

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

Einfluss von Melatonin auf die Barrierefunktion im Caco-2-Zellkulturmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tobias Holtmanns
(2025)

Angabe der Gutachter/Innen

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Christian Vollmer

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Hug Aubin

1. Bisher veröffentlichte Teile dieser Arbeit

Richard Truse , Inga Nolten, Jan Schulz , Anna Herminghaus , Tobias Holtmanns,
Lukas Gördes, Annika Raupach, Inge Bauer , Olaf Picker and Christian Vollmer

Topical Melatonin Improves Gastric Microcirculatory Oxygenation During Hemorrhagic
Shock in Dogs but Does Not Alter Barrier Integrity of Caco-2 Monolayers

Published on 28 August 2020

Front. Med. doi: 10.3389/fmed.2020.00510

2. Zusammenfassung deutsch

Die Darmschleimhaut ist nicht nur für die Aufnahme von Nährstoffen notwendig, sondern besitzt auch eine wichtige Funktion als Barriere gegen Bakterien und Endotoxine im intestinalen Lumen. Durch Hämorrhagie oder Sepsis kommt es zu einer Umverteilung des Blutflusses zu Gunsten überlebenswichtiger Organe wie Herz und Gehirn, sodass die viszerale Durchblutung beeinträchtigt wird. Diese Verminderung des mikrozirkulatorischen Sauerstoffangebots kann eine Störung der intestinalen Barrierefunktion der Mukosa zur Folge haben und somit die Translokation von Bakterien und die Entstehung einer Sepsis begünstigen. Es wurde bereits gezeigt, dass die systemische Applikation von Melatonin in vielen Organen protektiv wirkt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die lokale mikrozirkulatorische Oxygenierung der gastralen Mukosa während einer milden Hämorrhagie bei Hunden durch Melatonin verbessert werden kann. Gleichzeitig wurde der Schock-induzierte Schaden der intestinalen Barrierefunktion vermindert. In diesem Zusammenhang ist allerdings unklar, ob die protektiven Effekte von Melatonin durch die Modifikation der Mikrozirkulation oder durch direkte, z. B. antioxidative Effekte vermittelt werden und ob dadurch auch die topische Gabe von Melatonin, die Barrierefunktion von Epithelien direkt günstig beeinflussen kann. Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob die lokale Gabe von Melatonin einen positiven Effekt auf die durch EGTA- (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) oder H₂O₂- (Wasserstoffperoxid) geschädigte Barrierefunktion des intestinalen Epithels ausübt. Eine in-vitro Simulation des intestinalen Epithels erfolgte anhand der Zelllinie Caco-2 (humane epitheliale colorektale Adenocarcinomzellen), welche auf eine permeable, kollagenisierte Membranen ausgesät und über 21 Tage (+ 0 bis 3 Tage) kultiviert wurde. Die Zellkulturen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen und Zeiten sowohl von EGTA (20 – 300 mM, 2 – 24 h) als auch von H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) (1 – 300 mM, 2 – 6 h) mit Melatonin (0,1 mg/ml) ko- bzw. 30 Minuten prä-inkubiert. Die Barrierefunktion wurde mittels einer TEER-Messung (transepithelial electrical resistance) vor und nach Behandlung der Zellkulturen geprüft, indem der transepitheliale Widerstand (Ohm/cm²) mittels eines Voltmetres gemessen wurde. Mittels eines Diffusions-Assay wurde zusätzlich die Permeabilität der Zellbarriere nach der Behandlung der Zellkulturen gemessen. Hierfür wurde Lucifer-Yellow als Marker für parazelluläre Translokation auf die Zellen gegeben und anschließend der transepitheliale Farbübertritt bestimmt.

Es konnte eine konzentrations- und zeitabhängige Schädigung der Zellbarriere sowohl durch EGTA als auch durch H₂O₂ gezeigt werden. Eine Ko- oder Prä-Inkubation mittels Melatonin hatte keinen positiven Einfluss auf die Barrierefunktion, zu lediglich zwei Zeitpunkten reduzierte Melatonin die EGTA-induzierte Barrierereduktion zusätzlich. Dies war unter H₂O₂ nicht der Fall. Positive Effekte von Melatonin auf die Darmbarriere sind somit nicht auf direkte,

z. B. antioxidative Effekte von Melatonin zurückzuführen, sondern vermutlich auf eine verbesserte Mikrozirkulation.

3. Zusammenfassung englisch

The intestinal mucosa is not only necessary for the absorption of nutrients, but also has an important function as a barrier against bacteria and endotoxins in the intestinal lumen. Hemorrhage or sepsis redistributes blood flow in favor of vital organs such as the heart and brain, impairing visceral blood flow. This reduction in the microcirculatory oxygen supply can result in a disruption of the intestinal barrier function of the mucous membrane and thus promote the translocation of bacteria and the development of sepsis. It has already been shown that systemic application of melatonin has a protective effect in many organs. It was shown that local microcirculatory oxygenation of the gastric mucosa can be improved by melatonin during mild hemorrhage in dogs. At the same time, the shock-induced damage to the intestinal barrier function was prevented. In this context, however, it is unclear whether the protective effects of melatonin are through the modification of the microcirculation or directly, for example antioxidant effects mediated and whether the topical administration of melatonin can have a direct beneficial effect on the barrier function of epithelia. The aim of this work was therefore to investigate whether local administration of melatonin has a positive effect on the barrier function of the intestinal epithelium damaged by EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraaceticacid) or H₂O₂ (hydrogenperoxid). An in-vitro simulation of the intestinal epithelium was carried out using the cell line Caco-2 (human epithelial colorectal adenocarcinoma cells), which was seeded on a permeable, collagenized membrane and cultured for 21 days (+ 0 to 3 days). The cell cultures were co- or pre-incubated for 30 minutes. The barrier function was tested using a TEER measurement (transepithelial electrical resistance) before and after treatment of the cell cultures, with the transepithelial resistance (Ohm/cm²) being measured using a voltmeter. Using a diffusion assay, the permeability of the cell barrier was also measured after the treatment of the cell cultures. For this purpose Lucifer Yellow was applied to the cells as a marker for paracellular translocation and the transepithelial color transfer was then determined.

Concentration- and time-dependent damage to the cell barrier was demonstrated by both EGTA and H₂O₂. Co- or pre-incubation with melatonin had no positive influence on the barrier function. At only two points did melatonin additionally reduce the EGTA-induced barrier reduction. This was not the case under H₂O₂. Positive effects of melatonin on the intestinal barrier are therefore not due to direct, for example due to antioxidant effects of melatonin, but probably to improved microcirculation.

4. Abkürzungsverzeichnis

DPBS	Dulbecco's Phosphate Buttered Saline
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
m ²	Quadratmeter
M	Molar
mM	Millimolar
μl	Mikroliter
NGS	Normal Goat Serum
Nm	Nanometer
P _{app}	„apparent permeability index“; Permeabilitätskoeffizient
rpm	Round per minute
TEER	transepithelial electrical resistance
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid (Vitalfärbung von intakten Zellen)
°C	Grad Celsius
Ω	Ohm (elektrischer Widerstand)

5. Inhaltsverzeichnis

1.	Angabe Gutachter/Innen.....	i
2.	Bisher veröffentlichte Teile dieser Arbeit.....	i
3.	Zusammenfassung deutsch.....	I
4.	Zusammenfassung englisch.....	III
5.	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
6.	Inhaltsverzeichnis.....	V
7.	Einleitung.....	1
I.	Verdauung, intestinales Epithel.....	1
II.	Anatomie, Histologie.....	1
III.	Funktion der Barriere.....	1
IV.	Hämorrhagie/Sepsis.....	2
V.	Melatonin.....	2
8.	Ziele der Arbeit.....	3
9.	Material.....	3
I.	Geräte.....	3
II.	Zelllinie.....	4
III.	Chemikalien.....	5
10.	Methoden.....	6
I.	Zellkultivierung/Behandlung von Zellen.....	6
II.	Inserts.....	7
III.	TEER-Messung.....	8
IV.	Lucifer-Yellow Diffusions-Assay.....	9
V.	EGTA.....	10
VI.	H ₂ O ₂	11
VII.	XTT.....	12
VIII.	Statistik.....	13
11.	Ergebnisse.....	13
I.	EGTA schädigt die Barrierefunktion von Caco2-Zellen dosis- und zeitabhängig.....	13
II.	Die alleinige Inkubation mit Melatonin zeigt keinen Effekt auf die Barrierefunktion.....	15
IV.	H ₂ O ₂ schädigt die Barrierefunktion von Caco2-Zellen dosis- und zeitabhängig.....	17
V.	Eine Ko-Inkubation mit Melatonin und H ₂ O ₂ zeigt keinen protektiven Effekt auf die Barrierefunktion.....	18
VI.	Eine Prä-Inkubation mit Melatonin zeigt keinen protektiven Effekt auf die Barrierefunktion.....	19

VII.	Eine Ko- bzw. Prä-Inkubation mit Melatonin hat keinen Einfluss auf die Viabilität der Caco2-Zellen	20
12.	Diskussion	22
I.	Caco2-Monolayer als Modell für intestinale Barriere.....	23
II.	Lucifer Yellow-Assay und TEER-Messung als Messmethode für die intestinale Barrierefunktion	23
III.	Rolle von Melatonin in der Protektion bei Hämorrhagie/Schock	24
13.	Schlussfolgerung	26
14.	Literatur- und Quellenverzeichnis	27
	References	Fehler! Textmarke nicht definiert.
15.	Danksagung	30

6. Einleitung

I. Verdauung, intestinales Epithel

Die Energiezufuhr des Körpers für lebenswichtige Stoffwechselprozesse erfolgt über die Nahrungsaufnahme. Hierfür wird die Nahrung über die Organe des Magen-Darm-Trakts zerkleinert, verarbeitet und resorbiert. Die Oberfläche des Magen-Darm-Trakts besteht aus intestinalen Epithelzellen¹. Diese haben, neben der Aufnahme von Nährstoffen, die Aufgabe, unerwünschte Stoffe daran zu hindern, die Epithelschicht zu durchqueren. Hierfür ist eine zelluläre Spezialisierung aus einer Konstellation verschiedenster gewebespezifischer Proteine verantwortlich².

II. Anatomie, Histologie

Der Wandaufbau von Speiseröhre, Magen, Dünn- und Dickdarm besteht aus vier Schichten: der Mukosa, Submukosa, Muskularis und Serosa bzw. Adventitia, wobei histologisch Unterschiede bestehen. Durch Falten, Zotten und Mikrovilli hat der Dünndarm eine Oberfläche von ca. 100 - 200 m².

Neben den Enterozyten befinden sich in der Mukosa Becherzellen zur Schleimbildung, Lymphozyten zur Abwehr von Mikroorganismen und Bürstenzellen, deren Funktion noch nicht sicher geklärt ist. Man geht hierbei am ehesten von Sinneszellen aus.

Das Colon dient hauptsächlich der Resorption von Wasser und Natriumchlorid aus dem Speisebrei. Der eingedickte Speisebrei im Colon enthält eine physiologische meist anaerobe bakterielle Darmflora. Pro ml Stuhl sind ca. 10^{11} bis 10^{12} Bakterien vorhanden¹. Diese werden lediglich durch die Barrierefunktion der Schleimhaut vom Blutkreislauf getrennt.

III. Funktion der Barriere

Epithelzellen, auch Enterozyten, sind über Membranproteine, die Tight Junctions, miteinander verbunden. Diese bilden eine parazelluläre Diffusionsbarriere und sind entscheidend für die Barrierefunktion eines Epithels. Liegen Tight Junctions hintereinander, steigt die Barrierefunktion logarithmisch an³. Einige Tight Junctions bilden die Gruppe der Occludine und Claudine. Diese stehen mit intrazellulären Membranproteinen, den ZO-Proteinen, nach Zonula occludens benannt, in Verbindung.

IV. Hämorrhagie/Sepsis

Starke Blutungen, auch Hämorrhagie, (von Haimorrhagia [αἱμορραγία], *haĩma*: Blut, *rhegnumai*: durchbrechen) und der damit verbundene hypovoläme Schock sind eine der Hauptursachen für potenziell vermeidbare Todesfälle im Krankenhaus. Hierdurch sterben jährlich mehr als fünf Millionen Menschen weltweit ⁴. Während eines hämorrhagischen Schocks kommt es zum Blutdruckabfall und der Blutfluss wird daher frühzeitig zugunsten lebenswichtigerer Organe, d. h. Herz und Gehirn, umverteilt. Auch im Rahmen eines septischen Schocks kommt es zu einem Blutdruckabfall ⁵. Hierdurch ist die Splanchnikusperfusion frühzeitig beeinträchtigt ⁶. Eine mesenteriale Hypoperfusion induziert eine Gewebhypoxie, die letztendlich ein Organversagen verursacht. Die lokale Abschwächung der mikrozirkulatorischen Sauerstoffversorgung reduziert die Barrierefunktion der Schleimhaut und ermöglicht die Translokation von Bakterien und Endotoxinen in das Blut der Pfortader und in die mesenteriale Lymphzirkulation, wodurch eine systemische Entzündung hervorgerufen wird ⁷. Die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Splanchnikusperfusion und damit der Barrierefunktion, insbesondere während eines Kreislaufschocks, wird als entscheidend für die Prävention und Therapie kritischer Erkrankungen angesehen, um die Barriere aufrecht zu erhalten ^{8 9}.

Der Erhalt der Splanchnikusperfusion im schweren Schock ist jedoch nicht unter allen Umständen möglich. Daher werden weitere Wege gesucht, um die Barrierefunktion unabhängig von der Perfusion zu erhalten und wiederherzustellen.

In diesem Zusammenhang könnte Melatonin von besonderer Bedeutung sein.

V. Melatonin

Melatonin ist ein körpereigenes Hormon, welches in der Epiphyse (Zirbeldrüse) aus Serotonin produziert wird. Es hat Einfluss auf den zirkadianen Rhythmus des menschlichen Körpers und wird vor allem nachts ausgeschüttet und fungiert als Signal der Dunkelheit ¹⁰. Melatonin hat einen bedeutenden Einfluss auf die menschliche Gesundheit. Bei einer gestörten Melatoninausschüttung und damit gestörtem circadianen Rhythmus kann es zu Tumorerkrankungen, metabolischem Syndrom, Diabetes mellitus Typ II, Hypertonie und verschiedenen Stimmungs- und kognitiven Störungen kommen ¹⁰. Es ist bekannt, dass Melatonin gegen oxidativen Stress schützt und als Radikalfänger wirkt ¹¹. Eine exogene Verabreichung kann die hepatische Mikrozirkulation und Leberfunktion verbessern und reduziert stressinduzierte Magenläsionen ¹².

Die systemische Applikation von Melatonin, welches ebenfalls in vielen Organen protektiv wirkt, konnte die lokale mikrozirkulatorische Perfusion der gastralen Mukosa während einer

milden Hämorrhagie bei Hunden verbessern und verminderte den Schock-induzierten Schaden der intestinalen Barrierefunktion ¹³.

In diesem Zusammenhang ist allerdings unklar, ob die protektiven Effekte von Melatonin durch die Modifikation der Mikrozirkulation oder durch direkte, z. B. antioxidative Effekte, vermittelt werden und ob dadurch auch eine topische Gabe von Melatonin die Barrierefunktion von Epithelien direkt günstig beeinflussen kann.

7. Ziele der Arbeit

Daher sollten die folgenden Fragestellungen in dieser Arbeit beantwortet werden:

- 1) Welchen Einfluss hat Melatonin auf die Barrierefunktion von Caco-2 Zellen?
- 2) Welchen Einfluss hat Melatonin auf die gestörte Barrierefunktion nach Gabe von EGTA oder H₂O₂?
- 3) Hat der Zeitpunkt der Melatonin-Gabe (prophylaktisch vs. therapeutisch) einen Einfluss auf die Barrierefunktion?

8. Material

I. Geräte

Die verwendeten elektronischen Laborgeräte sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Geräte	Herstellerfirma und Firmensitz
Flüssigstickstofftank	Germancryo GmbH, Serial No. 762-007-W4, D-41363 Jüchen
Inkubator	Binder, CB 150, D - 78532 Tuttlingen
Arbeitsbank	Kendro, KS 15, D – 63505 Langenselbold
Ultratiefkühlschrank	Thermo Fisher Scientific, Model 907, Marietta OH 45750, USA
Feinwaage	sartorius AG Göttingen, LA 230S, 91109377, Sartorius AG, BP 1200
pH-Meter	mettler Toledo, Knick, Digital-pH-Meter 646, D-58239 Schwerte
Schüttler ohne CO2 inkubieren	Heidolph Unimax 1010, No: 549-90010-00-3, D-91126 Schwabach
Mikroskop	Leica Micosystems GmbH, Type: 020-519.012, D-35578 Wetzlar
Lichtquelle	Leistungselektronik Jena GmbH, ebq 100 dc -1, D-07747 Jena
Absauger	KNF, N 811 Laboport, Type N811KN.18, France 68128 Village-Neuf
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Centrifuge 5417 R, D-22339 Hamburg, Germany

Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Rotina 420 R, D-78532 Tuttlingen, Germany
Zellkulturflasche TC-Flasche T75	Sarstedt AG, REF:83.3911.002, D-51588 Nümbrecht, Germany
Vortex	Scientific Industries SI, Vortex-Genie 1 Touch Mixer, Bohemia, New York 11716, USA

Tabelle 1: elektronische Laborgeräte mit Angabe der Herstellerfirma mit Firmensitz

Verwendete nicht-elektronische Geräte und Materialien sind in Tabelle 2 aufgelistet:

TC-Flasche T75 Standard	Sarstedt AG & Co. KG, REF 83.3912.002, D-51588 Nümbrecht
TC-Platte 12-Well, Standard, F	Sarstedt, REF 83.3921, D-51588 Nümbrecht
TC-Platte 96 Well, Standard, F	Sarstedt, REF 83.3924, D-51588 Nümbrecht
TC-Inserts, 12 Well	Sarstedt AG & Co., REF.83.3931.040, D-51588 Nümbrecht
Tissue Culture Dish 60 x 15 mm	83.1801, Sarstedt, NC 28658-0468, D-51588 Nümbrecht
Tissue Culture Dish 35 x 10 mm	83.1800, Sarstedt, NC 28658-0468, D-51588 Nümbrecht
Parafilm	Merck KGaA, D-82024 Taufkirchen, Deutschland
Stripette 25 ml, 10 ml, 5 ml	Corning Incorporated costar, REF 4489, NY 14831, USA
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, REF 70.1186.210, D-51588 Nümbrecht, Germany
Tip StackPack	Sarstedt, REF 70.760.502, D-51588 Nümbrecht
Quality Pipette Tips	Sarstedt, REF 70.762.100, D-51588 Nümbrecht
Falcons groß	Sarstedt AG & Co. KG, REF 62.547.254, D-51588 Nümbrecht
Cellstar Tubes 15ml	Greiner Bio-one GmbH, LOT E18033NG, D-72636 Frickenhausen
Röhre/Tubes	Sarstedt AG & Co. KG, REF 62.554.502, D-51588 Nümbrecht
CryoPure Gefäß 1,8ml	Sarstedt, REF 72.379.002, D-51588 Nümbrecht
Tips 1000µl	Starlab GmbH, Tip Ohne Lot: J127067G, D-22143 Hamburg
Eppendorfer Mikroreagiergefäß 1,5ml Vial	Sarstedt AG & Co. KG, REF 72.690.001, D-51588 Nümbrecht
Neubauer-Zelle	LaborOptik Neubauer 0,0025mm ² , Lancing BN15 8TN, UK
Filter (20µm blau)	Sartorius AG, Lot No. 20685103, D-37079 Göttingen
Filteraufsatz 250ml	Techno Plastic Products AG, 99255, CH-8219 Trasadingen, Switzerland

Tabelle 2: nicht-elektorinische Laborgeräte und Materialien mit Angabe der Herstellerfirma mit Firmensitz

II. Zelllinie

Humane Colon Adenocarcinom Zelllinie Caco-2 (European Collection of Cell Cultures No. 86010202)

Dankenswerter Weise bereitgestellt durch Dr. H. Steinbrenner (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland).

Die humane Adenokarzinom-Zelllinie Caco-2 zeigt funktionelle und anatomische Ähnlichkeiten mit dem intestinalen Epithel und ist ein etabliertes Modell für die Untersuchung der intestinalen Permeabilität ¹⁴.

III. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Minimal Essential Medium Eagle	Sigma, St. Louis, M5650-500ml, MO 63103 USA
Fetales Kälber Serum	Gibco Life Technologies Limited, REF. 10270-106, NY 14072, USA
MEM NEAA (100x) 100ml	Gibco Life Technologies, REF: 11140-035, NY 14072, USA
GlutaMAX	Life Technologies gibco, REF. 35050-061, Grand Island, NY 14072, USA
PenStrep (Penicillin Streptomycin) 100ml	Life Techologies gibco, REF: 15140-122, NY 14072, USA
Ethanol 99.8% (V/V) 5l UN 1170	Shell Deutschland Oil GmbH, EG-Nummer 200-578-6, D-22335 Hamburg
Trypsin	Life Technologies gibco, REF. 25300-054, Grand Island, NY 14072, USA
Collagen Type I solution from rat tail	Sigma Aldrich Chemie GmbH C3867-1VL, LOT: SLBL7800V, D-82024 Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Art.-Nr. A994.1, D-76185 Karlsruhe
EGTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Art.-Nr. 3054.1, D-76185 Karlsruhe, Germany
Lucifer Yellow (L0144-25MG, Sigma)	Sigma-Aldric, L0144-100MG, St. Louis, MO 63103,USA
Melatonin (73-31-4, Sigma)	Sigma-Aldrich Co., M5250-1G, St. Louis, MO 63103, USA
Triton	Fluka BioChemika, 93426, Lot: 47621/1, Fluka Chemie AG, Ch-9471 Buchs, Schweiz
H2O2 (30%) 250ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Art.-Nr. 8070.2, D-76185 Karlsruhe
Dade Aqua-Clear	Dade Behring, MAT6706/70, D-35041 Marburg, Germany
Sodium Pyruvat 110mM 100ml	Gibco Life Technologies, REF 11360-070, NY 14072, USA
DMEM (1x) Dulbecco's Modified Eagle Medium 500ml	Gibco Life Technologies, REF 31053-028, NY 14072, USA
XTT Sodium Salt A2240,0100 100mg	AppliChem GmbH, BioCemica M=673,50g/mol, LOT: 4M010777, D-64291 Darmstadt
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	Merck KGaA, CAS-No. 10043-52-4, D-64271 Darmstadt
Magnesiumchloride (MgCl ₂ -6H ₂ O)	Merck-Schuchardt, 8.14733.0500, D-85662 Hohenbrunn
Magnesium Sulfate (MgSO ₄ -7H ₂ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Art.-Nr. P027.1, D-76185 Karlsruhe

Potassium Chloride (KCl)	Fluka Chemie GmbH, 60130, CH-9471 Buchs
Potassium Phosphate (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Art.-Nr. 3904.2, D-76185 Karlsruhe
D-Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Art.-Nr. 8551.1, D-76185 Karlsruhe
Sodium Chloride (NaCl)	VWR Chemicals, B-3001 Heverlee, Belgien
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Art.-Nr. P030.1, D-76185 Karlsruhe
D-Glucose (Dextrose)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Art.-Nr. X997.2, D-76185 Karlsruhe
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Art.-Nr. HN77.4, D-76185 Karlsruhe
Tris Pufferan >99,9%	Carl Roth GmbH, Art.-Nr. 5429.3, D-76185 Karlsruhe
Natriumhydroxid Plätzchen 250g	Merck, 525 C483795, D-64271 Darmstadt
Salzsäure rauchend 37%	Emsure, 1.00317.1011, Merck KGaA, 64271 Darmstadt
Essigsäure (Eisessig) 100%	1.00063.2511, Merck KGaA, 64271 Darmstadt

Tabelle 3: verwendete Chemikalien mit Herstellerfirma und Firmensitz

9. Methoden

Zu Beginn des Vorhabens war im Labor zwar eine Zellkultur etabliert, eine etablierte Caco-2 Kultivierung bestand bisher nicht. Daher bestand ein Teil der vorliegenden Arbeit darin, die Durchführung von Versuchen zur Etablierung des Caco2-Modells zur Bestimmung der Barrierefunktion (siehe Kapitel 11. I bis IV) in Zusammenarbeit und Absprache mit den wissenschaftlichen Mitarbeitern zu koordinieren. Anschließend wurde ein Schädigungsmodell mit EGTA und H₂O₂ entwickelt (siehe Kapitel 11. V und VI).

I. Zellkultivierung/Behandlung von Zellen

Um die Caco-2 Zellen zu kultivieren, wurde zunächst ein Nährmedium hergestellt. Dazu wurde einem Standardmedium MEME (Sigma, St. Louis, MO 63103, USA) 100 ml (= 20%) fetales Kälberserum (Gibco, Life Technologies, NY 14072, USA), 6,1 ml (= 1%) MEM (NEAA Non Essential Amino Acid Solution = L-Glutamine; Gibco Life Technologies, NY 14072, USA), 6,1 ml (= 1%) Glutamax (L-Alanyl-L-Glutamin-Dipeptid; Gibco Life Technologies, NY 14072, USA) und 6,1 ml (= 1%) Penicillin / Streptomycin (Gibco Life Technologies, NY 14072, USA) hinzugefügt ¹⁵.

Die Caco2-Zellen lagerten in flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Zum Kultivieren wurden sie aus dem flüssigen Stickstoff zunächst aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in eine mit 10 ml Nährmedium-gefüllte Zellkulturflasche (TC-Flasche T75, Sarstedt AG) pipettiert und die Zellkulturflasche wurde mit insgesamt 50 ml Nährmedium gefüllt. Nach vier Stunden

wurde der erste Nährmediumwechsel durchgeführt und die Zellen bei 37 °C, 5% CO₂ und 21% O₂ kultiviert.

Um die Zellen für die Versuche auszusähen, wurden diese aus den Zellkulturflaschen gelöst und in kollagenisierte Inserts mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² pipettiert. Hierzu wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellkulturflasche mit 10 ml DPBS (Dulbecco's Balanced Salt Solution; Gibco, Life Technologies, NY 14072, USA) vorsichtig gewaschen und anschließend wieder abgesaugt. Nun wurden 3 ml Trypsin (Gibco, Life Technologies, NY 14072, USA) auf die Zellen in der Zellkulturflasche gegeben, gleichmäßig verteilt und fünf Minuten im Inkubator inkubiert. Nach der Einwirkzeit wurden fünf Milliliter Nährmedium hinzugefügt und die Zellen in dem Nährmedium mehrfach resuspendiert. Die Caco2-Zellen wurden gesplittet in eine neue Zellkulturflasche und in Inserts für die Versuche verteilt.

II. Inserts

Zur Messung der Barrierefunktion wurden die Zellen auf porösen Membranen (Inserts) angezüchtet (siehe Abb. 1). Als Vorbereitung wurden die Inserts (TC-Inserts, Transwell Clear, aus PET (Polyester), 12 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße, 12-Well; Sarstedt AG, Nümbrecht, Germany) vor Aussähen der Zellen zunächst kollagenisiert. Dafür wurde eine Lösung aus 6,82 ml Essigsäure 0,02 M (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) und 165,8 µl Kollagen (Collagen Type I solution from rat tail, Sigma life Science, Taufkirchen, Deutschland) angesetzt. In jedes Insert wurden 200 µl dieser Lösung pipettiert und drei Stunden einwirken gelassen. Danach wurde der Überstand abpipettiert und mit 200 µl DPBS pro Insert gewaschen und wieder abpipettiert. Anschließend wurden die 12-Well-Platten mit den Inserts über Nacht in der Arbeitsbank steril getrocknet und am Folgetag mit Parafilm (Merck, Taufkirchen, Deutschland) umwickelt und im Kühlschrank gelagert.

Um die Zellen in die Inserts auszusähen, wurden diese zunächst aus einer großen Zellkulturflasche mit Trypsin gelöst und unter der Neubauer-Zelle gezählt. Pro Insert wurden 2×10^5 Zellen ausgesät. Das entspricht einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro cm². Für das Zählen wurde das Deckglas der Neubauer-Zelle angefeuchtet und 20 µl der Zell-Nährmedium-Mischung aus der Zellkulturflasche am oberen Rand des Deckglases pipettiert, welche von alleine zwischen Deckglas und Zelle floss. Unter dem Mikroskop (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany, Type: 020-519.012) wurden vier Zählquadrate eingestellt und alle Zellen in den Quadraten gezählt, summiert und durch vier geteilt, um einen Durchschnittswert der Anzahl der Zellen pro Milliliter zu errechnen. Die Zell-Nährmedium-Mischung wurde zentrifugiert, Medium abgesaugt und so wieder aufgefüllt, dass $2,4 \times 10^6$ Zellen in 6 ml Nährmedium gelöst waren. Anschließend wurde die Zell-Nährmedium-Mischung resuspendiert. Die Inserts wurden mit 250 µl Nährmedium

vorgefüllt und anschließend 500 µl der Zell-Nährmedium-Mischung hinzugefügt. Die Wells wurden mit 1500 µl aufgefüllt und die Inserts-Well-Platten im Inkubator angezuchtet.

Die Zellen wurden für 21 Tage (+ 0 bis 3 Tage) inkubiert bis mikroskopisch eine dichte, differenzierte Zellschicht deutlich erkennbar war und eine TEER-Messung einen ausreichenden transepithelialen Widerstand zeigte (vgl. Kapitel III. TEER-Messung). Es fand dreimal wöchentlich ein Nährmediumwechsel statt. Dabei wurden 500 µl Nährmedium in die Inserts und 1500 µl in die Wells pipettiert. Es bildete sich eine durchgehende Zellschicht, vergleichbar mit dem intestinalen Epithel.

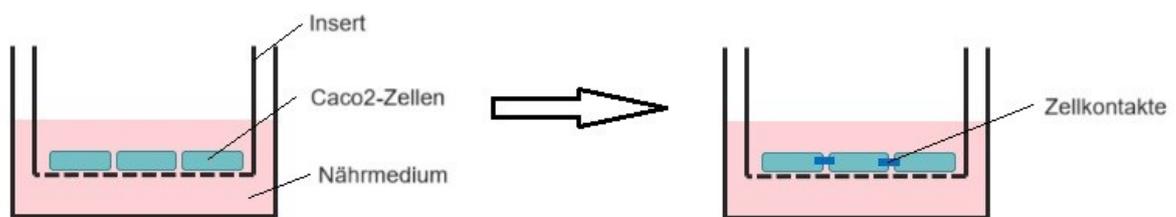


Abb. 1: Zellen in Inserts ausgesät und mit Nährmedium. Nach der Inkubationszeit von 21 + 0 bis 3 Tagen haben sich die Zellen ausdifferenziert und es hat sich eine Zellschicht mit Zellkontakten gebildet.

III. TEER-Messung

Die Permeabilität der Caco-2-Zellschicht wurde mittels transepitheliale Widerstand bestimmt. Eine TEER-Messung (transepithelial electrical resistance, TEER) erfolgte vor Nährmediumwechsel mit dem EVOM2 Volt-Meter (World Precision Instruments, Sarasota, USA). Hierfür wurde die Messkammer und Sonde zunächst mit Alkohol desinfiziert und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Die Messkammer wurde auf 37°C angewärmt und mit 3 ml Nährmedium befüllt und die Inserts für die Messung in die Messkammer gelegt. Die Sonde wurde daraufhin so platziert, dass sie möglichst nah an der Membran im Nährmedium lag (ca. 1-2 mm), jedoch nicht die Zellmembran berührt. Es wurde darauf geachtet, dass die Membran horizontal und immer im gleichen Abstand zur Elektrode stand und dass keine Luftblasen unterhalb der Elektrode oder des Inserts blieben. Ein Widerstand über 500 Ωcm^2 zeigte eine suffiziente Zellbarriere¹⁵.

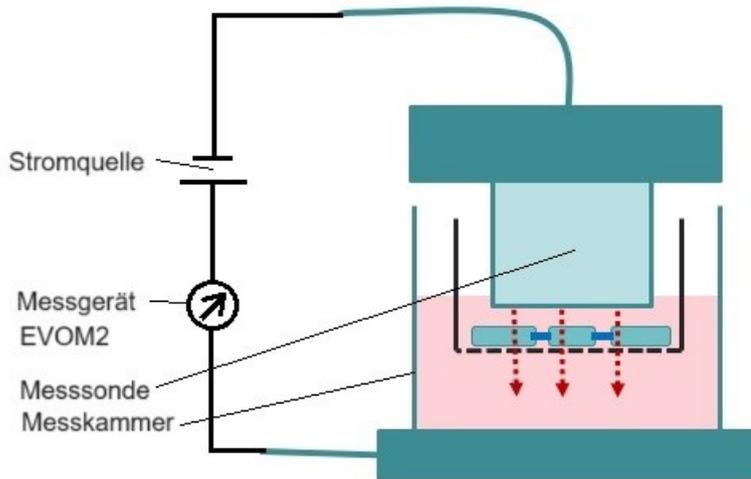


Abb. 2: TEER-Messung mittels EVOM2-Messgerät. Die Inserts wurden in die Messkammer gestellt und die Messsonde apikal der Zellmembran platziert. Die Messsonde befindet sich horizontal im Nährmedium, berührt die Zellschicht jedoch nicht.

IV. Lucifer-Yellow Diffusions-Assay

"Lucifer Yellow" (LY) ist ein wasserlösliches fluoreszierendes Farbstoffmolekül, das häufig in der Neurowissenschaft und Zellbiologie verwendet wird. Der Farbstoff wurde 1978 eingeführt und eignet sich zur Markierung von Zellen¹⁶. Die Methode des Diffusions-Assay mittels Lucifer Yellow ist eine Möglichkeit, die parazelluläre Permeabilität der Caco2-Zellschicht zu bestimmen.

Zunächst wurde eine Stocklösung Lucifer Yellow (384 μM , Sigma-Aw Idirc, St. Louis, USA) angesetzt. Dazu wurden 12,5 mg Lucifer Yellow Pulver in 5 ml HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) aufgelöst und vermischt. Anschließend wurde eine 0,2 mg/ml Lösung Lucifer Yellow für die Experimente angesetzt. Dazu wurden 640 μl der 2,5 mg/ml Lösung Lucifer Yellow in 7.360 μl HBSS verdünnt.

Zur Messung wurde in die Inserts auf die apikale Seite der Zellschicht 500 μl der 0,2 mg/ml Lucifer Yellow Lösung pipettiert (siehe Abb. 3). In die Well-Platte wurde 1500 μl farbloses HBSS gegeben. Es wurde daraufhin 2 Stunden bei 37°C ohne CO₂ und lichtgeschützt inkubiert. Zur Bestimmung der Permeabilität wurden je 100 μl Medium der apikalen (Inserts) und basalen Seite (Wellplatte) der Zellschicht auf ein 96-Well pipettiert. Zusätzlich wurde Medium alleine und 0,2 mg/ml Lucifer Yellow Lösung als Maximum-Wert ebenfalls auf die 96-Well-Platte pipettiert. Es erfolgte eine Fluoreszenzmessung mit einer Anregung bei 485 nm und einer Emission bei 535 nm. Hierbei wurde der Permeabilitätskoeffizient (P_{app} : apparent permeability index) ermittelt, das bedeutet der Lucifer Yellow Fluss durch die Membran über die Zeit.

Wir berechneten den P_{app} -Wert nach folgender Formel:

$$P_{app} = \left(\frac{\text{Volumen apikal}}{\text{Konzentration Lucifer Yellow} \times \text{Insertfläche}} \right) \times \left(\frac{\text{Konzentration Lucifer Yellow basal}}{\text{Diffusionszeit}} \right)$$

Volumen apikal der Zellschicht: 500 μl

Konzentration Lucifer Yellow: 0,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$

Insertfläche: 1,1 cm^2

Konzentration Lucifer Yellow basal: ermittelten wir durch die Fluoreszenzmessung nach den Versuchen ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)

Diffusionszeit: 2 Stunden = 7.200 Sekunden

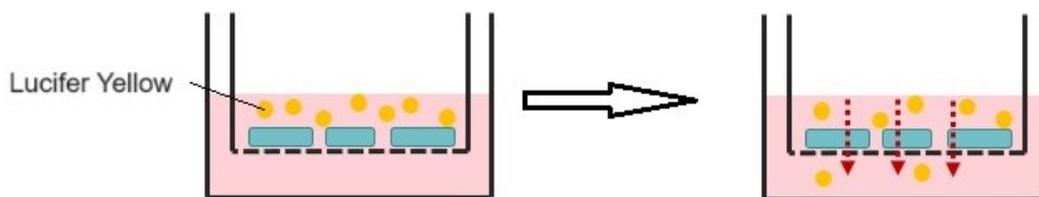


Abb. 3: Lucifer Yellow Diffusions-Assay. Lucifer Yellow wird auf die apikale Seite der Zellmembran pipettiert. Innerhalb einer Inkubationszeit von 2 Stunden diffundiert je nach Schädigung der Zellmembran eine gewisse Menge des Farbstoffes transmembran auf die basale Seite.

V. EGTA

Ethylenglycol-bis(amniothylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure ist eine Polyamino-Carboylsäure, die als Calcium-Chelator angewendet wird. In Zellen sind Calciumionen für wichtige Funktionen bei der Übertragung von Signalen und der Regulation von Zellprozessen verantwortlich, einschließlich der Regulierung von Zellkontakten. EGTA kann daher die Funktion von Calciumionen blockieren und dadurch die Aktivität von Signalwegen und Zellprozessen beeinflussen. Es beeinflusst hierbei auch die Bildung von Zellkontakten, indem es die Funktion von Calciumionen stört, die bei der Bildung von Zellkontakten wichtig sind.¹⁷

Ziel war es eine optimale Schädigung von Caco2-Zellen durch EGTA zu finden, in welcher die Zellen eine ausreichende Schädigung aufwiesen, jedoch nicht soweit geschädigt waren, dass keine Regeneration oder Reaktion auszumachen war.

Hierfür wurden die Zellen unterschiedlich lange mit EGTA inkubiert. Es wurden Zeitintervalle von 2-, 3,5- bzw. 4-, 16- und 24 Stunden untersucht. Zusätzlich wurde

versucht, passende EGTA-Konzentrationen zu ermitteln. Hierfür wurden tendenziell niedrigere Konzentrationen für längere Inkubationszeiten und höhere Konzentrationen für kürzere Inkubationszeiten verwendet. Dabei untersuchten wir:

bei 2-Stunden Inkubationszeit EGTA-Konzentrationen von 20-, 40-, 60-, 80-, 100-, 120-, 150-, 175-, 200-, 250-, 300 mM,

bei 3,5/4-Stunden 20-, 30-, 50-, 80-, 90-, 100-, 120- 150 mM,

bei 16-Stunden 5-, 10-, 15-, 20-, 30-, 100-, 120-, 150 mM

bei 24-Stunden 10-, 20-, 30-, 40-, 50-, 100-, 120-, 150 mM

Hierbei zeigte sich eine dosis- und zeitabhängige Schädigung, wobei die TEER-Messung deutlich sensitiver war und bereits bei niedrigeren Konzentrationen eine Barrierschädigung detektierte. Eine passende Zeit-Dosis-Schädigung zeigte sich bei 2 Stunden Inkubationszeit und einer EGTA-Konzentration von 150 bis 200 mM für Lucifer Yellow bzw. 40 bis 80 mM für die TEER-Messung und bei 24 Stunden Inkubationszeit und einer EGTA-Konzentration von 60 bis 70 mM.

Zur Bestimmung der Barrierefunktion und des möglichen protektiven Einflusses durch Melatonin führten wir Ko-Inkubationsversuche mit EGTA und Melatonin durch. Hierbei wurde eine zweistündige Inkubation mit einer Konzentration von 150 und 200 mM EGTA durchgeführt und die Differenz der Barrierefunktion vor und nach dem Versuch mittels P_{app} -Wert ermittelt. Zusätzlich führten wir eine zweistündige Ko-Inkubation mit 40, 80, 150 und 200 mM EGTA durch und bestimmten die Differenz der Barrierefunktion vor und nach Experiment mittels TEER-Messung.

Es folgten Ko-Inkubationversuche über einen Zeitraum von 24 Stunden. Dabei wurden EGTA-Konzentrationen von 60 und 70 mM gewählt und anschließend sowohl der P_{app} -Wert als auch die Differenz der TEER-Messung aus den Werten vor und nach dem Versuch bestimmt.

VI. H₂O₂

Um die Schädigung der intestinalen Barriere durch oxidativen Stress zu simulieren, wurde die Caco-2 Zellschicht mit H₂O₂ inkubiert. H₂O₂ ist hierbei in der Lage, ähnliche zelluläre und immunologische Effekte auszulösen, wie auch in vivo im Rahmen von Ischämie und Reperfusion beobachtet wurde ¹⁸.

Auch hierbei war unser Ziel eine optimale Schädigung von Caco2-Zellen durch H₂O₂ zu finden, in welcher die Zellen eine ausreichende Schädigung aufwiesen, jedoch nicht soweit geschädigt waren, dass keine Regeneration oder Reaktion auszumachen war.

Hierfür wurden die Zellen ebenfalls unterschiedlich lange mit H₂O₂ inkubiert. Es wurden Zeitintervalle von 2-, 4-, und 6-Stunden und H₂O₂-Konzentrationen von 1-, 3-, 10-, 30- und 300 mM untersucht. Zunächst wurde eine Stammlösung H₂O₂ mit einer Konzentration von 1 M hergestellt aus 102 µl H₂O₂ (30%) und 898 µl DMEM. Diese wurde entsprechend verdünnt.

Eine passende Schädigung zeigte sich bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden und einer H₂O₂-Konzentration von 10- bis 30 mM. Wir untersuchten daher die Zellen mit 10- und 30 mM H₂O₂ und einer Inkubationszeit von 4 Stunden. Es erfolgte jeweils eine Ko- oder Präinkubation (30 Minuten vor Zugabe von H₂O₂) der Zellen mit Melatonin 0,1 mg/ml oder reinem Medium. Es wurde jeweils ein Ansatz für die Messung mit TEER und ein Ansatz für die P_{app}-Bestimmung durchgeführt.

VII. XTT

XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid) ist ein farbloses Tetrazoliumsalz, das zum Nachweis von intakten Zellen (Vitalfärbung) genutzt wird. In der Histochemie findet es Anwendung zur Aktivitätsmessung von Dehydrogenasen in Zellen. Dabei wird das farblose Tetrazolium reduziert und zu einem roten Formazan.

Ziel dieser Versuche war es herauszufinden, welchen Einfluss H₂O₂ und Melatonin auf die Vitalität der Caco2-Zellen in den Experimenten hat.

Es wurde zunächst eine XTT-Stocklösung hergestellt. Dazu wurde 1 mg XTT-Salz in 1ml farblosem DMEM gelöst.

Vor Beginn des Experiments wurde das Nährmedium der 28 Tage inkubierten Zellen abpipettiert. Anschließend wurde jedes Well mit 200 µl farbloser DPBS gewaschen und 100 µl der Testkomponente in die Well pipettiert. Als Kontrollversuch wurde DMEM mit DMSO und DMEM mit Melatonin 0,1 mg/ml verwendet, um zu zeigen, dass hier keine Membranschädigung auftritt. Als Experimentkomponente wurde 10 mM bzw. 30 mM H₂O₂ mit sowohl DMSO als auch Melatonin 0,1 mg/ml verwendet. Als Negativkontrolle wurde Triton 1% genutzt. Anschließend wurden die Zellen 4 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Testkomponente abpipettiert und die Well mit 100 µl DMEM gewaschen. Daraufhin wurde 50 µl der XTT-Lösung pro Well hinzugegeben und die Well-Platte 1 Minute auf dem Schüttler bei 600 rpm geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen 2 Stunden inkubiert, danach erneut 3 Minuten auf dem Schüttler gestellt, um eventuelle Luftblasen zu entfernen. Zum Schluss erfolgte die Auswertung durch den Plate-Reader bei 450 nm.

VIII. Statistik

Primäre Endpunkte wurden als Veränderungen der Lucifer Yellow-Translokation und TEER definiert. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Statistische Unterschiede wurden mit GraphPad Prism Version 6.03 für Windows, GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA, analysiert. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mittels t-test durchgeführt, dabei wurde $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

10. Ergebnisse

I. EGTA schädigt die Barrierefunktion von Caco2-Zellen dosis- und zeitabhängig

In diesen ersten Versuchen sollte eine Zeit- und die Dosisfindung für EGTA erfolgen. Es wurden verschiedene Konzentrationen von EGTA zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Es zeigte sich ein sowohl dosis- als auch zeitabhängiger Anstieg des Lucifer Yellow-Durchtritts (P_{app}) über das Caco2-Epithel nach EGTA-Behandlung (Abb. 4). Hierbei zeigte sich, dass bei einer EGTA-Konzentration im Bereich von 60 bis 70 mM und einem Zeitpunkt von 24 Stunden, der Graph des P_{app} -Wert ansteigt (siehe Abb. 4). Dies bedeutet, dass hier lediglich ein Teil der Membran zerstört wurde und ein Teil seine Funktionsfähigkeit behält, sodass in diesem Intervall potentielle protektive Einflüsse am besten gemessen werden konnten.

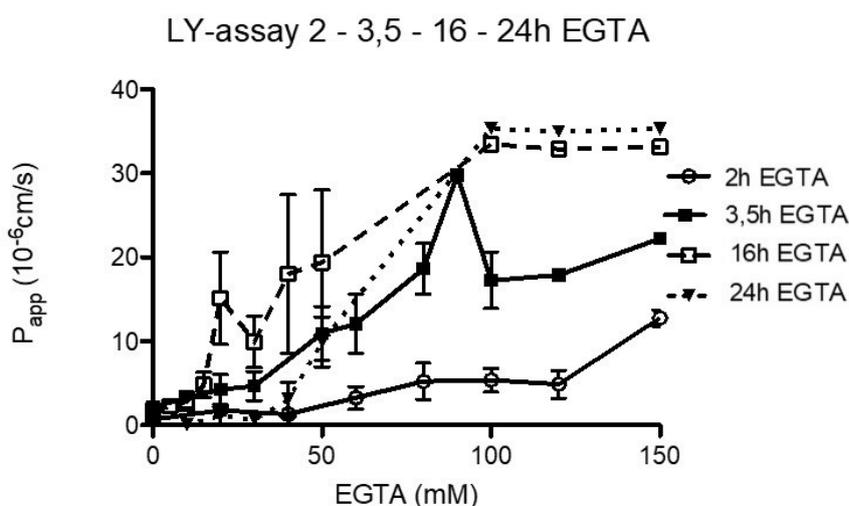


Abb. 4: Durchtritt von Lucifer Yellow durch die Epithelschicht nach Behandlung der Zellen mit 5-, 10-, 20-, 40-, 60-, 80-, 100-, 120-, 150-, 175-, 200-, 250-, 300 mM EGTA für 2, 3,5, 16, und 24h. Hierbei wurde der P_{app} -Wert (apparent permeability coefficient =

Permeabilitätskoeffizient) angegeben. Dieser gibt an, wie viel Farbstoff von der apikalen Seite der Membran auf die basale Seite diffundiert ist.

(Die Werte im Graphen wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben für jeweils n = 1 bis 8).

In weiteren Versuchen sollte eine Zeit- und Dosisfindung für die EGTA-Wirkung auf den transepithelialen elektrischen Widerstand TEER erfolgen. Es wurden die oben genannten Konzentrationen von EGTA zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Es zeigte sich eine dosis- und zeitabhängige Abnahme des Widerstands über dem Caco2-Epithel nach EGTA-Behandlung (Abb. 5). Hierbei zeigte sich, dass bei einer EGTA-Konzentration im Bereich von 40 bis 80 mM und einem Zeitpunkt von 2 Stunden eine Reduktion des TEER-Wertes erfolgt, ohne dass der Widerstand nahezu vollständig aufgehoben ist (siehe Abb. 5). Dies bedeutet, dass in diesem Bereich Effekte in weiteren Versuchen an ehesten gemessen werden könnten.

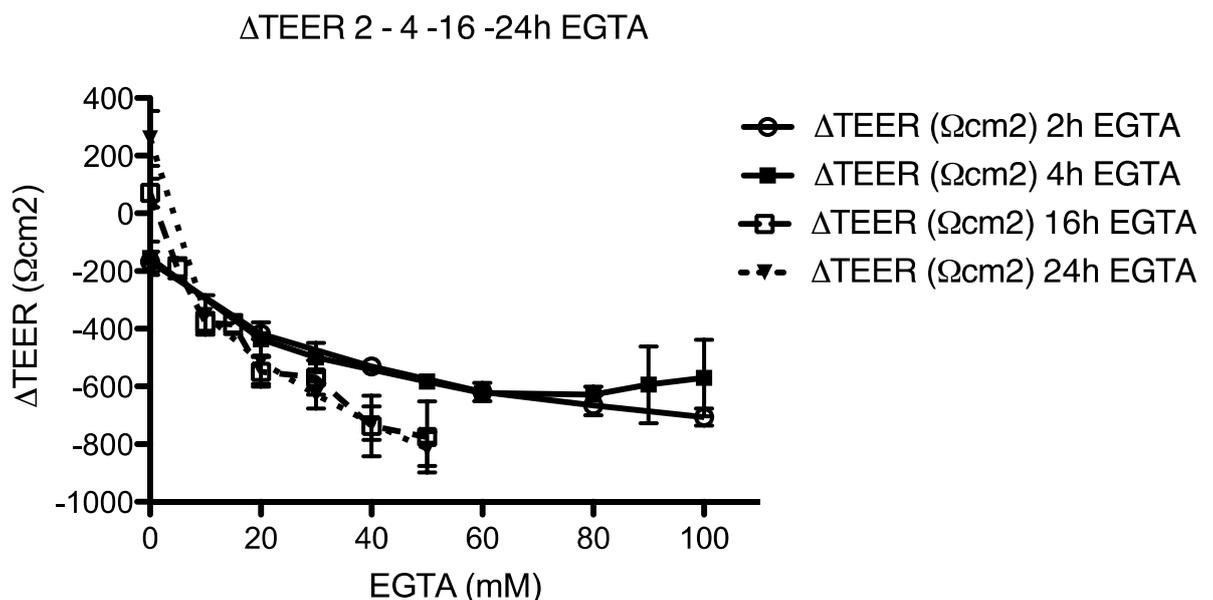


Abb. 5: Elektrischer Widerstand TEER (transepithelial electrical resistance) als Differenz vor und nach der Behandlung des Epithels mit 5-, 10-, 20-, 40-, 60-, 80-, 100-, 120-, 150-, 175-, 200-, 250-, 300 mM EGTA für 2, 4, 16 und 24 Stunden Inkubation.

(Die Werte im Graphen wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben für jeweils n = 1 - 8).

II. Die alleinige Inkubation mit Melatonin zeigt keinen Effekt auf die Barrierefunktion

In diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob die Inkubation der Caco2-Zellen mit Melatonin alleine positive oder auch negative Effekte auf die Barrierefunktion haben könnte. Hierbei wurden die gezüchteten Caco2-Zellen mit Melatonin in den Konzentrationen 100 ng/ml, 300 ng/ml, 1000 ng/ml und 0,1 mg/ml für 2, 4, 16 und 24 Stunden inkubiert. Hierbei zeigte sich keine Veränderung von der Permeabilität oder des Widerstandes der Caco2-Barriere, sodass sowohl positive als auch negative Einflüsse durch die alleinige Gabe von Melatonin nicht nachgewiesen werden konnten.

III. Die Ko-Inkubation mit Melatonin und EGTA zeigt keinen protektiven Effekt auf die Barrierefunktion

In diesem Versuchsteil sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Ko-Inkubation von EGTA als Barrierschädigung mit Melatonin als protektiven Schutz hat. Hierbei wurden die auf Inserts angezüchteten Caco2-Zellen mit EGTA in den Konzentrationen 60 und 70 mM ohne (-) und mit (+) Melatonin 0,1 mg/ml über 24 Stunden zusammen ko-inkubiert. Beim Vergleich der beiden Untersuchungsgruppen (mit vs. ohne Melatonin) konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Zur Überprüfung der Barrierefunktion wurde sowohl der P_{app} -Wert, als auch die Differenz des TEER-Wert vor und nach dem Versuch gemessen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Medium ohne (-) und mit (+) Melatonin inkubiert. Hierbei zeigte sich keine Änderung der Barrierefunktion der Zellen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit Triton 1% inkubiert. Hier zeigt sich eine maximale Schädigung der Barrierefunktion.

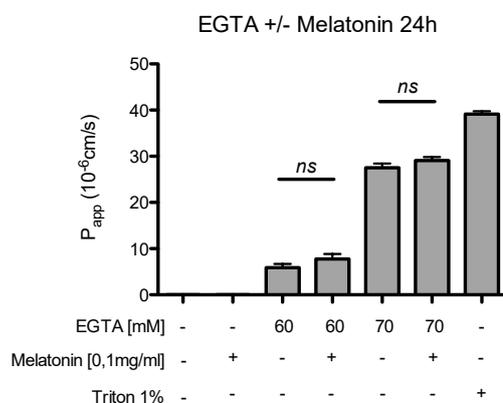


Abb. 6: Durchtritt von Lucifer Yellow (P_{app}) nach Inkubation der Zellen mit Medium ohne (-) EGTA, ohne (-) und mit (+) Melatonin, ohne (-) und mit (+) EGTA 60 bzw. 70 mM ohne (-) und mit (+) Melatonin und Triton über 24 Stunden.

(n = 3 pro Gruppe, Daten angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung, ns = nicht signifikant)

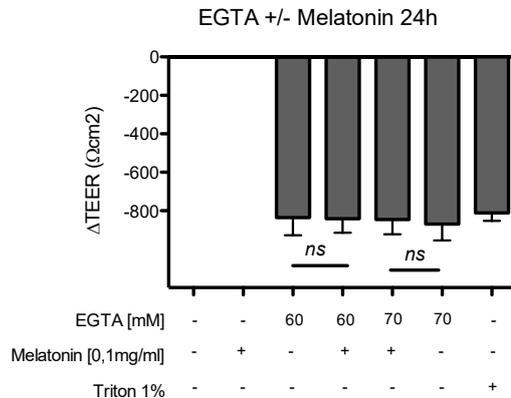


Abb. 7: Differenz des transepithelialen Widerstandes (TEER) mit Medium ohne (-) EGTA, ohne (-) und mit (+) Melatonin, ohne (-) und mit (+) EGTA 60 bzw. 70 mM ohne (-) und mit (+) Melatonin und Triton über 24 Stunden.

(n = 3 pro Gruppe, Daten angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung, ns = nicht signifikant)

Ein ähnlicher Versuchsteil wurde über einen kürzeren Zeitraum von zwei Stunden durchgeführt. Hierbei wurden die Caco2-Zellen mit EGTA in den Konzentrationen 150 und 200 mM ohne (-) und mit (+) Melatonin 0,1 mg/ml ko-inkubiert und die Barriere mittels P_{app} -Wert, bzw. mit 40, 80, 150 und 200 mM EGTA ohne (-) und mit (+) Melatonin 0,1 mg/ml ko-inkubiert und die Differenz des transepithelialen Widerstand (TEER) bestimmt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei der Ko-Inkubation ohne und mit Melatonin.

In zwei Versuchen bei einer EGTA-Konzentration von 80 mM und Bestimmung mittels TEER-Messung und bei einer EGTA-Konzentration von 200 mM in der P_{app} -Messung zeigte sich jedoch eine signifikante Verschlechterung der Barriere bei Zugabe von Melatonin.

Als Kontrolle wurden ebenfalls Medium ohne (-) und mit (+) Melatonin inkubiert. Es zeigte sich keine Änderung der Barrierefunktion der Zellen. Als Negativkontrolle wurde ebenfalls Triton 1% verwendet.

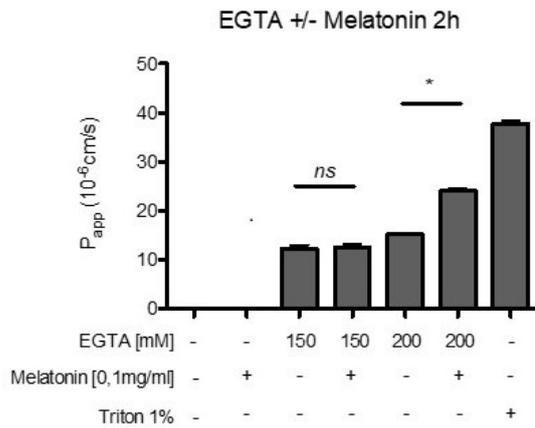


Abb. 8: Durchtritt von Lucifer Yellow (P_{app}) nach Inkubation der Zellen mit Medium ohne (-) EGTA, ohne (-) und mit (+) Melatonin, ohne (-) und mit (+) EGTA 150 bzw. 200 mM ohne (-) und mit (+) Melatonin und Triton über zwei Stunden.

(n = 3 pro Gruppe, Daten angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung, ns = nicht signifikant, * = $p < 0,05$)

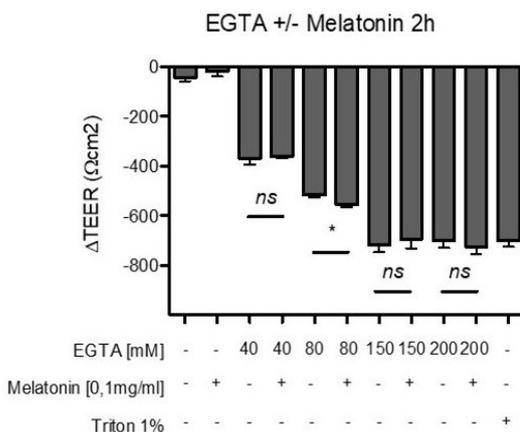


Abb. 9: Differenz des transepithelialen Widerstandes (TEER) mit Medium ohne (-) EGTA, ohne (-) und mit (+) Melatonin, ohne (-) und mit (+) EGTA 40, 80, 150 und 200 mM ohne (-) und mit (+) Melatonin und Triton über zwei Stunden.

(n = 3 pro Gruppe, Daten angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung, ns = nicht signifikant, * = $p < 0,05$)

IV. H_2O_2 schädigt die Barrierefunktion von Caco2-Zellen dosis- und zeitabhängig

Zur Simulation eines oxidativen Stresses wurden die Zellen mit H_2O_2 in Zeitintervallen von 2, 4, und 6 Stunden und H_2O_2 -Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 300 mM ko-inkubiert. Es wurde in diesem Versuchsteil der Einfluss von H_2O_2 auf die Caco2-Barriere untersucht. Es zeigte sich sowohl ein dosisabhängiger Anstieg des Lucifer Yellow-Durchtritts (P_{app}) (Abb. 10) als auch eine dosisabhängige Abnahme des elektrischen Widerstands über dem Caco2-Epithel nach H_2O_2 -Behandlung (Abb. 11).

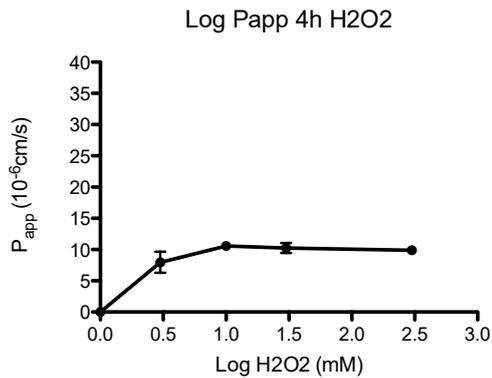


Abb. 10: Durchtritt von Lucifer Yellow nach Inkubation der Zellen mit H₂O₂ in verschiedenen Konzentrationen (Skala logarithmisch) (n = 2 pro Gruppe, Daten angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung)

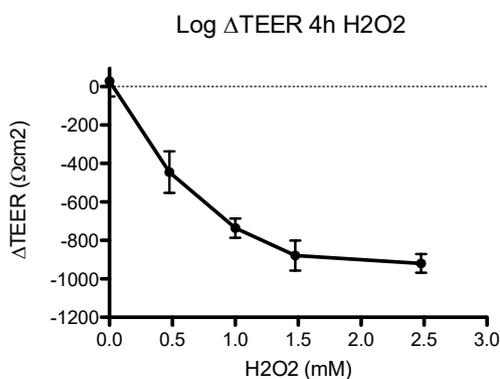


Abb. 11: Differenz des transepithelialen Widerstandes vor und nach Behandlung der Zellen mit H₂O₂ (Skala logarithmisch) (n = 2 pro Gruppe, Daten angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung)

V. Eine Ko-Inkubation mit Melatonin und H₂O₂ zeigt keinen protektiven Effekt auf die Barrierefunktion

In diesem Versuchsteil sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine Ko-Inkubation von H₂O₂ als Barrierschädigung mit Melatonin als potentiellen protektiven Schutz hat. Hierbei wurden die auf Inserts angezüchteten Caco2-Zellen mit H₂O₂ in den Konzentrationen 10 und 30 mM ohne (-) und mit (+) Melatonin 0,1 mg/ml über 4 Stunden zusammen koinkubiert.

Beim Vergleich der beiden Untersuchungsgruppen (mit vs. ohne Melatonin) konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Zur Überprüfung der Barrierefunktion wurde sowohl der P_{app}-Wert, als auch die Differenz des TEER-Wert vor und nach dem Versuch gemessen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Medium ohne (-) und mit (+) Melatonin inkubiert. Hierbei zeigte sich keine Änderung der Barrierefunktion der Zellen.

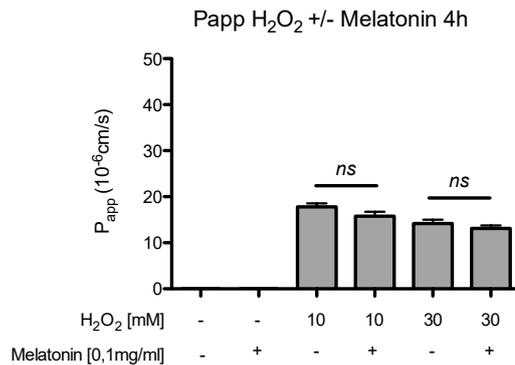


Abb. 12: (modifiziert nach ¹⁹) Durchtritt von Lucifer Yellow nach Behandlung der Zellen ohne (-) bzw. mit (+) Melatonin und H₂O₂ 10 bzw. 30 mM.

(n = 3 pro Gruppe, Daten angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung, ns = nicht signifikant)

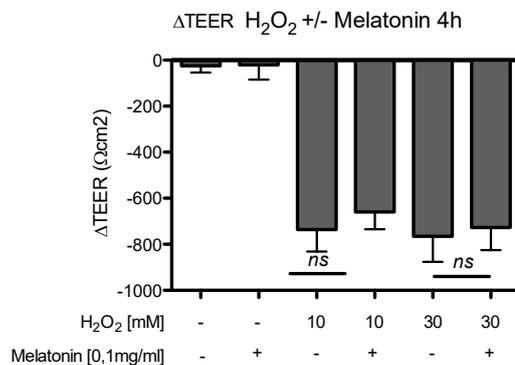


Abb. 13: (modifiziert nach ¹⁹) Differenz des transepithelialen Widerstandes vor und nach der Behandlung der Zellen ohne (-) bzw. mit (+) Melatonin und H₂O₂ 10 bzw. 30 mM.

(n = 3 pro Gruppe, Daten angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung, ns = nicht signifikant)

VI. Eine Prä-Inkubation mit Melatonin zeigt keinen protektiven Effekt auf die Barrierefunktion

Ein weiterer Versuchsteil untersuchte den Einfluss einer Prä-Inkubation von H₂O₂ als Barrierschädigung mit Melatonin als potentiellen protektiven Schutz hat. Hierbei wurden die auf Inserts angezüchteten Caco2-Zellen mit Melatonin 0,1 mg/ml 30 Minuten lang prä-inkubiert. Anschließend wurden die Caco2-Zellen über 4 Stunden mit H₂O₂ in den Konzentrationen 10 und 30 mM ohne (-) und mit (+) zusammen ko-inkubiert.

Beim Vergleich der beiden Untersuchungsgruppen (Ko-Inkubation vs. Prä-Inkubation mit Melatonin) konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Zur Überprüfung der Barrierefunktion wurde sowohl der P_{app}-Wert, als auch die Differenz des TEER-Wert vor

und nach dem Versuch gemessen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Medium und mit (+) Melatonin inkubiert. Hierbei zeigte sich keine Änderung der Barrierefunktion der Zellen.

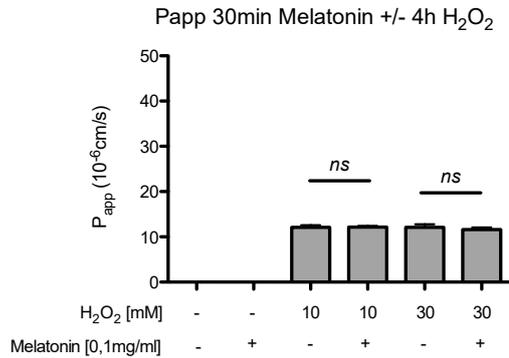


Abb. 14: Durchtritt von Lucifer Yellow (P_{app}) nach Prä-Inkubation der Zellen über 30 Minuten ohne (-) bzw. mit (+) 0,1 mg/ml Melatonin und H₂O₂ 10 bzw. 30 mM. (n = 3 pro Gruppe, Daten angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung, ns = nicht signifikant)

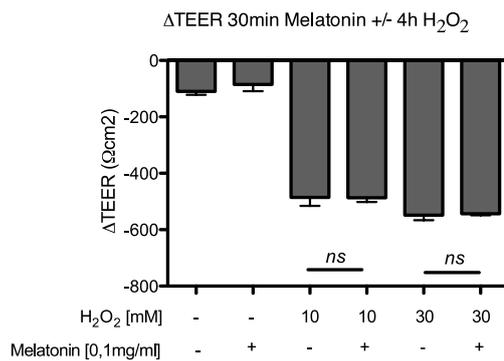


Abb. 15: Differenz des transepithelialen Widerstand nach Prä-Inkubation der Zellen über 30 Minuten ohne (-) bzw. mit (+) 0,1 mg/ml Melatonin und H₂O₂ 10 bzw. 30 mM. (n = 3 pro Gruppe, Daten angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung, ns = nicht signifikant)

VII. Eine Ko- bzw. Prä-Inkubation mit Melatonin hat keinen Einfluss auf die Viabilität der Caco2-Zellen

In diesem Versuchsteil wurde untersucht, welchen Einfluss eine Melatonin-Ko- bzw. Prä-Inkubation auf die Viabilität der Caco2-Zellen unter oxidativen Stress hat. Zunächst wurden die angezüchteten Caco2-Zellen mit (+) und ohne (-) 0,1 mg/ml Melatonin sowie mit und ohne H₂O₂ in den Konzentrationen 10 bzw. 40 mM 4 Stunden ko-inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 Stunden mit XTT-Salz inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit 1% Triton behandelt, um eine maximale Schädigung zu ermitteln.

Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen, die mit Melatonin ko-inkubiert wurden und den Zellen die nicht mit Melatonin ko-inkubiert wurden.

Anschließend erfolgte ein ähnlicher Versuchsaufbau. Dieses Mal wurden die angezüchteten Caco2-Zellen 30 Minuten lang mit (+) und ohne (-) 0,1 mg/ml Melatonin prä-inkubiert, bevor eine vierstündige Ko-Inkubation mit H₂O₂ in den Konzentrationen 10 bzw. 40 mM erfolgte. Als Negativkontrolle wurde auch hier 1% Triton verwendet.

Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen die mit Melatonin prä-inkubiert wurden und den Zellen die nicht mit Melatonin prä-inkubiert wurden.

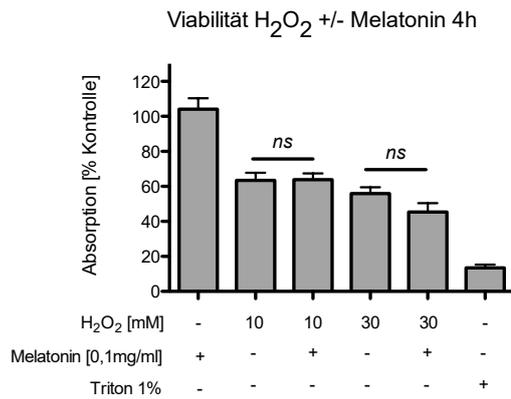


Abb. 16: Farbabsorption des XTT-Salzes nach Co-Inkubation ohne (-) und mit (+) 0,1 mg/ml Melatonin und H₂O₂ mit 10 bzw. 30 mM und Triton über 4 Stunden.

(n = 3 pro Gruppe, Daten angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung, ns = nicht signifikant)

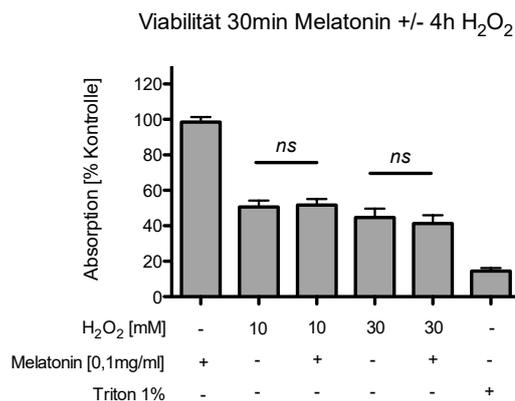


Abb. 17: Farbabsorption des XTT-Salzes nach 30 Minuten Prä-Inkubation ohne (-) und mit (+) Melatonin und anschließender H₂O₂-Inkubation mit 10 bzw. 30 mM über 4 Stunden und Triton.

(n = 3 pro Gruppe, Daten angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung, ns = nicht signifikant)

11. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welchen Einfluss Melatonin auf die Barrierefunktion hat.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen folgende Schlussfolgerungen bezüglich der eingangs gestellten Fragen zu:

- 1) Melatonin alleine hat keinen Einfluss auf die Barrierefunktion von Caco2-Zellen. In den Versuchen konnte weder ein positiver noch ein negativer Effekt nachgewiesen werden.
- 2) In unseren Versuchen konnte kein protektiver Effekt von Melatonin auf die gestörte Barrierefunktion nachgewiesen werden. Sowohl bei einer Schädigung mit EGTA als auch H_2O_2 konnten keine Effekte auf die Barrierefunktion durch Melatonin gezeigt werden. Zu lediglich zwei Zeitpunkten, in der Inkubation mit 80 mM EGTA über zwei Stunden Inkubationszeit zeigte sich in der TEER-Messung, und in der Inkubation mit 200 mM EGTA über zwei Stunden Inkubationszeit zeigte sich in der P_{app} -Messung, sogar eine verschlechterte Barrierefunktion unter Melatonin.
- 3) Der Zeitpunkt der Melatonin-Gabe hat keinen Einfluss auf die Barrierefunktion. Sowohl die Ko- als auch Prä-Inkubation zeigte in den Versuchen keinen protektiven Einfluss auf die Barrierefunktion der Caco2-Zellen.

Methodenkritik

I. Caco2-Monolayer als Modell für intestinale Barriere

1989 wurde bereits das Caco-2-Zellmodell durch Hidalgo et al. eingeführt. Es wird beschrieben, dass die Caco-2-Zellen Monoschichten von differenzierten Epithelzellen bilden, die durch Tight Junctions verbunden sind. Somit lässt sich die parazelluläre Diffusion von gelösten Stoffen verhindern²⁰. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass die Caco2-Zellen den Colonzellen in Ionenleitfähigkeit und Permeabilitätseigenschaften ähneln²¹.

Das Caco2-Modell ist heute ein etabliertes Modell für Resorption, wird aber auch als BarriermodeLL genutzt. In verschiedenen Studien zur Untersuchung der Arzneimittelabsorption in der Darmschleimhaut ist die Zelllinie Caco2 ein häufig verwendetes und etabliertes Modell^{22 23}.

Einschränkungen sind, dass es eine Zellkultur ist. Kritik ist, dass es Perfusion unberücksichtigt lässt. Dennoch ist es ein geeignetes Modell, um die Barrierefunktion zu untersuchen. Dies ist in dieser Studie ein Vorteil, da wir die isolierten, direkten Effekte von Melatonin unabhängig von den Effekten auf die Mikrozirkulation untersuchen wollten.

II. Lucifer Yellow-Assay und TEER-Messung als Messmethode für die intestinale Barrierefunktion

Vorangegangene Studien haben die Eignung des Calcium-Chelators, EGTA, als Schädigung der Integrität der Tight Junctions gezeigt²⁴. Ebenfalls wurde gezeigt, dass im Rahmen einer Sepsis vermehrt Peroxidasen (H_2O_2) gebildet werden und damit die Permeabilität des intestinalen Epithels gesteigert wird^{25 26}.

Weitere Studien zeigen, dass eine Permeabilität für anorganische Ionen proportional zur TEER-Messung ist²⁷. Die TEER-Messung ist eine etablierte Methode, die den elektrischen Widerstand über die Zellbarriere misst. Die TEER-Werte können jedoch aufgrund verschiedener Zusammensetzungen des Kulturmediums beeinflusst werden²⁸. Dies könnte dazu führen, dass nicht der exakte transepitheliale Widerstand gemessen wurde, sondern Einflüsse aus dem Kulturmedium unsere gemessenen Werte verändern. Um diesen Einfluss zu minimieren wurde stets das gleiche Medium bei den TEER-Messungen verwendet. Die TEER-Messung ist dennoch eine häufig genutzte Methode um in Zellkulturversuchen die Barrierefunktion des Epithels zu objektivieren.

Lucifer Yellow ist ein hydrophiler Farbstoff, mit dem eine parazelluläre Permeabilität durch Fluoreszenzwerte direkt berechnet werden kann²⁹. Einschränkungen sind jedoch, dass nur prä- und kokubiert werden kann. Wenn der Schaden verursacht ist, kann kein Effekt einer Therapie gesehen werden, da der Farbstoff dann schon übergetreten ist. Dennoch ist Lucifer Yellow ein gutes und etabliertes Modell, um parazelluläre Permeabilität zu messen und findet häufig Anwendung in Zellkulturversuchen.

III. Melatonin in der Protektion bei Hämorrhagie/Schock

Die Anwendung von Melatonin während der Wiederbelebung verbesserte das Überleben in einem Ratten- und Schweinemodell mit Polytrauma und hämorrhagischem Schock^{30 31}. In diesen Studien wurden keine mikrozirkulatorischen Variablen bewertet. Eine anschließende Untersuchung ergab jedoch eine erhöhte Harnausscheidung in den ersten Stunden der Wiederbelebung bei mit Melatonin behandelten Schweinen nach Trauma/Blutung³². Dies könnte mit einer verbesserten Nierenfunktion zusammenhängen. Man könnte spekulieren, dass eine verbesserte renale Mikrozirkulation während der Reanimation die renale Erholung förderte. Ähnlich wie bei unseren Ergebnissen, hatte die Anwendung von Melatonin keinen Einfluss auf makrohämodynamische Variablen. Die Anwendung von Melatonin in diesen Studien führte jedoch zu Plasmakonzentrationen von 8 bis 10 mM, die mehrere Größenordnungen, höher sind als die in unserer aktuellen Studie beobachteten Plasmaspiegel (~17 nM). Daher kann die Anwendung höherer Melatoninkonzentrationen zu ausgeprägteren mikrozirkulatorischen Wirkungen führen. Dies muss in Zukunft untersucht werden. Ergebnisse früherer Studien zeigen, dass exogenes Melatonin Störungen der Mikrozirkulation im Magen während eines hämorrhagischen Schocks verbessert¹³. Neben den bekannten entzündungshemmenden und antioxidativen Eigenschaften könnte die Modulation der Mikrozirkulation ein neuer Aspekt der bekannten gewebesetzenden Wirkung von Melatonin sein. Es wurde gezeigt, dass mehrere Gewebe, einschließlich des Darms, Melatoninrezeptoren exprimieren³³ und die antioxidativen Wirkungen von Melatonin möglicherweise rezeptorvermittelt sind³⁴. Ob die Melatonin-vermittelte Verringerung der Mikrozirkulation während der Blutung und die Modulation der mitochondrialen Funktion rezeptorabhängig sind, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Das Hauptziel der vorliegenden Studie war die Analyse der direkten Auswirkung von Melatonin auf die Integrität der Schleimhautbarriere *in vitro*. Die Inkubation einer CaCo-2-Monoschicht mit Melatonin hatte keinen protektiven Einfluss auf die Integrität der Schleimhautbarriere.

In unseren Experimenten analysierten wir die direkten Wirkungen von Melatonin auf die Integrität der Schleimhautbarriere unter Verwendung des gut etablierten Caco-2-Zellkulturmodells. Um die Bedingungen des durch Schock und Reperfusion induzierten oxidativen Stresses zu simulieren, wurden die Zellen einer exogenen Verabreichung von H_2O_2 ausgesetzt. Powers und Kollegen zeigten ein ähnliches Reaktionsmuster von Alveolarmakrophagen auf oxidativen Stress, der durch Schock und Reperfusion in vivo und durch H_2O_2 in vitro erzeugt wird ³⁵. In der vorliegenden Studie hatte Melatonin keine protektive Wirkung auf die Barrierefunktion der Schleimhaut. Weder die Lucifer Yellow-Translokation noch der transepitheliale elektrische Widerstand wurden nach exogener Melatonin-Anwendung verbessert. Zu lediglich einem Zeitpunkt zeigte sich sogar eine verschlechterte Barrierefunktion unter Melatonin. Dies könnte auf die Modulation des intrazellulären Calciums durch Melatonin zusätzlich zum eingesetzten EGTA zurückzuführen sein ³⁶ und war im Stressmodell mit H_2O_2 nicht nachzuweisen. Die fehlende protektive Wirkung ist angesichts der bekannten gewebesetzenden Eigenschaften von Melatonin zunächst unerwartet. Bei isolierten Fischhepatozyten, die $50 \mu M H_2O_2$ ausgesetzt waren, war die Zugabe von $0,1 \text{ mg/ml}$ Melatonin ausreichend, um die Akkumulation von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies zu verhindern und den antioxidativen Status durch Modulation von Transkriptionsfaktoren, z. B. NF- κB , ERK/, zu verbessern ³⁷. Es gibt große Datensätze zu den hepatoprotektiven Eigenschaften von Melatonin ³⁴, normalerweise mit einer Melatonin-Vorbehandlung für einige Tage oder manchmal sogar Wochen vor dem schädlichen Stimulus. Studien zur schützenden Wirkung auf den Darm sind spärlich. Es wurde gezeigt, dass die langfristige Verabreichung von oralem Melatonin die Permeabilität der Zwölffingerdarmschleimhaut während ethanolinduziertem Stress aufrechterhält ³⁸ und die durch Colitis induzierte erhöhte Darmpermeabilität reduziert ³⁹, wodurch die Darmbarrierefunktion bei chronischen Erkrankungen verbessert wird.

Im Gegensatz zu diesen langfristigen Vorbehandlungsprotokollen konzentrierte sich die vorliegende Studie auf kurzfristige Wirkungen. Während die antioxidativen Eigenschaften von Melatonin in Gegenwart von H_2O_2 wirksam sein könnten, sind seine entzündungshemmenden Eigenschaften im Zellkulturmodell zweitrangig. Weiterhin ist unklar, ob die gewebesetzenden Wirkungen von Melatonin hauptsächlich auf antioxidative Radikalfängereigenschaften oder auf systemische rezeptorvermittelte Wirkungen, z. B. auf die regionale Mikrozirkulation, zurückzuführen sind. In unserer vorherigen Studie war ein Anstieg des mikrovaskulären Blutflusses nach intravenöser Anwendung von Melatonin mit einer erhaltenen Darmbarrierefunktion während des hämorrhagischen Schocks verbunden ⁴⁰. Die fehlende Schutzwirkung von Melatonin im In-vitro-Modell weist darauf hin, dass die Schutzwirkung von Melatonin auf die Darmbarrierefunktion möglicherweise nicht über direkte Wirkungen auf die Darmschleimhaut vermittelt wird, sondern möglicherweise über eine Verbesserung der

lokalen Mikrozirkulation. Der experimentelle Aufbau imitiert jedoch keinen therapeutischen Ansatz mit Beginn der Behandlung nach Auftreten von oxidativem Stress. Daher schränkt das Prä- und Co-Inkubationsregime die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf das klinische Umfeld ein. Im vorliegenden Modell führte die Anwendung von H₂O₂ zu einer deutlichen Erhöhung der Lucifer Yellow-Translokation und einer Verringerung des TEER. Bei mit 10 mM und 30 mM H₂O₂ behandelten Zellen konnte keine Dosisabhängigkeit beobachtet werden. Da bereits 10 mM H₂O₂ zu einer irreversiblen Schädigung der Barrierefunktion führen könnten⁴¹, könnte ein umfassender Zellabbau etwaigen Melatoninvermittelten potenziell protektiven Effekten entgegenwirken. Diese Einschränkungen könnten möglicherweise den beobachteten fehlenden Einfluss von Melatonin auf die Integrität der Caco-2-Monoschicht erklären. Die Experimente schließen jedoch nicht aus, dass zu anderen Zeitpunkten oder bei anderen Schädigungsmechanismen protektive Effekte vorliegen.

12. Schlussfolgerung

In unserer Studie hatte Melatonin in der Konzentration von 0,1 mg/ml keinen protektiven Effekt auf die Schädigung der Barrierefunktion. In unserem ersten Versuchsteil bei EGTA in den Konzentration 60 und 70 mM und einer Inkubationszeit über 24 Stunden bzw. EGTA in den Konzentrationen 40, 80, 150 und 200 und einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurde kein protektiver Effekt nachgewiesen. Auch in dem zweiten Versuchsteil mit H₂O₂ in den Konzentrationen 10 mM und 30 mM über 4 Stunden ließ sich ebenfalls keine Verbesserung der Barrierefunktion nachweisen. Eine Prä-Inkubation über 30 Minuten zeigte keine protektiven Effekte der Schädigung der Barrierefunktion unter H₂O₂ in den Konzentrationen 10 mM und 30 mM über 4 Stunden. Die in den Vorstudien protektiven Effekte der Melatoningabe scheinen somit eher nicht durch eine topische Wirkung vermittelt zu sein, sondern eher durch Veränderung der Mikrozirkulation.

Nicht ausgeschlossen ist ebenfalls, dass Melatonin in anderen Konzentrationen und über andere Inkubationszeiten doch einen protektiven Effekt bei topischer Gabe haben könnte.

13. Literatur- und Quellenverzeichnis

References

1. Welsch U. *Lehrbuch Histologie*. 3rd ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2010.
2. Montrose MH. I. Visions of epithelial research. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*; 2003;4:G547-G550.
3. Gumbiner B. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *The American journal of physiology*; 1987;6 Pt 1:C749-58.
4. Murray CJL, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *The Lancet*; 1997;9064:1498–1504.
5. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*; 2016;8:801–810.
6. Jakob SM, Takala J. Gut perfusion in the critically ill. *Intensive care medicine*; 2000;6:813–815.
7. Deitch EA, Xu D, Kaise VL. Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci*; 2006;1:520–528.
8. Chierego M, Verdant C, Backer D de. Microcirculatory alterations in critically ill patients. *Minerva anesthesiologica*; 2006;4:199–205.
9. Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE, et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Annals of Emergency Medicine*; 2007;1:88-98, 98.e1-2.
10. Hardeland R, Madrid JA, Tan D-X, Reiter RJ. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *Journal of Pineal Research*; 2012;2:139–166.
11. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *Journal of Pineal Research*; 2011;1:1–16.
12. Brzozowski T, Konturek PC, Zwirska-Korczala K, et al. Importance of the pineal gland, endogenous prostaglandins and sensory nerves in the gastroprotective actions of central and peripheral melatonin against stress-induced damage. *Journal of Pineal Research*; 2005;4:375–385.
13. Vollmer C, Weber APM, Wallenfang M, et al. Melatonin pretreatment improves gastric mucosal blood flow and maintains intestinal barrier function during hemorrhagic shock in dogs. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*; 2017;4.
14. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. *Gastroenterology*; 1989;2:736–749.
15. Catalioto R-M, Festa C, Triolo A, Altamura M, Maggi CA, Giuliani S. Differential effect of ethanol and hydrogen peroxide on barrier function and prostaglandin E2 release in

- differentiated Caco-2 cells: selective prevention by growth factors. *Journal of pharmaceutical sciences*; 2009;2:713–727.
16. Hanani M. Lucifer yellow - an angel rather than the devil. *Journal of cellular and molecular medicine*; 2012;1:22–31.
 17. Gomez LD, Noctor G, Knight MR, Foyer CH. Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *J Exp Bot*; 2004;404:1851–1859.
 18. Powers KA, Szászi K, Khadaroo RG, Tawadros PS, Marshall JC, Kapus A, Rotstein OD. Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Exp Med*; 2006;8:1951–1961.
 19. Truse R, Nolten I, Schulz J, et al. Topical Melatonin Improves Gastric Microcirculatory Oxygenation During Hemorrhagic Shock in Dogs but Does Not Alter Barrier Integrity of Caco-2 Monolayers. *Frontiers in medicine*; 2020:510.
 20. Hidalgo IJ, Li J. Carrier-mediated transport and efflux mechanisms in Caco-2 cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 1996;1-2:53–66.
 21. Grasset E, Pinto M, Dussaulx E, Zweibaum A, Desjeux JF. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *The American journal of physiology*; 1984;3 Pt 1:C260-7.
 22. Delie F, Rubas W. A Human Colonic Cell Line Sharing Similarities With Enterocytes as a Model to Examine Oral Absorption: Advantages and Limitations of the Caco-2 Model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*; 1997;3:66.
 23. Artursson P, Borchardt RT. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharmaceutical research*; 1997;12:1655–1658.
 24. Stelwagen K, Farr VC, Davis SR, Prosser CG. EGTA-induced disruption of epithelial cell tight junctions in the lactating caprine mammary gland. *The American journal of physiology*; 1995;4 Pt 2:R848-55.
 25. Rao SC, Rainer G, Miller EK. Integration of what and where in the primate prefrontal cortex. *Science*; 1997;5313:821–824.
 26. Jepson PD, Arbelo M, Deaville R, et al. Gas-bubble lesions in stranded cetaceans. *Nature*; 2003;6958:575–576.
 27. Madara JL, Dharmasathaphorn K. Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer. *The Journal of cell biology*; 1985;6:2124–2133.
 28. Wolff A, Antfolk M, Brodin B, Tenje M. In Vitro Blood-Brain Barrier Models-An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches. *Journal of pharmaceutical sciences*; 2015;9:2727–2746.
 29. Zhao W, Han L, Bae Y, Manickam DS. Lucifer Yellow - A Robust Paracellular Permeability Marker in a Cell Model of the Human Blood-brain Barrier. *Journal of visualized experiments : JoVE*; 2019;150.
 30. Lynch B, Einspruch EL, Nichol G, Becker LB, Aufderheide TP, Idris A. Effectiveness of a 30-min CPR self-instruction program for lay responders: a controlled randomized study. *Resuscitation*; 2005;1:31–43.

31. Klein AH, Wendroth SM, Drewes LR, Andrews MT. Small-volume d- β -hydroxybutyrate solution infusion increases survivability of lethal hemorrhagic shock in rats. *Shock*; 2010;6:565–572.
32. Wolf A, Mulier KE, Iyegha UP, Asghar JI, Beilman GJ. Safety of D- β -Hydroxybutyrate and Melatonin for the Treatment of Hemorrhagic Shock With Polytrauma. *Shock*; 2015;August 2015:79–89.
33. Chan K, Chui SH, Wong DYL, Ha WY, Chan CL, Wong RNS. Protective effects of Danshensu from the aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) against homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Life Sciences*; 2004;26:3157–3171.
34. Mathes AM. Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World journal of gastroenterology*; 2010;48:6087–6097.
35. Powers KA, Szász K, Khadaroo RG, Tawadros PS, Marshall JC, Kapus A, Rotstein OD. Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Exp Med*; 2006;8:1951–1961.
36. Agil A, Elmahallawy EK, Rodríguez-Ferrer JM, et al. Melatonin increases intracellular calcium in the liver, muscle, white adipose tissues and pancreas of diabetic obese rats. *Food Funct.*; 2015;8:2671–2678.
37. Moniruzzaman M, Ghosal I, Das D, Chakraborty SB. Melatonin ameliorates H₂O₂-induced oxidative stress through modulation of Erk/Akt/NF κ B pathway. *Biol Res*; 2018;1:17.
38. Sommansson A, Yamskova O, Schiöth HB, Nylander O, Sjöblom M. Long-term oral melatonin administration reduces ethanol-induced increases in duodenal mucosal permeability and motility in rats. *Acta Physiologica*; 2014;2:152–165.
39. Trivedi PP, Jena GB. Melatonin reduces ulcerative colitis-associated local and systemic damage in mice: investigation on possible mechanisms. *Dig Dis Sci*; 2013;12:3460–3474.
40. Vollmer C, Weber APM, Wallenfanz M, et al. Melatonin pretreatment improves gastric mucosal blood flow and maintains intestinal barrier function during hemorrhagic shock in dogs. *Microcirculation*; 2017;4:e12345.
41. Catalioto R-M, Festa C, Triolo A, Altamura M, Maggi CA, Giuliani S. Differential effect of ethanol and hydrogen peroxide on barrier function and prostaglandin E₂ release in differentiated Caco-2 cells: selective prevention by growth factors. *Journal of pharmaceutical sciences*; 2009;2:713–727.

14. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Olaf Picker für die Aufnahme in sein Forschungsteam und Überlassung dieses Forschungsprojekts bedanken, wodurch diese Arbeit erst möglich wurde. Besonders für die andauernde Hilfe, Unterstützung und Beratung bedanke ich mich.

Zusätzlich bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Hug Aubin zur Betreuung meiner Arbeit als Zweitdoktorvater.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Christian Vollmer bedanken für die ausführliche und intensive Unterstützung und seine andauernde Geduld während des Abschlusses meiner Arbeit und die neue Motivation diese Arbeit zu vollenden.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Inge Bauer für das Anlernen im Labor, ihre Unterstützung und konstruktiven Vorschlägen in der Zeit der Laborarbeit und Durchführung der Experimente. Durch ihre Erfahrung in der Laborarbeit und ihre Ratschläge konnten die Experimente erst stattfinden.

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Dr. Richard Truse, Frau Dr. Inga Nolten und Frau Dr. Annika Raupach für die Betreuung während meiner Promotionsarbeit, die kontinuierliche Unterstützung während dieser Arbeit. Insbesondere bedanke ich mich für die Hilfe beim Zusammentragen der Daten, die Auswertung der Experimente und erstellen der Daten und Graphen.

Weiter bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Teams der experimentellen Anästhesie für ihre häufigen Ratschläge und Hilfe bei der Pflege und Aufzucht der Zellen. Hierbei gilt mein Dank besonders an Frau Birgitt Berke, die mir in meiner Zeit im Labor besonders beistand.

Mein Dank gilt auch meinen Kommilitonen Anna-Lena Müschenich, Henriette Hornstein, Maren Wieland, Jana Niedieck und Niklas Wergen welche mich während der Arbeit und des Studiums unterstützt und motiviert haben.

Ein besonderer Dank geht noch an meine Eltern Eva Annette und Hans-Werner Holtmanns, meine beiden Schwestern Ann-Katrin und Claudia, sowie meiner Partnerin Alina Bungartz, die mich immer liebevoll und verständlich auf meinem bisherigen Weg begleitet und mir zu jeder Zeit beistanden und unterstützt haben.