

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

Einfluss von Propofol auf die inflammativ veränderte
intestinale Barriere in vitro

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

vorgelegt von
Ayse Ceylan

2026

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

gez.: Ayse Ceylan

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Kathrin Scheckenbach

ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH)

Hintergrund: Im Gastrointestinaltrakt kommt es während einer Sepsis zu einer gesteigerten Permeabilität der epithelialen Barriere bis hin zum Einbruch der Barrierefunktion, die eine Translokation von Bakterien und ihren Toxinen mit ungehindertem Eintritt in die systemische Blutzirkulation begünstigen und so den Verlauf der Sepsis weiter aggravieren kann. Bei Propofol (2,6-Diisopropylphenol) wurden bereits antiinflammative Eigenschaften festgestellt. Ziel dieser Arbeit ist es, zu eruieren, inwiefern der antiinflammative Effekt von Propofol auf die inflammativ geschädigte Darmbarriere übertragbar ist.

Methodik: In dieser Arbeit wurden ausdifferenzierte, humane, epitheliale Caco-2 Zellen als *in vitro* Modell der intestinalen Epithelbarriere eingesetzt und mit Propofol (10, 50, 100, 500 μ M) 24 h vor und während der 24 stündigen Inflammationsinduktion durch die Entzündungsmediatoren Tumornekrosefaktor- α (TNF- α 2.5 ng/ml) und Interferon- γ (IFN- γ 10 ng/ml) behandelt. Der Einfluss von Propofol auf die Zellviabilität wurde mittels XTT-Assay quantifiziert. Zur Bestimmung der Barriereintegrität und -funktion wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) bestimmt. Weiterhin wurde das *tight junction* Protein ZO-1 immunhistochemisch gefärbt. Zellen ohne Behandlung mit proinflammatorischen Mediatoren und Propofol wurden als Negativkontrolle verwendet. Zellen mit inflammatorischer Behandlung, aber ohne weitere Propofolbehandlung dienten als Positivkontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism10, One-way ANOVA, Šídák-Korrektur und * $p < 0.05$.

Ergebnisse: Unter physiologischen Bedingungen führte die Anwendung der klinisch eingesetzten Propofol Fresenius Lipidemulsion zu einer signifikanten Reduktion der TEER-Werte auf $87,4 \pm 5,3$ % ($p = 0,03$) und der Proteinfärbung von Zonula occludens-1 (ZO-1). Unter inflammatorischer Schädigung aggravierte Propofol Fresenius die bereits inflammatorisch bedingte TEER-Reduktion (z. B. 50 μ M, $68,6 \pm 4,6$ %, $p = 0,02$) und die Anomalien des ZO-1 Expressionsmusters.

Zusammenfassung: Es konnte kein protektiver Effekt von Propofol auf die inflammatorisch gestörte Darmbarriere festgestellt werden. Im Gegenteil induzierte die Propofolemulsion eine Aggravierung der bereits bestehenden inflammatorischen Darmschädigung, während der in DMSO gelöste Wirkstoff Propofol keinen Einfluss auf die Darmbarriere zeigte. Der schädigende Effekt lässt sich so zumindest teilweise auf die Lipidkomponente zurückführen. Ob Patienten mit gestörter Barriere durch die Lipidinfusion tatsächlich einen weiteren Schaden nehmen, sollte in einem nächsten Schritt z.B. an Organ-on-a-Chip-Modellen verifiziert werden.

ZUSAMMENFASSUNG (ENGLISCH)

Background: Sepsis leads to increased permeability of the epithelial barrier in the gastrointestinal tract up to a breakdown of the barrier function, which favours the translocation of bacteria and their toxins and their entry into the systemic blood circulation. This can aggravate the course of sepsis and lead to subsequent multi-organ failure. Propofol (2,6-diisopropylphenol) has already been found to exert anti-inflammatory effects. The aim of this study is to determine the extent to which the anti-inflammatory effects of propofol can be transferred to the inflammatory damaged intestinal barrier.

Methods: In this study, the differentiated human epithelial Caco-2 cell line was used as an *in vitro* model of the intestinal epithelial barrier and treated with propofol (10, 50, 100, 500 μ M) 24 h before and during the 24-hour induction of inflammation using the inflammatory mediators tumour necrosis factor- α (TNF- α 2.5 ng/ml) and interferon- γ (IFN- γ 10 ng/ml). The effect of propofol on cell viability was quantified by an XTT assay. Transepithelial electrical resistance (TEER) was determined to assess barrier integrity and function. Furthermore, the tight junction protein ZO-1 was immunohistochemically stained. Cells without treatment with inflammatory mediators and propofol were used as negative controls. Cells with inflammatory treatment but without further propofol treatment served as a positive control. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism10, One-way ANOVA, Šídák correction and * $p < 0.05$.

Results: In physiologic conditions, application of the clinically used Propofol Fresenius lipid emulsion significantly reduced TEER levels to 87.4 ± 5.3 % ($p = 0.03$) and protein staining of Zonula occludens-1 (ZO-1). In inflammatory conditions Propofol Fresenius aggravated the already inflammatory-induced TEER reduction (e.g. 50 μ M, 68.6 ± 4.6 %, $p = 0.02$) and ZO-1 expression pattern abnormalities.

Summary: There was no protective effect of propofol on the inflammatory disturbed intestinal barrier found. On the contrary, propofol emulsion induced an aggravation of the already existing inflammatory intestinal damage whereas Propofol dissolved in DMSO had no effect on the intestinal barrier. This damaging effect was at least partly mediated by the lipid component with which propofol is clinically administered. Whether patients with a disturbed barrier actually suffer further damage as a result of the lipid infusion should be investigated in a next step, e.g. using organ-on-a-chip models, which represent a model more similar to the human intestinal barrier due to the combination of epithelial and endothelial barrier.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius	DRG	<i>Diagnosis Related Group</i>
Ω	Ohm	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
€	Euro	ELISA	<i>Enzyme- linked Immuno Sorbent Assay</i>
μg	Mikrogramm	et al.	Und andere
μl	Mikroliter	FCS	Fötales Kälberserum
μm	Mikrometer	g	Erdbeschleunigung
μM	Mikromolar	g	Gramm
ad	auffüllen auf	GABA	γ-Aminobuttersäure
AK	Antikörper	h	Stunde
Aqua dest.	Destilliertes Wasser	IFN-γ	Interferon-γ
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>	IgG	Immunglobulin G
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	IHC	Immunhistochemie
Caco	<i>Cancer Coli</i>	IL	Interleukin
cm	Zentimeter	iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid- Synthase
cm ²	Quadratcentimeter	i.v.	intravenös
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	kDa	Kilodalton
Cy3	Cyanin 3- Farbstoff	kg	Kilogramm
DAMP	<i>Damage- Associated Molecular Pattern</i>	KG	Körpergewicht
DMSO	Dimethylsulfoxid	l	Liter
DNA	Desoxyribonucleinsäure	LPS	Lipopolysaccharid
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	M	Molare Masse (mol/l)

MCT	<i>Medium chain triglycerides</i>	NO	Stickstoffmonoxid
MEM	Minimum Essential Medium	PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
mg	Milligramm	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
min	Minute	Pen/Stre	Penicillin/ Streptomycin
min.	Mindestens	P	
Mio.	Million	PFA	Paraformaldehyd
ml	Milliliter	PMS	Phenazine Methosulfat
mm	Millimeter	ROS	<i>Reaktive oxygen species</i> (Sauerstoffradikale)
mM	Millimolar	rpm	<i>Revolutions per minute</i>
mol	Stoffmenge	RT	Raumtemperatur
MPB	Medium/PBS/BSA	sec	Sekunde
MPBD	Medium/PBS/BSA/DMSO	SOFA	<i>Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment</i>
MPBL	Medium/PBS/BSA/Lipovenös	TEER	Transepithelial electrical resistance
Mrd.	Milliarde	TLR	<i>Toll- like</i> Rezeptor
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>	TNF-α	Tumornekrose-Faktor- α
MTX	Methotrexat	UK	<i>United Kingdom</i>
MW	Molekulargewicht	USA	<i>United States of America</i>
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat	Vol.-%	Volumenprozent
NF-κB	<i>Nuclear factor of kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> (nukleärer Transkriptionsfaktor- κ B)	XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide
ng	Nanogramm	ZO	Zonula occludens
nm	Nanometer		

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Sepsis.....	1
1.1.1 Epidemiologie, Definition und klinische Relevanz der Sepsis.....	1
1.1.2 Übersicht Pathophysiologie der Sepsis.....	1
1.2 Inflammativ veränderte Darmbarriere.....	3
1.2.1 Die physiologische Darmbarriere.....	3
1.2.2 Einbruch der Darmbarriere bei Sepsis	6
1.3 Modell für die inflammativ veränderte intestinale Barriere	8
1.3.1 Caco-2 Zellen.....	8
1.3.2 <i>In vitro</i> Schädigungsmodell	9
1.4 Eigenschaften von Propofol	10
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 Material	14
2.1.1 Zelllinie	14
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien	14
2.1.3 Antikörper	16
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.5 Geräte	17
2.1.6 Software und Datenbanken	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Zellkultur	20
2.2.2 Inflammatorische Schädigung und Behandlung mit Propofol	22

2.2.3	Kolorimetrischer Assay mittels Tetrazoliumsalz	23
2.2.4	Messung der Barrierefunktion mit TEER	24
2.2.5	Nachweis der <i>tight junction</i> Proteine mit Immunhistochemie.....	27
2.2.6	Statistische Analysen.....	30
3	ERGEBNISSE	31
3.1	Ergebnisse XTT-Test.....	31
3.1.1	Einfluss von Propofol DMSO auf die Zellviabilität	31
3.1.2	Einfluss von Propofol Fresenius auf die Zellviabilität.....	32
3.2	Ergebnisse der transepithelialen Widerstandsmessungen	33
3.2.1	Einfluss von Propofol DMSO auf TEER.....	33
3.2.2	Einfluss von Propofol Fresenius auf TEER	34
3.3	Ergebnisse Immunhistochemie	35
3.3.1	Einfluss von Propofol auf die ZO-1 Proteinexpression.....	35
4	DISKUSSION	37
4.1	Inflammatorische Schädigung der Caco-2 Zellen und Behandlung mit Propofol <i>in vitro</i>	37
4.2	Effekte von Propofol.....	40
4.3	Einfluss von Inflammation und Propofol auf die Expression der <i>tight junction</i> Proteine	45
5	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	49

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die inflammatorische Reaktion.....	3
Abbildung 2: Aufbau der Dünndarmwand	4
Abbildung 3: Einfluss der geschädigten intestinalen Barriere aufs Multiorganversagen.....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Endohmkammer.....	25
Abbildung 5: Abfolge der periinflammatorischen Behandlung und TEER-Versuche.....	26
Abbildung 6: Abfolge der periinflammatorischen Behandlung und Färbung für IHC.....	28
Abbildung 7: Einfluss von Propofol DMSO auf die Zellviabilität.....	31
Abbildung 8: Einfluss von Propofol Fresenius auf die Zellviabilität.....	32
Abbildung 9: Einfluss von Propofol DMSO auf den TEER.....	33
Abbildung 10: Einfluss von Propofol Fresenius auf den TEER.....	34
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung des Zonula occludens-1 Proteins.....	35

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	14
Tabelle 2: Übersicht primäre und sekundäre Antikörper.....	16
Tabelle 3: Übersicht der Verbrauchsmaterialien.....	16
Tabelle 4: Übersicht der Geräte.....	17
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Software und Datenbanken.....	19
Tabelle 6: Aussaatschema für die einzelnen Well-Formate.....	21
Tabelle 7: Eingesetzte Testsubstanzen.....	22
Tabelle 8: Angesetzte Lösungen für den 1. Tag der immunhistochemischen Färbung.....	29

1 EINLEITUNG

1.1 Sepsis

1.1.1 Epidemiologie, Definition und klinische Relevanz der Sepsis

Die weltweite Inzidenz der Sepsis lag 2017 bei 48,9 Mio. Fällen, von denen 11 Mio. tödlich verliefen; das entspricht ca 19,7 % aller Todesfälle des Jahres 2017 [1]. Allein in Deutschland beliefen sich die Gesamtkosten für die stationäre und ambulante Versorgung von Patienten mit Sepsis auf 7,7 Mrd. € im Jahr 2013 [2]. Zwischen 2007 und 2013 konnte eine Inzidenzzunahme der Sepsis beobachtet werden, die sich einerseits mit der immer älter werdenden Bevölkerung und dem vermehrten Einsatz invasiver und immunsuppressiver Therapien und andererseits mit der bewussteren Wahrnehmung der Sepsis und den damit verbundenen Effekten auf die DRG-Codierung erklären lässt [2].

Definiert ist eine Sepsis als eine akut lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine inadäquate Wirtsantwort auf eine Infektion hervorgerufen wird [3]. Eine solche Organdysfunktion kann klinisch durch den Anstieg in dem *Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment (SOFA) score* von zwei oder mehr Punkten messbar gemacht werden, was mit einer Krankenhaussterblichkeit von mehr als 10 % assoziiert ist [3]. Die aktualisierten Definitionen und klinischen Kriterien erleichtern ein früheres Erkennen und zeitlich optimiertes Management in der Behandlung von Patienten mit Sepsis oder drohender Sepsisgefahr [3].

Früheres Erkennen und vermehrter Einsatz von bewährten Verfahren in der Diagnostik und Therapie der Sepsis konnten die Krankenhaussterblichkeit reduzieren, sodass es mehr Langzeitüberlebende der Sepsis gibt [4]. Allerdings ist weiterhin eine vertiefte Erforschung der Pathomechanismen von Nöten, um das pathomechanistische Verständnis der kritischen Verläufe zu erhöhen und die immer noch hohe Letalität weiter zu senken.

1.1.2 Übersicht Pathophysiologie der Sepsis

Grundsätzlich ist die Sepsis eine inflammatorische Erkrankung, welche durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems vermittelt wird [5]. Zwei Schlüsselerkenntnisse charakterisieren die Immunantwort des angeborenen Immunsystems im Rahmen einer Sepsis [5]. Die erste Erkenntnis betrifft die Initiation der Sepsis durch mikrobielle Produkte und endogene Alarmsignale, welche durch spezifische Zellrezeptoren und dem Komplementsystem erkannt werden [5]. Die so aktivierten Zellrezeptoren setzen proinflammatorische Zytokine frei, die wiederum multiple intrazelluläre proinflammatorische Signalwege induzieren [5]. Die zweite Schlüsselerkenntnis ist, dass diese

multiplen Signalwege letzten Endes auch zur Expression mehrerer gemeinsamer Genklassen führen, die an Inflammation, adaptiver Immunantwort und Zellmetabolismus beteiligt sind [5].

Im Verlauf einer adäquaten Immunantwort kommt es zusätzlich zu einer kompensatorischen Aktivierung von antiinflammatorischen Signalwegen, welche die proinflammatorische Immunantwort ausbalancieren [6]. Die im Rahmen der Sepsis dysregulierten pro- und antiinflammatorischen Reaktionsmuster reichen von der überschießenden proinflammatorischen Reaktion, dem sogenannten Zytokinsturm, bis zur Immunparalyse, einer ausgeprägten Immunsuppression, die in der Spätphase der Erkrankung Sekundärinfektionen begünstigt [6].

Bei der Sepsis erfolgt die Aktivierung der verschiedenen Mediatorsysteme durch Kontakt mit sogenannte *Pathogen- Associated Molecular Patterns* (PAMPs) oder *Damage- Associated Molecular Patterns* (DAMPs) [7]. Während PAMPs Erregerbestandteile wie Lipopolysaccharide, Endotoxine, Exotoxine oder bakterielle Desoxyribonukleinsäure (DNA) sein können, sind DAMPs Eiweißsubstanzen, die bei Gewebsschädigung z.B. im Rahmen eines großen Traumas oder einer Infektion freigesetzt werden [7]. Zu den Mediatorsystemen, die nach ihrer Aktivierung Mediatoren produzieren, gehören die komplexen Proteinsysteme wie das Komplementsystem und die Gerinnungskaskade, vaskuläre und gewebsständige Zellen wie Endothel- und Epithelzellen, sowie das Blut mit seinen inflammatorischen Zellen (s. Abb. 1) [7]. Das aktivierte Komplementsystem setzt verschiedene Komplementfaktoren frei, welche auf endothelialer Ebene zu Vasodilatation und erhöhter Gefäßwandpermeabilität führen, woraufhin sich ausgeprägte Ödeme bilden können und ein intravaskulärer Volumenmangel entsteht [7]. Die Aktivierung des Gerinnungssystems kann eine disseminierte intravasale Gerinnung mit der Ausbildung von Thrombosen und Perfusionsstörungen zur Folge haben [7]. Die inflammatorischen Zellen des Blutes setzen verschiedene proinflammatorische Mediatoren frei, die zu Temperaturerhöhung, massiver Vasodilatation und dadurch zu schwerer Hypotension führen [7]. Diese beschriebenen systemischen Vorgänge der proinflammatorischen Aktivierung schädigen auch fokusferne Organsysteme bis hin zum Multiorganversagen und sind somit mit einer hohen Letalität verbunden [7]. Bedingt durch die systemischen schweren Makro- und Mikrozirkulationssörungen kann unter anderem Darmversagen mit Verlust der Barrierefunktion entstehen [7].

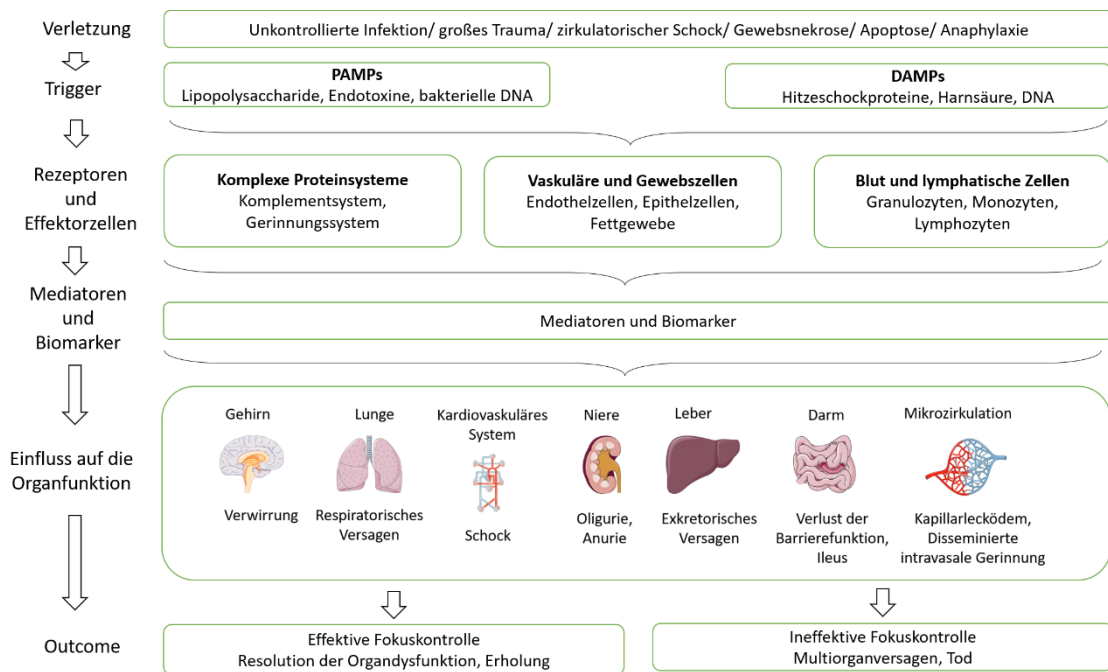


Abb. 1: Die inflammatorische Reaktion.

Modifiziert nach [7]. Diese vereinfachte Übersicht zeigt den Verlauf der inflammatorischen Reaktion. Eine Verletzung löst die Freisetzung von PAMPs (*Pathogen- Associated Molecular Patterns*) und DAMPs (*Damage- Associated Molecular Patterns*) aus, die durch Rezeptoren auf der Oberfläche von Sensorzellen sowie durch mustererkennende komplexe Systeme erkannt werden. Die daraufhin durch die Mediatorsysteme freigesetzten Mediatoren nehmen Einfluss auf die Organfunktion. (DNA - Desoxyribonucleinsäure).

1.2 Inflammativ veränderte Darmbarriere

Die inflammatorische Reaktion hat Auswirkungen auf nahezu alle Organsysteme, wobei insbesondere die physiologischen Barrieren des Körpers beeinträchtigt werden [8]. Auch im Gastrointestinaltrakt ist unter Sepsis eine Störung der epithelialen Barrierefunktion im Sinne einer Hyperpermeabilität zu beobachten, die unter anderem zur Entwicklung eines Multiorganversagens beitragen kann [8].

1.2.1 Die physiologische Darmbarriere

Die drei nicht scharf voneinander trennbaren Abschnitte des Dünndarms, Duodenum, Jejunum und Ileum, besitzen einen ähnlichen histologischen Wandaufbau aus Mukosa, Submukosa, Muskularis und Serosa oder Adventitia [9]. Die Mukosa besteht aus einschichtigem Zylinderepithel und bildet die Begrenzung zum Darmlumen und somit eine physikalische Barriere zwischen der Umwelt und dem Körperinneren [9]. Die intestinalen Epithelzellen, die als Enterozyten bezeichnet werden, sind zur Vergrößerung der mukosalen Oberfläche an ihrer Apikalmembran fingerartig zu sogenannten Mikrovilli ausgestülpt [9]. Weitere Strukturen, die zur Oberflächenvergrößerung beitragen, um eine maximale

Nährstoffaufnahme zu gewährleisten, sind die Einstülpungen der Mukosa zu Krypten und die Ausstülpung der Mukosa zu Zotten [9]. Zwischen den Enterozyten, die unter anderem auch resorptive Aufgaben erfüllen, finden sich eingestreut Becherzellen, die eine schützende Schleimschicht produzieren (s. Abb. 2) [9]. Der Wandaufbau des sich an den Dünndarm anschließenden Dickdarms mit seinen Abschnitten Zökum, Colon und Rektum entspricht prinzipiell dem des Dünndarms [9]. Im Gegensatz zum Dünndarm, gibt es hier jedoch keine Zotten, sondern lediglich tief bis zur Muskularis reichende Krypten der Mukosa, die zahlreiche Becherzellen und mitochondrienreiche Enterozyten mit langen Mikrovilli für die Flüssigkeitsresorption enthalten [9].

Die unter der Mukosa liegende Submukosa enthält Blut- und Lymphkapillaren zur Aufnahme der resorbierten Nährstoffe und viele Immunzellen, die weitere wichtige Schutzfunktionen erfüllen [9].

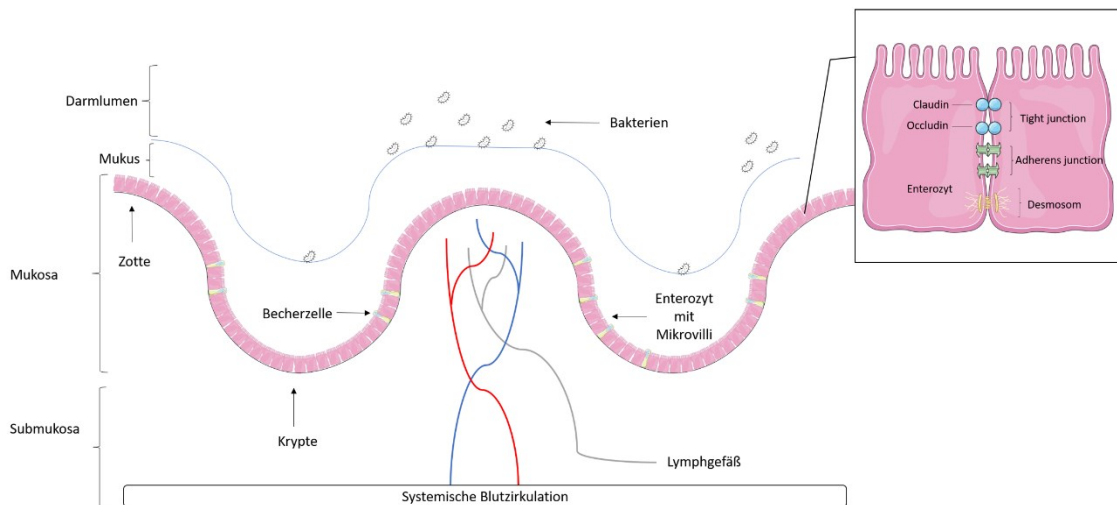


Abb. 2: Aufbau der Dünndarmwand.

Modifiziert nach [9]. Das einschichtige Zylinderepithel der Mukosa grenzt unmittelbar an das Darmlumen. Apikale Ausziehungen der Enterozyten (Mikrovilli), die Ein- und Ausstülpungen der Mukosa (Krypten und Zotten) tragen zur Oberflächenvergrößerung bei. Zwischen den Enterozyten finden sich vereinzelt Becherzellen, die schützenden Mucus produzieren, der den direkten Kontakt von Darminhalt mit den Enterozyten verhindert. In der Lamina propria der Mukosa sowie der Submukosa finden sich zahlreiche Blut- und Lymphkapillaren sowie auch Immunzellen. *Tight junctions* verbinden die Enterozyten miteinander und bilden die Barriere zwischen Darmlumen und Extrazellulärraum.

Die Enterozyten sind an ihrer lateralen Zellmembran durch interzelluläre Kontakte, den Desmosomen, *adherence junctions* und *tight junctions*, miteinander verbunden, wobei die *tight junctions* die eigentliche Diffusionsbarriere zwischen dem Darmlumen und dem extrazellulären Raum bilden (s. Abb. 2) [10].

Die *tight junctions* befinden sich am apikalen Pol der Enterozyten und sind essenziell für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion und die Kommunikation benachbarter Zellen [10].

Im Wesentlichen bestehen die *tight junctions* aus Aneinanderreihungen von transmembranalen Adhäsionsproteinen, insbesondere den Claudinen und dem Occludin, deren extrazelluläre Domäne mit den benachbarten Zellen interagiert und für die Ausbildung der abdichtenden Struktur der *tight junctions* verantwortlich ist [10]. Intrazellulär sind diese durch weitere *tight junction* Proteine wie Zonula occludens (ZO-1) über eine Verbindung mit zytosolischen Proteinen mit dem Zytoskelett verankert [10].

Claudin-5 gehört zu einer großen Familie von Transmembranproteinen und reguliert gemeinsam mit dem Occludin, einem integralen Phosphoprotein der Zellmembran, den interzellulären Transportweg benachbarter Zellmembranen [9]. Die intrazellulären Domänen des Claudins und Occludins sind mit dem Komplex der Zonula occludens Proteine verbunden [9].

Während die Claudine die charakteristischen, hochselektiven parazellulären Kanäle bilden, sind die Funktionen des Occludins und ZO-1 bisher weniger gut definiert [11]. Occludin besitzt möglicherweise eher eine regulatorische Funktion, die bei Überexpression von Occludin die epitheliale Barrierefunktion *in vitro* verbessert, als dass es eine notwendige strukturelle Komponente der *tight junctions* darstellt [11]. ZO-1, das erste *tight junction* Protein, das entdeckt wurde, ist ein zytosolisches peripheres Membranprotein mit mehreren Domänen, die für Proteininteraktionen spezialisiert sind und die Bindung an Claudine, Occludin und zahlreiche andere Proteine ermöglichen [11].

Die interzellulären *tight junction* Komplexe unterscheiden sich in ihrer Morphologie und Funktion, wobei die Anzahl und Zusammensetzung der *tight junction* Proteine die Barrierefunktion bestimmt; diese ist je nach Gewebe variabel und reicht von sehr dichten zu durchlässigen Epithelien [10]. Die *tight junctions* sind nicht nur für den Großteil der parazellulären Widerstände in den intestinalen Epithelzwischenräumen zuständig, sondern beeinflussen außerdem die Gentranskription, die Zellproliferation und die Ausbildung epithelialer Polarität [10]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten den Nachweis erbringen, dass die *tight junctions* die eigentliche Diffusionsbarriere im Interzellularspalt bilden, da apikal oder basolateral applizierte Markermoleküle die *tight junctions* nicht überwinden können [10]. Die von den *tight junctions* gebildete Diffusionsbarriere ist selektiv permeabel und reguliert die Diffusion löslicher Moleküle wie Nährstoffe oder bakterielle Metabolite durch die parazellulären Zwischenräume [10]. Die intestinale Barriere erfüllt somit nicht nur die wichtige Funktion der Nährstoffaufnahme, sondern bietet auch Schutz vor pathogenen Mikroorganismen und ihren Toxinen [10].

1.2.2 Einbruch der Darmbarriere bei Sepsis

In allen Anteilen des Darms finden unter akut lebensbedrohlichen Erkrankungen tiefgreifende Veränderungen statt [12]. Auf epithelialer Ebene kann eine Steigerung der Apoptose von Enterozyten und der Permeabilität der intestinalen Barriere beobachtet werden [12]. Die beeinträchtigte Barrierefunktion wird durch Veränderungen in den *tight junctions* hervorgerufen und ermöglicht das Austreten luminalen Inhalts [12]. Es kommt ebenfalls zur Schädigung der Mukusschicht, die eine Dysfunktion der Epithelzellen bedingt [12]. Ebenso sind Veränderungen im intestinalen Immunsystem und der Zusammensetzung des Mikrobioms beschrieben [12].

Bei einer Sepsis kann beobachtet werden, dass inflammatorische Einflüsse und Veränderungen der Blutzirkulation zu einer gesteigerten Permeabilität des Darmepithels und damit zu einem Einbruch der intestinalen Barrierefunktion führen [13]. In der Folge können Darmbakterien und ihre Toxine ungehindert in die systemische Blutzirkulation eintreten [13]. Die bakterielle Translokation ist dabei ein Promoter, aber nicht der Initiator der Sepsis [13]. Faktoren, die eine bakterielle Translokation begünstigen sind z.B. Immunschwäche, Störungen des intestinalen Mikrobioms, Medikamente und eine erhöhte mukosale Barrierepermeabilität [13]. Die mukosale Barriere wird durch die Mukusschicht, die antimikrobielle Peptide enthält und die Enterozyten vor Kontakt mit luminalem Darminhalt schützt, sowie den Mustererkennungsrezeptoren auf der luminalen Oberfläche der Enterozyten, die Gefahrensignale erkennen und Abwehrmechanismen aktivieren, gebildet [13]. Wenn es im Rahmen der Sepsis zur Zentralisation und damit zu einer Minderdurchblutung des Splanchnikusgebietes zugunsten lebenswichtiger Organe oder zur disseminierten intravasalen Gerinnung mit Mikrozirkulationsstörungen kommt, kann die daraus resultierende hypoxische Störung zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen führen, die wiederum eine erhöhte intestinalen Permeabilität vermitteln [13]. Die sich der Ischämie anschließenden Reperfusionsschäden tragen weiterhin zur Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, mukosaler Störung und erhöhter intestinaler Permeabilität mit bakterieller Translokation bei [13].

Eine gesteigerte Permeabilität des Darmepithels und die daraus resultierende bakterielle Translokation steht im Verdacht eine Rolle in der Pathogenese des Multiorganversagens einzunehmen [14]. Durch die reaktive inflammatorische Reaktion kommt es zu einer aggravierten Sepsis, die wiederum in diffuser Organschädigung, Organversagen und Tod resultieren kann und eine intensivmedizinische Behandlung notwendig macht [14]. Der Einbruch der intestinalen Darmbarriere führt dazu, dass Bakterien und Toxine die intestinale Barriere passieren und zu einer Aktivierung des inflammatorischen Abwehrmechanismus des lokalen und systemischen Immunsystems führen (s. Abb. 3) [14]. Die daraus resultierende

Autointoxikation und Gewebedestruktion gelten als Charakteristika der septischen Reaktion bei Multiorganversagen [14]. Bakterien und Endotoxine, die bei einer Störung der intestinalen *tight junction* Barriere in die Submukosa eintreten, führen zu einer Aktivierung des mukosalen Immunsystems mit lokaler Produktion von Zytokinen und anderen proinflammatorischen Mediatoren, die eine lokale Inflammation und Gewebedestruktion zur Folge haben [14]. Die intestinal freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren können zu einer Exazerbation der systemischen inflammatorischen Reaktion und damit zu einer weiteren Zunahme der intestinalen Barrierepermeabilität führen und so die Ausbildung eines *Circulus vitiosus* begünstigen [14]. Zu den intestinal freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren gehören auch die DAMPs, die in die mesenteriale Lymphe freigesetzt und über die Lunge in die systemische Blutzirkulation transportiert werden [15]. Immunzellen mit Mustererkennungsrezeptoren in diversen Geweben erkennen die DAMPs und aktivieren proinflammatorische Signalwege und fördern auf diesem Weg die Entwicklung von Multiorganversagen [15].

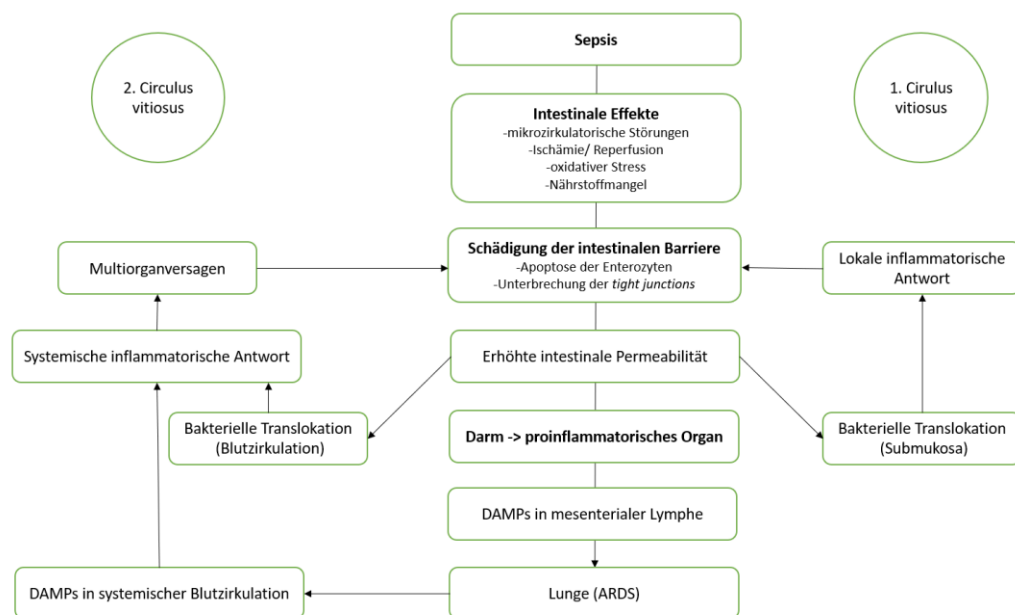


Abb. 3: Einfluss der geschädigten intestinalen Barriere aufs Multiorganversagen.

Modifiziert nach [15]. Die Sepsis führt über die Schädigung der intestinalen Barriere zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität. Bakterien und Endotoxine können die mukosale Barriere durchdringen, gelangen in die systemische Blutzirkulation und interagieren lokal mit dem intestinalen Immunsystem, was zu einer proinflammatorischen Antwort führt, die wiederum die intestinale Barrierefunktion weiter verschlechtert. Als Reaktion auf den mukosalen Schaden werden DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) in die mesenteriale Lymphe freigesetzt und über die Lunge in die systemische Blutzirkulation transportiert. Mustererkennende Rezeptoren auf Immunzellen erkennen die systemisch freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren und induzieren über proinflammatorische Signalwege Multiorganversagen. Die systemische inflammatorische Reaktion aggraviert die Schädigung der intestinalen Barriere und schafft dadurch einen zweiten, potentiell tödlichen *Circulus vitiosus*. (ARDS – *acute respiratory distress syndrome*).

Zusammenfassend ist die Störung der intestinalen Barriere im Rahmen einer Sepsis durch erhöhte mukosale Permeabilität, gestörte mukosale Perfusion, Entwicklung von Gewebsödemen, koagulationsassoziierte lokaler Dysregulation, bakterieller Translokation und einem Shift vom Mikrobiom zum Pathobiom charakterisiert [16].

1.3 Modell für die inflammativ veränderte intestinale Barriere

1.3.1 Caco-2 Zellen

Die humane epitheliale Cancer coli-2 (Caco-2) Zelllinie ist die am häufigsten genutzte Zelllinie für *in vitro* Modelle der intestinalen epithelialen Barriere [17]. Die Caco-2 Zelllinie stammt von einem humanen kolorektalen Adenokarzinom ab und wurde von Jorgen Fogh am Sloan-Kettering Cancer Research Institute etabliert [17]. In Kultur differenzieren die Zellen innerhalb von ca. 21 Tagen spontan zu einer konfluenten *Monolayer* von polarisierten, hochprismatischen Zellen mit apikalen Mikrovilli aus und weisen morphologische und funktionelle Charakteristika von reifen Enterozyten des Dünndarms auf [17]. Benachbarte Caco-2 Zellen bilden *tight junction* Komplexe aus und vernetzen sich mithilfe der Adhäsionsproteine miteinander [17]. Die Barrierefunktion der Caco-2 *Monolayer* kann durch die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) verifiziert werden [17]. Mithilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen kann die morphologische Zelldifferenzierung beobachtet werden [18]. Die Caco-2 Zellen erreichen sechs bis sieben Tage nach dem Aussäen auf kollagenisierten Polykarbonatmembranen *Monolayer* dichte, wobei benachbarte Zellen schon nach drei Tagen in Kultur beginnen apikal abdichtende *junctionale* Komplexe auszubilden [18]. Nach sechs Tagen sind die lateralen Membranen der benachbarten Zellen stark miteinander verzahnt [18]. Weiterhin kann apikal eine progressive Formierung des Bürstensaums mit Mikrovilli beobachtet werden [18]. Es konnte gezeigt werden, dass Caco-2 Zellen auch Enzyme des Bürstensaums wie Sucrase-Isomaltase, Lactase, Aminopeptidasen und alkalische Phosphatasen exprimieren, die als spezifische Marker für Enterozyten des Dünndarms gelten [18].

Der polarisierte Caco-2 *Monolayer* repräsentiert ein zuverlässiges Modell für Medikamentenabsorptionsstudien, da insbesondere für Bestandteile, die über passive, parazelluläre Mechanismen transportiert werden, eine hohe Korrelation zwischen dem Permeabilitätskoeffizienten der Caco-2 Zellen und des menschlichen Darms nachgewiesen werden konnte [19]. Es ist zu beachten, dass *Surfactants*, pharmazeutische Hilfsstoffe, Fettsäuren und Hormone die Struktur und Funktion der *tight junctions* modulieren und so einen Einfluss auf den parazellulären Transport von Medikamenten haben können [20]. Eine weitere Besonderheit im Hinblick auf den parazellulären Transport ist, dass der Porenradius

der *tight junctions* der Caco-2 Zellen kleiner ist als der Porenradius der *tight junctions* der humanen Enterozyten [20].

Die physiologischen Charakteristika wie die Morphologie und Funktion der Caco-2 Zellen sind mit der Barrierephysiologie und -funktionalität des Dünndarms vergleichbar, jedoch nicht uneingeschränkt repräsentativ [17]. So kommen im Epithel des Gastrointestinaltraktes noch andere Zellen wie z.B. die Becherzellen vor, die zwar keine *tight junctions* ausbilden, dafür aber Mukus als weitere Diffusionsbarriere produzieren, der daher in dem Caco-2 Zellmodell nicht vorhanden ist [17]. Trotz der Einschränkungen sind *in vitro* Modelle hilfreich um Effekte auf die Barrierefunktion, das Absorptionsverhalten von Enterozyten oder den transepithelialen Transport zu evaluieren [17]. Auch wenn kein direkter Vergleich vom experimentellen Caco-2 Modellsystem mit der *in vivo* Situation getroffen werden kann, haben intestinale epitheliale Zellmodelle wie das Caco-2 Modell viele Vorteile hinsichtlich ihrer Einfachheit und Reproduzierbarkeit, die einen Vergleich von Ergebnissen aus unterschiedlichen Laboren ermöglichen [17].

1.3.2 *In vitro* Schädigungsmodell

Die intestinale epitheliale Barrierefunktion wird durch die interzellulären *tight junction* Komplexe aufrecht erhalten und unter anderem durch das Immunsystem mit seinen Immunzellen und Zytokinen wie zum Beispiel Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ) moduliert [21]. TNF- α und IFN- γ sind zentrale proinflammatorische Zytokine, die im menschlichen Darm eine Dysfunktion der intestinalen epithelialen Barriere induzieren [22].

Zusätzlich zu direkten immunmodulatorischen Effekten, bewirkt TNF- α eine signifikante Zunahme der intestinalen epithelialen *tight junction* Permeabilität, was als wichtiger proinflammatorischer Mechanismus im Rahmen von entzündlichen Darmerkrankungen angesehen wird und sich durch eine erhöhte parazelluläre Permeabilität und einem Absinken des transepithelialen elektrischen Widerstandes manifestiert [23]. In Biopsien von Kindern mit entzündlichen Darmerkrankungen konnte eine erhöhte Anzahl von Zellen, die TNF- α und teilweise auch IFN- γ sekretieren, nachgewiesen und ein Zusammenhang zwischen den erhöhten Konzentrationen von TNF- α und IFN- γ und erhöhter intestinaler Permeabilität festgestellt werden [22, 24]. Diese erhöhte epithelialen Permeabilität geht einher mit einer Umverteilung der *tight junction* Proteine [24]. Weiterhin führt eine *in vitro* Behandlung mit TNF- α und IFN- γ zu Veränderungen der Lipidzusammensetzung und Fettsäuresubstitution der Phospholipide in den Membranmikrodomänen der *tight junctions* und hat somit einen direkten Einfluss auf die Funktion der *tight junctions* [24]. Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ beeinträchtigen demnach die epitheliale Barrierefunktion, indem

sie die Struktur und Funktion der *tight junctions* verändern, dabei beeinflusst TNF- α vornehmlich die Genexpression der *tight junction* Proteine Claudin und Occludin [25].

Weiterhin wirken TNF- α und IFN- γ durch die IFN- γ abhängige Upregulation von TNF-Rezeptoren und anderen metabolischen Effekten, welche die TNF- α Sensibilität erhöhen, synergistisch an der epithelialen Barriere [25].

In vitro Studien haben gezeigt, dass TNF- α und IFN- γ in hohen Einzeldosen, unabhängig voneinander, eine Barrieredysfunktion in angezüchteten intestinalen epithelialen *Monolayern* induzieren [26]. In Kombination wirken TNF- α und IFN- γ in niedrigeren Dosierungen synergistisch und beeinträchtigen die Barrierefunktion in Caco-2 *Monolayern* [26]. Der Vorteil für ein *in vitro* Schädigungsmodell liegt darin, dass niedrigere, physiologisch relevantere TNF- α und IFN- γ Konzentrationen eingesetzt werden können, um die Barrierefunktion der kultivierten intestinalen epithelialen Caco-2 *Monolayer* zu beeinträchtigen [26].

1.4 Eigenschaften von Propofol

Die meisten Patienten mit Sepsis werden auf der Intensivstation behandelt und benötigen oftmals eine Sedierung, um die mechanische Beatmung und andere lebenserhaltende Maßnahmen zu gewährleisten [27]. Propofol (2,6-Diisopropylphenol) ist ein starkes intravenöses Hypnotikum, das sowohl zur Einleitung und Aufrechterhaltung von Narkosen als auch zur Sedierung auf der Intensivstation eingesetzt wird [27]. Zusätzlich zu seinen anästhetischen Eigenschaften besitzt es ein therapeutisches Profil, das bei Patienten mit Sepsis besonders vorteilhaft sein kann [27]. Neben der Abschwächung der Produktion proinflammatorischer Zytokine und der antioxidativen Eigenschaften kann Propofol zusätzlich eine hemmende Wirkung auf die durch Sepsis ausgelöste vermehrte systemische Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) haben [27].

Seit seiner Einführung in den späten achtziger Jahren hat Propofol als intravenöses, kurz wirksames Narkosemittel weite Verbreitung gefunden [28]. Grund dafür sind die zahlreichen Vorteile des Medikamentes, wie das günstige Wirkprofil mit nur wenig unerwünschten Arzneimittelwirkungen, sowie der gut kontrollierbare Narkosezustand: Durch schnellen Wirkungseintritt und schnelles Wiederaufwachen aus der Allgemeinanästhesie erzeugt Propofol eine schnelle und gut steuerbare Narkoseinduktion und Hypnose von kurzer Dauer, ohne Erregungsphänomene [29].

Propofol entfaltet seine hypnotische Wirkung durch Potenzierung der Effekte des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) am GABAA-Rezeptor [30]. GABAA-Rezeptoren sind an der Regulierung von Vigilanz, Angst, Muskelspannung und

Gedächtnisleistung beteiligt [30]. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Propofol direkt die postsynaptischen GABAA-Rezeptoren aktiviert und einen Chloridstrom auslöst, der zu einer Suppression der neuronalen Erregbarkeit des zentralen Nervensystems führt [31]. Propofol besitzt schon in subhypnotischen Dosen signifikante direkte antiemetische und milde analgetische Wirkungen sowie anxiolytische Eigenschaften und minimale amnestische Effekte [32-35]. Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Propofol sind umfassend beschrieben, wobei die häufigste der Injektionsschmerz ist [36]. Andere unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind dosisabhängig kardiovaskulär, wie Bradykardie, Hypotonie und seltener metabolisch, wie die Hyperlipidämie infolge der Infusion der Lipidemulsion [36].

Propofol ist nicht wasserlöslich und wird daher in einer komplexen Lipidemulsion zubereitet, die in ihrem Gehalt an langkettigen ω -3- und ω -6-Fettsäuren variiert und neben dem Wirkstoff Propofol unter anderem Sojaöl, mittelkettige Triglyceride, Eilecithin, Glycerol, Ölsäure, Elektrolyte und Wasser für Injektionszwecke enthält [27, 37, 38]. Es gibt umfangreiche experimentelle und klinische Daten, die physiologische und krankheitsmodifizierende Wirkungen von langkettigen Fettsäuren beschreiben [27]. Langkettige ω -3-Fettsäuren haben z.B. antiinflammatorische Wirkungen und reduzieren Zytokinantworten, während langkettige ω -6-Fettsäuren eher proinflammatorisch wirken [27]. Linolsäure, eine mehrfach ungesättigte ω -6-Fettsäure, ist die wichtigste Fettsäure in Sojabohnenöl und macht mehr als 50 % des Fettsäuregehaltes aus [39]. Sie ist die Vorstufe der Arachidonsäure, aus der wiederum Prostaglandine und Leukotriene entstehen [39]. Das von der Arachidonsäure abgeleitete Prostaglandin E2 steigert die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und führt zu einer stressbedingten Immunsuppression [39]. Daher können ungesättigte ω -6-Fettsäuren die proinflammatorische Reaktion und die stressbedingte Immunsuppression bei kritisch kranken Patienten verstärken [39]. Mehrfach ungesättigte ω -3-Fettsäuren hingegen vermindern die Synthese von Prostaglandin E2 und bilden den biologisch weniger aktiven Metaboliten Prostaglandin E3 [40]. Die aus ω -3-Fettsäuren gebildeten Prostaglandine und Leukotriene sind weniger proinflammatorisch und immunsuppressiv als die, die aus ω -6-Fettsäuren entstehen [40]. Eine Propofolrezeptur, die hauptsächlich ω -3-Fettsäuren enthält, könnte gegebenenfalls über zusätzliche therapeutische Vorteile bei Patienten mit Sepsis verfügen [27].

Propofol selbst moduliert nachweislich verschiedene Aspekte der inflammatorischen Immunantwort des Wirts; Die Reinsubstanz Propofol senkt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, hemmt die Funktion der neutrophilen Granulozyten und verändert die Expression von Stickstoffmonoxid (NO) [37]. Im Gegensatz dazu bewirkt das

Sojaöl als Lipidkomponente der Propofolemulsion eine vermehrte Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren sowie eine Immunsuppression [37].

In tierexperimentellen Studien zeigte die Verabreichung von Propofol hemmende Effekte auf die Zytokinantwort sowie auf die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und deren Infiltration in die Lunge, sodass angenommen werden kann, dass Propofol die Entzündungsreaktion hemmt und auch die Entwicklung einer metabolischen Azidose während einer Endotoxämie verhindern könnte [41]. In der erweiterten tierexperimentellen Studie schwächte die frühe Nachbehandlung einer Endotoxinämie mit Propofol nicht nur die Zytokinreaktion und Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ ab, sondern reduziert außerdem die Sterblichkeitsrate deutlich, was darauf hindeutet, dass die Verabreichung von Propofol bei Sepsis von Vorteil sein könnte [42]. Neben der Abschwächung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zeigt Propofol zusätzlich komplexe, modulierende Effekte auf die NO-Produktion, welche die Veränderungen in der NO-Synthese, die bei Patienten mit Sepsis auftreten, umkehren [37, 43]. Bei Sepsis initiieren verschiedene proinflammatorische Mediatoren die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), was zu einer exzessiven Produktion des endogenen Vasodilators NO führt und für den drastischen Blutdruckabfall bei einem septischen Schock mitverantwortlich ist [43]. Propofol reduziert die durch Sepsis ausgelöste systemische NO-Produktion, indem es die iNOS selektiv hemmt [43]. Die unterschiedliche Hochregulierung von iNOS bei Patienten mit Sepsis und die Selektivität von Propofol für iNOS deuten darauf hin, dass Propofol den Blutdruck bei Patienten mit Sepsis erhöhen und damit für Patienten mit Sepsis besonders geeignet sein kann [41].

Der Wirkstoff Propofol besitzt des Weiteren eine phenolische Hydroxyl (OH)-Gruppe, die ihm strukturelle Ähnlichkeit mit dem endogenen Antioxidans α -Tocopherol (Vitamin E) und damit auch antioxidative Eigenschaften verleiht [44]. Propofol wirkt als Antioxidans, indem es mit freien Radikalen reagiert und ein Phenoxyradikal bildet [44]. Dies lässt vermuten, dass Propofol durch seine Eigenschaft als Radikalfänger, insbesondere bei Erkrankungen wie Multiorganversagen im Rahmen einer Sepsis, nützlich sein könnte [44].

Bei Propofol wurde bereits bei durch Hypoxie vermittelten Barrierschäden ein positiver Einfluss auf die Darmbarriere festgestellt [45]. Bisherige Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass Propofol inflammatorische endotheliale Barrierefunktionsstörungen positiv beeinflusst [46]. Außerdem zeigte Propofol unter anderem in einem Caco-2 Zellmodell eine signifikante hemmende Wirkung auf die nukleäre Transkriptionsfaktor- κB (NF- κB)- Expression und der NF- κB nachgeschalteten proinflammatorischen Zytokine [47]. Propofol reduzierte weiterhin die Wirkung von $\text{TNF-}\alpha$ auf die Entzündungsaktivität [47].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der Literatur sind zahlreiche positive Eigenschaften von Propofol, unter anderem antiinflammatorische, antioxidative und endothelprotektive Eigenschaften beschrieben. Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss von Propofol auf die gestörte Barrierefunktion des inflammatorisch beeinträchtigten Darmepithels zu evaluieren.

Das inflammatorische Milieu wird in dem hier beschriebenen humanen epithelialen Caco-2 Zellmodell, nachdem die Enterozyten ausdifferenziert sind und eine funktionstüchtige Barriere ausgebildet haben, durch die Inkubation mit den proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und IFN- γ erzeugt. Danach ist ein entsprechender Widerstandsverlust der Barriere, demzufolge der *Monolayerzellschicht* zu verzeichnen. Diese *in vitro* dargestellte inflammatorisch beeinträchtigte Darmbarriere wird zusätzlich mit Propofol inkubiert, um dessen Einfluss auf die Barrierefunktion zu evaluieren.

Zur Bestimmung der Auswirkungen auf die Epithelbarriere und die Integrität der *tight junctions* wird der transepitheliale elektrische Widerstand der Zellen eruiert, welcher Aufschluss auf die Barrierefunktion gibt. Weiterhin wird das *tight junction* Protein ZO-1 immunhistologisch dargestellt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zelllinie

Die im anästhesiologischen Forschungslabor kultivierten Caco-2 Zellen wurden vom Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/ Reagenzien	Hersteller
<i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	GIBCO by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Enzymreiner Enzol	Johnson & Johnson, New Brunswick, New Jersey, USA
Essigsäure (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Zentralapotheke Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Linde, Duisburg, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	GIBCO by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Glutamax (stabilisiertes Glutamin)	GIBCO by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
IFN- γ Interferon gamma (SRP3058) Interferon gamma human recombinant (51564)	Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland

Kollagen (Collagen, Typ I solution from rat tail)	Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Lipovenös 20 (20 % MCT)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Minimum Essential Medium Eagle (M5650)	Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Minimum Essential Medium Eagle Pulver (M3024)	Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin (Pen/ Strep)	GIBCO by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Phenazine Methosulfate (PMS)	Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Propofol (10 mg/ ml Propofol, 5% MCT)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Propofol (D126608)	Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Saponin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TNF- α Tumor Nekrose Faktor alpha human (SRP3177) Tumor Nekrose Faktor alpha human recombinant (50435)	Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Trehalose (D-(+)-Trehalose dihydrate)	Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Triton X-100	Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin- EDTA (0,05%)	GIBCO by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wasser für Injektionszwecke Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Wasserbadkonservierer Akasolv Aqua Care	Akadia Chemie, Plankstadt, Deutschland
XTT- Natriumsalz	XTT Sodium Salt BioChemica, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ziegen Serum: Goat Serum G9023	Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.1.3 Antikörper

Tabelle 2: Übersicht primäre und sekundäre Antikörper

Primär-Antikörper				
Zielprotein	Sekundär- AK	MW (kDa)	Verdünnung	Hersteller
Zonula occludens-1	Anti- Rabbit	200 kDa	1:100 (2 % Goat Serum in 0,2 % DPBS/ Saponin)	ThermoFisher Scientific # 61-7300, Waltham, Massachusetts, USA
Sekundär- Antikörper				
<i>Cy3-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG</i>			1:400 (2% Goat Serum in 0,2% DPBS/ Saponin)	Dianova GmbH # 111-165-144, Hamburg, Deutschland

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Übersicht der Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Herkunft
Chamberslides: Nunc Lab-Tek Chamber Slide System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Deckgläser	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Filter Vacuumfiltration Filteraufsatz 250 rapid-Filtermax Filter Filtopur 0,2	TPP, Trasadingen, Schweiz Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Inserts TL (PET 0,4 µm)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Nagellack	Essence, DM, Deutschland
Pasteurpipetten (Glas)	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere Filtertips (0,5-20 µl, 2-200 µl, 1000 µl 1250 µl extra long, 5000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Perfusorspritze	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Reagiergefäß	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Inc., Corning, New York, USA
Verschlussfolie Parafilm	Bemis Company, Neenah, Wisconsin, USA
Zellkulturflaschen (T75, T175)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten (96-,12-Well)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

2.1.5 Geräte

Tabelle 4: Übersicht der Geräte

Geräte	Herkunft
Autoclav Tuttnauer 2540 EL	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Brutschränke CO ₂ - Inkubator Modell CB 210/ CB ULE7/ CB 170	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Eismaschine Manitowoc RF0244A	Manitowoc Ice Inc., Manitowoc, Wisconsin, USA
Epithelwiderstand-Messkammer : EndOhm-12	World precision instruments Ltd., Sarasota, Florida USA
Epithelwiderstand-Voltohmmeter- Widerstandsmessgerät EVOM2	World precision instruments Ltd., Sarasota, Florida USA
Immunhistochemie (IHC) Mikroskop	

Leica DMLB Mikroskop mit Leica DFC420C Kamera	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzlampe Osram HBO 103W/2	Osram Licht AG, München, Deutschland
Inkubator BD23	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Laborvakuumpumpe N811 Laboport	KNF, Feiburg, Deutschland
Magnetrührer Variomag Mono	Neo Lab, Heidelberg, Deutschland
Magnetrührstäbchen Komet	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Hera safe KS 15	Heareus, Hanau, Deutschland
Mikroskop Motic AE 30	Motic, Wetzlar, Deutschland
Multi-Detektions-Plattenlesegerät BioTek Synergy2 Multi-Mode Microplate Reader	BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA
Neubauer Zählkammer	Neubauer, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler MTS 2/4 Digital (IKA Eurostar 20 digital 2000 rpm)	IKA- Labortechnik, IKA- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Trockenschrank T6120	Heraeus, Hanau, Deutschland
Waagen Sartorius LA230S Sartorius BP1200	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad Memmert WNE14	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifugen Eppendorf 5417R Hettich Zentrifugen Rotina 420R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Andreas Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland

2.1.6 Software und Datenbanken

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Software und Datenbanken

Softwares	
Detektionssoftware Immunhistochemie: LAS X	Leica Microsystems GmbH ,Wetzlar, Deutschland
Endnote 20.2	Clarivate Analytics, London, UK
Excel	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Gen5 Version 1.11	BioTek, Winooski, Vermont, USA
Power Point	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Statistik	Graphpad Prism Vs 10, Dotmatics, Boston, Massachusetts, USA
Word	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Datenbanken	
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Servier Medical Art	www.servier.com

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Medien und Zusätze

Für die Kultivierung der Caco-2 Zellen wurde Minimum Essential Medium (MEM) mit 1 % stabilisiertem Glutamin (Glutamax), 20 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/ Streptomycin (Pen/ Strep) verwendet. Für die Experimente wurde farbloses Medium angesetzt. Dafür wurden 4,15 g MEM zusammen mit 1,1 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in 500 ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) gelöst und steril filtriert. Auch hier wurden 20 % FCS, 1 % Glutamax und 1 % Pen/ Strep zugegeben.

2.2.1.2 Kultivierung der Caco-2 Zellen

Die Caco-2 Zellen wurden bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2 -Gehalt in T75/T175-Zellkulturflaschen mit 20/30 ml Medium im Brutschrank kultiviert, und alle 3 bis 4 Tage passagiert. Hierfür wurden die Zellen erst mit 5/10 ml *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) gewaschen und anschließend mit der gleichen Menge an DPBS für 5 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das DPBS wieder abgesaugt und die Zellen durch die Inkubation mit 2/4 ml Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (0,05 %) für 5 bis 10 min im Brutschrank vom Flaschenboden gelöst. Die Kontrolle des Ablösens erfolgte nach 5 min und wurde ggf. durch Klopfen an der Zellkulturflasche mechanisch unterstützt. Wenn sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde die weitere Lyse durch die Zugabe von 8/11 ml frischem Medium abgestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen gründlich mit einer 5 ml Pipette resuspendiert bevor sie mit der Neubauer Zählkammer gezählt und neu angesetzt wurden. Für 3 Tage wurden $0,7 \times 10^6$ Zellen in 20 ml (T75) bzw. $1,6 \times 10^6$ Zellen in 30 ml (T175) und für 4 Tage wurden $0,35 \times 10^6$ Zellen in 20 ml (T75) bzw. $0,8 \times 10^6$ Zellen in 30 ml (T175) angesetzt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage bzw. im Rahmen der Passagierung.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung, Aussäen im Well- Format, Kollagenisierung und Mediumwechsel

Um eine bestimmte Zellzahl pro Well auszusäen, wird die Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauer- Zählkammer durchgeführt. Hierfür wurde im Rahmen der Passagierung 20 μl der Zell/Medium Suspension auf die Neubauer- Zählkammer gegeben. Die Zellen wurden mithilfe des Mikroskops in 4 Quadranten ausgezählt und der Mittelwert der Zellzahl gebildet. Um die Zellzahl pro ml Medium zu erhalten, wurde der Mittelwert mit dem Volumenfaktor $1,0 \times 10^4$ multipliziert.

Um die gewünschte Anzahl an Zellen in dem benötigten Aussaatvolumen zu erhalten, wurde das bei der Zellzählung ermittelte Volumen an Zell/Medium Suspension in ein Falcon-Röhrchen gegeben und mit frischem Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden anschließend in verschiedenen Well-Platten ausgesät (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Aussaat- Schema für die einzelnen Well-Formate

	Zellen	cm ²	Medium µl	Zellen aussäen		
				Medium µl	Zellsuspension µl	
12-Well Inserts	2×10^5	1,10	500/ 1500	250	250	($0,8 \times 10^6$ Z/ml)
Chamber slides	5×10^4	0,70	300	100	200	($0,25 \times 10^6$ Z/ml)
96-Well	1×10^4	0,29	200	100	100	(1×10^5 Z/ml)

Für eine bessere Haftung der Zellen wurden die in 12-Well Platten eingesetzten Inserts und die Chamberslides vorab kollagenisiert. Für zwei 12-Well Platten mit je 12 Inserts wurde 6,82 ml Essigsäure (0,02 M) mit 165,8 µl Kollagenlösung gemischt und 250 µl der Lösung in jedes Insert gefüllt. Für ein Chamberslide mit acht Kammern wurde 1,8 ml Essigsäure (0,02 M) mit 43,8 µl Kollagenlösung angesetzt und je 200 µl pro Kammer pipettiert. Dann wurden die Platten 3 h inkubiert und der Überstand abpipettiert. Die Inserts wurden mit je 250 µl und die Kammern des Chamberslides mit je 200 µl DPBS gewaschen, welches anschließend wieder abpipettiert wurde. Die Inserts wurden über Nacht zum Austrocknen in der Sterilbank gelagert. Platten, die nicht sofort genutzt werden sollten, wurden am nächsten Morgen mit Parafilm umwickelt und im Kühlschrank gelagert.

Die in den Testplatten ausgesäten Caco-2 Zellen reifen über 21 Tage und bilden in dieser Zeit eine funktionstüchtige Barriere aus. Bei den Inserts wurde zunächst das basale Medium aus den Wells abgesaugt und dann das apikale Medium vorsichtig aus den Inserts abpipettiert. Das neue Medium wurde zunächst in die Inserts (500 µl) und danach in die Wells (1500 µl) pipettiert. Die Wachstumskontrolle der in den Inserts kultivierten Zellen erfolgte einmal wöchentlich durch die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER).

2.2.2 Inflammatorische Schädigung und Behandlung mit Propofol

2.2.2.1 Inflammatorische Schädigung mit TNF- α und IFN- γ

In experimentellen Vorversuchen mit unterschiedlich kombinierten TNF- α und IFN- γ Konzentrationen hat sich die Konzentrationskombination von TNF- α 2,5 ng/ml und IFN- γ 10 ng/ml über einer Inkubationszeit von 24 h mit einem signifikanten Abfall des TEER von durchschnittlich ca. 20 % als geeignet erwiesen, um eine Beeinträchtigung der intestinalen Barrierefunktion zu simulieren ohne apoptotische Zellen zu generieren. Dabei war eine Inkubationszeit von 24 h ausreichend.

2.2.2.2 Behandlung mit Propofol

Um den Einfluss von Propofol auf die inflammatorisch veränderte intestinale Barrierefunktion zu evaluieren, wurden die inflammativ geschädigten Caco-2 Zellen mit unterschiedlichen Propofolkonzentrationen (10, 50, 100 und 500 μ M) behandelt, die den im Menschen während der Sedierung und Narkose eingesetzten Propofolplasmakonzentrationen entsprechen [45].

Da das klinisch eingesetzte Propofol eine Lipidemulsion ist und der Einfluss der darin enthaltenen Fettsäuren auf die inflammatorisch geschädigte Barrierefunktion separat von dem Wirkstoff Propofol beurteilt werden sollte, wurden die Versuche jeweils mit der klinisch eingesetzten Propofol-Lipidemulsion von Fresenius Kabi und mit dem in DMSO gelösten Wirkstoff Propofol getrennt voneinander durchgeführt. Es wurde außerdem der Einfluss der eingesetzten Testsubstanzen auf die inflammatorisch beeinträchtigte Darmbarriere im Vergleich zur intakten Darmbarriere evaluiert. Die Testkomponenten enthalten unterschiedliche Propofolkonzentrationen und entsprechende Kontrollen (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Eingesetzte Testsubstanzen

Testsubstanz	Zusammensetzung
MPB	Medium (PBS 2 %/BSA 0,002 %)
DMSO 0,2 %	MPB+DMSO
Lipo 0,5 %	MPB+Lipovenös
10 μ M PropDMSO	10 μ M Propofol (0,2 % DMSO)
10 μ M PropFres	10 μ M Propofol (0,5 % Lipo)
50 μ M PropDMSO	50 μ M Propofol (0,2 % DMSO)
50 μ M Prop/Fres	50 μ M Propofol (0,5 % Lipo)

100 µM PropDMSO	100 µM Propofol (0,2 % DMSO)
100 µM PropFres	100 µM Propofol (0,5 % Lipo)
500 µM PropDMSO	500 µM Propofol (0,2 % DMSO)
500 µM Prop/Fres	500 µM Propofol (0,5 % Lipo)
INFL	TNF 2,5 ng/ml+IFN 10 ng/ml
1 % Triton	Medium+Triton 10 %

2.2.3 Kolorimetrischer Assay mittels Tetrazoliumsalz

Der 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide (XTT)-Test ist eine Methode zur Bestimmung der Viabilität von Zellen bzw. der Zytotoxizität von Testsubstanzen [48]. Das Testprinzip basiert auf der Enzymaktivität metabolisch aktiver Zellen. Dehydrogenasen in den Mitochondrien vitaler Zellen wandeln das Tetrazoliumsalz zu einem wasserlöslichen Reaktionsprodukt, dem Formazan, um [48]. Die Effizienz der Reduktion von XTT wird durch die Anwesenheit des Elektronenüberträgers Phenazine Methosulfate (PMS) gesteigert [48]. Das orangefarbene Endprodukt Formazan lässt sich spektrophotometrisch bei einem Absorptionsmaximum zwischen 440-490 nm Wellenlänge messen [48]. Hierbei verhält sich die Intensität des Farbstoffs proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven, also vitalen Zellen [48].

2.2.3.1 Versuchsaufbau

Um den Einfluss von Propofol auf die Zellviabilität zu untersuchen wurde Propofol in vier unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Es erfolgte jeweils ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne inflammatorische Schädigung. 24 h nach dem Beginn der Behandlung mit Propofol erfolgte entweder die inflammatorische Schädigung der Zellen mit TNF- α und IFN- γ in Kombination mit der Propofol-Behandlung oder nur die Behandlung mit Propofol, ohne inflammatorische Schädigung. Als Kontrollen wurde Medium und Triton eingesetzt.

Die Kultivierung der Caco-2 Zellen für den XTT- Versuch erfolgte in 96-Well Mikrotiterplatten. Dafür wurden 52 Wells mit 1×10^4 Zellen pro Well ausgesät. Für die Versuche wurden jeweils vier technische und drei biologische Replikate angefertigt.

2.2.3.2 Versuchsdurchführung

Am ersten Versuchstag wurde das alte Medium abgesaugt (und die Zellen mit je 200 µl DPBS pro Well gewaschen). Anschließend wurde 200 µl der jeweiligen Testkomponente (MPB,

DMSO/Lipofundin, Propofol in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 500 μM sowie Triton) in die Wells geben und die Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 stündiger Inkubation wurde die Testkomponente abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 200 μl Testkomponente pro Well behandelt - entweder mit der jeweiligen Testkomponente MPB, DMSO/Lipofundin, Propofol in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 500 μM sowie Triton wie am Vortag oder mit einer Kombination dieser Substanzen mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ zur Simulation einer inflammatorischen Zellschädigung. Die Zellen wurden für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Am zweiten Versuchstag wurden die Zellen somit entweder ausschließlich mit den Testsubstanzen oder mit den Testsubstanzen in Kombination mit einer inflammatorischen Komponente behandelt.

Nach 24 h der Inkubation wurde am dritten Versuchstag die Testkomponente abgezogen und 100 μl farbloses Caco-2 Medium in die Wells geben. Für den XTT- Versuch wurde 1 mg/ml XTT- Salz in farblosem Caco-2 Medium gelöst. Die 40 μl PMS (1 mM Stock) pro ml XTT-Lösung wurden erst unmittelbar vor Gebrauch zugegeben. Anschließend wurden 50 μl der angesetzten XTT-Lösung pro Well zugegeben und die Platte für eine min auf einem Schüttler (600 rpm) inkubiert, um den Farbstoff gleichmäßig zu verteilen. Die Platte wurde daraufhin für weitere 90 min im Brutschrank inkubiert und im Anschluss noch einmal für 3 min auf dem Schüttler. Sollten sich Luftblasen gebildet haben, wurden diese vor der Messung entfernt. Die Platten wurden dann am Plate Reader bei 450 nm Wellenlänge ausgelesen.

2.2.4 Messung der Barrierefunktion mit TEER

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) ist eine quantitative elektrophysiologische Methode zur Messung der Integrität der *tight junctions* zwischen den polarisierten Zellen in Zellkulturmodellen von epithelialen *Monolayern* [49]. TEER-Messungen ermöglichen ein Echtzeit-Monitoring der Barriereintegrität während der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsstadien der Zellen ohne dabei einen zellulären Schaden zu verursachen [49]. Die TEER-Werte sind aussagekräftige Indikatoren für die Permeabilität der zellulären Barrieren und basieren im Allgemeinen auf der Messung des ohm'schen Widerstands [49]. Dabei ist der elektrische Widerstand einer zellulären *Monolayer*, gemessen in Ohm, ein quantitatives Maß für die Barriereintegrität [49]. Für die Messung des TEER werden zwei Elektroden verwendet, von denen sich eine im apikalen und die andere im basalen Kompartiment befindet [49]. Der in semipermeablen Filtereinsätzen angezüchtete zelluläre *Monolayer*, bildet die Trennschicht zwischen beiden Kompartimenten [49]. Zwischen den beiden Elektroden wird Strom entlang der zellulären *Monolayer* geleitet und der Spannungsunterschied zwischen den Elektroden gemessen, um darüber den

entweder die inflammatorische Schädigung der Zellen mit TNF- α und IFN- γ in Kombination mit der Propofol- Behandlung oder nur die Behandlung mit Propofol, ohne inflammatorische Schädigung. Auch hier wurden für die Positivkontrollen Medium und für die Negativkontrollen Triton eingesetzt. Nach weiterer 24 stündiger Inkubation der Zellen erfolgte die dritte TEER-Messung (s. Abb. 5).

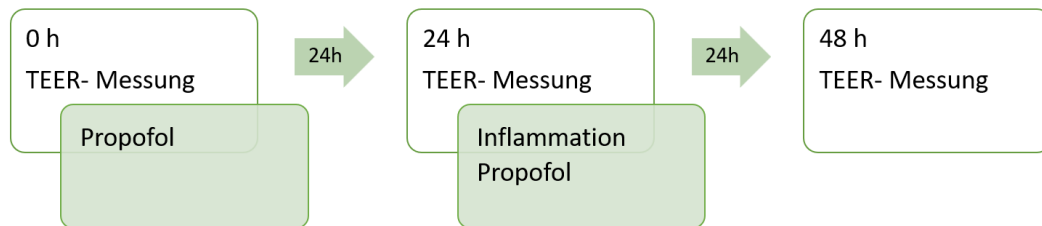


Abb. 5: Abfolge der periinflammatorischen Behandlung und TEER-Versuche.

Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der TEER- Versuche. Die TEER- Messung erfolgt zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten: Vor Versuchsbeginn, 24 h nach der Inkubation mit Propofol bzw. direkt vor der inflammatorischen Schädigung mit zeitgleicher Propofolbehandlung und 24 h nach der inflammatorischen Schädigung (TEER-transsepithelialer elektrischer Widerstand).

Die Kultivierung der Caco-2 Zellen für die TEER-Messung erfolgte in semipermeablen Filtereinsätzen (Inserts), die in 12-Well Platten eingesetzt wurden. Dies ermöglicht eine apikale Behandlung der Zellen mit Testsubstanzen, was einer oralen Medikamentengabe ähnelt, sowie auch eine basale Behandlung der Zellen, was wiederum eine intravenöse (i.v.) Medikamentenapplikation simuliert. Die Testsubstanzen wurden entsprechend der i.v. Applikation von Propofol in die 12-Well Platte, also die basale Komponente des Inserts pipettiert. Für einen Versuch wurden 38 Inserts mit 2×10^5 Zellen pro Insert ausgesät. Es wurden jeweils drei technische und drei biologische Replikate angefertigt.

2.2.4.2 Versuchsdurchführung

Der letzte Mediumwechsel wurde 24 h vor dem Versuchsbeginn durchgeführt. Für die TEER-Messung wurde die Kammer vorab mit Alkohol desinfiziert und dann gründlich mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurde die Kammer mit ca. 3,3 ml Medium befüllt. Inserts, deren Messwerte $> 450 \Omega$ lagen, wurden in den Versuch inkludiert.

Zunächst wurde das basale Medium abgesaugt und das apikale Medium aus dem Insert abpipettieren. Anschließend wurde 500 μ l Medium in die apikale Seite des Inserts und 1500 μ l Testkomponente (MPB, DMSO/Lipofundin, Propofol in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 500 μ M sowie Triton) in die basale Seite pipettiert und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Am zweiten Versuchstag, 24 h nach der ersten Behandlung der Zellen wurden die Inserts für

15 min in einer mit DPBS gefüllten 12-Well Platte gewaschen, damit die Fettkomponente des Lipofundins nicht die Messung stört. Danach erfolgte erneut die Messung des TEER wie oben beschrieben. Nach der TEER-Messung wurde die basale Testkomponente abgesaugt und das apikale Medium abpipettiert. Apikal wurde wieder frisches Medium pipettiert und basal in die 12-Well-Platte die Testsubstanzen gegeben - entweder die jeweilige Testkomponente MPB, DMSO/Lipofundin, Propofol in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 500 μM sowie Triton wie am Vortag oder als Kombination mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN als inflammatorischer Ansatz. Die Zellen wurden für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

Am dritten Versuchstag, 24 h nach der inflammatorischen Schädigung der Zellen, wurde der TEER erneut wie oben beschrieben mit der Epithelwiderstandskammer gemessen, nachdem die Inserts für 15 min in einer mit DPBS gefüllten 12-Well Platte gewaschen wurden, damit die Fettkomponente des Lipofundins nicht die Messung stört.

2.2.5 Nachweis der *tight junction* Proteine mit Immunhistochemie

Eine Methode für die qualitative Detektion der *tight junction* Proteine ist die Immunhistochemie (IHC), die mit Hilfe von spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen erfolgt [51]. Bei der Zwei-Schritt-Methode bindet der Primärantikörper an sein spezifisches Antigen in der entsprechenden Gewebeprobe [51]. Der speziesspezifische, mit z.B. Fluorochromen oder Enzymen markierte Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und wird anschließend mit Hilfe von unterschiedlichen Detektionssystemen visualisiert [51]. Der Vorteil der mehrstufigen Verfahren ist die Sensitivitätssteigerung [51]. Während Fluorochrome Licht bestimmter Wellenlänge absorbieren und emittieren, und man für die Detektion ein Fluoreszenzmikroskop benötigt, benötigen Enzyme ein spezifisches Substrat, das nach seiner Umsetzung die relevanten Strukturen farblich markiert, die dann über ein Lichtmikroskop nachgewiesen werden können [51].

2.2.5.1 Versuchsaufbau

Für die immunhistochemische Darstellung des *tight junction* Proteins ZO-1 erfolgte die Anzucht der Zellen in Chamberslides, dabei wurden pro Kammer 5×10^4 Zellen ausgesät. Es wurden zwei technische und zwei biologische Replikate angefertigt. Es erfolgte jeweils ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne inflammatorische Schädigung. 24 h nach dem Beginn der Behandlung mit Propofol in den Konzentrationen 10 μM und 100 μM erfolgte entweder die inflammatorische Schädigung der Zellen mit TNF- α und IFN- γ in Kombination mit der Propofol-Behandlung oder nur die Behandlung mit Propofol, ohne inflammatorische Schädigung. (s. Abb 6). Als Kontrollen dienten mit DMSO/Lipofundin behandelten Zellen.

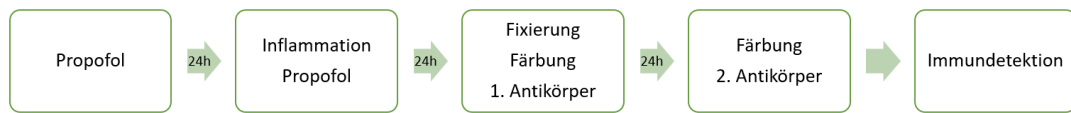


Abb. 6: Abfolge der periinflammatorischen Behandlung und Färbung für IHC.

In der Abbildung sind die für die Immunhistochemie gewählten Behandlungszeitpunkte mit Propofol schematisch dargestellt: Die periinflammatorische Behandlung der Zellen mit Propofol erfolgt 24 h vor und noch einmal zusammen mit der inflammatorischen Schädigung. Die Färbung und Fixierung erfolgt 24 h nach inflammatorischer Schädigung der Zellen.

2.2.5.2 Versuchsdurchführung

Am ersten Behandlungstag wurde das Medium abgezogen und je 400 µl der Testkomponente (DMSO/Lipofundin, Propofol 10 und 100 µM) in die jeweilige Kammer gegeben. Die Chamberslides wurden dann 24 h im Brutschrank inkubiert.

Um das dem Primärantikörper nachgeschaltete Nachweissystem, insbesondere den Sekundärantikörper auf unspezifische Bindungen an Strukturen des Präparates zu überprüfen, wurde auch eine Kontrolle ohne Primärantikörper durchgeführt [51]. Dafür wurde am zweiten Tag der Behandlung schon der 2. Antikörper (Anti-Rabbit IgG Cy3 konjugiert, 1:400) angesetzt. Die am ersten Behandlungstag pipettierte Testkomponente wurde abgezogen und je 400 µl der neuen Testkomponente in die entsprechende Kammer gegeben -entweder mit DMSO/Lipofundin, Propofol 10 und 100 µM wie am Vortag oder in Kombination dieser Substanzen mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α und IFN-γ zur Simulation einer inflammatorischen Zellschädigung. Die Zellen wurde für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Auch hier wurden die Zellen am zweiten Versuchstag entweder ausschließlich mit den Testsubstanzen oder mit den Testsubstanzen in Kombination mit dem inflammatorischen Stimulus behandelt.

24 h nach der inflammatorischen Behandlung erfolgte die Durchführung der Immunhistochemischen Färbung. Dafür wurden am ersten Tag der Färbung folgende Lösungen angesetzt (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Angesetzte Lösungen für den 1. Tag der immunhistochemischen Färbung

0,2 % DPBS/Saponin	0,2 g Saponin in 100 ml DPBS lösen
10 % Goat Serum in 0,2 % DPBS/Saponin	580 µl Goat Serum plus 5220 µl DPBS/ Saponin
2 % Goat Serum in 0,2 % DPBS/ Saponin	220 µl Goat Serum plus 10.780 µl DPBS/ Saponin
1. Antikörper ZO-1 (1:100)	38µl ZO-1 AK plus 3168 µl DPBS/ Saponin + 2 % Goat Serum

Zuerst wurde jede Kammer zweimal mit 200 µl warmen DPBS für 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte die chemische Fixierung mit 400 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA) in Phosphatpuffer für 10 min. Mit Hilfe der chemischen Fixierung, bei der das Präparat konserviert und gehärtet wird, kann die ursprüngliche Zell- bzw. Gewebemorphologie erhalten werden [51]. Da Antikörper idR. nicht in der Lage sind intakte Zellmembranen zu penetrieren, werden membranpermeabilisierende Agenzien wie z.B. Saponin eingesetzt, um intrazelluläre Messungen durchführen zu können [51].

Dafür wurden die Zellen dreimal mit 500 µl DPBS pro Schnitt für 10 min gewaschen und mit 200 µl 10 % Goat Serum in DPBS/Saponin für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurde 150 µl 1. Antikörper in die Kammern pipettiert. In die zwei Kontrollkammern, die nur mit Medium und 2. Antikörper vorbehandelt waren, wurde nur DPBS/Saponin gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht.

Am zweiten Tag der Färbung wurden die Kammern dreimal für 10 min mit je 500 µl DPBS/Saponin gewaschen, um die überschüssigen, ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 200 µl 2. Antikörper in einer dunklen, lichtgeschützten Box für 2 h bei RT. Nach der Inkubation wurden die Kammern zweimal mit 500 µl DPBS/Saponin für 15 min und am Schluss einmal mit DPBS ohne Saponin gewaschen.

Zum Eindecken wurden die Kammern und die Objektträger vorsichtig abgezogen und kurz mit DPBS gespült, dabei wurde darauf geachtet, dass der Schnitt nicht austrocknet. Dann wurde pro Objektträger insgesamt 6 Tropfen Pro Long Gold Antifade dazugegeben, um die Fluoreszenzfarbstoffe vor dem Verblässen zu schützen. Danach wurden die Objektträger mit einem Deckgläschen luftblasenfrei eingedeckt und außen mit Nagellack abgedichtet. Im Anschluss erfolgte die Immundetektion, bei der die geknüpften Antigen-Antikörper-Komplexe visualisiert werden, und die fotografische Dokumentation.

2.2.6 Statistische Analysen

Der XTT-Test sowie die TEER-Messungen wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Der Nachweis des ZO-1 Proteins erfolgte exemplarisch anhand einer zweimalig durchgeführten immunhistochemischen Darstellung.

Die Daten wurden mit GraphPad Prism10 analysiert. Zunächst wurde die Normalverteilung der TEER- und XTT-Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Anschließend wurden die Daten mit One-way ANOVA und dem Šídák'schen Multiple-Comparisons-Test weiter analysiert. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse XTT-Test

3.1.1 Einfluss von Propofol DMSO auf die Zellviabilität

Mithilfe des XTT-Tests wurde der Einfluss von der in DMSO gelösten Reinsubstanz Propofol in verschiedenen Konzentrationen (10, 50, 100 und 500 μM), auf die Viabilität der Caco-2 Zellen untersucht und mit der Wirkung unter inflammatorischer Schädigung verglichen (s. Abb. 7). Die Trägerlösung DMSO zeigte dabei keinen signifikanten Einfluss auf die prozentuale Zellviabilität. Bei der in DMSO gelösten Reinsubstanz Propofol konnte bei den eingesetzten Konzentrationen von 50 μM und höher eine signifikante Abnahme der Zellviabilität verzeichnet werden (s. Abb. 7A).

Die inflammatorische Schädigung der Caco-2 Zellen mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ zeigte keine signifikante Abnahme der Zellviabilität (s. Abb. 7B). Auch unter Inflammation zeigte DMSO keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Die unterschiedlichen Propofolkonzentrationen zeigten in Kombination mit TNF- α und IFN- γ keine signifikante Abnahme der Zellviabilität gegenüber der Inflammationskontrolle (s. Abb. 7B).

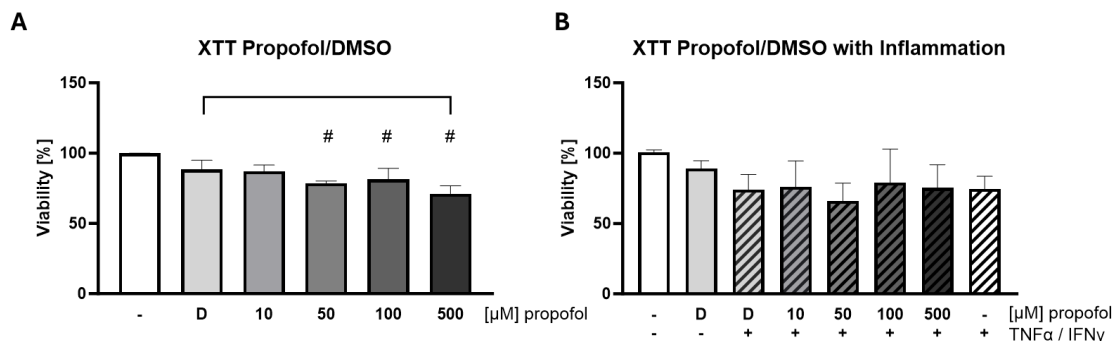


Abb. 7: Einfluss von Propofol DMSO auf die Zellviabilität.

Viabilität von Caco-2-Zellen nach A Propofol/DMSO Behandlung und B Propofol/DMSO Behandlung mit Inflammation. Kontrolle (keine Behandlung -/-); D (DMSO) Propofol Behandlung (10, 50, 100 und 500 μM); inflammatorischer Stimulus (2,5 ng/ml TNF- α / 10 ng/ml IFN- γ -/+); eine Kombination aus Propofol und inflammatorischem Stimulus (μM /+). Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt, n= 3, # p < 0,05 vs. Kontrolle, $\square$ p < 0,05 vs. D; in B waren keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Inflammation und zu D/+ zu beobachten.

3.1.2 Einfluss von Propofol Fresenius auf die Zellviabilität

Weiterhin wurde der Einfluss des klinisch eingesetzten und damit emulgierten Propofols (hier Propofol Fresenius) in verschiedenen Konzentrationen (10, 50, 100 und 500 μM) auf die Viabilität der Caco-2-Zellen untersucht und mit der Wirkung unter inflammatorischer Schädigung verglichen (s. Abb. 8). Weder die Trägerlösung Lipofundin noch die hier untersuchten Propofolkonzentrationen führten zu signifikanten Veränderungen der prozentualen Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle, obwohl der Mittelwert bei Propofol 50 μM ($71,2\% \pm 14,9$) und 100 μM ($74,6\% \pm 15,1$) sogar unter den entsprechenden Propofol/DMSO- Proben ($78,6 \pm 1,6$ und $81,5 \pm 7,7$) lag (s. Abb. 8). Proben, bei denen Propofol in Kombination mit der inflammatorischen Schädigung untersucht wurden, führten zu keiner signifikanten Abnahme der Viabilität im Vergleich zu einer Inflammation alleine (s. Abb. 8B).

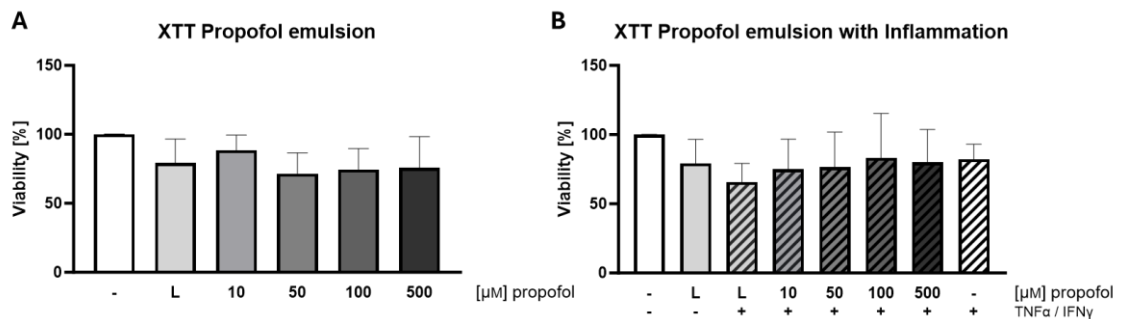


Abb. 8: Einfluss von Propofol Fresenius auf die Zellviabilität.

Viabilität von Caco-2-Zellen nach A Propofol Fresenius Behandlung und B Propofol Fresenius Behandlung mit Inflammation. Kontrolle (keine Behandlung -/-); L (Lipofundin) Propofol Behandlung (10, 50, 100 und 500 μM); inflammatorischer Stimulus (2,5 ng/ml TNF- α / 10ng/ml IFN- γ -/+); eine Kombination aus Propofol- oder Lipidkontrolle und inflammatorischem Stimulus ($\mu\text{M}/+$). Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt, n=3; es waren keine signifikanten Unterschiede in A im Vergleich zur Kontrolle und zu Lipofundin, in B im Vergleich zur Inflammation und zu L/+ zu beobachten.

3.2 Ergebnisse der transepithelialen Widerstandsmessungen

Mithilfe der Erhebung des TEER wurde der Einfluss von der in DMSO gelösten Reinsubstanz Propofol und dem klinisch eingesetzten Propofol Fresenius in verschiedenen Konzentrationen (10, 50, 100 und 500 μM) auf die Barrierefunktion der Caco-2 Zellen untersucht und mit der Wirkung unter inflammatorischer Schädigung verglichen.

3.2.1 Einfluss von Propofol DMSO auf TEER

Die Trägerlösung DMSO zeigte dabei keinen signifikanten Einfluss auf den TEER. Auch bei der in DMSO gelösten Reinsubstanz Propofol konnte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen eine signifikante Änderung des TEER verzeichnet werden (s. Abb. 9A).

DMSO zeigte auch in Kombination mit inflammatorischem Stimulus keine signifikante Abnahme des TEER. Die in DMSO gelöste Reinsubstanz Propofol hat unter inflammatorischer Schädigung in keiner der eingesetzten Konzentrationen eine signifikante Wirkung auf den TEER im Vergleich zur inflammatorischen Kontrolle (s. Abb. 9B).

Es ist anzumerken, dass die inflammatorische Kontrolle in diesem Ansatz im Gegensatz zu Vorversuchen (s. Abb. 10) die Signifikanz knapp verpasst ($p = 0.0505$).

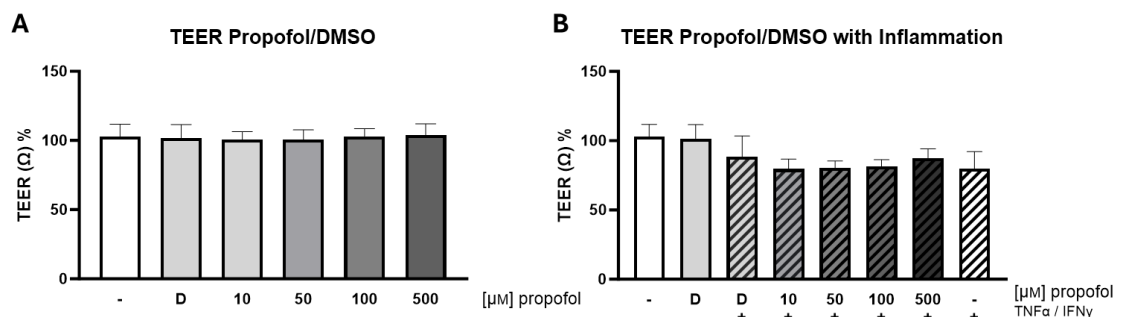


Abb. 9: Einfluss von Propofol DMSO auf den TEER.

Transepithelialer elektrischer Widerstand eines Caco-2-Monolayers nach 48 Stunden Behandlung. Kontrolle (keine Behandlung -/-); D (DMSO); Propofol-Behandlung (10, 50, 100 und 500 μM); inflammatorischer Stimulus (2,5 ng/ml TNF- α / 10ng/ml IFN- γ -/+); eine Kombination aus Propofol und inflammatorischem Stimulus ($\mu\text{M}/+$). Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben.

3.2.2 Einfluss von Propofol Fresenius auf TEER

Im Vergleich zu den beschriebenen Propofol/DMSO-Effekten zeigte das klinisch eingesetzte Propofol Fresenius deutliche Unterschiede. Die Trägerlösung Lipofundin ($90,1 \pm 7,4 \%$), welche als Kontrolle für den Lipidanteil der Propofol Emulsion diente, führte zu keiner signifikanten Abnahme des TEER (s. Abb. 10). Alle eingesetzten Propofol Fresenius Konzentrationen verursachten eine signifikante Abnahme des TEER. Propofol $10 \mu\text{M}$ ($87,4 \pm 5,3 \%$) verringerte den TEER um etwa 19 % im Vergleich zur Kontrolle ($106,1 \pm 10,1 \%$; $p = 0,03$). Propofol $50 \mu\text{M}$ ($77,9 \pm 3,1 \%$) und Propofol $100 \mu\text{M}$ ($77,2 \pm 2,6 \%$) verringerten den TEER sogar noch weiter und zeigten einen Unterschied von etwa 28 % zur Kontrolle ($p = 0,001$), während die Behandlung mit Propofol $500 \mu\text{M}$ eine TEER-Reduktion von etwa 25 % ($81 \pm 5,3 \%$, $p = 0,002$) zeigte (s. Abb 10A).

Unter inflammatorischer Schädigung variierte die Wirkung von Lipofundin und Propofol. Die Inflammation ($87,9 \pm 7,9 \%$, $p = 0,04$) allein bewirkte einen TEER-Reduktion von etwa 18 % gegenüber der Kontrolle. Lipofundin bewirkte unter inflammatorischer Schädigung eine signifikante Abnahme des TEER ($62,3 \pm 2,5 \%$, $p = 0,003$) im Vergleich zum inflammatorischen Stimulus allein. Während die Behandlung mit Propofol $10 \mu\text{M}$ ($71,4 \pm 9,1 \%$, $p = 0,8$) keine weitere Beeinträchtigung des TEER bewirkte, verursachten Propofol Fresenius Konzentrationen von $50 \mu\text{M}$ ($68,6 \pm 4,6 \%$, $p = 0,02$), $100 \mu\text{M}$ ($65,7 \pm 2,4 \%$, $p = 0,01$) und $500 \mu\text{M}$ ($68,7 \pm 1,6 \%$, $p = 0,02$) unter inflammatorischer Schädigung eine signifikante Reduktion des TEER gegenüber der inflammatorischen Kontrolle. Die TEER-Werte bleiben jedoch ähnlich den mit Lipofundin/Inflammation behandelten Proben (s. Abb. 10B).

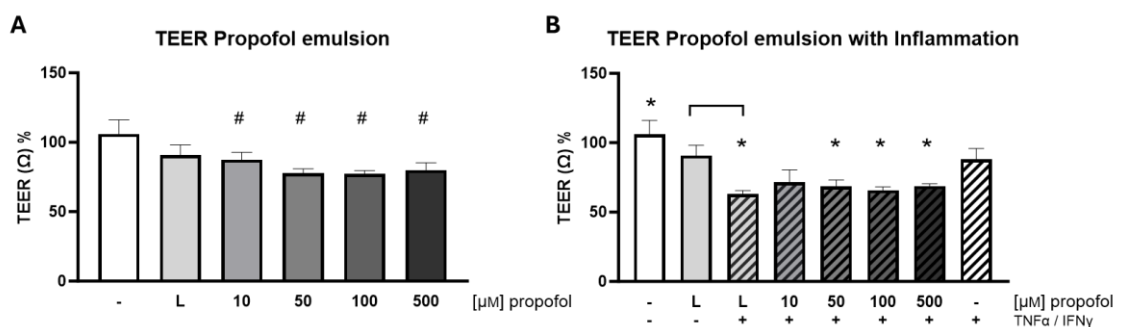


Abb. 10: Einfluss von Propofol Fresenius auf den TEER.

Transepithelialer elektrischer Widerstand eines Caco-2-Monolayers nach 48 Stunden Behandlung. Kontrolle (keine Behandlung -/-); L (Lipofundin); Propofol Behandlung (10, 50, 100 und $500 \mu\text{M}$); inflammatorischer Stimulus ($2,5 \text{ ng/ml TNF-}\alpha$ / $10 \text{ ng/ml IFN-}\gamma$ -/+); eine Kombination aus Propofol und inflammatorischem Stimulus ($\mu\text{M}/+$). Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben, # $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle, * $p < 0,05$ im Vergleich zur Inflammation, $\square$ $p < 0,05$ im Vergleich zu L/+.

3.3 Ergebnisse Immunhistochemie

3.3.1 Einfluss von Propofol auf die ZO-1 Proteinexpression

Eine Behandlung mit DMSO oder Propofol/DMSO führte in der immunhistochemischen Färbung zu keinen sichtbaren Veränderungen der netzartigen Expression des ZO-1 Proteins (s. Abb. 11A/B). Nach der inflammatorischen Schädigung waren zahlreiche durch ZO-1 angefärbte intrazelluläre Vakuolen sichtbar (s. Abb. 11D). Proben, die unter inflammatorischer Schädigung mit Propofol behandelt worden waren, zeigten immer noch intrazelluläre ZO-1 gefärbte Vakuolen, aber zusätzlich eine Zunahme von unregelmäßiger ZO-1 Färbung auf der Ebene der Zellmembran (s. Abb. 11C).

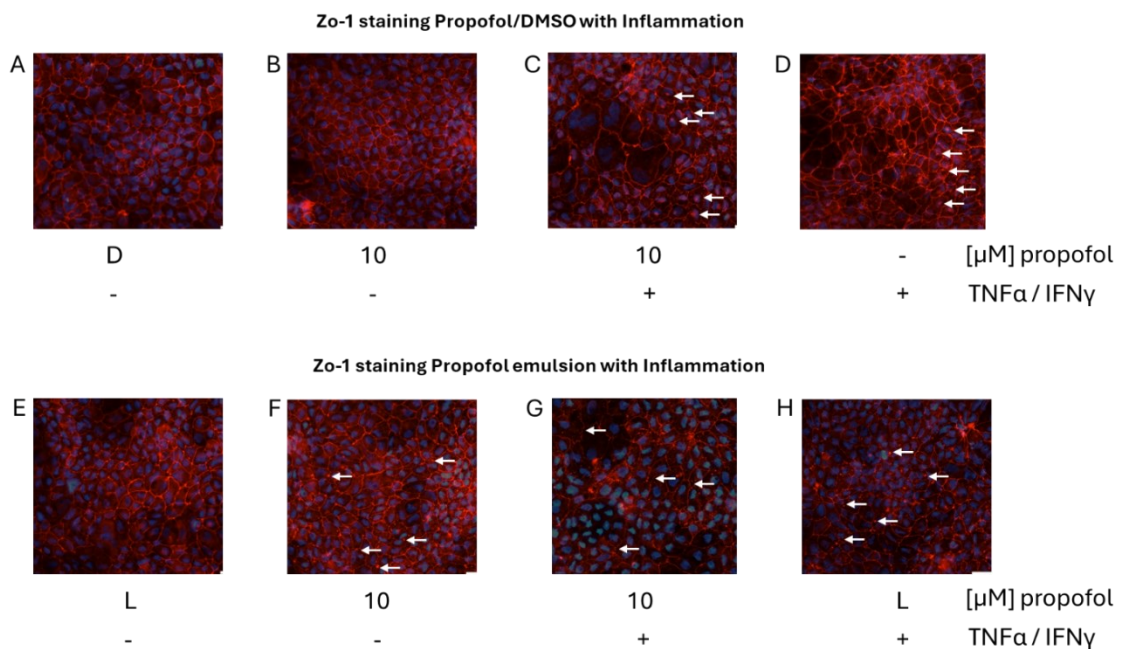


Abb. 11 Immunhistochemische Färbung des Zonula occludens-1 Proteins.

Immunhistochemische Färbung des Zonula occludens-1 Proteins nach periinflammatorischer Behandlung mit Propofol (400x). Die Proben wurden wie folgt behandelt: A DMSO; B 10 μM Propofol; C 10 μM Propofol in Kombination mit inflammatorischem Stimulus (2,5 ng/ml TNF-α/ 10ng/ml IFN-γ); D inflammatorischer Stimulus; E Lipofundin; F 10 μM Propofol Fresenius; G 10 μM Propofol Fresenius in Kombination mit inflammatorischem Stimulus; H Lipofundin in Kombination mit inflammatorischem Stimulus.

Verglichen mit der DMSO- Kontrolle zeigten die mit Lipofundin behandelten Proben (s. Abb. 11E) eine inhomogenere Verteilung des gefärbten ZO-1 Proteins. Bei der Behandlung mit Propofol Fresenius 10 μM war ein ähnlicher, aber verstärkter Effekt zu beobachten (s. Abb. 11F). Interessanterweise war in diesen Proben eine ähnlich unregelmäßige ZO-1 Färbung,

sowie auch durch ZO-1 gefärbte Vakuolen sichtbar, die jedoch im Vergleich tendenziell kleiner erschienen als die in den inflammatorisch geschädigten Proben.

In den inflammatorisch geschädigten Proben, die mit Lipofundin bzw. mit Propofol Fresenius behandelt worden waren, konnte die stärkste Veränderung des ZO-1 Färbemusters beobachtet werden (s. Abb 11G/H). In den mit Lipofundin behandelten inflammatorisch geschädigten Proben waren zahlreiche ZO-1 gefärbte intrazelluläre Vakuolen sichtbar, mit einer schwachen ZO-1 Färbung der Zellmembran (s. Abb 11H). In den mit Propofol Fresenius behandelten inflammatorisch geschädigten Proben stellten die gefärbten ZO-1-Proteine keine homogene Netzstruktur mehr dar; die gefärbten Membranen schienen unterbrochen und intrazellulär zeigte sich eine ZO-1-positive Sprenkelung (s. Abb. 11G).

4 DISKUSSION

4.1 Inflammatorische Schädigung der Caco-2 Zellen und Behandlung mit Propofol *in vitro*

In dieser Studie wurde untersucht, wie sich der Wirkstoff Propofol und die klinisch eingesetzte Propofolemulsion auf die Darmbarriere auswirken und ob die in bisherigen Studien beschriebenen antiinflammatorischen Eigenschaften von Propofol, mit seinen positiven Effekten auf den Darm, auch in einem inflammatorisch geschädigten, enterozytären Barriera-Modell *in vitro* nachzuweisen sind. Dabei konnte beobachtet werden, dass der Wirkstoff Propofol weder unter physiologischen noch unter inflammatorischen Bedingungen signifikante Veränderungen der Darmbarriere induzierte. Dagegen schädigte die klinisch eingesetzte Propofolemulsion nicht nur unter physiologischen Bedingungen die Darmbarriere signifikant, sondern verstärkte die unter inflammatorischen Bedingungen eingetretene Schädigung der Darmbarriere weiter.

Die Induktion eines inflammatorischen Milieus in Zellkulturen zur Simulation einer inflammatorisch veränderten intestinalen Barriere kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. In dieser Arbeit wurden, um Barrierefunktionsstörungen am Darmepithel zu simulieren und reproduzierbare inflammatorische Verhältnisse zu induzieren, zwei proinflammatorische Zytokine, TNF- α und IFN- γ , eingesetzt. Beide spielen bei der Sepsis eine zentrale Rolle [52]. Dieses Entzündungsmodell wird häufig eingesetzt, um Apoptose-unabhängige Schäden an der Darmbarriere zu untersuchen, und bietet den Vorteil, dass es durch die Verwendung von TNF- α , dem primären Chemokin aktivierter Makrophagen, und IFN- γ , dem Haupteffektor-Chemokin aktivierter T-Zellen, sowohl die native als auch die adaptive Immunantwort anspricht [53, 54]. So kommt dieses Entzündungsmodell gegenüber Modellen mit nur einem Entzündungsstimulus der multidimensionalen Immunantwort von Sepsispatienten zumindest einen Schritt näher.

Studien haben gezeigt, dass TNF- α bei klinisch relevanten Konzentrationen (1-10 ng/ml) eine signifikante Erhöhung der intestinalen *tight junction*-Permeabilität verursacht [55]. In einem Caco-2 Modell wurden dafür TNF- α Konzentrationen zwischen 0 und 100 ng/ml eingesetzt und die maximale Abnahme der *tight junction* Permeabilität bei 10 ng/ml beobachtet [56]. Höhere Konzentrationen führten zu keiner weiteren Abnahme des TEER [56].

TNF- α und IFN- γ triggern die proinflammatorische Kaskade und steigern die Permeabilität der epithelialen Barriere, indem sie über eine Umverteilung der *tight junction* Proteine eine Störung der *tight junction* Ultrastruktur induzieren [24]. Li et al. zeigten, dass eine

Behandlung mit TNF- α und IFN- γ zu Veränderungen in der Lipidzusammensetzung und der Fettacylsubstitution in Phospholipiden in den Membranmikrodomänen der *tight junctions* in T84 Zellen führt [24]. Sie inkubierten Zellmonolayer über 72 h mit TNF- α (10 ng/ml) und IFN- γ (100 U/ml), wobei sich der TEER-Wert nach der Behandlung mit TNF- α auf 56.82% reduzierte und bei der Behandlung mit IFN- γ auf 59.31% [24]. Die Inkubation mit TNF- α und IFN- γ induzierte eine zeitabhängige TEER-Reduktion mit dem maximalen Effekt nach 72 h, dabei sanken die TEER-Werte auf 20.88% [24]. Diese Ergebnisse zeigen, dass TNF- α und IFN- γ den TEER und damit die intestinale epitheliale Barrierefunktion synergistisch reduzieren [24].

Die Barrierefunktion von Caco-2-Zellmonolayern wird durch die Zytokine TNF- α und IFN- γ vermindert, wenn sie über die basale Komponente der Inserts mit TNF- α 2,5 ng/ml und IFN- γ 10 ng/ml inkubiert wurden [26]. Dabei fiel der TEER kontinuierlich innerhalb von 48 h um ca. 70 % ab [26]. Caco-2 Monolayer wurden mit oder ohne IFN- γ 10 ng/ml für 24 h inkubiert [26]. Die anschließende Zugabe von TNF- α bewirkte nach 48 h nur in den IFN- γ -geprägten Monolayern eine dosisabhängige Abnahme des TEER [26]. Dabei verursachten TNF- α Konzentrationen von 2,5 ng/ml einen Abfall des TEER um ca. 20 %, während eine TNF- α Konzentration von 10 ng/ml einen Abfall von mehr als 80 % verursachte [26].

Auch andere Experimente bestätigten die Synergie zwischen TNF- α und IFN- γ und zeigten, dass die kombinierte Behandlung von Caco-2 Monolayern mit 100 ng/ml TNF- α und 100 U/ml IFN- γ über 72 h nur zu einem geringen Anstieg der Apoptose führte, aber eine 22 %ige Reduktion des TEER bewirkte [57]. Dieser synergistische Effekt beruht möglicherweise darauf, dass jedes einzelne Zytokin die Expression des Oberflächenrezeptors für das jeweils Andere hochreguliert [57]. Größere Permeabilitätsdefekte durch höhere TNF- α und IFN- γ Dosen, die mit einer 50%igen Abnahme der TEER-Werte einhergingen ließen sich auf eine verminderte Expression der *tight junction* Proteine ZO-1 und Occludin zurückführen [57].

Ein systematisches Review und Metaanalyse, die 3654 Datensätze und 104 Studien mit insgesamt 3250 Teilnehmern einbezog, untersuchte die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ bei Patienten mit Sepsis [58]. Dabei betrug die gepoolte geschätzte mittlere TNF- α -Konzentration bei Sepsispatienten 58,4 pg/ml und bei gesunden Personen 5,5 pg/ml. Der gepoolte Schätzwert für IFN- γ bei Sepsispatienten lag bei 63,3 pg/ml [58]. Demnach lag die für diese Arbeit gewählte Zytokinkonzentration weit über den klinisch relevanten Konzentrationen. Sie wurde in Vorversuchen ermittelt. Die hier genutzten Konzentrationen entsprachen der kleinsten, in der Literatur bereits mehrfach verwendeten, Kombination von TNF- α und IFN- γ , die über eine Inkubationszeit von 24 h einen signifikanten Abfall des TEER von durchschnittlich ca. 25 % induzierte, ohne dabei eine signifikante Veränderung der Zellviabilität zu verursachen [26].

Bei einem der Ansätze wurde die durch TNF- α und IFN- γ induzierte signifikante TEER-Reduktion knapp verfehlt (s. Abb. 9, $p = 0,0505$). Eine mögliche Erklärung ist die etwas höhere Standardabweichung und die höhere Anzahl der erforderlichen Vergleiche, da der Mittelwert der inflammatorischen Proben mit dem anderen Ansatz vergleichbar war (s. Abb. 11). Zudem zeigen auch die Ergebnisse der Immunhistochemie durch die charakteristische Internalisierung des *tight junction* Proteins ZO-1 deutliche Zeichen für inflammatorisch bedingte Veränderungen der epithelialen Barriere [59].

Vergleichbar mit in der Literatur vorhandenen Werten zeigt sich in den hier durchgeführten Ansätzen ebenfalls eine TEER-Reduktion. Unterschiedlich hohe TEER-Reduktionen in den unterschiedlichen zitierten Studien beruhen am ehesten auf Unterschieden in den Zelleigenschaften der eingesetzten Caco-2-Subpopulationen [17, 19, 60]. So wachsen z.B. Caco-2 Zellen späterer Passagen aufgrund einer erhöhten Proliferationsrate in *Multilayern* und weisen dadurch höhere TEER-Werte auf, was die TEER-Messung beeinträchtigen kann und den Vergleich mit Zellen früher Passagen erschwert [17]. Daher sind Ergebnisse, die unter gleichen experimentellen Konditionen in unterschiedlichen Laboren, unter unterschiedlichen Kulturbedingungen und mit unterschiedlichen Caco-2-Zelllinien erhoben wurden, in der Literatur nur eingeschränkt zu vergleichen [17].

Die humane Caco-2-Zelllinie stellt mit ihren Eigenschaften ein passendes *in vitro* Transportmodell für das Dünndarmepithel dar [18]. Obwohl das intestinale Epithel *in vivo* mehr Zelltypen als nur Enterozyten beinhaltet und deswegen potenziell durchlässiger ist, weisen polarisierte Caco-2 *Monolayer* ähnliche TEER-Werte wie *in vivo* auf [17, 18]. Auch wenn die Caco-2-Zellen die meisten Rezeptoren, Transporter und Enzyme vergleichbar dem normalen intestinalen Epithel exprimieren, braucht es noch weitere Untersuchungen, da die Unterschiede in den *tight junctions* und der Expression von Enzymen und Transportern eine Limitation für die direkte Übertragung der *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Situation darstellen können [18, 20]. Abgesehen von diesen Abweichungen, hat das Caco-2 Zellmodell als Modell für intestinale Epitheltransporte viele Vorteile wegen seiner Einfachheit und Reproduzierbarkeit, die auch einen Vergleich der Ergebnisse zwischen Laboren erlauben [17, 18].

Viele Studien haben den Caco-2 Permeabilitätskoeffizienten mit Daten über die Absorption im Menschen verglichen und eine hohe Korrelation, insbesondere im passiven parazellulären Stofftransport, nachweisen können [19, 20]. Entsprechend eingesetzt kann das Caco-2 Zellmodell wertvolle Information über biologische und biochemische Barriereigenschaften des intestinalen Epithels, sowie die Absorption von Medikamenten und anderen Stoffen liefern [17]. Dafür müssen einige kritische Parameter kontrolliert werden: zum einen muss mithilfe der TEER-Messung die Qualität und Integrität der polarisierten Zellmonolayer

validiert werden [17]. Außerdem ist es wichtig zu wissen, dass die Proteinexpression durch eine Vielzahl von Parametern wie die Zellkulturbedingungen, die Passagenummer und dem Alter der Zellen in Kultur beeinflusst werden kann [17]. Die Standardprozedur und zuverlässigste Methode, um polarisierte Caco-2 *Monolayer* zu erhalten, die *tight junctions* und andere interzelluläre Kontakte exprimieren, erfordert die Kultur der Zellen über 21 Tage [17].

Für die Narkoseeinleitung werden 1,5 bis 2,5 mg/kg Körpergewicht (KG) Propofol, die einem Propofolmolekulargewicht von 178,27 g/mol entsprechen, eingesetzt [45]. Bei einem 70 kg schweren Menschen mit 5 l Blutvolumen entspricht dies 118 bis 196 µM [45].

In dieser Studie wurde die Wirkung von Propofol in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Darmbarriere untersucht. Während die Konzentration von 10 µM mit der klinisch eingesetzten Erhaltungsdosis (Plasmakonzentrationen von 2-3 µg/ml) vergleichbar ist, wurden die höheren Konzentrationen von 50, 100 und 500 µM auf Grundlage bereits durchgeführter Studien mit Propofol ausgewählt [61-63]. Dabei konnten die Propofol-Konzentrationen von 50-100 µM während der Einleitung und Aufrechterhaltung der Anästhesie klinisch im Plasma nachgewiesen werden [61].

4.2 Effekte von Propofol

Die vorab durchgeführte Messung der Zellviabilität dient dem Nachweis, dass eine effektive inflammatorische Schädigung der Barrierefunktion der Caco-2 Zellen auf einem Verlust der epithelialen Barrierefunktion beruht und nicht durch die Abnahme der Zellviabilität vermittelt ist. Dabei zeigte die inflammatorische Schädigung der Caco-2 Zellen mit den Zytokinen TNF-α und IFN-γ keine signifikante Abnahme der Zellviabilität. Durch die Messung des TEER, kann die Barrierefunktion der Caco-2 Zellen quantifiziert werden. So kann einerseits die Effektivität der inflammatorischen Schädigung der Barrierefunktion, sowie auch der Einfluss von Propofol auf die Barrierefunktion über den TEER messbar gemacht werden.

Die beobachteten Effekte von Propofol auf die Darmbarriere hingen interessanterweise von der Trägerlösung des Propofols ab. Der in DMSO gelöste Wirkstoff Propofol hatte in keiner der untersuchten Konzentrationen, weder unter physiologischen noch unter inflammatorischen Konditionen einen signifikanten Einfluss auf den TEER. Die klinisch eingesetzte Propofolemulsion dagegen führte nicht nur unter physiologischen Bedingungen zu einer Beeinträchtigung der Barriereintegrität, sondern verschlimmerte unter inflammatorischen Bedingungen die Barriestörung weiter, was sich sowohl im reduzierten TEER als auch einem veränderten ZO-1 Expressionsmuster widerspiegelte.

Bei Propofol wurde bereits bei durch Ischämie/Reperfusionsschäden vermittelten intestinalen Barriestörungen eine schützende Wirkung auf die Darmbarriere festgestellt, die in dieser Arbeit jedoch nicht für inflammatorisch induzierte Schäden der intestinalen epithelialen Barriere nachgewiesen werden konnte [45, 64-66]. Peters zeigte, dass die in einem Caco-2 Zellmodell *in vitro* induzierte Hypoxie zu erhöhten Sauerstoffradikal (ROS)-Konzentrationen und nach 48 h auch zu einer signifikanten Zunahme der Wasserstoffperoxidkonzentration führte [45]. Nach 48 h bewirkte die Behandlung mit 100 µM in DMSO gelöstem Propofol eine signifikante Reduktion der hypoxieinduzierten ROS-Konzentration, auch die Wasserstoffperoxidkonzentration konnte durch die Behandlung mit Propofol reduziert werden [45]. Propofol wirkt durch die Hydroxygruppe seines Phenolrings ähnlich antioxidativ wie α-Tocopherol, da diese durch die Abgabe eines Wasserstoffatoms an Radikale die Reaktivität von ROS abmildern kann [44]. Jedoch deutet die verspätete Reduktion der ROS-Konzentration daraufhin, dass Propofol, abgesehen von den in der Literatur ausführlich beschriebenen sofort eintretenden antioxidativen Effekten, auch indirekte Wirkungsmechanismen besitzt [45].

Im Hinblick auf die antiinflammatorischen Eigenschaften von Propofol geben bisherige Ergebnisse Hinweise darauf, dass Propofol inflammatorische endotheliale Barrierefunktionsstörungen positiv beeinflusst [46]. Dieser positive Effekt scheint sich jedoch nicht auf die in dieser Arbeit untersuchte inflammatorisch geschädigte epitheliale Barriere übertragen zu lassen. In der *in vitro* Studie von Gao et al. konnte Propofol signifikant die LPS-induzierte Barrieredysfunktion und Peroxynitritbildung in Endothelzellen abschwächen [46]. Jedoch erfolgte die Evaluation der endothelialen Barrierefunktion nicht mittels TEER-Messung sondern als transendothelialer Albuminpermeabilitätsassay [46]. Die antiinflammatorischen Effekte von Propofol ließen sich sowohl in der therapeutischen Konzentration, als auch in der fünffach erhöhten Konzentration (4 und 20 µg/ml) über die Inhibition und Suppression der LPS-induzierten NF-κB-Aktivierung und der iNOS *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression nachweisen und schützten die Endothelzellen vor Barrierefunktionsstörungen [46]. Der nukleare Transkriptionsfaktor-κB ist ein zentraler Regulator der Immunantwort und kontrolliert die Transkription von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-6, IL-8, und TNF-α und der iNOS während der Inflammation [46]. LPS bindet an membrangebundene *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) und stört die endotheliale Barriere durch Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die eine Beeinträchtigung der endothelialen Zytoskelettstruktur bewirken [46]. Gao et al. vermuten, dass die Bindungsaffinität von LPS an den TLR eine kritische Rolle in der Aktivierungsstärke von NF-κB spielen könnte [46]. Da Propofol so lipophil ist, dass es in der Zellmembran akkumulieren kann, könnte dies möglicherweise die Konformation der TLR

beeinflussen und die Bindungsaffinität von LPS an die Membran senken und somit die NF- κ B Aktivierung inhibieren [46]. Die Behandlung der Zellen mit Intralipid, dem Trägerstoff von Propofol, hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf den LPS-induzierten Anstieg der Permeabilität und dem Peroxynitrit, sodass die protektive Wirkung dem Wirkstoff Propofol zugeschrieben wurde [46]. Es könnte jedoch in Betracht gezogen werden, dass der beschriebene Akkumulationseffekt der Propofolemulsion in der epithelialen Zellmembran über eine gesteigerte Permeabilität zu einer Störung der Darmbarriere führt.

Es gibt allerdings kaum klinischen Studien, die belegen, dass Propofol die Darmbarriere beeinträchtigt. Auch über die Auswirkungen von Propofol auf die inflammatorisch geschädigte Darmbarriere ist wenig bekannt, da in den letzten Jahren vor allem die Wirkung von Propofol auf intestinale Ischämie/Reperfusionsmodelle von Interesse war. Die Daten von Zitta et al. zeigen jedoch, dass hohe Propofolkonzentrationen (100 μ M) zu einer signifikanten Steigerung der Permeabilität und damit verbunden zu einer Reduktion der Barrierefunktion intakter endotheliale Zellmonolayer führen, jedoch keinen negativen Einfluss auf die Morphologie der Zellen, die metabolische Aktivität oder Zellschaden haben [67]. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Propofolemulsion die Barrierefunktion signifikant reduziert, ohne dabei jedoch die Zellviabilität zu beeinträchtigen.

In jüngster Zeit wurden in einigen wenigen Studien die Effekte von Propofol auf die Darmbarriere beschrieben. Zhang et al. konnten z.B. zeigen, dass die Behandlung mit Propofol zu keiner verminderten Pyroptose von Enterozyten *in vivo* und *in vitro* führte [68].

Li et al. verwendeten ein ähnliches Enterozytenmodell wie das in dieser Arbeit verwendete, in welchem sie Caco-2 Zellen 48 h lang mit 10 nM TNF- α und 10 μ M Propofol behandelten [47]. Propofol zeigte hierbei antiinflammatorische Effekte über eine signifikante hemmende Wirkung auf die NF- κ B-Expression und den NF- κ B nachgeschalteten proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und IL-18 [47]. Der NF- κ B-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der Regulation inflammatorischer Aktivität im Körper und aktiviert eine Reihe nachgeschalteter Zytokinen wie IL-1 β und IL-18, was zu einer Inflammation führt [47]. Um weitere Effekte von Propofol auf die Inflammation zu untersuchen, wurden die Caco-2 Zellen mit TNF- α (100 nm) und Propofol (10 μ M) behandelt [47]. TNF- α steigerte die mRNA-Expressionslevel von NF- κ B in Caco-2 Zellen und Propofol reduzierte über eine signifikante Inhibition der TNF- α -vermittelten Aktivierung des NF- κ B-Signalweges die proinflammatorische Wirkung des Zytokins [47]. Desweiteren zeigten Propofolkonzentrationen über 10 μ M zytotoxische Effekte auf die Viabilität der Caco-2 Zellen, niedrigere Konzentrationen hatten weniger zytotoxische Effekte [47].

Auch in dieser Arbeit zeigte der in DMSO gelöste Wirkstoff Propofol in den eingesetzten Konzentrationen mit mehr als 10 μ M eine signifikante Abnahme der Viabilität der Caco-2 Zellen. Im Gegensatz dazu zeigte die klinisch eingesetzte Propofolemulsion in keiner der eingesetzten Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität, weder unter physiologischen noch unter inflammatorischen Bedingungen. Die in der Arbeit von Li et al. gezeigten protektiven Effekte von Propofol auf die inflammatorisch veränderte epitheliale Barriere konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit zeigte der Wirkstoff Propofol zwar keinen schädigenden Einfluss unter physiologischen, aber auch keinen protektiven Einfluss auf die Darmbarriere *in vitro*. Im Gegensatz dazu zeigte das mittels Lipidemulsion gelöste Propofol Fresenius in allen eingesetzten Konzentrationen signifikante TEER-reduzierende Effekte. Während unter inflammatorischen Bedingungen die Behandlung mit Propofol 10 μ M keine weitere Beeinträchtigung des TEER bewirkte, verursachten höhere Propofol Fresenius Konzentrationen eine signifikante Reduktion des TEER gegenüber der inflammatorischen Kontrolle. Auch Lipofundin bewirkte unter inflammatorischer Schädigung eine signifikante Abnahme des TEER im Vergleich zum inflammatorischen Stimulus allein. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Propofolemulsion schädigend auf die inflammatorisch veränderte intestinale Barriere wirkt und dass das Lipofundin dabei eine erhebliche Rolle bei der Schädigung der epithelialen Barrierefunktion spielt. Insgesamt sind die Beobachtungen von Li et al. jedoch nur schwer mit unseren Ergebnissen zu vergleichen, da sie nicht-konfluente Caco-2-Zellen, eine doppelt so lange und 10-mal höhere TNF- α Behandlung, keine Lipofundinkontrolle und keine Untersuchung der Barrierefunktion und *tight junction* Proteinkonzentration verwendeten [47].

In weiteren inflammatorisch beeinträchtigten Zellmodellen konnten antiinflammatorische Effekte von Propofol beobachtet werden. In einer Studie, in der LPS-stimulierte Maus-Monozyten/Makrophagen Zellen benutzt wurden, konnte gezeigt werden, dass Propofol die inflammatorische Antwort über eine signifikante Reduktion der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen wie IL-6, IL-8 und TNF- α inhibierte [69]. Propofol blockierte in beiden eingesetzten Konzentrationen (25 μ mol/l und 50 μ mol/l) die Aktivierung von NF- κ B und inhibierte zusätzlich die Expression von TLR-4 und NF- κ B [69]. Zusätzlich zu seinen anästhetischen Eigenschaften scheint Propofol die Produktion und Freisetzung von TNF- α zu reduzieren [69]. Song et al. untersuchten die Effekte von Propofol auf die Plasmakonzentrationen von TNF- α und IL-6 und die Aktivierung von NF- κ B in endoxämischen Ratten und fand heraus, dass Propofol die Aktivierung von NF- κ B und die damit verbundene proinflammatorische Zytokinantwort inhibierte und somit positive Effekte auf die Inhibierung von LPS-induzierter TNF- α Produktion hat [70]. Auch andere

Studien konnten zeigen, dass der in DMSO gelöste Wirkstoff Propofol (in einer Konzentration von 50 mg/ml) signifikant die durch LPS verursachte erhöhte Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α über die Hemmung von TLR-4 und NF- κ B reduzieren konnte [71]. Außerdem konnte Propofol (25 mmol/l) die TNF- α Konzentration und die dadurch induzierte Überexpression von iNOS und die Freisetzung von Stickstoffmonoxid senken und die damit verbundene Apoptose abschwächen [72]. Die klinische Relevanz der proinflammatorischen Zytokine ist nur schwierig zu vergleichen. Die Ergebnisse einer Metaanalyse deuten darauf hin, dass die Wahl des Anästhetikums nur wenig Einfluss auf die perioperative inflammatorische Reaktion, gemessen an den IL-6, IL-10, TNF- α , und CRP-Konzentrationen hat. Der fehlende Effekt legt nahe, dass Patienten- und Operationsvariablen einen signifikanteren Einfluss auf die Biomarkerreaktion und die postoperative inflammatorische Reaktion haben, der den Einfluss der Anästhetika bei weitem zu überwiegen scheint [73]. Obwohl es Langzeit-Sedierungsstudien gibt, werden inflammatorischen Biomarker nicht systematisch als primäre oder sekundäre Endpunkte erfasst, sodass ein Bedarf an biomarker-orientierten klinischen Studien zur inflammatorischen Reaktion bei Langzeitsedierung besteht.

Neben anderen, zeigte Desmet et al. jedoch, dass Propofol perioperativ anderen intravenösen oder volatilen Anästhetika in Bezug auf intestinale Einflüsse wie z.B. Störungen der Darmmotilität überlegen war [74, 75]. Dabei verzögerte eine Sedierung von endotoxämischen Mäusen mit Propofol im Gegensatz zu Dexmedetomidine kaum die gastrointestinale Peristaltik [74]. Untersucht wurden die Magenentleerung, Passage durch den Dünndarm und das Kolon, Fäzesanzahl und Kotgewicht sowie die Gesamtdarmtransitzeit [74]. In einer randomisierten kontrollierten Studie an Patientin die sich einer laparoskopischen Magenbypass-Operation unterzogen wurden peristaltische Wellen im Jejunum visuell ausgezählt [75]. Während unter Propofol-Narkose sechs Wellen pro Minute beobachtet werden konnten, ließen sich in der Vergleichsgruppe mit Sevofluran keine Wellen verzeichnen, was für eine erhöhte Darmmotilität unter Propofolnarkose spricht [75].

Unsere Ergebnisse stabiler TEER-Messungen nach der Applikation von in DMSO gelöstem Propofol und die Beobachtung, dass Lipofundin, welches als Kontrolle für die Propofolemulsionsgruppe eingesetzt wurde, unter physiologischen Bedingungen keine signifikante TEER-Reduktion, unter inflammatorischen Bedingungen jedoch eine signifikante Verstärkung der Schädigung verursachte, legt nahe, dass die Lipidfraktion der Propofolemulsion einen Teil der Barrierestörung vermittelt.

Gueguen et al. beobachteten kürzlich an einem immortalisierten humanen Endothelzelllinien-Modell, dass Lipidemulsionen eine Schädigung der Endothelbarriere vermitteln können, wobei Lipidemulsionen mit einem hohen Anteil an ω -6-Fettsäuren

(Intralipid®) weniger störend wirkten als solche mit einem hohen Anteil an ω -3-Fettsäuren [76]. Die Behandlung mit unterschiedlichen Lipiden führte zu einer Zellablösung, die wahrscheinlich durch stressinduzierte Veränderungen des Aktinzytoskeletts und die Sekretion von IL-6 und IL-8 ausgelöst wurde [76]. Intralipid®, welches mit dem hier verwendeten Lipofundin vergleichbar ist, erhöhte zwar die Zytokinsekretion für IL-6 und IL-8, führte jedoch zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der Endothelzellfunktion [76]. Die Ergebnisse von Gueguen et al. stimmen zumindest teilweise mit unseren Beobachtungen überein, dass Lipofundin allein zwar keine signifikante TEER-Reduktion bewirkt, jedoch die Epithelzellen scheinbar vulnerabler für Propofol- und inflammationsbedingte Schäden macht, was auf ein verändertes Zytokin-Milieu zurückgeführt werden könnte.

Die Ergebnisse von Gueguen et al. stehen jedoch nicht im Einklang mit den umfangreichen experimentellen und klinischen Daten, in denen langkettigen ω -3-Fettsäuren eine entzündungshemmende Wirkung und die Reduktion von Zytokinantworten und den langkettigen ω -6-Fettsäuren eher proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden [27, 40]. Da ungesättigte ω -6-Fettsäuren entzündliche und immunologische Reaktionen bei kritisch kranken Patienten beeinträchtigen können, postulieren sogar Marik et al., dass eine Propofolrezeptur, die hauptsächlich ω -3-Fettsäuren enthält, möglicherweise zusätzliche therapeutische Vorteile bei Patienten mit Sepsis hätte [27, 39].

Wir beobachteten eine ausgeprägtere Barrierschädigung, wenn zwei schädigende Substanzen wie Lipofundin und Inflammation, oder auch Lipofundin und Propofol, kombiniert angewendet wurden, was die Hypothese eines notwendigen Doppeltreffers zur zusätzlichen Beeinträchtigung der Barrierefunktion nahelegt. Auch die immunhistochemischen Ergebnisse, bei denen das Expressionsmuster des *tight junction* Proteins ZO-1 in den mit der Propofolemulsion behandelten Proben im Vergleich zu den nur mit Lipofundin behandelten Proben ebenfalls inhomogener erscheint, unterstützen diese Hypothese. Auch Hughes et al. zeigten, dass die Lipidkomponente von dem klinisch eingesetzten Propofol allein keine signifikante Barriestörung verursacht [62]. Die von dieser Arbeitsgruppe beschriebenen Propofol-induzierte Barrierschäden an der Blut-Hirn-Schranke spiegelten sich in einer signifikanten Herunterregulierung der Expression des *tight junction* Proteins Occludin wieder [62].

4.3 Einfluss von Inflammation und Propofol auf die Expression der *tight junction* Proteine

ZO-1 repräsentiert als wichtiger Bestandteil der *tight junctions* die Integrität der Zell-Zellverbindungen. Die regelmäßige, netzartige Verteilung von ZO-1 in Kontrollproben weist

auf eine intakte Barrierefunktion hin. Die Behandlung der Caco-2 Zellen mit dem in DMSO gelösten Wirkstoff Propofol zeigte in der immunhistochemischen Färbung keine sichtbaren Veränderungen der ZO-1 Expression. Unter inflammatorischer Schädigung kam es zur Bildung zahlreicher intrazellulärer Vakuolen, die mit ZO-1 angefärbt wurden. Diese deuten auf eine Störung der *tight junctions* und eine Umverteilung von ZO-1 hin, was wiederum mit der mittels TEER evaluierten gestörten Barrierefunktion assoziiert werden kann. Zusätzlich zu den intrazellulären Vakuolen, die auch unter inflammatorischer Schädigung mit Propofolbehandlung auftraten, zeigte sich auch eine unregelmäßige ZO-1 Färbung an der Zellmembran.

Unter inflammatorischer Schädigung in Kombination mit Lipofundin kam es ebenfalls zu einer schwächeren Färbung und einer inhomogeneren Verteilung von ZO-1 an der Zellmembran sowie zahlreichen intrazellulären Vakuolen. Die schwache Färbung der Zellmembran und die inhomogene Verteilung deuten darauf hin, dass Lipofundin die ZO-1 Verteilung in den inflammatorisch geschädigten Zellen weiter zu destabilisieren scheint und die Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kontakte verstärkt.

Unter inflammatorischer Schädigung in Kombination mit Propofol Fresenius (10µM) verstärkten sich die Effekte von Lipofundin. Die ZO-1 Färbung an der Zellmembran zeigte sich nur noch unregelmäßig und gestrichelt. Intrazellulär waren die deutlich sichtbaren ZO-1 Vakuolen kleiner und es zeigte sich eine intrazelluläre Sprenkelung von ZO-1. Die unregelmäßige, gestrichelte Färbung von ZO-1 an der Zellmembran sowie die intrazelluläre Sprenkelung von ZO-1 deuten auf eine starke Destabilisierung der *tight junctions* und eine gestörte Barrierefunktion hin, was relevante Konsequenzen für die Permeabilität und Funktion des Darmepithels hätte. Die tendenziell kleineren ZO-1 Vakuolen könnten darauf hindeuten, dass Propofol Fresenius die Dynamik der ZO-1 Umverteilung verändert. Propofol Fresenius scheint im Vergleich zum Lipofundin stärkere und spezifischere Effekte auf die *tight junctions* zu haben, was auf zusätzliche Wirkungen von Propofol hinweisen könnte, die über die lipiden Eigenschaften des Lipofundins hinausgehen. Diese zusätzlichen Eigenschaften könnten direkt durch Interaktion mit den *tight junction* Proteinen oder indirekt durch Modulation von Signalwegen vermittelt werden.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht nur die inflammatorische Schädigung sondern auch die Behandlung mit Lipofundin oder Propofol die Struktur und Funktion der *tight junctions* stören könnte.

Li et al. untersuchten den Effekt von TNF- α und IFN- γ auf die intestinale epitheliale Barrierefunktion in einem T48 Zellmodell und fanden heraus, dass die inflammatorischen Zytokine über morphologische Störungen und eine biochemische Umverteilung die

Ultrastruktur der *tight junction* Proteine beeinträchtigten und so eine Erhöhung der epithelialen Permeabilität verursachten, die eine Barrieredysfunktion zur Folge hatte [24]. Während in der Kontrolle ZO-1 und Occludin an der apikalen zellulären *junction* lokalisiert waren und sich immunhistochemisch im charakteristischen ‘*chicken-wire*’ Muster färben ließen, führte die Behandlung der T84- Zellen mit TNF- α (10 ng/ml) und IFN- γ (100 U/ml) über Veränderungen der Lipidzusammensetzung und der Fettacylsubstitution von Phospholipiden in den Membranmikrodomänen der *tight junctions* zu offensichtlichen Störungen der Verteilung von ZO-1 und Occludin [24]. Diese Veränderungen manifestierten sich durch Unterbrechungen in der Membranfärbung der *tight junction* Proteine, wobei die zytokininduzierte Steigerung der *tight junction* Permeabilität mit der Veränderung der Lokalisation von ZO-1 und Occludin korrelierte [24].

Die Internalisierung von *tight junction* Proteinen aus der Plasmamembran spielt eine zentrale Rolle in der Regulierung der *tight junction* Plastizität und der Funktion von epithelialen Barrieren [77]. Eine Bandbreite an pathologischen Stimuli wie Zytokine, Bakterien, Toxine und oxidativer Stress konnten als starke Induktoren für die Endozytose von *tight junctions* und *adherens junctions* in intestinalen epithelialen Zellen identifiziert werden [78, 79]. Der Prozess der Endozytose kommt aber auch unter stabilen Bedingungen als ein Erneuerungsprozess der *tight junction* Proteine vor [77]. Nach der Internalisierung werden die *tight junction* Proteine in Endosomen gesammelt, sortiert und weitergeleitet, es erfolgt die Degradierung oder das Recycling der Proteine, [77, 79] wobei die gesammelten *tight junction* Proteine nach dem Entzug von z.B. proinflammatorischen Stoffen wieder in die *tight junctions* integriert werden und so die Barrierefunktion regeneriert wird, ohne dass eine de novo Synthese der Proteine notwendig ist [78, 80]. In intestinalen Epithelzellen induzierte TNF- α die Internalisierung von Occludin und Claudin und IFN- γ induzierte über Makropinozytose die Internalisierung von Occludin Claudin, und JAM-A [77, 79] ohne ZO-1 oder *adherens junction* Proteine zu beeinflussen, was zu einer gesteigerten parazellulären Permeabilität führt ohne Unterbrechung der Zellkontakte [78]. Die Akkumulation von Claudin-1, Claudin-5, Claudin-16, Occludin, JAM-A, und ZO-1 in Endosomen von Epithelzellen ist eng mit einer verminderten Barrierefunktion im Sinne einer Hyperpermeabilität assoziiert [77]. Unter den anderen Prozessen, die potenziell an der Internalisierung der *tight junction* Proteine beteiligt sind, hat die Flotillin-abhängige Internalisierung eine enge Assoziation mit dem Uptake von Occludin und ZO-1 in Caco-2- Zellen, die mit IFN- γ behandelt wurden [77]. Zusätzlich lassen *in vitro* Studien annehmen, dass TNF- α Signaling das *tight junction* Protein ZO-1 beeinflusst [79].

Es gibt noch weitere Studien, die den Einfluss von inflammatorischen Mediatoren auf die Regulation und Expression von *tight junctions* untersucht und gezeigt haben, dass eine

Inflammation die *tight junctions* bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen nachweislich schwächt [81]. So führt z.B. eine Behandlung mit Methotrexat (MTX) häufig zu einer Darmschleimhautentzündung, die teilweise mit einer Steigerung der intestinalen Permeabilität verbunden ist [82]. Beutheu Youmba et al. zeigten, dass die MTX-Behandlung von Caco-2 Zellen zu einem Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-8 führte, ohne dabei Einfluss auf Apoptose und Nekrose der Caco-2-Zellen zu nehmen [82]. Die beobachtete Zunahme der parazellulären Permeabilität war mit einer reduzierten *tight junction* Proteinexpression von Occludin- und ZO-1 und einer veränderten zellulären Verteilung verbunden, was durch MAPK- und NF- κ B-Signalwege vermittelt wurde [82]. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit früheren Studien, die berichten, dass MEK1 und 2, JNK und NF- κ B-Signalwege an der Regulation von *tight junctions* in extraintestinalen oder intestinalen Geweben als Reaktion auf entzündliche Stimuli beteiligt sind [82]. Neyrinck-Leglantier et al. zeigten weiterhin, dass hohe Konzentrationen von zytonukleärem ZO-1 die Sekretion von proinflammatorischen Moleküle erhöhen und die Immunzellinfiltration stimulieren [81]. In einem Ohr-Schwamm-Mausmodell induzierte ZO-1 eine verstärkte Immunrekrutierung [81]. Bei menschlichem Lungenkrebs war eine erhöhtes Immuninfiltrat in der Mikroumgebung von Tumoren mit hohem zytonukleärem ZO-1 Gehalt vorhanden [81]. Die Überexpression von ZO-1 in Bronchialzellen induzierte die Sekretion von mehreren proinflammatorischen Zytokinen [81]. Die Mechanismen, die zur Relokalisierung von ZO-1 in die zytoplasmatischen Kompartimente führen, sind noch weitgehend unklar [81].

Schlussfolgerungen

Das Anästhetikum Propofol wird klinisch häufig bei Patienten mit unter Sepsis eingetretener Barrierefunktionsstörung eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Propofol auf die inflammatorisch veränderte intestinale Barriere untersucht. Es konnte kein protektiver Effekt von Propofol auf die inflammatorisch gestörte Darmbarriere festgestellt werden, stattdessen beeinträchtigte die klinisch eingesetzte Propofolemulsion die von den Enterozyten gebildete Barriere unter physiologischen Bedingungen erheblich. Unter inflammatorischen Bedingungen verstärkte Propofol die bereits bestehenden Defekte. Dieser schädigende Effekt lässt sich zumindest teilweise auf die Lipidkomponente zurückführen, da der in DMSO gelöste Wirkstoff Propofol keinen Effekt auf die intestinale Barriere zeigte. Um zu eruieren, ob Patienten mit gestörter Barriere durch die Lipidinfusion tatsächlich einen weiteren Schaden nehmen und um klinisch relevante Schlussfolgerungen ziehen zu können, sollte die Behandlung mit Propofol und Lipofundin in einem nächsten Schritt auf ein intestinales *Organ-on-a-chip*-Modell übertragen werden, welches durch die Kombination von Epithel- und Endothelbarriere ein der menschlichen Darmbarriere ähnlicheres Modell repräsentiert.

5 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

1. Rudd KE, J.S., Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R, Lopez AD, Angus DC, Murray CJL, Naghavi M., *Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study*. Lancet, 2020.
2. Fleischmann C, T.R.D., Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K, *Hospital incidence and mortality rates of sepsis—an analysis of hospital episode (DRG) statistics in Germany from 2007 to 2013*. Deutsches Ärzteblatt International, 2016.
3. Singer M, D.C., Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC, *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016.
4. Levy MM, R.A., Phillips GS, Townsend SR, Schorr CA, Beale R, Osborn T, Lemeshow S, Chiche JD, Artigas A, Dellinger RP, *Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study*. Critical Care Medicine, 2015.
5. Hotchkiss, R.S., Moldawer, L. L., Opal, S. M., Reinhart, K., Turnbull, I. R., & Vincent, J. L. , *Sepsis and septic shock*. Nature reviews. Disease primers, 2016.
6. Uhle F, L.C., Brenner T, Weigand MA, *Sepsis und Multiorganversagen - Pathophysiologie der Sepsis*. Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie, 2015.
7. Reinhart K, B.M., Riedemann NC, Hartog CS, *New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers*. Clinical Microbiology Reviews, 2012.
8. Yoseph BP, K.N., Liang Z, Breed ER, Burd EM, Mittal R, Dominguez JA, Petrie B, Ford ML, Coopersmith CM, *Mechanisms of Intestinal Barrier Dysfunction in Sepsis*. Shock, 2016.
9. Welsch, U., *Sobotta Lehrbuch Histologie*
Zytologie Histologie Mikroskopische Anatomie. 2006: München: Urban & Fischer in Elsevier.
10. Klinker, R., Pape, H., Kurtz, A., Silbernagl, S., *Physiologie*. Vol. 6., vollständig überarbeitete Auflage. 2009, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
11. Kuo WT, O.M., Turner JR, Zuo L, *Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2022.
12. Otani S, C.C., *Gut integrity in critical illness*. Journal of intensive Care, 2019.
13. Vaishnavi, C., *Translocation of gut flora and its role in sepsis*. Indian Journal of Medical Microbiology, 2013.
14. Swank GM, D.E., *Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes*. World Journal of Surgery, 1996.

15. Assimakopoulos SF, T.C., Thomopoulos K, Fligou F, Maroulis I, Marangos M, Gogos CA, *Gut-origin sepsis in the critically ill patient: pathophysiology and treatment*. Infection, 2018.
16. Haussner F, C.S., Halbgebauer R, Huber-Lang M., *Challenge to the Intestinal Mucosa During Sepsis*. Frontiers in Immunology, 2019.
17. Lea T, *The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health In Vitro and Ex Vivo Models* P.C. Kitty Verhoeckx, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, and Harry Wichers, Editor. 2015, Springer.
18. Hidalgo IJ, R.T., Borchardt RT, *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. Gastroenterology, 1989.
19. Artursson P, K.J., *Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991.
20. Sun H, C.E., Liu S, Du Y, Pang KS, *The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2008.
21. Groschwitz KR, H.S., *Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2009.
22. MacDonald TT, H.P., Choy MY, Murch S, Cooke A, *Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine*. Clinical and Experimental Immunology, 1990.
23. Ma TY, B.M., Ye D, Pedram A, Said HM, *Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression*. American Journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2005.
24. Li Q, Z.Q., Wang M, Zhao S, Ma J, Luo N, Li N, Li Y, Xu G, Li J, *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction* Clinical Immunology, 2008.
25. Mankertz J, T.S., Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD, *Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor α and interferon γ* . Journal of Cell Science, 2000.
26. Wang F, G.W., Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR, *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression* American Journal of Pathology, 2005.
27. Marik PE, *Propofol: Therapeutic Indications and Side-Effects*. Current Pharmaceutical Design, 2004.
28. Vasileiou I, X.T., Koudouna E, Perrea D, Klonaris C, Katsargyris A, Papadimitriou L, *Propofol: a review of its non-anaesthetic effects* European Journal of Pharmacology, 2009.
29. Glen JB, *Animal studies of the anaesthetic activity of ICI 35 868*. British Journal of Anaesthesia, 1980.
30. Rudolph U, A.B., *Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics*. Nature Reviews: Neuroscience, 2004.

31. Hara M, K.Y., Ikemoto Y, *Propofol activates GABAA receptor-chloride ionophore complex in dissociated hippocampal pyramidal neurons of the rat* Anesthesiology, 1993.
32. Smith I, M.T., White PF, Ding Y, *Propofol infusion during regional anesthesia: sedative, amnestic, and anxiolytic properties.* anesthesia and Analgesia, 1994.
33. Borgeat A, W.-S.O., Saiah M, Rifat K, *Subhypnotic doses of propofol possess direct antiemetic properties* Anesthesia and Analgesia, 1992.
34. Zacny JP, C.D., Young CJ, Klapf JM, Lichtor JL, Rupani G, Thapar P, Apfelbaum JL, *Propofol at conscious sedation doses produces mild analgesia to cold pressor-induced pain in healthy volunteers* Journal of Clinical Anesthesia, 1996.
35. Borgeat A, W.-S.O., Suter PM, *The nonhypnotic therapeutic applications of propofol.* Anesthesiology, 1994.
36. Sahinovic MM, S.M., Absalom AR, *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Propofol.* Clinical Pharmacokinetics, 2018.
37. Marik PE, *Propofol: An Immunomodulating Agent.* Pharmacotherapy, 2005.
38. Fresenius Kabi *FACHINFORMATION/ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS.* 2015.
39. Furukawa K, T.T., Yamamori H, Takagi K, Morishima Y, Sugiura T, Otsubo Y, Hayashi N, Itabashi T, Sano W, Toyoda Y, Nitta H, Nakajima N, *Effects of Soybean Oil Emulsion and Eicosapentaenoic Acid on Stress Response and Immune Function After a Severely Stressful Operation.* Annals of Surgery, 1999.
40. Hayashi N, T.T., Yamamori H, Takagi K, Morishima Y, Otsubo Y, Sugiura T, Furukawa K, Nitta H, Nakajima N, Suzuki N, Ito I, *Effects of intravenous omega-3 and omega-6 fat emulsion on cytokine production and delayed type hypersensitivity in burned rats receiving total parenteral nutrition.* JPEN: Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 1998.
41. Taniguchi T, Y.K., Ohmoto N, Ohta K, Kobayashi T, *Effects of propofol on hemodynamic and inflammatory responses to endotoxemia in rats.* Critical Care Medicine, 2000.
42. Taniguchi T, K.H., Yamamoto K, *Effects of posttreatment with propofol on mortality and cytokine responses to endotoxin-induced shock in rats.* Critical Care Medicine, 2002.
43. Mikawa K, N.K., Kodama S, Obara H, *Propofol Attenuates Diaphragmatic Dysfunction Induced by Septic Peritonitis in Hamsters.* Anesthesiology, 2001.
44. Murphy PG, M.D., Davies MJ, Webster NR, Jones JG, *THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF PROPOFOL (2,6-DIISOPROPYLPHENOL).* British Journal of Anaesthesia, 1992.
45. Peters S, *Untersuchungen zum Einfluss des intravenösen Anästhetikums Propofol auf Hypoxie induzierte Mechanismen in-vitro.* 2013.
46. Gao J, Z.W., Zhou LJ, Zeng BX, Yao SL, Liu D, Chen ZQ, *Protective effects of propofol on lipopolysaccharide-activated endothelial cell barrier dysfunction* Inflammation Research, 2006.
47. Li W, H.X., Liu Y, Tong T, Xu H, Jia L, *Effects of anesthetic agents on inflammation in Caco-2, HK-2 and HepG2 cells.* Experimental and Therapeutic Medicine, 2021.
48. Roehm NW, R.G., Hatfield SM, Glasebrook AL, *An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT.* Journal of Immunological Methods, 1991.

49. Srinivasan B, K.A., Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ., *TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems*. Journal of Laboratory Automation, 2015.
50. WPI, W.P.I., *INSTRUCTION MANUAL: EndOhm Tissue resistance measurement chambers for tissue culture cups*. 2019.
51. Luttmann W, B.K., Küpper M, Myrtek Daniel, *Der Experimentator Immunologie*. 2014, Springer Spektrum.
52. Tisoncik JR, K.M., Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG, *Into the Eye of the Cytokine Storm*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2012.
53. Bruewer M, L.A., Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A., *Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms*. Journal of immunology, 2003.
54. Wu Y, C.C., Chen Y, Monaghan SF, Patel S, Huang X, Heffernan DS, Ayala A, *A Novel Role for Programmed Cell Death Receptor Ligand-1 (PD-L1) in Sepsis-Induced Intestinal Dysfunction*. Molecular Medicine, 2017.
55. Ye D, M.I., Ma TY, *Molecular mechanism of tumor necrosis factor- modulation of intestinal epithelial tight junction barrier*. American Journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2006.
56. Ma TY, I.G., Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM, *TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation*. american Journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2004.
57. Zolotarevsky Y, H.G., Koutsouris A, Gonzalez DE, Quan C, Tom J, Mrsny RJ, Turner JR, *A Membrane-Permeant Peptide That Inhibits MLC Kinase Restores Barrier Function in In Vitro Models of Intestinal Disease*. Gastroenterology, 2002.
58. Gharamti AA, S.O., Monzon A, Montalbano G, Scherger S, DeSanto K, Chastain DB, Sillau S, Montoya JG, Franco-Paredes C, Henao-Martínez AF, Shapiro L, *Proinflammatory cytokines levels in sepsis and healthy volunteers, and tumor necrosis factor-alpha associated sepsis mortality: A systematic review and meta-analysis*. Cytokine, 2022.
59. Capaldo CT, N.A., *Cytokine regulation of tight junctions*. Biochimica et Biophysica Acta, 2009.
60. Sambuy Y, D.A.I., Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. , *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics*. cell Biology and Toxicology, 2005.
61. Herminghaus A, B.A., Schulz J, Vollmer C, Scheeren TWL, Bauer I, Picker O, Truse R, *Propofol improves colonic but impairs hepatic mitochondrial function in tissue homogenates from healthy rats*. European Journal of Pharmacology, 2019.
62. Hughes JM, N.O., Bieber DD, Lewis KA, Ahmadi LM, Parsons DW, Canfield SG, *The Effects of Propofol on a Human in vitro Blood-Brain Barrier Model*. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2022.
63. Yoshitani K, K.M., Takahashi M, Kitaguchi K, Furuya H, *Plasma propofol concentration and EEG burst suppression ratio during normothermic cardiopulmonary bypass*. British Journal of Anaesthesia, 2003.
64. Liu KX, R.T., He W, Wang F, Xia Z, *Propofol attenuates intestinal mucosa injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in the rat*. Canadian Journal of Anaesthesia, 2007.

65. Wu MB, M.B., Zhang TX, Zhao K, Cui SM, He SC, *Propofol improves intestinal ischemia-reperfusion injury in rats through NF-kappaB pathway*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2020.
66. Liu KX, C.S., Huang WQ, Li YS, Irwin MG, Xia Z, *Propofol pretreatment reduces ceramide production and attenuates intestinal mucosal apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats*. Anesthesia and Analgesia, 2008.
67. Zitta K, H.L., Broch O, Gruenewald M, Ohnesorge H, Parczany K, Steinfath M, Albrecht M, *Effects of propofol on wound closure and barrier function of cultured endothelial cells*. European Journal of Anaesthesiology, 2018.
68. Zhang XY, C.X., Zhang HF, Guan S, Wen SH, Huang WQ, Liu ZM, *Propofol Does Not Reduce Pyroptosis of Enterocytes and Intestinal Epithelial Injury After Lipopolysaccharide Challenge*. digestive Diseases and Sciences, 2018.
69. Jia J, S.Y., Hu Z, Li Y, Ruan X, *Propofol inhibits the release of interleukin-6, 8 and tumor necrosis factor- α correlating with high-mobility group box 1 expression in lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 cells*. BMC Anesthesiology, 2017.
70. Song XM, W.Y., Li JG, Wang CY, Zhou Q, Zhang ZZ, Liang H, *Effects of propofol on pro-inflammatory cytokines and nuclear factor kappaB during polymicrobial sepsis in rats*. Molecular Biology Reports, 2009.
71. Nie Y, L.Y., Lv LH, *Effect of propofol on generation of inflammatory mediator of monocytes*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2016.
72. Xu Z, L.Y., Wang J, Ding X, Chen J, Miao C, *The protective effect of propofol against TNF- α -induced apoptosis was mediated via inhibiting iNOS/NO production and maintaining intracellular Ca²⁺ homeostasis in mouse hippocampal HT22 cells*. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2017.
73. O'Bryan LJ, A.K., Lipszyc A, Scott DA, Silbert BS, Evered LA, *Inflammatory Biomarker Levels After Propofol or Sevoflurane Anesthesia: A Meta-analysis*. Anesthesia and Analgesia, 2022.
74. Chang H, L.S., Li Y, Hu H, Cheng B, Miao J, Gao H, Ma H, Gao Y, Wang Q, *Effect of sedation with dexmedetomidine or propofol on gastrointestinal motility in lipopolysaccharide-induced endotoxemic mice*. BMC Anesthesiology, 2020.
75. Desmet M, V.C.P., Pottel H, Carlier S, Devriendt D, Van Rooy F, De Corte W, *The influence of propofol and sevoflurane on intestinal motility during laparoscopic surgery*. acta Anaesthesiologica Scandinavica, 2015.
76. Gueguen E, M.Y., Scharl M, Krämer SD, Zaugg M, Hersberger M, Rogler G, Wawrzyniak M, *Endothelial Barrier Disruption by Lipid Emulsions Containing a High Amount of N3 Fatty Acids (Omegaven) but Not N6 Fatty Acids (Intralipid)*. Cells, 2022.
77. Stamatovic SM, J.A., Sladojevic N, Keep RF, Andjelkovic AV, *Endocytosis of tight junction proteins and the regulation of degradation and recycling*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2017.
78. Utech M, M.R., Bruewer M., *Endocytosis and Recycling of Tight Junction Proteins in Inflammation*. Journal of Biomedicine & Biotechnology, 2010.
79. Garcia-Hernandez V, Q.M., Nusrat A, *Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2017.
80. Nighot P, M.T., *Endocytosis of Intestinal Tight Junction Proteins: In Time and Space*. Inflammatory Bowel Diseases, 2021.

81. Neyrinck-Leglantier D, L.J., Blacher S, Bonnomet A, Hunziker W, Noël A, Dormoy V, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Polette M, *ZO-1 Intracellular Localization Organizes Immune Response in Non-Small Cell Lung Cancer*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021.
82. Beutheu Youmba S, B.L., Galas L, Boukhattala N, Bôle-Feysot C, Déchelotte P, Coëffier M, *Methotrexate Modulates Tight Junctions Through NF- κ B, MEK, and JNK Pathways*. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2012.