

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

**Einfluss von Dexmedetomidin auf die inflammativ
veränderte intestinale Barrierefunktion**

Dissertation

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

vorgelegt von

Björn Hinsen

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Zweitgutachterin : Prof. Dr. med. Kathrin Scheckenbach

Für M, P und S

Eigene Publikationen

Teile dieser Arbeiten wurden veröffentlicht:

Kuebart, A., Hinsen, B., Kämpfer, A., Picker, O., Bauer, I., Herminghaus, A., *Keine Protektion der Darmbarriere – Dexmedetomidin weist keinen positiven Effekt auf inflammatorisch geschädigte Caco-2-Monolayer auf.* A&I Anästhesiologie und Intensivmedizin, 2023. 64 (Supplement Nr.7); p. 224

Zusammenfassung

Die Sepsis ist als lebensbedrohliche Organdysfunktion durch eine fehlregulierte Infektionsantwort definiert und stellt als Krankheitsbild weltweit eine große Herausforderung mit hoher Inzidenz und Mortalität dar. Dabei korrelieren insbesondere intestinale Schäden wie eine *tight junction* Dysfunktion und ein verändertes Mikrobiom mit komplikationsreichen Verläufen. Die inflammatorisch geschädigte Darmbarriere wird somit als Verstärker und Folge der Sepsis angesehen. In verschiedenen klinischen und tierexperimentellen Studien konnte eine antiinflammatorische Wirkung des α_2 -Adrenorezeptor-Agonisten Dexmedetomidin beobachtet werden, dessen Hauptindikation die Sedierung ist. Ziel dieser Arbeit ist zu eruieren, inwiefern die vorbeschriebenen protektiven Eigenschaften von Dexmedetomidin auf einen inflammativen, intestinalen Epitheldefekt mit *tight junction* Dysfunktion übertragbar sind.

Dazu wurden Caco-2 Zellen 21 Tage ausdifferenziert und mittels 2,5 ng/ml TNF α und 10 ng/ml IFN γ inflammativ geschädigt. Die Zellen wurden mit Dexmedetomidin 24 h vor bis 24 h nach Inflammationsinduktion in Konzentrationen von 5 nM, 50 nM, 100 nM und 1000 nM inkubiert. Nach XTT-Viabilitätsmessung wurden transepitheliale Widerstandsmessungen zur Quantifizierung der Epithelpermeabilität durchgeführt. Proteinbestimmungen der *tight junction* Proteine Occludin und Claudin-5 erfolgten mittels Western Blot Analysen, sowie von Zonula occludens-1 mittels immunhistochemischer Färbung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Integrität der intestinalen Epithelbarriere unter Inflammation signifikant abnimmt. In Western Blot Analysen blieben die Proteinexpressionsmengen der *tight junction* Proteinen Occludin und Claudin-5 dabei unverändert. In immunhistochemischen Färbungen stellte sich das *tight junction* Protein Zonula occludens-1 hingegen nicht, wie physiologischerweise, an den Zellaußengrenzen dar, sondern war in intrazellulären Anhäufungen lokalisiert. Die Behandlung mit Dexmedetomidin hatte weder in klinisch relevanter (5 nM) noch in höherer Dosierung (50, 100, 1000 nM) einen Einfluss auf diese inflammativen Veränderungen der intestinalen Barriere. Schlussfolgernd konnten in dieser Studie keine antiinflammatorischen Eigenschaften von Dexmedetomidin auf die epitheliale Darmbarriere *in vitro* nachgewiesen werden.

Summary

Sepsis, defined as a life-threatening organ dysfunction with a dysregulated inflammatory response, still represents a significant healthcare challenge on a global scale, characterized by high incidence and high mortality rates. Intestinal tight junction dysfunction and an altered gut microbiome correlate with elevated complications such as hospitalization rates or mortality. The inflammatory-damaged intestinal barrier is seen as both a consequence and an amplifier. Various studies indicated an anti-inflammatory effect of the sedative dexmedetomidine, an α -adrenoreceptor agonist. This study evaluates this anti-inflammatory effect in an inflammatory-damaged intestinal environment with tight junction dysfunction.

The model used in this study, based on differentiated Caco-2 cells, was exposed to an inflammatory stimulus (2,5 ng/ml TNF α and 10 ng/ml IFN γ). The cells were treated with dexmedetomidine at concentrations of 5, 50, 100, and 1000 nM 24 hours before and 24 hours after the inflammatory induction. XTT cell viability measurements and transepithelial resistance measurements were performed. Tight junction proteins Occludin and Claudin-5 were detected via western blot analysis, and Zonula occludens-1 via immunohistochemical staining.

The results showed a significant increase in permeability after incubation with the inflammatory stimulus. The levels of tight junction proteins Occludin and Claudin-5 remained unaltered in western blot analysis. In immunohistochemical staining Zonula occludens-1 was observed to accumulate intracellularly. Dexmedetomidin had no effect on these inflammatory changes to intestinal barrier function, neither in a clinical dose (5 nM) nor at any higher concentration tested. In conclusion no anti-inflammatory properties of dexmedetomidine regarding the epithelial intestinal barrier could be detected.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb	Abbildung
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
BTLA	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
bzw.	beziehungsweise
Caco-2	<i>Cancer Coli cells 2</i>
cm ²	Quadratzentimeter
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
d	Tag
DAMPS	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dex	Dexmedetomidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS/PBS	<i>(Dulbecco's) phosphate-buffered saline</i>
Et al.	<i>et alia, alii, aliae</i>
FCS	fetales bovine Serum
FER-Gen	FER Tyrosinkinase Gen
h	Stunde
HMGB1	<i>High-Mobility Group Box 1</i>
IFN γ	Interferon γ (gamma)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JAM-A	<i>Junctional adhesion molecule A</i>
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharide
m	Meter

MAD	mittlerer arterieller Druck
min	Minuten
ml	Milliliter
MLCK	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPBT	CaCo-2 Medium, DPBS, BSA, Trehalose
MUC2	Mucin 2
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
PAMPS	<i>Pattern-associated molecular patterns</i>
PD1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
Pen/Strep	PenicillinG/Streptomycin
pg/ml	pikogramm/milliliter
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
qSOFA	<i>quick Sequential [Sepsis-related] Organ Function Assessment</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SOFA	<i>sequential [Sepsis-related] Organ Function Assessment</i>
SVEP1	<i>Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and Pentraxin domain containing 1 gen</i>
TEER	<i>Transepithelial/Transendothelial Electric Resistance</i>
TLR	Toll like Rezeptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
u.a.	unter anderem
USA	<i>United States of America</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
z.B.	zum Beispiel
ZO-1	Zonula occludens 1

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Sepsis	1
1.1.1 Allgemein	1
1.1.2 Epidemiologie	3
1.1.3 Pathophysiologie.....	3
1.1.4 Therapie der Sepsis.....	5
1.2 Intestinale Barrierestörungen in der Sepsis	7
1.2.1 Aufbau der intestinalen Barriere	7
1.2.2 Tight junctions.....	8
1.2.3 Veränderungen der intestinalen Barriere bei Sepsis	8
1.2.4 Wirkung von Entzündungsmediatoren auf <i>tight junctions</i>	9
1.3 Dexmedetomidin	10
1.3.1 Pharmakologie	10
1.3.2 Antiinflammatorische und organprotektive Eigenschaften von Dexmedetomidin.....	11
1.4 Ziele der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Material	14
2.1.1 Laborgeräte.....	14
2.1.2 Zellkulturmaterialien.....	16
2.1.3 Chemikalien	18
2.1.4 Antikörper.....	21
2.1.5 Sonstiges	22
2.1.6 Software	22

2.2	Methoden	23
2.2.1	Caco-2 Zelllinie	23
2.2.2	Zellkultur.....	23
2.2.3	Dexmedetomidin Behandlungsschemata.....	24
2.2.4	Zellviabilitätsnachweis mittels XTT-Test	25
2.2.5	Transepitheliale Widerstandsmessung im TEER-Versuch.....	26
2.2.6	Gewinnung von behandelten Caco-2 Zellen aus Inserts	26
2.2.7	Ganzzellextraktion der Zellpellets und Proteinanalyse nach Pierce™	27
2.2.8	Western Blot Analyse von Occludin und Claudin-5	27
2.2.9	Nachweis vom Zonula occludens-1 Proteinen in der Immunhistochemie	28
2.2.10	Statistische Auswertung	28
3	Ergebnisse.....	30
3.1	XTT-Analyse	30
3.2	Transepitheliale elektrische Widerstandsmessung von Caco-2 Zellen	31
3.3	Western Blot Analyse der <i>tight junction</i> Proteine Occludin und Claudin-5....	32
3.4	Immunhistochemische Färbung und Nachweis des <i>tight junction</i> Proteins Zonula occludens-1	35
4	Diskussion	38
4.1	Das intestinale Epithel als Forschungsgegenstand	38
4.2	Einfluss von Dexmedetomidin auf die inflammativ veränderte, intestinale Barriere.....	39
4.3	Limitationen.....	42
4.4	Schlussfolgerung	43
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	45

1 Einleitung

1.1 Sepsis

1.1.1 Allgemein

Im 4. Jahrhundert vor Christus verwendete Hippokrates das erste Mal den Begriff „Sepsis“, um den Zerfall und die Zersetzung eines organischen Materials zu beschreiben [1]. Nach verschiedenen weiteren Definitionen und deren Überarbeitungen [2, 3] ist seit 2016 die dritte internationale *Consensus Definition* für Sepsis (Sepsis-3 Definition) allgemein anerkannt [4]. Diese definiert Sepsis als lebensbedrohliche Organdysfunktion, verursacht durch eine fehlregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion. Dabei wird die Organdysfunktion als akuter Anstieg von mindestens 2 Punkten des *Sequential (Sepsis-related) Organ Function Assessment Scores* (SOFA-Score) bezeichnet, was mit einer Krankenhausmortalität von > 10 Prozent (%) einhergeht [3, 4]. Der SOFA-Score setzt sich mehrheitlich aus labortechnischen Parametern verschiedener Organsysteme zusammen (s. Tabelle 1.1), dazu zählen der Horovitz-Quotient, Kreatinin, Urinausscheidung, Bilirubin, Katecholamindosis, Thrombozytenzahl und die *Glasgow Coma Scale* [4, 5].

Parameter	1 Punkt	2 Punkt	3 Punkt	4 Punkt
P_aO₂/FiO₂ (mmHg)	<400	<300	<200 mit Beatmung	<100 mit Beatmung
Kreatinin (mg/dl)	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9	>5,0
Urinausscheidung (ml/d)			<500	<200
Bilirubin (mg/dl)	1,2 -1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	>12,0
Mittlerer arterieller Druck oder Katecholamindosis	<70 mmHg	Dopamin ≤ 5 µg/kg/min oder Dobutamin	Dopamin > 5 µg/kg/min oder (Nor-)Adrenalin ≤ 0,1 µg/kg/min	Dopamin > 15 µg/kg/min oder (Nor-)Adrenalin > 0,1 µg/kg/min
Thrombozyten (x10³/µl)	<150	<100	<50	<20
Glasgow Coma Scale	13 – 14	10 – 12	6 – 9	<6

Tabelle 1.1: **Sequential (Sepsis-related) Organ Function Assessment Score (SOFA-Score)** nach dritter internationaler Konsensus Definition für Sepsis und septischen Schock (Sepsis-3) von 2016. mmHg = Millimeter Quecksilbersäule, µg/kg/min = Mikrogramm/Kilogramm/Minute, ml/d = Milliliter/Tag

Da diese Parameter nicht routinemäßig außerhalb eines stationären Krankenhausaufenthaltes erhoben werden, wurde der *quick Sequential (Sepsis-related) Organ Function Assessment Score* (qSOFA-Score) als klinischer *Screening* Test entwickelt. Dieser besteht aus einem *Glasgow Coma Scale* Punktwert <15, einer Atemfrequenz von ≥22/Minute(min) und einem systolischen Blutdruckwert ≤100 mmHg. Bei einem qSOFA-Score von ≥ 2 haben Patienten ein erhöhtes Risiko für eine Sepsis und es sollte weitere Diagnostik (unter anderem (u.a.) SOFA-Scoring) betrieben, Überwachung ausgeweitet und eine angemessene Therapie eingeleitet werden [4, 5].

Zusätzlich grenzt die Sepsis-3 Definition den septischen Schock als Untergruppe der Sepsis ab. Ein erhöhter Serumlaktatspiegel > 2 mmol/l und Vasopressorenbedarf, um einen mittleren arteriellen Druck von ≥ 65 mmHg zu halten, definieren diesen. Die Kreislauf-, Zell- und Stoffwechseleränderungen, die mit einem septischen Schock einhergehen, sind unter den aktuellen intensivmedizinischen Maßnahmen weiterhin mit

einer Krankenhaussterblichkeit von über 40% assoziiert [4, 6]. Insgesamt ist die Sepsis mit einer weltweiten Krankenhausmortalität von 35% assoziiert [7].

1.1.2 Epidemiologie

2017 lag die geschätzte weltweite Inzidenz bei 48,9 Millionen Sepsiserkrankungen mit ca. 11 Millionen Todesfällen, was 19,7% aller globalen Todesfälle entsprach [8]. Vor allem der Süden Afrikas und Asiens sind hinsichtlich Inzidenz und Mortalität stärker betroffen [8]. So versterben in Afrika 47% der Sepsispatienten, in West-Europa hingegen 33% [7]. Die *World Health Organisation* (WHO) verabschiedete im gleichen Jahr eine Resolution, die ihre Mitgliedstaaten dazu auffordert, Maßnahmen zur Prävention, Diagnostik und Management der Sepsis zu verbessern [9].

Epidemiologische Daten für Deutschland liefert die INSEP-Studie aus dem Jahr 2013, allerdings bezogen auf eine veraltete Sepsisdefinition. Dabei lag die Prävalenz von schwerer Sepsis/septischem Schock bei 12,6% aller beobachteten Intensivpatienten. 57,3% waren nosokomialen Ursprungs [10]. Weltweit machen *hospital-acquired* Infektionen 48,7% aller auf Intensivstation behandelten Sepsispatienten aus [11].

Die 30-Tage-Sterblichkeit der Sepsis beträgt in Deutschland 26,5%, bezogen auf den septischen Schock liegt die 30-Tage Sterblichkeit bei 30,5%, und liegt damit unter dem westeuropäischen Durchschnitt [12].

1.1.3 Pathophysiologie

Eine Infektion mit Pathogenen löst eine zunächst physiologische Immunantwort des Körpers aus. Dabei binden *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) körpereigener Zellen an Liganden körperfremder Zellen, sogenannte *Pathogen-associated molecular Patterns* (PAMPs). Dazu zählen Lipopolysaccharide (LPS), gram-negativer Bakterien, virale und bakterielle Nukleinsäuren. Anschließend werden Zytokine als Entzündungsmediatoren freigesetzt und Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen migrieren in das Entzündungsgebiet. Zusätzlich wird das erworbene Immunsystem über antigenpräsentierende Zellen aktiviert, sodass T- und B-Zellen stimuliert werden und gezielte Antikörper gebildet werden. Gleichzeitig begrenzen antiinflammatorische Mediatoren das Entzündungsgeschehen auf eine lokale Reaktion [13, 14].

Bei dem Krankheitsbild der Sepsis ist diese regulierte Immunantwort dysfunktional. Die inflammatorische Imbalance der pro- und antiinflammatorischen Reaktionen ist Grundlage der Pathogenese und zeichnet sich im gesamten Prozess der Krankheit ab [2]. Dabei nehmen die Zellen des angeborenen Immunsystems eine zentrale Rolle innerhalb der Pathophysiologie ein.

So führt die Überaktivierung von PRRs bei der Sepsis zur massiven Produktion von Zytokinen und anderen Mediatoren, die über den Blut- oder Lymphkreislauf auch an primär nicht von der Infektion betroffenen Organen wirken [13]. Die überschießende proinflammatorische Zytokinantwort von Interleukin-1 β (IL-1 β), *high mobility group box 1* (HMGB1) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) zeichnet dabei die Anfangsphase der Sepsis aus und resultiert in Zellschädigungen [14]. Dazu zählen mitochondriale- und DNA-Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies [15], ebenso wie granulozytär vermittelte Phagozytose von körpereigenen Zellen [14]. Die T-Zell-induzierte Aktivierung von Makrophagen führt zudem zu einer Gewebsfibrosierung durch vermehrten zellulären Abbau [2].

Die überschießenden, hyperinflammatorischen Mechanismen induzieren zudem auf vaskulärer Ebene deutliche Veränderungen. Eine erhöhte Endothelpermeabilität mit Kapillarleckage, erhöhte Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion und Verringerung vaskulärer α 1-Adrenorezeptoren [13, 16] resultieren in einem vaskulären Hypotonus mit konsekutiver Organminderperfusion [13]. Gleichzeitig wird das hämostatische Gleichgewicht in ein prokoagulatorisches Milieu verschoben [14]. Durch kapilläre Stase und vermehrte Expression von *tissue factor* auf Leukozyten und Endothelzellen pseudoagglutinieren Erythrozyten und verlieren ihre anti-adhäsiven Eigenschaften [17].

Inflammatorische Schädigungen auf zellulärer Ebene resultieren in Zellapoptose und bedingen Organdysfunktionen. Insbesondere Mitochondrien weisen durch verringerte Sauerstoff-Versorgung, vermehrten Anfall reaktiver Sauerstoffspezies und verringerte Transkription mitochondrialer Proteine Schädigungen in der Zellmatrix und -membran auf [18-21]. Fehlgefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum, oxidativer Stress und intrazellulären Calcium-Konzentrationsänderungen führen ebenfalls zur Apoptose [22].

Während die Anfangsphase der Sepsis von proinflammatorischen Zytokinen geprägt ist, dominieren nachfolgend antiinflammatorische Signale, welche in eine über Monate andauernde Immunsuppression resultieren kann [2, 13, 14, 23, 24]. Bedingt wird dies durch verringerte Phagozytose, verringerte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten, vermehrte Apoptose von Lymphozyten und verringerte Immunglobulinproduktion [25,

26]. Zudem werden inhibitorische Signale an T-Zellen durch konstante Stimulation des T-Zell-Rezeptors durch Antigene wie *programmed cell death protein 1* (PD1), *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA4) und *B- and T-lymphocyte attenuator* (BTLA) verstärkt [27, 28]. Zusätzlich steigt die Anzahl regulatorischer T-Zellen und myeloider Suppressorzellen. Dies sind myeloische Zellen, die unter chronischen proinflammatorischen Stimuli entstehen, und vergleichbar mit regulatorischen T-Zellen immunsuppressiv wirken [29]. Die Anzahl von CD4+ und CD8+ T-Zellen hingegen sinkt [14].

Letztendlich führen diese aufgeführten Schädigungsmechanismen auf verschiedenen Ebenen zu Organdysfunktionen, die laut Sepsis-3 Definition Bedingung für das Krankheitsbild sind.

1.1.4 Therapie der Sepsis

Die große medizinische Relevanz der Sepsis resultierte 2002 in der *Surviving Sepsis Campaign* der *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) und der *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM). Seitdem liefert diese Arbeitsgruppe aus interdisziplinären Expertinnen und Experten Leitlinien und Maßnahmenpakete zur Verbesserung der Behandlung der Sepsis und des septischen Schocks, auf die sich auch die deutsche Leitlinie „S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge“ [30] mehrheitlich bezieht. Die aktuell überarbeiteten Versionen der *Surviving Sepsis Campaign* wurden veröffentlicht in „*Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021*“ [31] und in „*The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 Update*“ [32].

Die Notwendigkeit von früher Erkennung und angemessener sofortiger Behandlung resultierte in der Entwicklung eines 1h-Maßnahmenbündels (*bundle*) [32]. Das 1h-*bundle* listet dabei Vorgehensweisen auf, die innerhalb einer Stunde nach Vorstellung des Patienten in der Notaufnahme durchgeführt werden sollen [32, 33]. Diese sind in Tabelle 1.2 aufgeführt. Levy et. al konnten zeigen, dass die empfohlenen Maßnahmen zu einer Mortalitätsreduktion von 25% führen [34].

Maßnahme	Grad der Empfehlung	Evidenz
Serumlaktat messen. Erneute Messung, wenn initiales Serumlaktat > 2 mmol/l	Schwache Empfehlung	Geringe Qualität
Gewinnung von Blutkulturen vor dem Beginn der antimikrobiellen Therapie	<i>Best practice statement</i>	
Verabreichung von Breitspektrumantibiotika	Starke Empfehlung	Moderate Qualität
Schnelle Gabe von 30 ml/kg balancierter kristalloider Lösung bei Hypotonie oder Serumlaktat $\geq$ 4 mmol/l	Starke Empfehlung	Geringe Qualität
Einsatz von Vasopressoren bei bestehender Hypotonie während oder nach der Volumentherapie, um ein MAD $\geq$ 65 mmHg zu erhalten	Starke Empfehlung	Moderate Qualität

Tabelle 1.2: **1h-bundle** aus „The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update“ [32]. Therapiemaßnahmen, die innerhalb einer Stunde nach Eintreffen ins Krankenhaus, bei Sepsispatienten durchzuführen sind.

Laktat gilt als Surrogatmarker für Gewebepfusion, der bei Hypoxie ansteigt, und findet Verwendung im 1 hour (h)-bundle und in der Sepsis-3 Definition des septischen Schocks [32]. Dabei sind erhöhte Laktatwerte (>2 mmol/l) mit einer signifikant erhöhten Mortalität assoziiert [35, 36]. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine laktatstabilisierende Therapie mit einer geringeren Krankenhausmortalität bei kritisch kranken Patienten einhergeht [37, 38].

Die frühe Verabreichung einer antimikrobiellen Therapie ist eine der effizientesten Interventionen bei Sepsispatienten [30]. Die frühe empirische kalkulierte Antibiotikagabe wird bestärkt durch Ferrer et al., die zeigen konnten, dass die Mortalität ab der zweiten Stunde ohne Antibiotikagabe ansteigt [39]. Eine empirische Breitspektrumantibiotika-Therapie sollte den Ort der Infektion, die frühere Verwendung von Antibiotika, lokale Erregermuster und Immunsuppression berücksichtigen [40]. Die aktuellen Leitlinien empfehlen weiterhin die schnellstmögliche Fokussuche und die zeitnahe operative oder interventionelle Fokussanierung, sofern möglich [30, 31].

Eine kausale Therapie der Immundysfunktion steht derzeit nicht zur Verfügung, daher liegt das Forschungsinteresse in immunmodulatorischen Strategien, wie z.B. mit IFN β oder Immunstimulation mit Interleukinen [41]. Erste Hinweise für ein verbessertes klinisches *Outcome* hat der Einsatz von IgM-angereichertem Immunglobulin gezeigt [42]. Absoluter Therapiestandard bleibt allerdings weiterhin die Einhaltung der *Surviving Sepsis Campaign Guidelines* und leitliniengerechte intensivmedizinische Behandlung.

1.2 Intestinale Barrierestörungen in der Sepsis

1.2.1 Aufbau der intestinalen Barriere

Das Intestinum nimmt im menschlichen Körper eine Sonderrolle als große Austauschfläche zwischen äußerer Umwelt und innerem Milieu ein. Dementsprechend ist die intestinale Barriere von besonderer Funktion in den Bereichen Nahrungsaufnahme und Abwehr schädlicher Antigene [43]. Dabei verändert sich die intestinale Barriere dynamisch durch innere und äußere Stimuli, wie Zytokine, Bakterien und Nahrungsgewohnheiten [44, 45].

Der Aufbau des Gastrointestinaltrakts ist dabei grundsätzlich gleich. Er zieht sich vom Beginn des Ösophagus bis zum Ende des Analkanals und folgt der gleichen histologischen Wandgliederung von luminal nach basal in *Tunica mucosa*, *Tela submucosa*, *Tunica muscularis* und *Tunica serosa* beziehungsweise (bzw.) *adventitia* [46]. Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Kolon bilden als Intestinum den zentralen Teil des Verdauungssystems. Die Dünndarmschleimhaut gliedert sich in Zotten, die mit Mikrovilli tragenden Enterozyten und Becherzellen besetzt sind, und Krypten, die Stammzellen und immunologische Paneth-Zellen beherbergen. Das ca. 1 m lange Kolon besteht histologisch aus einfachen tubulären Drüsen mit Epithelzellen, Becherzellen, Stammzellen und endokrinen Zellen [47]. Zur Darmschleimhaut zählt zudem das darmassoziierte lymphatische Gewebe, das sich aus einzelnen Immunzellen, Lymphfollikeln und Peyer-Plaques zusammensetzt, und einen weiteren immunologischen Schutz gegenüber dem mit Pathogenen exponierten Intestinum bietet [48].

Die Epithelschicht des Darmtraktes besteht aus einschichtigem Zylinderepithel [46], welches den Hauptteil der intestinalen Barriere ausmacht und Ort der verschiedenen

Transportwege aus dem Lumen in die Zelle ist. Interzelluläre Verbindungskomplexe, bestehend aus apikal gelegenen *tight junctions*, basal gelegenen *adhearens junctions* und Desmosome, sind nötig, um den parazellulären Transport von Molekülen zu regulieren und Konzentrationsgradienten aufrecht zu erhalten [44, 49].

1.2.2 Tight junctions

Tight junctions, oder auch Zonula occludens, sind Multiproteinkomplexe, die sich zwischen benachbarten Zellen in Epithelien ausbilden. Zu den transmembranen Proteinen der *tight junctions* gehören Claudin, Occludin, Tricellulin und *junctional adhesion molecule A* (JAM-A), wohingegen Zonula occludens-1 (ZO-1) und Cingullin zu den intrazellulären Gerüstproteinen zählen [50]. Die Claudin-Proteinfamilie besteht aus mehreren Isoformen mit verschiedenen Eigenschaften. Die Isoformen Claudin-1, -3, -4, -5, und -8 stärken die Epithelbarriere und liegen vornehmlich in sehr dichtem Epithel vor [47]. Hingegen bilden Claudin-2, -7 und -12 selektive Poren für Ionen und Wasser aus und erhöhen somit die Permeabilität des Epithels [43, 50, 51]. Die Gerüstproteine ZO-1, -2 und -3 binden sowohl an die Transmembranproteine Occludin und Claudin als auch an das Zytoskelett und verankern die Struktur der *tight junctions* in den Zellen [52, 53].

Tight junctions sind der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für den parazellulären Strom entlang der Zellen und somit auch für die Epithelpermeabilität [45]. Zwei Routen durch die *tight junctions* wurden beschrieben: der *pore pathway* und der *leak pathway*. Der *pore pathway* besitzt die höhere Transportkapazität und ist größen- und ladungselektiv für kleine, ungeladene Moleküle und für Ionen. Er wird vor allem durch die Claudin-Expression bestimmt. Im Gegensatz weist der *leak pathway* eine geringere Transportkapazität auf, ist jedoch permeabel für größere Makromoleküle. Dieser Weg wird über ZO-1 und Occludin reguliert [54].

1.2.3 Veränderungen der intestinalen Barriere bei Sepsis

Der Fokus dieser Dissertation liegt insbesondere auf den Veränderungen der Darmbarriere, die während einer Sepsis auftreten. Intestinale Barrierestörungen werden dabei als Folge und als Ursache der Sepsis angesehen [55]. Zu den Veränderungen an der Darmbarriere zählen Verschiebungen innerhalb des Mikrobioms, erhöhte intestinale Permeabilität, gestörte Mikrozirkulation und veränderte Mukussekretion [55]. Die

resultierende Imbalance des intestinalen Mikrobioms ermöglicht zusätzlich die Exazerbation der Sepsis und führt zur Verschlechterung der Organdysfunktion unabhängig vom auslösenden Faktor [56].

Hinsichtlich der Zusammensetzung der intestinalen Flora im Kontext der Sepsis spricht man von einer Dysbiose, die das physiologische Mikrobiom zu einem Pathobiom verändert [57, 58]. Gekennzeichnet ist dieses durch den Verlust mikrobieller Diversität, die erhöhte Virulenz bestehender Bakterien und die Dominanz pathogener Bakterien einhergehend mit dem Verlust apathogener, symbiotischer Bakterien [59, 60]. Ein dysbalanciertes Mikrobiom stört zudem die angeborene und erworbenen Immunantwort des menschlichen Wirtsorganismus [55, 61]. In diesem Zusammenhang konnte eine Korrelation zwischen Infektionen mit einer Dysbiose und einer erhöhten Inzidenz von Sepsis gezeigt werden, so ist z.B. die Inzidenzrate der Sepsis nach einer Infektion durch *Clostridium difficile* um 70% gesteigert [62].

Ein weiteres zentrales Merkmal der Darmbarrierestörung ist die erhöhte Permeabilität über das Darmepithel [56]. Veränderungen in den *tight junctions*, die maßgeblich die parazelluläre Permeabilität bestimmen, treten ca. eine Stunde nach Beginn der Sepsis auf [63]. Genauer dazu wird in Kapitel 1.2.4 erläutert. Eine erhöhte intestinale Permeabilität scheint auch bei anderen Erkrankungen, wie z.B. chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder Zöliakie, von bedeutender Rolle zu sein. Gemein haben diese Erkrankungen Entzündungsmuster, die durch Translokationen von luminalen Antigenen über die geschädigte Darmbarriere in den systemischen Kreislauf bedingt sind [64].

1.2.4 Wirkung von Entzündungsmediatoren auf *tight junctions*

Verschiedene Entzündungsgeschehen sind Auslöser von *tight junction* Dysfunktionen [65]. Zytokine wirken u.a. auf die Expression von *tight junction* Proteinen und die Expression der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK), die die *tight junction* Struktur durch Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichte-Kette II im Aktinmyosinring verändert und eine Hyperpermeabilität bedingt [51, 66]. Generell nimmt die Myosin-Leichte-Ketten Kinase eine Schlüsselrolle in der *tight junction* Regulation durch inflammatorische und immunologische Einflüsse ein [45, 67]. Auch Stickstoffmonooxid (NO) und aktivierte Proteinkinase C gelten als Mediatoren der Hyperpermeabilität, vermutlich wirken sie ebenfalls über Phosphorylierung der Myosin-Leichte-Kette, wobei die exakten Mechanismen bisher unzureichend verstanden sind [68].

Unter Zytokineinfluss von IL-13 liegt vermehrt Claudin-2 vor, was zu vermehrten parazellulären Strom über den *pore pathway* der *tight junctions* führt. [49, 54, 67]. TNF α hingegen verstärkt über ZO-1- und Occludin-Regulation den *leak pathway* [45, 49, 54], sodass eine Hyperpermeabilität verstärkt wird.

Im Mausmodell kam es unter septischen Bedingungen zu ähnlichen Effekten mit erhöhter Expression der *tight junction* Proteine Claudin-2 und JAM-A, und verringerter Expression von Claudin-5, Occludin und ZO-1 [63]. Zudem scheint es zu einer zellulären Umverteilung der *tight junction* Proteinen zu kommen. Immunfluoreszenzmikroskopische Betrachtungen von murinen Kolonzellen zeigten, dass Claudin-1, -3, -4, -5 und -8 physiologisch im Mikrovillisaum und an den lateralen Seiten der Epithelzellen lokalisiert sind, sich unter septischen Bedingungen allerdings diffus über die Kolonzellen verteilen und eine Hyperpermeabilität bedingen [69]. Auch Nighot et al. führen verschiedene inflammative Mausmodelle an, bei denen in Kolonzellen *tight junction* Proteine, wie Occludin, Claudin und JAM-A, nicht mehr in den apikalen Zellkontakten vorlagen, sondern in zytoplasmatischen abgeschnürten Vakuolen [65]. Diverse weitere Studien zeigten, dass unter TNF α und IFN γ Einfluss eine Caveolin-abhängige Endozytose von Occludin stattfindet, die mit einer Schwäche der intestinalen Barriere assoziiert ist. Die Endozytose von Claudin dagegen wird Clathrin-abhängig vermittelt [65, 67].

Die beschriebene *tight junction* Endozytose ist reversibel. Die Proteine können erneut in der Membran verankert werden, ohne dass neue Proteinsynthese betrieben werden muss [65]. Genauso haben antiinflammatorische Zytokine, wie IL-10 oder *Transforming-growth-factor* β , einen epithelstärkenden Effekt und verhindern inflammatorische Einflüsse auf die Permeabilität [51].

1.3 Dexmedetomidin

1.3.1 Pharmakologie

Dexmedetomidin (Dex) ist ein rechts-drehendes Enantiomer des aus der Veterinärmedizin bekannten Medetomidin und chemisch mit Clonidin verwandt. 2011 wurde es in Europa für die Sedierung erwachsener Patienten zugelassen [70]. Dexmedetomidin wirkt als selektiver α_2 -Rezeptor-Agonist mit höherer Rezeptor-Affinität als Clonidin [71]. Der G-Protein-gekoppelte Adrenozeptor α_2 wird physiologisch durch

Adrenalin und Noradrenalin stimuliert und kommt in Form von 3 Subtypen im gesamten menschlichen Körper vor: $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ und $\alpha 2C$. Über diese erklärt sich die sedierende, analgetische und anxiolytische Wirkung von Dexmedetomidin. Dabei ist die inhibierende Wirkung auf den Sympathikotonus des postsynaptischen $\alpha 2A$ -Rezeptors im Locus caeruleus entscheidend für die Sedierung [70-72] und im Rückenmark entscheidend für die Analgesie [73].

Indiziert ist das Medikament zur Sedierung bei Erwachsenen, vor allem bei intubierten und mechanisch beatmeten Patienten [74, 75]. Mit Dexmedetomidin ist eine *arousable sedation* möglich, eine schlafähnliche Sedierungstiefe, bei der der Patient mit verbalen und taktilen Stimuli leicht erweckbar ist. Dies entspricht einem Score von 0 bis -3 auf der *Richmond Agitation Sedation Scale* [76, 77].

Die häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen bedingt durch eine zentrale Sympathikolyse sind arterielle Hypotonie und Bradykardie. Des Weiteren treten vor allem zu Beginn der Verabreichung arterielle Hypertonien durch eine $\alpha 2B$ -Rezeptor vermittelte periphere Vasokonstriktion auf. Daraus resultieren die Kontraindikationen von Dexmedetomidin bei Patienten mit arterieller Hypotonie, AV-Block Grad II oder III, akuten zerebrovaskulären Ereignissen oder Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff.

Dexmedetomidin wird intravenös als Infusion mit einer initialen Infusionsrate von 0,7 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht/h verabreicht. Zum Erreichen der gewünschten Sedierungstiefe kann die Infusionsrate von 0,2 - 1,4 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht/h angepasst werden, was einer Plasmakonzentration von 0,3 – 2 ng/ml ($\triangleq$ ca. 1 – 10 Nanomolar (nM)) entspricht [76, 78]. Dexmedetomidin liegt zu 94% gebunden an Proteinen, insbesondere Serumalbumin, vor und wird über hepatische Metabolisierung eliminiert. Die terminale Eliminationshalbwertszeit wird auf circa 2 h geschätzt [76, 78].

1.3.2 Antiinflammatorische und organprotektive Eigenschaften von Dexmedetomidin

Neben den oben beschriebenen Kreislaufeffekten, konnten in verschiedenen Sepsismodellen antiinflammatorische Effekte von Dexmedetomidin nachgewiesen werden. Die Stimulation des zentralen $\alpha 2$ -Adrenorezeptor und Inhibition des Immunsystem-stimulierenden TLR4/MyD88/NF κ B Signalweg werden dabei als Wirkmechanismen des Sedativums angesehen [79, 80], was zu Verringerung von proinflammatorischen Signalen wie TNF α , HMGB1, IL-6, IL-8 [81], IL-10 und CRP führt

[82]. Dexmedetomidin scheint außerdem den entzündungshemmenden cholinergen Signalweg zu verstärken. Dabei bindet Acetylcholin an den α -7-nikotinergen Acetylcholinrezeptor auf Immunzelloberflächen, was die Zytokinproduktion hemmt [83-85]. Im Tiermodell korrelierte der entzündungshemmende Effekt mit der Dosis von Dexmedetomidin, so verringerten sich TNF α und die IL-6-Serumspiegel ab einer Dosis von 5 μ g/kg/h und stärker bei 10 μ g/kg/h [86]. Neben antiinflammatorischen Effekten wurden ebenfalls antiapoptotische Eigenschaften durch Stimulation des PI3K/Akt-Signalweg und der Superoxiddismutase als zusätzlich protektive Effekte beschrieben [80, 87].

Diese zellschützenden Effekte konnten in tierexperimentellen Studien in verschiedensten Organsystemen nachvollzogen werden [80]. Im Lungengewebe konnte Dexmedetomidin leukozytenvermittelte Lungenschäden und Apoptoseschäden bei septischen Ratten abschwächen [88]. Bei Lungenschäden durch Ischämie/-Reperusionsverletzungen an Mäusen reduzierte Dexmedetomidin das Lungenödem und die Entzündungsreaktion [89]. Bezogen auf die Niere waren unter Dexmedetomidin die *tight junction* Proteine Zonula-1 und Occludin in Nierenzellen von Ratten hochreguliert und die renale Dysfunktion verringert [90]. Des Weiteren zeigten sich an Nervenzellen unter Dexmedetomidin eine verringerte Neuroinflammation [72] und eine verminderte septische Enzephalopathie bei Mäusen [91]. Bezüglich einer intestinalen Wirkung konnten Hitze- oder Toxin vermittelte Schäden am Rattendarm unter Dexmedetomidin Behandlung kompensiert werden. Ursächlich dafür waren Stärkung der epithelialen Integrität über Zonula occludens-1- und Occludin-Komplexe [92], Verbesserung der intestinale Mikrozirkulation und verringerter Zelltod [93].

Klinische *in vivo* Studien liegen vereinzelt vor. Li et al. führen an, dass die perioperative Gabe von Dexmedetomidin die postoperativen Serumspiegel von TNF α , IL-6 und IL-8 verringert [94].

1.4 Ziele der Arbeit

Der intestinale Barriere Defekte steht seit längerem als zentrales Kennzeichen der verstärkten inflammatorischen Reaktion bei Sepsispatienten im Forschungsinteresse. Da kausale Therapien begrenzt sind, stellt sich die Frage, inwiefern etablierte Therapeutika das Darmepithel protektiv beeinflussen. Unterschiedliche Sedativa, darunter auch Dexmedetomidin, haben in verschiedenen Kontexten bereits

antiinflammatorische Eigenschaften gezeigt. Es stellt sich somit die Frage, ob weitere Kriterien, wie zum Beispiel die Wirkung auf unterschiedliche Organsysteme, bei der Auswahl des Sedativums bei Sepsispatienten, neben persönlicher Präferenz des Behandlers und Klinikstandard, angewendet werden können. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die potenziellen antiinflammatorischen und barriereschützenden Eigenschaften von Dexmedetomidin im Intestinum zu untersuchen, was langfristig Rückschlüsse auf mögliche therapeutische Ansätze bei sepsisbedingten Darmbarrierestörungen ermöglichen könnte.

Konkret wird mit Hilfe von *Cancer Coli cells 2* (Caco-2 Zellen) die intestinale Barriere simuliert und mit den Zytokinen TNF α und IFN γ eine Entzündungsreaktion induziert. Die Funktion der Epithelbarriere wird über transepitheliale Widerstandsmessungen (TEER-Messung, *transepithelial electric resistance*) bestimmt. Weiter werden Western Blot Analysen der mit TNF α und IFN γ und/oder Dexmedetomidin versehenen Caco-2 Zellen zum Nachweis der *tight junction* Proteine Occludin und Claudin-5 durchgeführt. Hier soll evaluiert werden, ob durch eine entzündliche Schädigung die quantitative Menge dieser Proteine sinkt, und inwieweit Dexmedetomidin dies beeinflusst. Außerdem wird das *tight junction* Protein ZO-1 angefärbt und die Expression nach TNF α - und IFN γ -Substitution bzw. nach Applikation von Dexmedetomidin beurteilt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die experimentellen Arbeiten erfolgten in den Räumlichkeiten der Experimentellen Anästhesiologie der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. In den nachfolgenden Tabellen 2.1 – 2.6 sind verwendete Laborgeräte, Materialien und Softwares aufgelistet.

Die verwendete Caco-2 Zelllinie stammt aus einer freundlichen Überlassung des Leibniz-Instituts für umweltmedizinische Forschung Düsseldorf. 21 Tage ausdifferenzierte Caco-2 Zellen mit Passagennummern 24 – 32 wurden in die Experimente eingeschlossen.

2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Handelsname	Hersteller	Firmensitz
Brutschrank, groß	CO ₂ -Inkubator Modell CB210	Binder	Tuttlingen, D
Brutschrank, klein	CO ₂ -Inkubator Modell CB170	Binder	Tuttlingen, D
Brutschrank, unsteril	CO ₂ -Inkubator Modell BD23	Binder	Tuttlingen, D
Sterilbank	HeraSafe® KS15	Heraeus	Hanau, D
Wasserbad	Wasserbad WNE14	Memmert GmbH & Co KG	Schwabach, D
Inversmikroskop	Motic AE30	Motic Europe S.L.V.	Barcelona, S
Autoklave	Horizontalautoklav 2540 EL	Systec GmbH	Linden, D
Trockenschrank	Wärmeschrank T6120	Heraeus	Hanau, D
Eismaschine	Modell RF0244A	Manitowoc Ice	Manitowoc, <i>United States</i>

			<i>of America (USA)</i>
Vortexmischer	Vortex – Genie 1	Scientific Industries Inc.	Bohemia, USA
Zentrifuge, groß	Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & CoKG	Tuttlingen, D
Zentrifuge, klein	Centrifuge 5412R	Eppendorf AG	Hamburg, D
Zählkammer nach Neubauer	Zählkammer Neubauer Improved	Assistent®, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & CoKG	Sondheim vor der Röhn, D
Epithelwiderstand-Messkammer	Endohm-12G	World Precision Instruments Ltd.	Hitchin, GB
Epithelwiderstand-Messgerät	Evom2	World Precision Instruments Ltd.	Hitchin, GB
Plate Reader	Synergy2 Multi-Detection Microplate Reader	BioTek Instruments Inc.	Winooski, USA
Geldokumentationsgerät	CoolSnap HQ2	Teledyne Photometrics	Tucson, USA
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, D
2-D Gelelektrophorese Equipment		BioRad Laboratories	Hercules, USA
Thermocycler	ThermoMixer® C	Eppendorf AG	Hamburg, D
Schüttler, groß	GFL Schüttler 3011	Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, D
Schüttler, klein	MTS 2/4 digital Mikrotiterschüttler	IKA Werke GmbH & Co. KG	Staufen im Breisgau, D

Immunhistochemie- Mikroskop	Leica DMLB Mikroskop mit Leica DFC420C Kamera und Osram HBO 103W/2 Fluoreszenzlampe	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, D
		Osram Licht AG	München, D

Tabelle 2.1: **Verwendete Laborgeräte**

2.1.2 Zellkulturmaterialien

Material	Handelsname	Firma	Firmensitz	Serien-Nr.
Zellkulturflasche	Zellkulturflasche T-75 (Oberfläche Standard)	Sarstedt	Nümbrecht, D	83.3911.002
Zellkulturflasche	Zellkulturflasche T-175 (Oberfläche Standard)	Sarstedt	Nümbrecht, D	83.3912.002
96 Well Platte	Zellkulturplatte 96 Well	Sarstedt	Nümbrecht, D	83.3924
12 Well Platte	Zellkulturplatte	Sarstedt	Nümbrecht, D	83.3921
Inserts	Inserts 12 Well, PET, Porengröße 0,4 µm, TL, transluzent	Sarstedt	Nümbrecht, D	83.3931.040
Petrischale	Zellkultur Schale, PS, 100/20 MM, Cellstar® TC	Greiner Bio-One	Kremsmünster , AU	664160
Chamberslides	Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	177402
Falcon	15ml Tube, 120x17mm, PP	Sarstedt	Nümbrecht, D	62.554.502
Falcon	50ml Tube, 114x28mm, PP	Sarstedt	Nümbrecht, D	62.547.254

Eppendorf Reaktionsgefäß	Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt	Nümbrecht, D	72.690.001
Eppendorf Reaktionsgefäß	Safe Seal Gefäß 1,5ml	Sarstedt	Nümbrecht, D	72.706
Eppendorf Reaktionsgefäß	Safe Seal Gefäß 2ml	Sarstedt	Nümbrecht, D	72.695.500
Biofilter	Filtermax Filteraufsatz 250ml	TPP Techo Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz	9925
Absaugspitzen	Pasteurpipette (Glas)	Brand	Wertheim, D	747720
Stripette	25ml Stripette	Corning Inc.	Corning, USA	4489
Stripette	10ml Stripette	Corning Inc.	Corning, USA	4488
Stripette	5ml Stripette	Corning Inc.	Corning, USA	4487
Reagenzreservoir	Reagenzreservoir Tip-Tub	Eppendorf AG	Hamburg, D	0030058.607
Pipettenspitze	Biosphere®Filtertips 20-200µl	Sarstedt	Nümbrecht, D	70.760.211
Pipettenspitze	Biosphere®Filtertips 1250µl extra long	Sarstedt	Nümbrecht, D	70.1186.210
Pipetten (1000µl, 200µl, 100µl)	Eppendorf Research	Eppendorf	Hamburg, D	
Handschuhe	Vasco® Nitril ocean-blue	B. Braun	Melsangen, D	8208005

Tabelle 2.2: **Verwendete Zellkulturverbrauchsmaterialien**

2.1.3 Chemikalien

Substanz	Bezeichnung	Firma	Firmensitz
Dexmedetomidin	Dexmedetomidin Ever Valinject 100µl/ml	Ever Pharma GmbH	Unterach, Österreich
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha human (SRP3177)	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
IFNγ	Interferon gamma (SRP3058)	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
Trehalose	D-(+)-Trehalose Dihydrat	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
Triton	Triton™ X-100	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
Steriles Wasser	Ampuwa	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg, D
Aqua Care	Akasolv Aqua Care	Akadia Chemie	Plankstadt, D
Minimum Essential Medium, flüssig	Minimum Essential Medium Eagle (M5650)	Sigma- Aldrich	St.Louis, USA
Minimum Essential Medium, Pulver	Minimum Essential Medium Eagle (M3024)	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Trypsin	Trypsin-EDTA (0,05%)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Glutamax	200 mM L-Alanyl-L-Glutamin- Dipeptid	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & CoKG	Karlsruhe, D
FCS	Fetal Bovine Serum (Origin: Brazil)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Pen/Strep	PenicillinG/Streptomycin	VWR Chemicals	Radnor, USA
Ethanol 99,5%			
Kollagen	Collagen, Typ I solution from rat tail	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
XTT Salz	XTT Sodium Salt BioChemica	PanReac AppliChem ITW Reagents	Darmstadt, D
PMS	Phenazine Mehosulfat	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Tris Pufferan® (Sigma 7-9 pH)	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Carl-Roth GmbH&CoKG	Karlsruhe, D
HCl (37%)	Salzsäure	Merck KGaA	Darmstadt, D
NaOH	Natriumhydroxid	Carl-Roth GmbH&CoKG	Karlsruhe, D
NaCl	Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH&CoKG	Karlsruhe, D
SDS	Natriumdodecylsulfat	Merck-Schuchardt OHG	Hohenbrun, D
Natrium-Desoxycholat		Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

Nonidet® P40	Nonylphenylpolyethylen Glycol	Fluka Chemie GmbH	Steinheim, D
cOmplete™	Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, D
Na-EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Tetranatriumsalz Dihydrat	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natriumsalz	Merck KGaA	Darmstadt, D
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	BCA Reagent A, BCA Reagent B, Albumin Standard Ampules	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
2-Mercaptoethanol		Fluka Chemie GmbH	Steinheim, D
APS	Ammoniumperoxidsulfat	Carl-Roth GmbH&CoKG	Karlsruhe, D
Rothiphorese® Gel 30 (37,5:1)	AcrylamidstammLösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1	Carl-Roth GmbH&CoKG	Karlsruhe, D
Temed	Temed >99% p.a., C ₆ H ₁₆ N ₂	Carl-Roth GmbH&CoKG	Karlsruhe, D
Glycin Pufferan®	Glycin Pufferan® >99% p.a., C ₂ H ₅ NO ₂	Carl-Roth GmbH&CoKG	Karlsruhe, D
Milchpulver	Magermilchpulver, Blotto Reagenz	Carl-Roth GmbH&CoKG	Karlsruhe, D
Tween® 80 (Polysorbat)	Polyoxyethylensorbitanmonool eat	Merck-Schuchardt OHG	Hohenbrunn , D
BSA	Albumin aus Rinderserum >96% (Agarose Gel Elektrophorese)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

PageRuler™ Plus Marker	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Clarity™ Western ECL Substrat	Clarity™ Western Peroxid Reagenz und Clarity™ Western Luminol/Enhancer Reagenz	BioRad Laboratories	Hercules, USA
Saponin		Carl-Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe, D
Ziegen Serum	Goat Serum G9023	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
PFA	Paraformaldehyd	Merck KGaA	Darmstadt, D
Pro Long Gold Antifade	ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI	ThermoFisher Scientific	Waltham, USA
Flüssiger Stickstoff		Linde	Duisburg, D

Tabelle 2.3: **Verwendete Chemikalien**

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Spezies	Isotyp	Firma	Firmensitz	Serien-Nr.
Occludin	Maus	Immunglobulin G1 (IgG1), kappa	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	33-1500
Claudin-5	Maus	IgG1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	35-2500
β-Aktin	Maus	IgG2b	Cell Signaling Technology	Danvers, USA	3700
Goat-Anti-Mouse-HRP Conjugat	Ziege	IgG	BioRad Laboratories	Hercules, USA	1706516

Zonula occludin-1	Kaninchen	IgG	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	61-7300
Cy3-conjugated Goat Anti-Rabbit	Ziege	IgG	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd	Ely, UK	111-165-144

Tabelle 2.4: **Verwendete Antikörper** für Western Blot und immunhistochemische Färbung

2.1.5 Sonstiges

Substanz	Bezeichnung	Firma	Firmensitz
Western Blot Membran	Immobilon®-P Transfer Membran	Merck Millipore Ltd.	Billerica, USA

Tabelle 2.5: **Sonstige verwendete Materialien**

2.1.6 Software

Anwendung	Software	Firma	Firmensitz
Extinktionmessung	Gen 5 1.11	BioTek	Winooski, USA
Detektion Western Blot	Gel-Pro Analyzer	Media Cybernetics, Inc.	Rockville, USA
Auswertung Western Blot	Gimp	The Gimp Team	
	Image Studio Lite	LI-COR Biosciences - GmbH	Lincoln, USA
Statistische Auswertung	Microsoft Excel	Microsoft	Redmond, USA
	GraphPad Prism	Graphpad	La Jolla, USA
Übersetzung	DeepL	DeepL SE	Köln, D
Detektion Immunhistochemie	LAS X	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, D

Tabelle 2.6: **Verwendete Software**

2.2 Methoden

2.2.1 Caco-2 Zelllinie

Die Caco-2 Zelllinie ist ein gängiges Modell u.a. zur Untersuchung von intestinalen passiven transzellulären und parazellulären Absorptionsmechanismen [95, 96]. Sie wurde 1970 aus einem kolorektalen Adenokarzinom etabliert und bildet in vielen experimentellen Bereichen die humane intestinale Epithelbarriere nach [97]. Unter Zellkulturbedingungen differenzieren Caco-2 Zellen nach 21 Tagen zu einem konfluierenden *Monolayer* aus polar aufgebauten Zellen aus, welche apikal mit einem Bürstensaum aus Mikrovilli besetzt sind und durch *tight junctions* verbunden sind. Zudem wird ein Großteil der intestinalen Transportproteine und Enzyme exprimiert, sodass sowohl parazelluläre als auch transzelluläre Transportwege modelliert werden. Das Zellmodell bildet vor allem physiologische, passive Transportmechanismen im Jejunum nach [96, 98]. Im Gegensatz zum menschlichen Darmepithel exprimieren Caco-2 Zellen kein Cytochrom P450 3A4, werden somit nicht durch medikamentöse CYP3A4-Induktoren und Inhibitoren reguliert und können keine Arzneimittel über dieses Enzym metabolisieren [98, 99].

2.2.2 Zellkultur

Die Stammkultur der Caco-2 Zelllinie wurde in einem Nährmedium, bestehend aus Minimum Essential Medium Eagle (M6550), fetales bovines Serum (FCS), Glutamax und Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), kultiviert, welches 3x wöchentlich gewechselt wurde. Für photometrische Untersuchungen wurde zeitweise farbloses Nährmedium, bestehend aus Minimum Essential Medium Eagle (M3024), Natriumhydrogencarbonat, sterilisiertem Wasser, FCS, Glutamax und Pen/Strep, eingesetzt. Zur Subkultivierung wurde die Zellpopulation zweimal mit *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS) gewaschen und anschließend mit 0,05% Trypsin für ca. 6 min behandelt. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte lichtmikroskopisch mittels Neubauer-Kammer.

Für die verschiedenen Versuche wurden die Zellpopulationen in verschiedenen Zellkulturgefäßen kultiviert, die in Tabelle 2.7 aufgeführt sind.

Zellkulturgefäß	Zellen	Flächengröße	Medium	Zweck
96-Well Platte	1x10 ⁴ Zellen	Je 0,29 cm ²	200 µl	XTT-Test
12-Well Platte mit Inserts	2x10 ⁵ Zellen	Je 1,1 cm ² Insertfilter	500 µl apikal und 1500 µl basal der Insertfilter	TEER-Versuch
Chamberslides	5x10 ⁴ Zellen	Je 0,7 cm ²	300 µl	Immunhistochemie

Tabelle 2.7: **Übersicht Zellpopulationen in verschiedenen Zellkulturgefäßen**, cm² = Quadratzentimeter, µl = Mikroliter

Die Inkubation erfolgte bei 36° Celsius und 5% CO₂- Konzentration. Insertfilter und Chamberslides wurden vor Besiedlung mit Zellen mit Essigsäure (0,02 M) und Kollagen Typ I im Verhältnis 1:25 für 3 h kollagenisiert.

2.2.3 Dexmedetomidin Behandlungsschemata

In dieser Dissertation wird ein periinflammatorisches Behandlungsschema untersucht. Dabei unterscheiden sich die Zeitpunkte der Dexmedetomidin-Gabe und der Zeitpunkt der experimentellen Inflammation, welche mittels den Entzündungsmediatoren TNFα und IFNγ induziert wurde. Die zu untersuchenden Zellen wurden zu Beginn 24 h mit Dexmedetomidin inkubiert und daraufhin weitere 24 h mit Dexmedetomidin, TNFα und IFNγ behandelt. Abbildung 2.1 (Abb. 2.1.) stellt diese zeitliche Abfolge schematisch dar.

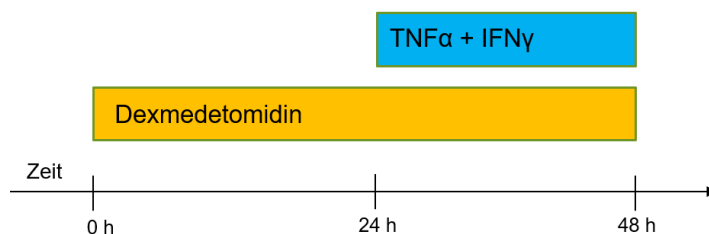


Abb. 2.1: **Behandlungsschema Dexmedetomidin:** 21 Tage ausdifferenzierte Caco-2 Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 h mit Dexmedetomidin 5 nM, 50 nM, 100 nM oder 1000 nM inkubiert. TNFα 2,5 ng/ml und IFNγ 10 ng/ml induzierten eine Inflammation über 24 h.

Dexmedetomidin wurde in dieser Dissertationsarbeit in folgender Konzentrationsreihe untersucht: 5 nM, 50 nM, 100 nM und 1000 nM. Die Konzentration von 5 nM entspricht dabei am ehesten einer klinisch relevanten Dosierung, welche von ca. 1-10 nM ($\cong$ 0,3 – 2 ng/ml) im Blutplasma reicht [76]. TNF α und IFN γ dienten als Inflammationsmodell, dazu wurde eine Kombination aus TNF α 2,5 ng/ml und IFN γ 10 ng/ml gewählt. Beide Chemikalien wurden als Stabilisatoren 0,05% Trehalose und 0,002% bovines Serumalbumin (BSA) zugesetzt. Die Mediumkontrolle besteht aus farblosem Caco-2 Medium, DPBS 2%, BSA 0,002%, Trehalose 0,05%. Es ergeben sich somit sechs Versuchsgruppen: eine Mediumkontrollgruppe, eine Inflammationskontrollgruppe mit TNF α 2,5 ng/ml + IFN γ 10 ng/ml und Gruppen für Dexmedetomidin 5 nM, 50 nM, 100 nM und 1000 nM jeweils in Kombination mit TNF α 2,5 ng/ml + IFN γ 10 ng/ml.

2.2.4 Zellviabilitätsnachweis mittels XTT-Test

Der XTT-Test ermittelt die Zellviabilität durch den Nachweis von mitochondrialen Dehydrogenasen und erlaubt somit auch Aussagen zur Zytotoxizität [100]. Dehydrogenasen vitaler Zellen reduzieren XTT-Salz zu farbigem Formazan (orange-rot), dabei dient PMS als Elektronenüberträger. Der spektrophotometrische Nachweis dieser Reaktion gelingt bei 450-500 Nanometer (nm). Die Intensität des Farbstoffes ist proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen [101].

Für den Versuch wurden 96-Well-Platten verwendet, von denen 44 Wells mit Caco-2 Zellen besetzt wurden. Nach 21 Tagen der Inkubation im Brutschrank begann die periinflammatorische Behandlung der Caco-2-Zellen mit 200 μ l der einzelnen Testkomponenten.

Nach Abtragung der Testkomponenten wurden pro Well 100 μ l farbloses Caco-2 Medium zusammen mit 50 μ l der XTT-Lösung, bestehend aus XTT Salz, farblosem Caco-2 Medium und PMS, für 90 Minuten inkubiert. Es folgte die photometrische Auswertung bei 450 nm im Plate Reader Photometer.

2.2.5 Transepitheliale Widerstandsmessung im TEER-Versuch

Zur transepithelialen Widerstandsmessung wurden Caco-2-Zellen auf einer Insertfiltermembran in einer 12-Well-Platte ausdifferenziert. Apikal der Insertfiltermembran befanden sich 500 μ l Nährmedium, basal der Membran befanden sich 1500 μ l Nährmedium (s. Abb. 2.2.). Die Testkomponenten wurden ausschließlich basal der Inserts appliziert. Zur Messung des transepithelialen Widerstands wurde das Insert in die Messkammer des EndOhm-Gerätes eingespannt, sodass sich je eine Messelektrode basal und apikal der Zellschicht befand. Mittels EVOM²-Gerät stellt sich ein elektrischer Widerstand ein. TEER-Messungen fanden nach 24 h und nach 48 h Behandlung mit den verschiedenen Testkomponenten statt.

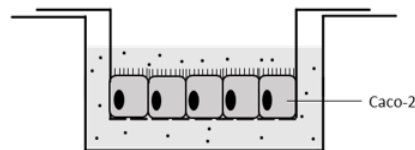


Abb. 2.2: **Übersicht eines Inserts mit Caco-2 Zellen in einem exemplarischen Well**

Aufgenommen in den Versuch wurden Inserts, die nach 21 Tagen Differenzierungszeit einen Widerstandswert $> 450 \Omega$ erreichten. Über die Differenzierungszeit fanden wöchentlich TEER-Messungen zur Wachstumskontrolle statt. Das Prinzip der transepithelialen Widerstandsmessung beruht auf den Grundlagen des Ohm'schen Gesetzes. Auf festgelegte Stromimpulse werden Spannungsausschläge gemessen, die in Widerstandswerte (Ohm) verrechnet werden [44].

2.2.6 Gewinnung von behandelten Caco-2 Zellen aus Inserts

Zur weiteren Analyse der behandelten Caco-2 Zellen wurden die Zellen aus den Inserts nach Beendigung der Widerstandsmessungen (siehe Kapitel 2.2.4) extrahiert. Dazu wurden die Testkomponenten der 12-Well-Platte auf Eis abpipettiert und die Inserts mit 500 μ l gekühltem DPBS befüllt. Die mittels Zellschaber gewonnenen Zellen wurden zentrifugiert (1 min, 4° Celsius, 20.000 rpm) und nach Verwerfen des Flüssigkeitsüberstands in flüssigem Stickstoff für ca. 10 min gefroren. Die weitere Lagerung fand bei -20° Celsius statt.

2.2.7 Ganzzellextraktion der Zellpellets und Proteinanalyse nach Pierce™

Zum Zellaufschluss wurden die gewonnenen Zellpellets mit 50 µl Lysepuffer (pH 8,0), bestehend aus Tris Pufferan®, Natriumchlorid, Natriumdesoxycholat, SDS, Nonidet® P40 und cOmplete™, für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 4° Celsius, 16.000 rpm). Es erfolgte eine Verdünnung des gewonnenen Lysat im Verhältnis 1:5 mit dem Lysepuffer.

Anschließend folgte eine Proteinanalyse nach Pierce™ zur photometrischen Bestimmung der Proteinmenge der Zelllysate. Die Analyse beruht auf der proteinvermittelten Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , welches mittels Bicinchoninsäure (BCA) detektiert wird. Dazu wurden 12,5 µl jeder Probe zusammen mit 200 µl BCA-Reagenz auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Unter Zuhilfenahme des Synergy2 Multi-Detection Microplate Readers, der Gen 5 1.11 Software und Microsoft Excel wurde die Proteinkonzentration errechnet. Die Proben wurden daraufhin mittels Lysepuffer auf die gleiche Proteinkonzentration bei einem Volumen von 40 µl eingestellt. Es folgte die Erhitzung des Ansatzes bei 95° Celsius für 5 min bei 550 rpm im Thermocycler mit 40 µl *Loading Buffer*, bestehend aus Tris Pufferan®, Natrium-EDTA, Glycerol, SDS, Bromphenolblau und Mercaptoethanol.

2.2.8 Western Blot Analyse von Occludin und Claudin-5

Mittels Western Blot-Analyse erfolgte ein semiquantitativer Nachweis der *tight junction* Proteine Occludin und Claudin-5 der behandelten Caco-2 Zellen. 15 µg der einzelnen Proben wurden in die Geltaschen eines 12%-igen SDS-Gels mit dem Marker PageRuler Plus pipettiert. Über 90 min wurden die Proteine mittels Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V im Gel entlang der Größe und Ladung aufgetrennt. Im kalten Transfer Puffer, bestehend aus Tris Pufferan® Glycin und destilliertem Wasser, folgte die Übertragung der Proteine auf die Polyvinylidendifluorid-Membran (90 min, 280 mA). Anschließend konnten die Proteine auf der Membran in 5% *Blocking Solution* aus Magermilchpulver und TBS-T fixiert werden. Nach Zugabe des Erst-Antikörpers Occludin (Thermo Fisher Scientific, 1:1000) bzw. Claudin-5 (Thermo Fisher Scientific, 1:1000) wurde die Membran über Nacht bei 4° Celsius inkubiert. Ein Zweit-Antikörper (Goat-Anti-Maus-IgG (BioRad Laboratories, 1:10000)) wurde nach dreimaligem Waschen mit TBS-T zur Beseitigung von ungebundenem Antikörper mit der Membran 2

h lang inkubiert. Mittels Clarity™ Western ECL-Substrat gelang der Nachweis der Proteine im Geldokumentationsgerät CoolSnap HQ2 mit der Gel-Pro Analyzer Software. Als *Housekeeper*-Kontrolle wurde β -Aktin detektiert.

Graphisch konnten die Aufnahmen mit den Bildbearbeitungssoftwares Gimp und Image Studio Lite zur Densitometrie-Analyse aufgearbeitet werden.

2.2.9 Nachweis vom Zonula occludens-1 Proteinen in der Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Färbung wurden Caco-2 Zellen in *Chamberslides* ausdifferenziert. Nach 48 h Inkubation mit den Testkomponenten erfolgte eine zweimalige Waschung mit *phosphate-buffered saline* (PBS) für 10 min. Nach Fixierung mit in Phosphat gepuffertem 4%-igem Paraformaldehyd wurden die Zellen erneut dreimal für 10 min mit PBS gespült. Die *Chamberslides* wurden 1 h lang mit 10 % Ziegenserum, verdünnt in PBS und Saponin, blockiert. Die Inkubation bei 4° Celsius über Nacht erfolgte mit 200 μ l des Primärantikörpers (polyklonaler ZO-1 Antikörper (Thermo Fisher Scientific, 1:100)), verdünnt in PBS und Saponin. Nach dreimaliger 10-minütiger Waschung mit PBS und Saponin wurden die Proben für 2 h lichtgeschützt in einer PBS/Saponin-Lösung mit dem Zweitantikörper (Indocarbocyanin-konjugierten Anti-Rabbit Antikörper (Dianova, 1:400)) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS und Saponin folgten das Auftragen des Deckmittels Pro Lang Gold Antifade mit dem DNA Färbemittel 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und das Eindecken mit Deckgläsern.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte mit der Software LAS-X die fluoreszenzmarkierten Zonula occludens-1-Proteine dargestellt werden. Der mit Indocarbocyanin-konjugierte Zweitantikörper färbt orangerot und hat ein Emissionsmaximum bei 570 nm. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Emissionsmaximum: 461 nm) färbt DNA blau, und wurde genutzt, um Zellkerne darzustellen.

2.2.10 Statistische Auswertung

Die Datenerfassung wurde mit Windows Excel vorgenommen. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit SPSS und Windows Excel. Als statistische Tests wurden der Shapiro-Wilk Test zur Normalverteilung, die ANOVA-Analyse und die Šidák-Korrektur

verwendet. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Graphische Auswertungen erfolgten mit der Software GraphPadPrism 10.

3 Ergebnisse

3.1 XTT-Analyse

Der XTT-Versuch dient dem Nachweis der Zellviabilität der behandelten Caco-2 Zellen. Dazu wurden die photometrischen Daten der Mediumkontrollgruppe als 100% genormt und die restlichen Versuchsgruppen in Relation dazu betrachtet (s. Abb. 3.1). Die verschiedenen Konzentrationen von Dexmedetomidin (Dex) weisen alleine (A) und in Kombination mit einem inflammatorischen Stimulus (B) keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Diese Ergebnisse wurden bereits in einem *Abstract* eines Supplement von „Anästhesiologie und Intensivmedizin“ publiziert [102].

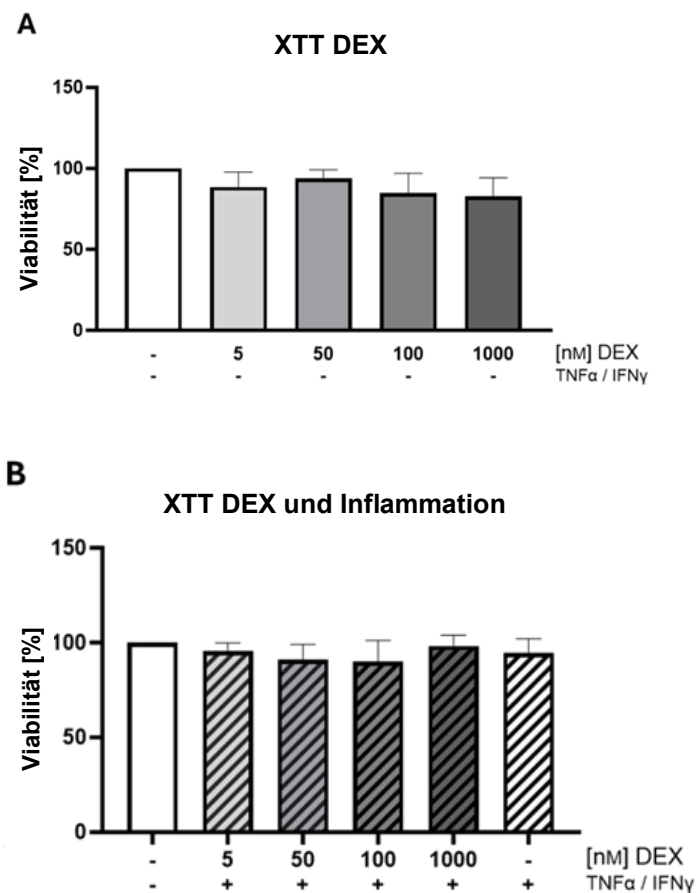


Abb. 3.1: **Relative Zellviabilität von Caco-2 Zellen unter Behandlung mit Dexmedetomidin und Zytokinen.** A: Viabilitätsänderungen nach 24 h Inkubation mit Dexmedetomidin. B: Viabilitätsänderungen nach 48 h Inkubation mit Dexmedetomidin und 24 h Inkubation mit TNFα und IFNγ. Kontrolle (keine Behandlung -/-); Dexmedetomidin Behandlung (5, 50, 100, 1000 nM); Inflammatorischer Stimulus (2,5 ng/ml TNFα + 10 ng/ml IFNγ); -/+). Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 3. Abk.: DEX = Dexmedetomidin, nM = Nanomolar, % = Prozent, TNFα / IFNγ = 2,5 ng/ml Tumornekrosefaktor α / 10 ng/ml Interferon γ.

3.2 Transepitheliale elektrische Widerstandsmessung von Caco-2 Zellen

Der elektrische Widerstand der 21 Tage ausdifferenzierten Caco-2 Zellen der Mediumkontrollgruppe wurde als 100% genormt, und die TEER-Messungen nach 24 h und 48 h Inkubation mit Testkomponenten in Relation dazu betrachtet. Ohne den Einfluss der Zytokine weisen die Versuchsgruppen nach 24 h Inkubation mit Dexmedetomidin gleiche Widerstandswerte wie die Mediumkontrollgruppe auf (s. Abb. 3.2 A). Nach zusätzlicher 24 h Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ sinkt der Widerstand der Inflammationsgruppe mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ um ca. 15% ($84,1\% \pm 6,1$) verglichen mit der Kontrollgruppe ($99,6\% \pm 6,6$) [102]. In Kombination der Inflammation mit Dexmedetomidin liegen alle Dexmedetomidingruppen signifikant unter der Kontrollgruppe und weisen ähnliche Widerstandswerte wie die Inflammationskontrollgruppe auf (s. Abb. 3.2 B, $p < 0,05$). Diese Daten wurden ebenfalls im selbigen *Abstract* bereits publiziert [102].

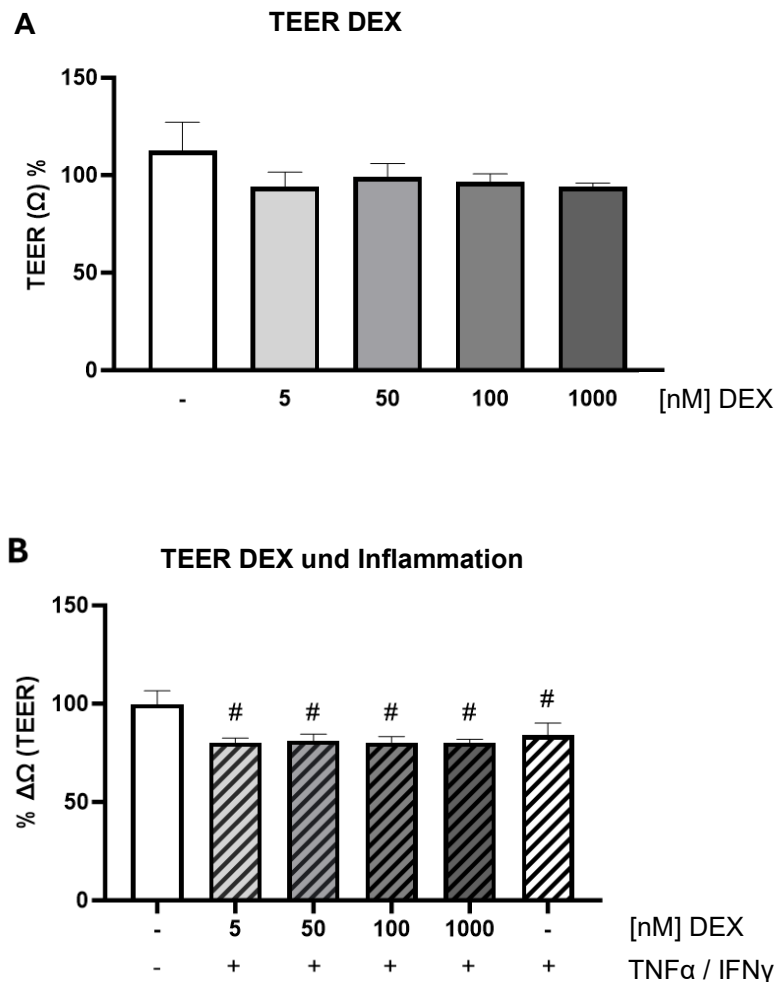


Abb. 3.2: **Transepitheliale elektrische Widerstandsmessung von Caco-2 Zellen unter Behandlung mit Dexmedetomidin und Zytokinen.** A: Relative TEER Werte nach 24 h Inkubation mit Dexmedetomidin, B: Relative TEER Werte nach 48 h Inkubation mit Dexmedetomidin und 24 h Inkubation mit TNFα und IFNγ. Kontrolle (keine Behandlung -/-); Dexmedetomidin Behandlung (5, 50, 100, 1000 nM); Inflammatorischer Stimulus (2,5 ng/ml TNFα + 10 ng/ml IFNγ; -/+). Mittelwert +/- Standardabweichung, n = 3, # = p < 0,05 zu Kontrollgruppe. Abk.: DEX = Dexmedetomidin, nM = Nanomolar, Ω = Ohm, ΔΩ = relative Widerstandsänderung, % = Prozent, TNFα / IFNγ = 2,5 ng/ml Tumornekrosefaktor α / 10 ng/ml Interferon γ

3.3 Western Blot Analyse der *tight junction* Proteine Occludin und Claudin-5

In der graphischen Analyse der Occludin Banden bei 65kD eines exemplarischen abgebildeten Western Blots (s. Abb. 3.3 A) weisen die Banden bei allen Versuchsgruppen ein ähnliches Muster auf. Jeweils eine Versuchsgruppe wurde im

technischen Duplikat nebeneinander geblottet. Ähnliches gilt für die Claudin-5 Banden bei 23kD (s. Abb. 3.3). Die Bandenbreiten weisen hier stärkere Abweichungen auf. Occludin und Claudin-5 können in allen Versuchsgruppen (Mediumkontrolle, Dex-Konzentrationen, Inflammationskontrolle) in einem ähnlichen Verhältnis nachgewiesen werden.

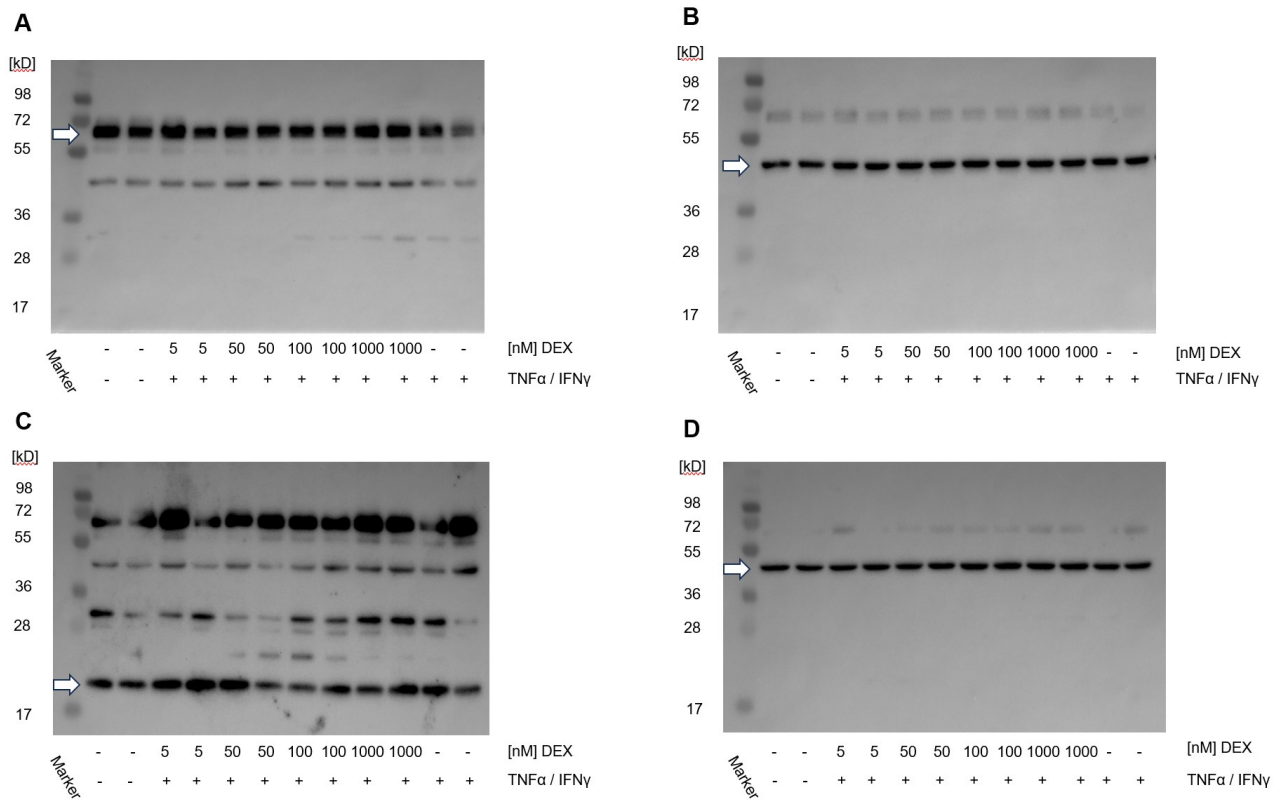


Abb. 3.3: Western Blot Analysen von Occludin (A) und Claudin-5 (C) mit dem housekeeper β -Aktin (B, D). A: Detektion von Occludin über 15 Sekunden, 1:1000 verdünnt, B: Detektion von β -Aktin über 2 Sekunden, 1:15000 verdünnt. C: Detektion von Claudin-5 über 45 Sekunden, 1:1000 verdünnt, D: Detektion von β -Aktin über 2 Sekunden, 1:15000 verdünnt. Kontrolle (keine Behandlung -/-); Dexmedetomidin Behandlung (5, 50, 100, 1000 nM); Inflammatorischer Stimulus (2,5 ng/ml TNF α + 10 ng/ml IFN γ); -/+). Abk.: DEX = Dexmedetomidin, kD = KiloDalton, nM = Nanomolar, TNF α / IFN γ = 2,5 ng/ml Tumornekrosefaktor α / 10 ng/ml Interferon γ .

Die Betrachtung der Densitometriesignale in Relation zum *housekeeper* β -Aktin, auch Normalisierungsfaktor genannt, zeigt normalverteilte Daten der einzelnen Versuchsgruppen (s. Abb. 3.4, Shapiro-Wilk-Test, $p < 0,05$). Eine einfaktorielle ANOVA Analyse zu $p < 0,05$ untersucht, ob es Unterschiede des Normalisierungsfaktors für Occludin und Claudin-5 abhängig von den Behandlungsgruppen mit Dexmedetomidin, TNF α und IFN γ gab. Die Proteinexpression von Occludin und Claudin-5 unterscheidet

sich dahingehend nicht statistisch signifikant für die verschiedenen Behandlungsgruppen.

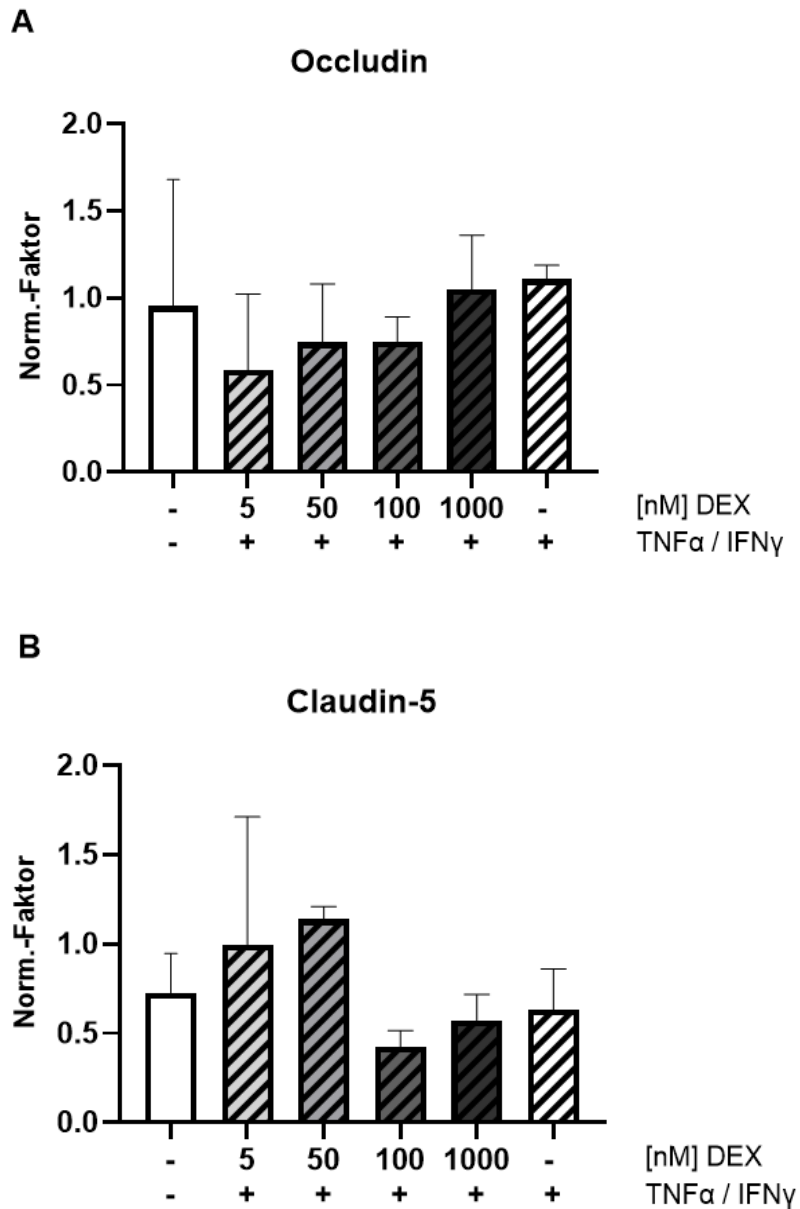
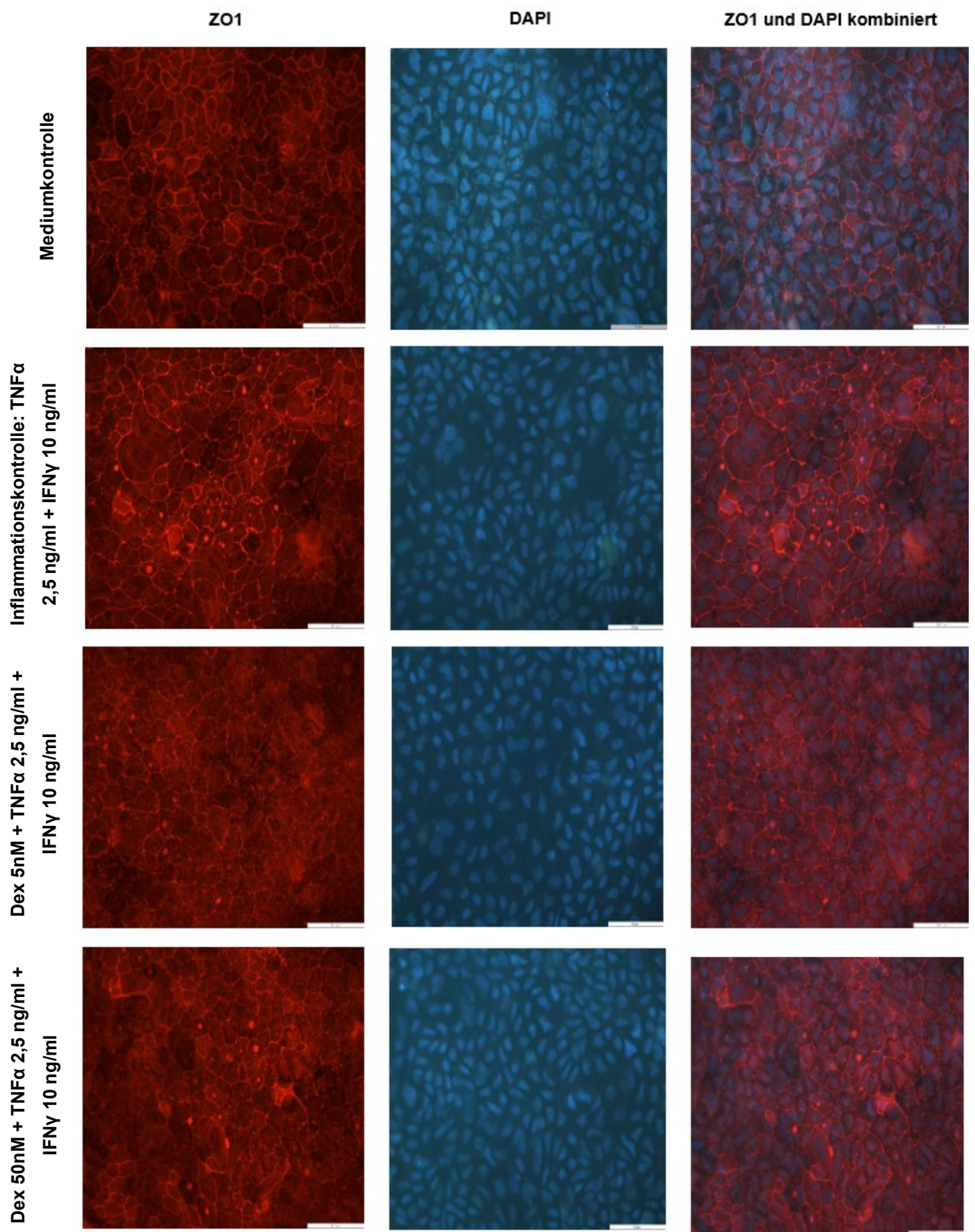


Abb. 3.4: **Normalisierungsfaktor der Western Blot Analysen von Occludin (A) und Claudin-5 (B).** Normalisierungsfaktor aus Densitometriesignale der Western Blot Analysen von Occludin oder Claudin-5 / housekeeper β -Aktin. Kontrolle (keine Behandlung -/-); Dexmedetomidin Behandlung (5, 50, 100, 1000 nM); Inflammatorisches Stimulus (2,5 ng/ml TNF α + 10 ng/ml IFN γ); -/+). Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, $n = 3$. Abk.: DEX = Dexmedetomidin, nM = Nanomolar, TNF α / IFN γ = 2,5 ng/ml Tumornekrosefaktor α / 10 ng/ml Interferon γ .

3.4 Immunhistochemische Färbung und Nachweis des *tight junction* Proteins Zonula occludens-1

In der mikroskopischen Auswertung des immunhistochemisch angefärbten Proteins ZO-1 (orange-rot) ist zu erkennen, dass dieses in der Mediumkontrolle randständig an den Zellmembranen in Form eines dünnen Saums angefärbt wird (s. Abb. 3.5). Im Unterschied hierzu sind in der Inflammationsprobe vesikelartige, intrazelluläre Anhäufungen von ZO-1 zu verorten. Diese Proteinansammlungen sind nicht in der Mediumkontrolle zu finden. Zellen, die kombiniert mit Inflammation und Dexmedetomidin behandelt wurden, weisen ebenfalls in allen Konzentrationsreihen entsprechend angefärbte intrazelluläre Vesikel auf und ähneln damit der Inflammationskontrolle. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte rein qualitativ.



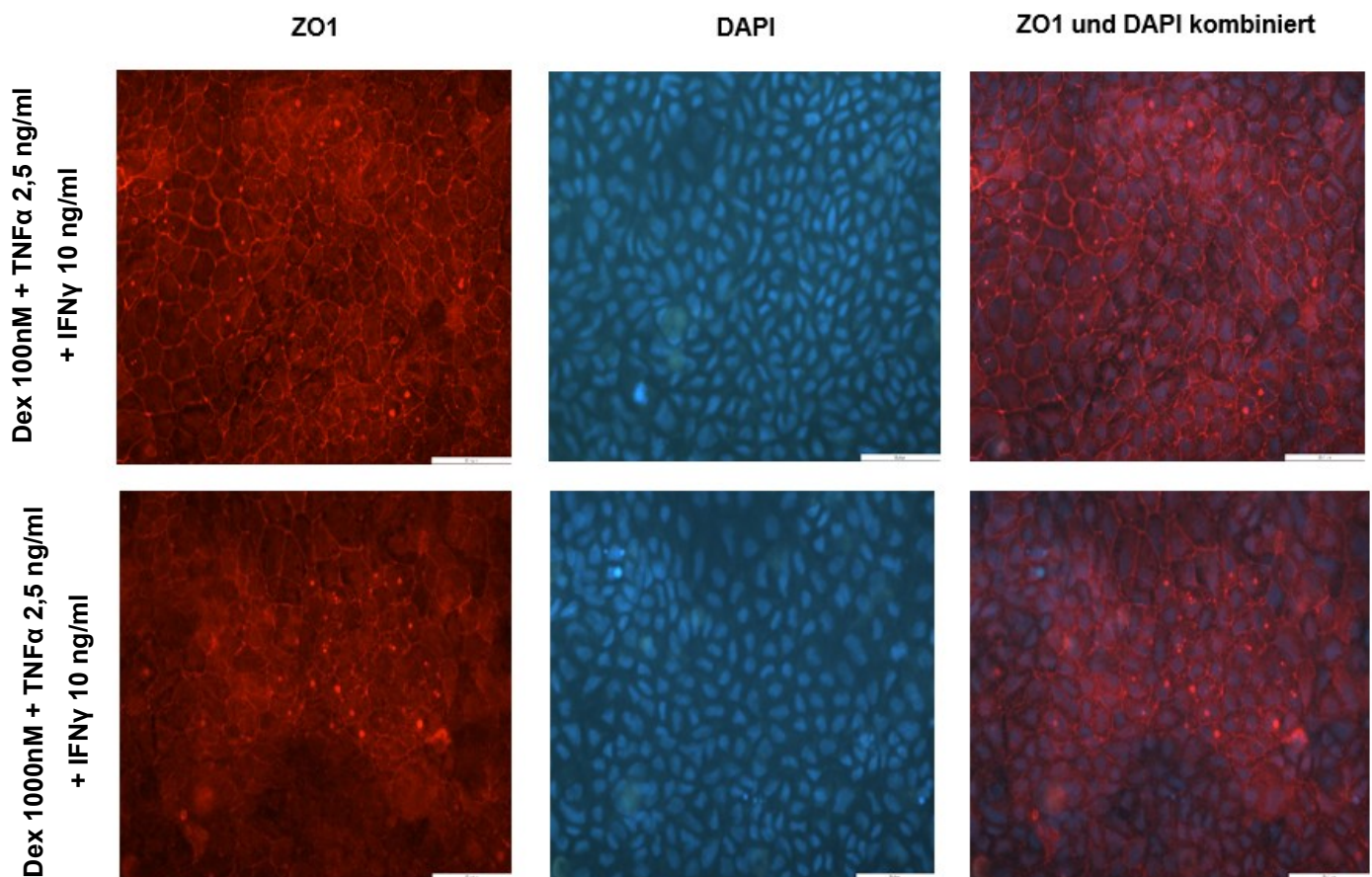


Abb. 3.5: Immunhistochemische Darstellung in 400-facher Vergrößerung von ZO-1 und DAPI bei Dexmedetomidin und Zytokinen behandelten Caco-2 Zellen. Maßstab 153 : 1. Abk.: Dex = Dexmedetomidin; ZO1 = Zonula occludens-1; DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole; nM= Nanomolar; ng = Nanogramm; ml = Milliliter. Unter proinflammatorischem Einfluss von TNF α und IFN γ verlagert sich ZO-1 in intrazelluläre, vesikelartige Anhäufungen. Dies ist ebenso in Kombination mit Dexmedetomidin vorzufinden.

4 Diskussion

4.1 Das intestinale Epithel als Forschungsgegenstand

Die *World Health Organisation* erklärte in ihrem „*Global Report on the epidemiology and burden of sepsis*“ von 2020 die Sepsis als erhebliche globale Gesundheitsbedrohung mit hoher Inzidenz und Mortalität. Demnach stand jeder fünfte Todesfall 2017 in Verbindung mit der Diagnose Sepsis. Die Mehrheit dieser Todesfälle sei durch Verbesserungen in der Prävention, Früherkennung und Therapie der Sepsis vermeidbar. Ein besseres Verständnis von Pathomechanismen und Abbau von Wissenslücken scheint daher essentiell [103]. In diesem Kontext liegt ein besonderes Forschungsinteresse auf der Rolle des Gastrointestinaltraktes, unter anderem seitdem gezeigt wurde, dass intestinale Funktionsstörungen mit erhöhter Mortalität bei Intensivpatienten assoziiert sind [104].

Der Verdauungstrakt nimmt somit als Organ mit großer Austauschfläche zur Außenwelt und hoher bakterieller Besiedlungsdichte eine herausgestellte Rolle ein. Die therapeutische Reduzierung inflammatorischer, gastrointestinaler Schäden ist im Rahmen diverser Krankheitsbilder von Interesse. Dong et al. zeigten an Mäusen mit *Dextran-Sodium-Sulfat*-induzierter Kolitis, dass die orale Substitution des Monosaccharids Mannose epitheliale Kolonschäden reduziert, und insbesondere die *tight junction* Dysfunktion aufhebt. Dieser Effekt wurde durch die Kombination mit dem Immunmodulator Mesalazin potenziert [105]. An Caco-2 Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Substitution der Aminosäure Glutamin protektive Eigenschaften besitzt und die *tight junction* Proteine Occludin und ZO-1 vermehrt exprimiert werden [106]. Für den bereits im klinischen Kontext eingesetzten $\alpha 2$ -Agonisten Dexmedetomidin konnten bereits immunmodulatorische Effekte nachgewiesen werden, inwiefern diese sich auf die inflammativ geschädigte, intestinale Barriere übertragen, ist Gegenstand dieser Arbeit.

Dexmedetomidin wurde in dieser Arbeit in den Dosierungen 5, 50, 100 und 1000 nM untersucht, was sowohl klinische als auch deutlich darüber liegende Konzentrationen abbildet. Die hier genutzten Konzentrationen wurden an im Blutplasma von Patienten nachgewiesenen Konzentrationen (1 – 10 nM Dexmedetomidin) [76] und an andere Zellkulturmodelle, in denen bereits antiinflammatorische Effekte von Dexmedetomidin beobachtet wurden, angelehnt [107, 108].

4.2 Einfluss von Dexmedetomidin auf die inflammativ veränderte, intestinale Barriere

Die intestinale Permeabilität ist einer der wichtigsten Indikatoren einer intakten Darmbarriere. Die Ergebnisse der transepithelialen Widerstandsmessungen zeigen, dass die intestinale Barriere unter Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ eine Widerstandsverringerung von ca. 15% aufweist, welche nicht durch eine signifikante Minderung der Zellviabilität in den XTT Versuchen verursacht ist. Unter Dexmedetomidin konnte keine signifikante Widerstandssteigerung dieser Hyperpermeabilität beobachtet werden, sodass mittels des hier durchgeführten Versuchsansatzes keine Dexmedetomidin-vermittelte, epitheliale Protektion nachgewiesen werden kann.

Dies ist insofern bemerkenswert, als Dexmedetomidin die endotheliale Hyperpermeabilität an anderen Organen verringern kann [91, 109]. Chen et al. zeigten im Mausmodell, dass sich eine pulmonale, mikrovaskuläre Hyperpermeabilität durch renale Ischämie/Reperfusionsschäden nach Behandlung mit Dexmedetomidin (einmalig 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intraperitoneal) um bis zu 26% verringert [109]. Vermutet wird eine protektive Wirkung von Dexmedetomidin über Modulation der Tyrosinkinase 2 [109]. Eine weitere Studie von Mei, Li und Zuo beschrieb, dass bei septischen Mäusen, die mittels Caekumligatur und -punktion geschädigt wurden, eine Hyperpermeabilität über der Blut-Hirn-Schranke bestand. Diese konnte mittels Dexmedetomidin über die Aktivierung von zentralen $\alpha 2$ -Adrenorezeptoren um 27% reduziert werden [91]. Dabei wurde die Permeabilität über die Blut-Hirn-Schranke mittels Dichtemessung einer Evans-Blau Färbung des Hippocampus gemessen und eine Dexmedetomidin Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intraperitoneal (dreimalige Gabe alle 2 h) gewählt [91]. Dass Dexmedetomidin ebenfalls die epitheliale Hyperpermeabilität verringern kann, zeigen die Ergebnisse von Qin et al. im Rattenmodell [92]. Eine erhöhte intestinale Permeabilität bei Verbrennungs-induzierter Sepsis konnte durch die Behandlung mit 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Dexmedetomidin intravenös reduziert werden. Die MLCK-Phosphorylierung via Dexmedetomidin schien dabei der entscheidende Wirkmechanismus zu sein. Die Studie ist jedoch lückenhaft in dem Bericht der Statistik, so wurde ein selbstgewählter Score zur histologischen Beurteilung gewählt. Die Interpretation ist damit eingeschränkt möglich. Die anschließende mikroskopische Betrachtung zeigte, dass die mit Dexmedetomidin-behandelte Gruppe weniger Schäden, wie etwa Epithelzellverlust, Entzündungszellinfiltration oder Nekrosen, aufwies [92]. Beim Verbrennungs-induzierten Sepsismodell an der Ratte ist die Sepsis sekundär durch ein Trauma ausgelöst und nicht primär durch eine Infektion. Der Goldstandard des Tiermodells ist deshalb das Caekumligatur-und-Punktions-Modell

[110]. Eine mechanische Störung der Darmbarriere durch thermischen Einfluss und variable Schweregrade der Sepsis können eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse in der Studie von Qin et al. zu den hier erhobenen Daten sein.

Die Darmbarriere besteht aus mechanischen, immunologischen und chemischen Komponenten. Die mechanische Barriere ist dabei zentraler Bestandteil und setzt sich aus Epithelzellen und interzellulären, adhäsiven *tight junction* Proteinkomplexen zusammen [92]. Die Daten der Western Blot Analyse zeigen, dass die quantitative Proteinexpression der *tight junction* Proteine Occludin und Claudin-5 durch die Substitution von TNF α , IFN γ und Dexmedetomidin nicht beeinflusst wird. In allen Versuchsgruppen werden die Proteine in gleicher Menge exprimiert. Die in den transepithelialen Widerstandsmessungen nachgewiesene, inflammative Hyperpermeabilität kann somit nicht auf Regulationsmechanismen in der quantitativen Proteinexpression von Occludin und Claudin-5 zurückgeführt werden. Die Ergebnisse aus den Western Blot Analysen und den transepithelialen Widerstandsmessungen können hier direkt miteinander korreliert werden, da die Western Blot Proben nach Abschluss der Widerstandsmessungen aus den gleichen Zellen generiert wurden.

Im Vergleich mit anderen Studien zeigt sich jedoch, dass in Tiermodellen die Expressionsmuster in Western Blot Analysen der beiden Proteine verringert sind [63, 92]. Die bereits zitierte Studie von Qin et al. an verbrennungsgeschädigten Ratten lieferte signifikant verringerte Proteinexpressionsmuster von ZO-1 und Occludin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Behandlung mit 5 $\mu\text{g/kg/h}$ Dexmedetomidin über 4 h bei gleichzeitiger Verbrennungsschädigung führte zu einer signifikanten Erhöhung der Proteinexpression der beiden Proteine gegenüber der Schädigungsgruppe [92]. Allerdings sind bei dieser Studie die intestinalen Schäden nicht durch eine primäre Inflammation ausgelöst worden, sondern durch Verbrennungen. Dass es dabei durch strukturelle Schädigungen der *tight junctions* zum Proteinverlust kam, ist denkbar.

In dieser Dissertationsarbeit wurden exemplarisch die beiden Proteine Occludin und Claudin-5 zur Untersuchung der Hyperpermeabilität gewählt. Dass der *tight junction* Komplex aus mehreren, hier nicht abgebildeten Proteinen besteht, ist in Kapitel 1.2.2 beschrieben. Die bedeutende Rolle von Occludin und Claudin-5 bei inflammativen Veränderungen der Darmbarriere konnte allerdings in diversen Studien belegt werden [43, 111, 112]. Yoseph et al. zeigten, dass bei septischen Mäusen lediglich Claudin-5 und Occludin verringert sind, hingegen war die Proteinmenge von Claudin-1, -3, -4, -7, -8, -13, -15 und ZO-1 gegenüber der Kontrollgruppe unverändert [63].

Zur weiteren Untersuchung der *tight junction* Komplexe in der intestinalen Barriere wurden immunhistochemische Färbungen des Proteins ZO-1 vorgenommen. Unter inflammatorischem Einfluss liegt ZO-1 in geringerer Menge in den Kontaktstellen der Zellgrenzen, sondern vielmehr in intrazellulären, vesikelartigen Anhäufungen, vor. Dexmedetomidin zeigt auch bei dieser Analyse keinen Einfluss auf die vorliegenden inflammatorischen Veränderungen. Dementsprechend konnte hier bei Betrachtung der ZO-1 Proteinverteilung kongruent zur Widerstandsmessung kein antiinflammatorischer bzw. bariereschützender Effekt durch Dexmedetomidin gezeigt werden. Die inflammativ bedingte Endozytose und intrazelluläre Einlagerung von *tight junction* Proteinen sind vorbeschrieben. Nighot et al. führen in ihrer Übersichtsarbeit an, dass die Endozytose von *tight junction* Proteinen (hauptsächlich Occludin und Claudin) physiologisch ist, und so dynamisch die Permeabilität der Membran reguliert wird. Es wird weiterhin beschrieben, dass die Endozytose dieser Proteine in einem inflammatorischen Milieu erhöht ist [65]. Marchiando et al. zeigte an Mäusen, dass TNF α die Endozytose von Occludin via Caveolin induziert [113]. Bruewer et al. beschreiben, wie IFN γ die Endozytose von *tight junctions* als Makropinozytose, also als flüssigkeitsgefüllte Vesikel, initiiert [114]. Dexmedetomidin scheint diese Regulation der Proteinpräsentation nicht zu beeinflussen. Das Studiendesign lässt hier keine Rückschlüsse zur Proteinexpression der Western Blot Analysen zu. Demnach kann lediglich vermutet werden, dass unter inflammatorischen Einflüssen die *tight junction* Proteine in diesem Versuchsaufbau mit Caco-2 Zellen nicht in ihrer Proteinexpression, sondern in der Proteinpräsentation gestört waren, und so eine Hyperpermeabilität aufgetreten ist. Eine zukünftige, ergänzende Etablierung einer immunhistochemischen Färbung von Occludin und Claudin-5 ist angezeigt, um Endozytosemechanismen auch für diese beiden genannten *tight junction* Proteine aufzudecken.

Eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse dieser Studie im Kontext bestehender Literatur könnte die mögliche antiinflammatorische Wirkweise von Dexmedetomidin sein. Der α 2-Rezeptor-Agonismus durch Dexmedetomidin löst überwiegend inhibitorische Signale am Rezeptor aus. Unter diesen kommt es zur Dämpfung des Sympathikus, zur Aktivierung des *Nervus vagus* und zur Stimulation von nikotinerger Acetylcholin-Rezeptoren, die für eine entzündungshemmende Wirkung des Sedativums entscheidend sind [83, 115, 116]. Es wird von einer Sympathikolyse gesprochen. In der tierexperimentellen Studie von Chen et al. wurde die protektive Wirkung von Dexmedetomidin auf die geschädigte Darmbarriere durch den hochpotenten α 2-Rezeptor-Antagonisten Yohimbin aufgehoben [117]. Diese Bestandteile des zentralen und peripheren Nervensystems werden im Caco-2-Modell nicht abgebildet, was eine

Hypothese für die ausbleibende antiinflammatorische Wirkung von Dexmedetomidin sein kann. Dagegen sprechen die Ergebnisse von Zhang et al., die zeigen, dass Dexmedetomidin über den TLR4/MyD88/ERK1/2/NF- κ B Signalweg unabhängig vom α 2-Rezeptor-Agonismus entzündungshemmend wirkt [118]. Bei Caco-2 Zellen konnte der TLR4 Rezeptor nachgewiesen werden [119]. Dieser wird allerdings LPS-induziert auf Caco-2 Zellen exprimiert. Ohne LPS Stimulation liegt der TLR4 in sehr geringer Menge vor [120]. Bei ausbleibender antiinflammatorischer Wirkung von Dexmedetomidin in dieser Studie wäre ein Nachweis von TLR4 auf den behandelten Caco-2 Zellen perspektivisch vorstellbar, ebenso ein verändertes Studiendesign mit LPS als inflammatorischer Stimulus anstelle einer Zytokin-induzierten Inflammation.

Zi et al. konnten zudem in ihren tierexperimentellen Studien zeigen, dass der entzündungshemmende Effekt von Dexmedetomidin ebenfalls über den α 7-nikotinergen Acetylcholinrezeptor vermittelt wird, welcher wie der TLR4 Rezeptor ebenfalls NF- κ B herunterreguliert [121]. Die Blockade des Rezeptors konnte die antiinflammatorisch Wirkung von Dexmedetomidin aufheben [122]. Der α 7-nikotinerger Acetylcholinrezeptor konnte an Caco-2 Zellen nachgewiesen werden [123]. Ein damit einhergehender Effekt von Dexmedetomidin bei TNF α /IFN γ -Stimulation wäre somit zu erwarten gewesen. Erwähnenswert ist, dass in einer anderen Studie an Caco-2 Zellen der barriereschützende Effekt eines Agonisten des α 7-nikotinergen Acetylcholinrezeptors ausblieb und in Kombination mit einer Zellkultur von enterischen Gliazellen wieder auftrat [124]. Perspektivisch wäre somit ebenfalls eine Anwendung von enterischen Gliazellen mit diesem Studiendesign denkbar.

4.3 Limitationen

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass diese lediglich mit einem Zellmodell erhoben wurden. Die Caco-2 Zelllinie ist für die Untersuchung von Permeabilität, Transport und Metabolismus an der Darmbarriere etabliert. Die Zelllinie bildet eine *Monolayer*-Schicht aus, die viele Eigenschaften von Enterozyten abbildet, [97] und ist somit geeignet, um erste Erkenntnisse über Arzneiwechselwirkungen mit der Darmbarriere zu gewinnen. Beim Vergleich zwischen Caco-2 Zelllinien verschiedener Labore ist zu beachten, dass die Zelllinie heterogen und verschiedene Subpopulationen ausbilden kann, was in Teilen einen Erklärungsansatz für divergierende Ergebnisse darstellt [97]. Schlussendliches Ziel von *in-vitro* Verfahren ist die Umwandlung in *in-vivo* Ergebnisse. Sun et al. führen an, dass die Mechanismen und Regulationswege der

Caco-2 Zelllinie zu vereinfacht abgebildet werden, um definitive Vorhersagen über *in-vivo* Überprüfungen effizient zu treffen [98]. Folgerichtig wäre demnach die Implementierung aus Caco-2 Ergebnissen in erweiterte Organmodelle, wie z.B. das *Organ-on-a-Chip* Modell, um genauer die epithelialen und endothelialen Bestandteile der menschlichen Darmbarriere darzustellen, und somit insgesamt Tierversuche zu reduzieren.

Weiterhin ist zu beachten, dass für die Inflammation ein Modell aus TNF α 2,5 ng/ml und IFN γ 10 ng/ml gewählt wurde, welches ein anerkanntes Modell zur Darmbarriereschädigung ist und unabhängig von Apoptosemechanismen wirkt [125, 126]. Dass eine physiologische Immunsystemaktivierung weitaus komplexer und mit weiteren Zytokinen abläuft, wird in Kapitel 1.1.5 beschrieben. Jedoch aktiviert der inflammatorische Stimulus aus TNF α und IFN γ sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem, da TNF α von aktivierten Makrophagen ausgeschüttet wird und IFN γ ein Zytokin von aktivierten T-Zellen ist. Somit bildet dieses Inflamationsmodell mehr inflammatorische Regulationswege ab, als ein Inflamationsmodell mit lediglich einem Stimulus. In anderen Studiendesigns konnte gezeigt werden, dass TNF α und IFN γ entscheidende Botenstoffe der Darmbarriere sind. So ist TNF α ein frühes proinflammatorisches Zytokin, welches via MLCK-Aktivierung durch *tight junction* Verringerung und Reorganisation des Zytoskeletts die Darmbarriere schädigt. Dabei lagen die gemessenen TNF α -Serumkonzentrationen bei Mäusen bei 20 - 60 pg/ml ($\pm$ 0,02 – 0,06 ng/ml) [127]. Auch für IFN γ (10-1000 IU/ml) konnte gezeigt werden, dass es alleine oder in Kombination mit anderen Zytokinen eine inflammative Hyperpermeabilität in verschiedenen Zelllinien auslöst [114, 128]. Die Dosierung der Zytokine TNF α (2,5 ng/ml) und IFN γ (10 ng/ml) wurde durch vorhergehende Dosisfindungsstudien so gewählt, dass eine TEER-Reduktion ohne XTT-Viabilitätsverlust in der Inflamationskontrolle erreicht wurde. Bei septischen Patienten liegt die mittlere TNF α -Konzentration bei 58,4 Pikogramm/Milliliter (pg/ml) ($\pm$ 0,058 ng/ml) und die mittlere IFN γ -Konzentration bei 63,3 pg/ml ($\pm$ 0,063 ng/ml) [129].

4.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Dexmedetomidin keine signifikanten Effekte auf Entzündungsschäden des Darmepithels *in vitro* aufweist. Unter dem Einfluss der inflammatorischen Zytokine TNF α und IFN γ wird eine Hyperpermeabilität über der Zellbarriere induziert. Dabei bleibt die Proteinexpression von Occludin und Claudin-5

unverändert. Hingegen verändert sich die zelluläre Verteilung von ZO-1. Es kann angenommen werden, dass die erhöhte Permeabilität auf einer veränderten Zelllokalisation der *tight junction* Proteine beruht. Die beschriebenen inflammatorischen Effekte bleiben unter Dexmedetomidin-Behandlung unverändert und entzündungsbedingte Barrierschäden können nicht kompensiert werden.

Damit weichen diese Studienergebnisse von anderen klinischen, tierexperimentellen und zellbasierten Studien ab, welche antiinflammatorische Effekte von Dexmedetomidin anzeigen. Eine Erklärung für die ausbleibenden Effekte in dieser Zellkultur könnten möglicherweise in Teilen nicht vollständig abgebildete Signalkaskaden sein. Ein Merkmal dieser Studie ist allerdings die Zytokin-induzierte Inflammation an der Darmbarriere, welche so in wenigen vergleichbaren Studien verwendet wurde.

Bezogen auf die eingangs beschriebene Frage kann aktuell nicht belegt werden, ob Sepsispatienten mit einer Sedierung durch Dexmedetomidin einen zusätzlichen Nutzen erfahren, und inwiefern Dexmedetomidin gegenüber anderen Sedativa vorteilhafter ist. Perspektivisch sind daher Untersuchungen an komplexeren Modellen, wie das *Intestine-On-A-Chip* Modell, zur genaueren Darstellung epithelialer Wechselwirkungen vorstellbar.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Majno, G., *The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis)*. J Infect Dis, 1991. **163**(5): p. 937-45.
2. Huang, M., S. Cai, and J. Su, *The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(21).
3. Bracht, H., S. Hafner, and M. Weiss, *[Sepsis Update: Definition and Epidemiology]*. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2019. **54**(1): p. 10-20.
4. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-10.
5. Seymour, C.W., et al., *Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. Jama, 2016. **315**(8): p. 762-74.
6. Shankar-Hari, M., et al., *Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. Jama, 2016. **315**(8): p. 775-87.
7. Sakr, Y., et al., *Sepsis in Intensive Care Unit Patients: Worldwide Data From the Intensive Care over Nations Audit*. Open Forum Infect Dis, 2018. **5**(12): p. ofy313.
8. Rudd, K.E., et al., *Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study*. Lancet, 2020. **395**(10219): p. 200-211.
9. Reinhart, K., et al., *Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution*. N Engl J Med, 2017. **377**(5): p. 414-417.
10. SepNet Critical Care Trials, G., *Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study*. Intensive Care Med, 2016. **42**(12): p. 1980-1989.
11. Markwart, R., et al., *Epidemiology and burden of sepsis acquired in hospitals and intensive care units: a systematic review and meta-analysis*. Intensive Care Med, 2020. **46**(8): p. 1536-1551.
12. Bauer, M., et al., *[Mortality in sepsis and septic shock in Germany. Results of a systematic review and meta-analysis]*. Anaesthesist, 2021. **70**(8): p. 673-680.
13. Arina, P. and M. Singer, *Pathophysiology of sepsis*. Curr Opin Anaesthesiol, 2021. **34**(2): p. 77-84.
14. Uhle, F., et al., *[Pathophysiology of sepsis]*. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2015. **50**(2): p. 114-22.
15. Gotts, J.E. and M.A. Matthay, *Sepsis: pathophysiology and clinical management*. Bmj, 2016. **353**: p. i1585.
16. Levy, B., et al., *Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside*. Intensive Care Med, 2010. **36**(12): p. 2019-29.
17. Koh, I.H., et al., *Microcirculatory evaluation in sepsis: a difficult task*. Shock, 2010. **34** Suppl 1: p. 27-33.
18. Singer, M., *The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure*. Virulence, 2014. **5**(1): p. 66-72.
19. Arulkumaran, N., et al., *MITOCHONDRIAL FUNCTION IN SEPSIS*. Shock, 2016. **45**(3): p. 271-81.
20. Rocha, M., et al., *Mitochondrial dysfunction and antioxidant therapy in sepsis*. Infect Disord Drug Targets, 2012. **12**(2): p. 161-78.
21. Gkikas, I., K. Palikaras, and N. Tavernarakis, *The Role of Mitophagy in Innate Immunity*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1283.
22. Khan, M.M., W.L. Yang, and P. Wang, *ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN SEPSIS*. Shock, 2015. **44**(4): p. 294-304.
23. Walton, A.H., et al., *Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e98819.

24. Drewry, A.M., et al., *Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality*. Shock, 2014. **42**(5): p. 383-91.
25. Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen, *Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(12): p. 862-74.
26. Rubio, I., et al., *Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research*. Lancet Infect Dis, 2019. **19**(12): p. e422-e436.
27. Patil, N.K., et al., *Targeting Immune Cell Checkpoints during Sepsis*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(11).
28. Zhang, T., L. Yu-Jing, and T. Ma, *Role of regulation of PD-1 and PD-L1 expression in sepsis*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1029438.
29. Gabrilovich, D.I., *Myeloid-Derived Suppressor Cells*. Cancer Immunol Res, 2017. **5**(1): p. 3-8.
30. Brunkhorst, F.M., et al., *S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge*. Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2020. **115**(2): p. 37-109.
31. Evans, L., et al., *Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021*. Intensive Care Med, 2021. **47**(11): p. 1181-1247.
32. Levy, M.M., L.E. Evans, and A. Rhodes, *The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 Update*. Crit Care Med, 2018. **46**(6): p. 997-1000.
33. Martin, L., J. Bickenbach, and G. Marx, *[Sepsis Update: Evidence-Based Therapy]*. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2019. **54**(1): p. 50-62.
34. Levy, M.M., et al., *Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study*. Crit Care Med, 2015. **43**(1): p. 3-12.
35. Liu, G., L. Haijin, and Y. An, *Early lactate levels for prediction of mortality in patients with sepsis or septic shock: a meta-analysis*. Int J Clin Exp Med, 2017. **10**(1): p. 37-47.
36. Casserly, B., et al., *Lactate measurements in sepsis-induced tissue hypoperfusion: results from the Surviving Sepsis Campaign database*. Crit Care Med, 2015. **43**(3): p. 567-73.
37. Jansen, T.C., et al., *Early lactate-guided therapy in intensive care unit patients: a multicenter, open-label, randomized controlled trial*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(6): p. 752-61.
38. Zhang, Z. and X. Xu, *Lactate clearance is a useful biomarker for the prediction of all-cause mortality in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis**. Crit Care Med, 2014. **42**(9): p. 2118-25.
39. Ferrer, R., et al., *Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program*. Crit Care Med, 2014. **42**(8): p. 1749-55.
40. Dugar, S., C. Choudhary, and A. Duggal, *Sepsis and septic shock: Guideline-based management*. Cleve Clin J Med, 2020. **87**(1): p. 53-64.
41. Vincent, J.L., *Emerging therapies for the treatment of sepsis*. Curr Opin Anaesthesiol, 2015. **28**(4): p. 411-6.
42. Cui, J., et al., *The clinical efficacy of intravenous IgM-enriched immunoglobulin (pentaglobin) in sepsis or septic shock: a meta-analysis with trial sequential analysis*. Ann Intensive Care, 2019. **9**(1): p. 27.
43. Camilleri, M., et al., *Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease*. Neurogastroenterol Motil, 2012. **24**(6): p. 503-12.
44. Vancamelbeke, M. and S. Vermeire, *The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **11**(9): p. 821-834.
45. Turner, J.R., *Intestinal mucosal barrier function in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 799-809.

46. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 5., vollst. überarb. Aufl. ed. 2015, Stuttgart u.a.: Thieme.
47. Welsch, U., *Histologie Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie : das Lehrbuch*. 5. Auflage ed, ed. U. Welsch and W. Kummer. 2018, München: Elsevier.
48. Mowat, A.M. and W.W. Agace, *Regional specialization within the intestinal immune system*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(10): p. 667-85.
49. Odenwald, M.A. and J.R. Turner, *Intestinal permeability defects: is it time to treat?* Clin Gastroenterol Hepatol, 2013. **11**(9): p. 1075-83.
50. Suzuki, T., *Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions*. Anim Sci J, 2020. **91**(1): p. e13357.
51. Wells, J.M., et al., *Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017. **312**(3): p. G171-g193.
52. Fanning, A.S., T.Y. Ma, and J.M. Anderson, *Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1*. Faseb j, 2002. **16**(13): p. 1835-7.
53. Heinemann, U. and A. Schuetz, *Structural Features of Tight-Junction Proteins*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(23).
54. Shen, L., et al., *Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo*. Annu Rev Physiol, 2011. **73**: p. 283-309.
55. Haussner, F., et al., *Challenge to the Intestinal Mucosa During Sepsis*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 891.
56. Fay, K.T., M.L. Ford, and C.M. Coopersmith, *The intestinal microenvironment in sepsis*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. **1863**(10 Pt B): p. 2574-2583.
57. Wischmeyer, P.E., D. McDonald, and R. Knight, *Role of the microbiome, probiotics, and 'dysbiosis therapy' in critical illness*. Curr Opin Crit Care, 2016. **22**(4): p. 347-53.
58. Alverdy, J.C. and M.A. Krezalek, *Collapse of the Microbiome, Emergence of the Pathobiome, and the Immunopathology of Sepsis*. Crit Care Med, 2017. **45**(2): p. 337-347.
59. McDonald, D., et al., *Extreme Dysbiosis of the Microbiome in Critical Illness*. mSphere, 2016. **1**(4).
60. Lankelma, J.M., et al., *Critically ill patients demonstrate large interpersonal variation in intestinal microbiota dysregulation: a pilot study*. Intensive Care Med, 2017. **43**(1): p. 59-68.
61. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 313-23.
62. Prescott, H.C., et al., *Hospitalization Type and Subsequent Severe Sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **192**(5): p. 581-8.
63. Yoseph, B.P., et al., *Mechanisms of Intestinal Barrier Dysfunction in Sepsis*. Shock, 2016. **46**(1): p. 52-9.
64. Bischoff, S.C., et al., *Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy*. BMC Gastroenterol, 2014. **14**: p. 189.
65. Nighot, P. and T. Ma, *Endocytosis of Intestinal Tight Junction Proteins: In Time and Space*. Inflamm Bowel Dis, 2021. **27**(2): p. 283-290.
66. Su, L., et al., *Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis*. Gastroenterology, 2009. **136**(2): p. 551-63.
67. Buckley, A. and J.R. Turner, *Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(1).
68. Fink, M.P., *Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness*. Curr Opin Crit Care, 2003. **9**(2): p. 143-51.
69. Li, Q., et al., *Disruption of tight junctions during polymicrobial sepsis in vivo*. J Pathol, 2009. **218**(2): p. 210-21.

70. Gerresheim, G. and U. Schwemmer, *[Dexmedetomidine]*. *Anaesthesist*, 2013. **62**(8): p. 661-74.
71. Coursin, D.B., D.B. Coursin, and G.A. Maccioli, *Dexmedetomidine*. *Curr Opin Crit Care*, 2001. **7**(4): p. 221-6.
72. Carr, Z.J., et al., *Does Dexmedetomidine Ameliorate Postoperative Cognitive Dysfunction? A Brief Review of the Recent Literature*. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2018. **18**(10): p. 64.
73. Naaz, S. and E. Ozair, *Dexmedetomidine in current anaesthesia practice- a review*. *J Clin Diagn Res*, 2014. **8**(10): p. Ge01-4.
74. *European Medicine Agency - Dexmedetomidine*. 2018 21.09.2022]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/dexdor#authorisation-details-section>.
75. Wiegand, A., et al., *Niche Roles for Dexmedetomidine in the Intensive Care Unit*. *Ann Pharmacother*, 2023. **57**(10): p. 1207-1220.
76. Ihmsen, H. and T.I. Saari, *[Dexmedetomidine. Pharmacokinetics and pharmacodynamics]*. *Anaesthesist*, 2012. **61**(12): p. 1059-66.
77. Sessler, C.N., et al., *The Richmond Agitation-Sedation Scale: validity and reliability in adult intensive care unit patients*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **166**(10): p. 1338-44.
78. *Dexmedetomidin-ratiopharm Fachinformation*. 2022 22.09.2022]; Available from: <https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/label/Dexmedetomidin-ratiopharm%20100%20Mikrogrammm%20Konzentrat%20zur%20Herstellung%20einer%20Infusionslosung%20-%204.pdf?pzn=11584493>
79. Yang, J., et al., *Dexmedetomidine Resists Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting TLR4/MyD88/NF-kappaB Signaling*. *J Surg Res*, 2021. **260**: p. 350-358.
80. Bao, N. and B. Tang, *Organ-Protective Effects and the Underlying Mechanism of Dexmedetomidine*. *Mediators Inflamm*, 2020. **2020**: p. 6136105.
81. Kawasaki, T., et al., *Dexmedetomidine suppresses proinflammatory mediator production in human whole blood in vitro*. *J Trauma Acute Care Surg*, 2013. **74**(5): p. 1370-5.
82. Chen, R., et al., *The Anti-inflammatory Effect of Dexmedetomidine Administration on Patients Undergoing Intestinal Surgery: A Randomized Study*. *Drugs R D*, 2021. **21**(4): p. 445-453.
83. Xiang, H., et al., *Dexmedetomidine controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway*. *Inflammation*, 2014. **37**(5): p. 1763-70.
84. Huang, D.Y., et al., *Dexmedetomidine attenuates inflammation and pancreatic injury in a rat model of experimental severe acute pancreatitis via cholinergic anti-inflammatory pathway*. *Chin Med J (Engl)*, 2020. **133**(9): p. 1073-1079.
85. Seyedabadi, M., R. Rahimian, and J.E. Ghia, *The role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in inflammatory bowel disease: involvement of different cellular pathways*. *Expert Opin Ther Targets*, 2018. **22**(2): p. 161-176.
86. Taniguchi, T., et al., *Dose- and time-related effects of dexmedetomidine on mortality and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats*. *J Anesth*, 2008. **22**(3): p. 221-8.
87. Li, J., et al., *Dexmedetomidine attenuates lung apoptosis induced by renal ischemia-reperfusion injury through $\alpha(2)$ AR/PI3K/Akt pathway*. *J Transl Med*, 2018. **16**(1): p. 78.
88. Karabulut, G., et al., *Dose-related effects of dexmedetomidine on sepsis-initiated lung injury in rats*. *Braz J Anesthesiol*, 2021. **71**(3): p. 271-277.

89. Gu, J., et al., *Dexmedetomidine attenuates remote lung injury induced by renal ischemia-reperfusion in mice*. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2011. **55**(10): p. 1272-8.
90. Liu, Y.E., et al., *Effect of dexmedetomidine on rats with renal ischemia-reperfusion injury and the expression of tight junction protein in kidney*. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **8**(10): p. 18751-7.
91. Mei, B., J. Li, and Z. Zuo, *Dexmedetomidine attenuates sepsis-associated inflammation and encephalopathy via central α 2A adrenoceptor*. *Brain Behav Immun*, 2021. **91**: p. 296-314.
92. Qin, C., et al., *Dexmedetomidine protects against burn-induced intestinal barrier injury via the MLCK/p-MLC signalling pathway*. *Burns*, 2021. **47**(7): p. 1576-1585.
93. Yeh, Y.C., et al., *Effects of Dexmedetomidine on Intestinal Microcirculation and Intestinal Epithelial Barrier in Endotoxemic Rats*. *Anesthesiology*, 2016. **125**(2): p. 355-67.
94. Li, B., et al., *Anti-inflammatory Effects of Perioperative Dexmedetomidine Administered as an Adjunct to General Anesthesia: A Meta-analysis*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 12342.
95. Artursson, P., K. Palm, and K. Luthman, *Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **46**(1-3): p. 27-43.
96. van Breemen, R.B. and Y. Li, *Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2005. **1**(2): p. 175-85.
97. Cotter, P., *The Impact of Food Bioactives on Health in vitro and ex vivo models*, ed. K. Verhoeckx, et al. 2015, Cham: Springer International Publishing.
98. Sun, H., et al., *The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008. **4**(4): p. 395-411.
99. Prueksaritanont, T., et al., *Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells*. *Drug Metab Dispos*, 1996. **24**(6): p. 634-42.
100. Roehm, N.W., et al., *An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT*. *J Immunol Methods*, 1991. **142**(2): p. 257-65.
101. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. 3 ed. Experimentator. 2011, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
102. Kuebart, A., et al., *Keine Protektion der Darmbarriere – Dexmedetomidin weist keinen positiven Effekt auf inflammatorisch geschädigte Caco-2-Monolayer auf*. *Anästh Intensivmed*, 2023. **64**: p. 224.
103. World Health Organisation. *Global report on the epidemiology and the burden of sepsis - Current evidence, identifying gaps and future directions*. 2020 30.04.2023]; Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334216/9789240010789-eng.pdf>.
104. Reintam Blaser, A., et al., *Gastrointestinal symptoms during the first week of intensive care are associated with poor outcome: a prospective multicentre study*. *Intensive Care Med*, 2013. **39**(5): p. 899-909.
105. Dong, L., et al., *Mannose ameliorates experimental colitis by protecting intestinal barrier integrity*. *Nat Commun*, 2022. **13**(1): p. 4804.
106. Beutheu, S., et al., *Glutamine and arginine improve permeability and tight junction protein expression in methotrexate-treated Caco-2 cells*. *Clin Nutr*, 2013. **32**(5): p. 863-9.
107. Kiyonaga, N., T. Moriyama, and Y. Kanmura, *Effects of dexmedetomidine on lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in rats and mitochondrial function in cell culture*. *Biomed Pharmacother*, 2020. **125**: p. 109912.
108. Zhang, Q., et al., *Dexmedetomidine inhibits mitochondria damage and apoptosis of enteric glial cells in experimental intestinal ischemia/reperfusion injury via*

- SIRT3-dependent PINK1/HDAC3/p53 pathway*. J Transl Med, 2021. **19**(1): p. 463.
109. Chen, Q., et al., *α 2-adrenoreceptor modulated FAK pathway induced by dexmedetomidine attenuates pulmonary microvascular hyper-permeability following kidney injury*. Oncotarget, 2016. **7**(35): p. 55990-56001.
 110. Dejager, L., et al., *Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?* Trends Microbiol, 2011. **19**(4): p. 198-208.
 111. Chen, H.Q., et al., *Lactobacillus plantarum ameliorates colonic epithelial barrier dysfunction by modulating the apical junctional complex and PepT1 in IL-10 knockout mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **299**(6): p. G1287-97.
 112. Kaminsky, L.W., R. Al-Sadi, and T.Y. Ma, *IL-1 β and the Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 767456.
 113. Marchiando, A.M., et al., *Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo*. J Cell Biol, 2010. **189**(1): p. 111-26.
 114. Bruewer, M., et al., *Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process*. Faseb j, 2005. **19**(8): p. 923-33.
 115. Ferreira, J., *The Theory is Out There: The Use of ALPHA-2 Agonists in Treatment of Septic Shock*. Shock, 2018. **49**(4): p. 358-363.
 116. Wang, K., et al., *Effects of dexmedetomidine on perioperative stress, inflammation, and immune function: systematic review and meta-analysis*. Br J Anaesth, 2019. **123**(6): p. 777-794.
 117. Chen, Y., et al., *Dexmedetomidine Ameliorate CLP-Induced Rat Intestinal Injury via Inhibition of Inflammation*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 918361.
 118. Zhang, J., et al., *The effect of dexmedetomidine on inflammatory response of septic rats*. BMC Anesthesiol, 2015. **15**: p. 68.
 119. Eyking, A., et al., *Toll-like receptor 4 variant D299G induces features of neoplastic progression in Caco-2 intestinal cells and is associated with advanced human colon cancer*. Gastroenterology, 2011. **141**(6): p. 2154-65.
 120. Abreu, M.T., et al., *Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1609-16.
 121. Zi, S.F., et al., *Dexmedetomidine-mediated protection against septic liver injury depends on TLR4/MyD88/NF- κ B signaling downregulation partly via cholinergic anti-inflammatory mechanisms*. Int Immunopharmacol, 2019. **76**: p. 105898.
 122. Han, Q.Q., X.Y. Li, and Y.X. Wang, *Dexmedetomidine attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation through macrophageal IL-10 expression following α 7 nAChR activation*. Int Immunopharmacol, 2022. **109**: p. 108920.
 123. Dang, X., et al., *CHRFAM7A: a human-specific α 7-nicotinic acetylcholine receptor gene shows differential responsiveness of human intestinal epithelial cells to LPS*. Faseb j, 2015. **29**(6): p. 2292-302.
 124. Costantini, T.W., et al., *Targeting α -7 nicotinic acetylcholine receptor in the enteric nervous system: a cholinergic agonist prevents gut barrier failure after severe burn injury*. Am J Pathol, 2012. **181**(2): p. 478-86.
 125. Bruewer, M., et al., *Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6164-72.
 126. Wu, Y., et al., *A Novel Role for Programmed Cell Death Receptor Ligand-1 (PD-L1) in Sepsis-Induced Intestinal Dysfunction*. Mol Med, 2017. **22**: p. 830-840.
 127. Zahs, A., et al., *Inhibition of long myosin light-chain kinase activation alleviates intestinal damage after binge ethanol exposure and burn injury*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(6): p. G705-12.

128. Madara, J.L. and J. Stafford, *Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers*. J Clin Invest, 1989. **83**(2): p. 724-7.
129. Gharamti, A.A., et al., *Proinflammatory cytokines levels in sepsis and healthy volunteers, and tumor necrosis factor-alpha associated sepsis mortality: A systematic review and meta-analysis*. Cytokine, 2022. **158**: p. 156006.

6 Danksagung

Diese Dissertationsarbeit konnte nur durch die Unterstützung und Mitwirkung zahlreicher Personen gelingen. Diesen sei an dieser Stelle mein herzlichster Dank ausgesprochen. Jeder Rat und jede Hilfe sind für mich von unschätzbaren Wert.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Olaf Picker insbesondere für die Bereitstellung des Themas und für die Leitung durch die wissenschaftliche Thematik. An gleicher Stelle möchte ich meinen Dank an meine Zweitbetreuerin Frau Prof. Dr. Kathrin Scheckenbach für die unkomplizierte Kooperation ausdrücken.

Ganz besonders danken möchte ich außerdem Frau Dr. Anne Kuebart. Mit ihrer herausragenden Betreuung stand sie mir stets unmittelbar mit Rat und Tat bei jeglicher Fragestellung hilfreich zur Seite. Ihr Beitrag an dieser Dissertationsarbeit kann ich nicht hoch genug schätzen. Durch ihre besonnene und motivierende Art konnte sie mich vieles lehren und mich immer wieder aufs neue erstaunen. Ihr enormes Engagement und ihre Begeisterung für wissenschaftliche Fragestellung habe ich als sehr ansteckend erlebt und kann Forschenden nur ein Vorbild sein.

Weiterhin gilt mein Dank dem gesamten Team der experimentellen Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Bei Frau Prof. Dr. Inge Bauer, Frau PD Dr. Annika Raupach und Frau PD Dr. Anna Herminghaus möchte ich mich für die Einführung in wissenschaftliche Arbeitsweisen und fortwährende Unterstützung bedanken. Frau Birgitt Berke und Frau Claudia Dohle möchte ich für die Vermittlung der methodischen Kenntnisse, der technischen Hilfe und der stets lehrreichen Zusammenarbeit würdigen. Ebenso möchte ich mich bei Frau Ayse Ceylan für die schöne Teamarbeit, anregende Gespräche und persönliche Unterstützung bedanken.

M, P und S danke ich für Ihre Ermutigung und Geduld, sowie emotionale, fachliche und finanzielle Unterstützung. Die Selbstverständigkeit, wie dies hier und durch mein gesamtes Studium geschah, weiß ich sehr zu schätzen und möchte ich besonders hervorheben.