

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
(Akademischer Vertreter: Prof. Dr. med. Norbert Weiler)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DES INTRAVENÖSEN ANÄSTHETIKUMS PROPOFOL AUF HYPOXIE INDUZIERTER MECHANISMEN IN-VITRO

Eine experimentelle Studie

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
SARAH PETERS
aus Hamburg

Kiel, 2013

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen veröffentlicht:

Zitta K, Peters S, Bein B, Scholz J, Steinfath M, Albrecht M. Molecular and cellular effects of propofol on hypoxia - induced cell damage in intestinal cells grown in - vitro: involvement of hydrogen peroxide and catalase. *European Journal of Anaesthesiology*. June 2012; 29 (Supplement 50): 144.

Zitta K, Meybohm P, Lauer F, Peters S, Bein B, Albrecht M. Serum from cardiac surgery patients undergoing remote ischemic preconditioning mediates cytoprotective effects in-vitro: Investigations employing a CaCo - 2 cell hypoxia model. *European Journal of Anaesthesiology*. June 2011, 28 (Supplement 48): 51.

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Martin Albrecht, Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Philip Rosenstiel, Institut für Klinische Molekularbiologie
Tag der mündlichen Prüfung:	17.07.2014
Zum Druck genehmigt, Kiel, den:	01.06.2014

gez.: Prof. Dr. Johann Roider,
Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Klinische Bedeutung von Ischämie und Reperfusion	1
1.2 Ischämie und Reperfusion im Darm	3
1.3 Ischämie und Reperfusion assoziierte Mechanismen: oxidativer Stress	4
1.4 CaCo-2 Zellen als Modellsystem für das Darmepithel.....	7
1.5 In-vitro Hypoxiemodelle	9
1.6 Eigenschaften von Propofol	10
1.7 Zielsetzung der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Zellkultur	13
2.1.2 Proteinbiochemie	13
2.1.3 Molekularbiologie	15
2.2 Methoden	16
2.2.1 Zellkultur	16
2.2.2 In-vitro Hypoxie	17
2.2.3 Behandlung der CaCo-2 Zellen mit Propofol	18
2.2.4 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies	21
2.2.5 Wasserstoffperoxidassay	22
2.2.6 Western Blot	23
2.2.7 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion.....	25
2.2.8 Statistische Analysen	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Erzeugung einer Hypoxie	29
3.2 Effekte der Hypoxie auf die Morphologie der CaCo-2 Zellen	30
3.3 Effekte von Propofol unter Normoxie und Hypoxie auf die Spiegel von reaktiven Sauerstoffspezies	31

3.4	Effekte von Propofol unter Normoxie und Hypoxie auf die Wasserstoffperoxidspiegel	34
3.5	Effekte von Propofol unter Normoxie und Hypoxie auf die Katalaseexpression	35
4	Diskussion	38
4.1	Hypoxiemodelle	38
4.2	Effekte der Hypoxie auf CaCo-2 Zellen	40
4.3	Verwendung von Propofol in-vitro	41
4.4	Effekte von Propofol unter Normoxie und Hypoxie auf die Spiegel von reaktiven Sauerstoffspezies	42
4.5	Effekte von Propofol unter Normoxie und Hypoxie auf die Spiegel von Wasserstoffperoxid	46
4.6	Effekte von Propofol unter Normoxie und Hypoxie auf die Expression von Katalase: mögliche Hinweise für indirekte Wirkungen von Propofol	48
4.7	Ausblick	51
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	54
7	Danksagung	63
8	Lebenslauf	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologische Folgen von Ischämie und Reperfusion.....	2
Abbildung 2: Ischämie und Reperfusion vermittelte Prozesse im Darmepithel.....	4
Abbildung 3: Auswirkungen von Ischämie und Reperfusion auf zellulärer Ebene	5
Abbildung 4: Entstehung von ROS	6
Abbildung 5: Wirkmechanismus der Katalase	7
Abbildung 6: Darmmukosa und CaCo-2 Monolayer	8
Abbildung 7: Enzymatische Erzeugung einer Hypoxie	10
Abbildung 8: Strukturformeln von Propofol und α -Tocopherol	11
Abbildung 9: Dosierungen von Propofol: Umrechnung in Molaritäten	19
Abbildung 10: Versuchsaufbau der Studie und zeitlicher Ablauf	20
Abbildung 11: Aufbau des Blots (Sandwichverfahren).....	24
Abbildung 12: Apparatur zur Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks.....	29
Abbildung 13: Induktion einer enzymatischen Hypoxie	30
Abbildung 14: Morphologie der CaCo-2 Zellen.....	31
Abbildung 15: Fluorometrische Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies	34
Abbildung 16: Quantifizierung der Wasserstoffperoxidkonzentration	35
Abbildung 17: Proteinexpression der Katalase	36
Abbildung 18: Genexpression der Katalase	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	14
Tabelle 2: Verwendete Antikörper	15
Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide	15
Tabelle 4: Art der Proben, Zeitpunkte der Probenentnahmen und Konfluenz der Zellen zu Beginn des Versuchs	21

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
18srRNA	18 Swedberg ribosomale Ribonukleinsäure
a.u.	unskalierte Einheit
ad	auffüllen auf
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2 assoziiertes X Protein
Bcl-2	B-Zelllymphom 2
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCo-2	humane epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen
CAT	Katalase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CYP	Cytochrom P450
D	Deutschland
DCF	Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
F	vorwärts
Fc	kristallisierbares Fragment von Antikörpern
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisenion
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisenion
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GO	Glukoseoxidase
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HG	hohe Glukosekonzentration
HIF 1α	Hypoxie induzierter Faktor 1α
HRP	Meerrettichperoxidase
I/R	Ischämie/Reperfusion
IgG	Immunglobulin G

IMR-32	humane Neuroblastomzelllinie
K _{ATP} -Kanäle	ATP-sensitive Kaliumkanäle
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
M	molare Masse
mA	Milliampere
MEK-ERK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase - extrazellulär-signal-regulierte Kinase
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mol	Stoffmenge
mRNA	Botenribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
nm	Nanometer
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	rückwärts
RIPA	Radioimmunopräzipitationassay
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
s.	siehe
SDC	Natriumdeoxycholat
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBST	Trishydroxymethylaminomethan Puffer Salzlösung Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit

USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
vs.	versus

1 Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung von Ischämie und Reperfusion

Im klinischen Alltag spielen Ischämie und Reperfusion eine bedeutende Rolle. Ischämie/Reperfusion(I/R)-Schäden können alle Organe und Gewebe betreffen und unterschiedliche Ursachen haben. Sie tragen zu Morbidität und Mortalität in einer Vielzahl von pathologischen Prozessen bei. Bedeutend für die Klinik sind vor allem I/R-Schäden im Rahmen von Schlaganfällen, Myokardinfarkten, akuten Nierenversagen und Herz-Kreislaufstillständen sowie in allen Bereichen der Chirurgie; beispielsweise während Organtransplantationen, in der Herz- und in der Thoraxchirurgie und bei gefäßchirurgischen Eingriffen. Insbesondere im Gastrointestinaltrakt können I/R-Schäden zu einer Dysfunktion der endothelialen und epithelialen Barriere, Translokation von Bakterien und schließlich zum Multiorganversagen führen.¹⁻³ Die Wiederherstellung des Blutflusses und damit einhergehend die Reoxygenierung ist assoziiert mit einer Verstärkung des Gewebes Schadens und einer Entzündungsantwort, dem sogenannten Reperfusionsschaden.⁴ Bei I/R-Schäden spielen eine Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen eine Rolle (s. Abbildung 1). Ein entscheidender Faktor im Rahmen von I/R-Schäden ist oxidativer Stress. Während I/R entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Vor allem während der Reperfusion fallen große Mengen davon an.⁵ Darüber hinaus können Ischämie und Reperfusion zur Aktivierung von Zelltod durch Apoptose und Nekrose beitragen.⁶ I/R-Schäden führen auch zu einer Störung der Barrierefunktion des Gefäßendothels. Es kommt zu einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit, einer Entzündungsreaktion des Endothels, einem Ungleichgewicht zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Faktoren sowie zur Aktivierung der Koagulation und des Komplementsystems.^{1, 7} Die I/R-Schäden des Darms bilden eine Ausnahme, da es durch Endothel-/Epithelschäden zur Translokation von Bakterien kommt. Ansonsten liegen bei I/R-Schäden meist keine mikrobiellen Einflüsse vor.⁸ Reperfusionsschäden sind meist auch durch Autoimmunprozesse gekennzeichnet. Hierbei kommt es zu einer Antikörperbildung, getriggert durch die Erkennung von eigenen Antigenen, ähnlich wie bei pathogenen Antigenen, und anschließend zur Komplementaktivierung.⁹ Außerdem führen I/R-Schäden zur Auslösung einer Immunantwort, unter anderem durch Aktivierung und

Ansammlung von Immunzellen der angeborenen und erworbenen Immunantwort, sowie der Aktivierung von Pattern Recognition Rezeptoren (PPR), wie beispielsweise Toll like Rezeptoren (TLR), durch endogene Faktoren.⁸

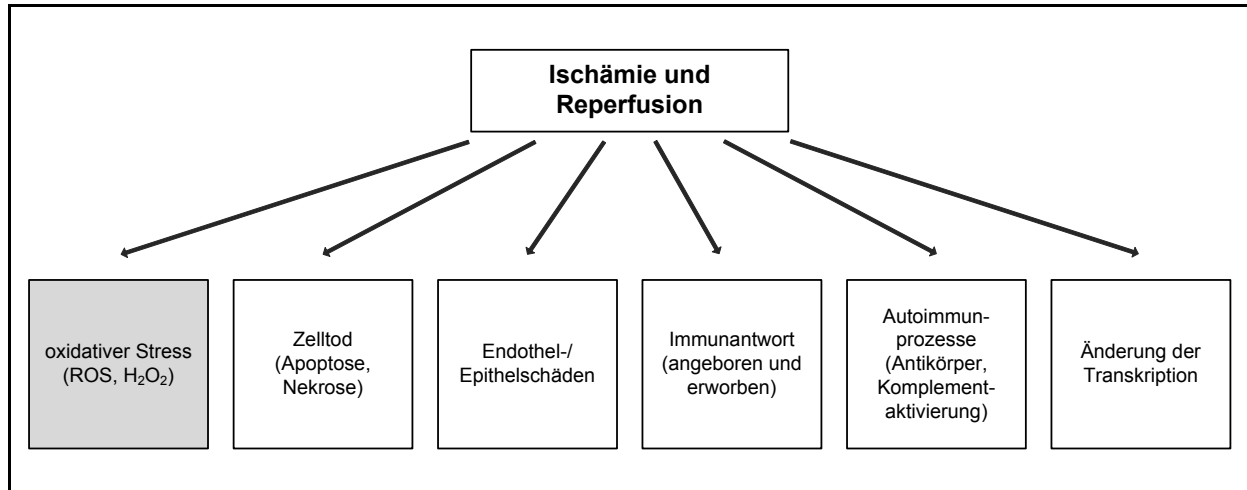


Abbildung 1: Pathophysiologische Folgen von Ischämie und Reperfusion

I/R-Schäden lösen eine Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen aus. Unter anderem kommt es zu oxidativem Stress, Zelltod, Schädigung des Endothels und Epithels, Änderung der Transkription sowie Auslösung einer Immunantwort und Autoimmunprozessen.

Um I/R-Schäden zum Beispiel während einer Organtransplantation oder während einer perkutanen Koronarintervention bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt zu verringern und die Ischämietoleranz zu erhöhen, gibt es unterschiedliche Ansätze. Möglichkeiten sind beispielsweise die ischämische Konditionierung, der Einsatz von therapeutischen Gasen sowie Eingriffe auf zellulärer Ebene, zum Beispiel durch die Gabe von Antioxidantien und metabolische Strategien, wie die Induktion von Glykolyseenzymen und somit eine Verschiebung der Energiegewinnung durch β -Oxidation hin zur Glykolyse.¹

Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die Gabe von verschiedenen Anästhetika, wie beispielsweise intravenös appliziertes Propofol, I/R-Schäden reduzieren kann. Allerdings sind die zellulären und molekularen Protektionsmechanismen noch weitgehend unklar.¹⁰⁻¹² Dies liegt unter anderem daran, dass geeignete in-vitro Systeme zur Untersuchung von Hypoxieschäden fehlen und somit die Auswirkungen von Anästhetika auf I/R-Schäden nur schwer evaluiert werden können. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein in-vitro Hypoxiemodell etabliert, um fokussiert die Effekte von Propofol unter Hypoxie und Normoxie auf CaCo-2 Zellen, als

Modellsystem für das Darmepithel, zu untersuchen. Insbesondere wurden die Spiegel von ROS, welche eine entscheidende Rolle bei I/R-Schäden spielen, evaluiert.

1.2 Ischämie und Reperfusion im Darm

Neben I/R-Schäden des Herzens und des Hirns ist auch der Gastrointestinaltrakt häufig von I/R betroffen. Arterielle Mangeldurchblutung, venöse Abflussstörung oder Mangeldurchblutung bei Kreislaufzentralisation im Schock verursachen Kreislaufstörungen des Darmes. I/R des Gastrointestinaltraktes ist ein klinischer Notfall. Eine schnelle Diagnose und Behandlung sind wichtig, um einen Darminfarkt zu verhindern.¹³ Bei Darmischämien werden zwei unterschiedliche Klassifikationen angewandt. In Anlehnung an die obstruktiven Mechanismen werden okklusive und nicht-okklusive Darminfarkte unterschieden. Die amerikanische Gesellschaft für Gastroenterologie empfiehlt darüber hinaus die Unterscheidung nach klinischen Gesichtspunkten: akute Mesenterialischämie (AMI), chronische Mesenterialischämie (Angina abdominalis) und ischämische Kolitis. Die Mortalitätsrate durch eine Darmischämie liegt zwischen 60 % und 80 %.¹⁴⁻¹⁶ Da Darmischämien häufig unspezifische Symptome zeigen, ist eine frühzeitige Diagnose oft schwierig.^{15, 16} Die I/R-Schäden des Darmes haben eine gestörte Barrierefunktion des Darmes, Translokation von Bakterien sowie lokale und systemische Entzündungsprozesse zur Folge, die letztendlich zum Multiorganversagen führen können. Bakteriämie und/oder Endotoxin assoziierte Systemantwort, wie SIRS (systemic inflammatory response syndrom), Sepsis, Atemversagen oder kardiale Dysfunktion sind für die schlechte Prognose eines akuten intestinalen I/R-Schadens mitverantwortlich.¹⁵⁻¹⁷

Die Entstehung von ROS im Rahmen von I/R ist entscheidend für den Schädigungsprozess. Vor allem während der Reperfusion entstehen große Mengen an ROS, darunter auch Wasserstoffperoxid (s. Abbildung 2).⁵ Da die intestinale Mukosa extrem sensitiv auf ROS reagiert, sind die ROS einer der wichtigsten Faktoren bei der Entstehung von intestinalen I/R-Schäden.¹⁷ Die Mechanismen der intestinalen Mukosaschädigung nach I/R-Schäden sind komplex. Eine durch ROS verursachte Lipidperoxidation ist ein entscheidender Faktor, der zu intestinalen I/R-Schäden führt. Antioxidantien dagegen, beispielsweise mit der Nahrung

aufgenommene Flavonoide, scheinen die intestinale Mukosa vor I/R-Schäden zu schützen.^{17, 18}

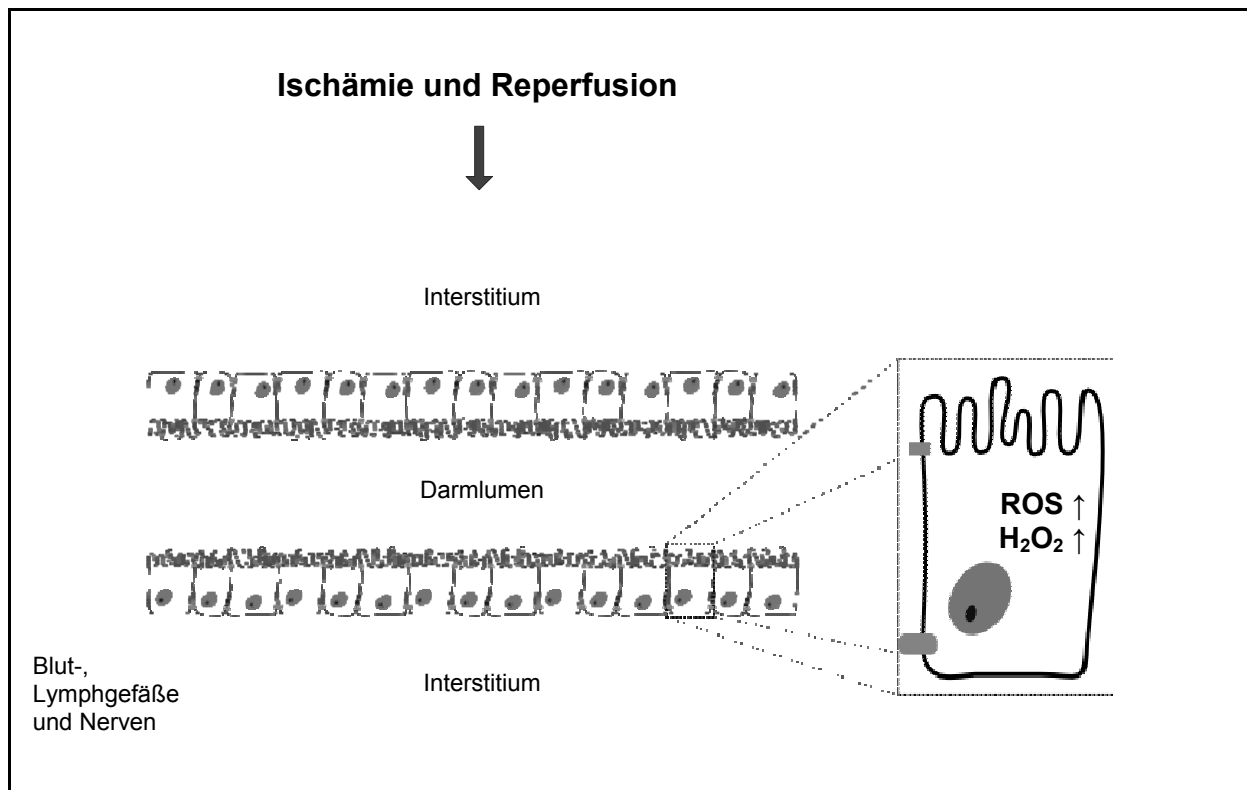


Abbildung 2: Ischämie und Reperfusions vermittelte Prozesse im Darmepithel

Während Ischämie und vor allem während der Reperfusion des Darms entstehen ROS, darunter Wasserstoffperoxid.

1.3 Ischämie und Reperfusions assoziierte Mechanismen: oxidativer Stress

Als oxidativer Stress wird eine das physiologische Ausmaß überschreitende Menge an ROS bezeichnet.⁵ Zu den ROS gehören zum einen stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid, Hydroperoxid, Hypochloritanionen und angeregte Sauerstoffmoleküle und zum anderen freie Radikale wie Hyperoxid-Anionen, Hydroxylradikale, Peroxylradikale und Alkoxyradikale.¹⁹ Als Radikale werden Moleküle mit mindestens einem ungepaarten Elektron bezeichnet, die dadurch besonders reaktionsfreudig und instabil sind.²⁰ Radikale entstehen während der Reperfusion in der Atmungskette, im Xanthinoxidase-Metabolismus und durch NADPH-Oxidase in Entzündungszellen (vor allem in aktivierten, neutrophilen

Granulozyten).^{4, 5, 21, 22} Auch unter Normoxie entstehen geringe Mengen an freien Sauerstoffradikalen, die aber unter anderem durch endogene antioxidative Enzyme neutralisiert werden. Insbesondere während der Reperfusion fallen große Mengen an freien Sauerstoffradikalen an, die schädlich sind.⁵ ROS führen zur Oxidation von zellulären Proteinen, Lipiden und Nucleinsäuren. Dies kann eine Funktionsänderung bzw. einen -ausfall, zelluläre Dysfunktion sowie Zelltod als Folge haben (s. Abbildung 3).¹

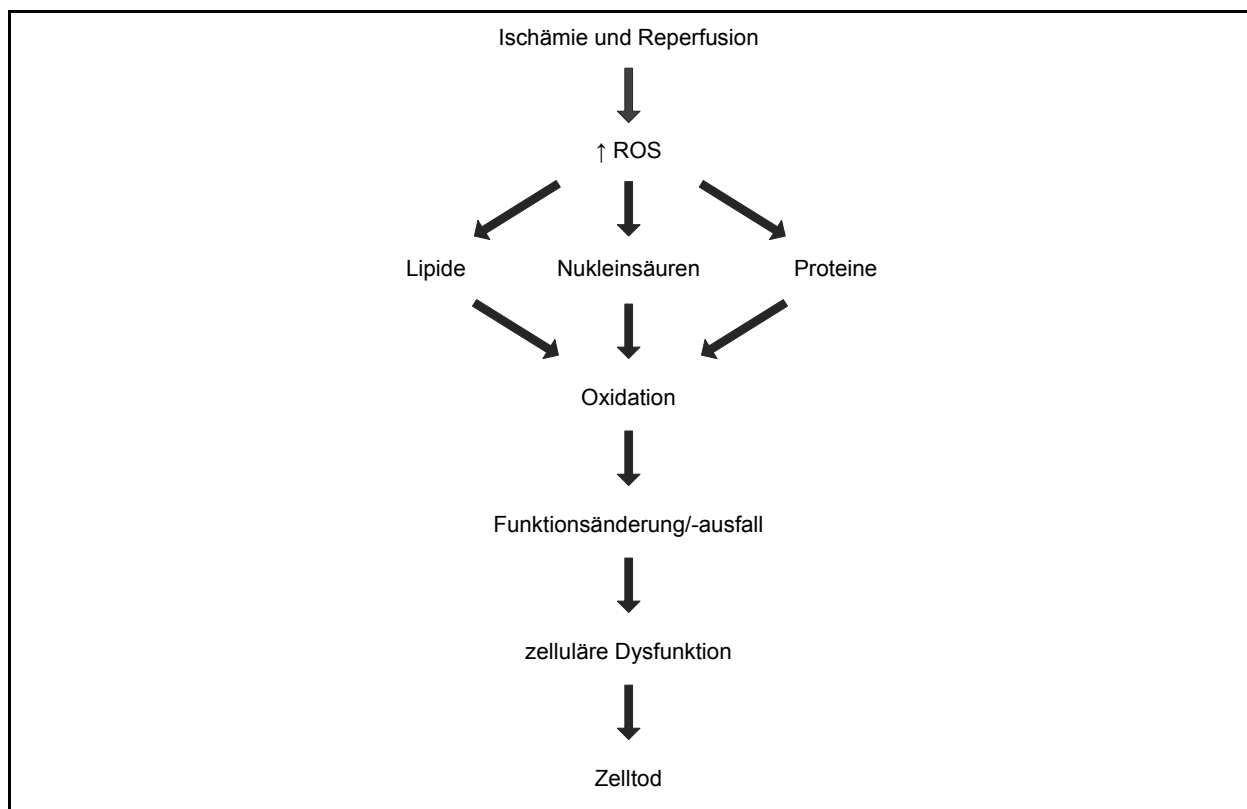


Abbildung 3: Auswirkungen von Ischämie und Reperfusion auf zellulärer Ebene

Während I/R entstehen große Mengen an ROS. Diese schädigen zelluläre Lipide, Nucleinsäuren und Proteine durch Oxidation. Hierdurch kann es zur Funktionsänderung oder zum Funktionsverlust und letztendlich zur zellulären Dysfunktion und zum Zelltod kommen.

Während der Reperfusion reagiert molekularer Sauerstoff auch mit Hypoxanthin und Xanthin durch die Xanthinoxidase zu Superoxidanionen, die wiederum katalysiert durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Entstehendes Wasserstoffperoxid führt durch die Haber-Weiss-Reaktion sowie die Fenton-Reaktion, welche durch erhöhte Verfügbarkeit von freiem Eisen während

Ischämie katalysiert werden, zu einem Anstieg von hochtoxischen Hydroxylradikalen (s. Abbildung 4).^{5, 22, 23} Hydroxylradikale reagieren mit Bestandteilen der Zellmembran und führen dadurch zur Ausschüttung von Faktoren, welche die Adhäsion von Granulozyten an das mikrovaskuläre Endothel begünstigen.⁵

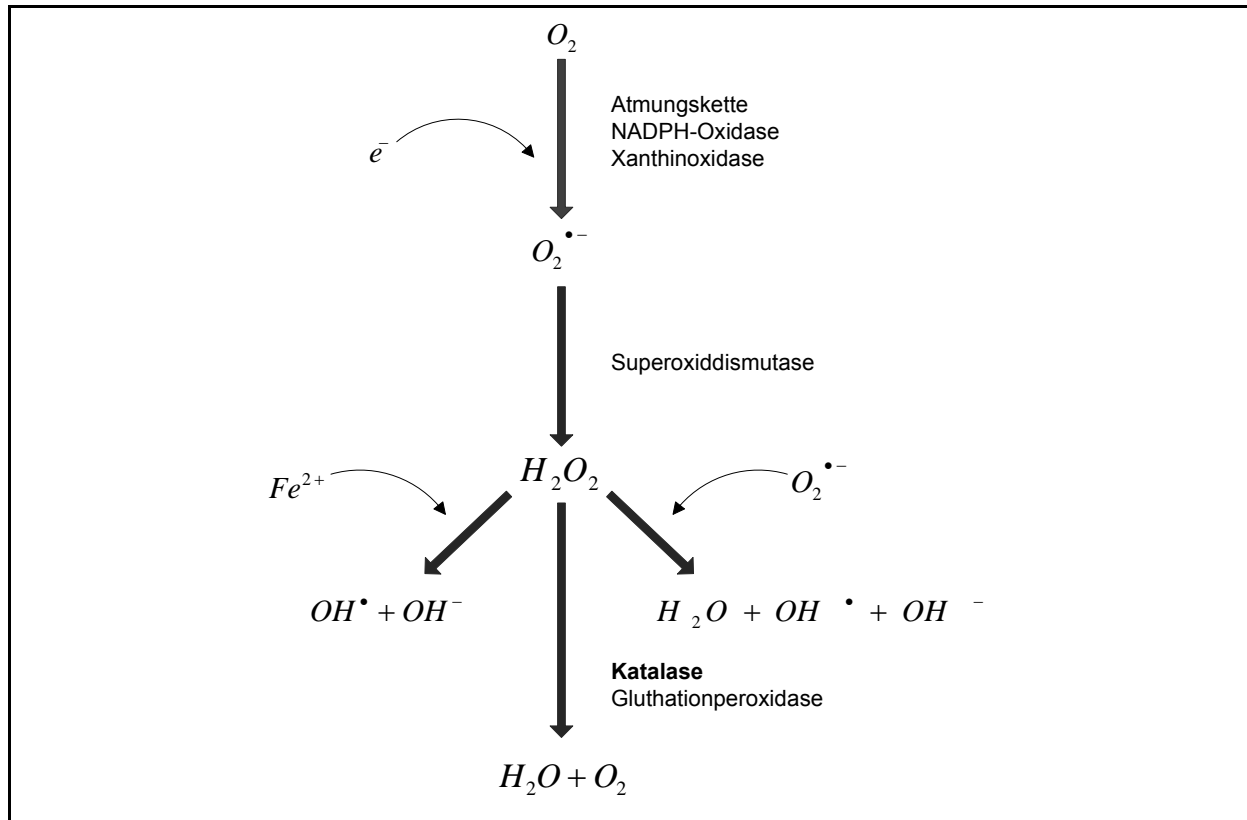


Abbildung 4: Entstehung von ROS

ROS entstehen bei verschiedenen Prozessen und werden unter physiologischen Bedingungen durch enzymatisch und nicht enzymatisch wirkende Antioxidantien umgewandelt. Unter pathophysiologischen Konditionen wie bei I/R kommt es zu einem Überschuss an ROS, der durch die antioxidativen Mechanismen nicht mehr ausgeglichen werden kann und Zellschäden zur Folge hat.

Der menschliche Körper verfügt über verschiedene antioxidative Schutzmechanismen gegen endogene und exogene ROS. Zu diesen Mechanismen zählen unter anderem Enzyme, wie Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase sowie nicht enzymatisch aktive Systeme wie Glutathion und Thioredoxin.²⁴ Daneben können unter anderem Vitamine, beispielsweise Vitamin E, antioxidative Wirkungen im Körper entfalten.²⁵

Im Folgenden wird detailliert auf die Katalase eingegangen, da diese im Vordergrund der vorliegenden Studie stand. Katalase setzt Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und

Wasser um (s. Abbildung 5).²⁶ Sie wurde erstmals 1900 durch Loew identifiziert und benannt.^{27, 28} Säugetiere, inklusive des Menschen, exprimieren Katalase in allen Geweben. Besonders hohe Konzentrationen werden in der Leber, den Nieren und den Erythrozyten gefunden.²⁶

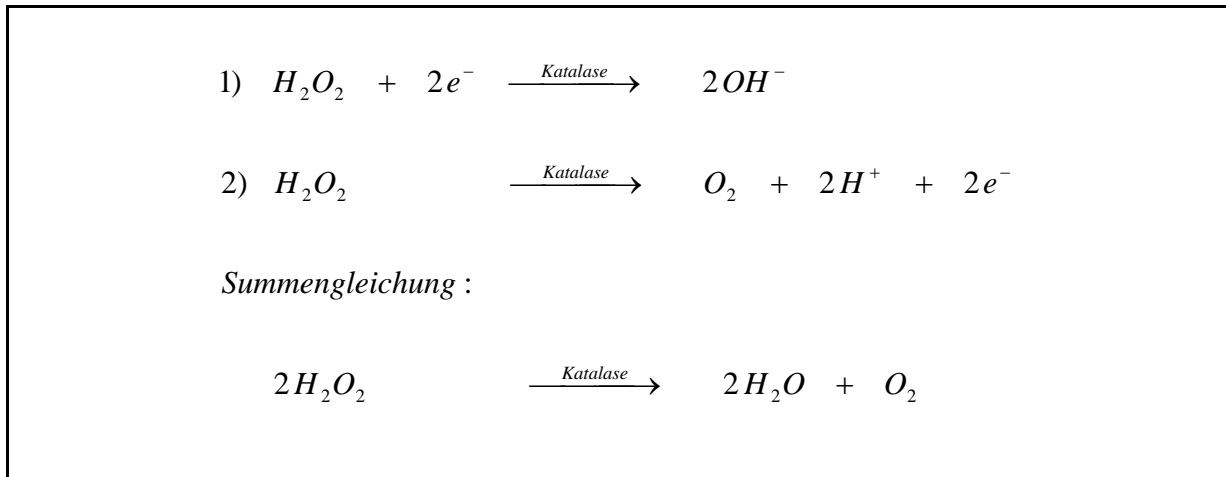


Abbildung 5: Wirkmechanismus der Katalase

Der Wirkmechanismus von Katalase verläuft in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird Wasserstoffperoxid durch Katalase reduziert. Im zweiten Schritt wird Wasserstoffperoxid oxidiert. Aus zwei Molekülen Wasserstoffperoxid entstehen durch die Umsetzung durch Katalase zwei Moleküle Wasser und ein Molekül Sauerstoff.

Neben den beschriebenen toxischen Effekten von ROS im Rahmen von I/R zeigen Studien aber auch, wie wichtig Wasserstoffperoxid und andere ROS als second messenger bei intrazellulären Signalwegen sowie bei der Regulation der Transkription sind.²⁹⁻³² Bei der Regulation der Genexpression durch Oxidantien wurden beispielsweise die beiden Transkriptionsfaktoren Nuclear Factor κB und Activator Protein 1 identifiziert. Die Bindungsstellen dieser beiden Redox-regulierten Transkriptionsfaktoren liegen in der Promoterregion einer Vielzahl von Genen, die direkt in die Pathogenese von zum Beispiel Tumorerkrankungen und Atherosklerose involviert sind.³⁰

1.4 CaCo-2 Zellen als Modellsystem für das Darmepithel

Die unterschiedlichen Abschnitte des menschlichen Darms besitzen einen einheitlichen vierschichtigen Wandaufbau aus Mukosa, Submukosa, Muskularis und

Serosa oder Adventitia. Das Epithel der Mukosa bildet im gesamten Gastrointestinaltrakt eine Diffusionsbarriere durch junctionale Komplexe wie Tight junctions und erfüllt darüber hinaus regional spezifische Aufgaben. Die Mukosa des Dünndarms ist durch Falten, Zotten und Mikrovilli enorm vergrößert und trägt ein einschichtiges Zylinderepithel mit Bürstensaum (Enterozyten) und Becherzellen (s. Abbildung 6). Durch das Epithel mit Tight junctions wird die Diffusionsschranke zwischen Darmlumen und dem Extrazellulärraum, dem eigentlichen Körperinneren, aufrechterhalten.^{33, 34}

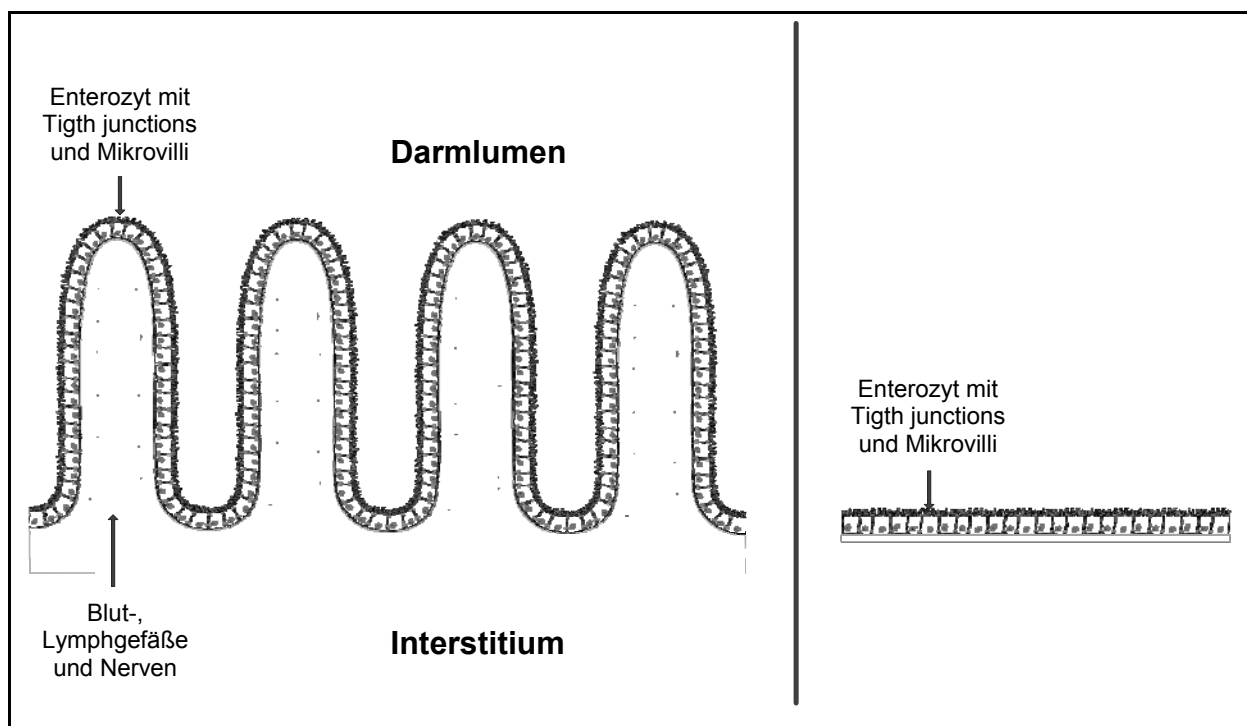


Abbildung 6: Darmmukosa und CaCo-2 Monolayer

Das Darmepithel in-vivo ist durch Falten, Zotten und Mikrovilli enorm vergrößert. Das einschichtige Zylinderepithel stellt durch junctionale Komplexe wie Tight junctions eine Diffusionsbarriere dar. Die CaCo-2 Zellen wachsen als Monolayer. Auch sie zeigen eine zylinderförmige polarisierte Morphologie mit Mikrovilli an der apikalen Seite und Tight junctions zwischen den Nachbarzellen.

Die humane intestinale CaCo-2 Zelllinie wird seit über zwanzig Jahren weitverbreitet als Modell der intestinalen Barriere angewendet.³⁵ Die ursprünglichen Zellen sind humane Adenokarzinomzellen des Kolons und wurden im Sloan-Kettering Institute for Cancer Research in New York City erstmals isoliert. Die Zellen wachsen als Monolayer, zeigen eine zylinderförmige, polarisierte Morphologie mit Mikrovilli an der apikalen Seite, Tight junctions zwischen den Nachbarzellen und exprimieren

Enzyme, wie beispielsweise Sucrase-Isomaltase, Laktase und Aminopeptidase N (s. Abbildung 6).³⁶⁻³⁹ CaCo-2 Zellen werden meist als konfluenter Monolayer verwendet. CaCo-2 Monolayer finden als in-vitro Modell des menschlichen Dünndarms in der pharmazeutischen Forschung breite Anwendung, um die Absorption und Wirkungen von oral verabreichten Medikamenten zu überprüfen. Das CaCo-2 Modellsystem bildet die Grundlage für Standardscreeningassays für Permeabilität, wird zur Untersuchung von Medikamenten und Arzneistoffträgern sowie deren zytotoxischen Evaluation genutzt.^{37, 38, 40-42}

1.5 In-vitro Hypoxiemodelle

Der Begriff Hypoxie bezeichnet einen verminderten Sauerstoffgehalt im Gewebe oder Blut. Dies kann durch verschiedene Faktoren hervorgerufen werden. Klinische Symptome einer Hypoxie können unter anderem Dyspnoe, Zyanose, Tachykardie, Blutdruckanstieg, Verwirrtheit, Angst und Unruhe sein.⁴³

Um eine Hypoxie in-vitro zu erzeugen, gibt es verschiedene Möglichkeiten.⁴⁴ Hypoxie kann durch die Verwendung einer Hypoxiekammer sowie durch die Verwendung von Enzymen induziert werden. Außerdem kann eine Hypoxie chemisch durch Cobalt-Chlorid oder Natriumdithionit erzeugt werden.⁴⁵⁻⁴⁹ Vor- und Nachteile dieser Hypoxiemodelle werden in der Diskussion (s. 4.1) erörtert.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Enzym basiertes Hypoxiemodell angewandt. Erstmals wurde dieses Modell von Baumann et al. beschrieben⁵⁰ und in den vergangenen Jahren im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin weiterentwickelt.⁵¹⁻⁵⁴ In diesem System werden zwei Enzyme, Glukoseoxidase und Katalase, eingesetzt, um rasch ein lang anhaltendes Sauerstoffdefizit in Zellkultur zu erzielen. Durch die Reaktion von Glukoseoxidase wird Sauerstoff aus dem Zellkulturmedium oder dem Puffer umgewandelt. Dies erfolgt dadurch, dass in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und Glukoseoxidase Glukose oxidiert wird. Dabei entstehen Gluconsäure und Wasserstoffperoxid, welches potentiell toxisch ist. Wasserstoffperoxid wird deswegen umgehend durch Katalase in Wasser und Sauerstoff umgewandelt. Bei dieser Reaktion werden zwei Moleküle Glukose pro Molekül Sauerstoff benötigt (s. Abbildung 7).^{44, 50, 55, 56}

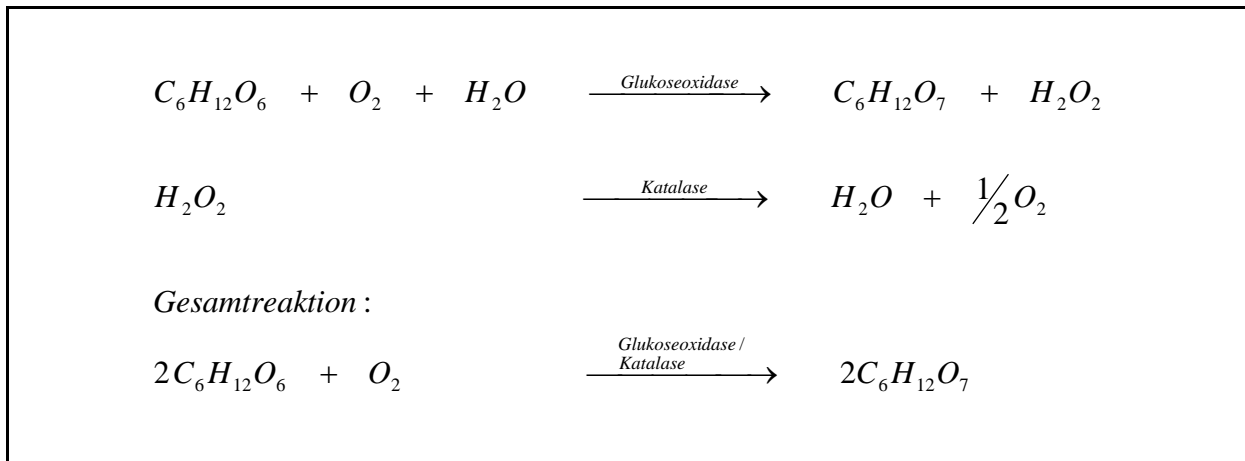


Abbildung 7: Enzymatische Erzeugung einer Hypoxie

Glukoseoxidase oxidiert Glukose in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid. Die Katalase katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff.

Durch dieses Enzym basierte System wird schnell eine stabile Hypoxie ($pO_2 < 5$ mmHg) erreicht und Interventionen sind während der Hypoxie möglich.

1.6 Eigenschaften von Propofol

Das intravenöse Anästhetikum Propofol (2,6-Diisopropylphenol) wird seit seiner Einführung Ende der achtziger Jahre weitverbreitet zur Narkoseeinleitung und -erhaltung sowie zur Sedierung verwendet, da es eine kurze Plasmahalbwertszeit, eine relativ geringe Kumulation sowie wenige unerwünschte Arzneimittelwirkungen aufweist.¹² Propofol wird hauptsächlich durch Konjugation in der Leber metabolisiert.⁵⁷ Neben seinen Vorteilen bezüglich der Anästhesie zeigt Propofol auch eine Reihe von Nicht-Anästhetikaeigenschaften.¹² Beispielsweise verfügt Propofol über immunmodulatorische¹², anxiolytische⁵⁸, antiemetische⁵⁹⁻⁶², analgetische⁶³ sowie antioxidative⁶⁴⁻⁶⁶ Eigenschaften. Darüber hinaus kann Propofol die Plättchenaggregation und die intrazelluläre Kalziumzunahme inhibieren⁶⁷⁻⁶⁹ und ist ein Modulator der Stickstoffmonoxidsynthese.⁷⁰ Verschiedene experimentelle Modelle zeigten protektive Effekte von Propofol auf einzelne Organe wie beispielsweise das Gehirn, die Leber, die Lunge und das Herz.⁷¹⁻⁸³ Klinische Studien bestätigten ebenfalls die Propofol vermittelte Organprotektion.^{67, 84, 85}

Propofol ist ein wasserunlösliches Alkylphenolderivat. Erhältlich ist Propofol zur intravenösen Injektion in einer Emulsion mit Sojabohnenöl, Eiphosphatid, Glycerol und Natriumhydroxid.⁸⁶ Aufgrund der schlechten Definition der Propofolemulsion wurde Propofol in der vorliegenden Studie in DMSO gelöst, wie auch in den meisten anderen Studien mit Propofol.^{71, 87-89}

Propofol enthält eine Phenol-Hydroxygruppe und ähnelt dadurch α -Tocopherol (Vitamin E), welches ein natürliches Antioxidans ist (s. Abbildung 8). Die antioxidativen Eigenschaften von Propofol resultieren teilweise aus dieser Phenolstruktur und sind vermutlich unter anderem für die zytoprotektiven Effekte von Propofol verantwortlich.²⁵

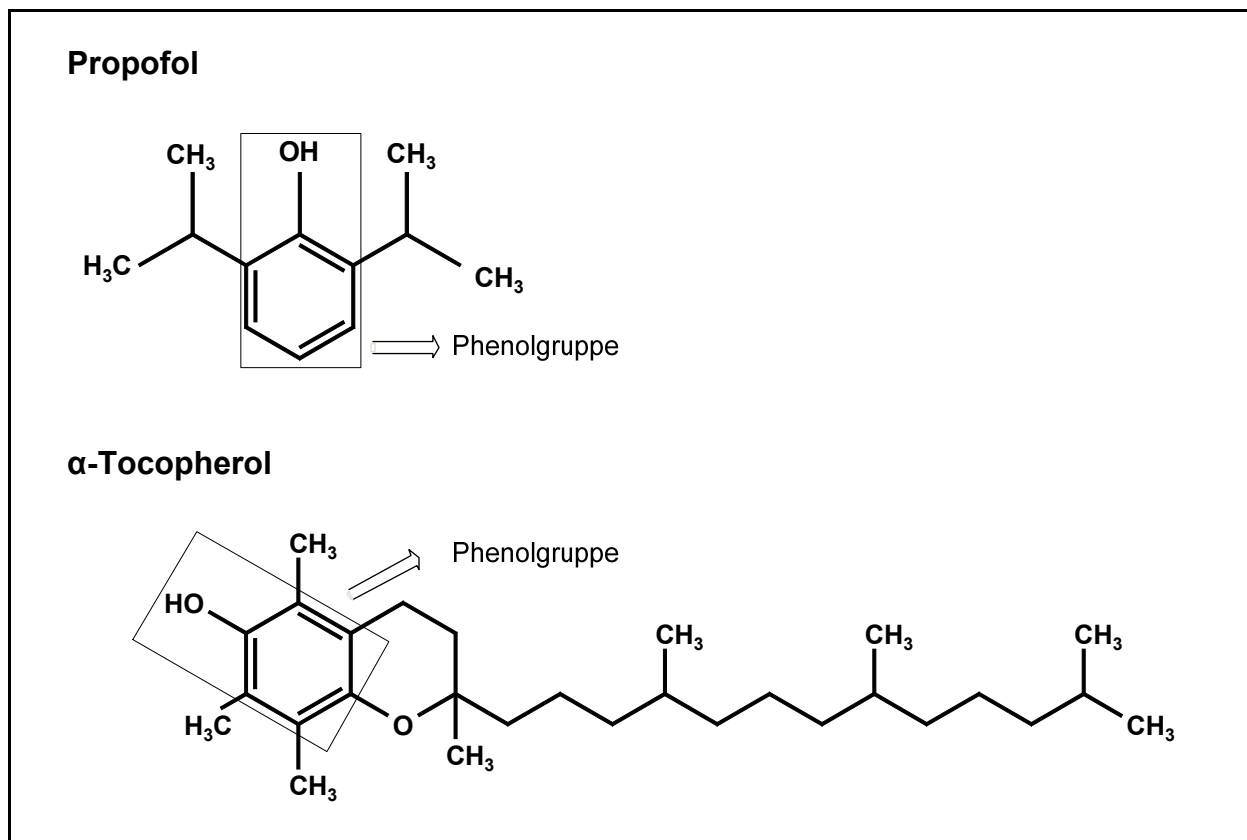


Abbildung 8: Strukturformeln von Propofol und α -Tocopherol

Propofol enthält wie α -Tocopherol (Vitamin E) eine Phenolgruppe und weist antioxidative Eigenschaften auf.

Darüber hinaus kann Propofol Signalwege, beispielsweise den Glutamat-Signalweg im Rahmen einer Ischämie des Gehirns, induzieren und regulieren.⁹⁰⁻⁹³ Die

zytoprotektiven Eigenschaften von Propofol könnten daher neben den direkten antioxidativen Eigenschaften indirekt über die Induktion von zelleigenen, antioxidativen Mechanismen vermittelt werden. Direkte antioxidative Effekte wurden von zahlreichen Gruppen gezeigt.⁶⁴⁻⁶⁶ Indirekte Effekte von Propofol konnte unsere Arbeitsgruppe im Jahr 2012 an humanen Neuroblastomzellen darstellen.⁹⁴

1.7 Zielsetzung der Arbeit

I/R-Schäden des Darms begünstigen eine Dysfunktion der Darmbarriere, die Translokation von Bakterien und können letztendlich zu einem Multiorganversagen führen. Diverse Studien zeigen, dass I/R-Schäden durch Gabe des intravenösen Anästhetikums Propofol reduziert werden können.^{5, 15-17} Jedoch sind die Wirkungen von Propofol sowie die zellulären und molekularen Mechanismen des Anästhetikums auf den Darm weitgehend unbekannt.¹⁰⁻¹²

Daher war es Ziel dieser Arbeit ein geeignetes in-vitro Hypoxiemodell zu etablieren und die zellulären und molekularen Mechanismen des Anästhetikums Propofol unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen an Darmzellen in-vitro zu evaluieren. Im Vordergrund der Analysen standen dabei Untersuchungen zu den Effekten von Propofol auf die ROS-Spiegel, Wasserstoffperoxidspiegel sowie dem Einfluss von Propofol auf die Katalaseexpression.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle verwendeten Substanzen wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth, Sigma und Merck; Deutschland (D) bezogen und waren von höchstmöglichem Reinheitsgrad.

2.1.1 Zellkultur

Zell-Schaber, BD Biosciences, USA; Black clear bottom 96 Well Platten, Cellstar Kulturflaschen 25 cm² und 75 cm², Greiner Bio-One, D; GlutaMAX 100x, Invitrogen, USA; Neubauer Zählkammer improved, Neubauer, D; Nunclon Surface 6 Well Platten, -12 Well Platten und -96 Well Platten, Nunc, D; DMEM/HG, Dulbecco's PBS 1x, Fetales Kälberserum Gold, Gentamicin 50 mg/ml, MEM Non Essential Amino Acids 100x, Trypsin-EDTA 1x, PAA, Österreich; Phosphatase inhibitor cocktail tablets, Protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics, D; Katalase (Aktivität 2950 U/mg), Glukose Oxidase (Aktivität 17300 U/g), Trypan Blau Lösung 0,4 %, Sigma-Aldrich, USA.

Pufferlösungen und Kulturmedien

Z1	PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,78 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 0,24 g KH ₂ PO ₄ , ad 1000 ml Aqua dest., pH=7,4
Z2	DMEM/HG 10 % FKS	DMEM/HG mit 10 % fetalem Kälberserum, NEAA und Gentamicin (0,05 mg/ml)
Z3	DMEM/HG 1 % FKS	DMEM/HG mit 1 % fetalem Kälberserum, NEAA und Gentamicin (0,05 mg/ml)

2.1.2 Proteinbiochemie

Filterpapier Mini Trans-Blot, Bio Rad, D; Page Ruler, Fermentas, D; ECL-Plus Western Blotting Detection System (RPN2132), High Performance Chemiluminescence Film Amersham Hyperfilm ECL, PVDF-Transfer-Membran (45 µm), GE Healthcare, UK; PBSA, PAA, Österreich; Phosphatase inhibitor cocktail tablets, Protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics, D; Roti-Quant, Roth, D; Starting Block T20 (TBS) Blocking Buffer, Thermo Scientific, USA.

Pufferlösungen

P1	Gelpuffer I	45,42 g Tris, 1 g SDS, ad 250 ml Aqua dest.
P2	Gelpuffer II	15,14 g Tris, 1 g SDS, ad 250 ml Aqua dest.
P3	PBSA-Complete	40 ml PBSA steril, 1600 µl Proteaseinhibitor
P4	RIPA-Puffer	4,38 g NaCl, 5 ml NP-40, 5 g SDC, 5 ml SDS (10 %), 3,03 g Tris, ad 500 ml Aqua dest.
P5	RIPA-full	5 ml RIPA (P4), 0,5 ml Phosphataseinhibitor, 0,2 ml Proteaseinhibitor
P6	Lämmli-Puffer (2x)	2,4 ml Tris (1 M), 0,8 g SDS, 4 ml Glycerol (100 %), 0,01 % BPB, 1 ml Mercaptoethanol, ad 13 ml Aqua dest.
P7	SDS- Laufpuffer	12,2 g Tris, 57,6 g Glycin, 4 g SDS, ad 4000 ml Aqua dest.
P8	Transferpuffer	28,8 g Glycin, 6,06 g Tris, 400 ml Methanol, ad 2000 ml Aqua dest., pH=7,5
P9	TBST-Puffer	6,06 g Tris, 20,25 g NaCl, 5 ml 0,5 M EDTA, 2,5 ml Tween 20, ad 2500 ml Aqua dest., pH=7,5

Reagenz	Trenngel 10 %	Sammelgel 4,5 %
P1	2,60 ml	-
P2	-	2,60 ml
Acrylamid	2,50 ml	1,13 ml
Aqua dest.	4,81 ml	6,19 ml
APS	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl

Tabelle 1: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Primärantikörper				
Zielprotein	MW [kDa]	Spezies	Verdünnung	Hersteller/ Katalognummer
CAT	65	Kaninchen	1/15000	Abcam, ab 1877
Aktin	42	Ziege	1/1000	Santa Cruz, sc-1615
Sekundärantikörper				
Schwein anti-Kaninchen IgG-HRP			1/10000	Dako, P0217
Kaninchen anti-Ziege IgG-HRP			1/10000	Santa Cruz, sc-2922

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

2.1.3 Molekularbiologie

Reverse Transkriptase MultiScribe, RNase Inhibitor, 10x RT Puffer, 10x RT Random Primer, Applied Biosystems, USA; Agarose GTQ, DEPC Wasser, Ethidiumbromidlösung 1 %, 100 bp Gen Ruler DNA-Ladder, 6x DNA Loading Dye, Fermentas, D; BSA 5 mg/ml, New England BioLabs, USA; RLT Puffer (1015750), RNAeasy Mini Kit (74106), Qiagen, D; dNTPs Mix 25x 100 mM für die reverse Transkription, dNTPs Mix 20 mM für die Polymerasekettenreaktion (aus dATP 100 mM, dCTP 100 mM, dGTP 100 mM, dTTP 100 mM), 10x Reaktionspuffer B, MgCl₂, Taq Polymerase (Hot Fire Pool DNA Polymerase 1, HF0573), Solis BioDyne, Estland.

Verwendete Primer	
<p>CAT</p> <p>F: 5'- AGC TGG TTA ATG CAA ATG GG</p> <p>R: 5'- TCT GTT CCT CAT TCA GCA CG</p> <p>Annealing-Temperatur: 55 °C,</p> <p>Amplicon-Größe: 705 bp</p>	<p>18srRNA</p> <p>F: 5'- GTT GGT GGA GCG ATT TGT CTG G</p> <p>R: 5'- AGG GCA GGG ACT TAA TCA ACG C</p> <p>Annealing-Temperatur: 55 °C,</p> <p>Amplicon-Größe: 348 bp</p>

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Pufferlösungen

- M1** RLT-Puffer (Qiagen, s. 2.1.3)
- M2** 10x RT-Puffer (Applied Biosystems, s. 2.1.3.)
- M3** 10x Reaktionspuffer B (Solis BioDyne, s. 2.1.3)
- M4** TAE-Puffer (50x): 242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA, ad 1000 ml Aqua dest., pH=8,0
- M5** 6x DNA Loading Dye (Fermentas, s. 2.1.3)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Hintergrund:

I/R-Schäden verursachen im Gastrointestinaltrakt eine Dysfunktion der intestinalen Barriere.¹⁵⁻¹⁷ Verschiedene Studien zeigen, dass die Gabe von Anästhetika I/R-Schäden reduzieren kann.¹⁰⁻¹² Um die zellulären und molekularen Mechanismen von Propofol unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen näher zu analysieren, wurde das CaCo-2-Zellkulturmodell, als ein Modell der intestinalen Barriere³⁵, verwendet (humane epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen; European Collection of Cell Cultures Salisbury, Großbritannien).

Durchführung:

Die Anzüchtung der CaCo-2 Zellen erfolgte mit DMEM/HG 10 % FKS (**Z2**) bei 37 °C und 5 % CO₂. Alle 5 bis 7 Tage fand ein Mediumwechsel statt. Für die Experimente wurde DMEM/HG 1 % FKS (**Z3**) verwendet, da hohe Konzentrationen von fetalem Kälberserum mit den Nachweisassays für ROS und Wasserstoffperoxid interferieren. Um Subkulturen anzulegen wurden die Zellen mit 37 °C warmen PBS (**Z1**) gewaschen; für 75 cm² Kulturflaschen fanden 7 ml PBS (**Z1**) und für 25 cm² Kulturflaschen 5 ml PBS (**Z1**) Verwendung. Zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurde Trypsin-EDTA, 5 ml bei 75 cm² Kulturflaschen und 3 ml bei 25 cm² Kulturflaschen, auf die Zellen gegeben und 3-5 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Hinzufügen von DMEM/HG 10 % FKS (**Z2**), für 75 cm² Kulturflaschen fanden 10 ml und für 25 cm² Kulturflaschen 6 ml Verwendung. Die Ablösung der restlichen am Boden haftenden Zellen geschah mechanisch und anschließend erfolgte die Zentrifugation (200 g, 10 min). Die

Zellpellets wurden in DMEM/HG 10 % FKS (**Z2**) resuspendiert. Für 75 cm² Kulturflaschen wurden 10–15 ml, für 25 cm² Kulturflaschen 10 ml und für 6-well-Platten 3 ml pro well DMEM/HG 10 % FKS (**Z2**) verwendet. In die mit DMEM/HG vorbereiteten Kulturgefäße wurden die resuspendierten Zellen gegeben und anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert bis sie die gewünschte Konfluenz erreicht hatten. Die Beurteilung der Konfluenz und der Morphologie erfolgte mit einem Leica DMIL Mikroskop und die fotografischen Aufnahmen der Zellen entstanden mit einer LMscope Kamera und der Software XnView v1.95.4.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst wie beim Anlegen von Subkulturen behandelt: waschen mit 37 °C warmen PBS (**Z1**) und Inkubation mit Trypsin–EDTA. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe von DMEM/HG 10 % FKS (**Z2**). Die Zellen wurden mechanisch vom Boden abgelöst, zentrifugiert (200 g, 10 min) und das Pellet wurde in 5,5 ml DMEM/HG 10 % FKS (**Z2**) gelöst. In jedem Cryocup fand die Vermengung von 100 µl DMSO und 900 µl Zellsuspension statt. Die Cryocups wurden in einem Isopropanolcontainer (Mr. Frosty Cryo 1 °C Freezing Container, Nalgene) über 24 h bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h erfolgte die Einlagerung der Cryocups in einem Stickstofftank.

Das Auftauen der Cryocups fand über 30 sec in einem 37 °C warmen Wasserbad statt. Die DMSO haltige Zellsuspension wurde in 10 ml DMEM/HG 10 % FKS (**Z2**) pipettiert und zentrifugiert (200 g, 10 min) um das DMSO zu entfernen. Die Auflösung des Zellpellets geschah in DMEM/HG 10 % FKS (**Z2**) und anschließend erfolgte der Transfer der gelösten Zellen in Zellkulturflaschen.

2.2.2 In-vitro Hypoxie

Hintergrund:

In den vergangenen Jahren ist es unserer Arbeitsgruppe gelungen, ein Enzym basiertes in-vitro Ischämie/Reperfusion(I/R)-Modell zu etablieren.⁵¹⁻⁵⁴ Dieses Modell eignet sich zur Untersuchung Hypoxie induzierter I/R-Schäden auf zellulärer und molekularer Ebene in einem definierten Zellkultursystem^{45, 50, 95} und konnte unter anderem für Untersuchungen der Effekte von Acetylsalicylsäure auf Apoptose und Signalwege in CaCo-2 Zellen eingesetzt werden. Darüber hinaus fand das Modell Anwendung für Untersuchungen protektiver Effekte von Patientenserum an CaCo-2 Zellen, sowie zur Evaluation der zytoprotektiven Effekte von Sevofluran auf neuronale Zellen und der Prüfung der Reduktion von Hypoxie induzierten

Zellschäden durch milde Hypothermie und Postkonditionierung mit Katalase *in vitro*.⁵¹⁻⁵⁴

Durchführung:

Die Anzucht der Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben unter normoxischen Bedingungen bei 37 °C (s. 2.2.1 Zellkultur). Die Induktion einer Hypoxie resultierte durch den Austausch des Normoxiemediums gegen Hypoxiemedium. Die Herstellung des Hypoxiemediums erfolgte dabei durch den Zusatz von Glukoseoxidase und Katalase zu 37 °C warmen DMEM/HG 1 % FKS (**Z3**). Die Glukoseoxidase lag im Medium mit einer finalen Aktivität von 4 U/ml und Katalase mit einer Endaktivität von 960 U/ml vor.

2.2.2.1 Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks

Hintergrund:

Zur Prüfung der Hypoxie und um die Kinetik der Hypoxieinduktion zu ermitteln, wurde der Sauerstoffpartialdruck im Medium bestimmt.

Durchführung:

Die Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) fand mit einem Tissue Oxygen Pressure Monitor (Licox cmP® Oxygen Catheter, Integra, USA) statt. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur über 240 min. Für die Aufzeichnung des pO_2 im Medium nach induzierter Hypoxie wurde 10 ml DMEM/HG 1 % FKS (**Z3**) mit 100 μ M Propofol kurz vor Messbeginn versetzt. Zum Zeitpunkt t_0 wurden Katalase und Glukoseoxidase hinzugefügt und kurz gemischt. Während der ersten 10 min wurde der pO_2 alle 30 sec, nach 10 min alle 60 sec und nach 20 min alle 5 min abgelesen. Nach 60 min, 120 min und 240 min wurde ebenfalls der pO_2 registriert. Als Lösungsmittelkontrolle diente ein Ansatz, der anstatt mit Propofollösung mit DMSO 0,04 % versetzt wurde. Je Ansatz wurden drei unabhängige Wiederholungen durchgeführt.

2.2.3 Behandlung der CaCo-2 Zellen mit Propofol

Hintergrund:

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Anästhetika I/R-Schäden reduzieren können. Allerdings werden die zellulären und molekularen Mechanismen kontrovers diskutiert.¹⁰⁻¹² Um die Effekte von Propofol auf CaCo-2 Zellen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen zu evaluieren, wurden CaCo-2 Zellen mit Propofol

behandelt. Die eingesetzten Propofolendkonzentrationen in den Medien 30 μM und 100 μM wurden basierend auf den beschriebenen Propofolplasmakonzentrationen im Menschen, die während Sedierung und Narkose erreicht werden (s. Abbildung 9), gewählt.⁹⁶

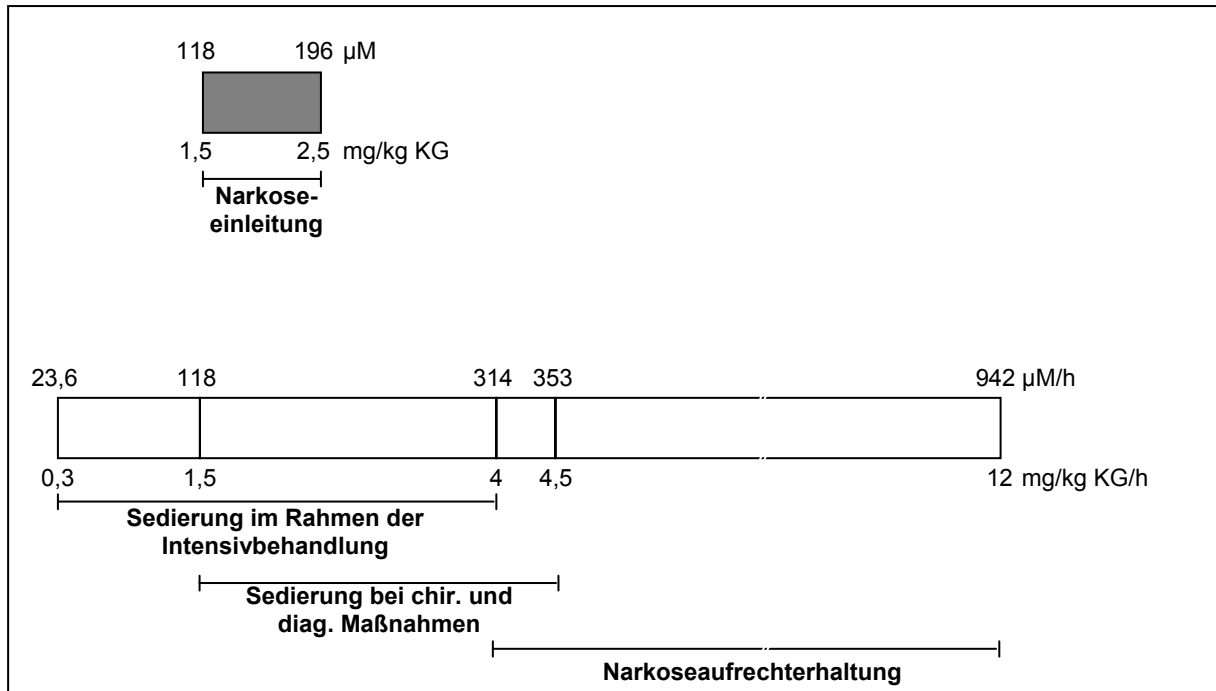


Abbildung 9: Dosierungen von Propofol: Umrechnung in Molaritäten

(Bei der Berechnung wurde von einer 70 kg Person und 5 l Blut ausgegangen. Molekulargewicht Propofol = 178,27 g/mol. KG = Körpergewicht)

Durchführung:

CaCo-2 Zellen, die die gewünschte Konfluenz für das jeweilige Experiment erreicht hatten, wurden Hypoxie, Hypoxie + Propofol 30 μM und Hypoxie + Propofol 100 μM ausgesetzt und jeweils mit den respektiven Normoxiekontrollen verglichen. Zunächst erfolgte die Herstellung des Hypoxiemediums (s. 2.2.2 In-vitro Hypoxie). Anschließend fand die Zugabe von Propofol (30 μM und 100 μM) bzw. DMSO (0,04 %) als Kontrolle zu dem Normoxiemedium sowie zu dem Hypoxiemedium statt (s. Abbildung 10). Bevor die Medien auf die Zellen gegeben wurden, fand bei jedem Experiment eine Kontrolle statt, ob der pO_2 unter 5 mmHg lag. Die Inkubation der Zellen erfolgte jeweils für 1 h mit den vorbereiteten Medien bei 37 °C und 5 % CO_2 . Nach 1 h wurden alle Zellen einmal mit 37 °C warmen DMEM/HG 1 % FKS (**Z3**) gewaschen, um anhaftende Rückstände zu entfernen. Anschließend erfolgte die

Zugabe von 37°C warmen DMEM/HG 1% FKS (**Z3**) zu den Zellen. Die Probenentnahme für die unterschiedlichen Experimente fand zu verschiedenen Zeitpunkten statt.

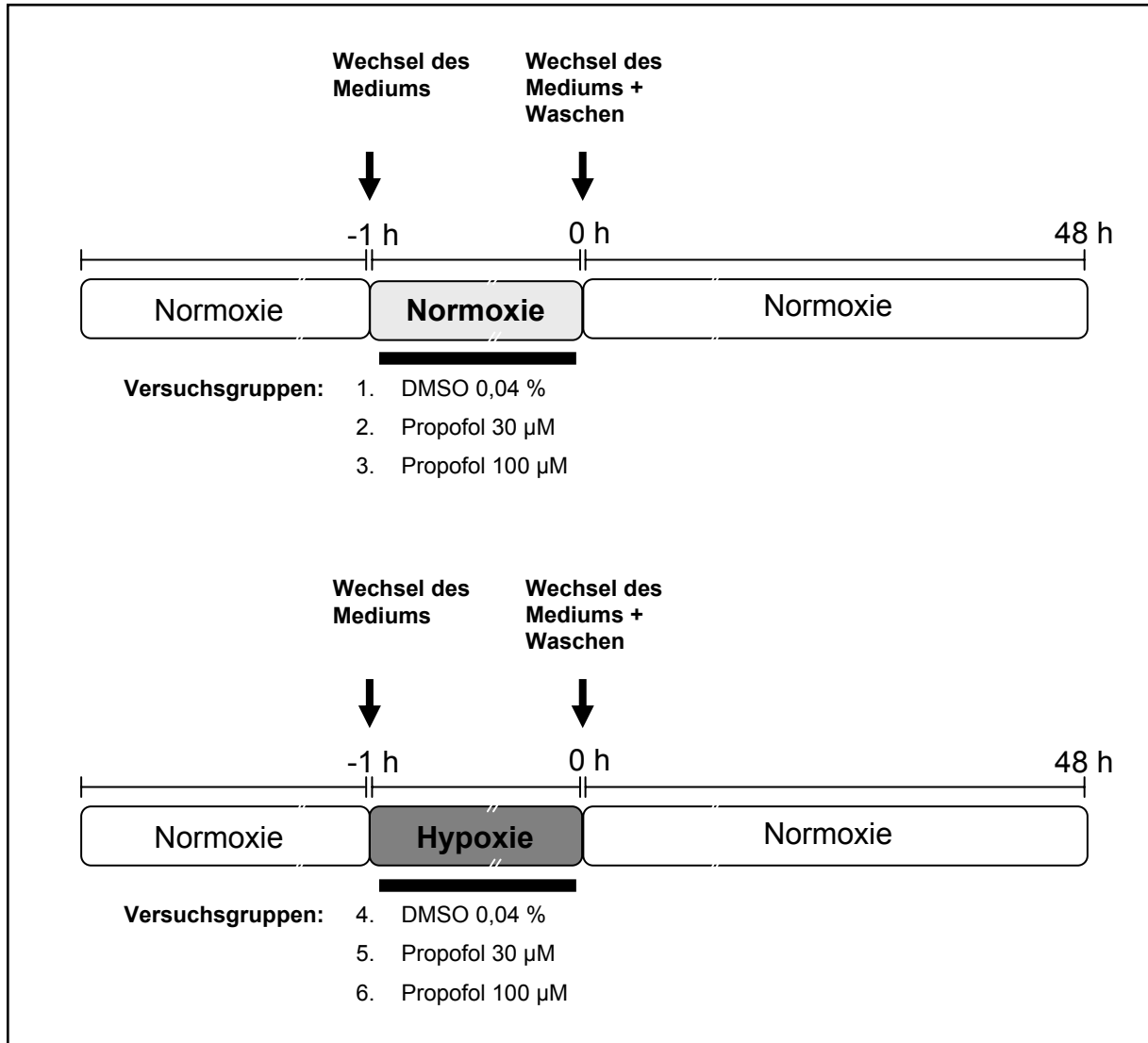


Abbildung 10: Versuchsaufbau der Studie und zeitlicher Ablauf

Für **Quantifizierungen der reaktiven Sauerstoffspezies** wurden die Zellen in schwarzen 96 Well Platten mit lichtdurchlässigem Boden ausgesät und stimuliert. Die ROS-Menge wurde mittels Dichlorodihydrofluoresceindiacetat-Assays bestimmt (s. 2.2.4).

Um die **Wasserstoffperoxidspiegel** in den Medien zu bestimmen, wurde jeweils 500 μ l Medium aus den 12 Well Platten entnommen. Die Quantifizierung der Peroxidkonzentration in den entnommenen Medien erfolgte durch ein QuantiChrom Peroxide Assay Kit (BioAssay Systems, USA) (s. 2.2.5).

Für den **Proteinnachweis durch Western Blot** wurden die Zellen in den 75 cm² Flaschen mit je 6 ml PBSA-Complete (**P3**) gewaschen. Die Proteinisolierung erfolgte mit eiskalten Lösungen und auf Eis. Anschließend wurden 200 µl RIPA-full (**P5**) hinzugegeben und die Zellen abgeschabt. Die Zelllösung wurde für 15 min im Ultraschallbad behandelt, fünfmal in eine Insulinspritze aufgezogen und dann 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Unter Verwendung des Roti-Quant Assays fand eine Proteinbestimmung nach Bradford statt (s. 2.2.6).

Für die **molekularbiologischen Experimente** wurde aus den CaCo-2 Zellen, die in 25 cm² Zellkulturflaschen gezüchtet und der gewünschten Behandlung ausgesetzt waren, RNA isoliert. Hierzu wurden die Zellen einmal mit 37 °C warmen PBS (**Z1**) gewaschen. Anschließend wurde 600 µl RLT-Puffer (**M1**) in jede Flasche gegeben. Mit Zellschabern wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst und in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert. Die RNA wurde durch die Verwendung des RNeasy-Kits (Qiagen, D) nach Herstellerangaben isoliert (s. 2.2.7).

Weitere Angaben zum Zeitpunkt der Probenentnahme und Konfluenz der Zellen finden sich in Tabelle 4.

Methode	Art der Probe	Zeitpunkt der Probenentnahme	Konfluenz der Zellen
ROS-Assay	Zellen + Kulturmedium	2 h, 4 h, 24 h und 48 h nach Hypoxie	40 %
H ₂ O ₂ -Assay	Kulturmedium	24 h und 48 h nach Hypoxie	30-40 %
Western Blot	Protein	4 h und 20 h nach Hypoxie	70-80 %
RT-PCR	RNA	1 h nach Hypoxie	60-80 %

Tabelle 4: Art der Proben, Zeitpunkte der Probenentnahmen und Konfluenz der Zellen zu Beginn des Versuchs

2.2.4 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

Hintergrund:

ROS spielen eine entscheidende Rolle bei I/R-Schäden. Vor allem während der Reperfusion fallen große Mengen an schädlichen Sauerstoffradikalen an, die mit zellulären Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren reagieren und hierdurch zu

zellulärer Dysfunktion sowie Zelltod führen können. Die intestinale Mukosa reagiert dabei extrem sensitiv auf ROS.^{1, 5, 17}

Durchführung:

Zur fluorometrischen Quantifizierung der ROS wurde jedes Well der schwarzen 96 Well Platten mit lichtdurchlässigem Boden mit 2 µl DCF (0,49 mg/ml Dichlorodihydrofluoresceindiacetat) und 198 µl DMEM/HG 1 % FKS (**Z3**) versetzt. Die kinetische Messung erfolgte bei 37 °C nach 0 min und nach 30 min mit einem Fluoreszenz ELISA Reader (Genios FL, Tecan, D). Die Fluoreszenzmessung fand bei einer Excitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm statt. Eine DCF-Standardkurve wurde angelegt und anhand dieser konnte mit der Software Magellan V6.6. sowie Excel 2003 die Menge an ROS bestimmt werden.

2.2.5 Wasserstoffperoxidassay

Hintergrund:

Peroxide nehmen eine zentrale Stellung unter den ROS ein. Viele pathologische Mechanismen im Körper sind mit erhöhten Peroxidkonzentrationen assoziiert, beispielsweise I/R-Schäden.⁹⁷ Zur Quantifizierung der Peroxidkonzentration in den Proben wurde ein QuantiChrom Peroxide Assay Kit (BioAssay Systems, USA) verwendet. Dieser basiert auf der Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Diese Änderungen können kolorimetrisch bei 620 nm gemessen werden.⁵⁴

Durchführung:

Um die Wasserstoffperoxidspiegel in den Medien zu bestimmen, wurde jeweils 20 µl Probe mit 100 µl Detektionslösung in eine 96 well Platte pipettiert. Die Detektionslösung wurde nach den Herstellerangaben angesetzt. Darüber hinaus wurde eine Wasserstoffperoxid-Standardkurve basierend auf den Herstellerangaben angelegt. Nach 30 min wurde bei 620 nm mit einem ELISA Reader (Sunrise, Tecan, D) die Absorption bestimmt. Durch Verwendung der Standardkurve mit bekannten Wasserstoffperoxidkonzentrationen erfolgte die rechnerische Ermittlung der Wasserstoffperoxidkonzentration in der entsprechenden Probe mithilfe der Software Magellan V6.6. sowie Excel 2003.

2.2.6 Western Blot

Hintergrund:

Der Western Blot wird zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen in Proben verwendet. Zunächst werden dabei denaturierte Proteine durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es folgt der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Transfer-Membran (Blot) und anschließend die Proteindetektion mittels Antikörpern. Der Primärantikörper bindet dabei spezifisch an antigene Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins. An die Fc-Region des Primärantikörpers bindet ein speziesspezifischer, markierter Sekundärantikörper, der zur Detektion dient.⁹⁸

Durchführung - Probenvorbereitung:

Eine Proteinbestimmung nach Bradford wurde unter Verwendung des Roti-Quant Assays nach Herstellerangaben durchgeführt. Anhand einer Standardkurve fand die Kalkulation der Proteinkonzentration in der Probe statt. Jeweils 30 µg der Proteinproben wurden auf ein einheitliches Volumen mit RIPA-Complete (**P5**) aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit 2x Lämmli-Puffer (**P6**) vermengt und drei Minuten bei 97 °C erhitzt.

Durchführung - Gelelektrophorese:

Für die Gelelektrophorese wurden ein 10 % Trenngel und ein 4,5 % Sammelgel verwendet (s. Tabelle 1). Das Sammelgel dient dazu die Proteine, bevor sie in das Trenngel wandern, zu einer scharfen Bande zu fokussieren. Hierdurch wird eine gute Auftrennung und hohe Schärfe der Proteinbanden erzielt. Zum Gießen des Gels wurden Glasplatten mit einem 1 mm breiten Spalt verwendet, welche in eine Gießvorrichtung eingespannt und mit Aqua dest. gewaschen wurden. Die verschiedenen Komponenten des Trenngels wurden vermengt und bis 1 cm unter den Rand in die Kammer eingefüllt. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um es feucht zu halten und eine glatte Oberfläche zu erzielen. Nach 30 min wurde das Sammelgel vorbereitet, welches nach Absaugen des Isopropanols auf das Trenngel gegossen wurde. In das Sammelgel wurde ein 1 mm Kamm für die Geltaschen eingesteckt. Nach weiteren 30 min wurden der Kamm aus dem Gel entfernt und die Glasplatten mit dem Gel in eine Laufvorrichtung eingespannt. Die Laufvorrichtung wurde mit SDS-Laufpuffer (**P7**) befüllt. In die Geltaschen wurden die Proben, jeweils gleiche Mengen an Protein (30 µg) sowie ein Proteinmarker als

Größenstandard pipettiert. Der Lauf erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA über 90 Minuten.

Durchführung – Transfer der Proteine auf eine Membran (Blot):

Für den Transfer der Proteine wurde die Wet-Blot Methode (Mini Trans-Blot, Bio-Rad, USA) verwendet. Diese erfolgt nach dem Sandwichverfahren. Zunächst wurde das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und eine PVDF-Transfer-Membran eine Minute lang in Methanol getränkt. Für das Sandwichverfahren wurde auf das schwarze Kunststoffgitter zunächst ein in Transferpuffer getränkter Schaumstoffschwamm gelegt. Auf den Schwamm folgte ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier, das Trenngel, eine PVDF-Transfer-Membran, wiederum ein Transferpuffer getränktes Filterpapier und ein Schaumstoffschwamm (s. Abbildung 11). Anschließend wurde das Sandwich geschlossen und in die mit kaltem Transferpuffer gefüllte, eisgekühlte Transfervorrichtung eingebaut. Hierbei war zu beachten, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten bildeten und dass die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode zeigte. Für den einstündigen Transfer lag eine konstante Spannung von 100 V an.

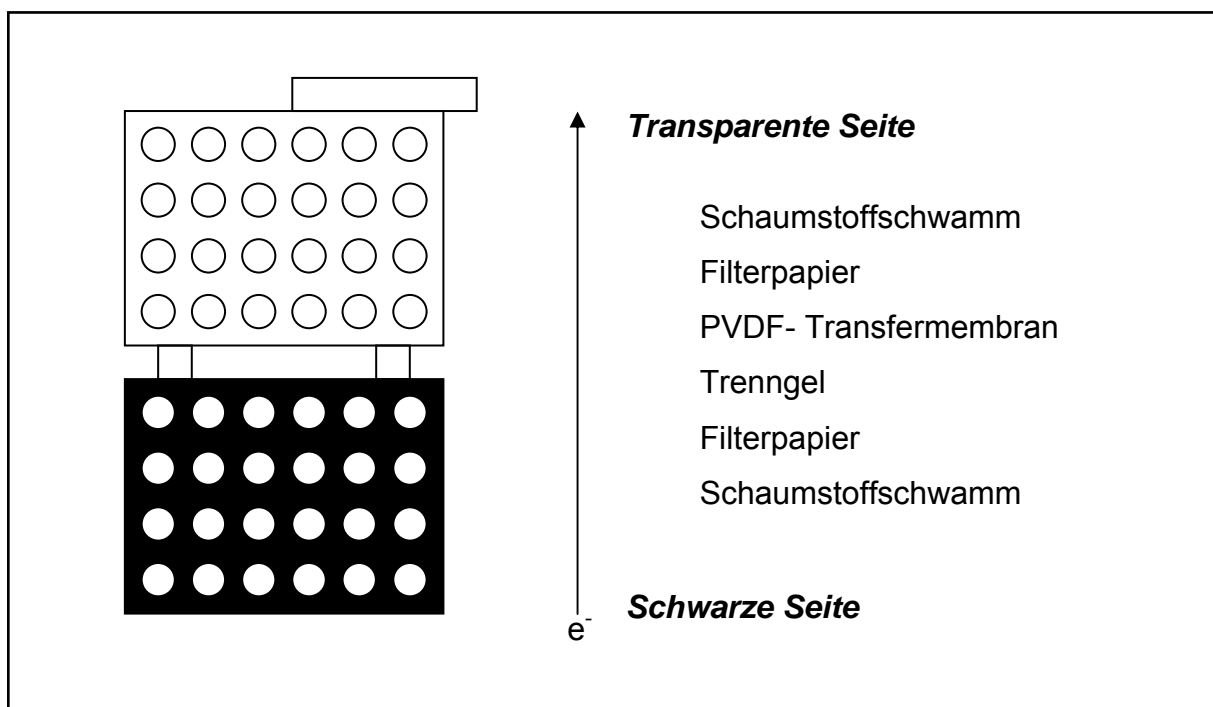


Abbildung 11: Aufbau des Blots (Sandwichverfahren)

Für das Sandwichverfahren erfolgte der Aufbau in oben gezeigter Reihenfolge. Die Schaumstoffschwämme sowie die Filterpapiere wurden in Transferpuffer (**P8**) getränkt. Der einstündige Transfer fand in einer eisgekühlten Transfervorrichtung bei einer konstanten Spannung von 100 V statt.

Durch Inkubation der Membran mit Starting Block T20 Blocking Buffer (für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler) wurden unspezifische Proteinbindestellen abgeblockt, sodass der Nachweisantikörper hier nicht mehr binden konnte. Hierdurch wurde die Sensitivität des Western Blots erhöht.

Durchführung – Detektion:

Die Verdünnung des Primärantikörpers (s. Tabelle 2) erfolgte mit Blocking Buffer nach Herstellerangabe. Auf die Membran, welche sich in einer Klappfolie befand, wurden 2 ml Primärantikörper gegeben und Luftblasen entfernt. Die Antikörperinkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal 5 min mit TBST (**P9**) bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 40 ml des in Blocking Buffer verdünnten Sekundärantikörpers (s. Tabelle 2) für 1 h bei Raumtemperatur. Wiederum wurde die Membran dreimal 5 min mit TBST (**P9**) bei Raumtemperatur gewaschen. Der Ansatz der Detektionslösung erfolgte nach Herstellerangabe. Pro Membran wurde 1 ml Detektionslösung für 5 min verwendet. Anschließend wurden überschüssige Lösung entfernt, die Membran in eine Klappfolie eingelegt und Luftblasen weggestrichen. Ein High Performance Chemiluminescence Film wurde für 5 bzw. 15 min aufgelegt und automatisch oder manuell entwickelt. Der entwickelte Film wurde fotografiert und mit der Software ImageJ (v.1.41o) analysiert. Nach der Entwicklung wurde die Membran abermals dreimal 5 min mit TBST (**P9**) bei Raumtemperatur gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran 45 min bei Raumtemperatur mit dem Aktin-Antikörper (s. Tabelle 2) inkubiert, dreimal 5 min mit TBST (**P9**) bei Raumtemperatur gewaschen und mit einem Sekundärantikörper (s. Tabelle 2) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein zweiter Film entwickelt. Die Intensitäten der entsprechenden Protein- und Aktinbanden wurden mit der Software ImageJ evaluiert und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

2.2.7 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Hintergrund:

Die reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) kombiniert zwei Methoden miteinander: die reverse Transkription und die Polymerasekettenreaktion. Zunächst wird aus einer beliebigen RNA cDNA synthetisiert und anschließend wird diese als Vorlage für eine Polymerasekettenreaktion verwendet. Die

Polymerasekettenreaktion ist ein enzymabhängiges Verfahren zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen. Für die Durchführung der Amplifikation sind zwei Primer (Oligonukleotide), einzelne Nukleosidtriphosphat-Moleküle sowie eine hitzestabile Polymerase, welche aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) isoliert wird, notwendig. Die typische Polymerasekettenreaktion besteht aus drei Schritten: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation, die zyklisch wiederholt werden. Eine anschließende Agarosegelelektrophorese wird verwendet, um Nukleinsäure-Stränge nach ihrer Größe aufzutrennen und die Größe der Fragmente mit Strängen von bekannter Größe zu vergleichen. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wird nach Abschluss der Elektrophorese das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt.⁹⁹

Durchführung – Reverse Transkription:

Um die RNA-Konzentration in der Probe zu bestimmen, wurde die Absorption der RNA-Lösung im Photometer (Photometer Genesys 10 uv, Thermo Spectronic, USA) bei 260 und 280 nm gemessen. Hierzu wurde die RNA 1/100 in einer Quarz Küvette mit Aqua dest. verdünnt. Durch die Bildung des Quotienten 260/280 konnte die Reinheit der Probe überprüft werden. Bei reinen RNA-Proben ergibt sich ein Quotient $\geq 1,8$.

Für die reverse Transkription wurde folgender Reaktionsansatz bei 4 °C angesetzt und durchlief anschließend vier Temperaturschritte (Schritt 1 bis 4) im Thermozykler (Biometra, Thermocycler T Gradient):

200 ng	RNA	Schritt 1	25 °C	10 min
2 µl	10x RT Puffer (M2)	Schritt 2	37 °C	120 min
0,8 µl	dNTPs Mix 25x (100 mM)	Schritt 3	85 °C	5 sec
2 µl	10x Random Primer	Schritt 4	4 °C	∞
1 µl	reverse Transkriptase			
1 µl	RNase Inhibitor			

ad 20 µl DEPC Wasser

Durchführung - Polymerasekettenreaktion:

Für die Polymerasekettenreaktion wurde bei 4° C folgender Reaktionsansatz gewählt:

2 µl cDNA	Schritt 1	95 °C	15 min	
1 µl Primer F (forward)	Schritt 2	95 °C	30 sec	} 35-40 x
1 µl Primer R (reverse)	<i>Denaturierung</i>			
2 µl Reaktionspuffer B (M3)	Schritt 3	55 °C/	30 sec	
1 µl dNTPs Mix 20 mM	<i>Primerhybridisierung</i>	62 °C		
3 µl BSA 5 mg/ml	Schritt 4	72 °C	30 sec	
1,6 µl MgCl ₂ 25 mM	<i>Elongation</i>			
0,5 µl Taq Polymerase (5 U/µl)	Schritt 5	72 °C	10 min	
7,9 µl DEPC Wasser	Schritt 6	4 °C	∞	

Das beschriebene Programm wurde in dem Thermozykler (Biometra, Thermocycler T Gradient) für den jeweiligen Reaktionsansatz angewendet.

Durchführung – Agarosegelelektrophorese:

Für die Herstellung eines 2,5%igen Agarosegels wurden 3,75 g Agarose mit 150 ml TAE-Puffer (**M4**) vermischt, aufgekocht und in eine Elektrophoresekammer (PeqLab Biotechnologie, Elektrophoreseapparatur) gegossen. Jeweils 10 µl des PCR-Produktes wurden mit 2 µl DNA Loading Dye (**M5**) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Um die Größe der Fragmente zu bestimmen, erfolgte eine Auftragung von 10 µl 100 bp Gen Ruler DNA-Ladder in Taschen. Es lag eine Spannung von 90 V über 60 min an die Laufkammer an. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Gels für 30 min in einer Lösung aus 750 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) und 500 ml Aqua dest. Mit einer UV-Licht Kamera (Raytest) fand eine Aufnahme des gefärbten Gels und eine Auswertung mittels der Software ImageJ (v.1.41) statt. Die Bandenintensität des gewünschten Produktes wurde ins Verhältnis zu der Bandenintensität des Housekeeping-Gens 18srRNA gesetzt. Hierdurch war es möglich, semiquantitative Aussagen zur Expression der untersuchten Gene zu machen.

2.2.8 Statistische Analysen

Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und als Triplikate angelegt. Für statistischen Auswertungen fand die Statistiksoftware GraphPad Prism Version 6.6 für Windows Verwendung. Die Datenanalyse erfolgte unter Anwendung von one-sample t-test und one-way ANOVA. Variablen wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Erzeugung einer Hypoxie

Durch die Verwendung des in 2.2.2 beschriebenen Enzym basierten Hypoxiemodells sank der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) schnell unter 5 mmHg. Es stellte sich bereits nach 15 Minuten eine Hypoxie ein, welche über mindestens vier Stunden konstant blieb. Die Zugabe von Propofol 100 μ M sowie des Lösungsmittels DMSO (0,04 %) in das Hypoxiemedium zeigten keine Auswirkungen auf die Entstehung und die zeitliche Kinetik der Hypoxie (s. Abbildung 12 und Abbildung 13).

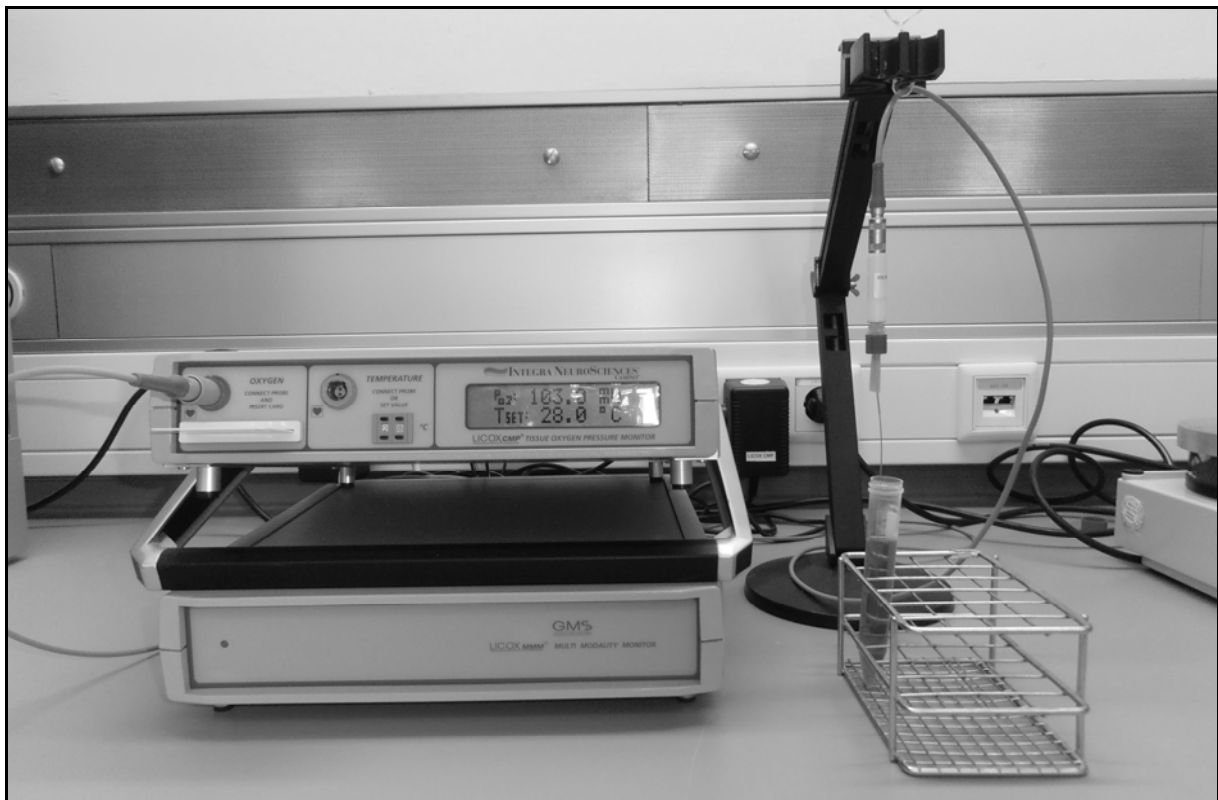


Abbildung 12: Apparatur zur Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks

Der Sauerstoffpartialdruck im Medium wird mit einem Tissue Oxygen Pressure Monitor (Licox cmP® Oxygen Catheter, Integra, USA) bestimmt.

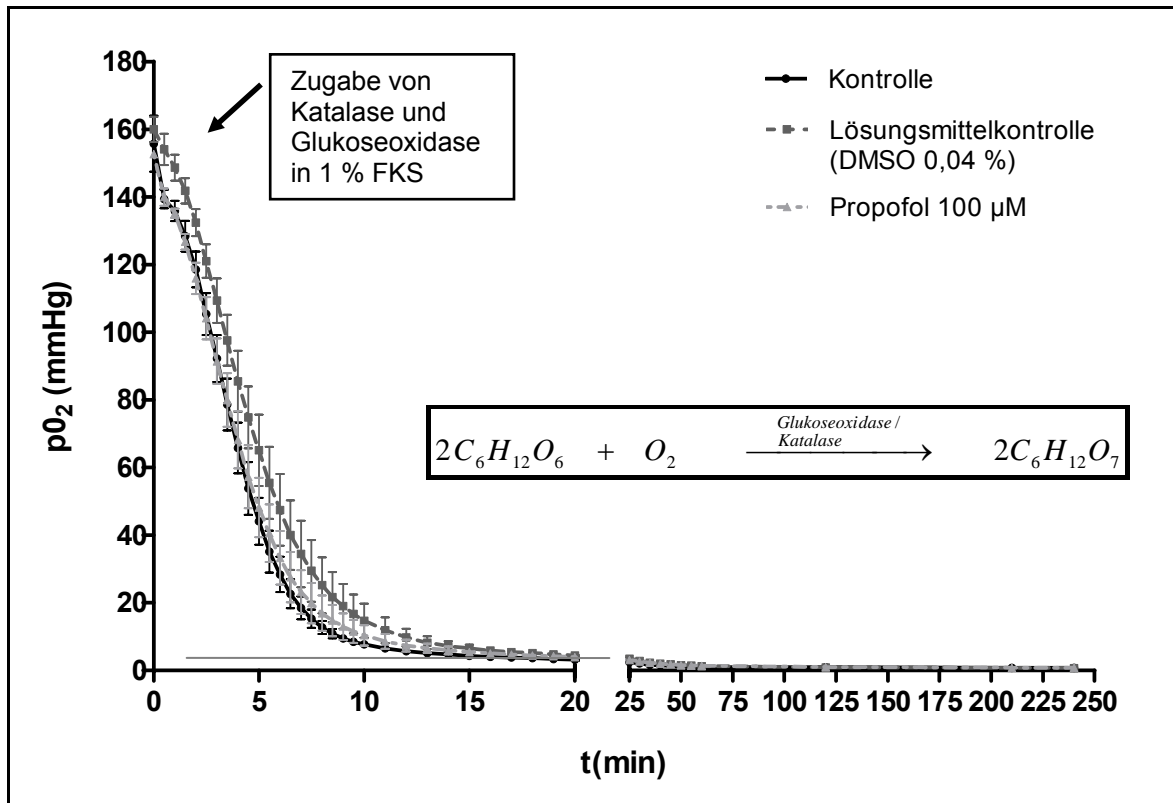


Abbildung 13: Induktion einer enzymatischen Hypoxie

Der Sauerstoffpartialdruck sinkt nach Gabe von Katalase und Glukoseperoxidase rasch unter 5 mmHg und bleibt mindestens vier Stunden konstant. Die Entstehung einer Hypoxie wird weder durch die Zugabe von Propofol 100 µM noch durch DMSO 0,04 % beeinflusst. Die Punkte entsprechen den Mittelwerten \pm SEM. Es wurden jeweils drei unabhängige Bestimmungen durchgeführt.

3.2 Effekte der Hypoxie auf die Morphologie der CaCo-2 Zellen

Die CaCo-2 Zellen wurden, wie in 2.2.1 beschrieben, in Zellkulturflaschen und in Well-Platten gezüchtet. Sie hafteten innerhalb weniger Stunden fest am Boden des Kulturgefäßes und wuchsen innerhalb einiger Tage bis zur gewünschten Konfluenz. Die CaCo-2 Zellen waren polygonal geformt und wuchsen pflastersteinartig. 18 Stunden nach einer einstündigen Hypoxie zeigten sich morphologische Veränderungen. Die Zellen rundeten sich ab, lösten sich von der Unterlage und es wurden lichtmikroskopisch auffällig granuliert Zellen und Zellcluster sowie zahlreiche homogen erscheinende Vakuolen erkennbar (s. Abbildung 14). Diese Befunde deuten auf eine Schädigung der Zellen durch die Hypoxie hin.

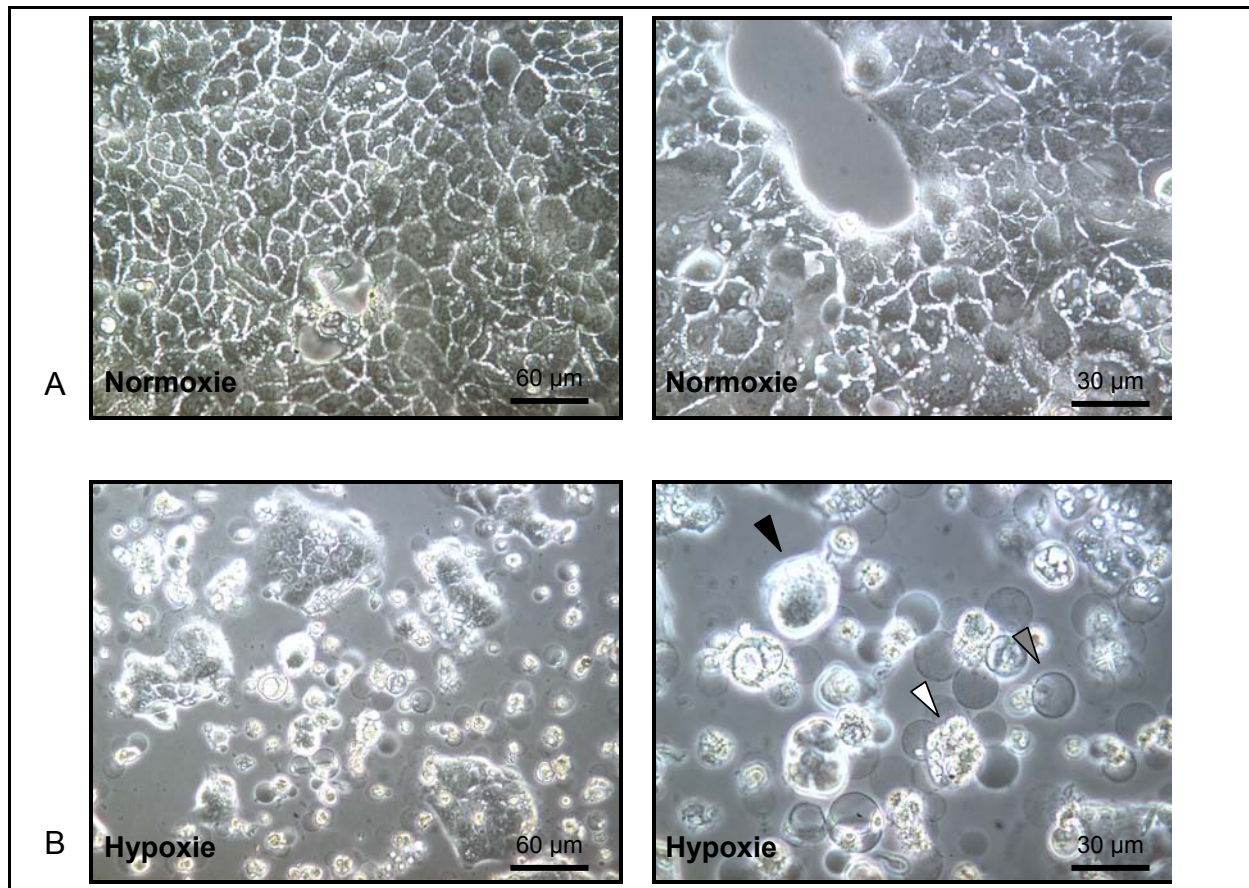


Abbildung 14: Morphologie der CaCo-2 Zellen

A: Die CaCo-2 Zellen zeigen unter Normoxiebedingungen eine polygonale, pflastersteinartige Wuchsform und haften an der Unterlage.

B: 18 Stunden nach einstündiger Hypoxie sind die Zellen vom Boden abgelöst und zeigen einen abgerundeten Phänotyp (schwarzer Pfeilkopf). Einige Zellen und Zellcluster enthalten granuliertes Material (weißer Pfeilkopf), des Weiteren sind homogene Vakuolen erkennbar (grauer Pfeilkopf).

3.3 Effekte von Propofol unter Normoxie und Hypoxie auf die Spiegel von reaktiven Sauerstoffspezies

Um die Spiegel von ROS zu analysieren, wurden fluorometrische Quantifizierungen 2, 24 und 48 Stunden nach Normoxie und Hypoxie durchgeführt. Die Zellen der Hypoxiegruppen wiesen zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu den Zellen der Kontrollgruppen, die einer Normoxie ausgesetzt waren, eine signifikante Zunahme der ROS-Konzentrationen auf (2 h nach Hypoxie: $193,8 \pm 2,2$ a.u. vs. Normoxie: $100,9 \pm 10,7$ a.u.; $P < 0,001$; 24 h nach Hypoxie: $35,3 \pm 4,2$ a.u. vs. Normoxie: $19,7 \pm 1,6$ a.u.; $P < 0,001$; 48 h nach Hypoxie: $60,9 \pm 5,2$ a.u. vs. Normoxie: $15,8 \pm 1,7$ a.u.; $P < 0,001$) (s. Abbildung 15 B, C und D).

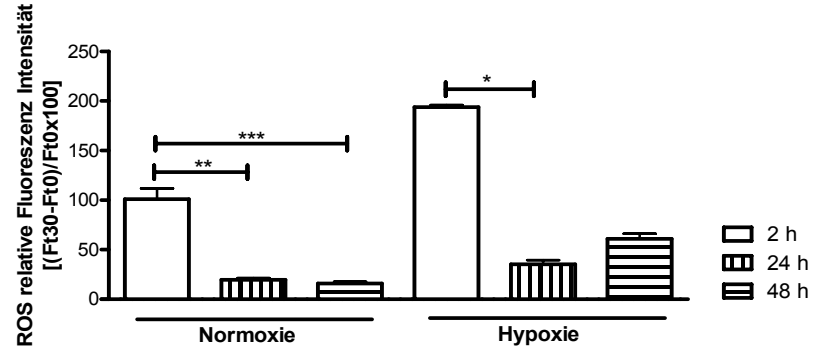
Die ROS-Konzentrationen sanken sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie im zeitlichen Verlauf wieder ab. Die Abnahme der ROS-Konzentration unter Normoxie war nach 24 Stunden und auch 48 Stunden statistisch signifikant (2 h nach Normoxie: $100,9 \pm 10,7$ a.u. vs. 24 h nach Normoxie: $19,7 \pm 1,6$ a.u.; $P < 0,01$; 2 h nach Normoxie: $100,9 \pm 10,7$ a.u. vs. 48 h nach Normoxie: $15,8 \pm 1,7$ a.u.; $P < 0,001$). Unter Hypoxie waren die Ergebnisse nach 24 Stunden statistisch signifikant (2 h nach Hypoxie: $193,8 \pm 2,2$ a.u. vs. 24 h nach Hypoxie: $35,3 \pm 4,2$ a.u.; $P < 0,05$) (s. Abbildung 15 A).

Nach 2 Stunden zeigte sich, dass Hypoxie die ROS-Konzentrationen signifikant erhöht. Propofol hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ROS-Konzentration unter Normoxie und Hypoxie (s. Abbildung 15 B).

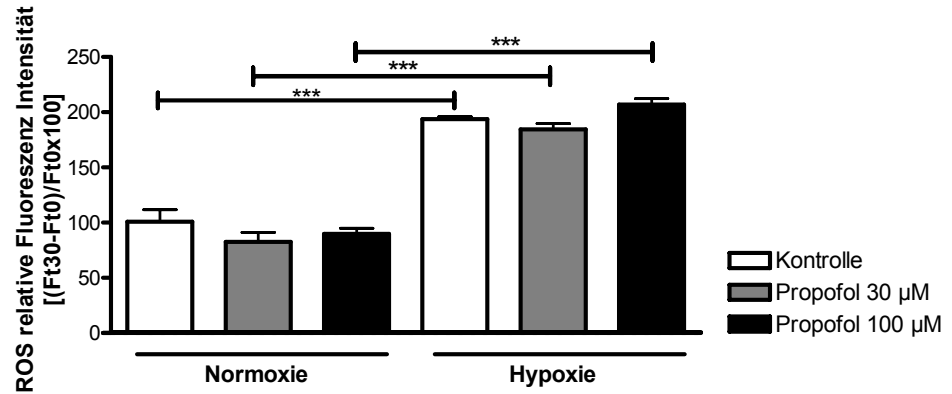
Nach 24 Stunden wurde durch die Applikation von $100 \mu\text{M}$ Propofol die Konzentration von ROS unter normoxischen Bedingungen signifikant reduziert (Normoxie: $19,7 \pm 1,6$ a.u. vs. Normoxie + Propofol $100 \mu\text{M}$: $5,9 \pm 0,9$; $P < 0,01$), während eine Propofolgabe unter Hypoxie keinen Einfluss auf die ROS-Konzentration zeigte (s. Abbildung 15 C).

48 Stunden nach einstündiger Hypoxie zeigte Propofol keinen Einfluss auf die ROS-Konzentration unter Normoxie. Jedoch reduzierte Propofol die Hypoxie induzierte Erhöhung der ROS-Konzentration signifikant (Hypoxie: $60,8 \pm 5,2$ a.u. vs. Hypoxie + Propofol $30 \mu\text{M}$: $47,7 \pm 4,4$ a.u.; $P < 0,05$; Hypoxie: $60,9 \pm 5,2$ a.u. vs. Hypoxie + Propofol $100 \mu\text{M}$: $39,6 \pm 4,1$ a.u.; $P < 0,001$) (s. Abbildung 15 D).

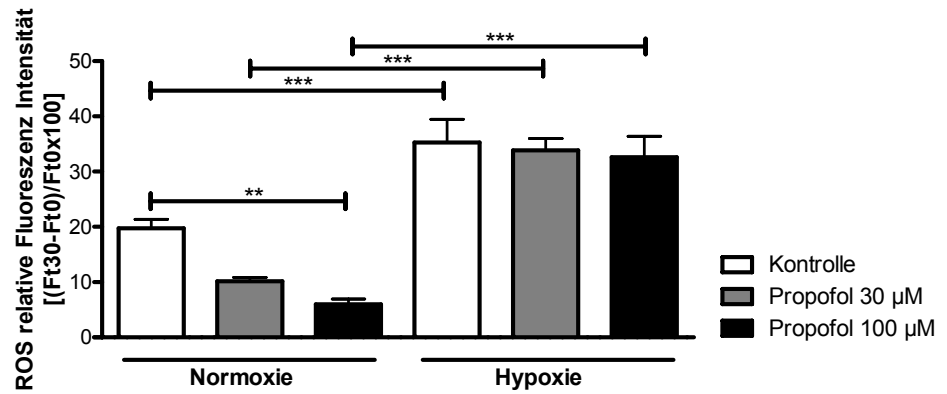
**A: ROS
Zeitverlauf**



B: 2 h



C: 24 h



D: 48 h

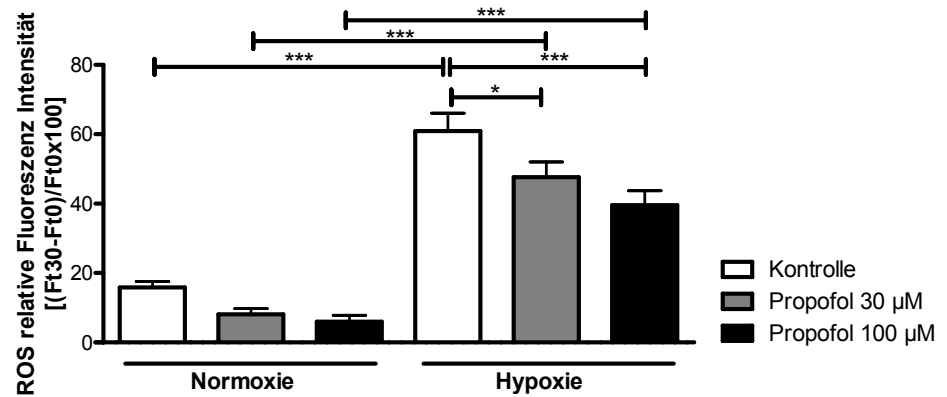


Abbildung 15: Fluorometrische Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies

A: Zeitverlauf der ROS unter Normoxie und Hypoxie

Die ROS-Konzentrationen sinken sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie im zeitlichen Verlauf ab.

B: Effekte von Propofol 2 Stunden nach Normoxie und Hypoxie

2 Stunden nach einstündiger Hypoxie zeigt sich eine signifikante Zunahme der ROS-Konzentrationen.

C: Effekte von Propofol 24 Stunden nach Normoxie und Hypoxie

24 Stunden nach Hypoxie zeigt sich eine signifikante Zunahme der ROS-Konzentrationen. Durch die Gabe von 100 μM Propofol unter normoxischen Bedingungen wird die ROS-Konzentration signifikant gesenkt.

D: Effekte von Propofol 48 Stunden nach Normoxie und Hypoxie

48 Stunden nach Hypoxie zeigt sich eine signifikante Zunahme der ROS-Konzentrationen. Die Konzentration von ROS wird durch Gabe von 30 μM und 100 μM Propofol unter hypoxischen Bedingungen signifikant gesenkt.

Es wurden jeweils acht unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ one-way ANOVA.

3.4 Effekte von Propofol unter Normoxie und Hypoxie auf die Wasserstoffperoxidspiegel

48 Stunden nach der Hypoxie zeigte sich eine signifikante Zunahme der Wasserstoffperoxidkonzentration im Vergleich zur Kontrolle (Hypoxie: $7,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$ vs. Normoxie: $2,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$; $P < 0,05$). Propofolgabe (100 μM) reduzierte die Hypoxie induzierte Erhöhung der Wasserstoffperoxidspiegel (Hypoxie + Propofol 100 μM : $4,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$ vs. Hypoxie: $7,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$; $P < 0,05$). Propofol hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Wasserstoffperoxidspiegel unter normoxischen Bedingungen (s. Abbildung 16).

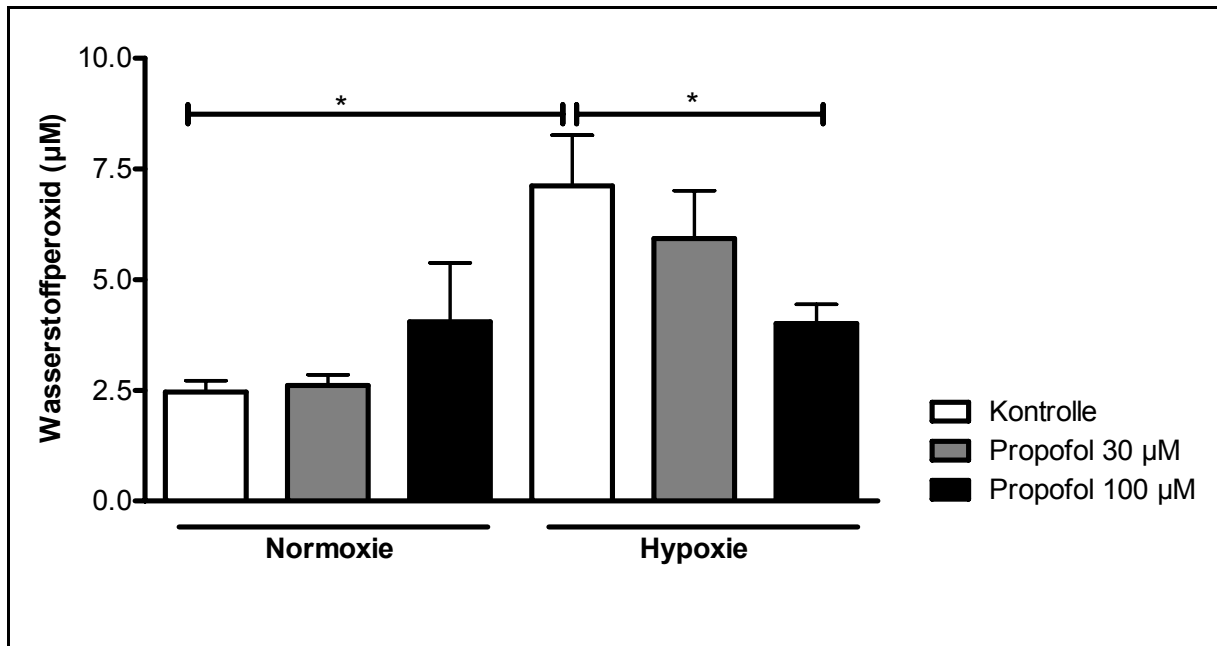


Abbildung 16: Quantifizierung der Wasserstoffperoxidkonzentration

Wasserstoffperoxidassays zeigen eine signifikante Zunahme der Wasserstoffperoxidkonzentration 48 Stunden nach einstündiger Hypoxie. Die Gabe von Propofol 100 µM führt zu einer signifikanten Abnahme der Wasserstoffperoxidkonzentration unter Hypoxiebedingungen. Es wurden jeweils drei unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM. *, $P < 0,05$ one-way ANOVA.

3.5 Effekte von Propofol unter Normoxie und Hypoxie auf die Katalaseexpression

Um die Expression der Katalase, welche die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff katalysiert, zu bestimmen, wurden Western Blot Experimente 4 Stunden nach Hypoxie durchgeführt. Die Western Blots wiesen eine signifikante Zunahme der Menge an exprimierter Katalase im Vergleich zur Normoxiekontrolle auf (Hypoxie: $1,6 \pm 0,2$ a.u. vs. Normoxie=1; $P < 0,05$). Auch die Zellen, die einer Hypoxie ausgesetzt waren und mit Propofol behandelt wurden, zeigten eine signifikante Zunahme der Menge an exprimierter Katalase im Vergleich zur Normoxiekontrolle (Hypoxie + Propofol 30 µM: $2,4 \pm 0,6$ a.u. vs. Normoxie=1; $P < 0,05$; Hypoxie + Propofol 100 µM: $2,5 \pm 0,4$ a.u. vs. Normoxie=1; $P < 0,05$).

Die Behandlung der CaCo-2 Zellen mit 30 µM und 100 µM Propofol während der Hypoxie führte verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (0,04 % DMSO) zu einer

Zunahme der Menge an Katalase, allerdings wurde das Signifikanzniveau von 0,05 nicht erreicht (s. Abbildung 17).

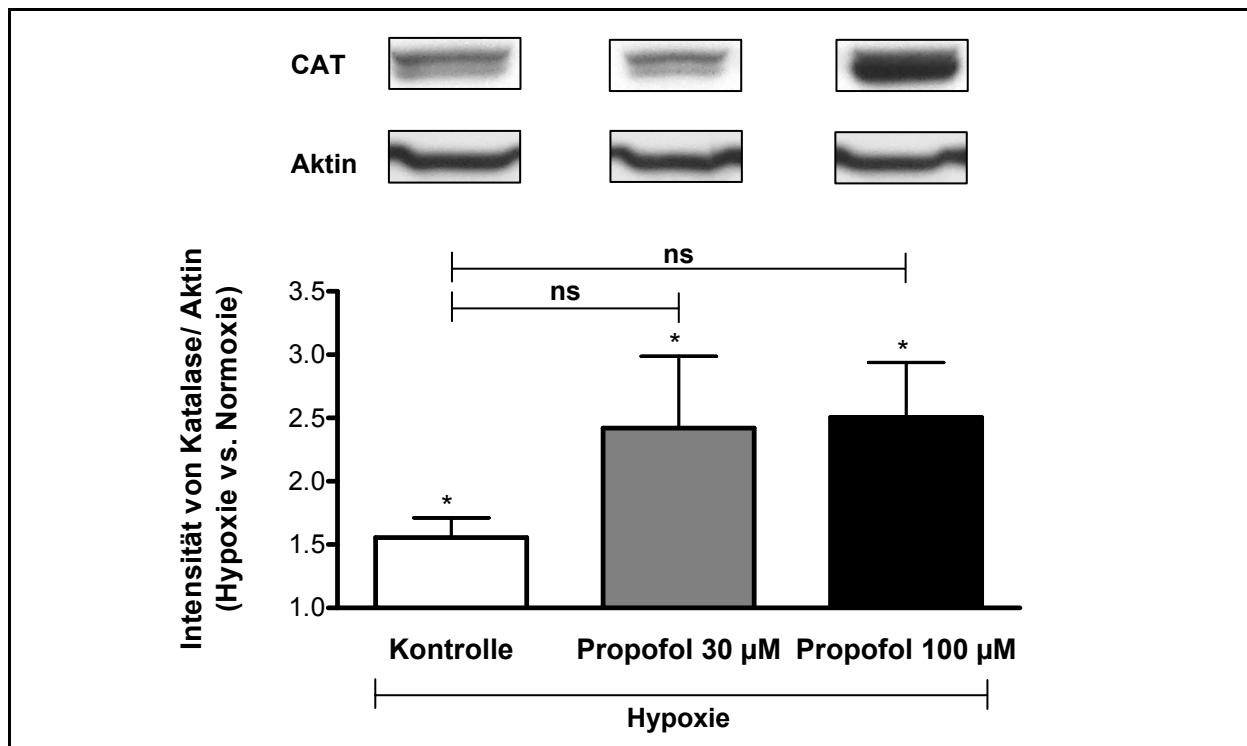


Abbildung 17: Proteinexpression der Katalase

Western Blot Experimente weisen eine signifikante Erhöhung der Menge an exprimierter Katalase 4 Stunden nach Hypoxie im Vergleich zur Normoxie auf. Die Behandlung der Zellen mit Propofol (30 µM und 100 µM) führt zu einer weiteren Zunahme der exprimierten Menge an Katalase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Es wurden jeweils fünf unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM. *, $P < 0,05$ vs. Normoxie one-sample t-Test. Ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt. ns = nicht signifikant, CAT = Katalase.

Um zu evaluieren, ob der Anstieg der Katalasemenge unter Hypoxie auch von einer erhöhten Genexpression begleitet wird, wurden 1 Stunde nach Hypoxie RT-PCRs durchgeführt. Es zeigte sich eine konstitutive Expression des Katalasegens, Gruppenunterschiede waren nicht detektierbar (s. Abbildung 18).

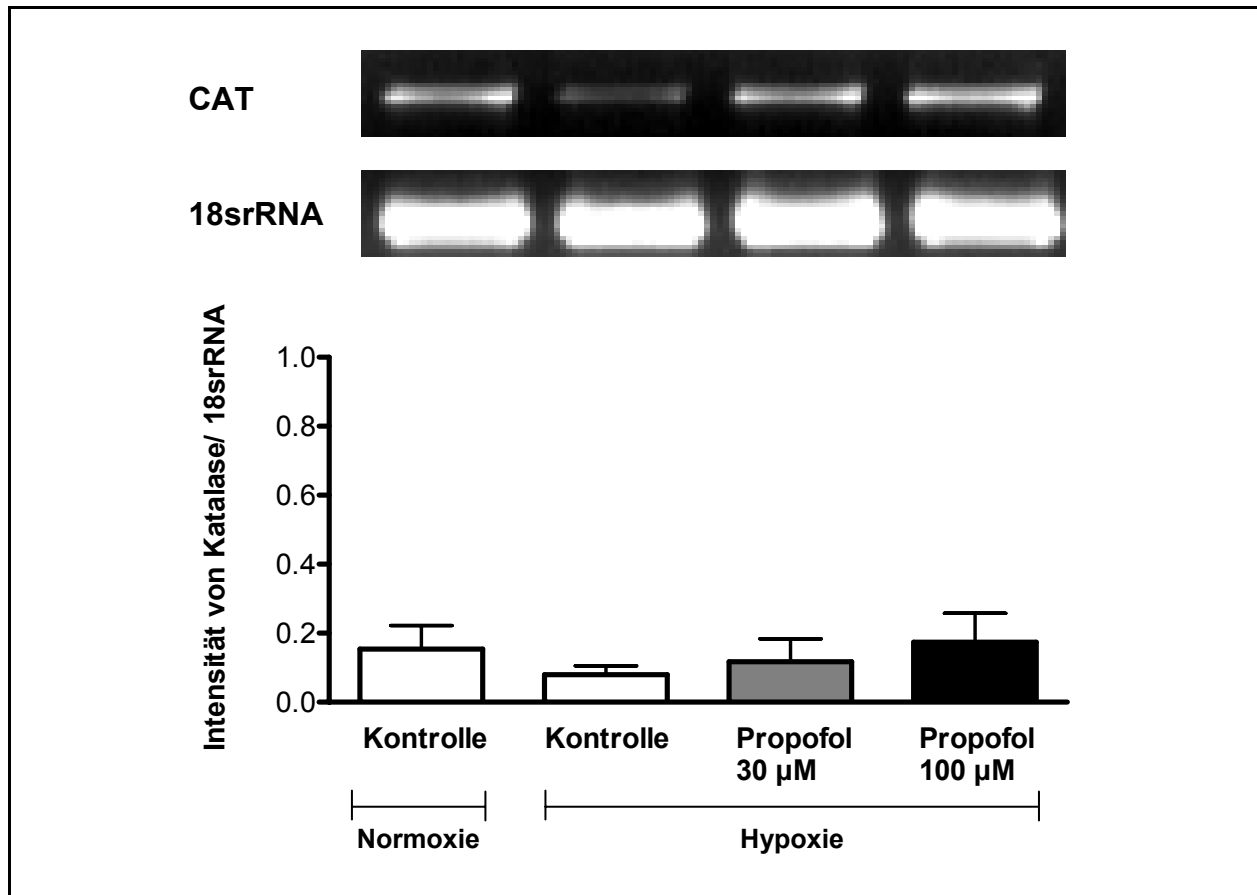


Abbildung 18: Genexpression der Katalase

Die RT-PCR Experimente zeigen keine statistisch signifikant geänderte Genexpression für Katalase. Das Housekeeping-Gen 18srRNA dient zum Vergleich der Signalintensitäten. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. Es wurden drei unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Ein repräsentatives PCR-Gel ist abgebildet. CAT = Katalase.

4 Diskussion

4.1 Hypoxiemodelle

Ischämische Prozesse, die mit einer Gewebhypoxie einhergehen, spielen eine entscheidende Rolle unter anderem beim Myokardinfarkt, beim Schlaganfall, während Organtransplantationen, in der Gefäßchirurgie und im Rahmen der intestinalen Ischämie. Im Gastrointestinaltrakt verursacht die Ischämie eine Endothel-/Epitheldysfunktion, welche zur Translokation von Bakterien und schließlich zum Multiorganversagen führen kann.^{1-3, 100} Allerdings sind bisher nur wenige molekulare Mechanismen aufgeklärt, die zur Entwicklung neuer Therapieformen beitragen können.

Zur Induktion einer Hypoxie in Zellkulturen gibt es verschiedene Möglichkeiten.⁴⁴ Am gängigsten und am häufigsten in der Literatur beschrieben ist die Verwendung einer Hypoxiekammer.^{45, 46} Außerdem kann eine Hypoxie chemisch durch Cobaltchlorid oder Natriumdithionit oder aber durch den Einsatz von Enzymen induziert werden.⁴⁷⁻⁴⁹ Der Vorteil der Hypoxiekammer, bei der sich die Zellen in einem abgeschlossenen System mit einem genau definierten Gasverhältnis befinden, ist, dass nur der Sauerstoffpartialdruck die Zellen beeinflusst und eine genaue Einstellung des Gasverhältnisses möglich ist. Schwierig ist dagegen die exakte Justierung der Hypoxiedauer, was durch den langsamen Ausgleich des Sauerstoffpartialdruckes zwischen Gasphase und dem Zellkulturmedium bedingt ist.¹⁰¹ Zudem sind Interventionen während der Hypoxie in dem hermetisch abgeschlossenen System schlecht möglich.^{45, 46, 102}

Um I/R-Schäden am Darmepithel nachzubilden und reproduzierbare hypoxische Verhältnisse zu induzieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Enzym basiertes Modell verwendet, welches erstmals von Baumann et al. beschrieben wurde.⁵⁰ In den vergangenen Jahren ist es im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin gelungen, dieses Hypoxiemodell zu etablieren und weiterzuentwickeln, sodass es bereits vielfältig eingesetzt werden konnte. Anwendung fand es unter anderem für Untersuchungen der Effekte von Acetylsalicylsäure auf Apoptose und Signalwege in CaCo-2 Zellen sowie für Untersuchungen protektiver Effekte von Patientenserum in Zellkultur.^{51, 52} Darüber

hinaus wurde das System zur Evaluation der zytoprotektiven Effekte von Sevofluran an IMR-32 Zellen und der Prüfung der Reduktion von Hypoxie induzierten Zellschäden durch milde Hypothermie und Postkonditionierung mit Katalase in-vitro eingesetzt.^{53, 54}

Die Vorteile des Enzym basierten Hypoxiemodells sind das schnelle Erreichen einer stabilen Hypoxie und die einfache Handhabung des Modells, denn im Gegensatz zum abgeschlossenen System der Hypoxiekammer handelt es sich um ein offenes Modell, welches Interventionen ermöglicht. Im Rahmen der enzymatisch induzierten Hypoxie kommt es zum Verbrauch von Glukose. Folglich nimmt die Glukosekonzentration im Kulturmedium ab. Der Sauerstoffpartialdruck und die mit fortdauernder Hypoxie abnehmende Glukosekonzentration entsprechen der in-vivo Situation bei Hypoxie/Ischämie. Somit ist das System gut geeignet, um die in-vivo Situation in Zellkultur zu simulieren. Als möglicher Nachteil des Systems ist die Zugabe von Enzymen und ihr potentieller Einfluss auf die Zellen sowie die Entstehung von Reaktionsprodukten zu sehen.^{45, 46, 50, 54} Wir und andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Ausprägung der Enzym basierten Hypoxie abhängig von den Enzymkonzentrationen, vom Verhältnis Volumen zur Oberfläche und der Glukosekonzentration ist.^{45, 50, 51, 54} Die Ausbildung der Hypoxie ist unabhängig von dem Enzymverhältnis Glukoseoxidase zu Katalase, allerdings wird die Wasserstoffperoxidkonzentration von dem Enzymverhältnis beeinflusst. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ab einem Verhältnis von 1 : 4 (Glukoseoxidase : Katalase) sich die Wasserstoffperoxidkonzentration nicht mehr ändert und bei 0,08 μM liegt. Basierend auf den geschilderten Fakten fand in der vorliegenden Arbeit Glukoseoxidase mit einer Endaktivität von 4 U/ml und Katalase mit einer Endaktivität von 960 U/ml im Hypoxiemedium Verwendung. Dies führte nach 15 Minuten zur Entstehung einer Hypoxie ($p\text{O}_2 < 5 \text{ mmHg}$). Bei Verwendung von initial 4,5 g/l Glukose hält die Hypoxie mindestens 4 Stunden an. Somit ist das beschriebene System geeignet die in-vivo Situation, wie beispielsweise während einer Darmischämie, zumindest ansatzweise in-vitro abzubilden und den Einfluss von Propofol auf die Hypoxie induzierten Prozesse in CaCo-2 Zellen zu untersuchen.

4.2 Effekte der Hypoxie auf CaCo-2 Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit fanden CaCo-2 Zellen Anwendung, die ein vielverwendetes und etabliertes Modell der intestinalen Barriere darstellen.³⁵ Die Zellen bilden einen Monolayer mit Tight junctions und zeigen viele Eigenschaften von Darmepithelzellen.^{42, 103}

Unter normoxischen Bedingungen wiesen die CaCo-2 Zellen im Rahmen der morphologischen Betrachtungen eine charakteristische, polygonale, pflastersteinartige Wuchsform auf. Andere Arbeitsgruppen beobachteten ähnliche Konstitutionen der CaCo-2 Zellen.^{52, 104, 105} 18 Stunden nach einer einstündigen Hypoxie zeigten sich morphologische Veränderungen: Die Zellen rundeten sich ab, lösten sich von der Unterlage und es wurden lichtmikroskopisch auffällige, granulierte Zellen und Zellcluster sowie zahlreiche homogen erscheinende Vakuolen erkennbar. Die beschriebenen morphologischen Veränderungen waren nicht unerwartet und deuten auf eine Schädigung der Zellen durch die Hypoxie hin. Unter Verwendung des enzymatischen Hypoxiesystems konnte unsere Arbeitsgruppe bereits an CaCo-2 Zellen und weiteren Zelltypen ähnliche Veränderungen beobachten.^{51, 52} Auch durch den Einfluss anderer Noxen, wie beispielsweise anaerobe, bakterielle Infektionen, treten bei CaCo-2 Zellen solche morphologischen Zeichen der Zellschädigung auf.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ Nicht nur CaCo-2 Zellen sondern auch humane Neuroblastom- sowie Fibrosarkomzellen zeigen unter hypoxischen Bedingungen ein Abrunden, Lösen vom Untergrund sowie Clusterbildung.^{53, 54, 94} Bei den granulierten Zellen und Zellclustern handelt es sich vermutlich um Hypoxie geschädigte Zellen.⁵¹ Die homogen erscheinenden Vakuolen sind eventuell abgeschnürte Zytoplasmabestandteile. Ein ähnliches Auftreten von abgeschnürten Zytoplasmabestandteilen unter hypoxischen Bedingungen konnte auch an humanen Fibrosarkomzellen beobachtet werden.⁵⁴ Kvolik et al. beschreiben bei CaCo-2 Zellen ebenfalls ein Abrunden der Zellen und Lösen vom Boden sowie die Entstehung von Vakuolen ähnlichen Gebilden durch die toxische Einwirkung von Halothan. Die genannte Studie wies in den Zellen mit oben beschriebenen morphologischen Veränderungen apoptotische Prozesse nach.¹⁰⁵ Auch Vidau et al. beschreiben bei CaCo-2 Zellen eine Abknospung von Zytoplasmabestandteilen an der Zelloberfläche bei durch Insektizide verursachter Zellschädigung.¹⁰³

Zusammenfassend können die in unserem System beobachteten morphologischen Veränderungen vermutlich als Schädigung der Zellen durch die induzierte Hypoxie gewertet werden.

Einschränkend ist zu sagen, dass in dem von uns verwendeten Hypoxiemodell nur eine Zellart eingesetzt wurde. Das hat den Vorteil, dass die Rolle von Propofol differenziert in-vitro beurteilt werden kann. Auf der anderen Seite lässt sich die Situation in dem von uns verwendeten Hypoxiemodell mit CaCo-2 Zellen nur eingeschränkt mit einer systemischen Antwort auf Hypoxie in-vivo vergleichen. Interaktionen zwischen den einzelnen Zellen sind zwar möglich, doch sind Untersuchungen von Einflüssen, die über Immunzellen oder Mediatoren vermittelt werden, in-vitro nicht möglich.

4.3 Verwendung von Propofol in-vitro

Obwohl zahlreiche Studien zeigen, dass Anästhetika I/R-Schäden reduzieren können, sind die zellulären und molekularen Mechanismen der Anästhetika vermittelten Protektion noch weitgehend unklar.¹⁰⁻¹² Um die Effekte von Propofol unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen zu evaluieren, wurden CaCo-2 Zellen, als Modell für das Darmepithel, mit Propofol stimuliert. Zur Behandlung der CaCo-2 Zellen wurden 30 μM und 100 μM Propofol, basierend auf den beschriebenen Propofolplasmakonzentrationen im Menschen während Sedierung und Narkose, gewählt. Zur Narkoseeinleitung kommen 1,5 bis 2,5 mg/kg KG Propofol zur Anwendung. Dies entspricht bei einem Propofolmolekulargewicht von 178,27 g/mol und wenn bei der Berechnung von einer 70 kg schweren Person mit einem Blutvolumen von 5 l ausgegangen wird 118 bis 196 μM . Zur Sedierung werden Propofolkonzentrationen von 24 bis hin zu 353 $\mu\text{M}/\text{h}$ eingesetzt und zur Narkoseaufrechterhaltung 314 bis 942 $\mu\text{M}/\text{h}$ (s. 2.2.3 Abbildung 9).^{86, 96} In den meisten Studien findet Propofol in Konzentrationen bis 100 μM Anwendung.^{71, 77, 87-89,}
¹⁰⁹ Rossaint et al. setzten in einer Studie zur Untersuchung der Neuroprotektion von Propofol in einem in-vitro Modell Propofolkonzentrationen bis 400 μM ein und zeigten, dass Propofol vor allem im Konzentrationsbereich von 30 bis 100 μM protektive Effekte in Kombination mit milder Hypothermie hat.⁷¹ Auch eine Studie von

Adembri et al. wies bei Propofolkonzentrationen von 30 bis 100 μM eine Neuroprotektion in einem in-vitro Modell der zerebralen Ischämie auf.⁷⁷

In der vorliegenden Arbeit wurde Propofol zur Stimulation der CaCo-2 Zellen in DMSO gelöst, um Einflüsse der lipophilen Lösungsmittel, welche in den zugelassenen Propofolemulsionen enthalten sind, auszuschließen. DMSO ist in Studien mit Propofol das am häufigsten verwendete Lösungsmittel.^{71, 87-89} In der Literatur wird empfohlen, für Standardscreeningverfahren mit CaCo-2 Zellmodellen DMSO ($\leq 1\%$) als Lösungsmittel für die zu testenden Substanzen zu verwenden.¹¹⁰ DMSO-Konzentrationen bis 1 % haben keinen Einfluss auf parazelluläre Effekte und schädigen CaCo-2 Zellen nicht.^{110, 111} DMSO beeinflusst in Konzentrationen bis 0,1 % auch nicht die Genexpression, Zellproliferation oder Apoptose.¹¹²⁻¹¹⁴ Die DMSO-Konzentrationen lagen bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit bis zu 0,04 % DMSO deutlich niedriger, so dass basierend auf den genannten Studien keine Beeinflussung der Ergebnisse durch DMSO anzunehmen ist.

4.4 Effekte von Propofol unter Normoxie und Hypoxie auf die Spiegel von reaktiven Sauerstoffspezies

I/R-Schäden sind assoziiert mit einer Erhöhung an ROS.^{1, 5, 115-117} Zu den ROS gehören zum einen stabile, molekulare Oxidantien wie beispielsweise Wasserstoffperoxid und zum anderen freie Radikale wie zum Beispiel Hydroxylradikale.¹⁹ Der Großteil der zellulären ROS-Produktion findet im Rahmen der Atmungskette statt. Der Elektronentransport funktioniert am besten unter physiologischen Sauerstoffkonzentrationen, wobei die Produktion von ROS unter diesen Bedingungen niedrig ist. Im Gegensatz hierzu führt eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration zu einem Ungleichgewicht des Elektronentransports und daraus resultiert eine erhöhte ROS-Konzentration.¹¹⁶ Die intestinale Mukosa reagiert extrem sensitiv auf ROS, welche mitverantwortlich für den intestinalen I/R-Schaden sind. Die Verminderung der Bildung von ROS und die Eliminierung von ROS sind daher therapeutische Ziele.¹⁷ Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Antioxidantien protektiven Einfluss auf die Entstehung von I/R-Schäden haben.

Propofol weist antioxidative Eigenschaften auf und könnte dementsprechend zytoprotektiv wirken.^{10-12, 25, 64-66}

Hypoxie und ROS

Fluorometrische Quantifizierungen der Menge an ROS zeigten an allen Zeitpunkten eine signifikante Zunahme der ROS-Spiegel in den Hypoxiegruppen im Vergleich zu den Normoxiegruppen. Huang et al. wiesen an humanen Neuroblastomzellen eine Steigerung der ROS-Konzentration unter hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen nach.⁹⁴ Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit, welche einen Anstieg der ROS-Menge nach Hypoxie belegen konnten, überein. Unsere Zellkulturbefunde werden auch durch tierexperimentelle Studien bestätigt: Eine erhöhte ROS-Produktion durch Mesenterialschämie und Reperfusion wurde im intestinalen sowie auch im vaskulären Gewebe nachgewiesen.¹¹⁸ Ebenso detektierten Watanabe et al. im Tiermodell die Akkumulation von ROS im Rahmen von I/R-Schäden des Dünndarms.¹¹⁹

Normoxie und ROS

Unter normoxischen Bedingungen zeigten die fluorometrischen Quantifizierungen zur Analyse der Menge an ROS erwartungsgemäß an allen Zeitpunkten signifikant niedrigere ROS-Spiegel als nach Hypoxie. Auch die oben genannten Studien präsentierten unter Normoxie niedrigere ROS-Spiegel als nach Hypoxie.^{94, 118, 119} Interessanterweise wiesen fluorometrische Quantifizierungen zur Analyse der Menge an ROS, die 2 Stunden nach Mediumwechsel in der Normoxiekontrollgruppe durchgeführt wurden, im Vergleich zu den 24 und 48 Stunden Werten signifikant mehr ROS auf. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass der Mediumwechsel ein kurzfristiger Stressfaktor ist und eine Zunahme der ROS verursacht. Li et al. legten dar, dass CaCo-2 Zellen sehr sensitiv auf den durch Mediumwechsel verursachten Stress mit einem Verlust der transepithelialen Resistenz und einer Permeabilitätszunahme reagieren.¹²⁰ Kim et al. zeigten, dass Mediumwechsel zu einer Änderung der Genexpression in neuronalen Vorläuferzellen führt.¹²¹

Einfluss von Propofol

In experimentellen Modellen wurde ein protektiver Effekt von Propofol auf I/R-Schäden in verschiedenen Organen wie beispielsweise im Gehirn, der Leber, der

Lunge und im Herzen demonstriert.⁷⁸⁻⁸³ An einem Herzmodell wurden I/R-Schäden sowie durch exogenes Wasserstoffperoxid induzierte Schäden durch die Gabe von Propofol verringert.^{122, 123} Eine tierexperimentelle Studie mit Ratten demonstrierte, dass Propofol eine durch I/R verursachte intestinale Mukosaschädigung abmildern kann.¹²⁴ Sowohl Prä-, Peri- als auch Postkonditionierung mit Propofol reduzierte die intestinale Mukosaschädigung. Dies ist möglicherweise auf die antioxidativen Eigenschaften von Propofol sowie auf eine Inhibition der Stickstoffmonoxidsynthese und auf abnehmende Endothelin-1 Spiegel zurückzuführen.¹²⁴ Auch klinische Studien ergaben, dass Propofol im Rahmen von oxidativen Schäden protektiv wirkt.^{67, 84, 85}

Unter physiologischen Konditionen werden ROS durch Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Katalase sowie andere molekulare Antioxidantien, wie beispielsweise Glutathion, Ascorbinsäure und α -Tocopherol, abgefangen. Allerdings sind diese endogenen, antioxidativen Mechanismen nicht ausreichend, um den Überschuss an ROS, der während I/R entsteht, zu bewältigen. Die erhöhte ROS-Menge führt zu einer Zunahme der Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren, sowie zur Zellschädigung.¹²⁵ Die Struktur von Propofol ähnelt den Phenol basierten Antioxidantien, wie beispielsweise dem endogenen α -Tocopherol.⁶⁴ Die Hydroxygruppe des Phenolrings ist unter anderem für die antioxidativen Eigenschaften des Propofols verantwortlich, da diese ein Wasserstoffatom an Radikale abgeben kann. ROS können ebenfalls mit Wasserstoffatomen aus den Hydroxygruppen reagieren und werden so in ihrer Reaktivität abgemildert.^{126, 127} Allerdings scheint dieser Mechanismus nur während eines kurzen Zeitraumes wirksam zu sein.¹²⁷ Durch die Phenolgruppe wirkt Propofol somit wie auch α -Tocopherol antioxidativ. Diese direkten antioxidativen Eigenschaften von Propofol wurden auch in zahlreichen Studien als Erklärung für die beobachteten protektiven Effekte angenommen.^{64-66, 78, 79, 81, 83, 122, 123}

Kvam et al. präsentierten in einer Studie zur Untersuchung des Radikalfängereffekts von Propofol, dass dieser Effekt von Propofol zeitabhängig abnimmt und auch konzentrationsabhängig ist. Propofol (160 μ M) zeigte innerhalb der ersten 30 min die höchsten Radikalfängereigenschaften, danach blieb der Effekt auf einem konstant niedrigen Niveau.¹²⁸ Auch Eriksson et al. wiesen im Rahmen einer Studie an isolierten Rattenlebermitochondrien zur Inhibition der Peroxidation durch Propofol nur

für einen Zeitraum von weniger als einer Stunde eine Verminderung des Peroxidationsprozesses durch Propofol nach.¹²⁷ Die beiden Studien deuten darauf hin, dass die direkten antioxidativen Effekte von Propofol als Radikalfänger durch die Phenolgruppe vermittelt werden und nur innerhalb eines kurzen Zeitraums bestehen.

Die in der Literatur beschriebenen antioxidativen Effekte von Propofol konnten auch in der vorliegenden Arbeit belegt werden: Die durch Hypoxie erhöhten ROS-Spiegel wurden durch Gabe von 30 μM und 100 μM Propofol im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle gesenkt.

Interessanterweise fanden sich signifikante Effekte von Propofol auf die Hypoxie induzierte ROS-Zunahme erst 48 Stunden nach Hypoxie. 2 und 24 Stunden nach Hypoxie ergaben sich nur marginale Unterschiede der ROS-Konzentrationen zwischen den mit Propofol behandelten Zellen und den respektiven Kontrollen. Auch der Vergleich der beiden eingesetzten Propofolkonzentrationen, 30 μM und 100 μM , untereinander wies keine deutlichen Unterschiede nach.

Möglicherweise zeigen die vorliegenden ROS-Analysen, dass die direkten antioxidativen Effekte von Propofol, die durch die Phenolgruppe vermittelt werden, zu diesen Zeitpunkten, 2 und 24 Stunden nach Hypoxie, nicht mehr ausreichend wirksam sind und andere Mechanismen noch nicht hinreichend zum Tragen kommen. Dass zusätzliche Propofol vermittelte Effekte, neben den direkten antioxidativen Effekten durch die Hydroxygruppe am Phenolring, eine Rolle spielen, wird durch eine Zellkulturstudie unterstützt, die zeigte, dass eine wasserlösliche Vorstufe von Propofol ohne eine Hydroxygruppe am Phenolring auch antioxidative Eigenschaften aufweist und neuronale Zellen vor oxidativen Schäden schützt.¹²⁹

Die späte Reduktion der ROS-Spiegel durch Gabe von Propofol bestärkt die Hypothese, dass Propofol neben den in der Literatur beschriebenen direkten antioxidativen Effekten in unserem Modellsystem auch indirekt wirkt. Möglicherweise werden antioxidative und protektive Effekte indirekt über Änderungen der Proteinexpression oder der Aktivität von antioxidativen Molekülen vermittelt. Dies ist durchaus vorstellbar, da Propofol auch Signalwege induzieren kann.⁹⁰⁻⁹³ Huang et al. zeigten in einer aktuellen Studie neben direkten antioxidativen Effekten von Propofol auch indirekte Effekte durch die Induktion von zellulären, antioxidativen Mechanismen.⁹⁴ Als ein Hinweis auf eine indirekte, zellvermittelte, zytoprotektive

Wirkung von Propofol können die Effekte von Propofol auf die Katalaseexpression (4.6) angesehen werden.

Zusammenfassend konnten die fluorometrischen Quantifizierungen zur Analyse der Menge an ROS nachweisen, dass Hypoxie zu einer signifikanten Erhöhung der ROS-Spiegel in der CaCo-2 Zellkultur führt. Außerdem deuteten die Ergebnisse in der Normoxiegruppe daraufhin, dass allein der Mediumwechsel ein kurzfristiger Stressfaktor ist und eine Zunahme der ROS verursacht. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Gabe von Propofol unter hypoxischen Bedingungen die Menge an ROS nach 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle signifikant senkt. Dass Propofol erst nach 48 Stunden und nicht aber nach 2 oder 24 Stunden die Menge an ROS reduziert, deutet auf mögliche indirekte Effekte von Propofol hin. Diese werden unter 4.6 eingehender analysiert.

4.5 Effekte von Propofol unter Normoxie und Hypoxie auf die Spiegel von Wasserstoffperoxid

Neben den in 4.4 erwähnten ROS-Assays wurden Wasserstoffperoxidassays durchgeführt. Diese ergänzen die Ergebnisse der fluorometrischen Quantifizierungen zur Analyse der ROS-Spiegel.

Hypoxie und Wasserstoffperoxid

48 Stunden nach Hypoxie wiesen die Wasserstoffperoxidassays eine signifikante Zunahme der Wasserstoffperoxidkonzentration im Vergleich zur Normoxie auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer von Huang et al. im Jahr 2012 publizierten Studie, die an humanen Neuroblastomzellen zeigte, dass durch Hypoxie im Vergleich zur Normoxie die Wasserstoffperoxidkonzentration in den Kulturen zunimmt.⁹⁴ Auch eine aktuelle Studie an Kardiomyozyten ergab, dass die Wasserstoffperoxidkonzentration nach Hypoxie und Reoxygenierung im Vergleich zu den Kontrollen erhöht ist.¹³⁰ Eine weitere Zellkulturstudie wies eine Zunahme der Wasserstoffperoxidproduktion in Mitochondrien während Hypoxie nach.¹³¹

Normoxie und Wasserstoffperoxid

Unter normoxischen Bedingungen zeigten die Wasserstoffperoxidassays erwartungsgemäß signifikant niedrigere Wasserstoffperoxidkonzentrationen als nach Hypoxie. Auch die oben genannten Studien bestätigen diese Befunde.^{94, 130, 131}

Einfluss von Propofol

Die Gabe von 100 µM Propofol führte 48 Stunden nach Hypoxie zu einer signifikanten Senkung der Wasserstoffperoxidkonzentration. Huang et al. konnten ebenfalls demonstrieren, dass die Gabe von Propofol die Wasserstoffperoxidkonzentration unter Hypoxie bei humanen Neuroblastomzellen senkt.⁹⁴ Auch eine aktuelle Studie von Lee et al. zeigte, dass Propofol humane Tubulusepithelzellen vor durch Wasserstoffperoxid verursachten oxidativem Stress schützen kann.¹³² Kokita et al. zeigten direkte antioxidative Effekt von Propofol. Propofol minderte die durch Wasserstoffperoxid verursachten Schäden an isolierten Rattenherzen ab. In dieser Studie wurde die Konzentration eines Produktes der Lipidperoxidation, Malondialdehyd, kurzzeitig (11 min nach Wasserstoffperoxidinfusion) gemessen und Propofol unterdrückte die Zunahme an Malondialdehyd. Dieser antioxidative Effekt wird der Phenolgruppe des Propofols zugeschrieben.¹²²

Der Befund, dass die Gabe von 100 µM Propofol zu einer signifikanten Senkung der Hypoxie induzierten Wasserstoffperoxidkonzentrationszunahme führt, deutet auf eine Propofol vermittelte antioxidative Wirkung hin, wie es in vielen Studien und unter 4.4 beschrieben wurde.^{64-66, 78-83, 122, 123} Allerdings verifiziert das Ergebnis der durchgeführten Wasserstoffperoxidassays nicht, ob direkte antioxidative Effekte von Propofol, oder indirekte Effekte, beispielsweise durch Änderung der Proteinexpression oder Enzymaktivitäten, oder aber eine Kombination aus beiden für die antioxidativen Eigenschaften verantwortlich sind.

Auch 30 µM Propofol bewirkte in der vorliegenden Studie eine Senkung der Wasserstoffperoxidkonzentration, die allerdings nicht signifikant war. Dieser Befund zeigt, dass eventuell niedrige Konzentrationen von Propofol keine oder eine geringere Wirksamkeit besitzen. Unterstützt wird dieser Befund durch eine Studie von Shao et al. In dieser fanden 25 µM, 50 µM und 100 µM Propofol Anwendung. 50 µM und 100 µM Propofol milderten I/R-Schäden auf mitochondrialer Ebene ab

und reduzierten die ROS- und Wasserstoffperoxidproduktion. Hingegen ergaben sich durch 25 μM Propofol keine Effekte.¹³³ Des Weiteren zeigte eine Studie zur Untersuchung der Neuroprotektion von Propofol an einem in-vitro Modell, dass Propofol dosisabhängig, mit zunehmenden Konzentrationen bis zu 400 μM , den neuronalen Zelltod vermindern kann.⁷¹ Diese Studien decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass die applizierte Propofolkonzentration für protektive Effekte entscheidend ist und niedrige Propofolkonzentrationen eventuell nicht wirksam sind oder eine geringere Wirksamkeit zeigen. Allerdings sind die Wirksamkeitsgrenzen vermutlich sowohl in-vitro als auch in-vivo vom Zell- bzw. Gewebe/Organtyp abhängig.

Zusammenfassend konnte in den durchgeführten Experimenten demonstriert werden, dass die Menge an Wasserstoffperoxid unter Hypoxiebedingungen signifikant ansteigt. 100 μM Propofol reduziert 48 Stunden nach Hypoxie die Wasserstoffperoxidkonzentrationen. Es lässt sich festhalten, dass die applizierte Propofolkonzentration für die Reduktion der Wasserstoffperoxidkonzentration ein wichtiger Faktor sein könnte und niedrige Propofolkonzentrationen keine oder nur eine geringe Wirksamkeit zeigen.

4.6 Effekte von Propofol unter Normoxie und Hypoxie auf die Expression von Katalase: mögliche Hinweise für indirekte Wirkungen von Propofol

Die meisten publizierten Arbeiten gehen von direkten antioxidativen Effekten von Propofol aus. Allerdings deuten die Befunde dieser Arbeit (4.4) auch auf indirekte Effekte von Propofol hin. Da Propofol Signalwege induzieren kann⁹⁰⁻⁹³, ist es durchaus denkbar, dass antioxidative und protektive Effekte indirekt über Änderungen der Gen- und Proteinexpression sowie Einfluss auf die Aktivität antioxidativer Enzyme vermittelt werden. Eventuelle Anhaltspunkte hierfür konnten in einer von Huang et al. publizierten Arbeit dargelegt werden. Die Autoren wiesen neben direkten antioxidativen Effekten von Propofol auch indirekte Effekte durch die Induktion von zellulären antioxidativen Mechanismen nach. Die Studie zeigte eine Zunahme der Katalaseaktivität durch Propofolgabe an humanen Neuroblastomzellen

15 Stunden nach Hypoxie.⁹⁴ Auch der Befund (4.4), dass Propofol erst nach 48 Stunden aber nicht nach 2 und 24 Stunden post Hypoxie die ROS-Spiegel reduziert, legt indirekte Propofoleffekte nahe.

Verschiedene antioxidative Mechanismen, unter anderem Enzyme wie Katalase sowie nicht enzymatisch aktive Moleküle wie das Glutathion, schützen Zellen vor ROS induzierten Schädigungen.²⁴ Katalase ist in der Lage Wasserstoffperoxid durch die Umsetzung zu Sauerstoff und Wasser unschädlich zu machen.²⁶ Damit ist das Enzym ein möglicher Ansatzpunkt für indirekte, zellvermittelte, zytoprotektive Effekte von Propofol.^{26, 134}

Zitta et al. zeigten, dass Katalase Hypoxie induzierte und Wasserstoffperoxid vermittelte Zellschäden in Zellkultur abmildern kann.⁵⁴ Auch im Tiermodell wurde die protektive Wirkung der Katalase auf I/R-Schäden der Leber, chemisch induzierte Gewebeschäden sowie Tumormetastasen der Leber und Lunge bestätigt. Hierbei wurde durch Gabe von Katalase eine Inhibition der durch ROS verursachten Schäden sowie der durch ROS vermittelten Genexpression, welche für die Rekrutierung von Entzündungszellen sowie für das Metastasenwachstum verantwortlich ist, erreicht. Eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (beispielsweise HIF 1 α), deren Aktivität durch Wasserstoffperoxid reguliert wird, sind Schlüsselproteine der Regulation der Genexpression, welche an pathologischen Prozessen beteiligt ist. Daher ist die Kontrolle von Wasserstoffperoxidkonzentration ein weiteres Ziel der Katalasegabe.²⁶

Bezüglich der Katalase könnten die indirekten Effekte des Propofols durch veränderte Stabilität des Katalaseproteins, verminderten Katalaseabbau, vermehrte Translation der RNA oder direkte Bindung von Propofol an regulatorische Proteinregionen und damit einhergehend eine Aktivitätserhöhung vermittelt sein.^{28, 94,}

¹³⁵⁻¹³⁹ Diese Hypothese wird auch durch Arbeiten anderer Gruppen gestützt, die zeigen konnten, dass Propofol in der Lage ist, die Aktivität unterschiedlicher ROS abbauender Enzyme wie zum Beispiel der Glutathionperoxidase zu regulieren.^{67, 140-}

¹⁴²

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Proteinmenge der von den CaCo-2 Zellen exprimierten Katalase 4 Stunden nach Hypoxie signifikant erhöht ist. Eine Behandlung der Zellen mit Propofol 30 μ M und Propofol 100 μ M während der

Hypoxie führte zu einer deutlichen, aber statistisch nicht signifikanten Zunahme der Menge an exprimierter Katalase. Dies deutet auf Effekte von Propofol auf die Katalaseproteinexpression oder -stabilität hin, die messbar waren, aber eventuell aufgrund der geringen Stichprobenzahl (n=5) nicht das Signifikanzniveau von 0,05 erreichten.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich auf RNA-Ebene keine Regulation der Katalaseexpression. In den RT-PCR Experimenten wurden 1 Stunde nach Hypoxie keine signifikanten Änderungen der Genexpression von Katalase in der Hypoxiegruppe sowie in den Propofolgruppen, 30 μ M und 100 μ M, im Vergleich zur Normoxiegruppe nachgewiesen. Möglicherweise fand die Analyse der Genexpression nicht zum optimalen Zeitpunkt statt oder aber dieser Befund könnte die oben dargelegte Hypothese unterstützen, dass die Katalaseexpression eventuell posttranskriptionell reguliert wird.¹⁴³

4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung eines Enzym basierten in-vitro Hypoxiesystems die Effekte des intravenösen Anästhetikums Propofol im CaCo-2 Zellkulturmodell untersucht. Es zeigte sich, dass Propofol den durch Hypoxie induzierten Anstieg der ROS- und Wasserstoffperoxidspiegel reduziert. An diesen Prozessen sind antioxidative Wirkungen von Propofol beteiligt. Die aktuellen Befunde deuten darauf hin, dass eventuell auch indirekte Effekte, wie zum Beispiel eine Propofol vermittelte vermehrte Katalaseproteinexpression und/oder veränderte Stabilität des Enzyms, hierbei eine Rolle spielen könnten.

Basierend auf diesen Resultaten ergeben sich weitere interessante Fragestellungen, die allerdings nicht Grundlage dieser Arbeit waren:

1. Aufschlussreich wäre es, die Tendenz, dass Propofol die Katalaseproteinexpression erhöht, durch weitere Versuche zu verifizieren.
2. Außerdem ist die Durchführung von Katalaseaktivitätsmessungen von Interesse, um den indirekten Effekten näher zu kommen.
3. Darauf aufbauend könnte man an einem Tiermodell zusätzliche Untersuchungen, beispielsweise zum Einfluss von Katalasegabe auf I/R des Darms anhand von ROS-Messungen oder Überlebenszeitmessungen, anstellen, um eventuell daraus resultierend klinische Anwendungen der Katalase zu entwickeln.
4. Im Rahmen dieser Studie lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Gesamtheit der ROS und im Speziellen auf Wasserstoffperoxid. Lohnenswert wäre zu untersuchen, welche anderen ROS, beispielsweise Superoxidanionen oder Hydroperoxid, unter hypoxischen Bedingungen vermehrt gebildet werden und welchen Einfluss Propofol auf diese hat.
5. Da in dieser Arbeit der Fokus auf der Expression von Katalase lag, wäre es interessant zu untersuchen, wie andere Enzyme, zum Beispiel Superoxiddismutase oder Gluthationperoxidase sowie zelluläre Antioxidantien, beispielsweise Gluthation, unter hypoxischen Bedingungen reguliert werden und ob Propofol einen Effekt auf diese aufweist.

5 Zusammenfassung

Ischämie und Reperfusion (I/R) im Gastrointestinaltrakt können eine Dysfunktion der endothelialen und epithelialen Barriere verursachen und dadurch zur Translokation von Bakterien und schließlich zum Multiorganversagen führen. In mehreren Studien wurde demonstriert, dass Anästhetika I/R-Schäden vermindern können, allerdings sind die zellulären und molekularen Mechanismen noch weitgehend ungeklärt.

Um die zellulären und molekularen Mechanismen der Wirkungen des intravenösen Anästhetikums Propofol auf Hypoxie induzierte Prozesse am Darmepithel zu untersuchen, wurden unter Verwendung eines Enzym basierten in-vitro Hypoxiesystems die Effekte von Propofol im CaCo-2 Zellkulturmodell (humane epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen) evaluiert. Hierzu wurden die Zellen einer einstündigen Hypoxie ausgesetzt und gleichzeitig mit Propofol in klinisch relevanten Konzentrationen von 30 μM sowie 100 μM inkubiert. Im Vordergrund der Untersuchungen standen die Regulation der ROS-Spiegel mittels fluorometrischer Quantifizierungen, der Wasserstoffperoxidspiegel durch kolorimetrische Quantifizierungen und der Expression der Katalase durch Western Blots und RT-PCRs.

Unter Verwendung des Enzym basierten Hypoxiemodells sank der Sauerstoffpartialdruck innerhalb von 15 Minuten unter 5 mmHg und blieb für mindestens vier Stunden konstant. Hypoxie induzierte in den CaCo-2 Zellen morphologische Veränderungen, die auf eine Zellschädigung hindeuten. Die fluorometrischen Quantifizierungen der ROS-Spiegel ergaben 2, 24 und 48 Stunden nach Hypoxie eine signifikante Zunahme der Menge an ROS in der Hypoxiegruppe im Vergleich zur Normoxiegruppe (2 h, 24 h und 48 h: $P < 0,001$). Durch Gabe von 30 μM und 100 μM Propofol unter hypoxischen Bedingungen wurden die ROS-Spiegel nach 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesenkt (Propofol 30 μM : $P < 0,05$; Propofol 100 μM : $P < 0,001$). 48 Stunden nach Hypoxie wiesen Wasserstoffperoxidassays eine signifikante Zunahme der Wasserstoffperoxidkonzentration in der Hypoxiegruppe nach ($P < 0,05$ vs. Normoxie). Die Inkubation mit 100 μM Propofol führte unter hypoxischen Bedingungen zu einer signifikanten Senkung der Wasserstoffperoxidkonzentration ($P < 0,05$), wohingegen 30 μM Propofol

die Wasserstoffperoxidkonzentration nur tendenziell reduzierte ($P > 0,05$). Western Blot Experimente demonstrierten, dass die Menge der exprimierten Katalase 4 Stunden nach Hypoxie im Vergleich zur Normoxiekontrolle signifikant erhöht war ($P < 0,05$). Die Applikation von 30 μM und 100 μM Propofol führte zu einer weiteren Zunahme der exprimierten Menge an Katalase, doch wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die bereits in der Literatur beschriebene antioxidative Wirkung von Propofol. Zusätzlich deuten die Befunde darauf hin, dass an der antioxidativen Wirkung des intravenösen Anästhetikums Propofol möglicherweise indirekte, zellvermittelte Effekte, die unter anderem zu einer vermehrten Proteinexpression der Katalase und/oder veränderter Stabilität des Enzyms führen, beteiligt sein könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391-1401.
2. Grenz A, Clambey E, Eltzschig HK. Hypoxia signaling during intestinal ischemia and inflammation. *Curr Opin Crit Care*. Apr 2012;18(2):178-185.
3. Park SW, Kim M, Brown KM, D'Agati VD, Lee HT. Paneth cell-derived interleukin-17A causes multiorgan dysfunction after hepatic ischemia and reperfusion injury. *Hepatology*. May 2011;53(5):1662-1675.
4. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. Sep 13 2007;357(11):1121-1135.
5. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras*. Jul-Aug 2005;20(4):336-343.
6. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med*. Oct 15 2009;361(16):1570-1583.
7. Rushing GD, Britt LD. Reperfusion injury after hemorrhage: a collective review. *Ann Surg*. Jun 2008;247(6):929-937.
8. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. Dec 2010;10(12):826-837.
9. Carroll MC, Holers VM. Innate autoimmunity. *Adv Immunol*. 2005;86:137-157.
10. Clarkson AN. Anesthetic-mediated protection/preconditioning during cerebral ischemia. *Life Sci*. Mar 6 2007;80(13):1157-1175.
11. Kitano H, Kirsch JR, Hurn PD, Murphy SJ. Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. Jun 2007;27(6):1108-1128.
12. Vasileiou I, Xanthos T, Koudouna E, Perrea D, Klonaris C, Katsargyris A, Papadimitriou L. Propofol: a review of its non-anaesthetic effects. *Eur J Pharmacol*. Mar 1 2009;605(1-3):1-8.
13. Bühling KJ, Lepenies J, Witt K. *Intensivkurs allgemeine und spezielle Pathologie*: Elsevier Urban & Fischer, München; 2008.
14. Brandt LJ, Boley SJ. AGA technical review on intestinal ischemia. American Gastrointestinal Association. *Gastroenterology*. May 2000;118(5):954-968.
15. Yasuhara H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today*. 2005;35(3):185-195.
16. Vollmar B, Menger M. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2011;396(1):13-29.
17. Sato Y, Itagaki S, Oikawa S, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K. Protective effect of soy isoflavone genistein on ischemia-reperfusion in the rat small intestine. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(9):1448-1454.
18. Riaz AA, Wan MX, Schafer T, Dawson P, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Allopurinol and superoxide dismutase protect against leucocyte-endothelium interactions in a novel model of colonic ischaemia-reperfusion. *Br J Surg*. Dec 2002;89(12):1572-1580.
19. Kevin LG, Novalija E, Stowe DF. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg*. Nov 2005;101(5):1275-1287.
20. Mortimer CE, Müller U. *Chemie: das Basiswissen der Chemie*: Thieme, Stuttgart 2010.

21. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. May 1994;81(5):637-647.
22. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. Jul 2011;17(7):796-808.
23. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*. Oct 1999;79(4):1431-1568.
24. Katayama S, Mine Y. Antioxidative activity of amino acids on tissue oxidative stress in human intestinal epithelial cell model. *J Agric Food Chem*. Oct 17 2007;55(21):8458-8464.
25. Ansley DM, Lee J, Godin DV, Garnett ME, Qayumi AK. Propofol enhances red cell antioxidant capacity in swine and humans. *Can J Anaesth*. Mar 1998;45(3):233-239.
26. Nishikawa M, Hashida M, Takakura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev*. Apr 28 2009;61(4):319-326.
27. Goyal MM, Basak A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell*. Oct 2010;1(10):888-897.
28. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*. Jan 2004;61(2):192-208.
29. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. Jan 2002;82(1):47-95.
30. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J*. May 1996;10(7):709-720.
31. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(1-2):269-285.
32. Therade-Matharan S, Laemmel E, Duranteau J, Vicaut E. Reoxygenation after hypoxia and glucose depletion causes reactive oxygen species production by mitochondria in HUVEC. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Nov 2004;287(5):R1037-1043.
33. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*: Thieme, Stuttgart; 2009.
34. Welsch U. *Lehrbuch Histologie*: Elsevier Urban & Fischer, München; 2003.
35. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. Mar 1989;96(3):736-749.
36. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol*. Jan 2005;21(1):1-26.
37. Sun H, Chow EC, Liu S, Du Y, Pang KS. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. Apr 2008;4(4):395-411.
38. Smetanova L, Stetinova V, Svoboda Z, Kvetina J. Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2011;54(1):3-8.
39. Sharp P. Methods and options for estimating iron and zinc bioavailability using Caco-2 cell models: benefits and limitations. *Int J Vitam Nutr Res*. Nov 2005;75(6):413-421.
40. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog*. Jan-Feb 2006;22(1):186-198.

41. van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* Aug 2005;1(2):175-185.
42. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.* Mar 1 2001;46(1-3):27-43.
43. Pschyrembel W, Dornblüth Ob, Bach MLdA. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 261. Auflage*: Walter de Gruyter, Berlin; 2007.
44. Englander SW, Calhoun DB, Englander JJ. Biochemistry without oxygen. *Anal Biochem.* Mar 1987;161(2):300-306.
45. Millonig G, Hegedusch S, Becker L, Seitz HK, Schuppan D, Mueller S. Hypoxia-inducible factor 1 alpha under rapid enzymatic hypoxia: cells sense decrements of oxygen but not hypoxia per se. *Free Radic Biol Med.* Jan 15 2009;46(2):182-191.
46. Askoxylakis V, Millonig G, Wirkner U, Schwager C, Rana S, Altmann A, Haberkorn U, Debus J, Mueller S, Huber PE. Investigation of tumor hypoxia using a two-enzyme system for in vitro generation of oxygen deficiency. *Radiat Oncol.* 2011;6:35.
47. Kumar N, Meena RC, Chakrabarti A. Over-Expression of YLR162W in *Saccharomyces cerevisiae* Inhibits Cell Proliferation and Renders Cells Susceptible to the Hypoxic Conditions Induced by Cobalt Chloride. *Indian J Microbiol.* Jun 2011;51(2):206-211.
48. Jiang RG, Eyzaguirre C. Effects of hypoxia and putative transmitters on $[Ca^{2+}]_i$ of rat glomus cells. *Brain Res.* Jan 9 2004;995(2):285-296.
49. Zhang XQ, Eyzaguirre C. Effects of hypoxia induced by $Na_2S_2O_4$ on intracellular calcium and resting potential of mouse glomus cells. *Brain Res.* Feb 6 1999;818(1):118-126.
50. Baumann RP, Penketh PG, Seow HA, Shyam K, Sartorelli AC. Generation of oxygen deficiency in cell culture using a two-enzyme system to evaluate agents targeting hypoxic tumor cells. *Radiat Res.* Nov 2008;170(5):651-660.
51. Zitta K, Meybohm P, Bein B, Heinrich C, Renner J, Cremer J, Steinfath M, Scholz J, Albrecht M. Serum from patients undergoing remote ischemic preconditioning protects cultured human intestinal cells from hypoxia-induced damage: involvement of matrixmetalloproteinase-2 and -9. *Mol Med.* 2012;18(1):29-37.
52. Zitta K, Meybohm P, Bein B, Huang Y, Heinrich C, Scholz J, Steinfath M, Albrecht M. Salicylic acid induces apoptosis in colon carcinoma cells grown in-vitro: influence of oxygen and salicylic acid concentration. *Exp Cell Res.* Apr 15 2012;318(7):828-834.
53. Zitta K, Meybohm P, Bein B, Ohnesorge H, Steinfath M, Scholz J, Albrecht M. Cytoprotective effects of the volatile anesthetic sevoflurane are highly dependent on timing and duration of sevoflurane conditioning: findings from a human, in-vitro hypoxia model. *Eur J Pharmacol.* Oct 25 2010;645(1-3):39-46.
54. Zitta K, Meybohm P, Bein B, Rodde C, Steinfath M, Scholz J, Albrecht M. Hypoxia-induced cell damage is reduced by mild hypothermia and postconditioning with catalase in-vitro: application of an enzyme based oxygen deficiency system. *Eur J Pharmacol.* Feb 25 2010;628(1-3):11-18.
55. Gibson QH, Swoboda BE, Massey V. Kinetics and Mechanism of Action of Glucose Oxidase. *J Biol Chem.* Nov 1964;239:3927-3934.
56. Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci.* Jan 2007;32(1):44-50.

57. Bell GD. Premedication, preparation, and surveillance. *Endoscopy*. Feb 2000;32(2):92-100.
58. Kurt M, Bilge SS, Kukula O, Celik S, Kesim Y. Anxiolytic-like profile of propofol, a general anesthetic, in the plus-maze test in mice. *Pol J Pharmacol*. Nov-Dec 2003;55(6):973-977.
59. Dandoy M, Poisson F, Lampl E, Reynaud S, Rondet S, Proust MN, Mallet A, Maurin JP. Anesthesia using propofol during surgery of strabismus in children. A comparison of two different protocols of induction and maintenance. *Cah Anesthesiol*. Oct 1990;38(4):241-245.
60. Jost U, Dorsing C, Jahr C, Hirschauer M. Propofol and postoperative nausea and/or vomiting. *Anaesthesist*. Sep 1997;46(9):776-782.
61. Borgeat A, Stirnemann HR. Antiemetic effect of propofol. *Anaesthesist*. Nov 1998;47(11):918-924.
62. Sneyd JR, Carr A, Byrom WD, Bilski AJ. A meta-analysis of nausea and vomiting following maintenance of anaesthesia with propofol or inhalational agents. *Eur J Anaesthesiol*. Jul 1998;15(4):433-445.
63. Dong XP, Xu TL. The actions of propofol on gamma-aminobutyric acid-A and glycine receptors in acutely dissociated spinal dorsal horn neurons of the rat. *Anesth Analg*. Oct 2002;95(4):907-914, table of contents.
64. Kahraman S, Demiryurek AT. Propofol is a peroxynitrite scavenger. *Anesth Analg*. May 1997;84(5):1127-1129.
65. Mathy-Hartert M, Mouithys-Mickalad A, Kohnen S, Deby-Dupont G, Lamy M, Hans P. Effects of propofol on endothelial cells subjected to a peroxynitrite donor (SIN-1). *Anaesthesia*. Nov 2000;55(11):1066-1071.
66. Green TR, Bennett SR, Nelson VM. Specificity and properties of propofol as an antioxidant free radical scavenger. *Toxicol Appl Pharmacol*. Nov 1994;129(1):163-169.
67. De La Cruz JP, Zanca A, Carmona JA, de la Cuesta FS. The effect of propofol on oxidative stress in platelets from surgical patients. *Anesth Analg*. Oct 1999;89(4):1050-1055.
68. Aoki H, Mizobe T, Nozuchi S, Hiramatsu N. In vivo and in vitro studies of the inhibitory effect of propofol on human platelet aggregation. *Anesthesiology*. Feb 1998;88(2):362-370.
69. Hirakata H, Nakamura K, Yokubol B, Toda H, Hatano Y, Urabe N, Mori K. Propofol has both enhancing and suppressing effects on human platelet aggregation in vitro. *Anesthesiology*. Nov 1999;91(5):1361-1369.
70. Gonzalez-Correa JA, Cruz-Andreotti E, Arrebola MM, Lopez-Villodres JA, Jodar M, De La Cruz JP. Effects of propofol on the leukocyte nitric oxide pathway: in vitro and ex vivo studies in surgical patients. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. Jan 2008;376(5):331-339.
71. Rossaint J, Rossaint R, Weis J, Fries M, Rex S, Coburn M. Propofol: neuroprotection in an in vitro model of traumatic brain injury. *Crit Care*. 2009;13(2):R61.
72. Engelhard K, Werner C, Eberspacher E, Pape M, Stegemann U, Kellermann K, Hollweck R, Hutzler P, Kochs E. Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats: a long-term observation. *Anesthesiology*. Oct 2004;101(4):912-917.
73. Gelb AW, Bayona NA, Wilson JX, Cechetto DF. Propofol anesthesia compared to awake reduces infarct size in rats. *Anesthesiology*. May 2002;96(5):1183-1190.

74. Ito H, Watanabe Y, Isshiki A, Uchino H. Neuroprotective properties of propofol and midazolam, but not pentobarbital, on neuronal damage induced by forebrain ischemia, based on the GABAA receptors. *Acta Anaesthesiol Scand.* Feb 1999;43(2):153-162.
75. Wang J, Yang X, Camporesi CV, Yang Z, Bosco G, Chen C, Camporesi EM. Propofol reduces infarct size and striatal dopamine accumulation following transient middle cerebral artery occlusion: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol.* Oct 11 2002;452(3):303-308.
76. Ishii H, Arai T, Segawa H, Morikawa S, Inubushi T, Fukuda K. Effects of propofol on lactate accumulation and oedema formation in focal cerebral ischaemia in hyperglycaemic rats. *Br J Anaesth.* Mar 2002;88(3):412-417.
77. Adembri C, Venturi L, Tani A, Chiarugi A, Gramigni E, Cozzi A, Pancani T, De Gaudio RA, Pellegrini-Giampietro DE. Neuroprotective effects of propofol in models of cerebral ischemia: inhibition of mitochondrial swelling as a possible mechanism. *Anesthesiology.* Jan 2006;104(1):80-89.
78. Chu CH, David Liu D, Hsu YH, Lee KC, Chen HI. Propofol exerts protective effects on the acute lung injury induced by endotoxin in rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007;20(5):503-512.
79. Lee CJ, Lee RP, Subeq YM, Lee CC, Peng TC, Hsu BG. Propofol protects against hemorrhagic shock-induced organ damage in conscious spontaneously hypertensive rats. *Biol Res Nurs.* Oct 2009;11(2):152-162.
80. Lee H, Jang YH, Lee SR. Protective effect of propofol against kainic acid-induced lipid peroxidation in mouse brain homogenates: comparison with trolox and melatonin. *J Neurosurg Anesthesiol.* Jul 2005;17(3):144-148.
81. Navapurkar VU, Skepper JN, Jones JG, Menon DK. Propofol preserves the viability of isolated rat hepatocyte suspensions under an oxidant stress. *Anesth Analg.* Nov 1998;87(5):1152-1157.
82. Young Y, Menon DK, Tisavipat N, Matta BF, Jones JG. Propofol neuroprotection in a rat model of ischaemia reperfusion injury. *Eur J Anaesthesiol.* May 1997;14(3):320-326.
83. Yumoto M, Nishida O, Nakamura F, Katsuya H. Propofol attenuates oxidant-induced acute lung injury in an isolated perfused rabbit-lung model. *J Anesth.* 2005;19(4):287-294.
84. Aldemir O, Celebi H, Cevik C, Duzgun E. The effects of propofol or halothane on free radical production after tourniquet induced ischaemia-reperfusion injury during knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand.* Nov 2001;45(10):1221-1225.
85. Sayin MM, Ozatamer O, Tasoz R, Kilinc K, Unal N. Propofol attenuates myocardial lipid peroxidation during coronary artery bypass grafting surgery. *Br J Anaesth.* Aug 2002;89(2):242-246.
86. Schulte am Esch J, Bause H, Kochs E, Scholz J, Standl T, Werner C. *Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie*: Thieme, Stuttgart; 2007.
87. Inada T, Kubo K, Kambara T, Shingu K. Propofol inhibits cyclo-oxygenase activity in human monocytic THP-1 cells. *Can J Anaesth.* Mar 2009;56(3):222-229.
88. Inada T, Kubo K, Shingu K. Promotion of interferon-gamma production by natural killer cells via suppression of murine peritoneal macrophage prostaglandin E(2) production using intravenous anesthetic propofol. *Int Immunopharmacol.* Oct 2010;10(10):1200-1208.

89. Wang H, Xue Z, Wang Q, Feng X, Shen Z. Propofol protects hepatic L02 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis via activation of extracellular signal-regulated kinases pathway. *Anesth Analg.* Aug 2008;107(2):534-540.
90. Sanchez-Conde P, Rodriguez-Lopez JM, Nicolas JL, Lozano FS, Garcia-Criado FJ, Cascajo C, Gonzalez-Sarmiento R, Muriel C. The comparative abilities of propofol and sevoflurane to modulate inflammation and oxidative stress in the kidney after aortic cross-clamping. *Anesth Analg.* Feb 2008;106(2):371-378, table of contents.
91. Cai J, Hu Y, Li W, Li L, Li S, Zhang M, Li Q. The neuroprotective effect of propofol against brain ischemia mediated by the glutamatergic signaling pathway in rats. *Neurochem Res.* Oct 2011;36(10):1724-1731.
92. Karmarkar SW, Bottum KM, Tischkau SA. Considerations for the use of anesthetics in neurotoxicity studies. *Comp Med.* Aug 2010;60(4):256-262.
93. Hsing CH, Lin MC, Choi PC, Huang WC, Kai JI, Tsai CC, Cheng YL, Hsieh CY, Wang CY, Chang YP, Chen YH, Chen CL, Lin CF. Anesthetic propofol reduces endotoxic inflammation by inhibiting reactive oxygen species-regulated Akt/IKKbeta/NF-kappaB signaling. *PLoS One.* 2011;6(3):e17598.
94. Huang Y, Zitta K, Bein B, Scholz J, Steinfath M, Albrecht M. Effect of propofol on hypoxia re-oxygenation induced neuronal cell damage in vitro. *Anaesthesia.* Jan 2013;68(1):31-39.
95. Mueller S, Millonig G, Waite GN. The GOX/CAT system: a novel enzymatic method to independently control hydrogen peroxide and hypoxia in cell culture. *Adv Med Sci.* 2009;54(2):121-135.
96. <http://www.fachinfo.de/data/fi/jsearch?praep Propfol>.
97. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* Oct 2002;18(10):872-879.
98. Mülhardt C. *Der Experimentator Immunologie*: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 2009.
99. Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 2009.
100. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* Feb 2002;282(2):C227-241.
101. Zitta K, Bein B, Albrecht M. Letter to the editor. *J Mol Neurosci.* Jun 2013;50(2):248-249.
102. Shyu KG, Wang BW, Chen WJ, Kuan P, Lin CM. Angiotensin II mediates urotensin II expression by hypoxia in cultured cardiac fibroblast. *Eur J Clin Invest.* Jan 2012;42(1):17-26.
103. Vidau C, Brunet JL, Badiou A, Belzunces LP. Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. *Toxicol In Vitro.* Jun 2009;23(4):589-597.
104. Hellinger E, Bakk ML, Pocza P, Tihanyi K, Vastag M. Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures. *Eur J Pharm Sci.* Sep 11 2010;41(1):96-106.
105. Kvolik S, Glavas-Obrovac L, Bares V, Karner I. Effects of inhalation anesthetics halothane, sevoflurane, and isoflurane on human cell lines. *Life Sci.* Sep 23 2005;77(19):2369-2383.
106. Smedley JG, 3rd, Uzal FA, McClane BA. Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun.* May 2007;75(5):2381-2390.

107. Ma M, Vidal J, Saputo J, McClane BA, Uzal F. The VirS/VirR two-component system regulates the anaerobic cytotoxicity, intestinal pathogenicity, and enterotoxemic lethality of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *MBio*. 2011;2(1):e00338-00310.
108. Papatheodorou P, Wilczek C, Nolke T, Guttenberg G, Hornuss D, Schwan C, Aktories K. Identification of the cellular receptor of *Clostridium spiroforme* toxin. *Infect Immun*. Apr 2012;80(4):1418-1423.
109. Xu JJ, Wang YL. Propofol attenuation of hydrogen peroxide-mediated oxidative stress and apoptosis in cultured cardiomyocytes involves haeme oxygenase-1. *Eur J Anaesthesiol*. May 2008;25(5):395-402.
110. Ingels FM, Augustijns PF. Biological, pharmaceutical, and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2. *J Pharm Sci*. Aug 2003;92(8):1545-1558.
111. Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, Grove JR. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci*. Jan 1999;88(1):28-33.
112. Adler S, Pellizzer C, Paparella M, Hartung T, Bremer S. The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation. *Toxicol In Vitro*. Apr 2006;20(3):265-271.
113. Nishimura M, Nikawa T, Kawano Y, Nakayama M, Ikeda M. Effects of dimethyl sulfoxide and dexamethasone on mRNA expression of housekeeping genes in cultures of C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 14 2008;367(3):603-608.
114. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol*. Apr 1 2003;65(7):1035-1041.
115. Tan S, Zhou F, Nielsen VG, Wang Z, Gladson CL, Parks DA. Increased injury following intermittent fetal hypoxia-reoxygenation is associated with increased free radical production in fetal rabbit brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. Sep 1999;58(9):972-981.
116. Razorenova OV. Brain and muscle ARNT-like protein BMAL1 regulates ROS homeostasis and senescence: a possible link to hypoxia-inducible factor-mediated pathway. *Cell Cycle*. Jan 15 2012;11(2):213-214.
117. Paternotte E, Gaucher C, Labrude P, Stoltz JF, Menu P. Review: behaviour of endothelial cells faced with hypoxia. *Biomed Mater Eng*. 2008;18(4-5):295-299.
118. Nosal'ova V, Navarova J, Mihalova D, Sotnikova R. Mesenteric ischemia/reperfusion-induced intestinal and vascular damage: effect of stobadine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. Jan-Feb 2007;29(1):39-45.
119. Watanabe T, Oowada S, Kobayashi H, Nakano H, Asakura T, Asano T, Koizumi S, Jinnouchi Y, Katayama M, Kawakami Y, Nagaoka S, Ootsubo T. Measurement of radical-scavenging ability in small bowel ischemia/reperfusion injury in rats using an in vivo and ex vivo electron paramagnetic resonance technique. *Transplant Proc*. Jan-Feb 2007;39(1):253-257.
120. Li N, DeMarco VG, West CM, Neu J. Glutamine supports recovery from loss of transepithelial resistance and increase of permeability induced by media change in Caco-2 cells. *J Nutr Biochem*. Jul 2003;14(7):401-408.
121. Kim HY, Kim MJ, Yang JE, Kim BK, Han J, Lee YS, Kim JH. Effects of intermittent media replacement on the gene expression of differentiating neural progenitor cells. *Mol Biosyst*. Feb 2012;8(2):602-608.

122. Kokita N, Hara A. Propofol attenuates hydrogen peroxide-induced mechanical and metabolic derangements in the isolated rat heart. *Anesthesiology*. Jan 1996;84(1):117-127.
123. Kokita N, Hara A, Abiko Y, Arakawa J, Hashizume H, Namiki A. Propofol improves functional and metabolic recovery in ischemic reperfused isolated rat hearts. *Anesth Analg*. Feb 1998;86(2):252-258.
124. Liu KX, Rinne T, He W, Wang F, Xia Z. Propofol attenuates intestinal mucosa injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *Can J Anaesth*. May 2007;54(5):366-374.
125. Sugawara T, Chan PH. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal*. Oct 2003;5(5):597-607.
126. Murphy PG, Myers DS, Davies MJ, Webster NR, Jones JG. The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol). *Br J Anaesth*. Jun 1992;68(6):613-618.
127. Eriksson O, Pollesello P, Saris NE. Inhibition of lipid peroxidation in isolated rat liver mitochondria by the general anaesthetic propofol. *Biochem Pharmacol*. Jul 22 1992;44(2):391-393.
128. Kvam C, Granese D, Flaibani A, Pollesello P, Paoletti S. Hyaluronan can be protected from free-radical depolymerisation by 2,6-diisopropylphenol, a novel radical scavenger. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 30 1993;193(3):927-933.
129. Sagara Y, Hendler S, Khoh-Reiter S, Gillenwater G, Carlo D, Schubert D, Chang J. Propofol hemisuccinate protects neuronal cells from oxidative injury. *J Neurochem*. Dec 1999;73(6):2524-2530.
130. Liu J, Hou J, Xia ZY, Zeng W, Wang X, Li R, Ke C, Xu J, Lei S, Xia Z. Recombinant PTD-Cu/Zn SOD attenuates hypoxia-reoxygenation injury in cardiomyocytes. *Free Radic Res*. May 2013;47(5):386-393.
131. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, Schumacker PT. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab*. Jun 2005;1(6):401-408.
132. Lee YM, Shin JW, Lee EH, Moon Y, Seo YJ, Kim JY, Kim JU. Protective effects of propofol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human kidney proximal tubular cells. *Korean J Anesthesiol*. Nov 2012;63(5):441-446.
133. Shao H, Li J, Zhou Y, Ge Z, Fan J, Shao Z, Zeng Y. Dose-dependent protective effect of propofol against mitochondrial dysfunction in ischaemic/reperfused rat heart: role of cardiolipin. *Br J Pharmacol*. Apr 2008;153(8):1641-1649.
134. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol*. Sep 2007;8(9):722-728.
135. Mishra S, Imlay J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch Biochem Biophys*. 2012 Sep 15;525(2):145-160.
136. Gregoriadis G, Fernandes A, Mital M, McCormack B. Polysialic acids: potential in improving the stability and pharmacokinetics of proteins and other therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. Dec 2000;57(13-14):1964-1969.
137. Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA, Ghourchian H, Ahmad F, Kiany A, Atri MS, Ariaeenejad S, Kavousi K, Saboury AA. Effect of compatible and

- noncompatible osmolytes on the enzymatic activity and thermal stability of bovine liver catalase. *J Biomol Struct Dyn*. Dec 2013;31(12):1440-1454.
- 138.** Arockiaraj J, Easwvaran S, Vanaraja P, Singh A, Othman RY, Bhassu S. Molecular cloning, characterization and gene expression of an antioxidant enzyme catalase (MrCat) from *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*. May 2012;32(5):670-682.
- 139.** Polidoros AN, Scandalios JG. Response of the maize catalases to light. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(3):497-504.
- 140.** Allaouchiche B, Debon R, Goudable J, Chassard D, Duflo F. Oxidative stress status during exposure to propofol, sevoflurane and desflurane. *Anesth Analg*. Oct 2001;93(4):981-985.
- 141.** De La Cruz JP, Sedeno G, Carmona JA, Sanchez de la Cuesta F. The in vitro effects of propofol on tissular oxidative stress in the rat. *Anesth Analg*. Nov 1998;87(5):1141-1146.
- 142.** Luo T, Xia Z. A small dose of hydrogen peroxide enhances tumor necrosis factor-alpha toxicity in inducing human vascular endothelial cell apoptosis: reversal with propofol. *Anesth Analg*. Jul 2006;103(1):110-116.
- 143.** Navarro RE, Aguirre J. Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. *J Bacteriol*. Nov 1998;180(21):5733-5738.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht und mich dabei unterstützt haben.

Zuerst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Steinfath für die Möglichkeit im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin eine Dissertationsarbeit durchführen zu dürfen.

Insbesondere danke ich meinem Doktorvater PD Dr. Martin Albrecht für die interessante Aufgabenstellung, die nette, kontinuierliche Betreuung und die wertvollen Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Karina Zitta und Christin Heinrich für ihre Unterstützung und ihre Weitergabe von Erfahrungen sowie die guten Arbeitsbedingungen im Labor.

Darüber hinaus danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und unendliche Geduld beim Erstellen dieser Arbeit sowie während des gesamten Studiums.

8 Lebenslauf

Name Sarah Peters
 Anschrift Jahnstraße 7, 24116 Kiel
 Geburtstag 19. Juli 1986
 Geburtsort Hamburg

Studium

08/2010-heute Experimentelle Doktorarbeit im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel

10/2009-vorauss. 10/2013 Christian-Albrechts-Universität Kiel,
 Studium der Medizin;
 angestrebter Abschluss: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung;

Praktisches Jahr:

1. Tertial: Wahlfach Anästhesie, Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel; 2. Tertial: Chirurgie, Medizinischer Klinikverbund Flensburg; 3. Tertial: Innere Medizin, Medizinischer Klinikverbund Flensburg

10/2007-09/2009 Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
 Studium der Medizin
 Physikum 08/2009, Note 2,5 und dem Wahlfach „Infektiologie für Vorkliniker“ mit der Note 1

10/2006-09/2007 Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
 Studium der Biochemie

Schulbildung

06/2006 Gymnasium Rissen, Hamburg, Abitur, Note 1,3

2003-2004 Muckross Park College, Dublin, Irland

1997-2006 Gymnasium Rissen, Hamburg, Klasse 5-10, 12-13

1993-1997 Grundschule Iserberg, Hamburg, Klasse 1-4

Veröffentlichungen

- 06/2012 Zitta K, Peters S, Bein B, Scholz J, Steinfath M, Albrecht M. Molecular and cellular effects of propofol on hypoxia - induced cell damage in intestinal cells grown in - vitro: involvement of hydrogen peroxide and catalase. *European Journal of Anaesthesiology*. June 2012; 29 (Supplement 50): 144.
- 06/2011 Zitta K, Meybohm P, Lauer F, Peters S, Bein B, Albrecht M. Serum from cardiac surgery patients undergoing remote ischemic preconditioning mediates cytoprotective effects in-vitro: Investigations employing a CaCo - 2 cell hypoxia model. *European Journal of Anaesthesiology*. June 2011, 28 (Supplement 48): 51.