

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ANÄSTHESIOLOGIE

Prof. Dr. med. Bernhard Graf
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Wirkung volatiler Anästhetika auf die Tumorprogression von
Kolonkarzinomzellen *in vitro***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Viktoria Ullrich

2019

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ANÄSTHESIOLOGIE

Prof. Dr. med. Bernhard Graf
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Wirkung volatiler Anästhetika auf die Tumorprogression von
Kolonkarzinomzellen *in vitro***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Viktoria Ullrich

2019

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Anika Bundscherer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Hornung
Tag der mündlichen Prüfung:	05.11.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Material und Methoden.....	9
2.1 Materialien	9
2.1.1 Geräte	9
2.1.2 Gebrauchsmaterialien.....	10
2.1.3 Lösungen und Chemikalien	11
2.1.4 Testkits	13
2.1.5 Kulturmedien, Puffer und Enzyme	13
2.1.6 Verwendete Medikamente.....	14
2.1.7 Antikörper.....	17
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Zellkultur.....	18
2.2.2 Versuchsaufbau	22
2.2.3 Durchflusszytometrische Analyse	25
2.2.4 Western Blot Analyse	30
2.3 Statistik	36
3. Ergebnisse	37
3.1 Zellzyklusanalyse	37
3.2 Apoptosemessungen	42
3.2.1 Messung der Apoptoserate via Annexin V Apoptosis Detection Kit.....	42
3.2.2 Ergebnisse der Western Blot Analyse.....	45
4. Diskussion.....	46
4.1 Allgemeiner Teil.....	46
4.1.1 Tumorentstehung und Metastasierung	46
4.1.1.1 Anhaltende Wachstumssignale	46

4.1.1.2 Ausschalten wachstumshemmender Signalwege	46
4.1.1.3 Invasion und Metastasierung	47
4.1.1.4 Andauernde DNA-Vermehrung	47
4.1.1.5 Angiogenese	50
4.1.1.6 Zelltodresistenz.....	50
4.1.2 Auswahl der Medikamente	53
4.1.2.1 Staurosporin als Positivkontrolle für die Messung der Apoptoserate	53
4.1.2.2 Acetylsalicylsäure als Positivkontrolle für die Zellzyklusanalyse	54
4.1.2.3 Sevofluran.....	54
4.1.2.4 Desfluran.....	55
4.2 Spezieller Teil.....	56
4.2.1 Wirkung inhalativer Anästhetika auf nicht entartete Zellen	56
4.2.2 Auswahl der Medikamentendosierung und -expositionszeit.....	57
4.2.3 Relation <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	58
4.2.4 Wirkung inhalativer Anästhetika auf die Tumormigration und -invasion	59
4.2.5 Einfluss von Desfluran auf den Zellzyklus bei SW480 Zellen	60
4.2.6 Einfluss von Desfluran auf die Apoptoserate bei SW480 Zellen.....	62
4.2.7 Einfluss von Sevofluran auf den Zellzyklus bei SW480 Zellen	61
4.2.8 Einfluss von Sevofluran auf die Apoptoserate bei SW480 Zellen	63
4.2.9 Ausblick.....	66
4.3 Zusammenfassung.....	67
5. Anhang.....	69
5.1 Abkürzungsverzeichnis	69
5.2 Tabellenverzeichnis.....	70
5.3 Abbildungsverzeichnis	71
5.4 Literaturverzeichnis	72

1. Einleitung

Etwa 50 Prozent der Männer und 44 Prozent der Frauen erkranken im Laufe ihres Lebens an Krebs. Rund 225.000 Menschen, jeder vierte Mann und jede fünfte Frau, sterben im Jahr an den Folgen ihres Tumorleidens. Krebs bleibt nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (1, 2).

Zu den häufigsten Krebsarten gehören Lungen-, Brust-, Darm-, Prostata- und Magenkrebs (3, 4).

Nach wie vor ist die chirurgische Entfernung des Tumors Mittel der Wahl (5–7). Die perioperative Phase könnte hierbei einen entscheidenden Einfluss auf die Tumormetastasierung nehmen (8, 9). Abbildung 1 erläutert das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren, die während der Operation auf den Organismus einwirken und eine Dissemination der im Körper verbleibenden Tumorzellen begünstigen könnten. Entscheidend für die Wahrscheinlichkeit einer Tumorausbreitung ist das Gleichgewicht zwischen dem Potenzial der Tumorzelle an sich und den immunologischen Abwehrmechanismen des Organismus.

Durch die chirurgische Traumatisierung der tumorversorgenden Blut- und Lymphgefäße bzw. des entarteten Gewebes können Tumorzellen in den Körperkreislauf freigesetzt werden. Mit der Aussaat dieser Tumorzellen steigt das Risiko der Metastasierung. Zudem setzt bereits perioperativ die Wundheilung in Form gesteigerter Expression von Wachstumsfaktoren und Proangiogenen (Angiostatin und Endostatin) ein. Diese fördern jedoch nicht nur das Wachstum und die Gefäßversorgung der nicht entarteten Zellen, sondern auch die Progression der disseminierten Tumorzellen und entstandenen Mikrometastasen (9–11). Das Immunsystem, welches dem entgegenwirken sollte, wird perioperativ durch verschiedene Mechanismen gehemmt. Psychische Faktoren wie Schmerz und Angst als auch Faktoren wie Hypovolämie, Azidose, Hypoxie, Medikamente und systemisch wirksame Mediatoren aus dem Operationsgebiet tragen zu einem erhöhten neurohumoralen Stresslevel für den Organismus bei. Über die Aktivierung des sympathischen Nervensystems sowie die Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Katecholaminen, Glukokortikoiden und Prostaglandinen (10, 12). Diese führen zu einer Schwächung des Immunsystems, insbesondere der zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen.

Jedoch sind gerade diese Zellen für die Elimination entarteter Zellen von essenzieller Bedeutung, was Studien im Tiermodell belegen (8, 10, 13). In der Literatur finden sich eindeutige Hinweise, dass eine erniedrigte Anzahl natürlicher Killerzellen perioperativ mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität von Tumorpatienten einhergeht (14–16).

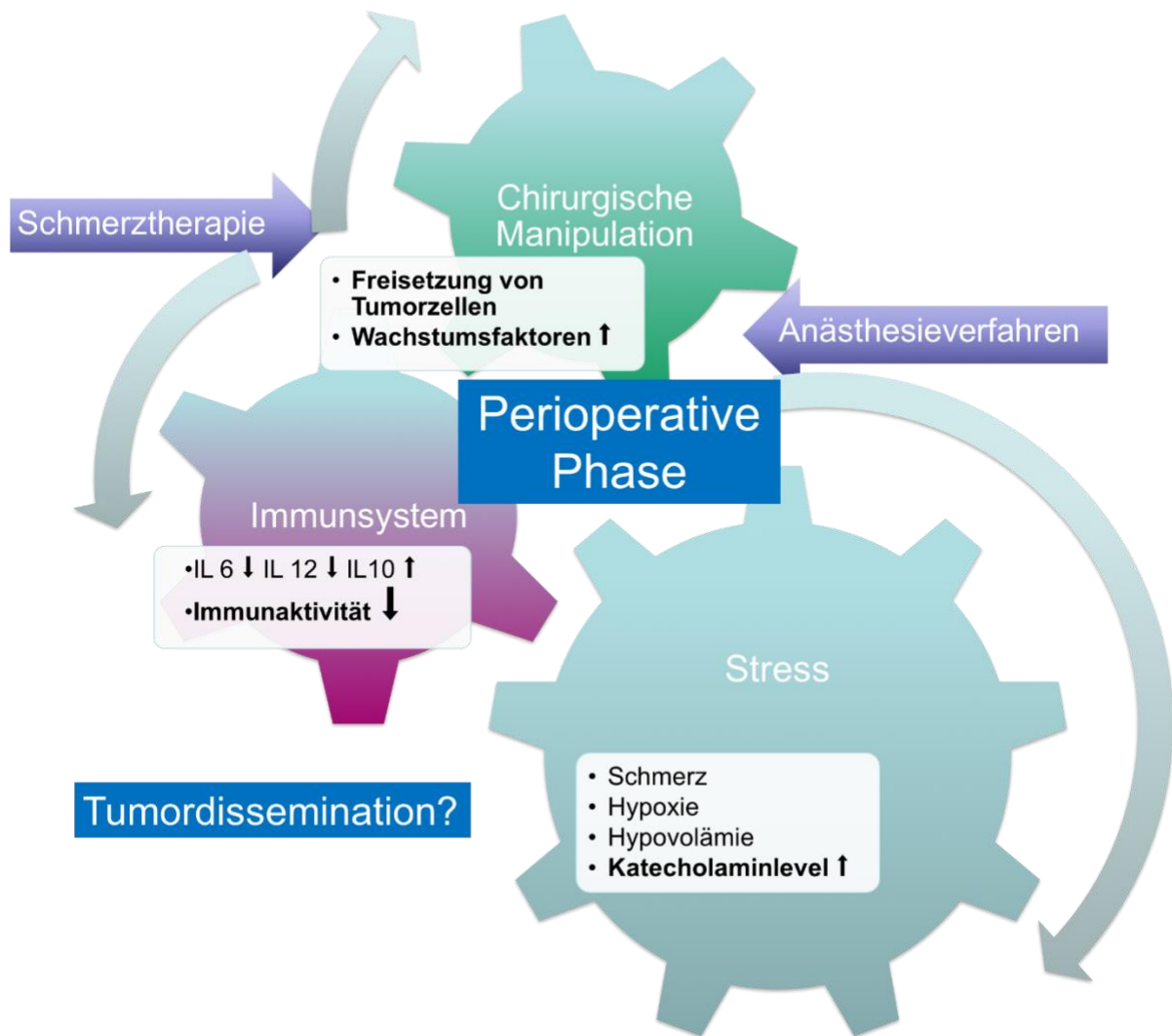


Abbildung 1: Die perioperative Phase als potenzieller Risikofaktor für Tumordissemination.

Des Weiteren ist die Entwicklung postoperativer Metastasen häufig. Hierfür werden die postoperativ im Organismus verbleibenden Mikrometastasen verantwortlich gemacht. Für das Kolonkarzinom beträgt, selbst in den Duke Stadien I und II, der Anteil an frei zirkulierenden Tumorzellen postoperativ bis zu 30 % (6, 17).

In vitro wurden einige Medikamente bezüglich ihrer Effekte auf Tumorzellen, u.a. Paracetamol, NSAR, Celecoxib, Metamizol und Opiode untersucht. Dabei wurden chemopräventive und antineoplastische Effekte nachgewiesen, die unter anderem auf

Apoptose induzierende Wirkungen sowie Zellzyklusarrest in der G0/G1 Phase zurückgeführt wurden (8, 18, 13, 19).

Bei einer Vielzahl der perioperativ genutzten Anästhetika sind die Effekte auf Tumorzellen noch nicht vollständig untersucht.

Die balancierte Anästhesie ist ein gut etabliertes und in der Praxis gängiges Anästhesieverfahren. Durch die Kombination verschiedener medikamentöser Substanzklassen können die Einzeldosen dieser Medikamente und damit auch die unerwünschten Arzneimittelwirkungen reduziert werden (20). Die Narkose wird zumeist mit einem intravenösen Anästhetikum eingeleitet und entweder mittels volatiler Anästhetika oder als totale intravenöse Anästhesie aufrechterhalten. Opioide wie auch Ketamin oder Nicht-Opioide-Analgetika werden zur Erreichung der Analgesie eingesetzt. Zudem können Regionalanästhesieverfahren in Form einer epiduralen Anästhesie, paravertebralen oder peripheren Nervenblockade ergänzend eingesetzt werden, um die intra- und postoperative Schmerztherapie zu verbessern (21).

Aktuelle Studien geben Hinweise darauf, dass das Anästhesieverfahren auch das onkologische Outcome von Tumorpatienten beeinflussen kann (22–25). So zeigte sich, dass das Überleben von Patienten mit Epiduralanästhesie signifikant höher im Vergleich zu denen war, die eine Generalanästhesie erhalten haben (26, 27). Zudem kann eine suffiziente Schmerztherapie die Anfälligkeit für eine Metastasierung im Tiermodell senken (28). Die optimale Kombination von Anästhetika und Anästhesieverfahren könnte dazu beitragen, das Überleben von Krebspatienten zu verbessern (29, 30).

Es wurde daher in dieser Arbeit untersucht, ob die etablierten Inhalationsanästhetika Sevofluran und Desfluran möglicherweise einen Effekt auf die Tumorprogression haben.

Bereits beschrieben ist der Einfluss volatiler Anästhetika auf das Immunsystem und neurodegenerative Erkrankungen (31). Lange operative Inhalationsnarkosen können Symptome eines Morbus Alzheimer oder Parkinson verschlimmern (32, 33). Im Tiermodell führen Desfluran wie auch Sevofluran zur Neuroapoptose und Störungen des Lernverhaltens (34). Zudem wurde die natürliche Killerzellfunktion durch

Inhalationsanästhetika beeinträchtigt, wohingegen dies bei intravenösen Anästhetika nicht der Fall ist (35).

Es konnte außerdem bereits festgestellt werden, dass Sevofluran die Proliferation von Brustkrebszellen *in vitro* erhöht (36).

Allerdings sind die Auswirkungen inhalativer Anästhetika auf die Proliferation und Apoptose von Kolonkarzinomzellen noch nicht geklärt.

Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Haben die in der Anästhesiologie üblichen Inhalationsanästhetika Sevofluran und Desfluran in klinisch verwendeten Konzentrationen einen Effekt auf die Apoptose in SW80 Kolonkarzinomzellen?
2. Über welche Signalwege ist ein solcher Effekt erklärbar?
3. Beeinflussen die untersuchten Anästhetika Sevofluran und Desfluran in klinisch verwendeten Konzentrationen den Zellzyklus von SW480 Kolonkarzinomzellen?
4. Haben die untersuchten Anästhesie-Gase unterschiedliche Wirkungen auf SW480 Zellen?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Nachfolgend sind die verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien, Test Kits, Kulturmedien und Enzyme tabellarisch aufgelistet.

2.1.1 Geräte

Produkt	Hersteller
Brutschrank Heracell 150i CU (37°C, 5% CO ₂)	ThermoFisher Scientific (Schwerte, D)
Capnomac Ultima Kapnograf	Datex Ohmeda GmbH (Duisburg, D)
Digestorium	Waldner Holding GmbH & Co. KG (Wangen, D)
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Elektronischer Timer und Stoppuhr	TFA Dostmann GmbH & CoKG (Wertheim, D)
Heizblock Techne® Dri-Block®	SIGMA-ALDRICH® (Missouri, USA)
Kühlschrank 4°C	Robert Bosch GmbH (Gerlingen, D)
Lichtmikroskop Leitz DM IRB	Leica Microsystems (Wetzlar, D)
Membran-Vakuumpumpe	Vaccubrand GmbH und CoKG (Wertheim, D)
Multipette® plus 100µl, 5ml, 50 ml	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Pipettierhelfer Accu jet®	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, D)
Schüttelgerät MS2 Minishaker	IKA-Werke GmbH (Staufen, D)
Schüttelgerät Vortex Genie 2	Scientific Industries Incorporated (Bohemia, USA)
Tiefkühlschrank -20°C	Robert Bosch GmbH (Gerlingen, D)
Thermostatisches Wasserbad 37°C	Fried Electric (Haifa, Israel)
Vapor Sevorane® ABBOTT	Drägerwerk AG (Lübeck, D)
Vapor Devapor	Drägerwerk AG (Lübeck, D)
Wasserschüttelbad 37°C	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, D)
Zellkulturbank LaminarFlow HeraSafeKS	ThermoFisher Scientific (Schwerte, D)

Zellzähler Typ Casy TT	Roche Innovatis AG (Mannheim, D)
Zentrifuge Biofuge stratos	ThermoFisher Scientific (Schwerte, D)
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	ThermoFisher Scientific (Schwerte, D)

Tabelle 1: Für die Arbeit genutzte Geräte im Anästhesie und HTC-Labor

2.1.2 Gebrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Becherglas 5, 10, 50 ml	SIMAX® (Křížová, Czech Republic)
Blott Filterpapier	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
Combitips advanced® 100µl	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Combitips advanced® 5 ml	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Combitips advanced® 50 ml	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Facs-Röhrchen 5 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Falcon Tubes, 15 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Falcon Tubes CELLSTAR®, 50 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Fiber Pads 4 St Mini T/B	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
Glasplatten	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
Hyperfilm™ ECL	Amersham (Freiburg, D)
Messpipetten aus Glas, 5,10,20 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, D)
Mini trans-Blot Cell	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
MP Tetra Cell, 4 Gels 10 W, 0,75 mm	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
MP Tetra Cell, 4 Precast Gels	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
Peha-Soft, Latex-Handschuhe	Paul Hartmann AG (Heidenheim, D)

Pipettenspitzen 10 µl DIAMOND® EASY PACK™	GILSON® Incorporated (Middleton, USA)
Pipettenspitzen 100 µl	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Pipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
SafeSeal Gefäß 1,5 ml, braun	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
SafeSeal Pipettenspitzen 10µl	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, D)
Serologische Einmalpipetten 10 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Spacer Platten	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
T ₂₅ Zellkulturflaschen mit blauer Verschlusskappe	FALCON®Corning Incorporated- Life Sciences (Durham, USA)
T ₇₅ Zellkulturflaschen mit blauer Verschlusskappe	FALCON®Corning Incorporated- Life Sciences (Durham, USA)
Zellschaber	ThermoFisher Scientific (Schwerte, D)

Tabelle 2: Für die Arbeit genutzte Gebrauchsmaterialien

2.1.3 Lösungen und Chemikalien

Produkt	Hersteller
30%ige/ 0,8%ige Acrylamidlösung	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
APS Ammoniumpersulfat	SIGMA-ALDRICH® (Missouri, USA)
CASY ton (steril abfiltriert)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder	LI-COR Biosciences – GmbH (Bad Homburg vor der Höhe, D)
Coomassie stain solution	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
DMSO Dimethyl sulfoxide	SIGMA-ALDRICH® (Missouri, USA)
DPBS Dulbecco's Phosphate- Buffered Solution, ohne Calcium, ohne Magnesium, Waschpufferlösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
ECL Western Blotting Detection Kit	Amersham (Freiburg, D)

EDTA Ethylendiamin-tetraacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
FACS Clean™	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
FACS Flow™	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
FACS Rinse™	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
FKS (fetales Kälberserum)	SIGMA-ALDRICH® (Missouri, USA)
Glycerin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Laemmli Sample Buffer 4x	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
LiChrosolv® Methanol	Merck KGaA (Darmstadt, D)
L- Glutamin, 200 mM	SIGMA-ALDRICH® (Missouri, USA)
Magermilchpulver	J.M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG (Obergünzburg, D)
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Natrium-Pyruvat	SIGMA-ALDRICH® (Missouri, USA)
Penicillin-Streptomycin	SIGMA-ALDRICH® (Missouri, USA)
Ponceau S	SIGMA-ALDRICH® (Missouri, USA)
Propidiumjodid Endkonzentration für Versuch 1,5 mM = 100 mg PJ in 100 ml PBS	Molecular Probes® ThermoFisher Scientific (Schwerte, D)
Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
RPMI 1640	PAN™ Biotech (Aidenbach, D)
SDS Sodiumdodecylsulfat 10 g	SIGMA-ALDRICH® (Missouri, USA)
TBS Buffer 10x	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
TEMED	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
TG Puffer 10x	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
TRIS SDS Glycin 10x Puffer	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
Tris 0,5M HCl pH 6,8	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)

Tris 1,5M HCl pH 8,8	Life Technologies BIORAD (Kalifornien, USA)
Triton X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)

Tabelle 3: Für die Arbeit genutzte Lösungen und Chemikalien

2.1.4 Testkits

2.1.4.1 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™)

Inhalt:

- 50 ml Annexin V Bindepuffer
- 0,5 ml FITC Annexin V
- 2 ml Propidiumiodid-Färbelösung

Lagerung: bei 4°C im Dunklen.

2.1.4.2 Pierce® BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific (Schwerte, D))

Inhalt:

- Pierce® BCA Protein Assay Reagenz A, 2 x 500 ml
- Pierce® BCA Protein Assay Reagenz B, 1 x 25 ml
- Albumin Standard-Lösung, 10 x 1 ml

Lagerung: bei 4°C im Dunklen.

2.1.5 Kulturmedien, Puffer und Enzyme

Als Kulturmedium für die SW480 Zelllinie diente PAN™ Biotech RPMI 1640, versetzt mit 2 mM L-Glutamin, 10 prozentigem FKS sowie 5 prozentigem Penicillin-Streptomycin und 5 prozentigem Natrium-Pyruvat.

Für die Versuche sowie das Passagieren der Zellen wurde SIGMA Trypsin in einer 1:4 Verdünnung, versetzt mit 0,53 mM EDTA, verwendet.

Um die Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer zu gewährleisten, mussten die Zellen mit RNase angedaut werden. Das Enzym wurde dafür 1:10 in PBS verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 1 mg/ml entstand.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verwendeten Enzyme und Hersteller. Die Lagerung des Mediums erfolgte bei 4° C im Kühlschrank. Die genannten Reagenzien und Enzyme wurden bei -20 °C im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Vor Verwendung wurden sie für 30 Minuten im Wasserbad bei 37,0° C erwärmt.

Enzym	Hersteller
RNase Away	Qiagen N.V. (Hilden, D)
Trypsin	SIGMA-ALDRICH® (Missouri, USA)

Tabelle 4: In der Arbeit verwendete Enzyme

2.1.6 Verwendete Medikamente

2.1.6.1 Staurosporin

Tabelle 5 gibt die chemischen Eigenschaften sowie die Strukturformel und Herstellungsweise der verwendeten Verdünnung wieder.

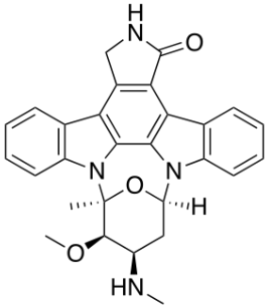
Staurosporin		 <p>Abbildung 2: Chemische Strukturformel von Staurosporin Quelle: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Staurosporine.svg. (zuletzt abgerufen 30.04.19).</p>
Bestellnummer	S-5921	
Firma	SIGMA-ALDRICH® (Missouri, USA)	
Molare Masse	466,53 g/mol	
Konz. Stamm-Lsg.	1 µM	
Lagerung bei	2-8°C	

Tabelle 5: Eigenschaften, Strukturformel und Herstellung der benötigten Verdünnung von Staurosporin.

2.1.6.2 Acetylsalicylsäure

Tabelle 6 gibt die wichtigsten Eigenschaften und die Strukturformel von Acetylsalicylsäure sowie die Herstellungsweise der benötigten Endkonzentration von 5 mM wieder.

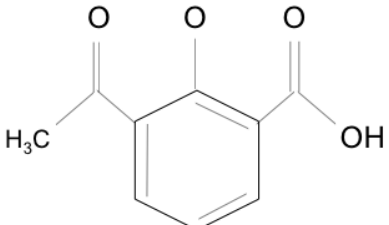
Acetylsalicylsäure		
Bestellnummer	A-5376	
Firma	SIGMA-ALDRICH® (Missouri, USA)	
Molare Masse	180,16 g/mol	
Konz. Stamm- Lsg.	5 mM	
Lagerung bei	Raumtemperatur	

Abbildung 3: Strukturformel Acetylsalicylsäure
Quelle: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspirin-Structural.svg>,
(zuletzt abgerufen am 30.04.19)

Tabelle 6: Eigenschaften, Strukturformel und Herstellungsweise der verwendeten Konzentration von ASS

2.1.6.3 Sevofluran

Tabelle 7 zeigt die chemische Strukturformel von Sevofluran und gibt die wichtigsten Kenngrößen sowie die Einleitungs- und Narkoseaufrechterhaltungsdosis an.

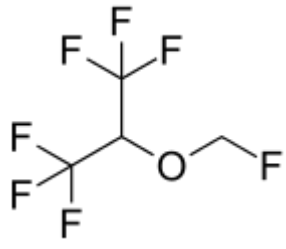
Sevofluran		
Handelsname	Sevorane®	
Firma	Abbvie GmbH & Co. KG (Ludwigshafen am Rhein, D)	
Siedepunkt	58,6°C	
MAC-Wert	In 100 % O ₂ : 1,8 Vol.- Prozent	
Blut-Gas- Verteilungskoeffizient	0,65 (schnell)	
Lebermetabolisierungsrate	3-5 %	
Einleitungsdosis	3-4 Vol.-Prozent	
Narkoseaufrechterhaltung	1-1,1 MAC endexpiratorisch, + Opioid ca. 0,7-0,8 MAC (= 0,8-0,9 Volumenprozent)	
Dosis im Versuch	1 und 2,5 Volumenprozent	
Lagerung bei	Raumtemperatur 25°C	

Abbildung 4: Strukturformel von Sevofluran
Quelle: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-\(fluoromethoxy\)propane_200.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(fluoromethoxy)propane_200.svg),
(zuletzt geprüft am 30.04.19)

Tabelle 7: Charakteristika und Strukturformel von Sevofluran

2.1.6.4 Desfluran

In Tabelle 8 werden die Eigenschaften von Desfluran mit wichtigen Werten und Einstellungen für die Narkose sowie die chemische Strukturformel gezeigt.

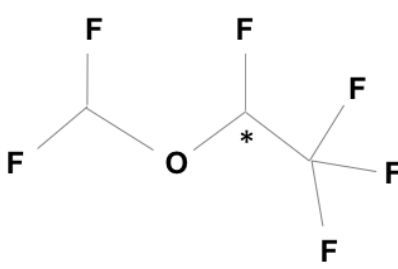
Desfluran		
Handelsname	Suprane®	 <p>Abbildung 5: Strukturformel von Desfluran</p> <p>Quelle: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:(RS)-Desfluran_Structural_Formula_V1.svg (zuletzt geprüft am 30.04.19).</p>
Firma	Baxter Deutschland GmbH (Unterschleißheim, D)	
Siedepunkt	22,8°C	
MAC-Wert	In 100 % O ₂ : 6,6 Vol.-Prozent	
Blut-Gas-Verteilungskoeffizient	0,45 (sehr schnell)	
Lebermetabolisierungsrate	0,02 %	
Einleitungsdosis	8-10 Vol.-Prozent	
Narkoseaufrechterhaltung	1-1,1 MAC endexpiratorisch, + Opioid ca. 0,7-0,8 MAC (= 4,6-5,3 Volumenprozent)	
Dosis im Versuch	6 und 12 Volumenprozent	
Lagerung bei	Raumtemperatur 25°C	

Tabelle 8: Charakteristika und Strukturformel von Desfluran.

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma/Hersteller
Caspase-3	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology®
Caspase-8	Maus, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology®
Caspase-9	Maus, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology®
Anti β -Actin	Maus, monoclonal	1:100	Sigma-Aldrich®
Anti β -Actin	Kaninchen, monoclonal	1:100	Sigma-Aldrich®

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma/Hersteller
Anti-mouse IgG HRP-linked	Pferd, polyclonal	1:5000	Cell Signaling Technology®
Anti-rabbit IgG HRP-linked	Pferd, polyclonal	1:5000	Cell Signaling Technology®

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

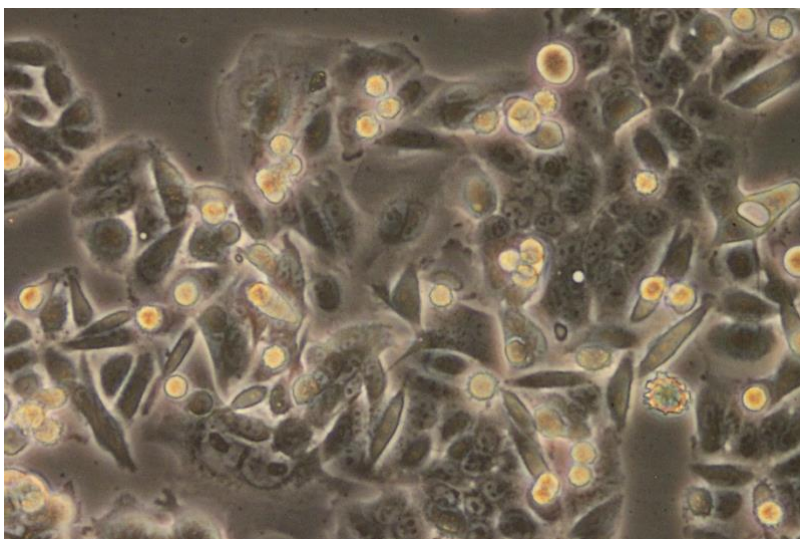
2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die verwendeten Zellen wurden in T₇₅ bzw. T₂₅ Zellkulturflaschen in befeuchteter Atmosphäre bei 5% CO₂ und 37°C im Brutschrank kultiviert. Sie formieren sich in einem adhärennten, einschichtigen Zellrasen. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Zellkulturbank (LaminarFlow) durchgeführt, um einer Kontamination durch Bakterien oder Pilze vorzubeugen. Arbeitsfläche und Werkzeuge wurden vor Gebrauch mit 70% Isopropanol gereinigt und nur sterile Pipetten, Medien und Verbrauchsmaterialien verwendet. Wenn nicht anders beschrieben wurden alle Lösungen im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

2.2.1.2 Zelllinie

Die humane Kolonkarzinomzelllinie SW480 wurde 1976 von Leibovitz et al. aus dem Dickdarm eines 50-jährigen kaukasischen Mannes mit primären kolorektalem Adenokarzinom isoliert. Das Tumorstadium entspricht der Duke Klasse B, welches ungefähr dem Stadium II der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) mit einer Ausbreitung von T3/T4, aber noch keinem Lymphknoten- oder Metastasenbefall gleichzusetzen ist. Die Zellen produzieren CEA (carcinoembryonic antigen) (37), GM-CSF (38) sowie Keratin und exprimieren EGF-Rezeptoren. (37).

Bei den SW480-Zellen sind folgende Onkogene aktiv: c-myc, myb, K/H/N-ras, fos, sis (39). Es wurde eine vermehrte Expression von p53 Proteinen festgestellt (40–42).



Die Zelllinie wurde von LGC Standards (Wesel, D) mit der ATCC® Nummer CCL-228™ erworben.

Abbildung 6 zeigt das lichtmikroskopische Bild von subkonfluenten SW 480 Zellen.

Abbildung 6: Subkonfluente, einen adhärennten Zellrasen bildende Zellen der Zelllinie SW480.

2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden tiefgefroren bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurden ursprünglich zu 80% konfluente Zellen dreimal mit Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS) aufgereinigt, abtrypsiniert und in vorgekühltem Basismedium (Kulturmedium versetzt mit 30% FKS) wiederaufgenommen. Der genaue Ablauf des Wasch- und Aberntevorganges ist in dem Abschnitt „2.2.1.4 Passagieren und Zählen der Zellen“ erläutert. Alle Arbeiten fanden auf Eis und mit gekühlten Medien statt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1300 rpm und 4°C wurde der Überstand abgesaugt. Es erfolgte die Resuspendierung des Zellpellet mit Einfriermedium 1, bestehend aus 90% Basismedium und 10% $20\mu\text{M}$ Hepes Puffer. Nach der Zellzählung (genauerer siehe Abschnitt „2.2.1.4 Passagieren und Zählen der Zellen“) wurden die Zellen auf ca. 1-2,5 Millionen Zellen pro 600 μl verdünnt und dann auf die gekühlten Kryoröhrchen verteilt. In jedes Kryoröhrchen wurde zum Schluss 600 μl Einfriermedium 2 (70% Basismedium, 10% Hepes Puffer, 20% DMSO) hinzugefügt. Die fertigen Kryoröhrchen wurden nun in die auf -20°C vorgekühlte Einfrierbox gesteckt und über Nacht bei -80°C , anschließend dauerhaft bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Röhrchen langsam erwärmt und vorsichtig in ein 50 ml Falcon Tube mit vorbereitetem 15 ml kaltem Kulturmedium (versetzt mit 10% FKS) gegeben. Um das DMSO des Gefriermediums vollständig aus den Zellen zu entfernen, wurde der Tube für fünf Minuten kühl bei 1300 rpm zentrifugiert und danach der Überstand vorsichtig dekantiert. Nach Resuspension mit 5 ml Kulturmedium wurde die Zellsuspension in eine T_{25} -Zellkulturflasche pipettiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach circa 2-3 Tagen wurden die Zellen in eine T_{75} Zellkulturflasche umgesetzt.

2.2.1.4 Passagieren und Zählen der Zellen

Um eine kontinuierliche Kultivierung zu gewährleisten, wurden konfluente bis dichte Zellrasen alle zwei bis drei Tage von der Zellkulturflasche gelöst und in geringerer Dichte wieder ausgesät. Dazu wurden nach dem Absaugen des Kulturmediums die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, um einer das Trypsin inhibierenden Wirkung des FKS-haltigen Kulturmediums entgegenzuwirken. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 4 ml Trypsin-EDTA behandelt. Die Zellkulturflaschen wurden bei 37°C für vier bis

sechs Minuten im Brutschrank inkubiert und regelmäßig unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Sobald sich alle Zellen abgerundet hatten, wurde die Flasche kräftig abgeklopft, um die verbliebenen Zellen zu lösen. Durch Zugabe von 6 ml FKS-haltigem Kulturmedium wurde die Reaktion gestoppt. Damit wurde irreversible Zellschädigungen durch eine zu lange Inkubationszeit mit Trypsin-EDTA vorgebeugt. Um noch haftende Zellen zu lösen, wurde der Flaschenboden gründlich drei- bis viermal mit der Zellsuspension abgespült und letztendlich in ein 50 ml Falcon Tube überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1300 rpm wurde der Überstand aus dem Tube abgesaugt und die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert.

Um die Zellzahl in einem Milliliter zu bestimmen, wurden 20 µl der Zellsuspension in ein Casy-Zellzähler-Röhrchen überführt und mit einem Hub (entspricht fünf Milliliter) Casy-ton-Flüssigkeit, einem speziell für das Gerät entwickelten Elektrolytgemisch, vermischt. Für die korrekte Vermengung wurden die Probe entweder mit einem Casy-Deckel geschwenkt oder auf der Tischplatte in Achtertouren bewegt. Die Messung erfolgte am Zellzähler Typ Casy TT (Roche Innovatis AG) nach folgendem Prinzip: Die Zellsuspension wird in einer konstanten Geschwindigkeit durch eine Messpore gepumpt. Diese Messpore steht unter einer Wechsel-Spannung mit einer Frequenz von 1 MHz. Passiert eine Zelle mit intakter Zellmembran die Pore sendet sie ein volumenabhängiges Signal zum Gerät (Electrical Current Exclusion, ECE®). Tote Zellen mit geschädigter Zellmembran hingegen können den Stromfluss nicht mehr unterbrechen. Sie werden mit dem Volumen ihres Zellkerns erfasst. Die digitale Signalauswertung trennt tote von vitalen Zellen und stellt diese in einem Graphen größenabhängig dar (43). Abbildung 7 und Abbildung 8 zeigen die graphische Verteilung der Zellen nach Abschluss der Messung.

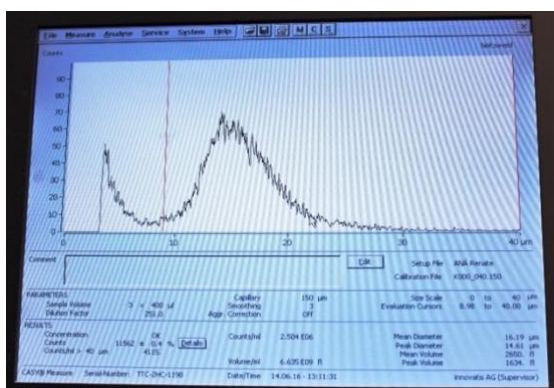


Abbildung 7: Anzeige des Zellzählers Casy TT nach Abschluss der Messung. Man sieht die vitalen Zellen als gaußsche Verteilungskurve rechts der roten Linie des Graphen.

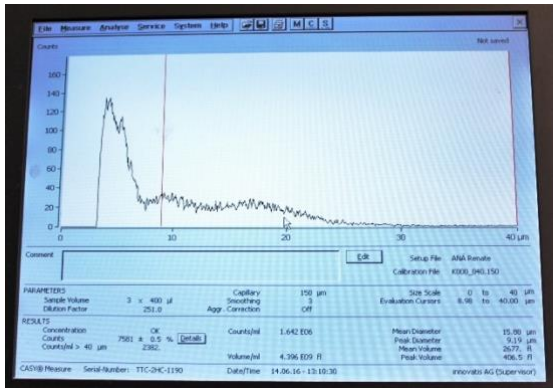


Abbildung 8: Anzeige des Zellzählers Casy TT nach Abschluss der Messung. Man sieht die zum großen Teil in Apoptose befindlichen bzw. toten Zellen links der roten Linie des Graphen

Je nach gemessener Zellzahl wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:10 auf mit 10 ml Kulturmedium vorbereitete Zellkulturflaschen verteilt. Hatten die Zellen nach zwei bis drei Tagen noch keine Konfluenz erreicht, so wurde lediglich das Kulturmedium gewechselt. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und durch 10-15ml frisches Kulturmedium ersetzt.

2.2.1.5 Aussäen der Zellen für den Inkubationsversuch

Die Zellen wurden für eine Versuchsreihe zwei bis drei Tage vorher ausgesät.

Nach dem Wasch- und Aberntevorgang wurden die Zellen am Zellzähler gemessen und entsprechend der gewünschten Zellzahl in 48 T₂₅-Zellkulturflaschen mit vorbereitetem 5 ml Kulturmedium ausgesät (siehe Abschnitt „2.2.1.4 Passagieren und Zählen der Zellen“).

Da der letzte Messzeitpunkt 72 Stunden nach der Begasung stattfand, musste ein Kompromiss in der Zelldichte gefunden werden. Für die Begasungsversuche mit Sevofluran wurden alle T₂₅-Zellkulturflaschen mit 250.000 Zellen ausgesät. Aufgrund der problematischen Zellausbeute am ersten Versuchstag wurde für die Begasungsversuche mit Desfluran für die ersten drei Messzeitpunkte 0, 3 und 6 Stunden eine höhere Zellzahl mit 400.000 Zellen festgesetzt. Die restlichen Flaschen wurden wie gewohnt mit 250.000 Zellen versehen. Die verwendete Zellzahl hatte dabei keinen Einfluss auf den Effekt ($p > 0,1$).

2.2.2 Versuchsaufbau

Die T₂₅-Proben-Zellkulturflaschen wurden in einer mit Sevofluran- bzw. Desfluran-Luft-Gemisch gefüllten 48 Liter großen Kammer über drei bzw. sechs Stunden inkubiert. Die Inkubationskammer wurde mit einem Thermostat konstant bei 37°C gehalten. Bei einem Gasfluss von 2,5 l/Min wurde kontinuierlich ein Gemisch aus 95% Luft/ 5% CO₂ sowie Sevofluran (1,0 bzw. 2,5 Vol%) oder Desfluran (6,0 bzw. 12,0 Vol%) zugeführt. Die jeweilige Verteilung der Gaskonzentration im Kulturmedium wie auch der pH-Wert wurden mittels Gaschromatographie während der Methodenetablierung überprüft. Die Gaskonzentrationen wurden mit dem Capnomac Ultima Kapnografen (Datex Ohmeda GmbH) gemessen. Das Gas-Luft-Gemisch wurde, bevor es in die Kammer gelangte, mit 37°C warmen PBS angefeuchtet. Um mögliche Medikament-Protein-Bindungen zu vermeiden, wurde vor der Begasung auf ein FKS-freies Zellkulturmedium gewechselt. Dieses Medium wurde zuvor mit dem Versuchsgas in der vorgesehenen Konzentration angereichert. Die Negativ- als auch die Positivkontrollen verblieben während der Begasung im Brutschrank in befeuchteter Atmosphäre bei 5% CO₂ und 37°C. Nach einer Inkubationszeit von 3 bzw. 6 Stunden wurden den Proben wie auch den Negativkontrollen (Zellen versetzt mit Medium) das gewohnte FKS-haltige Zellkulturmedium zugeführt und im Brutschrank gelagert. Die Positivkontrollen wurden mit 5 ml Staurosporin bzw. ASS versetzt und in den Brutschrank gestellt. In Abbildung 9 und Abbildung 10 ist der Versuchsaufbau dargestellt.



Abbildung 9: Anordnung der Zellkulturflaschen in der Inkubationskammer.

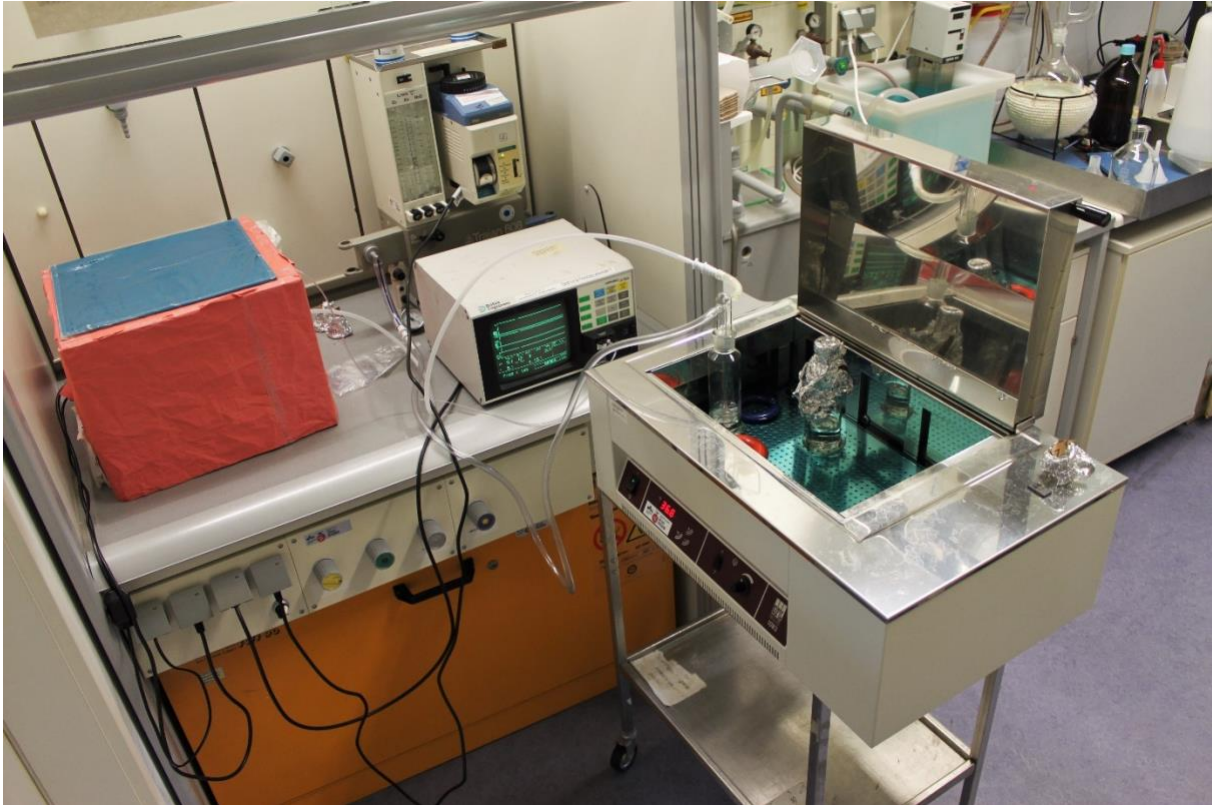


Abbildung 10: Versuchsaufbau. Von links nach rechts: Inkubationskammer, Vapor, Kapnograf, Wasserbad.

2.2.2.1 Messung der Apoptoserate

Die Apoptoserate wurde nach 0, 3, 6, 24 und 48 Stunden Erholung nach der Exposition gemessen. Jede Versuchsreihe wurde mindestens dreimal, und unabhängig voneinander, wiederholt. Die Versuchsreihe setzte sich jeweils aus zwei Positivkontrollen (Zellen versetzt mit Staurosporin), zwei Negativkontrollen (Zellen versetzt mit reinem Kulturmedium) und zwei begasten Proben zusammen. Falls nicht anders beschrieben, fanden alle Arbeiten auf Eis statt.

Nachdem das Medium aus den T₂₅-Zellkulturflaschen in 50 ml Falcon Tubes dekantiert und die Flaschen mit 2 ml PBS gespült wurden, erfolgte das Abernten der Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA. Die Zellen wurden in das jeweilige Probenröhrchen zu dem Medium- und PBS-Überstand gegeben. Nach Zentrifugation der Proben bei 4° C für fünf Minuten mit 1300 rpm und zweimaligem Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen mit 1 ml kaltem Annexin V Bindepuffer resuspendiert.

Für die Messung der Apoptoserate am FACS Calibur Durchflusszytometer ist eine Zellzahl von einer Million Zellen pro Milliliter Bindepuffer in einem FACS-Röhrchen notwendig. Hierfür wurden die Zellen mittels Zellzähler nach dem bereits in „2.2.1.4 Passagieren und Zählen der Zellen“ erläuterten Prinzip eingestellt. In jedes FACS-

Röhrchen wurden 100 µl Zellsuspension (entsprechend 100.000 Zellen) gegeben. Zudem erfolgte eine Färbung der Zellen mit Propidiumjodid und Annexin V. Hierbei wurden die 100 µl Zellsuspension mit 5 µl Annexin V und 5 µl Propidiumjodid gefärbt. Nachdem der Inhalt jedes Röhrchens vorsichtig mit dem Vortexer vermischt wurde, erfolgte eine fünfzehnminütige Inkubation der Proben bei Raumtemperatur (25°C) im Dunklen. Abschließend wurde jedem Röhrchen 100-200 µl Bindepuffer hinzugefügt und die Proben innerhalb von einer Stunde am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.2.2 Fixierung der Zellen mit Methanol für die Zellzyklusanalyse

Jeweils sechs T₂₅-Zellkulturflaschen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden Erholung nach der Exposition abgearbeitet. Jede Versuchsreihe wurde mindestens dreimal, und unabhängig voneinander wiederholt. Die sechs Flaschen setzten sich aus zwei Positivkontrollen (Zellen versetzt mit ASS), zwei Negativkontrollen (Zellen versetzt mit reinem Kulturmedium) und zwei begasten Proben zusammen.

Die Zellen wurden wie vorbeschrieben mit Trypsin-EDTA abgeerntet, wobei die Überstände wieder in sechs entsprechend beschriftete Falcon Tubes dekantiert wurden. Für die genaue Vorgehensweise siehe „2.2.2.1 Messung der Apoptoserate“. Nach Zentrifugation und dem Absaugen des Überstands konnten die Zellen mit 2 ml PBS/ 1% FKS resuspendiert werden. Die einzelnen Falcon Tubes wurden vorsichtig mit dem Vortexer geschüttelt und erneut bei 1300 rpm und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands erfolgte die Resuspendierung des Zellellet mit 1 ml PBS/ 1% FKS. Es wurden 250.000 Zellen pro FACS-Röhrchen mittels Zellzähler eingestellt. Aus jedem Falcon Tube wurde ein Doppelansatz hergestellt, insgesamt also 12 Röhrchen. Weiterhin fügte man 500 µl Waschpuffer hinzu und stellte die Röhrchen für fünf Minuten bei 1300 rpm und 4°C in die Zentrifuge. Nach diesem letzten Waschvorgang wurde der Überstand aus den Röhrchen vorsichtig abgekippt und auf einem Tuch abgetropft. Um nun die Zellen zu fixieren wurde unter ständigem Einsatz des Vortexers tropfenweise 500µl 70% Methanol hinzugefügt. Durch Zufügen dieses kurzkettigen Alkohols wurden die Zellen für die Propidiumjodid-Messung permeabilisiert, denn der Farbstoff kann die intakte Zellmembran nicht passieren (44). Abschließend wurden die FACS-Röhrchen mit den dafür vorgesehenen FACS-Deckelchen verschlossen und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.2.2.3 Färbung der fixierten Zellen für die Zellzyklusanalyse

Nach der letzten Fixierung konnten am folgenden Tag alle Proben gemeinsam abgearbeitet werden. Dazu wurden die 36 FACS-Röhrchen mit 1-2 ml PBS/1% FKS zweimal gewaschen. Der Überstand wurde dabei sehr vorsichtig abgekippt und abgetropft, da das Zellpellet mit den fixierten, permeabilisierten Zellen recht instabil ist. In jedes Röhrchen wurden 220 µl PBS/ 1% FKS sowie 25 µl RNase zur RNA Andauung gegeben. Der Farbstoff Propidiumjodid interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäure. Deswegen sollte vorhandene RNA entfernt werden, sodass die DNA Messung nicht verfälscht wird (44). Es erfolgte eine Inkubation von 20 Minuten im Wasserbad bei 37°C im Dunklen. Im Anschluss daran wurden 12 µl vom DNA-Farbstoff Propidiumjodid zugegeben. Nach gründlichem Durchmischen der Zellsuspension erfolgte innerhalb von 30 Minuten die Messung am FACS Calibur Durchflusszytometer im Linear Modus zur DNA-Gehalt Analyse. Die Proliferationsmessung erfolgte einparametrisch.

2.2.3 Durchflusszytometrische Analyse

2.2.3.1 Aufbau und Funktionsweise eines Durchflusszytometers

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Testverfahren, welches die lichtstreuenden und fluoreszierenden Eigenschaften von farbmarkierten Zellen nutzt. Es ermöglicht die Analyse einzelner Zellen anhand von Dichte, Größe, DNA-Gehalt oder diversen Antikörper-gekoppelten Farbstoffen (45, 44).

Es besteht aus einer optischen Einheit, einem flüssigkeitsbasierten Transportsystem und einer Signaldetektionseinheit. Zu der optischen Einheit gehört eine Lichtquelle in Form eines Lasers. Beim FACS Calibur handelte es sich um einen Argon Laser mit einem Wellenlängenbereich von 488nm (blau-grün). Weiterhin gehört zu der optischen Einheit noch ein Linsensystem zur Fokussierung des Laserstrahls auf die Flusszelle. Die Zellen werden über eine Stahlnadel eingesaugt und von der Trägersubstanz aufgenommen. Nun werden die Zellen innerhalb eines Flüssigkeitsstrahls gesammelt (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung).

Aufgereiht wie an einer Perlenkette gelangen die Zellen so in die Flusszelle und treffen nacheinander auf den Laserstrahl. Es erfolgt die Streuung des Laserlichts entsprechend der Eigenschaften der Zellen (45).

Mittels Ausmaß und Signalintensität der Laserstrahlstreuung kann eine Aussage über die Zellgröße durch die Reichweite der Streuung nach vorne (front scatter, FSC), und über die Zellgranularität mittels Grad der Streuung zur Seite (side scatter, SSC) getroffen werden (45).

Zudem besteht die Möglichkeit der Zellmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen und farbstoffmarkierten Antikörpern. Hier heißen die einzelnen Detektoren FL (= fluorescent light) -1, FL-2 und FL-3, entsprechend ihres Abstandes zum anregenden Wellenlängenbereich. Dabei findet die Emission der Fluoreszenzsignale folgendermaßen statt: Die Elektronen der Farbstoffe werden durch das Laserlicht angeregt und auf ein höheres Energieniveau angehoben. Beim Zurückfallen auf eine atomkernnähere Schale wird die Energie in Form von Licht wieder abgegeben. Dieses Fluoreszenzsignal trifft im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl auf den Signalwandler (46).

Um die weitere spezifische Analyse zu ermöglichen, wird ein System von Spiegeln und Filtern sowie signalverstärkende Fotomultiplier, die die optischen Signale in elektrische Impulse umwandeln, genutzt. Nach Digitalisierung der elektrischen Impulse durch die jeweiligen Detektoren können die erfassten Zellen in Histogrammen und dot plots dargestellt werden. In den dot plots ergeben homogene Zellpopulationen Punktwolken. Heterogene Proben führen zu vielen, zum Teil sich überlappenden Punktwolken (45).

Abbildung 11A zeigt ein typisches DNA-Zellzyklus-Histogramm, Abbildung 11B hingegen ein dot plot Diagramm.

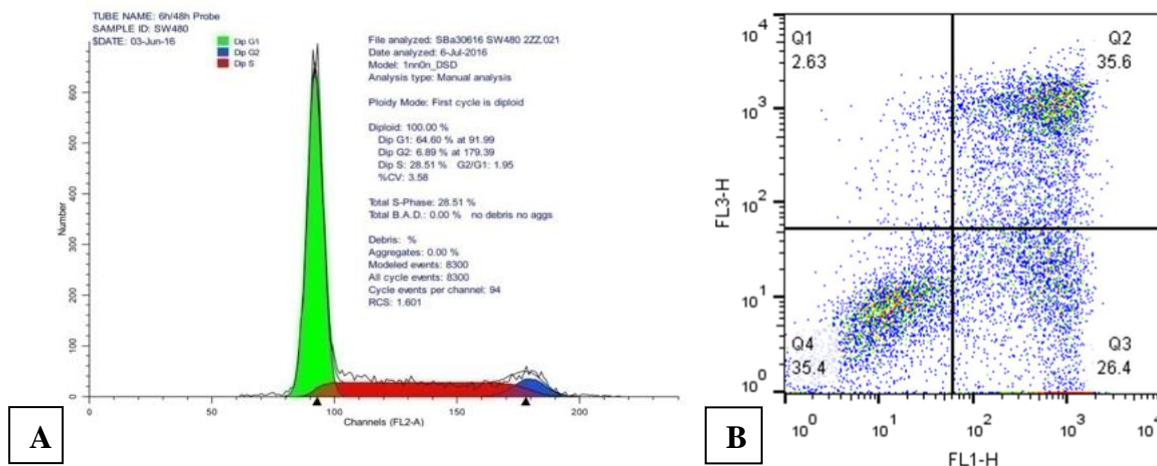


Abbildung 11: A. Zellzyklus-Histogramm von SW480 Zellen nach 24 h Bebrütung mit Zellmedium. B. Dot plot Diagramm mit drei unterschiedlichen Punktwolken. Gibt die Verteilung der Zellpopulation nach 48 h Behandlung mit Staurosporin wieder.

2.2.3.2 Fluoreszenzmessung mit Propidiumjodid

In dieser Arbeit sollte die prozentuale Zellzyklusverteilung anhand des absoluten DNA-Gehalts der Zellen bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen mit Propidiumjodid behandelt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff geht eine basenpaarunspezifische Bindung in doppelsträngige Nukleinsäure ein, durch Anlagerung zwischen die Basen der DNA-Doppelhelix. Die so gemessene Intensität des Fluoreszenzsignals ist direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zellen (44). Die Anregung des Farbstoffes erfolgte bei 488 nm durch den im Durchflusszytometer befindlichen Argon Laser. Propidiumjodid hat ein Anregungsmaximum bei 305,54 nm, es emittiert bei 620 nm und die Messung erfolgte im Kanal FL-3 des FACS Calibur Durchflusszytometers. Alle Analysen am FACS Calibur erfolgten mit dem Programm CellQuestPro (Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA). Die endgültigen Auswertungen der Zellzyklusanalyse wurden mit Hilfe des Programms ModFit LT 3.0 (Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA) erstellt. Dabei wurde die detektierte prozentuale Verteilung der Zellen auf die G₁-, S- und M/G₂-Phasen des Zellzyklus in einem Histogramm zusammengefasst.

2.2.3.3 Fluoreszenzmessung mit FITC Annexin V und Propidiumjodid

Für die Messung der Apoptoserate der Zellen wurde das Testkit FITC Annexin V von BD Pharmingen™ verwendet. Annexin V ist ein 35 kDa großes, Ca₂₊-abhängiges Protein, welches spezifisch an das Phospholipid Phosphatidylserin bindet (47, 48). Phosphatidylserin (PS) befindet sich in vitalen Zellen auf der inneren Seite der

Plasmamembran. In apoptotischen Zellen wandert PS von der inneren Seite der Membran auf die äußere Seite, sodass es in die extrazelluläre Matrix zeigt (49). So können Makrophagen apoptotische Zellen von vitalen Zellen unterscheiden und entfernen (50). Der Verlust der Plasmamembranintegrität ist eines der frühesten Anzeichen für Apoptose. Im fortgeschrittenen Stadium der Apoptose ist sowohl die Membranintegrität gestört als auch der Kern fragmentiert. Spätapoptotische Zellen sind zusätzlich mit Propidiumjodid, welches über die beschädigte Plasmamembran an freie DNA bindet, markiert. Nekrotische oder tote Zellen sind genauso mit beiden Stoffen beladen. Das FITC Annexin V Apoptose Detektionskit kann also sehr sensitiv frühapoptotische Zellen markieren. Ob letztendlich Apoptose oder Nekrose für den Zelluntergang verantwortlich ist lässt sich nur im zeitlichen Verlauf der Messungen feststellen. So weist ein Wandern der Punktwolken innerhalb der Quadranten von vital über früh- und spätapoptotische Zellen auf Apoptose hin (47–49). Abbildung 12 stellt das Testprinzip schematisch (a) und in Form von typischen Dot Plots (b) dar.

Das Protein Annexin V ist, um eine durchflusszytometrische Analyse zu gewährleisten, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert (50).

Die Anregung des Farbstoffes erfolgte bei 488 nm durch den im Durchflusszytometer befindlichen Argon Laser. Fluoresceinisothiocyanat hat ein Anregungsmaximum bei 490 nm, es emittiert bei 525 nm und die Messung erfolgte im Kanal FL-1 des FACS Calibur Durchflusszytometers.

In der durchflusszytometrischen Analyse wurden die mit FITC Annexin V oder Propidiumjodid markierten Zellen in dot plots Diagrammen zusammengefasst. Auch hier erfolgten alle Analysen am FACS Calibur mit dem Programm CellQuestPro (Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA). Die jeweiligen Diagramme wurden mit Hilfe des Programms FlowJo (Version 10.0.7; Ashland, Oregon) erstellt und die Prozentwerte der Quadranten in Excel-Tabellen exportiert. Abbildung 13 zeigt die Einteilung der Zellen in Quadranten und das für Apoptose charakteristische „Wandern der Punktwolken“ vom vitalen Quadranten über den früh- und spätapoptotischen.

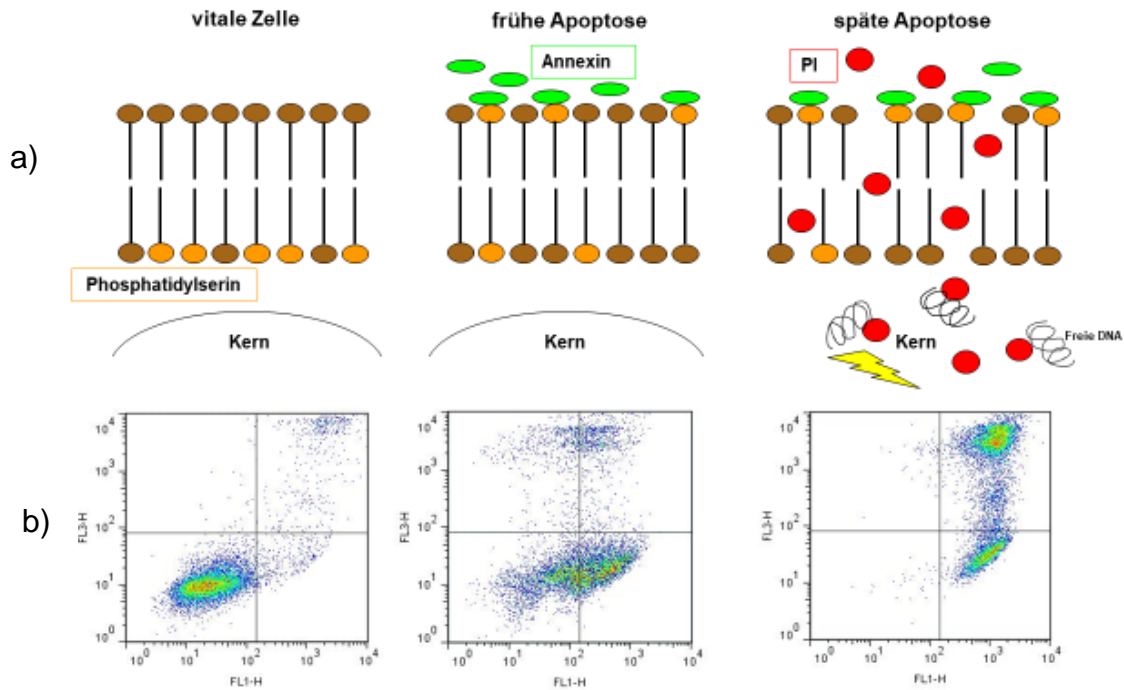


Abbildung 12: Testprinzip des Annexin V Test.

a) Darstellung des Testprinzips

b) typische Dot Plots nach Doppelfärbung mit Annexin V und PI

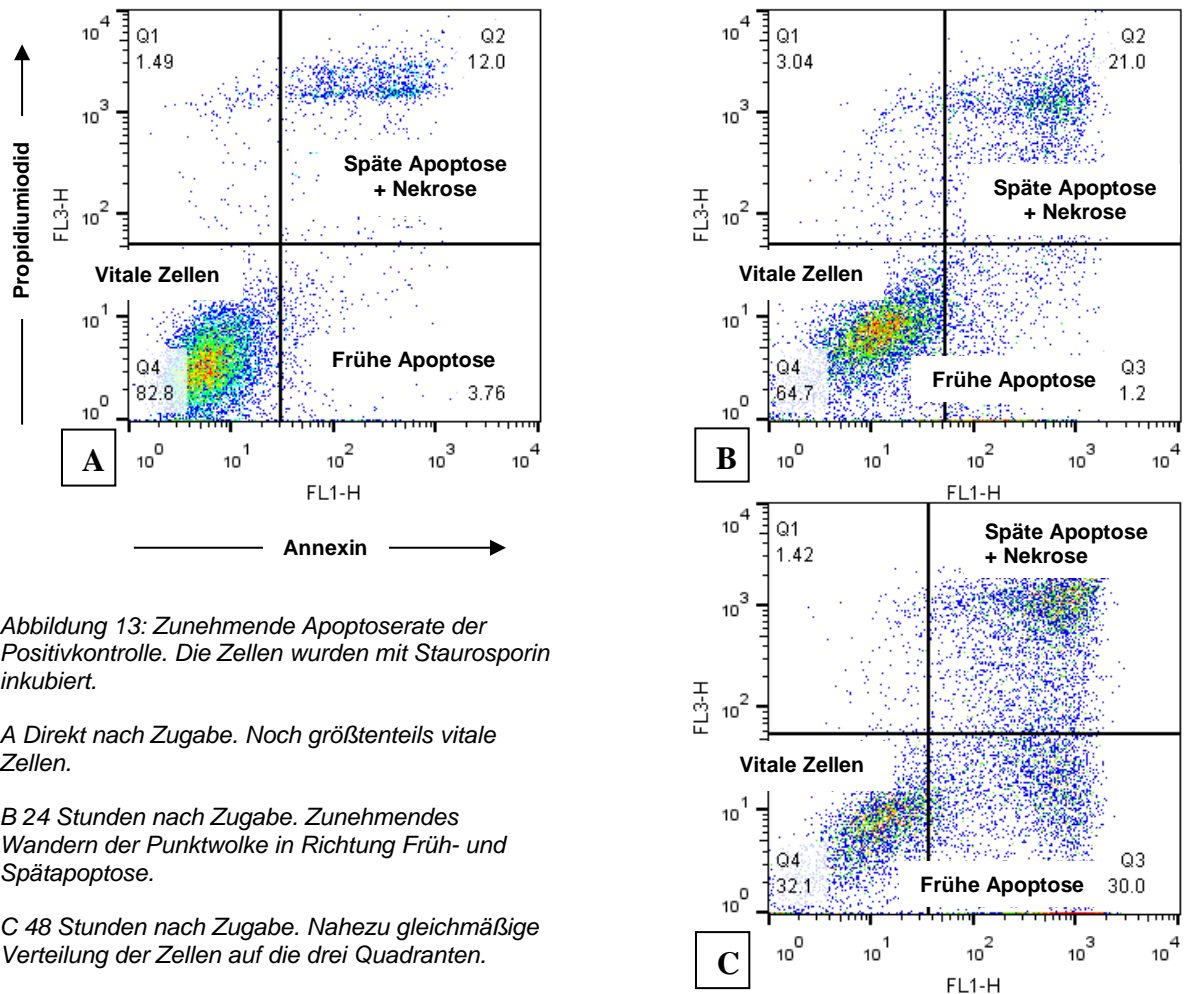


Abbildung 13: Zunehmende Apoptoserate der Positivkontrolle. Die Zellen wurden mit Staurosporin inkubiert.

A Direkt nach Zugabe. Noch größtenteils vitale Zellen.

B 24 Stunden nach Zugabe. Zunehmendes Wandern der Punktwolke in Richtung Früh- und Spätapoptose.

C 48 Stunden nach Zugabe. Nahezu gleichmäßige Verteilung der Zellen auf die drei Quadranten.

2.2.4 Western Blot Analyse

2.2.4.1 Zellaussaat

Für den Western Blot wurden sechs T₇₅ Zellkulturflaschen mit circa einer Million Zellen zwei bis drei Tage vor Versuchsbeginn ausgesät und solange bebrütet, bis ein subkonfluenter Zellrasen ersichtlich war.

2.2.4.2 Zellstimulation

Die Zellen wurden, wie in Abschnitt „2.2.2 “ beschrieben, in einer Inkubationskammer für 6 Stunden mit 2,5 Volumenprozent Sevofluran begast.

2.2.4.3 Proteinisolation

Die folgenden Arbeiten fanden unter stetiger Kühlung statt. Das jeweilige Zellmedium der T₇₅ Zellkulturflaschen mit den darin befindlichen apoptotischen Zellen wurde zunächst in 15 ml Falcons übertragen. Nachdem der Zellrasen mittels Zellschaber vom Boden der Flasche gelöst wurde, konnten die Zellen mit circa 4 ml DPBS aufgenommen und in die Falcons überführt werden. Es erfolgte eine Zentrifugation (2500 rpm, 10 Min bei 4°C) der Suspensionen mit anschließender Resuspension der Pellets in circa 100 µl RIPEA Puffer inklusive Proteaseinhibitor. Die so gewonnene Suspension wurde, nach Überführung in Eppendorf-Cups, mehrmals mit flüssigem Stickstoff behandelt. Es schloss sich eine 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C an. Der Überstand, in welchem sich die gelösten Proteine befanden, wurde in neue Eppendorf-Cups überführt und bei -80° C bis zur weiteren Verwertung gelagert.

RIPEA Puffer: in 500 ml DPBS

- 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1% Triton X-100
- 0,1% SDS
- 1% Sodium deoxycholate

2.2.4.4 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde photometrisch mit dem Pierce® BCA-Proteinbestimmungs-Kit (ThermoFisher Scientific) ermittelt, um für die semiquantitative Western Blot Analyse gleiche Mengen an Protein pro Slot gewährleisten zu können.

2.2.4.5 Ablauf der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinauftrennung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen als diskontinuierliche SDS-PAGE gemäß der Methode von Laemmli (51). Dabei dient ein Gel auf 10%-Polyacrylamidbasis mit definierter Porengröße als Trennmedium. Durch den Einsatz von SDS (Sodiumdodecylsulfat) als anionisches Detergenz, welches die Eigenladung der Proteine überdeckt, wird eine konstante Ladungsverteilung erhalten. Zudem denaturiert SDS die Proteine und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen (52).

Zum Gießen der vier Gele wurden folgende Lösungen verwendet:

Sammelgelpuffer:

- 12,1 g /200 ml 0,5 M Tris Base (pH 6,8)
- 4 ml 0,4%ige SDS-Lösung

Sammelgel:

- 0,945 ml Sammelgelpuffer
- 5,1 ml destilliertes Wasser
- 1,25 ml 30%ige/ 0,8%ige Acrylamidlösung
- 75 µl 10%ige Ammoniumpersulfatlösung (APS)
- 7,5 µl TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin)

Trenngelpuffer:

- 36,3 g /200 ml 1,5 M Tris-Base (pH 8,8)
- 4 ml 0,4%ige SDS-Lösung

Trenngellösung:

- 3,75 ml Trenngelpuffer
- 5,1 ml destilliertes Wasser
- 4,95 ml 30%ige/ 0,8%ige Acrylamidlösung
- 0,9 ml Glycerol
- 0,15 ml SDS

Stoppgel:

- 800 µl Trenngellösung
- 4 µl 10%ige APS-Lösung
- 4 µl TEMED

Zur Trenngellösung wurden 150 µl APS und 6 µl TEMED gegeben. Als nächstes wurden 202 µl Stoppgel, 4 ml Trenngel und 4 ml Sammelgel zwischen die mit Ethanol gereinigten Platten gefüllt. Als letztes wurde der Kamm, der die Slots für die Proben formt, in das Sammelgel eingesteckt und das Gel zur Polymerisation mindestens 20 Minuten ruhen gelassen. Bestenfalls wurden die Gele in nasse Tücher gewickelt bei 4°C über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Die zu analysierenden Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit Laemmlipuffer (setzt sich zusammen aus 1:10 Mercaptoethanol und 4-fach Laemmli) versetzt. Danach wurden sie für 5 Minuten bei 95°C auf einem Heizblock gekocht und mit einer Hamilton-Mikroliter-Spritze gleichmäßig mit einer Proteinmenge von 35 µg in die Geltaschen gefüllt. Als Proteingrößenreferenzmarker (PageRuler) wurde die standardisierte Leiter ChameleonDuo von LICOR unverdünnt verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 Volt und einer Stromstärke von 34 mA gestartet und nach Durchlaufen des Sammelgels auf 160 V und 44 mA erhöht. Kleine Proteine durchlaufen dabei relativ ungehindert das Gel zur Anode, während große Proteine von den Gelmaschen zurückgehalten werden und sich dadurch langsamer bewegen. Nach Ende des Durchlaufs (circa 1 h) konnten die Proteingele geblottet werden.

Elektrophoresepuffer:

- 100 ml BIORAD Tris/SDS/Glycin 10 x Puffer

- 900 ml deionisiertes Wasser

2.2.4.6 Western-Blotting und Immundetektion

Verwendete Puffer:

Transferpuffer für die Blotkammer:

- 100 ml BIORAD Tris/Glycin 10x Puffer
- 200 ml Methanol
- 700 ml deionisiertes Wasser

Waschpuffer:

- 100 ml 10x TBS
- 900 ml deionisiertes Wasser
- 500 µl Tween_20

Blocking-Puffer:

- 2,5 g Magermilchpulver
- 50 ml Waschpuffer

Nach Ablösen des Sammelgels vom Trenngel begann die Vorbereitung des Western Blots. Der experimentelle Aufbau erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale im Blotting Rahmen gemäß folgender Reihenfolge:

Anode, Schwamm, Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, Filterpapier, Schwamm, Kathode

Die PVDF-Membranen mussten vor dem Transfer in Methanol aktiviert werden. Anschließend wurde der Proteintransfer für 1 Stunde und 30 Minuten bei 400 mA durchgeführt. Beim Western Blot erfolgt der Transfer der Proteine des SDS-Gels auf die PVDF-Membran elektrophoretisch. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen werden die Proteine auf der Membran gebunden. Der eigentliche Proteinnachweis gelingt mittels einer Immunreaktion. Der antigenspezifische primäre Antikörper bindet an die Epitope des gesuchten Proteins. An den primären Antikörper bindet wiederum

ein sekundärer Antikörper, der durch die chemische Reaktion von Luminol in seine oxidierte Form eine Lumineszenz detektiert (52).

Um die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran zu kontrollieren wurde die Coomassie-Brilliantblue-Färbung, sowie als direkter Nachweis die Färbung mit Ponceau S angewandt. Die Proteingele wurden circa 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Coomassie-Brilliantblue-Färbelösung gefärbt. Die anschließende Inkubation in Entfärber-Lösung machte die übrig gebliebenen Banden im Gel sichtbar.

Abbildung 14 zeigt beispielhaft ein Proteingel, bei dem nahezu alle Proteine auf die PVDF-Membran übertragen worden sind.

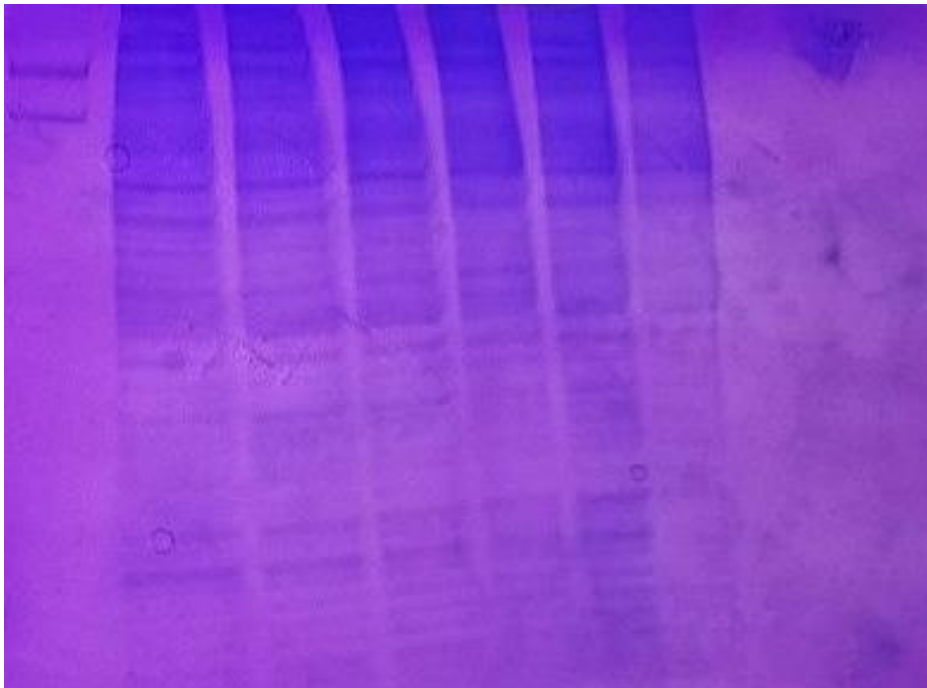


Abbildung 14: Nachweisfärbung der PVDF-Membran mit Coomassie-Brilliantblue. Links oben im Gel sind noch Restbestandteile der Proteinreferenzleiter zu sehen, was die dunklere Färbung in dieser Ebene erklärt. Proteine in dieser Größenordnung sind noch nicht übertragen worden. Im Gegensatz dazu sind auf der unteren Gelseite nur noch leichte Proteinrückstände zu erkennen.

Für die sofortige Überprüfung der Proteinübertragung wurde die PVDF-Membran ca. 1 Minute mit dem Farbstoff Ponceau S behandelt. Ponceau S ist ein Azofarbstoff und geht eine reversible Bindung mit den positiv geladenen Aminogruppen der Proteine ein. Abbildung 15 zeigt die angefärbten Proteinbanden, wie sie bei einem erfolgreichen Transfer entstehen.

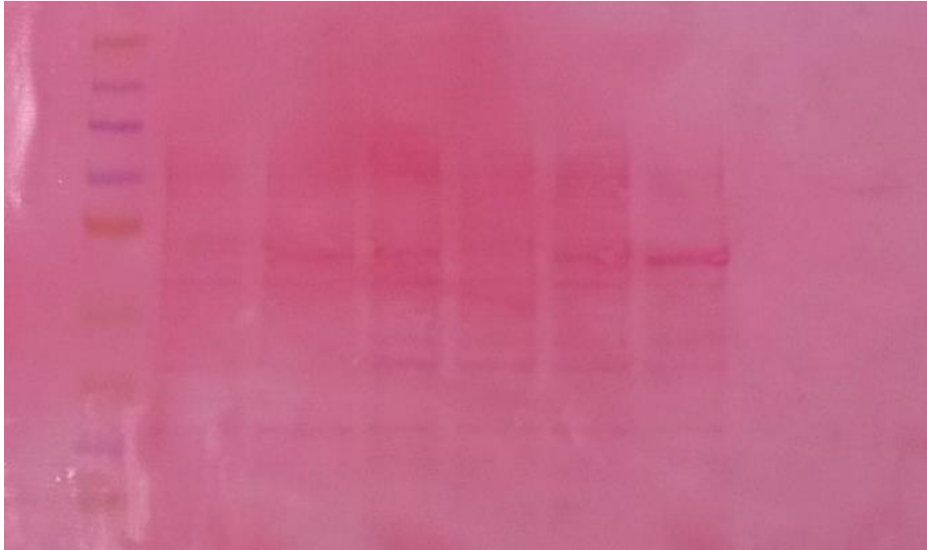


Abbildung 15: Nachweisfärbung der PVDF-Membran mit Ponceau-S. Links im Bild ist die farbige Proteinreferenzleiter von Chameleon Duo zu sehen. Die verschiedenen sichtbaren Banden belegen den erfolgreichen Proteintransfer vom Gel auf die Membran.

Durch mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer erfolgt die Entfärbung der Membran und Vorbereitung auf das Blocken, wodurch freie Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran besetzt werden sollen. Dazu wurde die Membran nach Zugabe von 10 ml Blocking-Puffer für eine Stunde auf einem Kippschüttler inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (10 μ l in 10 ml Blocking Puffer) erfolgte für 15-17 Stunden bei 4°C auf einem Kippschüttler. Die ungebundenen Antikörper wurden anschließend durch mehrmaliges Waschen mit frischem Waschpuffer entfernt. Der mit Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper (2 μ l in 10 ml Blocking Puffer) wurde für ungefähr eine Stunde mit der Membran lichtgeschützt inkubiert. Erneut erfolgte ein ausführlicher Waschvorgang, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Für die Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde die Membran mit dem ECL Western Blotting Detection Kit von Amersham (GE Healthcare GmbH, Freiburg) behandelt. Bei diesem Schritt wurde sie mit ca. 1 ml ECL-Lösung für 5 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Das im ECL-Reagenz enthaltene Luminol wird durch die an den Sekundärantikörpern gebundene Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) zu 3-Aminophthalat oxidiert. Mittels Röntgenfilm konnte in der Dunkelkammer die dabei freigewordene Lichtemission detektiert werden.

Im Anschluss daran erfolgte die Gegenfärbung mit β -Aktin als Ladekontrolle, um die gleichmäßige Proteinverteilung nachzuweisen. β -Aktin als Primärkörper wurde nach

mehrmaligem Waschen für ungefähr 20 Minuten inkubiert und anschließend für den Sekundärantikörper das gleiche Vorgehen wie oben beschrieben durchgeführt.

2.3 Statistik

Alle Auswertungen wurden mit Hilfe von Excel 2016 (Microsoft, Redmond, USA) erstellt. Aus den Ergebnissen mehrerer unabhängiger Versuche wurden Mittelwert und zugehörige Standardabweichung berechnet und die Daten in Diagrammen und Tabellen präsentiert.

Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS (Version 22.0; IBM New York, US). Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Die Werte der Kontrollen und der behandelten Zellen wurden dabei verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Zellzyklusanalyse

Die SW480 Zellen wurden für 0, 3 oder 6 Stunden mit Sevofluran bzw. Desfluran begast, die Analyse des Zellzyklus erfolgte nach 0-48 Stunden postexpositionell.

Der Einfluss von sowohl Sevofluran als auch Desfluran zeigte sich in Bezug auf den Zellzyklus von SW480 Zellen insgesamt als eher gering. Es zeigten sich nur wenige signifikante Veränderungen. Diese werden im Folgenden zusammengefasst.

Es zeigten sich signifikante Veränderungen der G2-Phase nach 48 und 72 Stunden Erholungszeit, nachdem die Zellen 6 Stunden mit Sevofluran 2,5 % als auch Desfluran 12 % inkubiert wurden. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher.

Zudem zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle ein signifikant niedriger Anteil der Zellen in der G1-Phase nach drei und sechs stündiger Inkubation mit 12 % Desfluran und 48 Stunden Erholungszeit.

Außerdem waren die Zellen nach 3 bzw. 6 Stunden Inkubation mit 6 % bzw. 12 % Desfluran und 48 Stunden Erholungszeit in der S-Phase signifikant erhöht.

Nach dreistündiger Inkubation mit 1% Sevofluran und 24 Stunden Erholungszeit befanden sich signifikant weniger Zellen in der G2 Phase als im Vergleich zur Kontrolle. Dies lässt sich durch einen höheren Anteil der in der G1 Phase befindlichen Zellen der Probe mit $55,8 \pm 2,3$ % im Vergleich zur Kontrolle mit $54,9 \pm 2,1$ % erklären. Dieser Anstieg war nicht signifikant.

Tabelle 9 - Tabelle 16 fassen die prozentuale Verteilung der SW480-Zellen auf die G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus nach 24, 48 und 72 Stunden Erholungszeit zusammen.

	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
Kontrolle nach 24 h Erholung	54,9 ± 2,1	34,5 ± 2,4	10,6 ± 1,3
Probe nach 24 h Erholung	55,8 ± 2,3	34,8 ± 2,2	9,4 ± 0,8 *
Kontrolle nach 48 h Erholung	63,3 ± 1,2	27,7 ± 1,5	9,0 ± 1,4
Probe nach 48 h Erholung	63,0 ± 1,6	29,0 ± 1,8	8,0 ± 1,7
Kontrolle nach 72 h Erholung	67,5 ± 2,8	25,8 ± 2,9	6,7 ± 0,8
Probe nach 72 h Erholung	65,1 ± 2,1	27,4 ± 2,4	7,5 ± 1,0

Tabelle 9: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus G1-, S- und G2 nach drei stündiger Inkubation mit 1 prozentigem Sevofluran nach unterschiedlichen Erholungszeiten mit Angabe der Standardabweichungen. (*) $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
Kontrolle nach 24 h Erholung	54,0 ± 2,1	34,6 ± 2,9	11,4 ± 2,7
Probe nach 24 h Erholung	54,3 ± 2,5	36,0 ± 1,9	9,7 ± 1,9
Kontrolle nach 48 h Erholung	61,8 ± 0,7	30,6 ± 2,3	7,7 ± 2,3
Probe nach 48 h Erholung	63,3 ± 3,0	28,3 ± 3,2	8,4 ± 1,1
Kontrolle nach 72 h Erholung	66,7 ± 2,6	26,8 ± 2,3	6,5 ± 1,4
Probe nach 72 h Erholung	64,3 ± 2,8	28,6 ± 2,9	7,0 ± 1,0

Tabelle 10: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus G1-, S- und G2 nach sechs stündiger Inkubation mit 1 prozentigem Sevofluran nach unterschiedlichen Erholungszeiten mit Angabe der Standardabweichungen.

	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
Kontrolle nach 24 h Erholung	53,6 ± 1,8	36,4 ± 3,0	10,1 ± 1,5
Probe nach 24 h Erholung	53,4 ± 1,3	36,7 ± 2,1	10,0 ± 1,5
Kontrolle nach 48 h Erholung	61,7 ± 5,3	29,2 ± 1,7	7,0 ± 0,8
Probe nach 48 h Erholung	67,6 ± 9,7	24,3 ± 7,8	8,1 ± 2,1
Kontrolle nach 72 h Erholung	67,3 ± 2,6	26,3 ± 2,0	6,4 ± 0,9
Probe nach 72 h Erholung	66,0 ± 3,2	27,0 ± 2,2	7,0 ± 1,7

Tabelle 11: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus G1-, S- und G2 nach drei stündiger Inkubation mit 2,5 prozentigem Sevofluran nach unterschiedlichen Erholungszeiten mit Angabe der Standardabweichungen.

	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
Kontrolle nach 24 h Erholung	52,4 ± 1,2	37,2 ± 2,4	10,4 ± 1,3
Probe nach 24 h Erholung	52,9 ± 1,7	36,7 ± 1,8	10,4 ± 1,7
Kontrolle nach 48 h Erholung	63,4 ± 1,7	31,3 ± 2,2	5,8 ± 0,5
Probe nach 48 h Erholung	62,5 ± 2,1	28,9 ± 0,9	8,6 ± 1,7 *
Kontrolle nach 72 h Erholung	67,5 ± 2,4	26,3 ± 2,2	6,1 ± 0,8
Probe nach 72 h Erholung	64,9 ± 2,0	27,5 ± 2,2	7,6 ± 0,6 *

Tabelle 12: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus G1-, S- und G2 nach sechs stündiger Inkubation mit 2,5 prozentigem Sevofluran nach unterschiedlichen Erholungszeiten mit Angabe der Standardabweichungen. (*) $p < 0,01$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
Kontrolle nach 24 h Erholung	54,4 ± 2,1	34,9 ± 1,9	10,7 ± 1,6
Probe nach 24 h Erholung	54,3 ± 3,5	36,5 ± 2,9	9,3 ± 2,9
Kontrolle nach 48 h Erholung	62,3 ± 1,5	29,4 ± 1,1	8,3 ± 1,4
Probe nach 48 h Erholung	61,2 ± 2,4	30,4 ± 2,0	8,4 ± 0,7
Kontrolle nach 72 h Erholung	68,4 ± 1,5	24,6 ± 0,9	7,0 ± 1,1
Probe nach 72 h Erholung	66,1 ± 4,1	24,6 ± 2,5	7,5 ± 1,7

Tabelle 13: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus G1-, S- und G2 nach drei stündiger Inkubation mit 6 procentigem Desfluran nach unterschiedlichen Erholungszeiten mit Angabe der Standardabweichungen.

	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
Kontrolle nach 24 h Erholung	53,1 ± 2,4	36,8 ± 1,2	10,2 ± 3,2
Probe nach 24 h Erholung	53,1 ± 3,7	37,1 ± 4,4	9,8 ± 1,7
Kontrolle nach 48 h Erholung	63,6 ± 2,2	27,4 ± 1,3	8,9 ± 1,0
Probe nach 48 h Erholung	61,7 ± 3,0	30,2 ± 1,8 *	8,1 ± 2,1
Kontrolle nach 72 h Erholung	68,5 ± 2,1	24,7 ± 1,2	6,7 ± 1,8
Probe nach 72 h Erholung	67,1 ± 3,4	25,7 ± 1,4	7,2 ± 2,1

Tabelle 14: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus G1-, S- und G2 nach sechs stündiger Inkubation mit 6 procentigem Desfluran nach unterschiedlichen Erholungszeiten mit Angabe der Standardabweichungen. (*) $p < 0,01$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
Kontrolle nach 24 h Erholung	53,3 ± 2,1	34,5 ± 3,8	12,2 ± 2,1
Probe nach 24 h Erholung	54,1 ± 1,5	34,1 ± 1,7	11,8 ± 1,3
Kontrolle nach 48 h Erholung	62,5 ± 1,3	28,5 ± 0,9	9,0 ± 1,7
Probe nach 48 h Erholung	59,6 ± 1,4 *	30,7 ± 0,9 *	9,7 ± 1,1
Kontrolle nach 72 h Erholung	66,3 ± 2,0	26,9 ± 1,8	6,8 ± 1,6
Probe nach 72 h Erholung	64,2 ± 1,5	27,8 ± 0,4	8,1 ± 1,8

Tabelle 15: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus G1-, S- und G2 nach drei stündiger Inkubation mit 12 prozentigem Desfluran nach unterschiedlichen Erholungszeiten mit Angabe der Standardabweichungen. (*) $p < 0,01$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
Kontrolle nach 24 h Erholung	53,1 ± 2,4	34,9 ± 2,8	12,0 ± 0,5
Probe nach 24 h Erholung	54,8 ± 1,7	33,6 ± 2,1	11,7 ± 1,6
Kontrolle nach 48 h Erholung	61,1 ± 1,0	30,1 ± 0,8	8,8 ± 1,3
Probe nach 48 h Erholung	59,0 ± 1,9 *	30,4 ± 2,3	10,7 ± 1,0 *
Kontrolle nach 72 h Erholung	63,4 ± 4,3	28,0 ± 3,6	8,6 ± 1,0
Probe nach 72 h Erholung	64,7 ± 1,1	26,7 ± 1,2	8,6 ± 0,9

Tabelle 16: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus G1-, S- und G2 nach sechs stündiger Inkubation mit 12 prozentigem Desfluran nach unterschiedlichen Erholungszeiten mit Angabe der Standardabweichungen. (*) $p < 0,01$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

3.2 Apoptosemessungen

3.2.1 Messung der Apoptoserate via Annexin V Apoptosis Detection Kit

Die SW480 Zellen wurden für 0, 3 oder 6 Stunden mit Sevofluran bzw. Desfluran begast, die Messung der Apoptoserate erfolgte nach 0-48 Stunden postexpositionell. Eine statistisch signifikante Steigerung der Apoptoserate zeigte sich, nachdem die Zellen für 3 bzw. 6 Stunden mit 1 % bzw. 2,5 % Sevofluran inkubiert wurden, einmal 48 Stunden, das andere Mal direkt, nach der Exposition. Bei dem direkten Effekt auf die Zellen nach der Exposition mit 2,5 % Sevofluran für 6 Stunden betrug die Steigerung der Apoptoserate 30 %, nach den 6 Stunden Erholungszeit konnte in dieser Gruppe eine Steigerung der Apoptoserate um 27 % detektiert werden.

Abbildung 16 und Abbildung 17 stellen die Ergebnisse der mit 1 % bzw. 2,5 % Sevofluran begasten Zellen in Abhängigkeit von Expositionsdauer und Erholungszeiten im Vergleich zur Kontrolle dar.

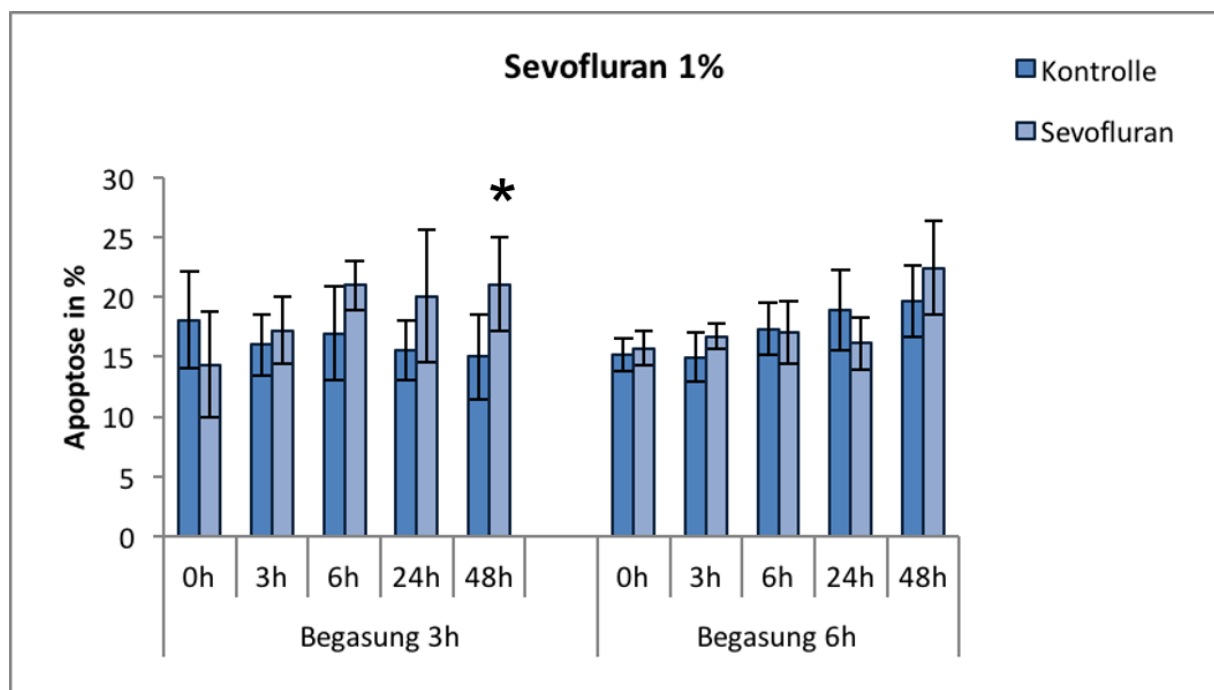


Abbildung 16: Effekt von 1 % Sevofluran auf die Apoptoserate von SW480 Kolonkarzinomzellen *in vitro*. Die Apoptoserate wurde nach 3h bzw. 6h Inkubationszeit und 0, 3, 6, 24 und 48 h Erholungszeit mit Hilfe des Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen) ermittelt. (*) $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

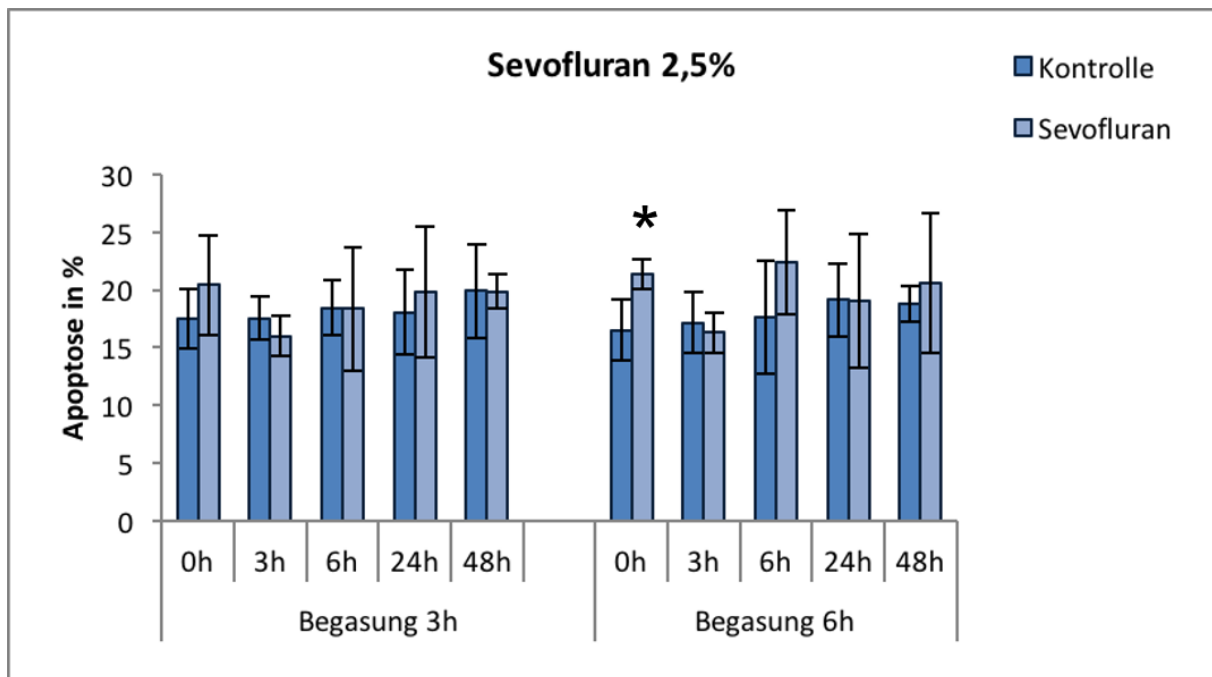


Abbildung 17: Effekt von 2,5 % Sevofluran auf die Apoptoserate von SW480 Kolonkarzinomzellen in vitro. Die Apoptoserate wurde nach 3h bzw. 6h Inkubationszeit und 0, 3, 6, 24 und 48 h Erholungszeit mit Hilfe des Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen) ermittelt. (*) $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Eine 3-stündige Inkubation mit 6% oder 12% Desfluran hatte keinen Einfluss auf die Apoptoserate nach 0-48 Stunden Erholungszeit. Nur nach 24 Stunden Erholungszeit konnte in SW 480 Zellen, die für 6 Stunden mit 6 % Desfluran inkubiert wurden, eine signifikante Steigerung der späten Apoptoserate beobachtet werden. ($p < 0,01$) Gleichzeitig trat hierbei eine Reduktion der vitalen Zellen, von $79,5 \pm 1,6$ % in der Kontrolle zu $77,4 \pm 3,0$ % in der Probe, auf.

Nach sechs Stunden Erholungszeit konnte bei Zellen, die mit 12 % Desfluran für sechs Stunden inkubiert wurden, eine signifikante Verringerung der Apoptoserate festgestellt werden. Die Zelltodrate in der Probe betrug $16,7 \pm 2,5$ %, in Vergleich war sie in der unbehandelten Kontrolle mit $20,1 \pm 2,5$ % höher. ($p < 0,05$)

Abbildung 18 und Abbildung 19 fassen die Ergebnisse der mit 6 % bzw. 12 % Desfluran inkubierten Zellen in Abhängigkeit von Expositionsdauer und Erholungszeiten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dar.

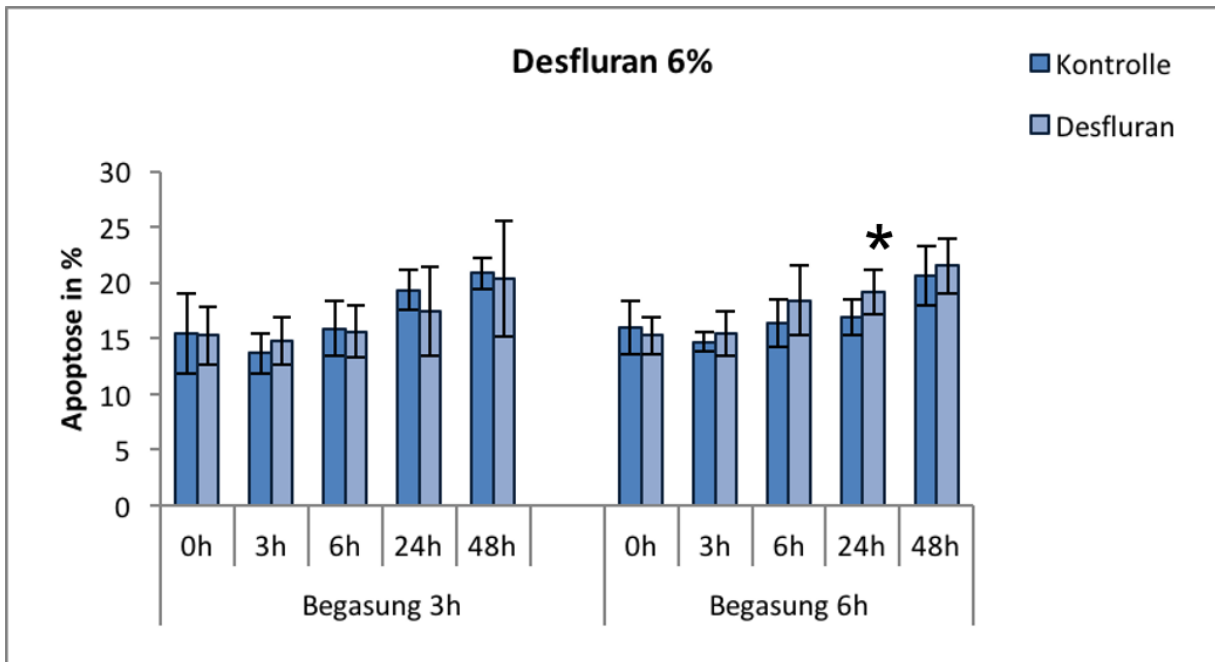


Abbildung 18: Effekt von 6 % Desfluran auf die Apoptoserate von SW480 Kolonkarzinomzellen in vitro. Die Apoptoserate wurde nach 3h bzw. 6h Inkubationszeit und 0, 3, 6, 24 und 48 h Erholungszeit mit Hilfe des Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen) ermittelt. (*) $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

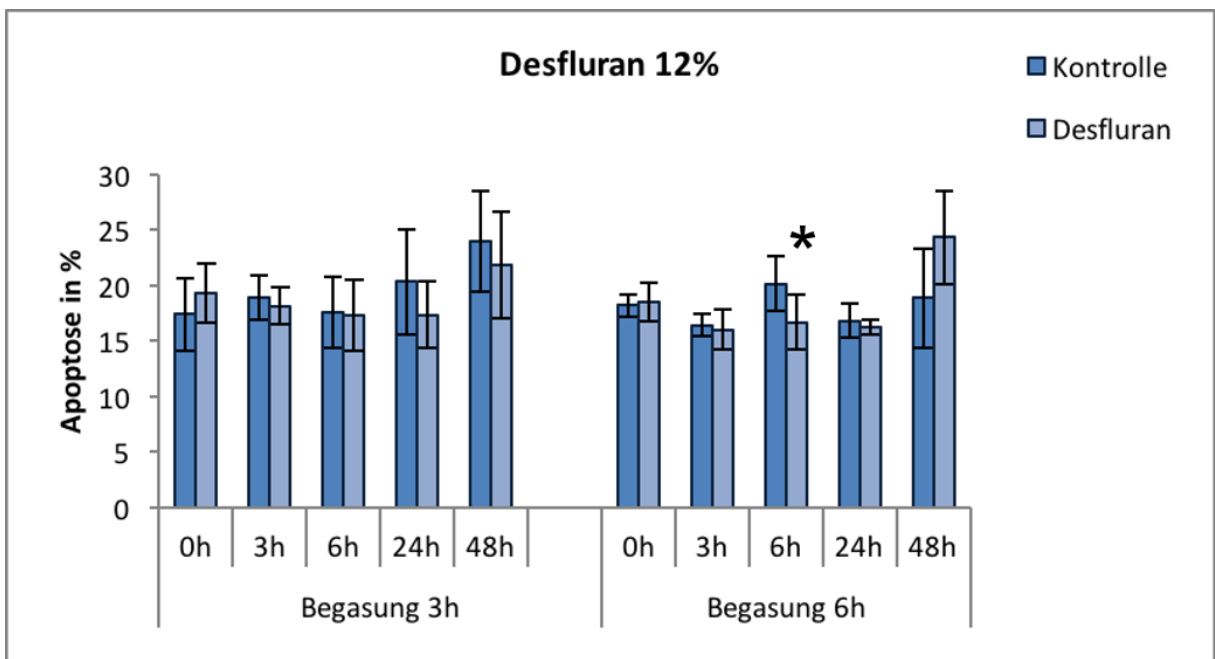


Abbildung 19: Effekt von 12 % Desfluran auf die Apoptoserate von SW480 Kolonkarzinomzellen in vitro. Die Apoptoserate wurde nach 3h bzw. 6h Inkubationszeit und 0, 3, 6, 24 und 48 h Erholungszeit mit Hilfe des Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen) ermittelt. (*) $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

3.2.2 Ergebnisse der Western Blot Analyse

Um den Einfluss von Sevofluran auf die Apoptose in SW 480 Zellen genauer zu erfassen, wurden die Expressionslevel der Caspasen 3, 8 und 9 untersucht. Wie bereits in Abschnitt „4.1.1.6.1 Apoptose- das Aufräumprogramm der Zelle“ erläutert, haben diese Caspasen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Zelltodprogramms. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der Antikörpernachweise nach Gelelektrophorese. Dabei sind von rechts nach links zuerst die unbehandelten Kontrollen nach 0, 3 und 6 Stunden Erholungszeit, danach die für 6 Stunden mit 2,5 % Sevofluran inkubierten Proben nach 0, 3 und 6 Stunden Erholungszeit dargestellt. β -Aktin ist die Ladekontrolle.

Nach sechsstündiger Inkubation der Zellen mit 2,5% Sevofluran nimmt die Expression von Procaspase 9 und aktivierter Caspase 9 zeitabhängig ab. Die aktivierte Caspase 9 kann nach 6 Stunden Erholungszeit kaum noch nachgewiesen werden, was auf einen Verbrauch dieser hinweist. Hingegen bleibt das Expressionslevel der Caspase 3 konstant. Caspase 8 war kaum nachweisbar.

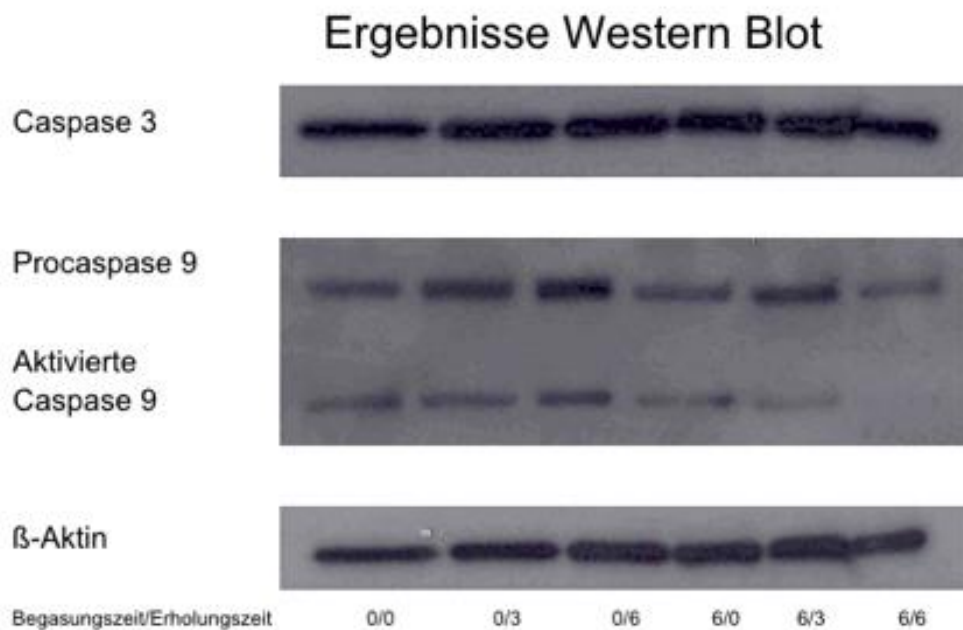


Abbildung 20: Ergebnisse des Western Blots für die Caspase 3, die Procaspase 9 sowie die aktivierte Caspase 9. β -Aktin dient als Ladekontrolle. Von rechts nach links: Kontrollen nach 0, 3 und 6 Stunden Erholungszeit, danach Proben (für 6 Stunden mit 2,5 % Sevofluran inkubiert) nach 0, 3, und 6 Stunden Erholung.

4. Diskussion

4.1 Allgemeiner Teil

4.1.1 Tumorentstehung und Metastasierung

Nach Hanahan und Weinberg sind sechs Faktoren für die Entstehung und Verbreitung von Tumoren verantwortlich (Abbildung 21) (53).

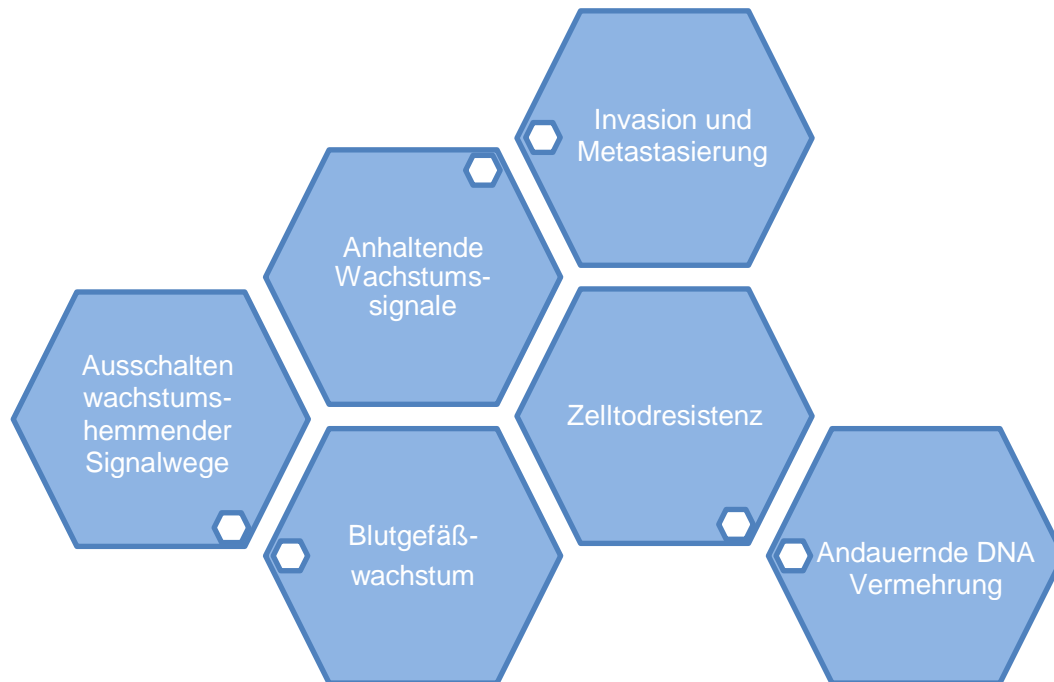


Abbildung 21: Die sechs Hauptmerkmale von Tumorzellen.

4.1.1.1 Anhaltende Wachstumssignale

Eine der wesentlichen Eigenschaften von Tumorzellen ist ihre Fähigkeit zu kontinuierlicher Zellvermehrung. Sie können ihr Zellwachstum in unterschiedlicher Weise aufrechterhalten: Mittels autokriner Stimulation, Hemmung ihres negativen-Feedback-Mechanismus oder mit Hilfe der sie umgebenden Zellen. Diese werden durch Signale von Tumorzellen zur Wachstumsfaktorenproduktion angeregt. Zudem weisen viele humane Krebszellen somatische Mutationen, mit der Folge einer unentwegten Aktivierung proliferativer Signalkreisläufe, auf (54, 55).

4.1.1.2 Ausschalten wachstumshemmender Signalwege

Tumorzellen können nicht nur das Zellwachstum stimulieren, sondern besitzen auch die Fähigkeit, antiproliferativ wirkende Signale auszuschalten (53). Dies wird durch loss-of-function Mutationen von Tumorsuppressorgenen erreicht. Die Funktion der

Tumorsuppressorgene, Zellwachstum negativ zu beeinflussen bzw. wenn nötig Apoptose zu induzieren, entfällt (56).

4.1.1.3 Invasion und Metastasierung

E-Cadherin, ein wichtiges Adhäsionsmolekül für Zellkontakte, spielt eine zentrale Rolle in der Karzinomausbreitung. Durch verminderte Expression oder mutationsbedingte Inaktivierung dieses Schlüsselproteins kommt es zur vermehrten Tumorzellinvasion. Auch andere Gene, die für Zell-Zell-Kontakte bzw. Zell-Matrix-Kontakte codieren, sind in einigen hochaggressiven Tumoren herunterreguliert. Im Gegensatz dazu weisen Adhäsionsmoleküle, die während der Embryonalzeit und Entzündungsphasen aktiv sind, in Karzinomen oft höhere Spiegel auf (53, 57, 58). Beispielsweise sind Matrixmetalloproteasen in der Lage, die Tumorzellen aus ihrer Umgebung zu lösen und stellen einen wichtigen Schritt in der Invasion und Migration von neoplastischen Zellen dar (59).

4.1.1.4 Andauernde DNA-Vermehrung

4.1.1.4.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus ist essenziell für die DNA-Vermehrung und von verschiedenen Genen abhängig. Er gliedert sich in fünf unterschiedliche Phasen: G₀, G₁, S, G₂ und M Phase. Zellen ohne externen Stimulus befinden sich in der Ruhephase G₀.

Koordinationszentren für den Ablauf des Zellzyklus bilden die spezifischen Kontrollpunkte (checkpoints). Sie stellen sicher, dass der nächste Schritt im Zellzyklus erst dann erfolgt, wenn der vorhergehende abgeschlossen ist. Dafür besteht die Möglichkeit der Arretierung des Zellzyklus oder der Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose). Spezielle Zellzyklusproteine, die CDKs (cycline dependent kinases) und die Cycline stellen die entscheidenden Schlüsselproteine dar. Durch Mechanismen wie Dephosphorylierung und Phosphorylierung sowie Komplexbildung erfolgt die Steuerung der Abläufe.

In der G₁-Phase werden die Bausteine für die folgende DNA Replikation synthetisiert. Dazu gehören mRNAs, Zytosol und Zytosolorganellen, Replikationsenzyme sowie Desoxyribonukleosid-Triphosphate. Die G₁-Phase ist die längste von allen Phasen. Ein wichtiger Kontrollpunkt befindet sich am Ende der G₁-Phase. Dabei spielen die Cycline D, E und CDK 2, 4 und 6 eine große Rolle.

Das Startsignal für die Replikation (S-Phase) wird durch Phosphorylierung bestimmter Präreplikationskomplexe (Cyclin A und CDK 2) gegeben. Es erfolgt die Verdopplung des Chromosomensatzes. Mit Abschluss der Replikation liegen in der G₂-Phase doppelt so viele Chromosomen wie in der G₀/G₁-Phase vor (=4n).

Die G₂-Phase dient der Vorbereitung auf die M-Phase (Mitose). RNA-Moleküle und zellteilungsspezifische Proteine werden hergestellt, Zell-Zell-Kontakte lösen sich. Am Ende der G₂-Phase wird am Check Point geprüft, ob die DNA-Replikation vollständig abgelaufen ist und die passenden Umweltbedingungen für den Übergang in die M-Phase erfüllt sind. Maßgeblich beteiligt sind die Proteine Cyclin B und CDK 1.

Schließlich wird in der Mitose der duplizierte Chromosomensatz auf zwei Tochterzellen aufgeteilt (60).

Abbildung 22 stellt den Zellzyklus mit Verlauf des DNA-Gehaltes der einzelnen Phasen und ihrem Äquivalent im Zellzyklus-Histogramm des Auswerteprogrammes dar.

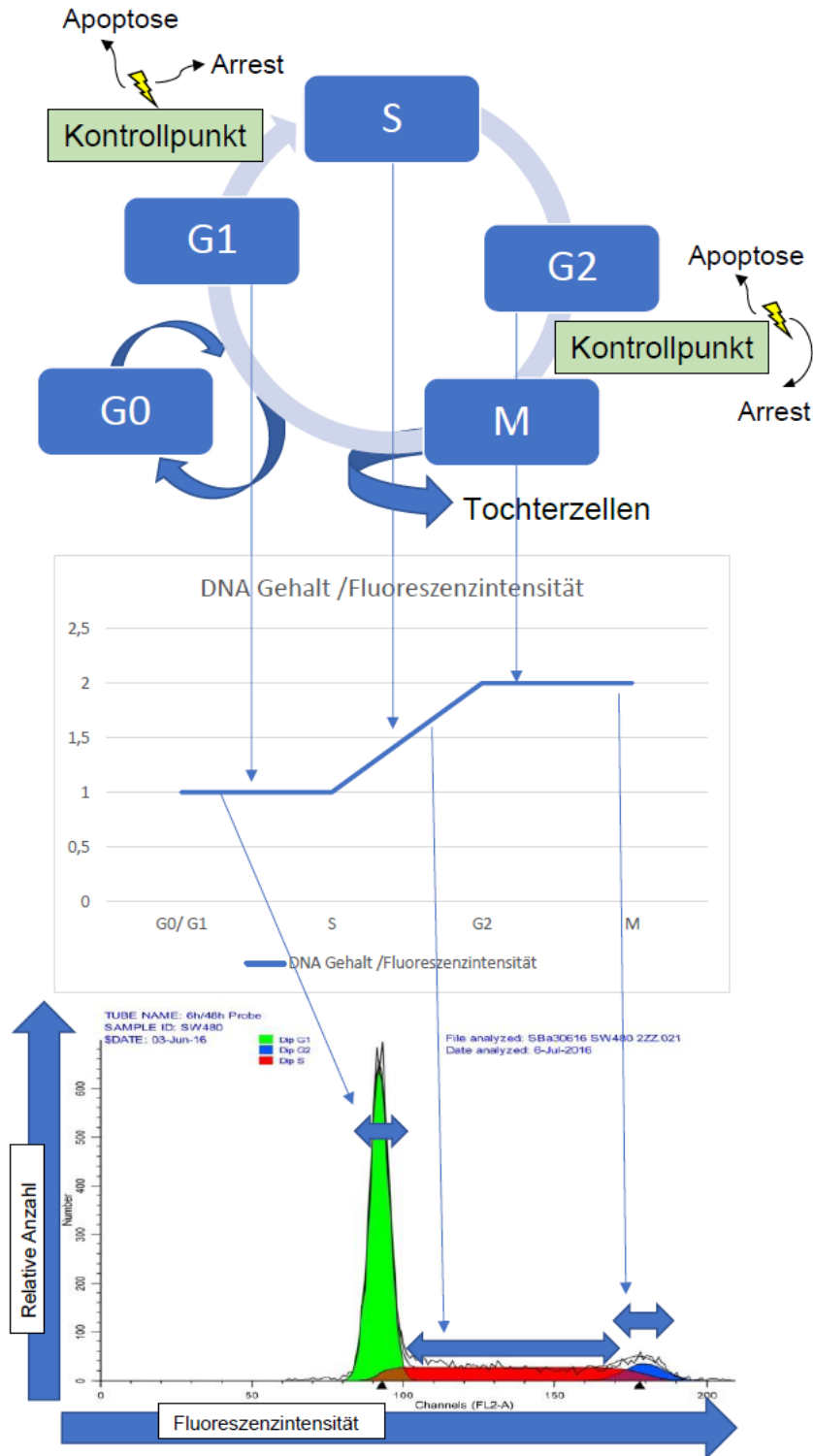


Abbildung 22: Zellzyklusdarstellung mit Verlauf des DNA-Gehaltes der einzelnen Phasen und ihrem Äquivalent im Zellzyklus-Histogramm des Auswerteprogrammes. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten können im DNA-Histogramm den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet werden. Dabei können G_0 und G_1 Phase-Zellen mit identischem DNA-Gehalt nicht unterschieden werden. Die Anzahl der Zellen in den verschiedenen Phasen ist auf der Y-Achse dargestellt, der unterschiedliche Chromosomensatz, $2n$ bzw. $4n$ ist auf der x-Achse zu sehen. (Modifiziert nach Rothe et al (45))

4.1.1.4.2 Die Beeinflussung des Zellzyklus durch Tumorzellen

Körperzellen können nur eine limitierte Anzahl an Zellwachstums- und Zellteilungszyklen durchlaufen. Sind die DNA-Enden, die sogenannte Telomere, aufgebraucht, treten die Zellen in ein Ruhestadium ein. Danach folgt der programmierte Zelltod. Somit besitzt jede Zelle ein zeitliches "Ablaufdatum".

Manche Zellen können ihre Lebensspanne mit Hilfe eines Enzyms verlängern. Dieses Enzym ist die Telomerase, eine spezialisierte DNA Polymerase. Sie verlängert die Telomer-Enden durch Anhängen von neuen Nukleotid Wiederholungseinheiten. Zellen, die eine vermehrte Telomerase-Aktivität aufweisen, nennt man unsterblich. Tumorzellen gehören zu den wenigen unsterblich gewordenen Zellen, da sie entweder vermehrte Telomerase-Level exprimieren oder, eher seltener, alternative Wege gefunden haben, die Telomerlänge aufrecht zu erhalten (53, 61, 62).

4.1.1.5 Angiogenese

Im Gegensatz zur Embryogenese kommt es im erwachsenen Organismus nur noch selten zur Angiogenese. Beispielsweise spielt die Angiogenese noch eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, der Entzündungsreaktion und dem weiblichen Menstruationszyklus, jedoch auch hier nur vorübergehend. Durch das Wachstum der Tumorzellen liegt ein höherer Nährstoff- und Sauerstoffbedarf vor (63). Für die suffiziente Versorgung müssen die Blutgefäße weiterwachsen und aussprossen (53, 64). Das vermehrte Blutgefäßwachstum ist ein frühes Kennzeichen von Tumorzellen (65, 64). Die neu gebildeten Blutgefäße weichen stark von der Norm ab. So finden sich unreife Kapillarbette, stark verzweigte, deformierte sowie erweiterte Gefäße mit ungleichmäßigem Blutfluss und Mikrohämorrhagien (66, 67).

4.1.1.6 Zelltodresistenz

4.1.1.6.1 Apoptose- das Aufräumprogramm der Zelle

Die Apoptose ist ein physiologischer Vorgang, der geschädigte, nicht mehr benötigte oder infizierte Zellen gezielt beseitigt. Sie ist ein zentraler Bestandteil der Embryonalentwicklung und ermöglicht die Aufrechterhaltung der Homöostase sowie eines potenten Immunsystems (68, 48, 69). Es gibt zwei Hauptwege, Apoptose zu induzieren. Einer umfasst den extrinsischen Weg über extrazelluläre Signale, zum Beispiel die Aktivierung des Todesliganden Fas. Die intrinsische Aktivierung wird mit

Hilfe intrazellulärer Komponenten, beispielsweise die Überexpression des proapoptotischen Faktors Bax oder Freisetzung von mitochondrialen Cytochrom-c ausgelöst.

Beide Wege münden in die Aktivierung von Proteasen. Meistens sind die Initiatorcaspasen 8 (extrinsischer Weg) oder 9 (intrinsischer Weg), sowie die Effektorcaspase 3 (gemeinsame Endstrecke) betroffen, welche wiederum kaskadenartig weitere Caspasen aktivieren. Letztendlich wird die Zelle wie auch ihr Genom stückchenweise lysiert und die einzelnen Bestandteile von phagozytären Zellen verdaut (53, 69).

Beim intrinsischen System spielt das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinfamilien eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung. Die Bcl-Familie, allen voran das Bcl-2, verhindert Apoptose. Indem sie an die in der mitochondrialen Außenmembran befindlichen Proteine Bax und Bak bindet, verhindert sie deren Apoptose induzierende Wirkung. Bleibt die Hemmung der antiapoptotischen Bcl-Familie aus, zerstören Bax und Bak die äußere Struktur der Mitochondrienmembran. Es folgt die Freisetzung proapoptotischer Signalproteine, insbesondere von Cytochrom c. Cytochrom c ist in der Lage Caspasen (u.a. Caspase 9), die das weitere Zelltodprogramm fortführen, zu aktivieren (69).

Abbildung 23 fasst den Ablauf der Apoptose mit seinen beiden Hauptwegen zusammen.

Auch Immunzellen, wie zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen, sind in der Lage Apoptose auszulösen. Zytotoxische T-Zellen führen MHC (major histocompatibility complex) Typ I abhängig zum Zelltod ihrer Zielzellen.

Natürliche Killerzellen entsprechen einer Subpopulation von Lymphozyten, die Zellen unabhängig von ihrer MHC Immunisierung detektieren. Sie erkennen beispielsweise Tumorzellen anhand ihres fehlenden MHC Typ I Komplexes als körperfremd. Es erfolgt die Elimination mittels lysierender Granula, darunter finden sich Perforine, Granzyme und Fas Todesliganden. Zudem verfügen natürliche Killerzellen über eine Reihe von aktivierenden und inhibitorischen Oberflächenrezeptoren, mit welchen sie MHC Typ I wie auch Stressliganden detektieren können (35, 60).

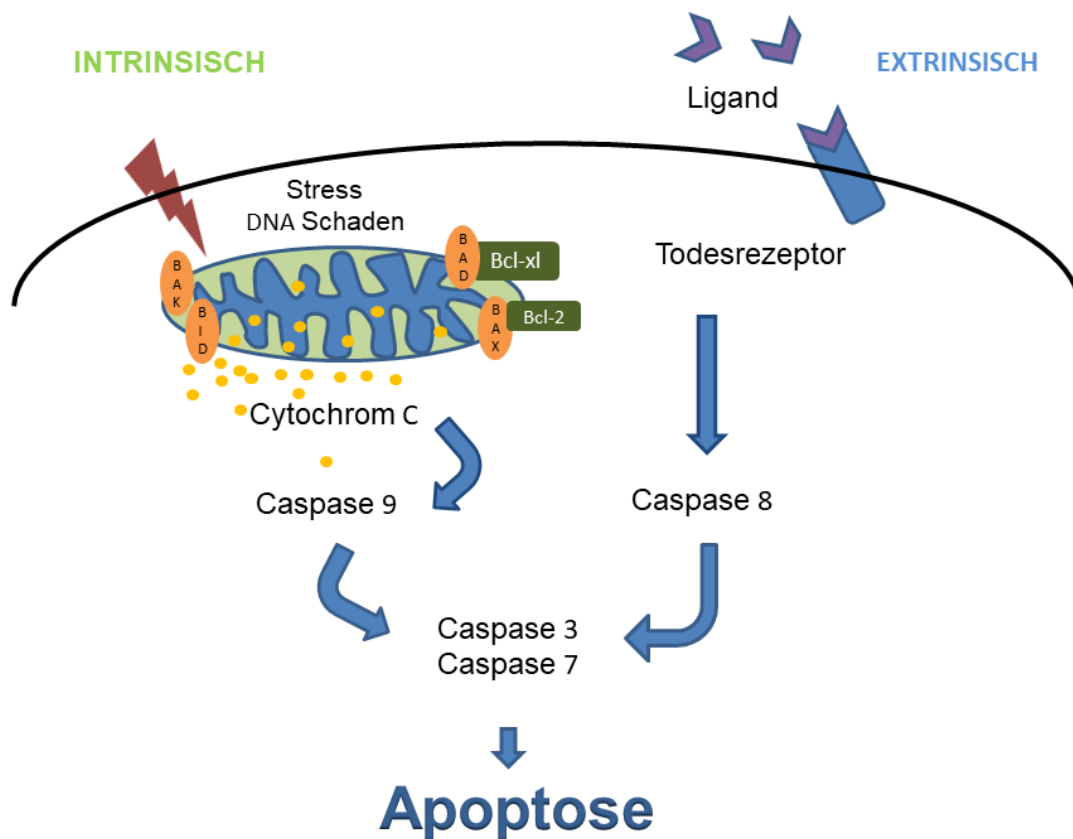


Abbildung 23: Apoptose-Signalweg: Extrinsischer Signalweg: Aktivierung der Caspase 8 durch Bindung eines Liganden an den Todesrezeptor. Intrinsischer Signalweg: Über die Veränderung des Mitochondrienmembranpotentials mit konsekutiver Freisetzung von Cytochrom C kommt es zur Aktivierung der Caspase 9. Die Aktivierung von Caspase 3 und 7 stellt die gemeinsame Endstrecke beider Signalwege dar. Proapoptotische Faktoren: BID, BAX, BAD, BAX und BAD, antiapoptotische Faktoren; Bcl-2 und Bcl-xL.

4.1.1.6.2 Die Nekrose – der unkontrollierte Zellverlust

Es gibt noch eine weitere Form des Zelltods, die Nekrose. Die Nekrose läuft unkontrolliert mit irreversibler Schädigung der Zellintegrität ab. Hervorgerufen wird die Nekrose durch pathologische äußere Einflüsse wie beispielsweise Sauerstoffmangel, hohe Temperaturen oder giftige Noxen. Es kommt zur Schwellung der Zellorganellen, die Zelle "platzt" und entleert ihren Inhalt in die extrazelluläre Matrix mit der Folge einer lokalen Entzündungsreaktion. Die angelockten Immunzellen können das Tumorwachstum fördern. Sie schütten Wachstums- und angiogenetische Faktoren aus, welche die Ausbreitung der umgebenden, potenziell neoplastischen Zellen erleichtern (53, 70, 71).

4.1.1.6.3 Wie Tumorzellen den Zelltod umgehen

Tumorzellen entgehen dem Zelltod über Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. TP53 und RB-Protein) und Aktivierung von Onkogenen (z.B. RAS und MYC). Weiterhin exprimieren sie vermehrt antiapoptotische Regulatoren wie Bcl-2, die Expression der proapoptotischen Faktoren (wie Bax) ist vermindert (53, 8).

4.1.2 Auswahl der Medikamente

4.1.2.1 Staurosporin als Positivkontrolle für die Messung der Apoptoserate

Die erstmalige Isolation von Staurosporin (Antibiotic AM-2282 (72)) aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* gelangen Omura und Mitarbeitern 1977. Staurosporin ist ein mikrobielles Alkaloid mit einer Phospholipid/Calcium²⁺-abhängigen Proteinkinase-C-Inhibitor Aktivität und antimykotischer Wirkung. Es ist dafür bekannt, Apoptose auf unterschiedlichste Weise zu induzieren (73–75).

Man nimmt an, dass Staurosporin seine Apoptose-induzierende Wirkung über verschiedene Signalwege entfaltet. Einerseits wirkt es über die klassische Aktivierung des mitochondrialen Cytochrom-c/Apaf-1-Weges. Andererseits wird auch ein neuer, intrinsischer Weg diskutiert, der unabhängig von Apaf-1 abläuft (73). Apaf-1 stellt ein wichtiges Bindeglied im Apoptose-Signalweg dar, indem es Procaspase-9 bindet und dadurch aktiviert (76). Auch für den Staurosporin vermittelten Zelltod spielt die Caspase-9 eine tragende Rolle. Bisher konnte Apoptose in Zusammenhang mit Staurosporin nur in der Anwesenheit von Caspase 9 stattfinden. Man geht davon aus, dass Staurosporin in der Lage ist, Procaspase-9 auf eine eigene Art und Weise zu aktivieren, da die Apoptose auch in Abwesenheit von Apaf-1, Todesrezeptoren und trotz vermehrter Expression von Bcl-2 stattfindet (73).

In Bezug auf SW480 Kolonkarzinomzellen konnte eine apoptoseinduzierende Wirkung durch Staurosporin, wie auch 5-Hydroxy-Staurosporin, ein Derivat des Staurosporins, festgestellt werden. Das Derivat induziert vor allem in Kolonkarzinomzellen Apoptose (77, 78).

Aufgrund der genannten Eigenschaften erschien Staurosporin zur Positivkontrolle für die Analyse der Apoptoserate gut geeignet zu sein.

4.1.2.2 Acetylsalicylsäure als Positivkontrolle für die Zellzyklusanalyse

Acetylsalicylsäure (ASS, ASA, Acetylsalicylic Acid) ist ein irreversibler Cyclooxygenase I und reversibler Cyclooxygenase II Hemmer. Es führt zu einer geringeren Prostaglandinsynthese und einer abgeschwächten Thrombozytenaktivierung und –aggregation (79). Es wirkt antiinflammatorisch und möglicherweise auch antiproliferativ auf die Tumorzellprogression (80).

Es arretiert den Zellzyklus in der G₀/G₁-Phase dosisabhängig (81–83). Dachineni et al. (84) erklären dies mit einer ASS bedingten Herabsetzung der Cyclin A2, CDK 2 sowie mRNA Spiegel. Auch die Spiegel der Cycline B1, D3 und CDKs 1, 2, 4 und 6 wurden durch ASS herunterreguliert. Zudem führt Aspirin zum programmierten Zelltod durch Expression von p53 und Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Weges über Freisetzung von Cytochrom c und aktivierter Caspase 3 (81). Außerdem soll es die Expression von Bcl-2 hemmen und von Bax fördern (80).

In Bezug auf SW480 Kolonkarzinomzellen zeigt die aktuelle Studienlage einen wachstumshemmenden Effekt, durch Arrest des Zellzyklus in der G₀/G₁-Phase sowie möglicherweise Störung der Bildung von epidermal growth factor und dessen Rezeptor in den Tumorzellen (85, 86).

Vor diesem Hintergrund wurde Acetylsalicylsäure als Positivkontrolle für die Zellzyklusanalyse der Proben ausgewählt.

4.1.2.3 Sevofluran

Sevofluran ist ein schnell anflutendes Narkosegas. Die Patienten erlangen nach einer Narkose mit Sevofluran schnell wieder die Orientierung und Leistungsfähigkeit, nahezu genauso rasch wie nach einer Narkose mit Propofol. Auch die Aufwachzeiten sind relativ kurz. Es ist ein in der klinischen Routine häufig verwendetes Anästhetikum. Aufgrund der geringen analgetischen Wirkung wird Sevofluran mit einem Opioid und/oder Lachgas kombiniert. Außerdem wirkt es kardio- und neuroprotektiv. Es vermindert den zerebralen Sauerstoffbedarf deutlich. Sevofluran führt dosisabhängig zu einem durch Vasodilatation verursachten Blutdruckabfall, jedoch sind die hämodynamischen Veränderungen geringer ausgeprägt als bei anderen Inhalationsanästhetika. Aufgrund seines angenehmen Geruchs und der geringen Atemwegsreizung ist es zur Inhalationseinleitung sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern geeignet. Wie auch die anderen Inhalationsanästhetika wirkt es dosisabhängig atemdepressiv und

Hirndruck steigernd. Zudem kann es bei prädisponierten Patienten zu einer malignen Hyperthermie führen (21).

Zu beachten ist, dass es nach mit Sevofluran geführten Narkosen zu postoperativen Agitationszuständen kommen kann, vor allem bei Kindern (87–89).

4.1.2.4 Desfluran

Desfluran flutet von allen volatilen Anästhetika am schnellsten an und ab und gilt dadurch besonders gut steuerbar. Somit ist auch die Aufwachzeit sehr kurz. Es bietet sich an bei Narkosen mit niedrigem Frischgasfluss.

Die narkotische Potenz ist am niedrigsten von allen Inhalationsanästhetika. Es wird wegen der geringen analgetischen Wirkung üblicherweise mit einem Opioid oder Lachgas kombiniert. Desfluran wirkt kardio- und neuroprotektiv. Desfluran führt dosisabhängig zu einer Atem- und Kreislaufdepression. Vorsicht ist bei einer schnellen Konzentrationserhöhung geboten, da es zu einer minutenlangen, starken Herzfrequenzsteigerung kommen kann.

Desfluran kann den intrakraniellen Druck steigern sowie den zerebralen Sauerstoffbedarf senken. Es kann bei prädisponierten Patienten eine maligne Hyperthermie verursachen (21).

4.2 Spezieller Teil

4.2.1 Wirkung inhalativer Anästhetika auf nicht entartete Zellen

Studien zeigen, dass nicht entartete Zellen weniger empfindlich auf die toxischen Effekte der inhalativen Anästhetika reagieren als Tumorzellen. Mückter et al. fanden bei Nierenzellen keine zytotoxischen Effekte von Inhalationsanästhetika. Trotz einer kontinuierlichen Inkubation mit Halothan, Isofluran oder Enfluran, die über 24 Stunden andauerte, zeigten sich die Zellen vital (90). Auch Kvolik et al. konnten nur eine leichte Wachstumshemmung von humanen Fibroblasten nach Exposition mit volatilen Anästhetika nachweisen. Die Zellen wurden für zwei, vier oder sechs Stunden mit jeweils Sevofluran, Halothan oder Isofluran inkubiert (91). Darüber hinaus sollen volatile Anästhetika einen protektiven, antiapoptotischen Effekt auf humane Myokardzellen haben (92). Allerdings fanden sich im *in-vivo*-Modell, bei dem das Blut ansonsten gesunder Patienten untersucht wurde, eine gesteigerte Konzentration der Apoptosemarker im Vergleich zur präoperativen Ausgangssituation (93). Inwieweit sich die betroffenen Zellen wieder erholen, wurde nicht untersucht. Im Hinblick auf den Zellzyklus zeigte nur Xenon eine nahezu vollständige, wenn auch reversible Hemmung des Wachstums von humanen Endothelzellen am G2/M-Kontrollpunkt. In dieser experimentellen Studie von Petzelt et al. wurde neben Xenon u.a. Desfluran und Isofluran getestet (94).

Eine Ausnahme bilden adulte neuronale Zellen. Die Wirkung volatiler Anästhetika auf diese Zellgruppe wird derzeit intensiv diskutiert. So legen die Ergebnisse von Fang et al. eine apoptoseinduzierende Wirkung von Sevofluran in hippocampalen Zellen von Mäusen nahe. Erwachsene Mäuse sowie deren extrahierte, neuronale Zellen wurden dabei für zwei Stunden mit 2,5 % Sevofluran begast (95). Lin et al. konnten dies in ihrer Studie allerdings nicht bestätigen, die humanen neuronalen Zellen lieferten keinen Hinweis auf Apoptose, trotz der hochdosierten Begasung mit 6% Sevofluran oder 12 % Desfluran für 48 Stunden (96). Auch Deng et al. und Wise-Faberowski et al. legen einen gegen Apoptose protektiven Effekt von Sevofluran als auch Desfluran nahe, was mit der Reduktion des oxidativen Stresslevels von neuronalen Zellen begründet wurde (97, 98).

Neuroembryonale Zellen wiederum scheinen vulnerabler gegenüber volatilen Anästhetika zu sein, es kommt vermehrt zur Apoptoseinduktion sowie Einschränkungen des Verhaltens und Lernens, wie *in vitro* und *in vivo* Studien zeigen

(34),(99). Dabei ist zu bedenken, dass postnatal keine neuronale Zellvermehrung stattfindet.

Zudem zeigten sich *in vitro* und *in vivo* vor allem unter dem Einfluss von Sevofluran immunsuppressive Effekte durch Verminderung der Entzündungsmediatoren (100, 101).

4.2.2 Auswahl der Medikamentendosierung und -expositionszeit

Sevofluran und Desfluran werden in der balancierten Anästhesie üblicherweise zur Narkoseaufrechterhaltung, Sevofluran auch zur Narkoseeinleitung, eingesetzt. Die minimale alveoläre Konzentration (MAC-Wert) dient als etabliertes Maß für die Potenz eines Inhalationsnarkotikums. Reagieren 50 % der Patienten nicht mehr auf einen Schmerzreiz, ist die minimale alveoläre Konzentration eines Inhalationsnarkotikums erreicht. Der MAC 50 % Wert beträgt für Desfluran 6 Volumenprozent, sowie für Sevofluran 2,05 Volumenprozent in 100 % Sauerstoff. Es gilt zu beachten, dass sich der MAC Wert mit steigendem Patientenalter und in Kombination mit anderen Substanzen wie beispielsweise Opioiden und Benzodiazepinen verringert (102).

Der molekulare Wirkmechanismus von volatilen Anästhetika ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurden unter anderem die Interaktion mit Zellmembranlipiden, Proteinen und Ionenkanälen diskutiert. Dabei scheinen Rezeptoren für nikotinisches Acetylcholin, Glycin, NMDA, AMPA und Serotonin eine wichtige Rolle zu spielen (102). In dieser Arbeit wurden die Zellen mit 1 % und 2,5 % Sevofluran, sowie 6 % und 12 % Desfluran für jeweils drei und sechs Stunden inkubiert. 1 % Sevofluran bzw. 6 % Desfluran werden üblicherweise bei einer Tumoroperation eingesetzt, die höheren Konzentrationen (2,5 % Sevofluran bzw. 12 % Desfluran) wären so im klinischen Alltag überdosiert. In Studien mit anderen Tumorentitäten konnten bei diesen Medikamentenkonzentrationen *in vitro* geringe antineoplastische Effekte nachgewiesen werden (90, 91). Die Inkubationszeiten differieren von einer Stunde (103) bis zu 48 Stunden (96), meistens wurde jedoch eine Dauer von 2 bis zu 6 Stunden gewählt (104, 105). Sevofluran wurde in einer Konzentration von 1,7 Volumenprozent (106) bis zu 6 Volumenprozent (96), Desfluran von 6,6 Volumenprozent (107) bis zu 12 Volumenprozent (96) untersucht. Meist fanden sich signifikante Ergebnisse bei höheren Medikamentenkonzentrationen und/oder längeren Expositionzeiten (104, 108). Die Übertragbarkeit von solchen *in-vitro*-Befunden auf

die *in-vivo*-Situation ist jedoch bei Konzentrationen außerhalb der klinischen Relevanz nur eingeschränkt möglich.

4.2.3 Relation *in vitro* und *in vivo*

Die inhalativen Anästhetika diffundieren in der Lunge durch die Alveolarmembran ins Blut und erreichen letztendlich die Zielorgane in weitaus geringeren Konzentrationen, als *in vitro* simuliert. Es stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse der *in vitro* Stimulationen auf die *in vivo* Situation übertragbar ist. Klinisch-experimentelle Studien mit den Seren krebserkrankter Patienten zeigen zum Großteil keine Veränderung der Apoptoserate.

Die Studie von Buckley et al. testete das Serum brustkrebskranker Frauen auf die natürliche Killerzellfunktion (NK) und T-Zell Zytotoxizität gegen Mammakarzinomzellen vor und 24 Stunden nach der Tumoroperation. Die Frauen wurden entweder der Gruppe mit paravertebalem Block mit Propofol (PPA) oder der Gruppe mit Allgemeinanästhesie mit Sevofluran und Opioiden (GA) randomisiert zugeordnet. Serum von Patientinnen mit PPA unterschied sich nicht im Vergleich zur Kontrolle in seiner natürlichen Killerzellaktivität bzw. der Zytokinsekretion. Das Serum von GA Patientinnen zeigte eine reduzierte NK Rezeptoraktivität ($p < 0.001$) sowie reduzierte Entzündungsmediatorenlevel. Gleichzeitig zeigte sich eine vermehrte NK Rezeptoraktivität ($p < 0.007$) und erhöhte Tumorzellapoptoserate ($p < 0.0001$) bei Patientinnen, die die PPA Behandlung erhielten (109).

Xu, Li et al. untersuchten das Serum von zwei Patientengruppen, die unterschiedlichen anästhesiologischen Verfahren unterlagen, bezüglich Proliferation und Apoptose der Kolonkarzinomzellen. Lovo Kolonkarzinomzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Patientenserum (0-10%), beimpft und dann der Einfluss auf die Zellproliferation und Apoptoserate gemessen. Die Seren wurden den zwei Patientengruppen nach der Operation entnommen. Die Patienten wurden randomisiert entweder der Gruppe mit thorakalem Epiduralkatheter (0,15% Ropivacain und Sufentanil 0,3 Mikrogramm/ml) und Propofol Narkose oder der Gruppe mit Sevofluran (1-1,5 MAC) Narkose und Opioiden (Sufentanil 0,2-0,4 Mikrogramm/kg/h) zugeteilt. In der Gruppe, die mit Propofol und thorakalem Epiduralkatheter behandelt wurde, kam es zu einem reduzierten Zellwachstum der Kolonkarzinomzellen. Die Gruppe, die mit Sevofluran und Opioiden anästhesiert wurde, zeigte eine reduzierte Apoptoserate der

Zellen (110). Bei beiden Studien kann jedoch der Effekt nicht nur auf Sevofluran allein zurückgeführt werden, da die Narkose in Verbindung mit Opioiden durchgeführt wurde.

Zudem zeigten sich immunsuppressive Effekte, v.a. von Sevofluran (109). Durch die Beeinträchtigung der Zytotoxizität natürlicher Killerzellen und die daraus resultierende Schwächung der Tumorzellerkennung führte dieser Effekt sogar eher zur Progression der malignen Zellen (35).

4.2.4 Wirkung inhalativer Anästhetika auf die Tumormigration und -invasion

Die Wirkung der Inhalationsanästhetika Sevofluran und Desfluran auf das invasive Tumorstadium und die Metastasenbildung wird derzeit kontrovers diskutiert. Die Mehrzahl der Studien stellten eine Reduktion der Tumormigration und -invasion fest. Müller-Edenborn et al. konnten eine herabgesetzte Tumormigration in kolorektalen Karzinomen durch die Behandlung mit Sevofluran und Desfluran *in vitro* nachweisen. Humane neutrophile Granulozyten als auch MC-38 GFP Kolonkarzinomzellen wurden mit Sevofluran (2,2 %) oder Desfluran (6 %) für 45 Minuten vorbehandelt, danach erfolgte die Zellstimulation mit Interleukin 8. Letztendlich kam es unter dem Einfluss der volatilen Anästhetika zu einer signifikanten Reduktion der Matrixmetalloprotease 9 (MMP-9) Freisetzung. MMP 9 ist ein wichtiges Protein für die Tumormigration und -invasion in die extrazelluläre Matrix (111). Dies bestätigen Liang, Wang et al., die ebenso ein Absinken der Level von Matrixmetalloprotease 2 und 9 in A549 Lungenkarzinomzellen unter dem Einfluss von Sevofluran in Kombination mit Cisplatin detektierten (112).

Auch in U251 Gliomzellen konnte ein inhibierender, dosis- und expositionsabhängiger Effekt von Sevofluran auf das Migrations- und Invasionsverhalten festgestellt werden. Die Wirkung von Sevofluran zeigt sich durch Veränderung der micro-RNA Level und somit in der Genexpression der für die Metastasierung verantwortlichen Proteine (113).

Zudem unterdrückte Sevofluran das durch HIF-1 α induzierte Wachstum und die Ausbreitung von A549 Lungenkarzinomzellen *in vitro* (114).

Iwasaki, Zhao et al. sahen jedoch einen gegenteiligen migrationsfördernden Effekt von Sevofluran (3,6 %) sowie Desfluran (10,3 %) auf humane Ovarialkrebszellen. Beide Anästhetika erhöhten nach einer zweistündigen Inkubation mit Metastasen assoziierte

Genexpressionen, darunter Matrixmetalloprotease 11 (MMP-11) und Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) (115).

Allerdings ist zu beachten, dass Matrixmetalloproteasen eine heterogene Gruppe an Enzymen darstellen, die das Zellverhalten sowie die Zell-Zell-Kontakte regulieren. Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen konnten in der onkologischen Therapie bisher nicht erfolgsbringend eingesetzt werden (116). Dies gilt es bei der Bewertung der Ergebnisse zu beachten. Migration und Metastasierung umfasst das Zusammenspiel mehrerer Faktoren, die einzelnen Subtypen der Matrixmetalloproteasen entsprechen dabei einem Baustein (59).

4.2.5 Einfluss von Desfluran auf den Zellzyklus bei SW480 Zellen

Nach sechs stündiger Inkubation mit 6 % Desfluran sowie drei stündiger Inkubation mit 12 % Desfluran und 48 Stunden Erholungszeit befand sich eine signifikant höhere Anzahl an Zellen in der S-Phase als in der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$). Der Anteil der Zellen, die sich nach drei und sechs stündiger Inkubation mit 12 % Desfluran nach 48 Stunden Erholung in der G1- Phase befanden, ist signifikant niedriger als in der Kontrolle. Dabei war bei der Gruppe mit sechs stündiger Inkubation gleichzeitig ein signifikanter Anstieg der Zellen in der G2-Phase zu beobachten. ($p < 0,05$)

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Desfluran nach direkter Exposition eine Verlängerung des Zellzyklus in der G1 Phase hervorruft. Diese „gestoppten“ Zellen erholen sich nach einer gewissen Zeitspanne und durchlaufen synchron weiter den Zellzyklus. Dies erklärt die dargelegten signifikanten Effekte hinreichend, denn nach 48 Stunden Erholungszeit zeigen sich erhöhte Zellanteile in der S- und G2-Phase sowie verringerte in der G1-Phase. Nach dieser Hypothese ist die anfängliche, möglicherweise signifikante Verlängerung in der G1 Phase durch den 24 Stunden Wert nicht erfasst, sie müsste in einem Zeitraum vor dieser Messung stattgefunden haben. Weiterführende Studien mit weiteren Messzeitpunkten sind notwendig, um den Einfluss von Desfluran auf den Zellzyklus von SW480 Zellen zu klären. Doch auch wenn eine geringe antiproliferative Wirkung angenommen werden kann, so ist diese zeitlich begrenzt. Die Zellen erholen sich von der Medikamentenwirkung. Von einem auf lange Sicht wachstumshemmenden Effekt auf SW480 Kolonkarzinomzellen ist daher nicht auszugehen. Die Effekte von Desfluran auf den Zellzyklus nicht maligner Zellen sind ebenso gering. In der experimentellen Studie von Petzelt et al. zeigt sich

nach zwei stündiger Inkubation von humanen Endothelzellen mit Desfluran keine Veränderung der Zellzyklus-Phasen im Vergleich zur Kontrolle (94).

4.2.6 Einfluss von Sevofluran auf den Zellzyklus bei SW480 Zellen

Nach sechs stündiger Inkubation mit 2,5 % Sevofluran und 48 sowie 72 Stunden Erholungszeit kam es zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils der Zellen in der G2 Phase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$). Dies gibt Hinweis auf einen wachstumshemmenden Effekt von Sevofluran auf SW480 Zellen. Ein Teil der Zellen wurde im Vergleich zur Kontrolle in der G2 Phase gehalten. Es ist zu einer Prolongation des Zellzyklus gekommen. Dieser Einfluss macht sich erst in höheren Konzentrationen und Expositionszeiten bemerkbar. Nach drei stündiger Inkubation mit 1% Sevofluran und 24 Stunden Erholungszeit befanden sich signifikant weniger Zellen in der G2 Phase als in der Kontrolle, eine Arretierung in einer bestimmten Phase fand nicht statt. Es ist am ehesten nur von einer leichten Wachstumseinschränkung der SW 480 Kolonkarzinomzellen auszugehen, denn insgesamt blieb der Anteil der Zellen in der S-Phase verhältnismäßig hoch. Abbildung 22 gibt einen Überblick über die verschiedenen Phasen des Zellzyklus.

Vergleichbare Studien bringen ähnliche Ergebnisse. So kam es in der Studie von Liang, Gu et al. zu einem durch Sevofluran induziertem Anstieg von A549 Bronchialkarzinomzellen in der G₂-Phase. Dieser Anstieg war für alle Inkubationszeiten (2, 4, 6 Stunden) und alle Konzentrationen von Sevofluran (1,7 %, 3,4 %, 5,1%) signifikant. Der Effekt wurde nach 48 Stunden Erholungszeit nachgewiesen. Diskutiert wurde hier ein durch das Inhalationsanästhetikum induzierter Arrest des Zellzyklus am G₂/M-Checkpoint. Denn die Western Blot Analyse der Studiengruppe zeigte eine dosisabhängige Senkung der Proteinlevel von Cyclin A, Cyclin B und CDK 2 unter Sevofluran (106).

Auch O'Leary, Bacon et al. sowie Kvolik, Glavas-Obrovac et al. postulieren einen zytostatischen Effekt von Sevofluran. Auch wenn in diesen Studien keine signifikante Veränderung der Zellverteilung auf die Zellzyklusphasen festgestellt werden konnte, so ist die wachstumshemmende Wirkung von Sevofluran auf C6 Gliomzellen, Hep-2 Larynx- und Caco-2 Kolonkarzinomzellen signifikant. Die Zellen wurden von zwei bis 48 Stunden mit bis zu 2 mM Medikamentenkonzentrationen inkubiert und danach die

Zellzyklusphasen durchflusszytometrisch erfasst bzw. das Zellwachstum mittels tetrazolium dye assay MTT Test erfasst (117), (91).

Der erstmalige Nachweis, dass Sevofluran die Genexpression zirkadianer Rhythmen störend beeinflusst, gelang 2005 Sakamoto et al (118). Zirkadiane Rhythmen steuern unter anderem den Schlaf-Wach-Rhythmus, die Körperkerntemperatur, den Energiebedarf, wie auch die Sekretion von Hormonen, z.B. Melatonin, Wachstumshormon oder Cortisol (119, 120). Die Gene, die dafür verantwortlich sind, werden zum Großteil über den Nucleus suprachiasmaticus, eine Region des ventralen Hypothalamus ausgeschüttet (121). Kobayashi et al. konnten zudem einen dosisabhängigen suppressiven Effekt von Sevofluran auf die Expression zirkadianer Gene *in vivo* nachweisen. Es wurde die zirkadiane Genexpression verschiedenster Gene im gesamten Gehirn (Per2, Dbp, Arc, Egr1, Krox20, NGFI-B) durch Sevofluran unterdrückt, ein Effekt, der selbst nach 24 h Erholungszeit nachweisbar war. Die Ausschüttung von Per2 und dessen Transkriptionsfaktor Dbp wird beispielsweise durch Licht verursacht und nimmt zusammen mit Per1 und Per3 einen entscheidenden Einfluss auf den Schlaf-Wach-Rhythmus (122). Da die Cycline auch durch zirkadiane Rhythmen gesteuert werden, ist eine Übertragbarkeit auf den Zellzyklus gegeben. Abschließend bleibt zu bedenken, dass eine Senkung der CDK-Protein- und Genexpressionslevel allein nicht für einen dauerhaften Arrest der Zellen ausreicht. Ergebnisse nach längeren Erholungszeiten, z.B. 96 oder 120 Stunden, sind in der Literatur nicht beschrieben. Eine temporäre, wachstumshemmende Wirkung von Sevofluran auf Tumorzellen ist während und nach der Narkose mit hohen Dosierungen und langen Expositionszeiten denkbar.

4.2.7 Einfluss von Desfluran auf die Apoptoserate bei SW480 Zellen

Desfluran bewirkte in dieser Arbeit bei geringen Dosierungen und Expositionszeiten eine leichte Steigerung der Apoptoserate. So zeigte sich in SW 480 Zellen, die für sechs Stunden mit 6 % Desfluran inkubiert wurden, nach 24 Stunden Erholungszeit eine signifikante Steigerung der späten Apoptoserate ($p < 0,01$). Nach sechs stündiger Begasung mit 12 % Desfluran konnte nach sechs Stunden Erholungszeit eine signifikante Verringerung der Apoptoserate festgestellt werden, es gingen weniger Tumorzellen in den programmierten Zelltod im Vergleich zur Kontrolle. Auch in anderen Studiengruppen konnte für Desfluran bisher kein apoptosefördernder Effekt auf Tumorzellen nachgewiesen werden (123–126), ganz im Gegensatz zu neuronalen

Zellen. Im Tiermodell wies Desfluran im Vergleich zu Sevofluran und Isofluran eine deutlich höhere neurotoxische Wirkung auf (34). Dies stützt die Vermutung, dass Pharmaka unterschiedliche Wirkungen auf die Zellpopulationen verschiedener Organe haben.

Boost et al. wie auch Müller-Edenborn et al. postulieren einen dosisabhängigen, immunsuppressiven Effekt von Desfluran (127). Die Inhalation von 1 Mac Desfluran über vier Stunden zeigte eine verminderte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha und Interleukin 1-beta, jedoch keine Veränderung der Freisetzung von Interleukin 6 (128). Durch die Inhibierung der Immunzellen kann die Abwehrfunktion, z.B. durch natürliche Killerzellen nicht mehr aufrechterhalten werden. Dies belegt auch die Studie von Schallner et al., die eine verminderte Apoptoserate von Neuroblastomzellen nach Inkubation mit Desfluran durch Verringerung des oxidativen Stresses beschreibt. Bei dieser Studie wurde jedoch die Wirkung von inhalativen Anästhetika auf vorgeschädigte Zellen untersucht, eine reine Vorbehandlung mit 7,2% Desfluran über 2 Stunden zeigte keine Veränderung der Apoptoserate. Nachdem den Zellen Sauerstoff und Glukose entzogen wurde, reagierten sie sensibel auf das Narkosegas, die frühe Apoptoserate wurde signifikant verringert (125). Dieses Modell lässt sich auf die perioperative Situation für die Zellen innerhalb des Operationsgebietes möglicherweise übertragen. Der Entzug von Sauerstoff und Glukose könnte die Empfindlichkeit der Tumorzellen auf das Narkosegas und dessen narkotisierende Wirkung verstärken. Demnach ist anzunehmen, dass perioperativ der oxidative Stress vermindert und der Zellstoffwechsel reduziert wird. Immunzellen wie auch Tumorzellen könnten sich in einer Art von Ruhephase befinden, in welcher das Tumorwachstum weder begünstigt noch gefördert wird.

4.2.8 Einfluss von Sevofluran auf die Apoptoserate bei SW480 Zellen

Mehrere Studien belegen die apoptosesteigernde Wirkung von Sevofluran auf verschiedene Zellarten. Darunter T-Lymphozyten, Jurkat T-Zellen, neuronale Zellen aus Mäusen, H4 Neurogliomzellen, A549 Bronchialkarzinomzellen, Caco-2 Kolonkarzinomzellen, Hep-2 Larynxkarzinomzellen sowie FaDu und CAL-27 Pharynx- und Zungenkarzinomzellen (129, 103, 124, 123, 106, 104, 108, 130, 105). So führten Konzentrationen von 1,7 % bis 5,1 % unter Expositionszeiten von 1 bis 8 Stunden zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate (106, 129, 104, 103, 105). Als

mögliche Signalwege werden die zunehmende Permeabilität der Mitochondrienmembran mit konsekutiver Cytochrom c Freisetzung und Aktivierung der Caspasen 3 und 7 wie auch die Aktivierung des p53 Tumorsuppressorgens diskutiert (104, 103, 124). Es konnte auch eine vermehrte, durch Sevofluran induzierte Aktivierung des Todesliganden Fas und Verminderung des antiapoptotisch wirksamen Bcl-2 festgestellt werden (105).

In vivo zeigten sich z.T. widersprüchliche Ergebnisse. Buckley et al. testeten das Serum brustkrebskranker Frauen auf die natürliche Killerzellfunktion (NKT) und T-Zell Zytotoxizität vor und 24 Stunden nach der Tumoroperation. Bei den Frauen, die eine Allgemeinanästhesie mit Sevofluran und Opioiden erhielten, fanden sich reduzierte NKT Rezeptoraktivität ($p < 0.001$) sowie reduzierte Entzündungsmediatorenlevel im Serum. Es kam zu keiner Steigerung der Tumorzellapoptoserate (109). Zur genaueren Studienbeschreibung siehe Abschnitt „4.2.3 Relation *in vitro* und *in vivo*“. Wegen der Kompromittierung des Immunsystems ist mit einer Begünstigung des Tumorwachstums zu rechnen, da die natürlichen Killerzellen eine wichtige Funktion in der Tumorzellerkennung und Einleitung des programmierten Zelltods innehaben (60). Jedoch ist fraglich, ob der Effekt allein auf Sevofluran zurückzuführen ist, da Sevofluran und Opiode gemeinsam getestet wurden (109). Gleiches gilt für die Ergebnisse von Jaura et al., die im Serum brustkrebskranker Frauen postoperativ nach einer Sevofluran-/Opioid Narkose eine geringere Tumorzellapoptoserate fanden als im Vergleich zu denen, die eine Propofol-Narkose mit regionaler Schmerztherapie erhielten. Die Frauen wurden in einer groß angelegten, prospektiven klinischen Studie in zwei Gruppen randomisiert: Eine Gruppe erhielt eine Propofol Narkose mit paravertebralem Block, die andere Gruppe eine Sevofluran Narkose, gekoppelt mit Opioiden. Das Serum wurde kurz vor der Narkoseeinleitung und eine Stunde nach der Operation abgenommen und der aggressiven Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231, ER-negativ, zugeführt. Die Apoptoserate wurde mittels ApoLive-Glo Multiplex Assay™ detektiert (131).

In der vorliegenden Studie konnte eine dosisabhängige Steigerung der Apoptoserate von Tumorzellen festgestellt werden. Es kam vermehrt zum programmierten Zelltod, der sich im Anschluss an die sechsstündige Exposition mit 2,5 % Sevofluran zeigte. Die Zunahme der in Apoptose befindlichen Zellen war statistisch signifikant ($p < 0,05$) mit einer Steigerung um rund 30 %. Im Vergleich lagen bei der verwendeten

Positivkontrolle Staurosporin Steigerungsraten der Apoptose von bis zu 300 % vor. Die Detektion der Proteinexpressionslevel erwies sich als schwierig. Die Verwendung höherer Sevoflurankonzentrationen oder längerer Inkubationszeiten hätte möglicherweise eindeutigere Ergebnisse gebracht, jedoch wäre die Übertragbarkeit auf die klinische Situation damit eingeschränkt gewesen. In oben genannten Studien traten Signifikanzen zum Teil erst ab Gaskonzentrationen von über 3 % auf. Es ist zu beachten, dass nach 48 Stunden Erholungszeit keine signifikante Veränderung der Apoptoserate der Proben im Vergleich zur Kontrolle auftraten. Die Zellen scheinen von der Exposition nicht dauerhaft geschädigt zu werden. Die Expressionslevel von Procaspase 9 und aktivierter Caspase 9 nahmen leicht ab, was auf einen vermehrten Verbrauch der Caspase 9 hinweist. Caspase 9 stellt ein Schlüsselenzym in der Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges dar (vgl. Abbildung 23). Somit gibt es Hinweise auf eine Aktivierung des intrinsischen Signalweges der Apoptose. Es konnte jedoch keine Veränderung der Caspase 3 festgestellt werden. Caspase 3 bildet die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Aktivierungsweges der Apoptose. Weiterhin vermuten Brozovic und Mitarbeiter die Möglichkeit der Apoptoseaktivierung über andere, noch unbekannte Mechanismen. Ihre Ergebnisse belegen *in vivo* starke genotoxische Effekte von Sevofluran auf Tumorzellen. Es wurde 2,4 prozentiges Sevofluran für zwei Stunden an drei aufeinanderfolgenden Tagen einer Gruppe von Mäusen mit intraperitonealen Aszites-Tumorzellen (EAT-Zellen) zugeführt. Sevofluran verminderte die Anzahl der lebenden EAT-Zellen in der Peritoneallavage, obwohl es keinen direkten Effekt auf die Apoptoserate der Zellen zeigte. Brozovic et al. erklären sich dies über eine möglicherweise unterschiedliche Metabolisierung der inhalativen Anästhetika via Oxidation und Reduktion. Daraus resultieren reaktive Produkte, die wiederum in die DNA Schädigung involviert sein könnten. Somit ruft Sevofluran wahrscheinlich eine andere Art von Zelltod hervor, wie beispielsweise Nekrose, Autophagie oder Mitosefehler wie auch die vermehrte Bildung freier Radikale. Freie Radikale können die DNA direkt durch Strangbrüche und/oder Oxidation der Basen angreifen. Zur Unterstützung dieser Hypothese sind Testungen des ROS- (reactive oxygen species) und Antioxidantien-Levels im Blut und in den Tumorzellen notwendig. Weiterhin ist anzumerken, dass Tumorzellen eine heterogene Zellpopulation darstellen, deren Klone wechselnd sensibel auf Schädigung reagieren. Entscheidend ist die Erholungsrate von Tumorzellen nach der Schädigung (132).

Bezüglich der wissenschaftlichen Fragestellung lässt sich zusammenfassend feststellen:

1. Das Inhalationsanästhetikum Sevofluran führte in den klinisch verwendeten Konzentrationen zu einer zeitweise gesteigerten Apoptoserate in SW80 Kolonkarzinomzellen, wogegen dies bei Desfluran nicht zu beobachten war.
2. Als zugrundeliegender Signalweg ergaben sich Hinweise auf eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges. Entsprechende Aussagen über den extrinsischen Signalweg können aufgrund des fehlenden Nachweises von Caspase 8 nicht getroffen werden.
3. Die untersuchten Anästhetika Sevofluran und Desfluran bewirkten eine relevante Prolongation des Zellzyklus in SW480 Kolonkarzinomzellen, jedoch lag ein Arrest definitionsgemäß nicht vor.
4. Desfluran zeigte weniger signifikante Wirkungen auf SW480 Kolonkarzinomzellen als Sevofluran, insgesamt waren jedoch die Effekte auf den Zellzyklus und die Apoptose eher gering.

4.2.9 Ausblick

Aus onkologischer Sicht erlaubt die derzeit vorliegende wissenschaftliche Literatur noch keine definitive Empfehlung für ein spezielles Anästhesieverfahren oder perioperatives anästhesiologisches Management. Welche Anästhetika in Bezug auf die Tumorprogression als unbedenklich gelten, ist noch nicht ausreichend geklärt. Durch eine Kombination mit regionalen Anästhesieverfahren könnten beispielsweise Opiate zur postoperativen Schmerztherapie eingespart werden (131, 133). Die Studienergebnisse deuten darauf hin, dass Sevofluran ein antitumorales Potenzial besitzt und sich positiv auf das Outcome der Patienten auswirken könnte. Auch wenn dieser Medikamenteneffekt als gering zu werten ist, könnten in Anbetracht der weltweit großen Zahl an Tumoreingriffen die Patienten davon profitieren.

4.3 Zusammenfassung

In der balancierten Anästhesie werden verschiedene medikamentöse Substanzklassen kombiniert, und so die Einzeldosen sowie unerwünschte Arzneimittelwirkungen reduziert. Dabei werden die etablierten Inhalationsanästhetika Sevofluran und Desfluran bei den meisten Tumoroperationen zur Narkoseaufrechterhaltung eingesetzt. Jedoch zeigt sich gerade die perioperative Phase vulnerabel in Bezug auf die Tumorprogression. Durch chirurgische Manipulation, gesteigerte Expression von Wachstumsfaktoren, Immunsuppression, insbesondere der natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen, wird das Tumorwachstum und die Ausbildung von Mikrometastasen begünstigt. Über die vermehrte Freisetzung von Katecholaminen, Glukokortikoiden und Prostaglandinen wird der neurohumorale Stresslevel des Organismus erhöht. Inwieweit perioperativ genutzte Medikamente das Wachstums- und Metastasierungsverhalten von Tumorzellen beeinflussen, ist noch unklar. Deswegen wurde in dieser Studie der Effekt der volatilen Anästhetika Sevofluran und Desfluran auf den Zellzyklus und die Apoptose von SW480 Kolonkarzinomzellen *in vitro* untersucht.

Die Tumorzellen wurden für 3 oder 6 Stunden mit Sevofluran (1 oder 2,5 Volumenprozent) oder Desfluran (6 oder 12 Volumenprozent) inkubiert. Die Zellzyklusverteilung wurde nach 24, 48 und 72 Stunden Erholungszeit durchflusszytometrisch erfasst. Die Analyse des Apoptoseverhaltens erfolgte nach 0-48 Stunden Erholungszeit durch Behandlung mit Annexin V und Propidiumjodid via Durchflusszytometrie. Um den getriggerten Apoptosesignalweg erfassen zu können, wurden Western Blot Analysen der Caspasen 3, 8, 9 sowie Procaspase 9 durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sowohl Sevofluran als auch Desfluran leichte Veränderungen in der Zellzyklusverteilung verursachen können. Der möglicherweise wachstumshemmende Effekt auf SW480 Zellen zeigte sich jedoch langfristig reversibel.

Desfluran erzielte keine relevanten Wirkungen auf die Apoptoserate von SW480 Zellen, wohingegen Sevofluran zwar einen reversiblen, aber signifikanten apoptosesteigernden Effekt auf die Kolonkarzinomzellen, direkt nach der Inkubation aufwies.

Somit zeigten sich insgesamt nur leichte Veränderungen der Zellzyklusverteilung und Apoptoserate von SW480 Kolonkarzinomzellen nach der Inkubation mit Sevofluran und Desfluran in klinisch relevanten Dosierungen und Expositionszeiten.

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen präklinischen Studien ist eine Empfehlung für die Verwendung eines bestimmten Anästhesieverfahrens oder Substanzklasse in der klinischen Praxis noch nicht möglich.

Weitere Studien an verschiedenen Tumorentitäten sind notwendig, um den Einfluss der volatilen Anästhetika auf Wachstum und Ausbreitung maligner Erkrankungen abschließend zu klären. Die Ergebnisse der *in-vitro*-Studien sollten an geeigneten *in-vivo*-Modellen weiterentwickelt und überprüft werden.

5. Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

CDK	Cyclin depending kinases
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGFR	Endothelial growth factor receptor
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FGF	Fibroblast growth factor
FKS	Fetales Kalbsserum
HIF-1 α	Hypoxie induzierter Faktor 1 α
H ₂ O	Wasser
IL	Interleukin
MAC	Minimale alveolare Konzentration
MMP	Matrixmetalloproteinase
N ₂	Stickstoff
NKT Zellen	Natürliche Killer T Zellen
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PBS	Phosphate buffered salin

RNA	Ribonucleic acid
RPM	Rounds per minute
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für die Arbeit genutzte Geräte im Anästhesie und HTC-Labor	10
Tabelle 2: Für die Arbeit genutzte Gebrauchsmaterialien	11
Tabelle 3: Für die Arbeit genutzte Lösungen und Chemikalien	13
Tabelle 4: In der Arbeit verwendete Enzyme	14
Tabelle 5: Eigenschaften, Strukturformel und Herstellung dervon Staurosporin.....	14
Tabelle 6: Eigenschaften von ASS.....	15
Tabelle 7: Charakteristka und Strukturformel von Sevofluran.....	15
Tabelle 8: Charakteristka und Strukturformel von Desfluran.	16
Tabelle 9: Prozentuale Verteilung der Zellen in die Phasen des Zellzyklus nach drei stündiger Inkubation mit 1 prozentigem Sevofluran	38
Tabelle 10: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus nach sechs stündiger Inkubation mit 1 prozentigem Sevofluran.....	38
Tabelle 11: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus nach drei stündiger Inkubation mit 2,5 prozentigem Sevofluran	39
Tabelle 12: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus nach sechs stündiger Inkubation mit 2,5 prozentigem Sevofluran.....	39
Tabelle 13: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus nach drei stündiger Inkubation mit 6 prozentigem Desfluran	40
Tabelle 14: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus nach sechs stündiger Inkubation mit 6 prozentigem Desfluran.....	40
Tabelle 15: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus nach drei stündiger Inkubation mit 12 prozentigem Desfluran	41
Tabelle 16: Prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus nach sechs stündiger Inkubation mit 12 prozentigem Desfluran.	41

5.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die perioperative Phase als potenzieller Risikofaktor für Tumordissemination.	6
Abbildung 2: Chemische Strukturformel von Staurosporin.....	14
Abbildung 3: Strukturformel Acetylsalicylsäure.....	15
Abbildung 4: Strukturformel von Sevofluran	15
Abbildung 5: Strukturformel von Desfluran	16
Abbildung 6: Subkonfluente, einen adhärenenten Zellrasen bildende Zellen der Zelllinie SW480.....	18
Abbildung 7: Anzeige des Zellzählers Casy TT nach Abschluss der Messung.....	20
Abbildung 8: Anzeige des Zellzählers Casy TT nach Abschluss der Messung.....	21
Abbildung 9: Anordnung der Zellkulturflaschen in der Inkubationskammer.	22
Abbildung 10: Versuchsaufbau.	23
Abbildung 11: A. Zellzyklus-Histogramm von SW480 Zellen nach 24 h Bebrütung mit Zellmedium. B. Dot plot Diagramm mit drei unterschiedlichen Punktwolken. Gibt die Verteilung der Zellpopulation nach 48 h Behandlung mit Staurosporin wieder.	27
Abbildung 12: Testprinzip des Annexin V Test.	29
Abbildung 13: Zunehmende Apoptoserate der Positivkontrolle. Die Zellen wurden mit Staurosporin inkubiert.....	29
Abbildung 14: Nachweisfärbung der PVDF-Membran mit Coomassie-Brilliantblue...34	
Abbildung 15: Nachweisfärbung der PVDF-Membran mit Poinceau-S.	35
Abbildung 16: Effekt von 1 % Sevofluran auf die Apoptoserate von SW480 Kolonkarzinomzellen in vitro.....	42
Abbildung 17: Effekt von 2,5 % Sevofluran auf die Apoptoserate von SW480 Kolonkarzinomzellen in vitro.....	43
Abbildung 18: Effekt von 6 % Desfluran auf die Apoptoserate von SW480 Kolonkarzinomzellen in vitro.....	44
Abbildung 19: Effekt von 12 % Desfluran auf die Apoptoserate von SW480 Kolonkarzinomzellen in vitro.....	44
Abbildung 20: Ergebnisse des Western Blots für die Caspase 3, die Procaspase 9 sowie die aktivierte Caspase 9. β -Aktin dient als Ladekontrolle.	45
Abbildung 21: Die sechs Hauptmerkmale von Tumorzellen.	46

Abbildung 22: Zellzyklusdarstellung mit Verlauf des DNA-Gehaltes der einzelnen Phasen und ihrem Äquivalent im Zellzyklus-Histogramm des Auswerteprogrammes.	49
Abbildung 23: Apoptosesignalwege	52

5.4 Literaturverzeichnis

1. Krebszahlen; 2016 [cited 22.10.17]. Available from: URL: <https://www.krebshilfe.de/informieren/ueber-krebs/was-ist-krebs/?L=0%253FkeepThis%253Dtrue>.
2. Zentrum für Krebsregisterdaten; 2012 [cited 22.10.17]. Available from: URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html;jsessionid=3D5EBFA726735BE283CD24CD6FC52FA4.2_cid390.
3. Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ): Krebsatlas [cited 14.11.17]. Available from: URL: https://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_6.html.
4. Häufige Krebsarten; 01.06.17 [cited 22.03.19]. Available from: URL: <https://www.krebshilfe.de/informieren/ueber-krebs/haeufige-krebsarten/>.
5. Deutsche Krebsgesellschaft DK. Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1; 2019 [cited 2019 Apr 30]. Available from: URL: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/>.
6. Faerden AE, Sjo OH, Bukholm IRK, Andersen SN, Svindland A, Nesbakken A et al. Lymph node micrometastases and isolated tumor cells influence survival in stage I and II colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2011; 54(2):200–6.
7. Xu YJ, Li SY, Cheng Q, Chen WK, Wang SL, Ren Y et al. Effects of anaesthesia on proliferation, invasion and apoptosis of LoVo colon cancer cells in vitro. *Anaesthesia* 2016; 71(2):147–54.
8. Bundscherer A, Malsy M, Bitzinger D, Graf BM. Interaktion von Anästhetika und Analgetika mit Tumorzellen. *Anaesthesist* 2014; 63(4):313–25.
9. Goldfarb Y, Ben-Eliyahu S. Surgery as a risk factor for breast cancer recurrence and metastasis: mediating mechanisms and clinical prophylactic approaches. *Breast Dis* 2006-2007; 26:99–114.

10. Gottschalk A, Pogatzki-Zahn H, Van Aken A. Anesthetische und Tumorprogression-Fiktion oder Realität. *Anasth Intensivmed* 12/2011 [cited 2016 Apr 21]; (52):876–7. Available from: URL: http://www.ai-online.info/aionline/Artikel/artikelId/2471/Jahr/2011/Monat/Dezember/Titel/Anaesthesie_und__Tumorprogression/wicket:pageMapName/AI-Artikel.
11. Yamaguchi K, Takagi Y, Aoki S, Futamura M, Saji S. Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection. *Ann Surg* 2000; 232(1):58–65.
12. Kim R. Anesthetic technique and cancer recurrence in oncologic surgery: Unraveling the puzzle. *Cancer Metastasis Rev* 2017; 36(1):159–77.
13. Gottschalk A, Sharma S, Ford J, Durieux ME, Tiouririne M. Review article: The role of the perioperative period in recurrence after cancer surgery. *Anesth Analg* 2010; 110(6):1636–43.
14. Takeuchi H, Maehara Y, Tokunaga E, Koga T, Kakeji Y, Sugimachi K. Prognostic significance of natural killer cell activity in patients with gastric carcinoma: a multivariate analysis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(2):574–8.
15. Koda K, Saito N, Takiguchi N, Oda K, Nunomura M, Nakajima N. Preoperative natural killer cell activity: correlation with distant metastases in curatively resected colorectal carcinomas. *Int Surg* 1997; 82(2):190–3.
16. Brittenden J, Heys SD, Ross J, Eremin O. Natural killer cells and cancer. *Cancer* 1996; 77(7):1226–43.
17. Peach G, Kim C, Zacharakis E, Purkayastha S, Ziprin P. Prognostic significance of circulating tumour cells following surgical resection of colorectal cancers: A systematic review. *Br J Cancer* 2010; 102(9):1327–34.
18. Han C, Leng J, Demetris AJ, Wu T. Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004; 64(4):1369–76.
19. Bundscherer AC, Malsy M, Gruber MA, Graf BM, Sinner B. Acetaminophen and Metamizole Induce Apoptosis in HT 29 and SW 480 Colon Carcinoma Cell Lines In Vitro. *Anticancer Res* 2018; 38(2):745–51.

20. Silver S. Balanced Anesthesia. *J Am Dent Soc Anesthesiol* 1959; 6(7):11.
21. Striebel HW. *Die Anästhesie: Grundlagen und Praxis ; mit 318 Tabellen [Band 1]. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl.* Stuttgart: Schattauer; 2013.
22. Xuan W, Hankin J, Zhao H, Yao S, Ma D. The potential benefits of the use of regional anesthesia in cancer patients. *Int J Cancer* 2015; 137(12):2774–84.
23. Snyder GL, Greenberg S. Effect of anaesthetic technique and other perioperative factors on cancer recurrence. *British Journal of Anaesthesia* 2010; 105(2):106–15.
24. Cassinello F, Prieto I, del Olmo M, Rivas S, Strichartz GR. Cancer surgery: How may anesthesia influence outcome? *J Clin Anesth* 2015; 27(3):262–72.
25. Lin L, Liu C, Tan H, Ouyang H, Zhang Y, Zeng W. Anaesthetic technique may affect prognosis for ovarian serous adenocarcinoma: A retrospective analysis. *British Journal of Anaesthesia* 2011; 106(6):814–22.
26. Christopherson R, James KE, Tableman M, Marshall P, Johnson FE. Long-term survival after colon cancer surgery: A variation associated with choice of anesthesia. *Anesth Analg* 2008; 107(1):325–32.
27. Schlagenhauff B, Ellwanger U, Breuninger H, Stroebel W, Rassner G, Garbe C. Prognostic impact of the type of anaesthesia used during the excision of primary cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2000; 10(2):165–9.
28. Page GG, Blakely WP, Ben-Eliyahu S. Evidence that postoperative pain is a mediator of the tumor-promoting effects of surgery in rats. *Pain* 2001; 90(1-2):191–9.
29. Tavare AN, Perry NJS, Benzonana LL, Takata M, Ma D. Cancer recurrence after surgery: Direct and indirect effects of anesthetic agents. *Int J Cancer* 2012; 130(6):1237–50.
30. Exadaktylos AK, Buggy DJ, Moriarty DC, Mascha E, Sessler DI. Can anesthetic technique for primary breast cancer surgery affect recurrence or metastasis? *Anesthesiology* 2006; 105(4):660–4.
31. Wu X, Lu Y, Dong Y, Zhang G, Zhang Y, Xu Z et al. The inhalation anesthetic isoflurane increases levels of proinflammatory TNF- α , IL-6, and IL-1 β . *Neurobiol Aging* 2012; 33(7):1364–78.

32. Xie Z, Tanzi RE. Alzheimer's disease and post-operative cognitive dysfunction. *Exp Gerontol* 2006; 41(4):346–59.
33. Xu Z, Dong Y, Wu X, Zhang J, McAuliffe S, Pan C et al. The potential dual effects of anesthetic isoflurane on A β -induced apoptosis. *Curr Alzheimer Res* 2011; 8(7):741–52.
34. Kodama M, Satoh Y, Otsubo Y, Araki Y, Yonamine R, Masui K et al. Neonatal desflurane exposure induces more robust neuroapoptosis than do isoflurane and sevoflurane and impairs working memory. *Anesthesiology* 2011; 115(5):979–91.
35. Tazawa K, Koutsogiannaki S, Chamberlain M, Yuki K. The effect of different anesthetics on tumor cytotoxicity by natural killer cells. *Toxicol Lett* 2017; 266:23–31.
36. Ecimovic P, McHugh B, Murray D, Doran P, Buggy DJ. Effects of sevoflurane on breast cancer cell function in vitro. *Anticancer Res* 2013; 33(10):4255–60.
37. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB3, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 1976; 36(12):4562–9.
38. Lahm H, Wyniger J, Hertig S, Yilmaz A, Fischer JR, Givel JC et al. Secretion of bioactive granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 1994; 54(14):3700–2.
39. Trainer DL, Kline T, McCabe FL, Faucette LF, Feild J, Chaikin M et al. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1988; 41(2):287–96.
40. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342(6250):705–8.
41. Weiss J, Schwechheimer K, Cavenee WK, Herlyn M, Arden KC. Mutation and expression of the p53 gene in malignant melanoma cell lines. *Int J Cancer* 1993; 54(4):693–9.
42. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV et al. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(19):7555–9.

43. Roche Life Science - Germany [cited 2016 Sep 4]. Available from: URL: <https://lifescience.roche.com/shop/home>.
44. Sack U, editor. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen. Basel [u.a.]: Karger; 2007.
45. Gregor Rothe, Stefan Barlage, Evelyn Orsy, Gerd Schmitz. Durchflusszytometrie in der klinischen Labordiagnostik. In: Thomas L, editor. Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 8.th ed. Frankfurt/Main: Th-Books-Verl.-Ges; 2012. p. 2247–59 (vol. 2).
46. Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA. Cells: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
47. van Engeland M, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 1996; 24(2):131–9.
48. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184(1):39–51.
49. Homburg CH, Haas M de, von dem Borne, A E, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 1995; 85(2):532–40.
50. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84(5):1415–20.
51. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680–5.
52. Rehm H, Letzel T. Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. 7., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2016. (Experimentator). Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-48851-5>.
53. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; 144(5):646–74.

54. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 2010; 29(41):5545–55.
55. Jiang B-H, Liu L-Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 2009; 102:19–65.
56. Ghebranious N, Donehower LA. Mouse models in tumor suppression. *Oncogene* 1998; 17(25):3385–400.
57. Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(6):a003129.
58. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(2):118–32.
59. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(3):161–74.
60. Rassow J, Duale Reihe Biochemie. *Biochemie*. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2016. (Duale Reihe).
61. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005; 6(8):611–22.
62. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1(1):72–6.
63. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801):249–57.
64. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3):353–64.
65. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* 2009; 45(11):1924–34.
66. Nagy JA, Chang S-H, Shih S-C, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36(3):321–31.
67. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15(1):102–11.

68. van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998; 31(1):1–9.
69. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007; 26(9):1324–37.
70. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* 2008; 135(7):1161–3.
71. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140(6):883–99.
72. Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchya H et al. A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 1977; 30(4):275–82.
73. Manns J, Daubrawa M, Driessen S, Paasch F, Hoffmann N, Loffler A et al. Triggering of a novel intrinsic apoptosis pathway by the kinase inhibitor staurosporine: activation of caspase-9 in the absence of Apaf-1. *FASEB J* 2011; 25(9):3250–61.
74. Waibel M, Kramer S, Lauber K, Lupescu A, Manns J, Schulze-Osthoff K et al. Mitochondria are not required for death receptor-mediated cytosolic acidification during apoptosis. *Apoptosis* 2007; 12(3):623–30.
75. Zhao L, Lu G, Zhao Q, Zhang M, Chen M, Zhang J et al. Staurosporine Induces Platelet Apoptosis Through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *Clin Lab* 2015; 61(7):717–26.
76. Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J* 1999; 18(13):3586–95.
77. Das B, Neilsen BK, Fisher KW, Gehring D, Hu Y, Volle DJ et al. A Functional Signature Ontology (FUSION) screen detects an AMPK inhibitor with selective toxicity toward human colon tumor cells. *Sci Rep* 2018; 8(1):307.
78. Kawaguchi N, Tashiro K, Taniguchi K, Kawai M, Tanaka K, Okuda J et al. Nogo-B (Reticulon-4B) functions as a negative regulator of the apoptotic pathway through

the interaction with c-FLIP in colorectal cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; 1864(8):2600–9.

79. Aktories K, Forth W, editors. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin Veterinärmedizin Pharmazie Chemie und Biologie sowie für Ärzte Tierärzte und Apotheker ; mit 305 Tabellen*. 11., überarb. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2013. (Mediscript).

80. Raza H, John A, Benedict S. Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. *Eur J Pharmacol* 2011; 668(1-2):15–24.

81. Luciani MG, Campregher C, Gasche C. Aspirin blocks proliferation in colon cells by inducing a G1 arrest and apoptosis through activation of the checkpoint kinase ATM. *Carcinogenesis* 2007; 28(10):2207–17.

82. Lai M-Y, Huang J-A, Liang Z-H, Jiang H-X, Tang G-D. Mechanisms underlying aspirin-mediated growth inhibition and apoptosis induction of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cell line SW480. *World J Gastroenterol* 2008; 14(26):4227–33.

83. Goel A, Chang DK, Ricciardiello L, Gasche C, Boland CR. A novel mechanism for aspirin-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1):383–90.

84. Dachineni R, Ai G, Kumar DR, Sadhu SS, Tummala H, Bhat GJ. Cyclin A2 and CDK2 as Novel Targets of Aspirin and Salicylic Acid: A Potential Role in Cancer Prevention. *Mol Cancer Res* 2016; 14(3):241–52.

85. Bashir A'ulJ, Kankipati CS, Jones S, Newman RM, Safrany ST, Perry CJ et al. A novel mechanism for the anticancer activity of aspirin and salicylates. *Int J Oncol* 2019.

86. Zumwalt TJ, Wodarz D, Komarova NL, Toden S, Turner J, Cardenas J et al. Aspirin-induced chemoprevention and response kinetics are enhanced by PIK3CA mutations in colorectal cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2017; 10(3):208–18.

87. Veyckemans F. Excitation and delirium during sevoflurane anesthesia in pediatric patients. *Minerva Anesthesiol* 2002; 68(5):402–5.

88. Trieschmann U. Excitation following sevoflurane: a problem in pediatric anesthesia? Comment on a paper in *Der Anaesthesist* (1999)48: 917-918. *Anaesthesist* 2000; 49(6):551-2; author reply 553-4.
89. Veyckemans F. Excitation phenomena during sevoflurane anaesthesia in children. *Curr Opin Anaesthesiol* 2001; 14(3):339–43.
90. Mückter H, Zwing M, Bäder S, Marx T, Doklea E, Liebl B et al. A novel apparatus for the exposure of cultured cells to volatile agents. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1998; 40(2):63–9.
91. Kvolik S, Glavas-Obrovac L, Bares V, Karner I. Effects of inhalation anesthetics halothane, sevoflurane, and isoflurane on human cell lines. *Life Sci* 2005; 77(19):2369–83.
92. Zaugg M, Lucchinetti E, Uecker M, Pasch T, Schaub MC. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *British Journal of Anaesthesia* 2003; 91(4):551–65.
93. Osman ES, Khafagy HF, Samhan YM, Hassan MM, El-Shanawany FM, Fathallah ARM et al. In vivo effects of different anesthetic agents on apoptosis. *Korean J Anesthesiol* 2012; 63(1):18–24.
94. Petzelt C, Taschenberger G, Schmehl W, Kox WJ. Xenon-induced inhibition of Ca²⁺-regulated transitions in the cell cycle of human endothelial cells. *Pflugers Arch* 1999; 437(5):737–44.
95. Fang F, Lin W, Ling X, Song R, Liu Q, Lai B et al. The hippocampal cyclin D1 expression is involved in postoperative cognitive dysfunction after sevoflurane exposure in aged mice. *Life Sci* 2016; 160:34–40.
96. Lin D, Feng C, Cao M, Zuo Z. Volatile anesthetics may not induce significant toxicity to human neuron-like cells. *Anesth Analg* 2011; 112(5):1194–8.
97. Deng B, Xu H, Zhang J, Wang J, Han L-C, Li L-Y et al. Neuroprotective effects of sevoflurane against electromagnetic pulse-induced brain injury through inhibition of neuronal oxidative stress and apoptosis. *PLoS One* 2014; 9(3):e91019.
98. Wise-Faberowski L, Raizada MK, Sumners C. Desflurane and sevoflurane attenuate oxygen and glucose deprivation-induced neuronal cell death. *J Neurosurg Anesthesiol* 2003; 15(3):193–9.

99. Sinner B, Becke K, Engelhard K. General anaesthetics and the developing brain: An overview. *Anaesthesia* 2014; 69(9):1009–22.
100. Song S-Y, Zhou B, Yang S-M, Liu G-Z, Tian J-M, Yue X-Q. Preventive effects of sevoflurane treatment on lung inflammation in rats. *Asian Pac J Trop Med* 2013; 6(1):53–6.
101. Rodríguez-González R, Baluja A, Veiras Del Río S, Rodríguez A, Rodríguez J, Taboada M et al. Effects of sevoflurane postconditioning on cell death, inflammation and TLR expression in human endothelial cells exposed to LPS. *J Transl Med* 2013; 11:87.
102. Torri G. Inhalation anesthetics: a review. *Minerva Anestesiol* 2010; 76(3):215–28.
103. Kvolik S, Dobrosevic B, Marczi S, Prlic L, Glavas-Obrovac L. Different apoptosis ratios and gene expressions in two human cell lines after sevoflurane anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009; 53(9):1192–9.
104. Wei G-H, Zhang J, Liao D-Q, Li Z, Yang J, Luo N-F et al. The common anesthetic, sevoflurane, induces apoptosis in A549 lung alveolar epithelial cells. *Mol Med Rep* 2014; 9(1):197–203.
105. Yang Y, Hu R, Yan J, Chen Z, Lu Y, Jiang J et al. Sevoflurane inhibits the malignant potential of head and neck squamous cell carcinoma via activating the hypoxia-inducible factor-1 α signaling pathway in vitro. *Int J Mol Med* 2018; 41(2):995–1002.
106. Liang H, Gu M-N, Yang C-X, Wang H-B, Wen X-J, Zhou Q-L. Sevoflurane inhibits proliferation, induces apoptosis, and blocks cell cycle progression of lung carcinoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12(12):3415–20.
107. Wang Q, Li K, Yao S. Effect of inhalational anesthetics on cytotoxicity and intracellular calcium differently in rat pheochromocytoma cells (PC12). *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2008; 28(1):104–9.
108. Zhou Y-F, Wang Q-X, Zhou H-Y, Chen G. Autophagy activation prevents sevoflurane-induced neurotoxicity in H4 human neuroglioma cells. *Acta Pharmacol Sin* 2016; 37(5):580–8.

109. Buckley A, McQuaid S, Johnson P, Buggy DJ. Effect of anaesthetic technique on the natural killer cell anti-tumour activity of serum from women undergoing breast cancer surgery: a pilot study. *British Journal of Anaesthesia* 2014; 113 Suppl 1:i56-62.
110. Lim J-A, Oh C-S, Yoon T-G, Lee JY, Lee S-H, Yoo Y-B et al. The effect of propofol and sevoflurane on cancer cell, natural killer cell, and cytotoxic T lymphocyte function in patients undergoing breast cancer surgery: An in vitro analysis. *BMC Cancer* 2018; 18(1):159.
111. Muller-Edenborn B, Roth-Z'graggen B, Bartnicka K, Borgeat A, Hoos A, Borsig L et al. Volatile anesthetics reduce invasion of colorectal cancer cells through down-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Anesthesiology* 2012; 117(2):293–301.
112. Liang H, Wang HB, Liu HZ, Wen XJ, Zhou QL, Yang CX. The effects of combined treatment with sevoflurane and cisplatin on growth and invasion of human adenocarcinoma cell line A549. *Biomed Pharmacother* 2013; 67(6):503–9.
113. Yi W, Li D, Guo Y, Zhang Y, Huang B, Li X. Sevoflurane inhibits the migration and invasion of glioma cells by upregulating microRNA-637. *Int J Mol Med* 2016; 38(6):1857–63.
114. Liang H, Yang CX, Zhang B, Wang HB, Liu HZ, Lai XH et al. Sevoflurane suppresses hypoxia-induced growth and metastasis of lung cancer cells via inhibiting hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Anesth* 2015; 29(6):821–30.
115. Iwasaki M, Zhao H, Jaffer T, Unwith S, Benzonana L, Lian Q et al. Volatile anaesthetics enhance the metastasis related cellular signalling including CXCR2 of ovarian cancer cells. *Oncotarget* 2016.
116. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803(1):39–54.
117. O'Leary G, Bacon CL, Odumeru O, Fagan C, Fitzpatrick T, Gallagher HC et al. Antiproliferative actions of inhalational anesthetics: comparisons to the valproate teratogen. *Int J Dev Neurosci* 2000; 18(1):39–45.

118. Sakamoto A, Imai J-I, Nishikawa A, Honma R, Ito E, Yanagisawa Y et al. Influence of inhalation anesthesia assessed by comprehensive gene expression profiling. *Gene* 2005; 356:39–48.
119. Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* 2007; 195(2):187–98.
120. Czeisler CA, Klerman EB. Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans. *Recent Prog Horm Res* 1999; 54:97-130; discussion 130-2.
121. Moore RY, Speh JC, Leak RK. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 2002; 309(1):89–98.
122. Kobayashi K, Takemori K, Sakamoto A. Circadian gene expression is suppressed during sevoflurane anesthesia and the suppression persists after awakening. *Brain Res* 2007; 1185:1–7.
123. Roesslein M, Frick M, Auwaerter V, Humar M, Goebel U, Schwer C et al. Sevoflurane-mediated activation of p38-mitogen-activated stresskinase is independent of apoptosis in Jurkat T-cells. *Anesth Analg* 2008; 106(4):1150-60, table of contents.
124. Loop T, Dovi-Akue D, Frick M, Roesslein M, Egger L, Humar M et al. Volatile anesthetics induce caspase-dependent, mitochondria-mediated apoptosis in human T lymphocytes in vitro. *Anesthesiology* 2005; 102(6):1147–57.
125. Schallner N, Ulbrich F, Engelstaedter H, Biermann J, Auwaerter V, Loop T et al. Isoflurane but not sevoflurane or desflurane aggravates injury to neurons in vitro and in vivo via p75NTR-NF- κ B activation. *Anesth Analg* 2014; 119(6):1429–41.
126. Zhang Y, Dong Y, Wu X, Lu Y, Xu Z, Knapp A et al. The mitochondrial pathway of anesthetic isoflurane-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2010; 285(6):4025–37.
127. Muller-Edenborn B, Frick R, Piegeler T, Schlapfer M, Roth-Z'graggen B, Schlicker A et al. Volatile anaesthetics reduce neutrophil inflammatory response by interfering with CXCR2 signalling. *British Journal of Anaesthesia* 2015; 114(1):143–9.

128. Boost KA, Hofstetter C, Flondor M, Betz C, Homann M, Pfeilschifter J et al. Desflurane differentially affects the release of proinflammatory cytokines in plasma and bronchoalveolar fluid of endotoxemic rats. *Int J Mol Med* 2006; 17(6):1139–44.
129. Dong Y, Zhang G, Zhang B, Moir RD, Xia W, Marcantonio ER et al. The common inhalational anesthetic sevoflurane induces apoptosis and increases beta-amyloid protein levels. *Arch Neurol* 2009; 66(5):620–31.
130. Jia Z, Geng L, Xie G, Chu Q, Zhang W. Sevoflurane impairs acquisition learning and memory function in transgenic mice model of Alzheimer's disease by induction of hippocampal neuron apoptosis. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(9):15490–7.
131. Jaura AI, Flood G, Gallagher HC, Buggy DJ. Differential effects of serum from patients administered distinct anaesthetic techniques on apoptosis in breast cancer cells in vitro: a pilot study. *British Journal of Anaesthesia* 2014; 113 Suppl 1:i63-7.
132. Brozovic G, Orsolich N, Knezevic F, Horvat Knezevic A, Benkovic V, Sakic K et al. Genotoxicity and cytotoxicity of cisplatin treatment combined with anaesthetics on EAT cells in vivo. *Onkologie* 2009; 32(6):337–43.
133. Kim R. Effects of surgery and anesthetic choice on immunosuppression and cancer recurrence. *J Transl Med* 2018; 16.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel bei Anticancer research publiziert:

ANIKA C. BUNDSCHERER* , VIKTORIA ULLRICH* , MANUELA MALSY, MICHAEL A. GRUBER, BERNHARD M. GRAF, GERO BROCKHOFF, and BARBARA SINNER
Effects of Volatile Anesthetics on Proliferation and Viability of SW480 Colon Cancer Cells In Vitro.

Anticancer Res November 2019 39 (11) 6049-6055; doi:10.21873/anticancer.13811

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. med Anika Bundscherer, für die Überlassung des Themas, die motivierenden Gespräche und die sehr gute wissenschaftliche Betreuung. Frau Priv. Doz. Dr. med Bundscherer hatte stets ein offenes Ohr für mich.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernhard Graf für die Möglichkeit, die Dissertation an seiner Klinik zu erstellen. Für wertvolle Tipps geht mein Dank an Herrn Dr. Michael Gruber, der mir im Labor großzügig Gastrecht gewährte. Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Anästhesielabors, insbesondere Frau Sigrid Bamberger, für die methodische Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Manuela Malsy für die Beratung bei der Durchführung der Western Blot Analysen bedanken.

Außerdem danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff für seine Beratung und die Bereitstellung der Zellzyklus-Auswertungssoftware.

Meinem Vater Prof. Dr. med. Dieter Hausmann danke ich für die Ratschläge zum Erstellen einer wissenschaftlichen Arbeit und das aufmerksame Korrekturlesen.

Bei meinem Ehemann Niklas Ullrich möchte ich mich für seinen geduldigen Zuspruch und seine liebevolle Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Viktoria Patrizia Ullrich, geborene Hausmann
Geburtsdatum: 26.11.1993
Geburtsort: Bonn

Schulische Ausbildung

2000 – 2004 Grundschule St. Johannis, Bayreuth
2004 – 2012 Graf-Münster-Gymnasium, Bayreuth (Abitur im Juni 2012)

Studium

seit WS 2012/13 Humanmedizin an der Universität Regensburg
September 2014 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Oktober 2017 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
22. November 2018 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

seit 02.01.2019 Assistenzärztin an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Klinik St. Hedwig, Barmherzige Brüder Regensburg

Posterpräsentationen

Hausmann V, Malsy M, Graf B, Sinner B, Bundscherer A: Interaktion volatiler Anästhetika mit Tumorzellen *in vitro*: Hat Desfluran Einfluss auf die Apoptose von Kolonkarzinomzellen?

Deutscher Anästhesie Congress 2017, PO 3.1.11,
Nürnberg 03.-05.05.2017

Bundscherer B, Hausmann V, Malsy M, Graf B, Sinner B: Effekt von Sevofluran auf die Apoptoserate von SW480 Kolonkarzinomzellen *in vitro*

Deutscher Anästhesie Congress 2017, PO 2.1.11;
Nürnberg 03.-05.05.2017

Interessen

seit 2006 Klavierspielen, Saxophonistin im Blasorchester Bayreuth
seit 2013 Schauspiel und Regieführung
Theaterverein Theatraubling e.V. Neutraubling