

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ANÄSTHESIOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. BERNHARD M. GRAF, MSC.
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

DER EINFLUSS EXTRAZELLULÄREER MATRIX AUF DIE FUNKTIONALITÄT
NEUTROPHILER GRANULOZYTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Richard Felix Kraus

2021

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ANÄSTHESIOLOGIE*
DIREKTOR: PROF. DR. BERNHARD M. GRAF, MSC.
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DER EINFLUSS EXTRAZELLULÄREER MATRIX AUF DIE FUNKTIONALITÄT
NEUTROPHILER GRANULOZYTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Richard Felix Kraus

aus
Furth im Wald

2021

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. Martin Kieninger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Martin Proescholdt

Tag der mündlichen Prüfung:

11. November 2021

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in Immunity, Inflammation and Disease:

Kraus RF, Gruber MA, Kieninger M. The influence of extracellular tissue on neutrophil function and its possible linkage to inflammatory diseases. *Immun. Inflamm. Dis.* 2021; 9: S. 1237-1251.

Für
meine liebe Familie

„Wenn demnach auch das Gros der Leukocyten keine durch saure oder basische Farben darstellbare Körnung enthielt, so [...] konnte es sich, da saure und basische ungeeignet waren, nur um neutrale Pigmente handeln.“

Paul Ehrlich*

*Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten, in: *Zeitschrift für klinische Medicin* (erster Band), Verlag von August Hirschwald, Berlin **1880**, Seite 557

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	<i>Das menschliche Immunsystem</i>	10
1.1.1	Die Rolle von neutrophilen Granulozyten innerhalb der unspezifischen Immunabwehr	11
1.1.1.1	Der Prozess der Extravasation	13
1.1.1.2	Migration im Interstitium des Zielgewebes	14
1.1.2	Chemotaktische Lenkung und Beeinflussung von Neutrophilen	15
1.1.3	Neutrophile Immuneffekte am Wirkort	16
1.1.4	Importanz einer ausgewogenen Immunreaktion von Neutrophilen	17
1.2	<i>Aktuelle Forschungs- und Problemlage</i>	17
1.2.1	Ausbildung von Chemotaxisgradienten in Wechselwirkung mit extrazellulärer Matrix	18
1.2.2	Kenntnisse und Kontroversen des Einflusses von extrazellulärer Matrix auf Funktionen von Neutrophilen in der Fachliteratur von 1997 bis 2021	19
1.2.3	Allgemeine Aspekte von Chemotaxisexperimenten mit Granulozyten	21
1.3	<i>Wissenschaftliche Fragestellung</i>	22
1.4	<i>Auswahl der extrazellulären Matrices</i>	23
1.5	<i>Projektplan</i>	24
2	Material und Methoden	26
2.1	<i>Votum der Ethikkommission</i>	26
2.2	<i>Vorversuche zur Herstellung und Verwendung geeigneter dreidimensionaler Gelmatrices</i>	26
2.2.1	Kollagen I	26
2.2.2	Kollagen II	27
2.2.3	Kollagen III	29
2.2.4	Agarose	31
2.2.5	Low-Melting-Agarose	32
2.2.6	Fibrin	33
2.2.7	Überprüfung der Integrität der Matrices mittels Hämatoxylin-Färbelösung	35
2.3	<i>Versuchsaufbau der Funktionalitätsprüfung neutrophiler Granulozyten</i>	35
2.3.1	Probengewinnung und Isolierung neutrophiler Granulozyten	35
2.3.2	Färbemethoden zur Sichtbarmachung granulozytenspezifischer Immuneffekte	37
2.3.3	Aufbau und Vorbereitung der Chemotaxis-Kammern	38
2.3.4	Mikroskopische Betrachtung („live cell imaging“)	39

2.4	Vorgehensweise zur Auswertung des „live cell imaging“	41
2.4.1	Grundsätze der Auswertung durch die Software Imaris®	42
2.4.1.1	Auswertung der Migration	42
2.4.1.2	Auswertung der granulozytenspezifischen Immuneffekte	44
2.4.2	Weiterführende Auswertungen mit den Kalkulationsprogrammen Certara Phoenix® und Microsoft Excel®	44
2.4.2.1	Weitere Verarbeitung der Datensätze der ROS-Produktion.....	45
2.4.2.2	Weitere Verarbeitung der Datensätze von NETosis und MPO-Freisetzung	46
2.4.3	Normierung auf Zeitpunkt des Gelkontaktes als gemeinsamen Referenzpunkt.....	47
2.4.4	Statistik.....	48
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Ergebnisse der Vorversuche	49
3.1.1	Ergebnisse der Modifikation von Matrices aus Kollagen I	49
3.1.2	Ergebnisse der Modifikation von Matrices aus Kollagen II	49
3.1.2.1	Erste Vorversuchsreihe Kollagen II	49
3.1.2.2	Zweite Vorversuchsreihe Kollagen II.....	50
3.1.2.3	Dritte Vorversuchsreihe Kollagen II	50
3.1.2.4	Vierte Vorversuchsreihe Kollagen II.....	50
3.1.3	Ergebnisse der Modifikation von Matrices aus Kollagen III	51
3.1.3.1	Erste Vorversuchsreihe Kollagen III	51
3.1.3.2	Zweite Vorversuchsreihe Kollagen III.....	51
3.1.3.3	Dritte Vorversuchsreihe Kollagen III	51
3.1.3.4	Vierte Vorversuchsreihe Kollagen III.....	51
3.1.4	Ergebnisse der Modifikation von Matrices aus Agarose	52
3.1.5	Ergebnisse der Modifikation von Matrices aus Low-Melting-Agarose.....	52
3.1.6	Ergebnisse der Modifikation von Matrices aus Fibrin	53
3.1.7	Ergebnisse der Integritätsprüfung der Gelmatrices	53
3.1.8	Zusammenfassung der zur Funktionalitätsprüfung der neutrophilen Granulozyten verwendeten extrazellulären Gelmatrices	54
3.2	Ergebnisse der Funktionalitätsprüfung der neutrophilen Granulozyten.....	54
3.2.1	Ergebnisse Migration	54
3.2.1.1	Ergebnisüberblick über die Migrationsstrecken	55
3.2.1.2	Ergebnisse Migrationslängen Abschnitt „0-30“	57
3.2.1.3	Ergebnisse Migrationslängen Abschnitt „31-60“	58
3.2.1.4	Ergebnisse Migrationslängen Abschnitt „61-90“	59
3.2.1.5	Ergebnisse Auswertung TrackDisplacementLength	60
3.2.1.6	Ergebnisse Auswertung TrackStraightness	61

3.2.1.7	Ergebnisse Auswertung TrackSpeedMean	62
3.2.1.8	Ergebnisse Auswertung TrackDisplacement in x- und y-Richtung.....	63
3.2.2	Ergebnisse Immuneffekte	65
3.2.2.1	Übersicht Ergebnisse der Immuneffekte	66
3.2.2.2	Ergebnisse ROS-Produktion	67
3.2.2.3	Ergebnisse MPO-Freisetzung.....	68
3.2.2.4	Ergebnisse NETosis	69
3.2.3	Ergebnisse verschiedener Korrekturzeitpunkte am Beispiel T_{\max} ROS in Kollagen I	70
4	Diskussion	70
4.1	<i>Gelherstellungs- und Anwendungsmethoden der Vorversuchsreihen</i>	<i>71</i>
4.1.1	Grundsätze der Matrix-Methodenentwicklung	71
4.1.1.1	Kollagen I	73
4.1.1.2	Kollagen II	73
4.1.1.3	Kollagen III	74
4.1.1.4	Agarose	75
4.1.1.5	Low-Melting-Agarose	75
4.1.1.6	Fibrin.....	76
4.1.2	Limitierungen der entwickelten Matrices	76
4.1.2.1	Limitierung durch die Anpassung der Aushärtungszeit	76
4.1.2.2	Limitierung durch die pH-Werteinstellung.....	77
4.1.2.3	Limitierung durch einen zeitversetzten Kontakt zu fMLP.....	77
4.2	<i>Funktionalitätsprüfung neutrophiler Granulozyten</i>	<i>77</i>
4.2.1	Ergebnisse Funktionalitätsprüfung der neutrophilen Granulozyten.....	78
4.2.1.1	Ausbildung eines Chemokingradienten	78
4.2.1.2	Übersicht über den Migrationsverlauf	78
4.2.1.3	Migrationslängen in den einzelnen Abschnitten	79
4.2.1.4	Richtung, Geschwindigkeit und Zielgerichtetheit der Migration.....	81
4.2.1.5	Abfolge der Immuneffekte	82
4.2.1.6	ROS-Produktion	83
4.2.1.7	MPO-Freisetzung	83
4.2.1.8	NETosis.....	84
4.2.1.9	Kollagen I als Referenzgel	85
4.2.2	Besonderheiten und Limitierungen des In-vitro-Untersuchungsmodells	85
4.2.2.1	Gewinnungs- und Isolierungsmethoden neutrophiler Granulozyten.....	86
4.2.2.2	Anpassung der Temperatur- und Umgebungsbedingungen	86
4.2.2.3	Vorteile und Limitierungen des In-vitro-Untersuchungssystems	86
4.2.2.4	Determinierung der Auswertungskriterien	87

4.2.2.5	Wahl des allgemeinen Referenzzeitpunktes.....	87
4.2.3	Assoziation der gesteigerten Aktivierung von Neutrophilen in Kollagen III mit inflammatorischen Erkrankungen	87
4.2.3.1	Pyoderma Gangränosum	88
4.2.3.2	Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS)	88
4.2.3.3	Fazit der Assoziationsbeobachtungen	89
4.3	<i>Zusammenfassende Bewertung</i>	89
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	93
7	Anhang.....	104
7.1	<i>Details und nähere Informationen zu verwendeten Materialien und Geräten</i>	<i>104</i>
7.2	<i>Abkürzungsverzeichnis.....</i>	<i>107</i>
7.3	<i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>108</i>
7.4	<i>Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>110</i>
7.5	<i>Ärztlicher Aufklärungsbogen, Einwilligungserklärung zur Studienteilnahme und Datenschutzerklärung.....</i>	<i>111</i>
8	Danksagung	113
9	Lebenslauf.....	115
10	Erklärung zum Promotionsverfahren	117

1 Einleitung

1.1 Das menschliche Immunsystem

Der Mensch ist ständigen Gefahren der Umwelt ausgesetzt. Zu diesen Gefahren zählen insbesondere infektiöse Erreger, die dem menschlichen Organismus schaden. Zur Abwehr von Pathogenen entwickelten sich deshalb im Laufe der Evolution eine Vielzahl an Mechanismen, Effektorzellen und Effektormolekülen zum Schutze des Menschen. Diese bezeichnen wir als unser Immunsystem [1].

Das menschliche Immunsystem wird unterteilt in das angeborene (unspezifische) und das erworbene (spezifische) Immunsystem. Während im angeborenen Immunsystem im wesentlichen Makrophagen, Dendritische Zellen, Mastzellen und Granulozyten eine schnelle Immunantwort vermitteln, bewirken im erworbenen Immunsystem B- und T-Lymphozyten eine verzögerte, jedoch sehr effiziente Eradikation von Erregern [2]. Durch ein gutes Zusammenspiel aller Teile des Immunsystems kann eine ganzheitliche Immunoffensive, welche unabdingbar für den effizienten Schutz des Körpers ist, gestartet und aufgebaut werden [1].

Die Aufgaben des Immunsystems nur auf die Verteidigung gegen Erreger zu beschränken, würde dem derzeitigen Wissen jedoch nicht gerecht werden, da auch ohne Vorliegen einer Infektion Bestandteilen des Immunsystems eine entscheidende Rolle in wichtigen physiologischen Abläufen des Körpers zugeschrieben wird. Es wird angenommen, dass der inflammatorische Zustand von Geweben entscheidend zu deren Erhaltung und Instandsetzung beiträgt [3].

Nach heutigem Verständnis und Wissensstand ist das Immunsystem eine „allumfassende Maschinerie“ zur Sicherstellung der Integrität des menschlichen Organismus [3].

Diese Forschungsarbeit befasst sich mit der Funktionalität von neutrophilen Granulozyten in extrazellulärer Matrix (EZM). Um die Forschungsthematik dieser Arbeit in den Kontext aktueller Forschungserkenntnisse einzuordnen, werden im Folgenden die Eigenschaften und Funktionen neutrophiler Granulozyten innerhalb der angeborenen Immunabwehr näher beschrieben.

1.1.1 Die Rolle von neutrophilen Granulozyten innerhalb der unspezifischen Immunabwehr

Ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind die Granulozyten. Anhand von histologischen, morphologischen und immunologischen Eigenschaften unterscheidet man drei Arten: Eosinophile, Basophile und Neutrophile. Jede der drei Granulozytenarten reift im Knochenmark und jede von ihnen hat nach Ausreifung eine Lebensdauer von nur wenigen Tagen [1].

Die neutrophilen Granulozyten (polymorphnukleäre Zellen; PMNs) stellen mit 50-70% aller zirkulierenden Leukozyten den mobilsten und zahlenmäßig größten zellulären Bestandteil des angeborenen Immunsystems des menschlichen Körpers. Sie bilden eine bedeutende erste Verteidigungslinie innerhalb der angeborenen Immunantwort [4, 5].

Neutrophile haben einen Durchmesser von 10 - 12 μm und ihr Zellkern besteht meist aus 3 - 4 Segmenten. Deshalb werden sie auch „polymorphnukleär“ genannt. Ihre Granula sind sehr klein ($<1\mu\text{m}$) und zeigen sich in der Pappenheim-Färbung blass rosa bis fliederfarben (siehe Abbildung 1) [6].

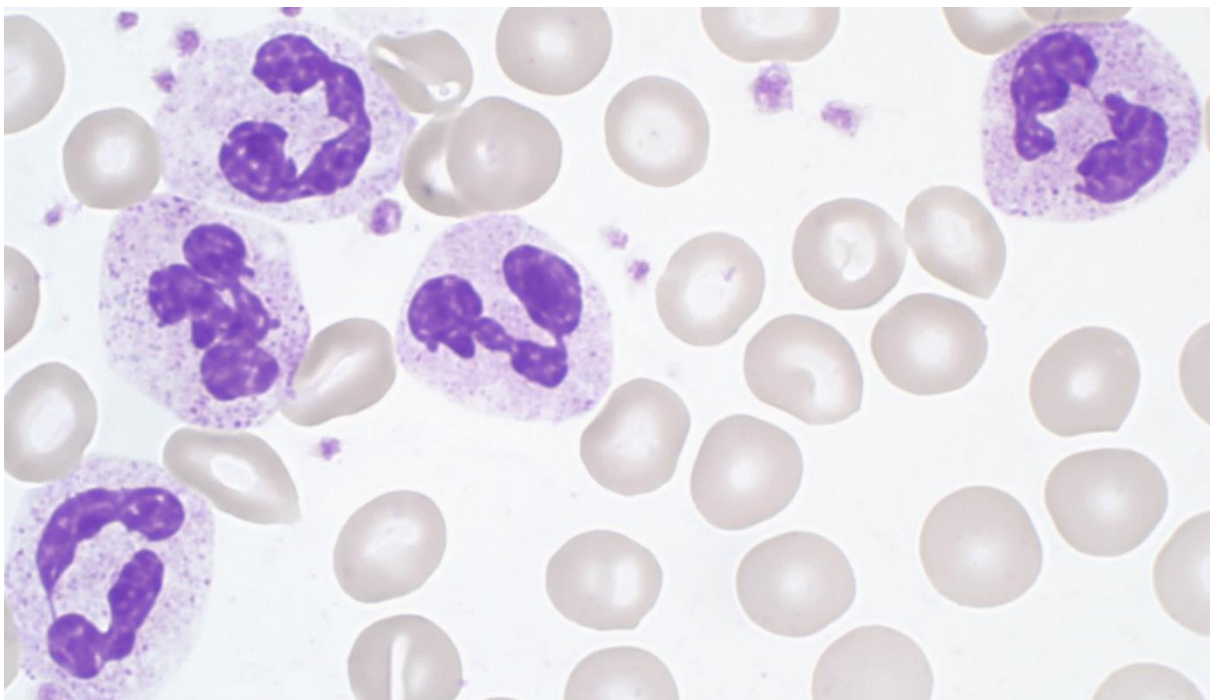


Abbildung 1 [7]: Segmentkernige neutrophile Granulozyten neben Erythrozyten und Thrombozyten im Blutausschlag in der Pappenheim-Färbung

Jeden Tag werden circa 10^{11} PMNs im Knochenmark gebildet und ans Blut abgegeben. Nach ihrer Freisetzung aus dem Knochenmark kreisen PMNs unter physiologischen Bedingungen weniger als 24 Stunden im Blutstrom. Die kurze Lebensdauer und die hohe Produktion von PMNs erfordern eine gleichwertige Beseitigung von PMNs aus der Zirkulation, um die Homöostase aufrechtzuerhalten [8]. Daher unterzieht sich ein gewisser Teil der zirkulierenden PMNs einer konstitutiven Apoptose. Die apoptotischen PMNs werden im Knochenmark, in der Leber und in der Milz aussortiert und anschließend durch Efferozytose beseitigt [9, 10].

Neben den im Blut zirkulierenden PMNs (Zirkulierender Pool) existieren zwei Reservoirire, an denen PMNs ruhen und auf Abruf freigesetzt werden können. Zum einen gibt es im Knochenmark eine Reserve von fast reifen (stabkernigen) und reifen PMNs, die noch durch die lebenserhaltenden Zytokine des Knochenmarks dort zurückgehalten werden (Knochenmarkspool). Zum anderen gibt es PMNs, die sich intravaskulär nicht im Hauptblutstrom befinden, sondern dem Endothel venöser Blutgefäße lose anliegen (Marginaler Pool). Man erklärt sich die Entstehung eines solchen Marginalen Pools durch einen prolongierten Übertritt der PMNs ins Interstitium bestimmter Organe. So findet man diese Marginalen Pools in der Leber, der Milz, dem Knochenmark und, wie derzeit diskutiert wird, auch in der Lunge [6, 11].

In aktuellen Lehrbüchern, unter anderem in Janeway's Immunobiology, trifft man bis zum heutigen Zeitpunkt auf die Lehrmeinung, dass im Gegensatz zu anderen phagozytierenden Zellen PMNs nicht im gesunden Gewebe zu finden seien [12]. Neuere Untersuchungen (reviewed u.a. von Summers et al. und Kolaczkowska et al. [5, 11]) jedoch ergaben, dass man auch physiologisch PMNs im Interstitium der gleichen Organe, in denen die Marginalen Pools beobachtet werden, findet, so in Leber, Milz, Knochenmark und Lunge. Trotzdem bleibt die Frage, wie und warum PMNs physiologisch in diesen Geweben konzentriert werden, unbeantwortet. Es wäre möglich, dass diese Organe weitere Reservoirire für PMNs sind, die im Akutfall schnell PMNs bereitstellen können. Es wäre auch denkbar, dass die organ-marginalisierten PMNs durch die gerade erwähnten Organe „patrouillieren“ und nach Gewebeschäden oder Mikroorganismen „Ausschau halten“. Die Frage, warum PMNs in gesunden Geweben vorkommen, ist derzeit noch nicht vollständig beantwortbar [5].

Abgesehen von dem nicht vollständig geklärten Vorkommen der PMNs in physiologischem Gewebe, wandern PMNs in Folge von Infektionen oder von sterilen Gewebeschädigungen, aus dem peripheren Blut sehr schnell in periphere Gewebe ein, um dort eine Läsion zu bekämpfen [13]. Im Rahmen einer akuten Inflammationsreaktion wird dann die

Granulopoiese im Knochenmark gesteigert und es wird eine große Zahl an PMNs sehr schnell am Infektort beziehungsweise Läsionsort gesammelt [4].

Die Inflammationsreaktion wird durch inflammatorische Mediatoren vermittelt. Diese werden von im Gewebe befindenden sensitiven Leukozyten, wie Makrophagen, dendritischen Zellen oder Mastzellen freigesetzt, wenn diese ein Pathogen erkennen oder eine Störung der Gewebemöostase feststellen [5, 13].

Im speziellen Fall der PMNs koordinieren die durch die sensitiven Leukozyten freigesetzten Mediatoren Leukotrien B₄, aktivierter Komplementfaktor C5 (C5a) und das Interleukin C-X-C-motif-chemokine-ligand-8 (CXCL8, früher auch als Interleukin-8 bezeichnet) einerseits die Mobilisierung aus dem Knochenmark in die Blutbahn. Andererseits werden die PMNs durch diese Mediatoren mittels chemotaktischer Gradienten zum Läsionsort geleitet (siehe Punkt 1.1.2) und schließlich dazu veranlasst, das Blut zu verlassen und ins umgebende Gewebe zu migrieren. Dieser Prozess wird als Extravasation bezeichnet [14, 15].

1.1.1.1 Der Prozess der Extravasation

Die Rekrutierung von PMNs aus dem Blutstrom erfordert eine Adhäsion an und eine anschließende Transmigration durch Gefäßwände [16].

Die Initialaktion der PMN-Extravasation ist die Aktivierung und Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen (P- und E-Selektine) im Endothel, das sich in unmittelbarer Nähe zu einem inflammatorischen Gewebe befindet [5, 13]. Einmal auf der Endotheloberfläche vorhanden, binden die Selektine an Adhäsionsliganden auf den PMNs. Dies führt dazu, dass im Blutstrom frei fließende PMNs an die Endotheloberfläche angeheftet werden. Diese erste Interaktion kann die Zellen jedoch nicht gegen die Scherkräfte des Blutflusses verankern. In der Folge „rollen“ die Zellen durch reversible Bindungen entlang des Endothels, indem zwischen dem Endothel und den Zellen ständig Kontakt hergestellt und wieder unterbrochen wird [14, 15].

Danach lagern sich PMN-Attraktanzien, die auf der apikalen Endothelmembran abgesondert werden (Details siehe Punkt 1.1.3) an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf den „rollenden“ Granulozyten an [15]. Dadurch wird den PMNs ein sogenanntes „inside-out-Signal“ vermittelt, welches Konformationsänderungen von PMN-Oberflächenproteinen, den sogenannten β 2-Integrinen, bewirkt [5].

Prinzipiell binden β 2-Integrine ihre Liganden (interzelluläre Adhäsionsmoleküle; ICAM-1 und ICAM-2) auf der Endotheloberfläche nur schwach. Durch die Integrin-Konformationsänderung wird diese Bindung jedoch sehr fest, was ein Ende des „Rollens“ und ein festes Anhaften der PMNs am Endothel („Arrest“) zur Folge hat [5, 14]. Feste Wechselwirkungen von β 2-Integrinen mit ICAM-1 ermöglichen den PMNs im weiteren Verlauf, aktiv - unter den Scherbedingungen des Blutstroms - entlang des Endothels zu geeigneten Endotheldurchtrittsstellen zu „kriechen“ („Crawling“) [5, 17].

Geeignete Stellen zur Durchquerung des Endothels finden die PMNs an Zell-Zell-Verbindungen zwischen den Endothelzellen. Bindungen von β 2-Integrinen an ICAM-1 und ICAM-2 und dem Vascular-cell-adhesion-protein-1 (VCAM-1) erlauben es den PMNs schließlich, sich zwischen den Endothelzellen hindurch zu drängen (parazelluläre Transmigration) [5, 14].

Haben die PMNs das Ende der Endothelzellschicht erreicht, müssen sie die endotheliale Basalmembran überwinden. Diese Passage wird als Diapedese bezeichnet [14]. PMNs besitzen spezifische Proteasen, die enzymatische Aktivität gegen EZM-Proteine der Basalmembran aufweisen. Derzeit geht man davon aus, dass PMNs mit Hilfe der Proteasen bevorzugt durch Bereiche der Basalmembran wandern, die einen niedrigen Gehalt an EZM-Molekülen aufweisen [5].

Nach Überwindung der Basalmembran migrieren die PMNs anschließend durch die sogenannte Perizytenregion, ehe sie das Interstitium erreichen. Perizyten bilden durch Umwicklung von Endothelzellen eine Schnittstelle zwischen dem zirkulierenden Blut und dem Interstitialraum. Interessanterweise überlappen sich Lücken von Perizytenregionen mit Regionen, die eine geringere Dichte der Basalmembran aufweisen. Daher wird angenommen, dass PMNs bei der Extravasation den Weg des geringsten Widerstands für die Auswanderung ins Interstitium wählen [5].

1.1.1.2 Migration im Interstitium des Zielgewebes

Haben die PMNs die transendotheliale Migration abgeschlossen, erreichen sie ihr Zielgewebe. Dort angekommen, wandern die PMNs entlang eines Chemokingradienten (siehe Punkt 1.1.3) durch das inflammatorische Interstitium, um zu ihrem endgültigen Zielort zu gelangen [18]. Je nach Lokalisation der Schädigung können PMNs hier auf sehr unterschiedliches Gewebe, wie ein fibrilläres Netzwerk oder eine zellreiche Umgebung eines Organparenchyms oder lymphatischen Gewebes, treffen [19]. Um durch die verschiedenartigen Gewebe migrieren zu

können, benutzen die PMNs bevorzugt die amöboide Fortbewegungsart. Diese ist durch eine gleitende und schnelle Migration charakterisiert [20].

Bei der amöboiden Fortbewegung müssen zytoskelettale Kräfte auf die Extrazellulärmatrix übertragen werden. Diese Übertragung kann integrin-vermittelt durch schwache Wechselwirkung von Adhäsionsmolekülen stattfinden, wobei im Gegensatz zur dominanten Beteiligung von $\beta 2$ -Integrinen bei der Extravasation der interstitielle Migrationsprozess vor allem mit der Aktivierung von $\beta 1$ -Integrinen assoziiert zu sein scheint [21, 22].

Darüber hinaus beschrieben Nourshargh et al., dass, wenn Integrin-Rezeptoren fehlen oder nicht an das Substrat binden können, PMNs auch physikalisch mit der extrazellulären Umgebung interagieren könnten und dadurch eine Kraftübertragung erzielt würde. Sie postulierten, dass die Möglichkeit beider Fortbewegungsarten, also sowohl die Integrin-abhängige, als auch Integrin-unabhängige Fortbewegung, die PMNs befähigt, eine große Vielzahl an verschiedenen interstitiellen Geweben zu durchwandern [19].

Resümierend fassten Friedl et al. die Zellmigration innerhalb interstitiellen Gewebes als einen komplexen mechanochemischen Prozess zusammen, der ein Zusammenspiel von Schlüsselvorgängen der Signal-, Zytoskelett-, Membran- und Adhäsionssysteme erfordert [23].

1.1.2 Chemotaktische Lenkung und Beeinflussung von Neutrophilen

Um ihre Funktion adäquat ausüben zu können, müssen PMNs zielgerichtet aus den Reservoirs, durch das Gefäßsystem zum Läsionsort, dem betroffenen Gewebe, gelenkt werden [15]. PMNs können hierfür extrazelluläre chemotaktische Konzentrationsgradienten erkennen und sich anhand der Gradienten gerichtet auf höhere Konzentrationen zubewegen. Dieser Prozess wird als Chemotaxis bezeichnet [24, 25].

PMNs besitzen Rezeptoren für Chemokine und Chemoattraktanzien, wie die im Zuge einer Inflammationsantwort freigesetzten endogenen Moleküle C5a, CXCL8, Leukotrien B4 (LTB4), aber auch für exogene Moleküle, wie das von Bakterien freigesetzte Peptid N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP). Ein von Heit et al. entwickeltes Modell einer schrittweisen Migration beschreibt eine Priorisierung chemotaktischer Signale. Demnach unterscheiden PMNs durch deutlich unterschiedliche intrazelluläre Signalwege "intermediäre" (LTB4, CXCL8) von "end-target" Chemoattraktanzien (fMLP, C5a). Die PMNs sind dadurch in der Lage, eine "Ablenkung" in einem komplexen Umfeld von

Chemoattraktanzien zu vermeiden und sich zielgerichtet auf den Ort der Läsion zu zubewegen [26].

1.1.3 Neutrophile Immuneffekte am Wirkort

Am Wirkort angelangt, nutzen PMNs neben der Phagozytose von Erregern zusätzlich zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen zur Abwehr von Infektionserregern: sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Mechanismen [27, 28].

Ein wichtiger sauerstoffabhängiger Mechanismus ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species; ROS) [27]. Im Rahmen der sogenannten „Respiratory Burst Reaktion“ zeigen phagozytierende PMNs einen starken Anstieg ihres Sauerstoffverbrauchs, der durch die NADPH-abhängige Produktion von Superoxidanionen (O_2^-) verursacht wird. Superoxidanionen sind der Auslöser, der zur Bildung von ROS führt, d.h. zur Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikal ($OH\bullet$) und hypochlorige Säure (HOCl). Diese tragen zur Zerstörung von Bakterien bei [29, 30].

Bei sauerstoffunabhängigen Mechanismen ist die Degranulation der histologisch sichtbaren Granula von Bedeutung. Durch diese Degranulation werden lytische Enzyme und bakterizide Peptide freigesetzt [28]. Ein bedeutsames Enzym, das durch die Degranulation freigesetzt wird, ist die Myeloperoxidase (MPO). MPO katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Chlorid-Anionen (Cl^-) die Bildung von reaktiven Sauerstoffzwischenprodukten einschließlich hypochloriger Säure (HOCl). HOCl zerstört Zellmembranen und Zellwände und wirkt als lokaler Vermittler von Gewebeschäden [31].

Im Jahr 2004 wurde von Brinkmann et al. eine weitere bis dahin unbekannte Fähigkeit der PMNs beschrieben [32]. Am Ende eines zytolytischen Prozesses wird der Zellkern von PMNs als netzartige DNA-Struktur in den extrazellulären Raum freigesetzt. Diese sogenannten neutrophil extracellular traps (NETs) besitzen auf ihrer Oberfläche Histone und kationische Peptide [28, 32]. Einmal freigesetzt, lagern sie sich an Bakterien, aber auch an Pilzen an, wodurch diese immobilisiert und letztendlich abgetötet werden [33]. Das Phänomen der NET-Freisetzung tritt vor allem an Inflammationsherden auf und wird als NETosis bezeichnet [32].

In Wundarealen entfernen PMNs darüber hinaus totes Gewebe durch Phagozytose und bereiten die Wunde dadurch auf neue Gewebekonstruktion und –ablagerung vor [34].

Zellmigration, Phagozytose, Oxidative Burst, Degranulation und NETosis sind funktionelle Reaktionen von elementarem Stellenwert, die es PMNs ermöglichen, ihre Aufgaben in der Immunabwehr zu erfüllen [35].

1.1.4 Wichtigkeit einer ausgeglichenen Immunreaktion von Neutrophilen

Wie wichtig eine funktionierende PMN-Immunantwort ist, sieht man vor allem an den schwerwiegenden Erkrankungsverläufen, bei denen eine gestörte PMN-Immunantwort zu lebensbedrohlichen Infektionen führen kann (z.B. bei chronischer Granulomatose, Leukozytenadhäsionsdefekten oder allen Formen von Neutropenien) [36–38].

Die Mechanismen, mit denen PMNs Mikroorganismen abtöten, haben jedoch auch das Potenzial gesundes Gewebe zu verletzen. So wird überschießenden PMN-Reaktionen ein negativer Effekt auf den Verlauf bestimmter inflammatorischer Erkrankungen wie cerebralem Schlaganfall, akutem Koronarsyndrom, COVID-19, Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) oder Sepsis zugeschrieben [39–41].

Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Autoimmunerkrankungen, deren Entstehung nicht unmittelbar auf Fehlfunktion der PMNs selbst zurückzuführen sind, bei denen PMNs jedoch einen maßgeblichen Beitrag zur Pathogenese leisten [42]. Einer dysregulierten PMN-Immunreaktion wird ein bedeutender Einfluss, unter anderem auf Autoimmunerkrankungen, wie systemischer Lupus Erythematodes (SLE), rheumatoide Arthritis (RA) oder Pyoderma Gangränosum, zugeschrieben [43–45].

Die wichtige Rolle von Neutrophilen bei der angeborenen Immunabwehr, verbunden mit ihrer Neigung Gewebeschäden zu verursachen, erfordert eine ausbalancierte und streng kontrollierte Aktivität von PMNs [11].

1.2 Aktuelle Forschungs- und Problemlage

Diese Forschungsarbeit hat die Zielsetzung, Einflüsse von extrazellulärer Matrix auf Funktionen von neutrophilen Granulozyten zu untersuchen. Diesbezüglich ist es für ein fundiertes Verständnis lohnenswert, Wechselwirkungen extrazellulärer Matrix mit einer chemotaktischen PMN-Immunantwort differenziert zu betrachten und bisher für die Erforschung verwendete Untersuchungsmethoden zu evaluieren.

1.2.1 Ausbildung von Chemotaxisgradienten in Wechselwirkung mit extrazellulärer Matrix

Das ursprüngliche Konzept der Chemotaxis von Zellen wurde als gerichtete Migration beschrieben, die auf einen Konzentrationsgradienten von löslichen Chemoattraktanzien ausgerichtet ist [25]. In den frühen 1990er Jahren fanden Forschergruppen um Antal Rot und Yoshiya Tanaka unabhängig voneinander heraus, dass der Gradient von Chemoattraktanzien im Interstitium durch die Bindung und Immobilisierung dieser chemischen Signale an ein Substrat bestimmt wird [46, 47]. Demgemäß wird die interstitielle PMN-Navigation zutreffend durch das in der Fachliteratur eingeführte Konzept der Haptotaxis (eine gerichtete Zellbewegung, die durch einen Gradienten strukturgebundener Adhäsionsstellen oder Signalmoleküle induziert wird) charakterisiert [25].

Innerhalb des Gefäßkompartiments werden Chemoattraktanzien durch Glycosaminoglycane (GAGs) oder Heparansulfat, insbesondere auf der luminalen Membran von Endothelzellen, immobilisiert [48–50]. Extravaskulär können Chemoattraktanzien an die EZM binden (siehe unten) und so die Migration der Neutrophilen zu den Läsionsherden leiten [25].

PMNs kommen auf ihrem Migrationsweg mit zwei unterschiedlichen Grundformen von EZM in Kontakt; zum einen mit Basalmembranen, die aus dünnen Netzwerken hochvernetzter Glykoproteine bestehen; zum anderen treffen sie nach der Transmigration auf lose fibrillenartige Interstitialmatrizes [51].

Die Basalmembran besteht (wie unter Punkt 1.1.1.1 beschrieben) aus den vier Hauptbestandteilen Kollagen IV, Laminin, Nidogen, Heparansulfat und dem Proteoglycan Perlecan. Die Interstitialmatrix ist mit Ausnahme des ZNS in den meisten Geweben aus Fibrillen aufgebaut, die hauptsächlich Kollagen der Typen I, III, V, und/oder XI enthalten [51].

Die negative Ladung vieler EZM-Moleküle und die große Fläche, die sie im Gewebe einnehmen, bieten ein großes Potenzial für Wechselwirkungen mit anderen geladenen Molekülen, wie den Chemokinen [51]. Chemoattraktanzien können so an die Proteoglycane der EZM binden und dadurch die Migration der Neutrophilen zu Läsionsherden leiten [25].

1.2.2 Kenntnisse und Kontroversen des Einflusses von extrazellulärer Matrix auf Funktionen von Neutrophilen in der Fachliteratur von 1997 bis 2021

Die Art der Fortbewegung im Interstitium unterscheidet sich deutlich von der Art der Fortbewegung bei der Extravasation. Bei letzterer bleiben die Zellen durch Zell-Zell- oder Zell-EZM-Adhäsionen fest in einem Gewebekontext integriert [19]. Die amöboide Fortbewegungsart im Interstitium zeichnet sich dagegen durch das Fehlen solch starker adhäsiver Wechselwirkungen aus [52].

Während die intravaskulären Ereignisse und die Transmigration durch das Endothel in zahlreichen Studien umfassend untersucht wurden, wurde in der Vergangenheit vergleichsweise wenig Interesse den der Extravasationskaskade nachfolgenden Schritten gewidmet. In der Folge sind die Mechanismen, die die Passage durch das Interstitium regeln, weniger gut charakterisiert. Die Zell-Matrix Interaktion ist nicht vollständig geklärt und es ist wenig über die adhäsiven Wechselwirkungen bekannt, die die Beweglichkeit der wandernden Leukozyten im Interstitium bestimmen [19, 22].

Auch die Frage ob und falls ja, in welchem Ausmaß PMNs extrazelluläre Gegebenheiten als Führungsstrukturen nutzen, bleibt nicht endgültig beantwortet [19]. Zudem finden sich in der Fachliteratur unterschiedliche, zum Teil konträre Angaben dazu, ob die Zusammensetzung der EZM die Funktion von Granulozyten beeinflusst:

So berichteten Nourshargh et. al in ihrem Review, dass die amöboide Fortbewegung von Leukozyten und somit auch von PMNs unabhängig von der Zusammensetzung der extrazellulären Umgebung ist [19].

Jennings et al. hingegen postulierten, dass PMNs ihre Fortbewegungsart an die Zusammensetzung der EZM anpassen, wobei sie sich auf eine Studie von Van Goethem et al. bezogen, in der die Migration von Makrophagen von EZM-Bedingungen beeinflusst wurden. Die EZM-Umgebung, auf die die PMNs treffen, determiniert laut Ansicht der Autoren den Input an $\beta 1$ -oder $\beta 2$ -Integrinen, die Aktin-polymerisation und die mMyosin-II-angetriebenen Kräfte des amöboiden Bewegungsverhaltens [53].

Burns et al. gaben einen Überblick darüber, wie die Hafteigenschaften verschiedener EZM-Elemente sowohl die Richtung als auch die Geschwindigkeit der Leukozytenbewegung beeinflussen. Darüber hinaus beschrieben sie die über Integrin vermittelte Adhärenz an die EZM als sehr wichtig für die PMN-Fortbewegung in Richtung Entzündungsstellen [21].

Lindbom et. al. befürworteten das Konzept, dass für eine effiziente Bewegungsfähigkeit von PMNs wiederholte Zyklen von vorübergehender Anhaftung an und Loslösung von Matrixstrukturen erforderlich sind. Integrine scheinen dabei dadurch ausschlaggebend zu sein, indem sie Kontakt mit Matrixmolekülen herstellen und so als Anker für Filamente des Zytoskeletts die Fortbewegung ermöglichen [22]. Dabei stützten sie sich auf vorherige Betrachtungen von Cox und Huttenlocher [54]. Zwar gibt es auch integrinunabhängige PMN-Migration; diese adhäsionsunabhängigen Mechanismen sind jedoch sehr ineffizient und reichen bei weitem nicht aus, um die signifikante Leistungsfähigkeit des Bewegungsapparates unter physiologischen Bedingungen zu bewerkstelligen [22, 54].

Lindbom et. al. beschrieben des Weiteren, dass die Chemotaxis von Granulozyten auch von der relativen Häufigkeit von Matrixproteinen innerhalb des Gewebes beeinflusst wird. Bedingungen, die in der extrazellulären Umgebung vorkommen, können die Bindungsstärke zwischen den Integrinen und ihren Liganden erhöhen und auf diese Weise der Beweglichkeit entgegenwirken [22].

Kuntz et al. gingen davon aus, dass Migration abhängig sein muss von Adhäsion an EZM [55]. In diesem Zusammenhang beobachteten Konrad et al., dass PMNs die Ausprägung mehrerer Adhäsionsmoleküle ihrer Oberfläche (u.a. α -Integrine) änderten, wenn sie verschiedene Kompartimente der Lunge (Interstitium, Intraalveolarraum) durchwanderten [56]. Dies deutete laut Lin und Fessler darauf hin, dass spezifische Adhäsionsinteraktionen der PMNs mit der EZM Kontrollpunkte entlang der Migrationsstrecke regulieren [57].

Zusammenfassend ist festzustellen: Die EZM scheint Migrationsmuster mehr zu modulieren als strikt festzulegen [19].

Die Vorstellung, dass die EZM eine strukturelle Funktion haben kann, indem sie als Barriere oder Gerüst für Zellen, die entzündetes Gewebe infiltrieren, fungiert, ist naheliegend. Neben der Beeinflussung der Migration von Immunzellen berichteten Sorokin et al. aber auch über einen Einfluss der EZM auf die Inflammation von Geweben. Wie oben bereits erwähnt kann die EZM durch Bindung von Chemokinen in räumlich strukturierter und regulierter Weise multiple komplexe Signale an Leukozyten liefern und integrieren, die deren Verhalten in inflammatorischen Geweben beeinflussen [51].

Darüber hinaus werden in inflammatorischen Geweben sowohl der Gewebeumsatz, als auch die Proteasesekretion von geweberesidenten Zellen durch Chemokine gesteigert [51]. Mehrere Publikationen - u.a. von Houghton et al. und Ospelt und Gay – lassen vermuten, dass

solche aberrant exprimierten EZM-Moleküle die Aktivierung, Differenzierung und das Überleben von Immunzellen beeinflussen können [58, 59].

In diesem Zusammenhang beschrieben Gaggar et al., dass während einer in vitro Inflammation von PMNs freigesetzte Proteasen Kollagen in bioaktive EZM-Fragmente zerlegen. Diese besitzen wiederum chemotaktische Aktivität, was zudem von Weathington et al. in einem in vivo Lungeninflammationsmodell nachgewiesen wurde [60, 61]. Darüber hinaus zeigten Nissen et al., dass PMNs in Anwesenheit bioaktiver Kollagen-Fragmente in vitro weniger ROS produzieren und ihre interstitielle Migrationsgeschwindigkeit reduzieren. In einem in vivo Asthma-Modell stellten sie überdies fest, dass selbige bioaktive Fragmente selektiv die Akkumulation von PMNs in Lungeninterstitium inhibieren, und belegten dadurch, dass der Einfluss der EZM auf Inflammation und im Speziellen auf die Funktion von PMNs durchaus (patho-)physiologische Relevanz besitzt [62].

1.2.3 Allgemeine Aspekte von Chemotaxisexperimenten mit Granulozyten

Migration und Immunantwort von Granulozyten waren und sind Gegenstand intensiver Forschung im Bereich Immunbiologie. Zahlreiche Untersuchungen – reviewed u.a. von Toetsch et al. - gaben in der Vergangenheit aufschlussreiche Einblicke in die Migrations- und biochemischen Prozesse, die diese Immunantwort ermöglichen [63]. Viele dieser in vitro Chemotaxis- und Migrationsansätze untersuchten Zellen, jedoch in einer Umgebung, die sich zum Teil deutlich von der in vivo Umgebung unterschied. Um Bedingungen nachzustellen, wie sie Zellen an Gefäßwänden vorfinden, arbeiten bis in die Gegenwart verschiedene Assay-Ansätze (u.a. Dunn, Zigmond, Boyden oder Gundersen und Barrett) mit einer zweidimensionalen Umgebung, in der bewegliche Zellen Kontakt zu Glas oder Filtern haben. Da Granulozyten im menschlichen Körper grundsätzlich jedoch im dreidimensionalen menschlichen Gewebe verteilt sind, ist ein dreidimensionaler Versuchsaufbau – vgl. Parkhurst et al.- durch eine realitätsnähere Umgebung die bessere Wahl, um die Bedingungen im Körper möglichst gut nachzubilden [64, 65].

2017 bzw. 2018 erschienene Publikation – u. a. von Hattenkofer et al. und Weckmann et al. – beschrieben eine neue Analysetechnik, mit der die Migration von PMNs auf Einzelzellebene im dreidimensionalen Raum untersucht werden kann [27, 66]. Aber auch diese neueren Methoden untersuchten ausschließlich die PMN Migration. 2019 wurde von Dobliger et al. ein Methodenansatz veröffentlicht, mit dem es möglich ist, sowohl Migration, als auch Immunreaktionen gleichzeitig in einem Assay zu analysieren [67].

1.3 Wissenschaftliche Fragestellung

Dreidimensionale Chemotaxisexperimente versuchen Umgebungen im menschlichen Körper möglichst exakt nachzustellen. Zu diesem Zweck werden im Allgemeinen PMNs in eine Gelmatrix eingebettet, um Bedingungen nachzuahmen, die PMNs auch im menschlichen Gewebe vorfinden [68, 69]. Bei bisherigen Studien wurde eine Vielzahl verschiedener Gelarten verwendet, je nachdem, welches Kompartiment des Körpers man nachstellen wollte. So verwendeten Weckmann et al. beispielsweise eine Matrix vorwiegend aus Kollagen IV, um Bedingungen, wie sie in endothelialen Basalmembranen vorkommen, nachzubilden [27]. Um die EZM des Interstitiums zu imitieren, wurde – wie beispielsweise bei Reid et al. – häufig eine Matrix aus Kollagen I verwendet, da Kollagen I die am meisten vorkommende fibrinöse Komponente der EZM ist [70, 71].

Fibringle – wie sie u. a. bei bei Moghe et al. verwendet wurden – eigneten sich gut, Modelle für Blutgerinnsel in der inflammatorischen Phase der Wundheilung oder Stroma im soliden Tumorwachstum zu rekonstruieren [24].

In der einschlägigen Fachliteratur finden sich darüber hinaus Chemotaxis-Studien, die Agarose als Gelmatrix verwenden [68]. Diese „Under-Agarose-Assays“, wie sie unter anderem bei Nelson et al. beschrieben sind, verwenden Agarosematrizes aufgrund ihrer guten Laboreigenschaften, obwohl die pflanzliche Agarose nicht im menschlichen Körper vorkommt [72].

Trotz der doch vielfältigen Verwendung unterschiedlicher Gelmatrizes in bisherigen PMN-Chemotaxis-Studien, weiß man wenig darüber, wie Gelmatrizes PMNs beeinflussen können. Die Zielsetzung meiner Forschungsarbeit ist daher, mögliche Einflüsse auf die Funktionalität von PMNs durch die extrazelluläre Gelmatrix, in welche Neutrophile bei Chemotaxisstudien zur Beobachtung eingebettet werden, zu identifizieren, zu charakterisieren und zu quantifizieren. In der hypothetischen Annahme, dass bei einer initialen Immunreaktion die bloße Anwesenheit von EZM im physiologischen Kontext keine Aktivierung der Granulozyten bewirkt, wird folgende Forschungshypothese formuliert:

Die Wahl der dreidimensionalen Gelmatrix bei in vitro Chemotaxisexperimenten hat keinen Einfluss auf Migration und Funktion von Granulozyten.

1.4 Auswahl der extrazellulären Matrices

Um PMNs realitätsnah im dreidimensionalen Raum untersuchen zu können, wurde in dieser Forschungsarbeit bei der Auswahl der extrazellulären Gelmatrices darauf geachtet, dass letztere grundsätzlich die Zusammensetzung, Elastizität und Dichte der Barrieren und Gewebe, mit denen wandernde PMNs im menschlichen Körper konfrontiert sind, widerspiegeln [53]. Da jedoch nicht nur die PMN-Migration sondern auch granulozytenspezifische Funktionen betrachtet werden sollten, wurde die Wahl der Materialien für meine Experimente zudem maßgeblich von folgender Frage bestimmt: Welche Voraussetzungen, beziehungsweise Eigenschaften, muss eine Matrix / ein Gel aufweisen, um für die geforderten Zwecke, also die Beobachtung und Untersuchung spezifischer Funktionen und Migration von PMNs, geeignet zu sein?

Erforderliche Eigenschaften :

- a) PMNs müssen in der Matrix überleben und ihre Funktionen ausüben können.
- b) Ein Chemotaxisgradient muss im Gel aufgebaut werden können [73].
- c) Die Verarbeitung der Gele sollte in einem geeigneten Zeitraum erfolgen können.
Bedingt durch die kurze Lebens- bzw. Aktivitätsdauer der PMNs, darf die Verarbeitung der Gele eine Zeitdauer von 1h nicht überschreiten, da nur so die Beobachtung und Untersuchung von Chemotaxiseffekten der PMNs möglich ist.
- d) PMNs sollten im Gel gleichmäßig verteilt sein können.

Neben den Eigenschaften, die speziell mit der Untersuchung von PMNs verbunden sind, müssen die Matrices zusätzlich dem in den Versuchen verwendeten Chemotaxismodell, den μ -Slide-Chemotaxiskammern[®] von IBIDI, gerecht werden. Eine ausführliche Einführung und detaillierte Beschreibung des Chemotaxismodells wird an dieser Stelle nicht vorgenommen. Diese erfolgt unter Punkt 2.3.3. Diese Chemotaxiskammern besitzen jedoch einen speziellen Aufbau, der zusätzlich modellbedingte Anforderungen an die Gelmatrices stellt. So verfügen die Chemotaxiskammern über einen mittleren Kanal, in den die Matrix eingefüllt werden kann. Zur linken und rechten Seite des Kanals befindet sich ein Reservoir, das mit Flüssigkeit zum Aufbau eines Chemokingradienten gefüllt wird.

Die durch den Aufbau modellbedingten Anforderungen an die Gelmatrices lauten:

Gele...

- müssen bei den gewählten Untersuchungsbedingungen (37°C und 5% CO₂) eine ausreichende Stabilität im Kanal besitzen, um eine sichere Barriere zwischen den beiden Reservoirien zu bilden;
- müssen gut in die Kanäle einfüllbar sein;
- dürfen den Kanal beim Aushärten nicht verlassen;
- dürfen durch das Befüllen der Reservoirie nicht ausgeschwemmt werden;
- sollen den Kanal homogen ausfüllen.

Bei der Auswahl der Materialien diente ein Review von Keenan et al., der die Entwicklung von biomolekularen Gradienten in Zellkultursystemen thematisiert, als Orientierung [68]. Oftmals fanden Hydrogele wie Agarose, Kollagen oder Fibrin Verwendung für Experimente, die den Aufbau eines biomolekularen Gradienten benötigen.

Es ergaben sich deutliche Übereinstimmung der Anforderungen an die Gele (vergleiche obige Ausführungen) und der Eigenschaften, die die Materialien **Agarose**, **Kollagen I**, **II** und **III** sowie **Fibrin** besitzen. In bisherigen Chemotaxisexperimenten des Forschungslabors der Klinik für Anästhesiologie am Uniklinikum Regensburg wurden ausschließlich Matrices aus Kollagen-I-Gel verwendet. Somit diente dieses als Referenzgel.

1.5 Projektplan

Um die unter Punkt 1.3 formulierte Forschungshypothese zu überprüfen, wurden mehrere Versuchsreihen nach Doblinger et al. durchgeführt [67]. Ziel dieser Versuchsreihen war es, neben der Migration auch die granulozytenspezifischen Funktionen ROS-Produktion, MPO-Freisetzung und NETosis in verschiedenen Matrices zu beobachten, zu analysieren und zu vergleichen.

Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Vorgehensweise zur Überprüfung der Forschungshypothese. Jeder Versuch dieser Forschungsarbeit war nach dem gleichen Prinzip aufgebaut und enthielt die in Abbildung 2 dargestellten Versuchsschritte. Weitere Ausführungen zur Auswahl der einzelnen dreidimensionalen Gelmatrices werden unter Punkt 1.4 vorgenommen. Die einzelnen in Abbildung 2 dargestellten Versuchsschritte werden im Kapitel 2 (Material und Methoden) näher erläutert. Die in Abbildung 2 angegebenen abgekürzten Analyseparameter werden unter den Punkten 2.4.1 und 2.4.2 beziehungsweise in Tabelle 14 (Seite 43) erläutert.

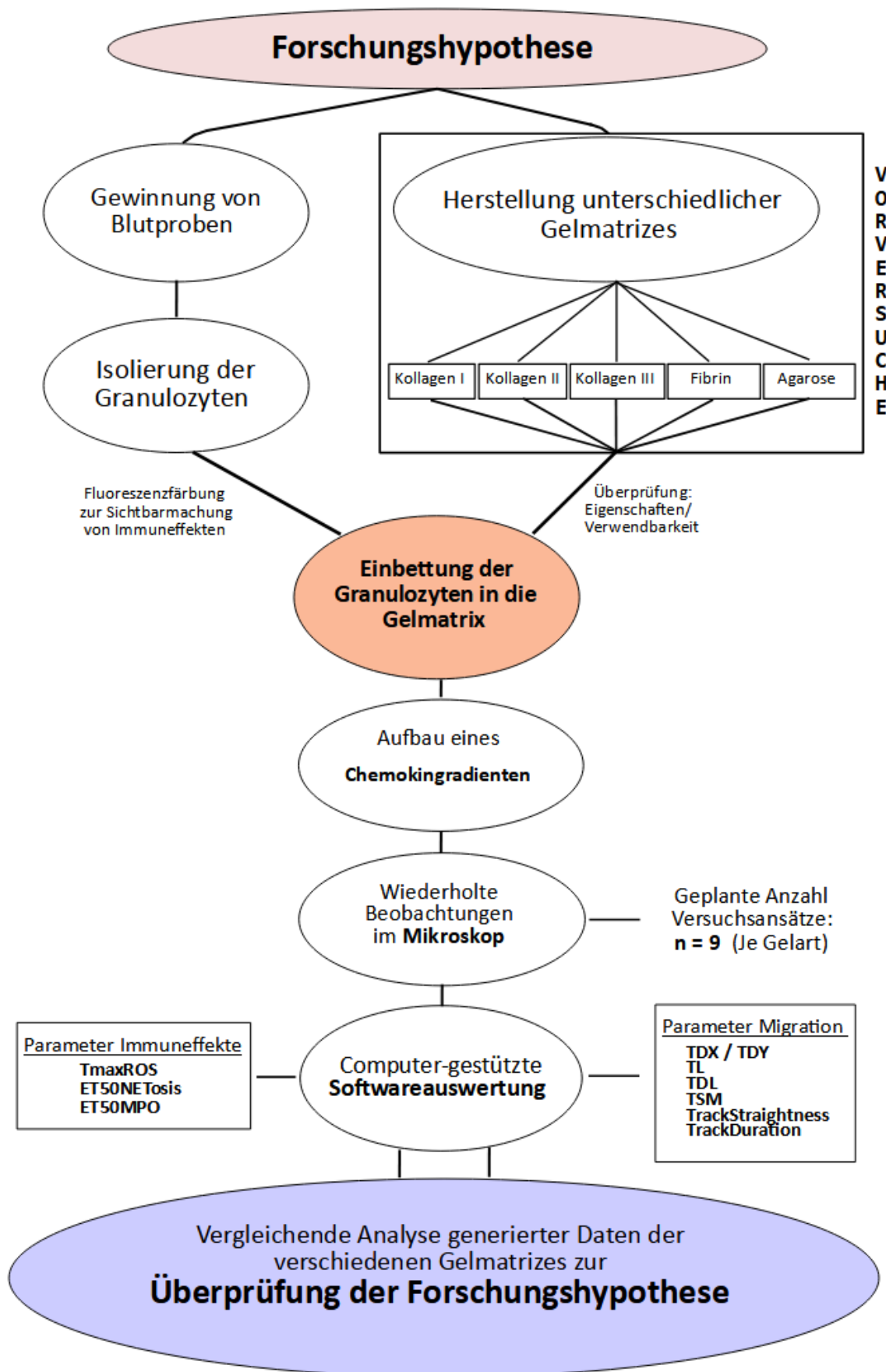


Abbildung 2: Schematischer Überblick über den Projektplan zur Überprüfung der Forschungshypothese

2 Material und Methoden

Im Folgenden wird im Anschluss an das Votum der Ethikkommission in Kapitel 2.2 die Konstruierung geeigneter Herstellungs- und Anwendungsmethoden einzelner Gelmatrizes beschrieben („Vorversuche“). Im darauffolgenden Kapitel 2.3 wird näher auf den allgemeinen Versuchsaufbau der PMN-Funktionalitätsprüfung und damit auf die zentrale Fragestellung dieser Dissertation eingegangen. Nähere Angaben zu verwendetem Material und Geräten finden sich in einer zusammenfassenden Materialliste unter Punkt 7.1 im Anhang. Im Text werden die Verweise zur Materialliste in runden Klammern () bei Erstnennung der jeweiligen Substanz angegeben.

2.1 Votum der Ethikkommission

Die Durchführung dieser Studie entspricht den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki und wurde durch die lokale Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg (Aktenzeichen 16-101-0322) genehmigt.

2.2 Vorversuche zur Herstellung und Verwendung geeigneter dreidimensionaler Gelmatrizes

Im nachfolgenden Text werden zunächst einzelne Entwicklungs- und Modifikationsschritte der ausgewählten Hydrogelmatrizes (siehe Punkt 1.4) beschrieben. Am Ende jedes Kapitels wird eine zusammenfassende Übersicht über die letztendlich für die PMN-Funktionalitätsprüfung verwendete Gelherstellungsmethode gegeben. Die Eigenschaften der durch die einzelnen Modifikationen hergestellten Matrizes sind in Kapitel 3.1 aufgeführt. Eine Beurteilung der verschiedenen Modifikationen wird unter Punkt 4.1.1 vorgenommen. Eigenschaften und Beurteilung tragen wesentlich zum Verständnis für die Herstellungsmethode der für die PMN-Funktionalitätsprüfung eingesetzten Matrizes bei.

2.2.1 Kollagen I

In den Versuchen zur PMN-Funktionalitätsprüfung wurde als Referenzgel eine Kollagen-I-Matrix der Konzentration $1,5 \frac{mg}{mL}$ in Anlehnung an die Versuchsvorschrift *Application Note 26* der Firma IBIDI hergestellt [74]. Die beiden Hauptbestandteile Puffer und gelöstes Kollagen I wurden im Vorfeld der jeweiligen Versuche vorbereitet.

Zur Herstellung des Puffers wurden 20 μ L 10 x MEM (1), 50 μ L RPMI-1640 (2), 10 μ L 7,5 % Natriumbikarbonat Lösung (3) und 20 μ L destilliertes Wasser (H₂O dest.) in ein Safe-Lock-Tube gegeben. Diese Puffermischung wurde im Brutschrank für 12 h auf 37°C erwärmt.

Für die Gelherstellung wurde bereits gelöstes Kollagen I (4) in der Konzentration $3,0 \frac{mg}{mL}$ verwendet. Die Kollagen-I-Gelmatrix der Konzentration $1,5 \frac{mg}{mL}$ enthielt somit folgende Bestandteile (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: Bestandteile der Referenzmatrix aus Kollagen I

Kollagen I ($3 \frac{mg}{mL}$) [μL]	Puffer [μL]	Granulozyten in RPMI [μL]
150	100	50

Nach Mischung der Gelkomponenten und Einfüllen in den mittleren Kanal der IBIDI-Kammern (siehe Punkt 2.3.3) härteten die Gele 30 min bei $37^{\circ}C$, 5% CO_2 und 50% Luftfeuchtigkeit aus.

2.2.2 Kollagen II

Nach der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Vorgehensweise wurden verschiedene Matrices aus Kollagen II hergestellt und schrittweise modifiziert. Angezeigte pH-Wertmessungen wurden mittels Indikatorpapier (5) durchgeführt.

Dazu wurden 5 mg Kollagen II (6), welches aus Rinderknorpel hergestellt worden war, in $1000 \mu L$ 0,058 M Essigsäure ((7); pH = 3) gelöst. Die auf diese Weise erhaltene Kollagen-II-Lösung der Konzentration $5 \frac{mg}{mL}$ bildete die Basis für weitere Experimente.

In einer ersten Vorversuchsreihe wurden Kollagen-II-Gele mit folgenden Bestandteilen hergestellt (siehe Tabelle 2):

Tabelle 2: Bestandteile von Kollagen-II-Matrices aus Rinderkollagen (erste Vorversuchsreihe)

Konzentration [$\frac{mg}{mL}$]	Kollagen-II-Lösung [μL]	Zell-suspension [μL]	10xMEM [μL]	NaHCO₃ (7,5%) [μL]	RPMI-1640 [μL]	H₂O dest. [μL]	NaOH (8) (1 M) [μL]
1,5 (a)	50	38	15	8	38	15	-
1,5 (b)	90	50	20	4	50	81	5
1,67	100	50	20	7	50	73	-
2,5	75	25	10	5	25	10	-

Im Rahmen einer zweiten Vorversuchsreihe wurde ein alternativer Puffer angesetzt, der sich aus den folgenden Bestandteilen zusammensetzte [75]:

1,1 g NaHCO₃ (9) wurden gelöst in 50 mL 0,05 M NaOH ((8) NaOH-Lösung enthält hier 10% Hepespuffer (10)).

Unter Verwendung des alternativen Puffers wurden Kollagen-II-Gele hergestellt, die folgende Bestandteile enthielten (siehe Tabelle 3):

Tabelle 3: Bestandteile von Kollagen-II-Matrizes aus Rinderkollagen mit Alternativpuffer (zweite Vorversuchsreihe)

Konzentration [$\frac{mg}{mL}$]	Kollagen-II-Lösung [µL]	Zellsuspension [µL]	Puffer [µL]	10 x MEM [µL]
3	50	16,7	8,3	8,3
2,5	40	20	10	10
1,5	40	46,66	23,3	23,3
1,0	20	40	20	20

In einer dritten Vorversuchsreihe wurde ein weiteres Kollagen-II-Produkt (11), welches aus Knorpel des Huhns gewonnen wurde, getestet.

Es wurden 25 mg des Huhn-Kollagen-II in 5 mL 0,058 M Essigsäure gelöst, woraufhin eine Kollagen-II-Lösung der Konzentration 5 $\frac{mg}{mL}$ entstand. Mit dieser Lösung wurden gemäß der unter Punkt 2.2.1 beschriebenen Methode folgende Kollagen-II-Gele hergestellt (siehe Tabelle 4):

Tabelle 4: Bestandteile von Kollagen-II-Matrizes aus Huhnkollagen (dritte Vorversuchsreihe)

Konzentration [$\frac{mg}{mL}$]	Kollagen-II-Lösung [µL]	Zell-suspension [µL]	10xMEM [µL]	NaHCO₃-Lösung (7,5%) [µL]	RPMI-1640 [µL]	H₂O destilliert [µL]
2,0	120	50	20	20	50	40
1,5	90	50	20	15	50	75
1	60	50	20	10	50	110

In einer vierten Vorversuchsreihe wurde die Aushärtungszeit auf 60 min verlängert, und die Pufferbestandteile vor Zusammengabe mittels Eis gekühlt. Mit dieser Modifizierung wurden folgende Kollagen-II-Gele hergestellt (siehe Tabelle 5):

Tabelle 5: Bestandteile von Kollagen-II-Matrizes aus Huhnkollagen mit verlängerter Aushärtungszeit (vierte Vorversuchsreihe)

Konzentration $\left[\frac{mg}{mL}\right]$	Kollagen-II-Lösung [μ L]	Zell-suspension [μ L]	10xMEM [μ L]	NaHCO₃-Lösung (7,5%) [μ L]	RPMI-1640 [μ L]	H₂O destilliert [μ L]
1,5	90	50	20	10	50	80
1,5	90	50	20	15	50	75
1,5	90	50	20	20	50	70
1,5	90	50	20	25	50	65
1,5	90	50	20	40	50	50
1,5	90	50	20	60	50	30
1,5	90	50	60	10	50	40
2,0	120	50	20	20	50	40
2,0	120	50	30	20	50	30
2,5	150	50	20	25	50	5
2,5	150	50	20	25	50	5

2.2.3 Kollagen III

Um eine Gelmatrix aus Kollagen III herzustellen, wurden 10 mg Kollagen III (12), welches aus Rinderhaut gewonnen wurde, in 3,33 mL 0,5 M Essigsäure unter ständigem Schütteln bei 2 - 8°C gelöst. Danach wurde die fertige Lösung der Konzentration $3 \frac{mg}{mL}$ in Aliquots zu je 165 μ L aufgeteilt, die dann für die weitere Verwendung bei - 20°C gelagert wurden und erst kurz vor dem jeweiligen Versuch wieder aufgetaut wurden. Die Aliquots wurden nach einmaliger Verwendung verworfen, sodass ein Wiedereinfrieren und –auftauen vermieden wurde. Angezeigte pH-Wertmessungen wurden mittels Indikatorpapier (35) durchgeführt.

In einer ersten Vorversuchsreihe wurden unter Verwendung der unter Punkt 2.2.1 beschriebenen Methodik Kollagen-III-Gele mit folgenden Bestandteilen hergestellt (siehe Tabelle 6):

Tabelle 6: Bestandteile von Kollagen-III-Matrizes der ersten Vorversuchsreihe

Konzentration [$\frac{mg}{mL}$]	Kollagen-III-Lösung [μL]	Zellsuspension [μL]	10x MEM [μL]	H ₂ O dest. [μL]	NaOH [μL]	NaHCO ₃ -Lösung [μL]	RPMI-1640 [μL]	Konsistenz	pH-Wert
2,25	112,5	20	10	-	-	7,5	-	Flüssig	3-4
2,0	100	25	10	-	-	7,5	7,5	Flüssig	3-4
1,75	87,5	25	10	-	-	5	22,5	Flüssig	3-4
1,5	75	25	10	10	-	5	25	Flüssig	3-4
1	50	25	10	35	-	5	25	Flüssig	3-4
0,5	25	25	10	60	-	5	25	Flüssig	3-4

Im Rahmen einer zweiten Vorversuchsreihe wurde 1 M NaOH-Lösung als basische Lösung zur Neutralisierung verwendet. Es wurde eine Neutralisierungslösung hergestellt, die dann folgende Bestandteile in jeweils verschiedenen Mengen (siehe Tabellen 7 - 9) enthielt:

10 x MEM, H₂O destilliert, RPMI-1640, 7,5% NaHCO₃ (27)

Die Zusammengabe der Bestandteile erfolgte nach einer bestimmten Reihenfolge:

Zuerst wurde das Kollagen III mit dem Puffer vermischt. Erst dann wurden die Zellen hinzugegeben, alles gut durchmischt und zum Schluss in die IBIDI-Kammer eingefüllt.

Auf diese Weise wurden Gele mit folgenden Bestandteilen hergestellt (siehe Tabelle 7)

Tabelle 7: Bestandteile von Kollagen-III-Gele der zweiten Vorversuchsreihe

Konzentration [$\frac{mg}{mL}$]	Kollagen-III-Lösung [μL]	Zellsuspension [μL]	10 x MEM [μL]	H ₂ O dest. [μL]	NaOH [μL]	NaHCO ₃ -Lösung [μL]	RPMI-1640 [μL]	Konsistenz	pH-Wert
1,5	75	25	5	-	40	5	-	Fest	10-11
1,0	50	25	10	-	25	5	35	Fest	10-11
0,5	25	25	10	30	10	10	40	Flüssig	10-11

In einer dritten Vorversuchsreihe wurden Gele der Konzentrationen $1,5 \frac{mg}{mL}$ mit folgenden Bestandteilen hergestellt (siehe Tabelle 8):

Tabelle 8: Bestandteile von Kollagen-III-Gelen der dritten Vorversuchsreihe

Konzentration [$\frac{mg}{mL}$]	Kollagen-III-Lösung [μL]	Zellsuspension [μL]	10 x MEM [μL]	H ₂ O dest. [μL]	NaOH [μL]	NaHCO ₃ -Lösung [μL]	RPMI-1640 [μL]	Konsistenz	pH-Wert
1,5	75	25	7,5	-	35	7,5	-	Fest	8-9
1,5	75	25	10	-	32,5	7,5	-	Fest	8-9
1,5	75	25	5	-	33,5	11,5	-	Fest	7-8
1,5	75	25	10	-	30	10	-	Fest	7

Im Rahmen einer vierten Vorversuchsreihe wurden Gele der Konzentration $1,0 \frac{mg}{mL}$ mit folgenden Bestandteilen hergestellt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Bestandteile von Kollagen-III-Gelen der vierten Vorversuchsreihe

Konzentration [$\frac{mg}{mL}$]	Kollagen-III-Lösung [μL]	Zellsuspension [μL]	10x MEM [μL]	H ₂ O dest. [μL]	NaOH [μL]	NaHCO ₃ -Lösung [μL]	RPMI-1640 [μL]	Konsistenz	pH-Wert
1,0	50	25	10	10	25	5	25	fest	10-11
1,0	50	25	10	-1	25	5	35	fest	10-11
1,0	50	25	10	10	20	10	25	fest	7-8
1,0	50	25	10	10	22,5	7,5	25	fest	7-8
1,0	50	25	10	15	20	5	25	fest	7-8

Im Rahmen der vierten Vorversuchsreihe wurden Zwischenversuche ohne Zellen durchgeführt, in denen die Aushärtungszeit auf 15 min verkürzt wurde.

Für die Hauptversuche zum Vergleich der PMN-Funktionalität mit anderen Gelarten wurden Kollagen-III-Matrizes der Konzentration $1,0 \frac{mg}{mL}$, welche aus den in Tabelle 9 farblich markierten Bestandteilen mit einer Aushärtungszeit von 15 min hergestellt worden waren, verwendet.

2.2.4 Agarose

Zur Herstellung einer Matrix aus Agarose wurde eine von Foxman et al. beschriebene Methode benutzt [76]. So wurden 1,2 g Agarose (13) in 100 mL destilliertem Wasser gelöst. Durch Aufheizen auf 90°C in einer Mikrowelle erhielt man ein Agarosegel mit der

Konzentration $12 \frac{mg}{mL}$. Das warme, noch flüssige Gel wurde in Aliquots zu je 1 mL aufgeteilt, und diese wurden in steril verpackte Safe-Lock-Tubes gefüllt. Zudem wurde eine Agarose-Pufferlösung aus folgenden Substanzen hergestellt:

- 4,75 mL Hanks' Balanced Salt Solution („HBSS“ (14))
- 4,75 mL RPMI
- 500 μ L fetales Kälberserum ((15); „FKS“)

Um die Verwendbarkeit der hergestellten Reagenzien zu gewährleisten, wurden sie für die nachfolgenden Experimente bei 2 - 4°C gelagert.

Während der Zellisolation wurde ein Safe-Lock-Tube (Inhalt: $12 \frac{mg}{mL}$ Agarosegel; hergestellt wie oben beschrieben) in einem Heizblock auf 90°C erhitzt, um den Inhalt zu verflüssigen. Anschließend wurden definierten Mengen an Agarose-Puffer und fertiger Zellsuspension (siehe Punkt 2.3.1) gemischt, wobei als Letztes die Agarose hinzugefügt wurde. Dazu wurde aus dem Safe-Lock-Tube mit $12 \frac{mg}{mL}$ flüssiger Agarose ein definiertes Volumen (siehe Tabellen 10 & 11) zum fertigen Gemisch gegeben. Danach härteten die Gele (wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben) 30 min im Brutschrank aus.

Durch diese Vorgehensweise entstanden in einer Vorversuchsreihe Agarosegele mit folgenden Konzentrationen (Tabelle 10):

Tabelle 10: Bestandteile der hergestellten Agarosematrizes

Konzentration $\left[\frac{mg}{mL}\right]$	Agarose ($12 \frac{mg}{mL}$) [μ L]	Zellsuspension [μ L]	Puffer [μ L]
6	150	50	100
4	100	50	150
2	50	50	200
1,5	37,5	50	212,5
1	25	50	225
0,5	12,5	50	237,5

2.2.5 Low-Melting-Agarose

Es wurden weitere Matrizes mit einem alternativen Agaroseprodukt (16) hergestellt, das mit $\leq 65^\circ\text{C}$ einen geringeren Gelpunkt besaß (im Weiteren bezeichnet als Low-melting-Agarose (LM-Agarose)). Nach der im vorhergehenden Abschnitt bereits eingeführten Methode

von Foxman et. al. wurden unter ständigem Rühren 500 mg LM-Agarose in 50 mL destilliertem Wasser ($\vartheta = 70^{\circ}\text{C}$) gelöst, anschließend die noch warme LM-Agaroselösung mit der Konzentration $10 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ in Aliquots zu je 1 mL Inhalt aufgeteilt und in Safe-Lock-Tubes eingefüllt, die dann bei $2 - 4^{\circ}\text{C}$ für die weitere Verwendung gelagert wurden [76].

Die letztendliche Herstellung des Gels erfolgte, wie in den ersten Abschnitten von Punkt 2.2.4 beschrieben. Es ergab sich lediglich ein methodischer Unterschied:

Die LM-Agarose wurde zur Verflüssigung auf 66°C - und nicht wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben - auf 90°C erhitzt.

Auf diese Weise entstanden Gele aus LM-Agarose mit folgenden Bestandteilen (siehe Tabelle 11):

Tabelle 11: Bestandteile der hergestellten Gele aus Low-Melting-Agarose

Konzentration $\left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right]$	LM-Agarose ($10 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$) [μL]	Zellsuspension [μL]	Puffer [μL]
5	50	25	25
4	50	37,5	37,5
3,33	37,5	37,5	37,5
3	50	58,33	58,33
2,5	50	75	75
1	30	85	85
0,5	10	95	95

Für die Hauptversuche zum Vergleich der PMN-Funktionalität mit anderen Gelarten wurden LM-Agarose-Matrizes der Konzentration $2,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, welche aus den in Tabelle 11 farblich markierten Bestandteilen hergestellt wurden, verwendet.

2.2.6 Fibrin

Zur Herstellung eines Fibringels wurden, basierend auf einer von Moghe et al. beschriebenen Methode, die beiden Hauptbestandteile Fibrinogen (17) und Thrombin (18) separat voneinander vorbereitet und erst zur abschließenden Gelherstellung zusammenpipettiert [24].

Fibrinogen wurde wie folgt vorbereitet: 1g Fibrinogen wurde in 33,33 mL 0,9% NaCl-Lösung aufgelöst, um eine Ausgangslösung mit $30 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ zu erhalten. Diese wurde zur weiteren

Verwendung in ca. 40 Safe-Lock-Tubes zu je 100 µL abgefüllt, welche bis zur endgültigen Verwendung bei -80°C eingefroren wurden. Zur Gelherstellung wurde die Ausgangslösung auf Raumtemperatur aufgetaut und mit 500 µL 0,9% NaCl-Lösung verdünnt. Die so erhaltene Lösung mit der Konzentration $5 \frac{mg}{mL}$ wurde dann als Gelherstellungslösung eingesetzt.

Thrombin wurde ähnlich angesetzt: Die für die Gelherstellung von Moghe et al. beschriebene Thrombinausgangslösung mit der Aktivität $25 \frac{U}{mL}$ wurde hergestellt, indem das lyophilisierte Thrombin mit Ausgangsaktivität 1 KU in 40 mL PBS (19) aufgelöst und so gleichzeitig auf die gewünschte Aktivität verdünnt wurde [24]. Die so erhaltene Lösung wurde dann in Safe-Lock-Tubes zu je 20 µL abgefüllt und ebenso wie das Fibrinogen bei -80°C bis zur endgültigen Verwendung gelagert. Die Thrombinausgangslösung wurde kurz vor Gelherstellung auf Raumtemperatur erwärmt und mit 230 µL Nährmedium (Details zum Medium siehe unten) auf insgesamt 250 µL Endvolumen verdünnt. So entstand die fertige Thrombinlösung mit der Aktivität $2 \frac{U}{mL}$, die als Gelherstellungslösung verwendet werden konnte.

Durch Zusammengabe der beiden Komponenten, also der fertigen Gelherstellungslösungen von Fibrinogen und Thrombin, wurde schließlich eine flüssige Fibrinmatrix erzeugt, die in den Kanal der IBIDI-µSlide-Kammer eingefüllt werden konnte.

Die Aushärtungszeit nach Einfüllen in die IBIDI-Kammer betrug 30 min bei 37°C, 5% CO₂ und 50% Luftfeuchtigkeit (siehe Punkt 2.2.1).

Vorversuchsreihen zur Anpassung des Nährmediums

In einer ersten Vorversuchsreihe zur Herstellung eines Fibringels wurde (wie bei Moghe et al. beschrieben) die Thrombinausgangslösung vor Zusammengabe der Komponenten (siehe oben) mit einer Lösung des Medium 199 (M199) verdünnt [24]. Zudem wurden in diesen Versuchen die Granulozyten ebenso in einer M199-Lösung resuspendiert (Methodik siehe 2.3.1). Die in dieser Vorversuchsreihe verwendete M199-Lösung wurde wie folgt hergestellt:

Die vom Hersteller bereits abgewogene Menge für 1 L M199 (20) wurde in 900 mL destilliertem Wasser unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur gelöst. Danach wurde der pH-Wert mit einem pH-Meter gemessen und mittels 1 M NaOH-Lösung auf pH = 7,3 angepasst. Anschließend wurde die neutrale M199-Lösung auf 1000 mL aufgefüllt. Für die weitere Verwendung wurde die M199-Lösung bei 2 - 8°C gelagert.

In einer zweiten Vorversuchsreihe wurde die Thrombinausgangslösung vor Zusammengabe der Komponenten durch das Nährmedium RPMI 1640 verdünnt.

Für die Fibrinhauptversuche wurde - sowohl für die Verdünnung der Thrombinausgangslösung als auch für die Resuspendierung der Granulozyten RPMI-1640 als Nährmedium verwendet. Pro Versuchsansatz wurden so jeweils 500 µL Fibringel mit der Konzentration $3 \frac{mg}{mL}$ durch Zusammengeben der Gelherstellungslösungen von Fibrinogen und Thrombin (Herstellung oben beschrieben) hergestellt.

Das Fibringel der Versuche zur PMN-Funktionalitätsprüfung enthielt folgende Volumina der einzelnen Bestandteile (siehe Tabelle 12):

Tabelle 12: Bestandteile der hergestellten Fibringele zur PMN-Funktionalitätsprüfung

Gelkomponente	Fibrinogen ($c = 5 \frac{mg}{mL}$)	Thrombin ($v = 2 \frac{U}{mL}$)	Zellsuspension
Volumen [µL]	300	150	50

2.2.7 Überprüfung der Integrität der Matrices mittels Hämatoxylin-Färbelösung

Nach Ablauf der Mikroskopbetrachtung wurde eine Hämatoxylin-Färbelösung jeweils in die rechten Reservoirs der IBIDI-Kammern eingefüllt. Dieser Test erfolgte sowohl orientierend für sämtliche Gele in der Testphase der Methodenentwicklung als auch stichprobenweise für die Hauptversuche zum Vergleich der verschiedenen Gele.

2.3 Versuchsaufbau der Funktionalitätsprüfung neutrophiler Granulozyten

Im Folgenden wird der allgemeine Versuchsaufbau der PMN-Funktionalitätsprüfung beschrieben. Dieser bildete die Basis zur Überprüfung der Forschungshypothese (siehe Punkt 1.3). Der Versuchsablauf wurde in den Hauptversuchen der PMN-Funktionalitätsprüfung für jede etablierte Gelart (siehe Punkt 3.2) mit einer Gesamtversuchszahl von $n = 9$ (je Gelart) durchgeführt.

2.3.1 Probengewinnung und Isolierung neutrophiler Granulozyten

Nach ärztlicher Aufklärung (siehe Punkt 7.5 im Anhang) zu möglichen Risiken und Folgen einer Blutabnahme wurde gesunden Probanden im Alter von 21 bis 55 Jahren jeweils 7,5 mL Blut mittels einer Safety-Multifly-Kanüle (21) aus einer geeigneten Ellenbeugenvene in ein Lithium-Heparin-Blutabnahmeröhrchen (22) entnommen.

Im Vorfeld des Versuches wurden zwei 15 mL Zentrifugenröhrchen (23) mit jeweils zwei Medien unterschiedlicher Dichte für die spätere Dichtegradientenzentrifugation vorbereitet: 3 mL Leuko-Spin-Medium (24) wurden mit 3 mL PBMC-Spin-Medium/Lympho-Spin-Medium (25) überschichtet. Auf jedes der Röhrchen wurde anschließend als oberste Schicht nun 3 mL des entnommenen Blutes gegeben, sodass das Zentrifugenröhrchen schließlich drei Schichten mit insgesamt 9 mL enthält (siehe Abbildung 3).

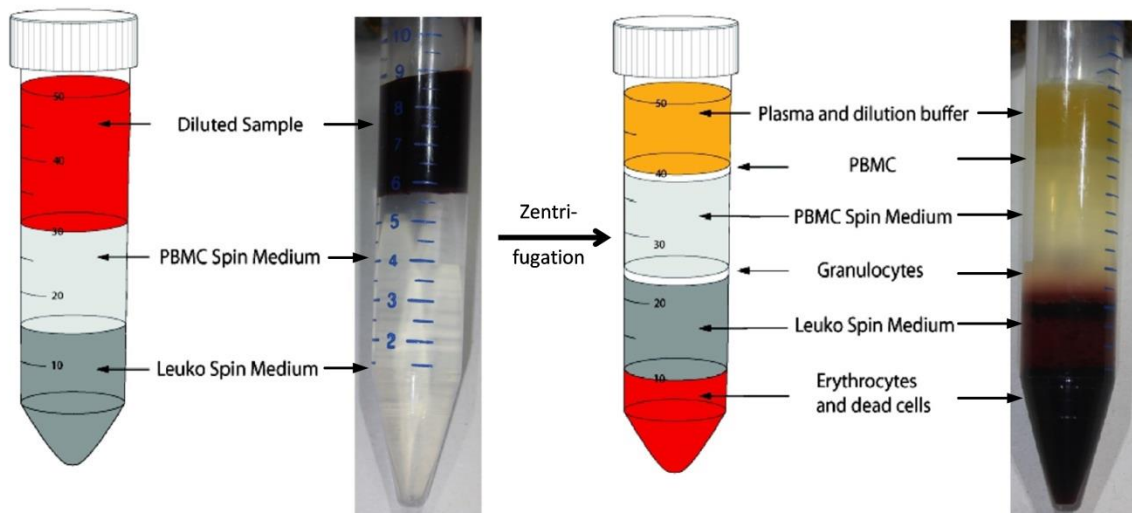


Abbildung 3 [77]: Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation mittels Leuko-/Lymphospin-Technik

Im Anschluss wurden die beiden Röhrchen 20 min in der Zentrifuge (26) bei 276 g ohne Zentrifugenbremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erhielt man verschiedene makroskopisch gut abgrenzbare Schichten (Abbildung 3) beziehungsweise Ringe, die jeweils unterschiedliche Zellarten enthielten. Die über den Granulozyten liegenden Schichten wurden mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Vom nun direkt zugänglichen Granulozytenring wurde je Röhrchen vorsichtig 1 mL abgehoben und in ein leeres 15 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Insgesamt erhielt man 2 mL einer Granulozytenlösung in Spinmedium, deren Konzentration jedoch unbekannt ist, weil die beschriebene Methode sehr variierende Konzentrationen an Granulozyten liefert.

Um in der Zellsuspension eine Konzentration von 18 Millionen Zellen pro mL zu erreichen, wurden zur Zellzahleinstellung 10 μ L von der gewonnenen Granulozytenlösung auf eine Neubauer-Zählkammer (27) gegeben. Mit Hilfe dieser Neubauerkammer (siehe Abbildung 4) wurde die Zellzahl pro Milliliter ermittelt.

In der Zwischenzeit wurde die Granulozytenlösung mit 4 mL Dulbecco's-Phosphate-Buffered-Saline-Waschpuffer („PBS“ (28)) und anschließend 5 min bei 272 g zentrifugiert. Man erhielt dadurch ein „Granulozytenpellet“ am Boden des Zentrifugenröhrchens. Das über diesem Pellet befindliche Spinmedium-Waschpuffer-Gemisch wurde dann mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Das notwendige Volumen für die Herstellung der endgültigen Granulozytenlösung wurde anhand der zuvor in der Neubauerkammer ermittelten Zellzahl errechnet. Schließlich wurde der Granulozytenpellet mit diesem ausgerechneten Volumen an Nährmedium RPMI-1640, welches mit 10% FKS versetzt worden war, aufgenommen.

Durch dieses Prozedere wurde das Spinmedium entfernt, und man erhielt eine Granulozytenlösung im Nährmedium RPMI (mit 10% FKS) mit der für die Beobachtung im Mikroskop optimalen Konzentration von 18 Millionen Zellen pro mL. Diese Zellsuspension war Ausgangspunkt für die nachfolgende Herstellung des Zell-Matrix-Gemisches (siehe Punkt 2.3.3).

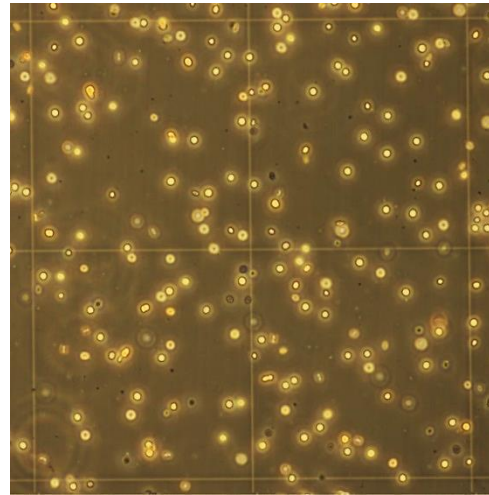


Abbildung 4: Zählfläche der Neubauer-Zählkammer, mittels der die Zellzahl pro mL ermittelt wurde

2.3.2 Färbemethoden zur Sichtbarmachung granulozytenspezifischer Immuneffekte

Während die Migration im Phasenkontrast der Weißlichtmikroskopie beobachtet wurde, wurden zur Sichtbarmachung der granulozytenspezifischen Immuneffekte verschiedene Fluoreszenzfärbungen in den Versuchsaufbau integriert. Hierfür wurden verschiedene Färbelösungen zur fertigen Zellsuspension (siehe Punkt 2.3.1) gegeben, wobei für jeden Immuneffekt eine jeweils unterschiedliche Methode eingesetzt wurde (siehe unten).

Zur ROS-Analyse wurden die Fluoreszenzeigenschaften von 1,2,3-Dihydrorhodamin (DHR) genutzt. DHR-Färbelösung (29) im Lösungsmittel Dimethylformamid (30) wurde durch PBS verdünnt, sodass die letztendliche Konzentration von DHR in der Zellsuspension bei jedem Versuch 1 μM betrug. Durch ROS wurde DHR zu Rhodamin oxidiert. Rhodamin konnte im Wellenlängenbereich von 490 nm des elektromagnetischen Spektrums zur Fluoreszenz angeregt werden und emittierte nach Anregung Licht einer Wellenlänge von 532 nm (siehe Tabelle 13) [35].

NETosis wurde durch den DNA-Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht. Dazu wurde DAPI (31) durch Verdünnung mit RPMI in einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ in der Zellsuspension eingesetzt. Der DAPI-Farbstoff lagerte sich an AT-reiche Regionen von doppelsträngiger DNA an und gab im Bindungszustand nach Anregung mit ultraviolettem Licht (385 nm) eine Fluoreszenzantwort im blauen Lichtbereich (461 nm) des sichtbaren Spektrums ab (siehe Tabelle 13). Nach der Ruptur von Kern- und Zellmembran lagerte sich DAPI unmittelbar an die nukleinsäurereichen NETs an, wodurch diese sichtbar wurden [78, 79].

MPO wurde durch einen monoklonalen Anti-MPO-Antikörper markiert, welcher wiederum an Allophycocyanin (APC) gebunden war. Anti-MPO-APC (32) wurde mit einer Konzentration von $0,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ in der Zellsuspension eingesetzt. APC fluoreszierte nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 635 nm bei einer Wellenlänge von 660 nm (siehe Tabelle 13) und machte freigesetzte MPO auf diese Weise in Kombination mit dem Anti-MPO-Antikörper für eine Aufzeichnung zugänglich [67].

2.3.3 Aufbau und Vorbereitung der Chemotaxis-Kammern

Für die Chemotaxis- und Migrationsstudien wurden μSlide -Chemotaxiskammern[®] (33) verwendet (siehe Abbildung 5).



Abbildung 5 [80]: Aufbau der μSlide -Chemotaxiskammern[®]

Diese enthielten an je drei Positionen in der Mitte einen Kanal, der mit einer Gelmatrix gefüllt wurde. Diese Gelmatrix wurde in noch flüssigem Zustand vor Einfüllen in diesen Kanal mit einer zuvor hergestellten Suspension aus PMNs (siehe 2.1.1 und 2.1.2) in einem Safe-Lock-Tube vermischt, in den Kanal eingefüllt und härtete dort schließlich aus. Genauere Details zu Methodenentwicklung und Herstellung der Gelmatrizes finden sich im Kapitel 2.2. Eine

Übersicht über die letztendlich für die PMN-Funktionalitätsprüfung verwendeten Gelmatrizes gibt Tabelle 15 auf Seite 54.

Links und rechts dieses Kanals befinden sich zwei Reservoirs. Das linke Reservoir wurde bei allen Versuchen nach Aushärten der Matrix mit einer 10 nM Lösung fMLP (34) gefüllt. In das rechte Reservoir wurde analog das Medium RPMI gegeben.

Jede einzelne Kammer wurde vor Beginn der Versuche für mindestens 6 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Beim Bestücken der einzelnen Kanäle der Kammer wurde eine 37°C warme Heizplatte als Unterlage verwendet.

2.3.4 Mikroskopische Betrachtung („live cell imaging“)

Die μ -Slide-Kammern wurden umgehend nach Bestückung in die Klimakammer des Inversionsmikroskops gegeben. Durch die beiden Komponenten *ibidi Heating System* und *ibidi Gas incubation System for CO₂* (35) wurde dort eine Atmosphäre mit 37°C, 5% CO₂ und 50% Luftfeuchtigkeit erzeugt.

Die Migrations- und Fluoreszenzmessungen wurden mit dem Inversionsmikroskop Leica DMI8 (36) durchgeführt. Die Fotoaufnahmen hierzu wurden mittels der sCMOS-schwarzweiß-Kamera Leica DFC9000 GT (37) unter Verwendung eines Harmonic Compound Objektivs (10fach) (38) und der Lichtquelle CoolLED pE-4000 (39) angefertigt. Für DAPI (λ abs. 385 nm) und Rhodamin (λ abs. 490 nm) wurde der Filterwürfel DAPI/FI (40) verwendet. Für Anti-MPO-APC (λ abs. 635 nm) der LED QUAD Filterwürfel (41). Spezifische Eigenschaften der beiden Filterwürfel können dem Anhang (40/41) entnommen werden.

Die Steuerung des Mikroskops und des Ablaufs der Beobachtung wurde computergestützt durch die Softwareplattform Leica Application Suite X (42) vorgenommen.

Die Gesamtbeobachtungszeit jedes Versuches im Mikroskop betrug 6 Stunden, wobei zu Beginn jedes Versuches die Lichtintensität und Belichtungszeit angepasst wurde. Neben Fluoreszenzaufnahmen in den spezifischen Wellenlängenbereichen zur Detektion der Immuneffekte (siehe Tabelle 13) erfolgte pro Zyklus eine vierte Aufnahme im Phasenkontrast. Zur Aufzeichnung der Migration im Phasenkontrast wurden PMNs untereinander und vom Hintergrund durch Helligkeitsunterschiede differenziert. In jedem Zyklus wurden jeweils 4 Aufnahmen im Abstand von 30 s pro IBIDI-Kanal in 10facher

Vergrößerung erstellt, sodass am Ende die Vorgänge jedes IBIDI-Kanals in 720 Einzelbildern entstanden.

Tabelle 13: Übersicht über Detektionseigenschaften der verschiedenen Immuneffekte

Effekt	Farbstoff	Anregungs-/Emissionswellenlänge	Filterwürfel
NETosis	DAPI	385 nm / 461 nm	DAPI/FI
MPO-Freisetzung	ANTI-MPO-APC	635 nm / 660 nm	LED QUAD
ROS-Produktion	Rhodamin	490 nm / 532 nm	DAPI/FI
Migration	/	Weißlicht	/

2.4 Vorgehensweise zur Auswertung des „live cell imaging“

Die Auswertung der im Mikroskop erzeugten Daten umfasste mehrere Schritte. Diese werden in Abbildung 6 schematisch dargestellt und anschließend im Text erläutert.

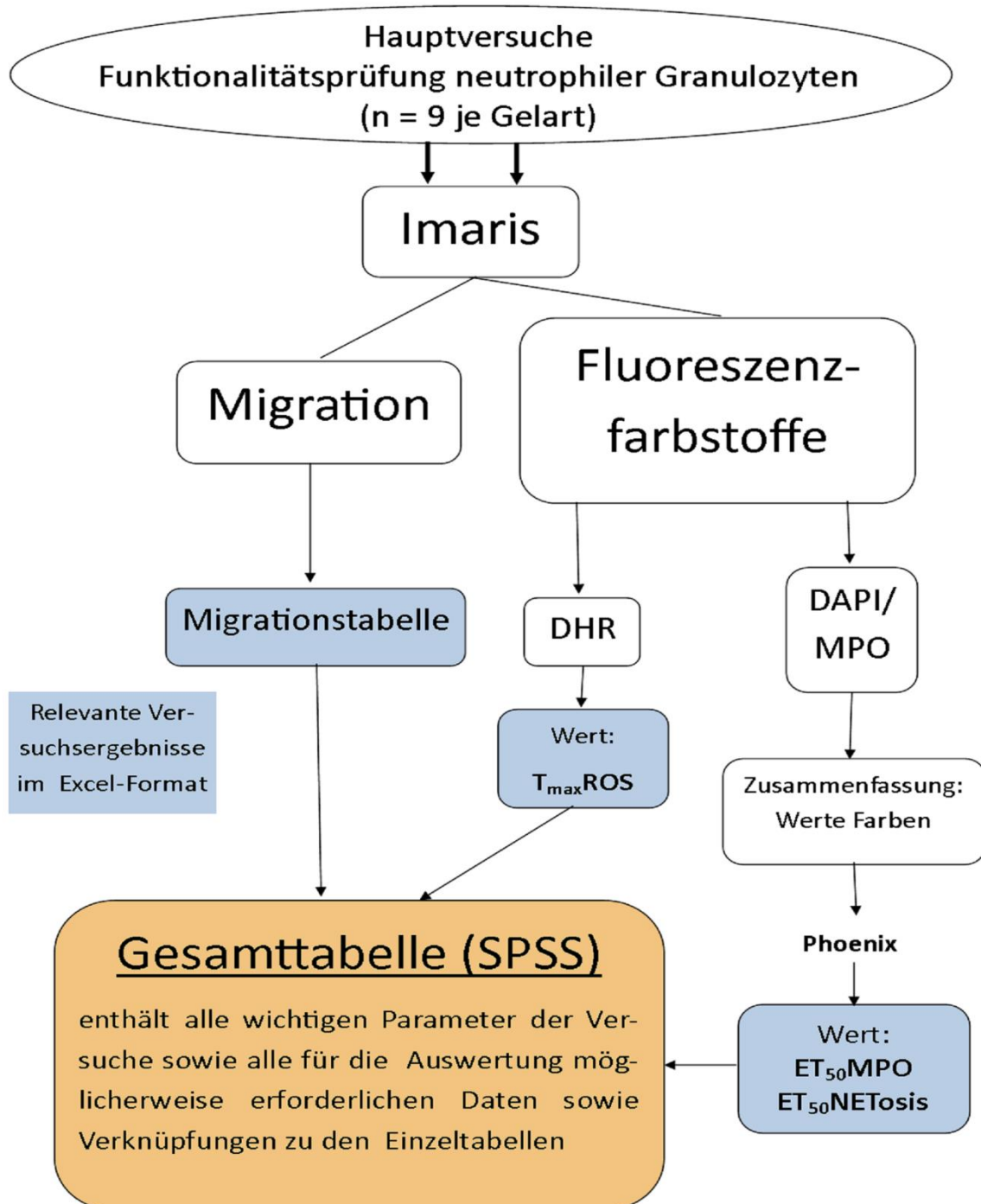


Abbildung 6: Schematischer Überblick über die einzelnen Schritte der Auswertung

2.4.1 Grundsätze der Auswertung durch die Software Imaris®

Die in den Hauptversuchen (je Gelart $n = 9$) durch das Mikroskop erzeugten Bildreihen wurden im Anschluss an den jeweiligen Versuch mithilfe der Computersoftware Imaris® (43) verarbeitet und analysiert. Dazu wurde jedes Bild des vom Mikroskop erzeugten Datensatzes in einzelne dreidimensionale Volumenelemente fest definierter Größen eingeteilt, die sogenannten Voxel. Diese Voxel besitzen jedes für sich spezifische Bildinformationen im dreidimensionalen Raum, ähnlich den sogenannten Pixel im zweidimensionalen Raum, weshalb Voxel auch als Volumenpixel bezeichnet werden [81]. Allen Berechnungen von Imaris® lag diese Definition von Voxel zugrunde.

Für die Auswertung von Bedeutung waren in erster Linie die Bewegung von Zellen und die durch die Färbungen sichtbar gemachten Immunprozesse. Die Auswertung der Migration erfolgte getrennt von der Auswertung der Fluoreszenz.

2.4.1.1 Auswertung der Migration

Imaris® unterschied aufgrund von Intensitätsunterschieden den Hintergrund von andersfarbigen Ereignissen. Die Option *Background Subtraction* verrechnete hierzu die Helligkeitsintensitäten von Zellstrukturen mit den Intensitäten der Umgebung. Jede erkannte Zelle wurde auf diese Weise im Phasenkontrast detektiert und darüber hinaus mittels sogenannter Spots markiert. Hierzu wurde in Imaris® die Option *SpotDetection* genutzt. Um nun die Migration zu quantifizieren, wurden die erzeugten Spots dann über den Beobachtungszeitraum (Laufzeit des Mikroskops) verfolgt, „getrackt“.

Der Fokus der Auswertung wurde auf die ersten 300 min gelegt, wobei dieser Zeitraum in Abschnitte zu je 30 min unterteilt wurde. Dazu wurden in Imaris® diejenige Anzahl an Bildern (46) ausgewählt, die jeweils einen solchen halbstündigen Zeitabschnitt repräsentierten.

Für die Detektion, aber auch später für die Quantifizierung, wurden für jeden Kanal wie bei einem kartesischen Koordinatensystem dreidimensionale Achsen in x-, y- und z-Richtung (siehe Abbildung 7) über die gesamte Länge des betrachteten Bildbereiches festgelegt.

Der geschätzte xy-Durchmesser der Zielzellen wurde auf $13\mu\text{m}$ gesetzt. Um Randartefakte auszuschließen, wurde die Position X der Spots zwischen $160\mu\text{m}$ und $1100\mu\text{m}$ begrenzt. Für das Kriterium *Quality* wurde ein Minimum zwischen 5 - 8 gewählt. Durch stetige Überprüfung und Anpassung der *Quality*, wurde sichergestellt, dass die richtigen Zellen ausgewählt wurden. Es wurden die Ergebnisse von Kanälen in die Auswertung aufgenommen, in denen mindestens 50 PMNs identifiziert wurden. Die Berechnung erfolgte durch den Algorithmus „*Autoregressive Motion*“ mit den Parametern *Max-Distance* = $40\mu\text{m}$ und *Max-Gap-Size* = 3 und der zusätzlichen Auswahl der Option „*Fill gaps with all detected objects*“. Schließlich wurden die Parameter *Render-Quality* = 0,5 und *Radius-Scale* = 1,00 definiert. Es wurde das Kriterium *TrackDuration* für die jeweiligen 30 min Zeiträume auf $> 1000\text{ s}$ gesetzt. Zusätzlich wurde der Filter *TrackDisplacementLength* $> 10\mu\text{m}$ festgelegt. Dadurch konnten folgende Migrationsgrößen bestimmt werden (Siehe Tabelle 14):

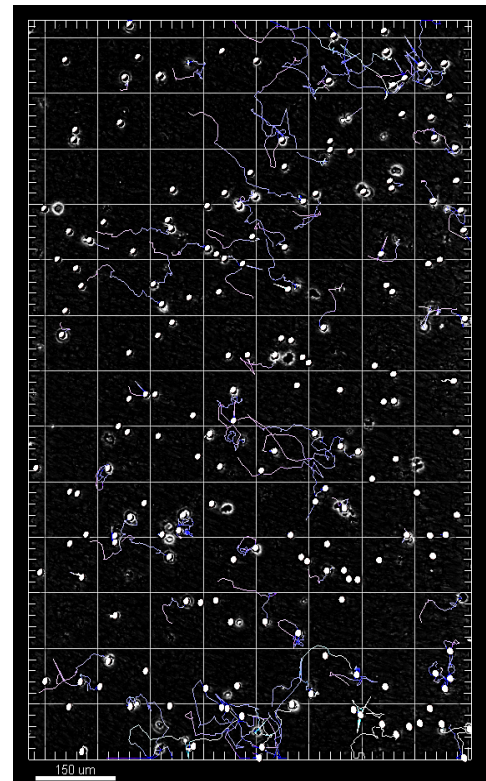


Abbildung 7: Darstellung der Migrationsauswertung durch Spots (graue Kugeln) und Tracks (blaue Linien) in Imaris

Tabelle 14: Zur Quantifizierung der Migration erfasste Parameter

TrackDisplacement X (TDX) [μm]	Zurückgelegte Wegstrecke in x-Richtung
TrackDisplacement Y (TDY) [μm]	Zurückgelegte Wegstrecke in y-Richtung
TrackLength (TL) [μm]	Tatsächlich zurückgelegte Wegstrecke
TrackDisplacementLength (TDL) [μm]	Euklidische Distanz zwischen Ausgangs- und Endpunkt
TrackSpeedMean (TSM) [$\frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$]	Durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit
TrackStraightness = $\frac{\text{TrackDisplacementLength}}{\text{TrackLength}}$	Maß für die Zielgerichtetheit der Bewegung
TrackDuration [s]	Dauer der „getrackten“ chemotaktischen Migration

Die durch die beschriebene Vorgehensweise erzeugten Datensätze wurden als Tabelle aus Imaris[®] exportiert und weiter in Excel[®] 2016 (44) bearbeitet (siehe Abbildung 6).

2.4.1.2 Auswertung der granulozytenspezifischen Immuneffekte

Jedem Fluoreszenzwellenlängenbereich und damit jedem Immuneffekt wurde digital eine künstliche Farbe zugeordnet. NETosis wurde in Falschfarbe blau (*Channel blue*), Veränderungen der MPO-Freisetzung in grüner (*Channel green*) und die ROS-Produktion in roter Falschfarbe (*Channel red*) am Computer in Imaris[®] dargestellt. Durch die verschiedenen Färbemethoden und Wellenlängenbetrachtungen hoben sich die PMNs bei Aktivierung des jeweiligen Immuneffekts durch ihre Intensität vom Hintergrund ab. Überschritt die Fluoreszenz einer Zelle eine festgelegte Grenzintensität, wurde dies durch Imaris[®] erfasst. Die Gesamtfläche aller aktivierten Zellen pro Mikroskopbild (Zeitpunkt) wurde durch Imaris[®] anhand der „*Number of Voxels*“ (*Anzahl der Voxel*) berechnet.

Die Fläche aller zu einem Zeitpunkt aktivierten Zellen wurde ermittelt, indem in Imaris[®] die Option *Create Surface* benutzt wurde, wobei der jeweils zu analysierende Kanal (*blue, green, red*) ausgewählt wurde. Bei den Oberflächendetails (*Surface Detail*) wurde ein Bereich von 5 µm festgesetzt. Zusätzlich wurde mit einer *Center Point* von 5 *Pixel Weite* gearbeitet. Zur Berechnung der Flächen wurde wie bei der Migrationsauswertung die Option *Background Subtraction (Local Contrast)* verwendet. Der Durchmesser des größten Farbumfelds (*Diameter of largest Sphere which fits into the Object*) wurde auf 15 µm begrenzt. Die Grenzen für die Sensitivität der *Background Subtraction* sowie die Größe der Farbpunkte, also die Anzahl der Voxel, repräsentiert durch die Option *Area*, wurden für jeden Kanal individuell angepasst. Die erzeugten Daten wurden nach Excel[®] exportiert (siehe Abbildung 6).

2.4.2 Weiterführende Auswertungen mit den Kalkulationsprogrammen

Certara Phoenix[®] und Microsoft Excel[®]

Während die aus Imaris[®] exportierten Migrationsdaten direkt in die Gesamttabelle für die statistische Betrachtung übertragen wurden, wurden die erhobenen Immuneffektdaten über mehrere Schritte aufbereitet (siehe Abbildung 6).

Die exportierten Tabellen der Immuneffekte schlüsselten für jeden definierten Bildzeitpunkt die erkannten Flächen einzeln und getrennt auf. Der Verlauf der Immuneffektfunktionen

wurde ausgewertet, indem mittels Excel[®] für jeden Bildzeitpunkt die Flächen addiert und diese pro Bildzeitpunkt summierten Flächen als Funktion der Zeit aufgetragen wurden.

Die sich nun anschließende Verarbeitung dieser Zeit-Flächen-Beziehung unterschied sich jeweils entsprechend der betrachteten Parameter.

2.4.2.1 Weitere Verarbeitung der Datensätze der ROS-Produktion

Die Gesamtfluoreszenzflächen des *Channel red* an den einzelnen Zeitpunkten wurden in Beziehung mit der Versuchszeit gesetzt. Für den auf diese Weise erhaltenen zeitlichen Verlauf des Immuneffekts ROS-Produktion wurde eine Maximumkurve als Erwartungskurve angenommen [67]. Anhand dieser typischen Verlaufskurve wurde der Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion ($T_{\max\text{ROS}}$), also der Zeitpunkt, an dem im *Channel red* die meisten Zellen fluoreszierten, bestimmt. Durch grafische Darstellung der Beziehung zwischen der Zeit und den Flächensummen der fluoreszierenden Zellen an den einzelnen Zeitpunkten wurde ein Hochpunkt als Maximum definiert. Zur genaueren Bestimmung wurde ein Bereich von ± 5 Bildpunkten um den Punkt der größten Flächensumme herum ausgewählt (siehe Abbildung 8).

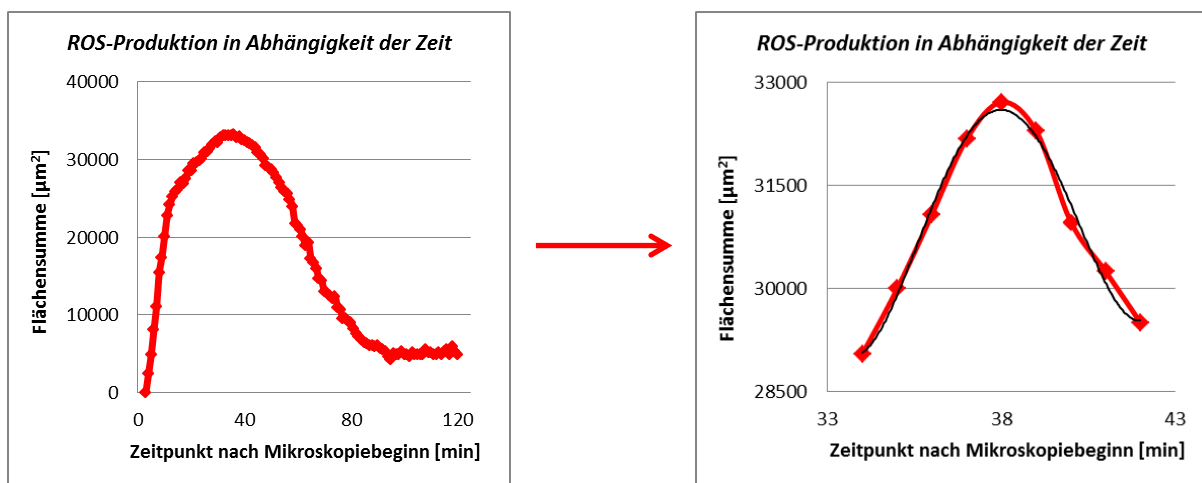


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Beziehung der ROS-Produktion über die Gesamtzeit des Versuches (links) und Auswahl des Maximumbereiches (rechts) mit Darstellung der Berechnung eines Polynom dritten Grades (Trendlinie) zur Bestimmung des $T_{\max\text{ROS}}$ durch Ableitung und Nullstellenbestimmung

Für diesen Bereich wurde durch Excel[®] anhand der Messpunkte ein Polynom dritten Grades errechnet, von dem dann mittels zweier Freeware Rechenprogramme [Polynomrechner (Matheretter) und Nullstellenrechner (Arndt-Brünner)] und durch Ableitung und Nullstellenbestimmung der Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion berechnet wurde [82,

83]. Hierbei wurde durch den Gültigkeitsbereich der Funktion das richtige Maximum festgelegt.

Abschließend wurden die unterschiedlichen Zeitpunkte der maximalen ROS-Produktion in den jeweiligen Gelmatrizes miteinander verglichen.

2.4.2.2 Weitere Verarbeitung der Datensätze von NETosis und MPO-Freisetzung

Bei diesen beiden Immuneffekten wurde für die Beziehung zwischen der Zeit und den Flächensummen an den einzelnen Zeitpunkten eine sigmoidale Verlaufskurve angenommen, welche sich allgemein durch folgende Gleichung beschreiben lässt:

$$E = E_0 \cdot \frac{E_{max} \cdot T^\gamma}{ET_{50}^\gamma + T^\gamma}$$

- E*: Ermittelter Wert des Effektes
- E*₀: Initiale Effekthöhe
- E*_{max}: Maximale Effekthöhe
- T*: Zeit
- γ*: „Steilheit“ der Effektänderung
- ET*₅₀: Zeitpunkt des halbmaximalen Effektes

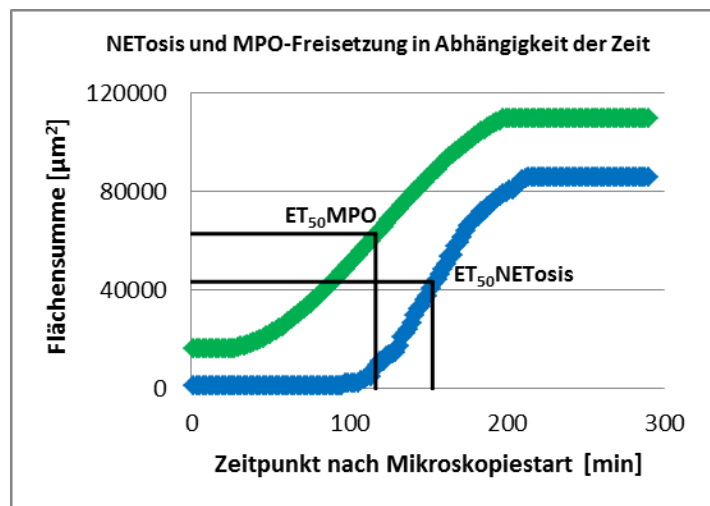


Abbildung 9 [67]: Mathematische Formel und graphische (Schema-)Darstellung einer Funktion zur Berechnung der *ET*₅₀-Werte von NETosis und MPO-Freisetzung durch Phoenix®

Als Maß für die NETosis oder den MPO-Release wurden die Zeitpunkte definiert, bei denen die halbmaximale Effekthöhe erreicht wurde (sogenannter *ET*₅₀-Wert). Um diesen zu bestimmen, wurden die vorbereiteten Daten (siehe Punkt 2.4.2) mittels der Computersoftware Phoenix® (45) graphisch dargestellt, und die geforderten Werte berechnet. Den Berechnungen der Software lag die oben beschriebene Formel zu Grunde.

Die auf diese Weise durch Phoenix® erhaltenen *ET*₅₀-Werte wurden ins Excel®-Format exportiert (siehe Abbildung 6) und dienten als Vergleichsparameter zu den Werten der anderen Gelarten.

2.4.3 Normierung auf Zeitpunkt des Gelkontaktes als gemeinsamen

Referenzpunkt

Als Vergleichsgrößen wurden letztlich Zeiten beziehungsweise Zeitpunkte verglichen, denen eine bestimmte Bedeutung (Abbildung 8, Abbildung 9) zugeordnet wurde. Als einheitlicher Referenzpunkt wurde der Zeitpunkt des ersten Kontaktes von PMNs und Gelmatrix gewählt.

Aufgrund der 15 Minuten kürzeren Aushärtungszeiten von Kollagen-III-Matrizes (siehe Punkt 2.2.3) wurde eine Anpassung der definierten Beobachtungsbereiche für die Migrationsauswertung vorgenommen. Bei allen Matrizes wurde der Erstkontakt der Zellen mit der Gelmatrix als Start- bzw. Referenzpunkt festgesetzt. Bei Kollagen III wurde der erste Beobachtungsbereich auf 15 min begrenzt, wobei dieser keiner vergleichenden Analyse unterzogen wurde. Dadurch startete der zweite Zeitraum bei Kollagen III in Bezug auf den Referenzpunkt parallel zum ersten Beobachtungszeitraum der übrigen Gelmatrizes.

Für die Bezeichnung der einzelnen zu vergleichenden Migrationsabschnitte wurde die jeweilige Minutenzahl ab Zeitpunkt des Vergleichsbeginns gewählt. So wurde beispielsweise der Bereich Minute 0 bis Minute 30 Bereich „0-30“ genannt. Bei Kollagen III wurde diese Zählung erst nach den ersten 15 Minuten, also zu Beginn des zweiten Abschnitts, begonnen.

Abbildung 10 gibt einen schematischen Überblick über die Einteilung und Anpassung der 30-min-Beobachtungszeiträume. Es wird ein Zeitstrahl mit den verschiedenen Abschnitten der Experimente dargestellt. Alle Experimente haben den gemeinsamen Startpunkt (a). Aufgrund der verschiedenen Aushärtungszeit (b) beginnt bei Kollagen III der Start der Mikroskopie (c) 15 min früher. Bei Kollagen III erfolgte eine Anpassung der Bezeichnung (IIa) → (IIb). Durch die alternative Bezeichnung (IIb) konnte ein Vergleich mit den übrigen Gelen (I) durchgeführt werden.

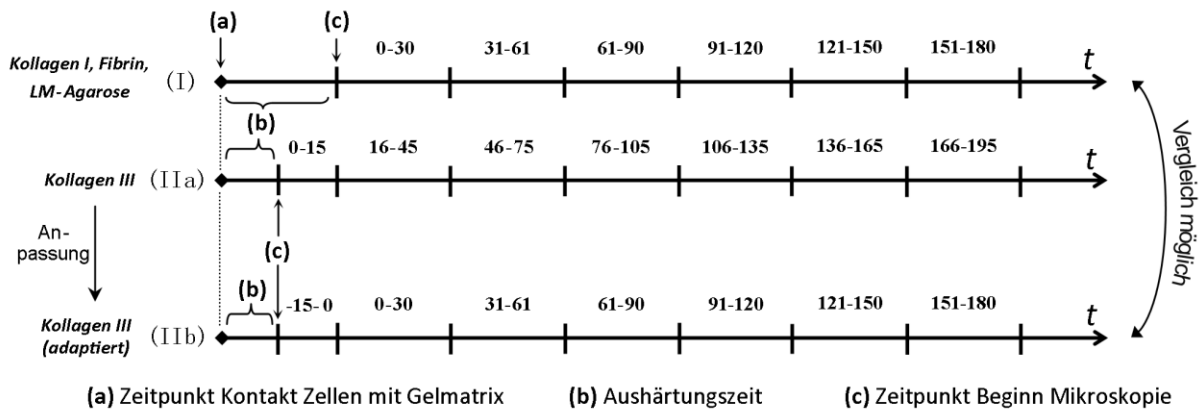


Abbildung 10: Einteilung und Anpassung der Migrationsauswertung in 30-min-Blöcke, Darstellung der Beziehung untereinander und zum Referenzpunkt Gelkontakt

2.4.4 Statistik

Die Auswahl und Anwendung der im Folgenden beschriebenen Statistikmethoden erfolgte unter Berücksichtigung der Methodenberatung Statistik der Universität Zürich (UZH) [84].

Die statistische Auswertung wurde anhand der Gesamttabelle mittels der Analysesoftware IBM SPSS[®] (46) durchgeführt. Anfangs wurde jede in die Auswertung einfließende Gruppe mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Bei Normalverteilung aller in die nachfolgende Auswertung einfließenden Daten wurden bei Mehrfachvergleichen und bestehender Varianzhomogenität jeweils die Mittelwerte (MW) durch eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) unter Angabe der Standardabweichung (\pm SD) auf signifikante Unterschiede geprüft. Bestand keine Varianzhomogenität, wurde die Welch-ANOVA verwendet. Die sich anschließende Post-Hoc-Analyse erfolgte bei bestehender Varianzhomogenität nach Bonferroni. Bei bestehender Varianzheterogenität wurde die Dunn-T3-Testung benutzt. Der Test auf Varianzhomogenität wurde anhand des *Levene*-Tests durchgeführt. Zur graphischen Darstellung wurden bei Normalverteilung einfache beziehungsweise gruppierte Fehlerbalkendiagramme genutzt. Lag bei den jeweils zu vergleichenden Daten keine Normalverteilung vor, wurde ein Vergleich der zentralen Tendenzen der einzelnen zu testenden Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Testung unter Angabe der Mediane und Interquartilsabstände (IQR) durchgeführt. Die sich an diesen Test anschließende Post-Hoc-Analyse erfolgte durch Dunn-Bonferroni-Testung. Dadurch erhielt man paarweise Vergleiche der Mediane. Die graphische Darstellung nicht normalverteilter Größen erfolgte mittels einfacher und gruppierter Boxplots. Werte, die nicht im Gültigkeitsbereich der bei der Auswertung verwendeten Rechenfunktionen enthalten waren

oder außerhalb der Zeiten des Versuchsverlaufs lagen, wurden als unplausibel abgelehnt. Es galt eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ als statistisch signifikant.

Die Ergebnisse von statistischen Tests wurden unter Angabe von Teststatistik (allgemein gültige Abkürzungsbuchstaben) und Freiheitsgraden (df) in folgender Darstellung aufgeführt: Test(df) = Teststatistik. Ferner wurden Ergebnisse von statistischen Tests in Tabellen zusammengefasst.

Die Fallzahl der in die Auswertung eingeflossenen Versuche wurde jeweils in Klammern mit angegeben. Soweit erforderlich wurde mathematisch auf drei Nachkommastellen gerundet. Wurden keine signifikanten Unterschiede einzelner Mediane beziehungsweise Mittelwerte explizit angegeben, waren sie statistisch nicht unterscheidbar.

3 Ergebnisse

In Kapitel 3.1 werden die qualitativen Eigenschaften und Charakteristika der verschiedenen Gelmodifikationen der Vorversuchsreihen besprochen. Die Ergebnisse der quantitativen PMN-Funktionsprüfung sind in Kapitel 3.2 erfasst.

3.1 Ergebnisse der Vorversuche

3.1.1 Ergebnisse der Modifikation von Matrizes aus Kollagen I

Durch die unter Punkt 2.2.1 beschriebene Methode konnte eine für den Versuchsaufbau dieser Arbeit geeignete Kollagen-I-Matrix hergestellt werden. Eine Modifikation war nicht notwendig.

3.1.2 Ergebnisse der Modifikation von Matrizes aus Kollagen II

3.1.2.1 Erste Vorversuchsreihe Kollagen II

Die im Rahmen der ersten Vorversuchsreihe entstandenen Kollagen-II-Matrizes (Bestandteile und Abkürzungen siehe Tabelle 2) zeigten folgende Charakteristika:

- Gele der Konzentration $1,5 \frac{mg}{mL}$ (a) wiesen einen sauren pH-Wert ($pH = 3 - 4$) auf und wurden im Kanal nicht fest.
- Gele der Konzentration $1,5 \frac{mg}{mL}$ (b) wiesen einen neutralen pH-Wert ($pH = 7$) auf, verteilten sich jedoch nicht homogen im Kanal. Migration, NETosis und ROS-Produktion der PMNs fanden im Gel statt. Ein eindeutiger MPO-Effekt konnte nicht detektiert werden.

- Gele der Konzentrationen $1,67 \frac{mg}{mL}$ und $2,5 \frac{mg}{mL}$ zeigten gute Festigkeitsergebnisse, jedoch konnte bei beiden Gelen keine Migrationsfähigkeit der PMNs beobachtet werden.

3.1.2.2 Zweite Vorversuchsreihe Kollagen II

Die im Rahmen der zweiten Vorversuchsreihe hergestellten Kollagen-II-Matrizes (siehe Tabelle 3) brachten folgende Ergebnisse:

- Gele der Konzentration $c = 3 \frac{mg}{mL}$ verteilten sich nicht homogen im Kanal.
- Gele der Konzentration $2,5 \frac{mg}{mL}$ verteilten sich gut im Kanal, jedoch bewegten sich die PMNs in diesen Gelen nicht.
- Bei Gelen mit $c = 1,5 \frac{mg}{mL}$ setzte verstärkte Klumpenbildung ein, die die Homogenität beeinträchtigte. Zwar waren teilweise Migration, sowie Immuneffekte beobachtbar, insgesamt konnte jedoch kein homogenes Gel reproduziert werden.
- Gele der Konzentration $1,0 \frac{mg}{mL}$ wiesen nicht die nötige Festigkeit auf.

3.1.2.3 Dritte Vorversuchsreihe Kollagen II

Die Ergebnisse der dritten Vorversuchsreihe Kollagen II lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Gele der dritten Vorversuchsreihe wurden nicht fest (siehe Tabelle 4).
- Es bildete sich im Laufe der mikroskopischen Beobachtung ab $t = 35$ min bei Konzentration $1,5 \frac{mg}{mL}$ eine netzartige Struktur, die man im Phasenkontrast erkennen konnte.

3.1.2.4 Vierte Vorversuchsreihe Kollagen II

Die Ergebnisse der Gelansätze der vierten Vorversuchsreihe Kollagen II (siehe Tabelle 5) lauteten:

- Bei keinem dieser Ansätze ließ sich ein homogenes Gel herstellen.
- Bei allen Ansätzen wurde das Gel ausgeschwemmt.
- Es bildeten sich lediglich Gelklumpen, die im Kanal verblieben.
- Weder Migration noch Immuneffekte konnten beobachtet werden.

3.1.3 Ergebnisse der Modifikation von Matrices aus Kollagen III

3.1.3.1 Erste Vorversuchsreihe Kollagen III

Kollagen-III-Gele der ersten Vorversuchsreihe (siehe Tabelle 6) wiesen folgende Eigenschaften auf:

- Die Gele wurden nicht fest.
- Die Gele wiesen insgesamt einen pH-Wert im saurem Bereich auf.

3.1.3.2 Zweite Vorversuchsreihe Kollagen III

Die Kollagen-III-Gele der zweiten Vorversuchsreihe (siehe Tabelle 7) brachten folgende Ergebnisse:

- Gele der Konzentration $1,5 \frac{mg}{mL}$ und $1,0 \frac{mg}{mL}$ wurden fest.
- Gele der Konzentration $0,5 \frac{mg}{mL}$ wiesen keine ausreichende Stabilität auf.
- Alle Gele besaßen insgesamt einen pH-Wert im stark basischen Bereich.
- PMNs überlebten in den polymerisierten Matrices nicht.

3.1.3.3 Dritte Vorversuchsreihe Kollagen III

Die Ergebnisse der dritten Vorversuchsreihe Kollagen III mit Gelen der Konzentration $1,5 \frac{mg}{mL}$ (siehe Tabelle 8) lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Alle Gele dieser Vorversuchsreihe bildeten eine stabile, homogene Matrix.
- In Gelen mit basischen pH-Werten ($pH > 8$) war der größte Anteil der PMNs bereits unmittelbar nach Aushärtung tot.
- Durch Verringerung der NaOH-Konzentration in den Gelen wurde der Anteil der toten Zellen minimiert.
- Bei Gelen mit neutralem pH-Wert ($pH = 7,0$) überlebte der größte Anteil der PMNs den Aushärtungsprozess.
- Bei Gelen mit neutralem pH-Wert war keine PMN-Migration feststellbar; die ROS-Produktion war früh ausgeprägt. NETosis und MPO-Freisetzung waren in geringer Ausprägung beobachtbar.

3.1.3.4 Vierte Vorversuchsreihe Kollagen III

Im Rahmen der vierten Vorversuchsreihe hergestellte Kollagen-III-Gele der Konzentration $1,0 \frac{mg}{mL}$ (siehe Tabelle 9) zeigten folgende Ergebnisse:

- Alle Gele dieser Vorversuchsreihe bildeten eine stabile, homogene Matrix.
- In Gelen mit basischem Milieu ($pH \geq 10$) überlebten die PMNs die Aushärtungszeit nicht.

- Durch Verringerung der NaOH-Konzentration in den Gelen wurde der Anteil der toten Zellen minimiert.
- Nach Anpassung des pH-Werts an den Neutralpunkt (pH = 7) konnten alle ausgewählten PMN-Funktionsparameter (Migration, NETosis, MPO-Freisetzung und ROS-Produktion) beobachtet werden.
- In neutralen Gelen lag $T_{\max\text{ROS}}$ vor dem bisher gewählten Beobachtungszeitfenster (siehe Punkt 2.4.3).
- In neutralen Gelen war die ROS-Produktion des Großteils der PMNs nach 30 min Aushärtungszeit schon vor Zugabe von fMLP beendet.
- Die Zwischenversuche ohne Zellen ergaben, dass ein Zeitfenster 15 min für die Polymerisation des Kollagen III ausreicht.

3.1.4 Ergebnisse der Modifikation von Matrices aus Agarose

Die Ergebnisse der Vorversuche mit verschiedenen Agarosekonzentrationen (siehe Punkt 2.2.4) lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Gele mit den Konzentrationen $4 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ und $6 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ bildeten im IBIDI-Kanal zwar stabile, jedoch inhomogene Matrices.
- Die Konzentrationen $1,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, $1,0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ und $0,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ besaßen im Kanal nicht die nötige Stabilität.
- Gele der Konzentration $2,0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ bildeten zum Teil stabile Matrices im IBIDI-Kanal. Ferner konnten alle ausgewählten PMN-Funktionen beobachtet werden. Durch eine Wiederholung von Ansätzen dieser Konzentration (n = 3) konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden.

3.1.5 Ergebnisse der Modifikation von Matrices aus Low-Melting-Agarose

Die Ergebnisse der Modifikation von LM-Agarosematrices (siehe Punkt 2.2.5) lassen sich so zusammenfassen:

- Gele mit $5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, $3,33 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, $3 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ verhielten sich sehr starr und zeigten Rissbildungen.
- Gele der Konzentration $2,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ bildeten eine stabile, homogene Matrix im IBIDI-Kanal. Alle ausgewählten PMN-Funktionen konnten in diesen Gelen beobachtet werden.
- Gele der Konzentrationen $1,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ und $0,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ bildeten im Kanal keine stabile Matrix und wurden durch das Befüllen der Reservoirs ausgeschwemmt.

3.1.6 Ergebnisse der Modifikation von Matrizes aus Fibrin

Die Ergebnisse der Modifikation von Matrizes aus Fibrin (siehe Punkt 2.2.6) lassen sich auf folgende Weise zusammenfassen:

- Alle Fibringele der ersten (M199) sowie der zweiten (RPMI) Vorversuchsreihe bildeten stabile, homogene Matrizes im IBIDI-Kanal.
- Ansätzen mit M199: Alle ausgewählten PMN-Funktionen konnten beobachtet und quantifiziert werden.
- Ansätze mit RPMI: Alle ausgewählten PMN-Funktionen konnten beobachtet und quantifiziert werden.

3.1.7 Ergebnisse der Integritätsprüfung der Gelmatrizes

Bei bestehender Integrität bildete die Matrix eine durchgehende Barriere, sodass die Hämatoxylinlösung ausschließlich im rechten Reservoir blieb (siehe Abbildung 11). Dies wurde bei sämtlichen Gelen, die für die PMN-Funktionalitätsprüfung etabliert werden konnten (siehe Tabelle 15, Seite 54) beobachtet.



Abbildung 11: Makroskopische Überprüfung der Integrität der Matrizes (hier am Beispiel eines LM-Agarosegels) mittels Hämatoxylin-Färbelösung; keine Ausbreitung der Farbe auf linkes Reservoir, deshalb Integrität der Matrix gegeben

Bestand keine vollständige Integrität der hergestellten Gele, so wurden jeweils beide Reservoirs durch Hämatoxylin dunkel gefärbt. Dies wurde bei Gelen beobachtet, die im Kanal keine stabile Matrix bildeten (siehe Ergebnisse Methodenentwicklung, Punkte 3.1.2 - 3.1.5).

3.1.8 Zusammenfassung der zur Funktionalitätsprüfung der neutrophilen Granulozyten verwendeten extrazellulären Gelmatrizes

Als Resultate der Vorversuche konnten folgende Gelmatrizes für die PMN-Funktionalitätsprüfung etabliert werden (siehe Tabelle 15):

Tabelle 15: Bestandteile der für die PMN-Funktionalitätsprüfung verwendeten extrazellulären Gelmatrizes

Gelkomponente		Kollagen I (1,5 $\frac{mg}{mL}$)	LM-Agarose (2,5 $\frac{mg}{mL}$)	Kollagen III (1,0 $\frac{mg}{mL}$)	Fibrin (3,0 $\frac{mg}{mL}$)
Zellsuspension	[μ L]	50	75	25	50
Kollagen-I-Lösung (3,0 $\frac{mg}{mL}$)	[μ L]	150	-	-	-
Kollagen-III-Lösung (3,0 $\frac{mg}{mL}$)	[μ L]	-	-	50	-
LM-Agarose-Lösung (10 $\frac{mg}{mL}$)	[μ L]	-	50	-	-
MEM	[μ L]	20	-	10	-
RPMI-1640	[μ L]	50	35,5	25	138
NaHCO ₃ (7,5%)	[μ L]	10	-	7,5	-
H ₂ O dest.	[μ L]	20	-	10	-
NaOH	[μ L]	-	-	22,5	-
HBSS	[μ L]	-	35,5	-	-
FKS	[μ L]	-	4	-	-
Fibrinogen (c = 5 $\frac{mg}{mL}$)	[μ L]	-	-	-	300
Thrombin (v = 25 $\frac{U}{mL}$)	[μ L]	-	-	-	12

3.2 Ergebnisse der Funktionalitätsprüfung der neutrophilen Granulozyten

Für die Gelarten Kollagen I und III, Fibrin und LM-Agarose gelang es, die vier ausgewählten Funktionselemente (siehe Kapitel 1.5) der Neutrophilen darzustellen und zu quantifizieren. Für die Gelarten Kollagen II und Agarose konnte kein Beobachtungssystem entwickelt werden. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der PMN-Funktionalitätsprüfung getrennt nach Parametern besprochen.

3.2.1 Ergebnisse Migration

In Matrizes der Gelarten Kollagen I und III, Fibrin und LM-Agarose konnte die Migrationsfähigkeit von PMNs qualitativ beobachtet und quantifiziert werden. Nachfolgend

werden die Ergebnisse der Migrationsauswertung getrennt nach den einzelnen Migrationsparametern besprochen.

3.2.1.1 Ergebnisüberblick über die Migrationsstrecken

Abbildung 12 und Tabelle 16 geben einen Überblick über die nach Zeit und Gelart aufgeteilten Beobachtungsergebnisse des Parameters TrackLength (TL).

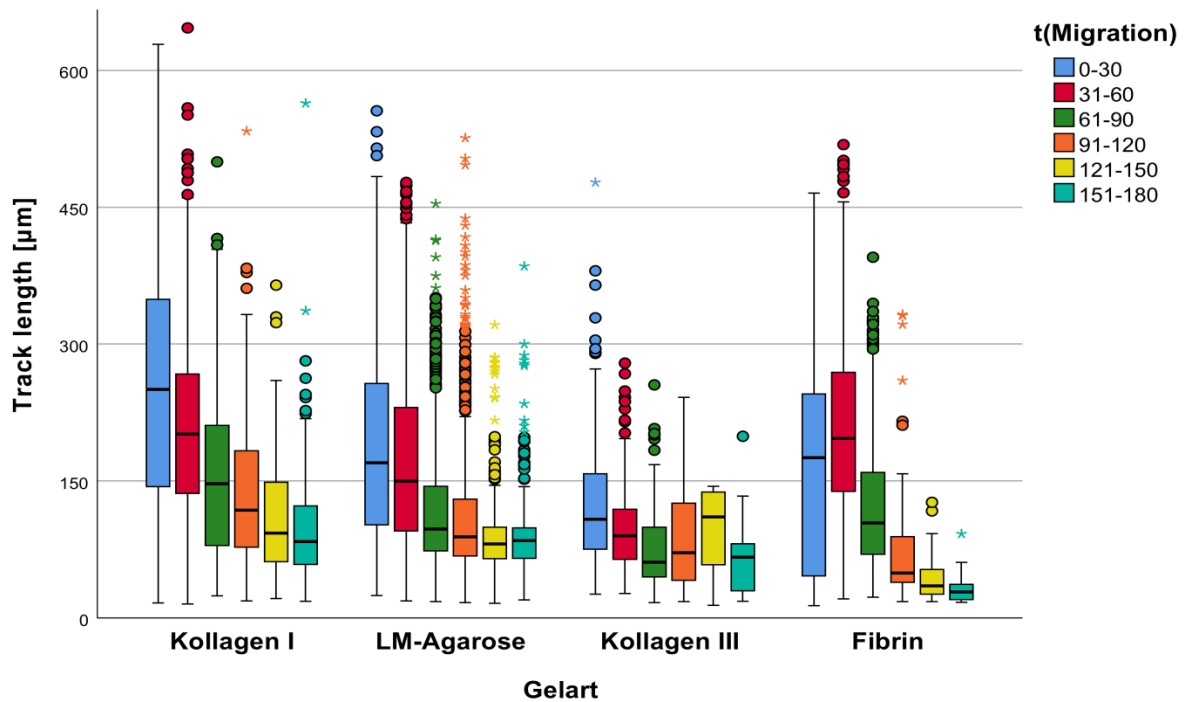


Abbildung 12: Übersicht über die Migrationsstrecken der Granulozyten (TrackLength [µm]), aufgeteilt nach Beobachtungszeiträumen und Gelarten

Tabelle 16: Tabellarische Übersicht der Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TrackLength, aufgeschlüsselt nach Gelart und Beobachtungszeitraum;
(in jeder Zelle gibt der oberste Wert ohne Klammern den Median an, der Wert in runden Klammern den Interquartilsabstand. Der Wert in eckigen Klammern enthält die Anzahl der aufgenommenen Tracks.)

	0-30	31-60	61-90	91-120	121-150	151-180
Kollagen I	250,4µm (205,5µm) [n=1280]	201,7µm (131,1µm) [n=1115]	147,0µm (131,8µm) [n=739]	118,1µm (106,0µm) [n=267]	92,8µm (87,7µm) [n=112]	83,6µm (66,6µm) [n=77]
LM-Agarose	170,1µm (154,8µm) [n=889]	150,1µm (135,5µm) [n=933]	97,4µm (71,1µm) [n=555]	88,9µm (63,0µm) [n=513]	81,0µm (34,5µm) [n=290]	84,7µm (33,6µm) [n=246]
Kollagen III	108,2µm (82,9µm) [n=373]	90,1µm (55,2µm) [n=257]	61,2µm (54,9µm) [n=118]	71,4µm (94,8µm) [n=37]	110,6µm (83,6µm) [n=18]	66,6µm (54,6µm) [n=18]
Fibrin	175,4µm (199,7µm) [n=431]	196,7µm (130,7µm) [n=427]	104,1µm (89,5µm) [n=366]	49,3µm (50,9µm) [n=107]	35,0µm (28,9µm) [n=20]	28,7µm (17,4µm) [n=12]

Für den Vergleich der Migrationsstrecken wurden die ersten drei Beobachtungszeiträume ab Zeitpunkt Gelkontakt ausgewählt und jeweils getrennt einer statistischen Analyse unterzogen. Deren Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt. Bei keinem der Zeitabschnitte war Normalverteilung gegeben. Die in die Analyse eingehenden Mediane und Interquartilsabschnitte der einzelnen Gele und Abschnitte sind Tabelle 16 zu entnehmen. Ebenso ist dort die Anzahl der einzeln detektierten Tracks [in eckigen Klammern] angegeben (Siehe Tabelle 16, Spalten: „0-30“, „31-60“ und „61-90“).

3.2.1.2 Ergebnisse Migrationslängen Abschnitt „0-30“

Abbildung 13 gibt einen graphischen Überblick über die Ergebnisse des Parameters TrackLength im Abschnitt „0-30“.

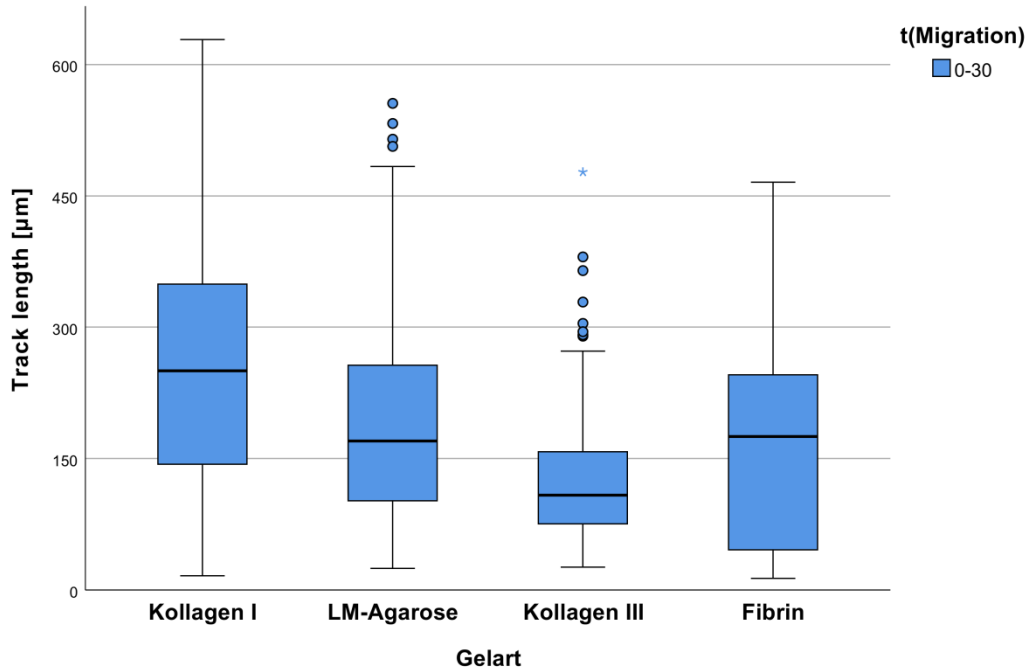


Abbildung 13: Einfacher Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TrackLength [µm] im Zeitraum "0-30", getrennt nach Gelart

Im Abschnitt „0-30“ konnte zwischen den Medianen der TL ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gelen nachgewiesen werden ($X^2(3, N=2973) = 409,831$; $p < 0,001$). Alle Mediane der TL unterschieden sich in diesem ersten Beobachtungsabschnitt untereinander signifikant (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Übersicht über die Ergebnisse der Post-Hoc-Testung des Parameters TrackLength im Abschnitt "0-30"

Gelpaare	Standardteststatistik	Signifikanz
<i>Kollagen I</i> – <i>LM-Agarose</i>	$z = -10,725$	$p < 0,001$
<i>Kollagen I</i> – <i>Kollagen III</i>	$z = -18,147$	$p < 0,001$
<i>Kollagen</i> – <i>Fibrin</i>	$z = -12,411$	$p < 0,001$
<i>LM-Agarose</i> – <i>Kollagen III</i>	$z = -9,718$	$p < 0,001$
<i>LM-Agarose</i> – <i>Fibrin</i>	$z = -3,798$	$p < 0,001$
<i>Kollagen III</i> – <i>Fibrin</i>	$z = -5,326$	$p < 0,001$

3.2.1.3 Ergebnisse Migrationslängen Abschnitt „31-60“

Abbildung 14 gibt einen graphischen Überblick über die Ergebnisse des Parameters TrackLength im Abschnitt „31-60“.

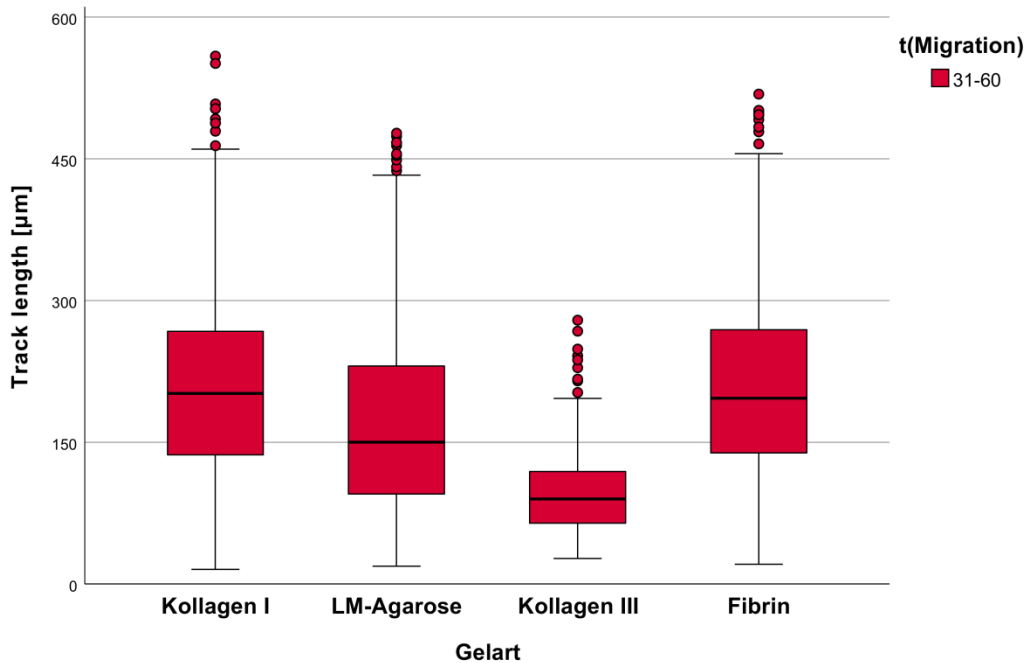


Abbildung 14: Einfacher Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TrackLength [µm] im Zeitraum "31-60", getrennt nach Gelart

Im Abschnitt „31-60“ konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der TL in den jeweiligen Gelen nachgewiesen werden ($X^2(3, N=2732)=386,334$; $p<0,001$). Ebenso unterschieden sich, mit einer Ausnahme, sämtliche Mediane der TL voneinander (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Übersicht über die Ergebnisse der Post-Hoc-Testung des Parameters TrackLength im Abschnitt "31-60"

Gelpaare	Standardteststatistik	Signifikanz
<i>Kollagen I – LM-Agarose</i>	$z = -9,747$	$p<0,001$
<i>Kollagen I – Kollagen III</i>	$z = -18,214$	$p<0,001$
<i>Kollagen I – Fibrin</i>	$z = -0,241$	$p=1,000$
<i>LM-Agarose – Kollagen III</i>	$z = -11,751$	$p<0,001$
<i>LM-Agarose – Fibrin</i>	$z = -7,194$	$p<0,001$
<i>Kollagen III – Fibrin</i>	$z = -15,809$	$p<0,001$

3.2.1.4 Ergebnisse Migrationslängen Abschnitt „61-90“

Abbildung 15 gibt einen graphischen Überblick über die Ergebnisse des Parameters TrackLength im Abschnitt „61-90“.

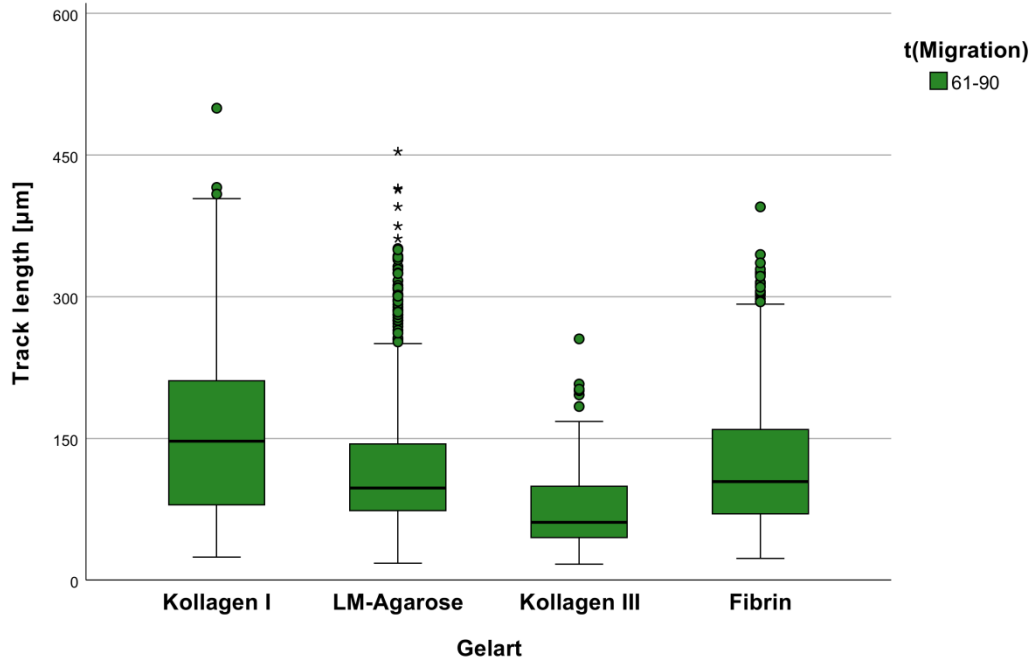


Abbildung 15: Einfacher Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TrackLength [µm] im Zeitraum "61-90", getrennt nach Gelart

Im Abschnitt „61-90“ wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der TL der einzelnen Gelarten beobachtet ($X^2(3, N=1778)=143,081$; $p<0,001$). In diesem Zeitraum unterschieden sich die Mediane der TL zwischen den Gelarten LM-Agarose und Fibrin nicht signifikant. Zwischen allen anderen Gelen wurden beim paarweisen Vergleich signifikante Unterschiede festgestellt (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Übersicht über die Ergebnisse der Post-Hoc-Testung des Parameters TrackLength im Abschnitt "61-90"

Gelpaare	Standardteststatistik	Signifikanz
<i>Kollagen I</i> – <i>LM-Agarose</i>	$z = -7,300$	$p<0,001$
<i>Kollagen I</i> – <i>Kollagen III</i>	$z = -10,783$	$p<0,001$
<i>Kollagen</i> – <i>Fibrin</i>	$z = -5,643$	$p<0,001$
<i>LM-Agarose</i> – <i>Kollagen III</i>	$z = -6,501$	$p<0,001$
<i>LM-Agarose</i> – <i>Fibrin</i>	$z = -0,732$	$p=1,000$
<i>Kollagen III</i> – <i>Fibrin</i>	$z = -6,691$	$p<0,001$

3.2.1.5 Ergebnisse Auswertung TrackDisplacementLength

Die Ergebnisse der Auswertung der Messgröße TrackDisplacementLength (TDL) sind in Abbildung 16 graphisch dargestellt. Die absoluten Ergebniswerte sind in Tabelle 20 aufgeführt.

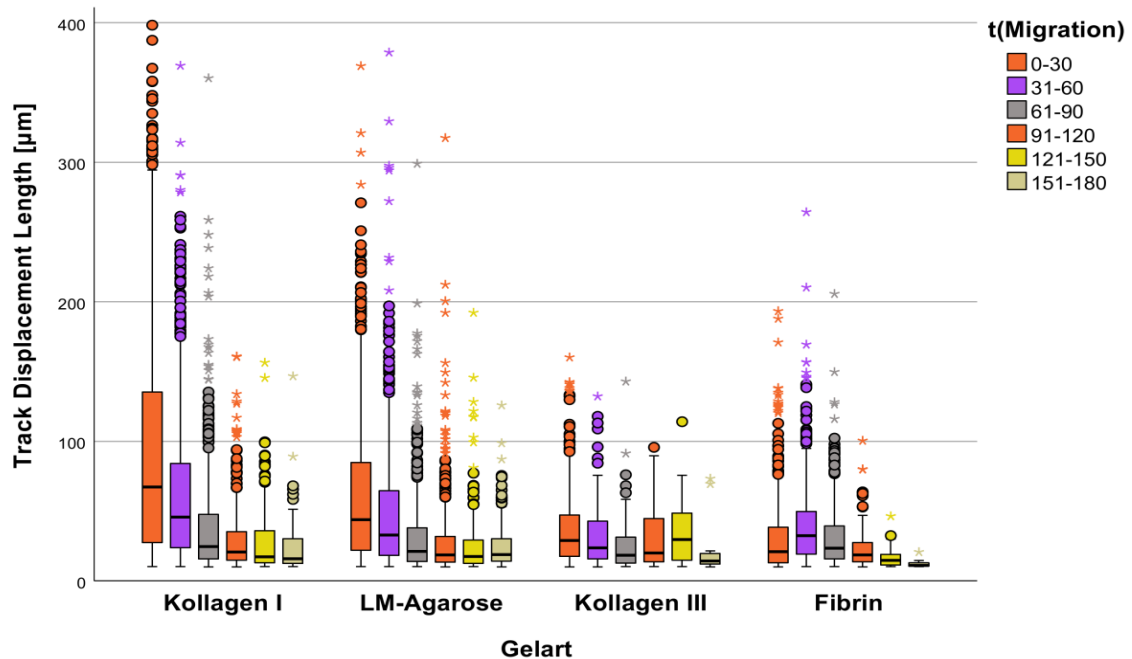


Abbildung 16: Gruppiertes Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TrackDisplacementLength (in allen beobachteten Zeiträumen)

Tabelle 20: Übersicht über die Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TDL, aufgeteilt nach Gelart und Beobachtungszeitraum

	0-30	31-60	61-90
Kollagen I	67,3µm (IQR=108,1µm)	45,7µm (IQR=60,5)	24,5µm (IQR=31,9µm)
LM-Agarose	43,7µm (IQR=62,9µm)	32,9µm (IQR=46,7)	21,1µm (IQR=24,4µm)
Kollagen III	29,0 µm (IQR= 29,6µm)	23,7µm (IQR=27,4)	18,4µm (IQR=18,8µm)
Fibrin	20,8µm (IQR=25,4µm)	32,3µm (IQR=30,9µm)	23,4µm (IQR=23,9µm)

Es wurden analog zur Auswertung des Parameters TL auch hier zur Auswertung der TDL die Medianwerte der verschiedenen Gele in den ersten drei Zeitabschnitten miteinander verglichen:

Im ersten Abschnitt „0-30“ wurde ein signifikanter Unterschied über alle Untergruppen festgestellt ($X^2(3; N=2973)=387,315; p<0,001$), wobei sich die Werte aller Gele signifikant voneinander unterschieden ($p<0,001$; Ausnahme: Kollagen III und Fibrin mit $p=0,003$). Im zweiten Abschnitt „31-60“ wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt ($X^2(3; N=2732)=129,672; p<0,001$). Hier unterschieden sich mit Ausnahme von LM-Agarose und Fibrin alle Gele signifikant voneinander ($p<0,001$). Im Abschnitt „61-90“ ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Untergruppen ($X^2(3; N=1778)=25,387; p<0,001$). Hier unterschieden sich die Werte von Kollagen I und LM-Agarose beziehungsweise von Kollagen I und Kollagen III ($p<0,001$). Ebenso wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Kollagen III und Fibrin festgestellt ($p=0,019$).

3.2.1.6 Ergebnisse Auswertung TrackStraightness

Die Ergebnisse der Auswertung des Parameters TrackStraightness sind in Abbildung 17 veranschaulicht:

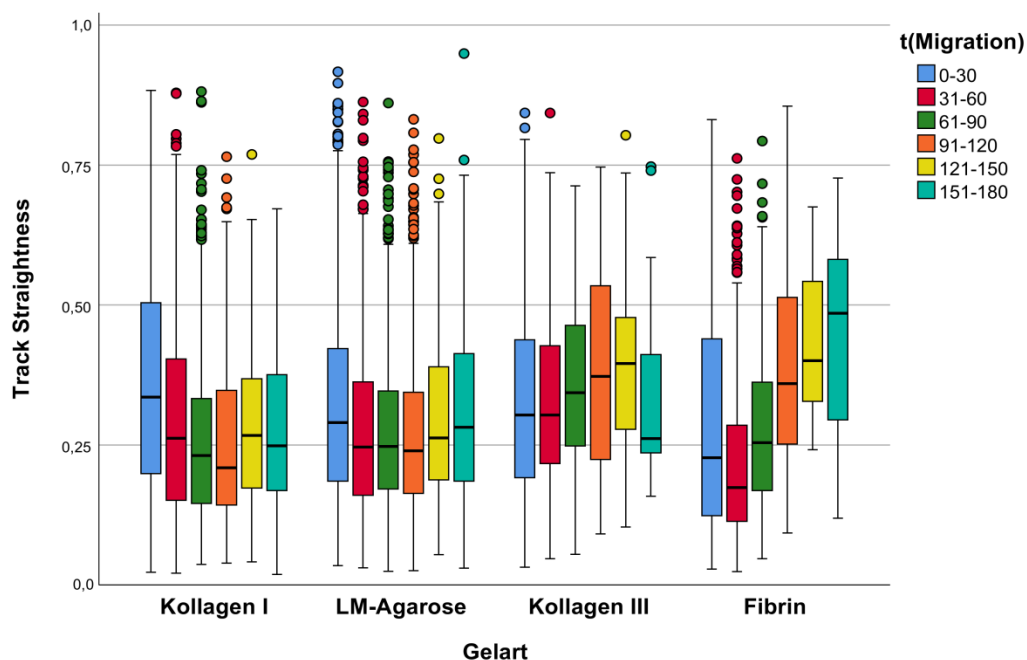


Abbildung 17: Gruppiertes Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TrackStraightness, aufgeteilt nach Gelarten und Beobachtungszeiträumen

In Kollagen-I-Matrizes fiel die Zielgerichtetheit in den ersten vier Zeiträumen kontinuierlich ab und bewegte sich zwischen 0,21 - 0,34. In LM-Agarose blieb sie auf konstantem Niveau zwischen 0,24 und 0,29. In beiden Gelen wurde der höchste Wert jeweils zu Beginn (0-30) erreicht, der niedrigste im vierten Abschnitt (91-120). Eine gegenläufige Tendenz zeigt sich in Kollagen III (mit Ausnahme des letzten Abschnitts) und in Fibrin. In diesen beiden Gelen

wurde ab dem dritten Zeitraum (61-90) bis zum letzten Abschnitt (151-180) die Zielgerichtetheit größer. In Kollagen III bewegte sich die Straightness zwischen 0,26 (151-180) und 0,40 (121-150), in Fibrin zwischen 0,17 (31-60) und 0,49 (151-180).

3.2.1.7 Ergebnisse Auswertung TrackSpeedMean

Die Ergebnisse der Auswertung des Parameters TrackSpeedMean wurden in Abbildung 18 graphisch dargestellt.

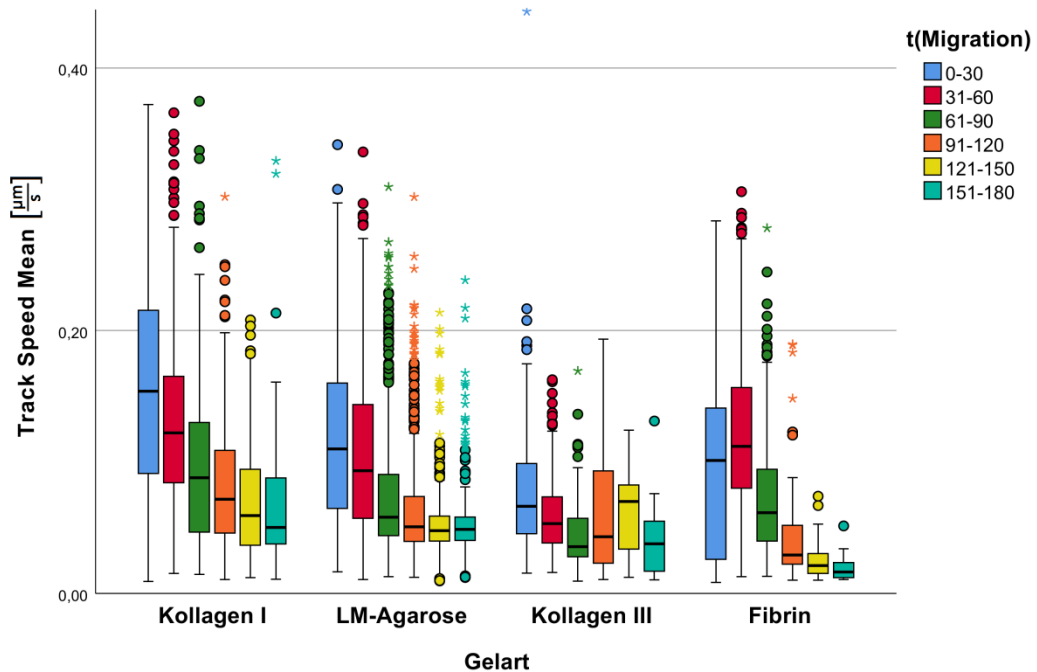


Abbildung 18: Gruppierte Boxplot zur Veranschaulichung der ermittelten Mediane und Interquartilsabstände

Bei Betrachtung des Parameters TSM lassen sich folgende Tendenzen erkennen:

In Kollagen I wird mit $TSM=0,12 \frac{\mu m}{s}$ ($IQR=0,12 \frac{\mu m}{s}$) die höchste Geschwindigkeit am Anfang (0-30) beobachtet, dann ein kontinuierlicher Abfall auf $TSM = 0,05 \frac{\mu m}{s}$ ($IQR=0,05 \frac{\mu m}{s}$) im letzten Abschnitt (151-180). Die gleiche Tendenz ergab sich in LM-Agarose mit anfänglich (0-30) höchster $TSM=0,11 \frac{\mu m}{s}$ ($IQR=0,10 \frac{\mu m}{s}$) und kleinstem Wert mit $TSM = 0,05 \frac{\mu m}{s}$ ($IQR=0,02 \frac{\mu m}{s}$) am Ende (151-180). In Fibrin wird die höchste Geschwindigkeit im zweiten Abschnitt (31-60) mit $TSM=0,11 \frac{\mu m}{s}$ erreicht, ab welchem dann die TSM stetig auf $0,02 \frac{\mu m}{s}$ ($IQR=0,01 \frac{\mu m}{s}$) im letzten Abschnitt (151-160) abfällt. In Kollagen III lässt sich vom anfänglichen (0-30) Level mit $TSM=0,07 \frac{\mu m}{s}$ ($IQR=0,05 \frac{\mu m}{s}$) ein fortdauernder Abfall der

Geschwindigkeit in den ersten drei Abschnitten auf $TSM=0,04\frac{\mu m}{s}$ (IQR= $0,08\frac{\mu m}{s}$) im dritten Abschnitt (61-90) beobachten. Die Geschwindigkeit steigt bis zum vorletzten Abschnitt (121-150) nochmals auf $TSM=0,07\frac{\mu m}{s}$ (IQR= $0,05\frac{\mu m}{s}$), um letztlich wieder auf $TSM=0,04\frac{\mu m}{s}$ (IQR= $0,04\frac{\mu m}{s}$) abzufallen.

3.2.1.8 Ergebnisse Auswertung TrackDisplacement in x- und y-Richtung

Schlüsselt man die Bewegung der Granulozyten (wie unter Punkt 2.4.1.1 beschrieben) in einem Koordinatensystem auf, so ergeben sich in x-Richtung die in Abbildung 19 veranschaulichten und in Tabelle 21 aufgeführten Ergebnisse:

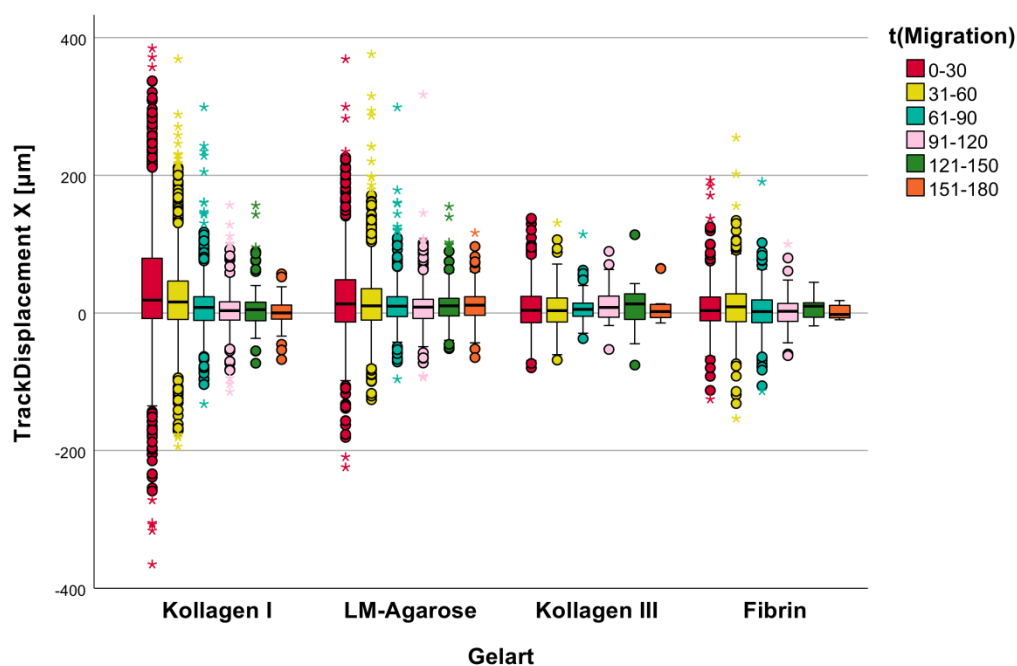


Abbildung 19: Gruppierter Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände der Messgröße TrackDisplacementX, sortiert nach Gelart und Beobachtungsabschnitt

Es wurde festgestellt, dass alle Mediane von TDX mit Ausnahme des TDX-Wertes von Fibrin im Zeitraum „151-180“ einen positiven Wert trugen.

Die Messgröße TDX wies keine Normalverteilung auf. Es ergaben sich folgende Mediane und Interquartilsabstände:

Tabelle 21: Übersicht über die Mediane (erste Zeile ohne Klammern) und Interquartilsabstände (zweite Zeile in Klammern) des Parameters TrackDisplacementX

	0-30	31-60	61-90	91-120	121-150	151-180
Kollagen I	18,8µm	15,8µm	8,1µm	3,3µm	4,7µm	0,4µm
	(87,7µm)	(56,0µm)	(34,5µm)	(26,7µm)	(26,8µm)	(20,9µm)
LM-Agarose	13,2µm	10,7µm	10,2µm	8,6µm	10,2µm	11,6 µm
	(61,3µm)	(45,5µm)	(29,1,µm)	(27,9µm)	(25,6µm)	(27,1µm)
Kollagen III	4,1µm	3,7µm	5,2µm	8,2µm	13,4µm	1,9µm
	(38,7µm)	(35,1µm)	(19,2µm)	(34,1µm)	(41,0µm)	(19,0µm)
Fibrin	3,5µm	8,9µm	2,2µm	2,8µm	10,2µm	-2,3µm
	(34,8µm)	(40,4µm)	(33,2µm)	(26,3µm)	(21,9µm)	(18,5µm)

Die Anzahl der in den einzelnen Abschnitten in die Auswertung mit aufgenommenen Tracks sind Tabelle 16 (Seite 56) zu entnehmen.

Die Auswertung der Bewegung der Granulozyten in y-Richtung ergab die in Abbildung 20 veranschaulichten und in Tabelle 22 aufgeführten Ergebnisse:

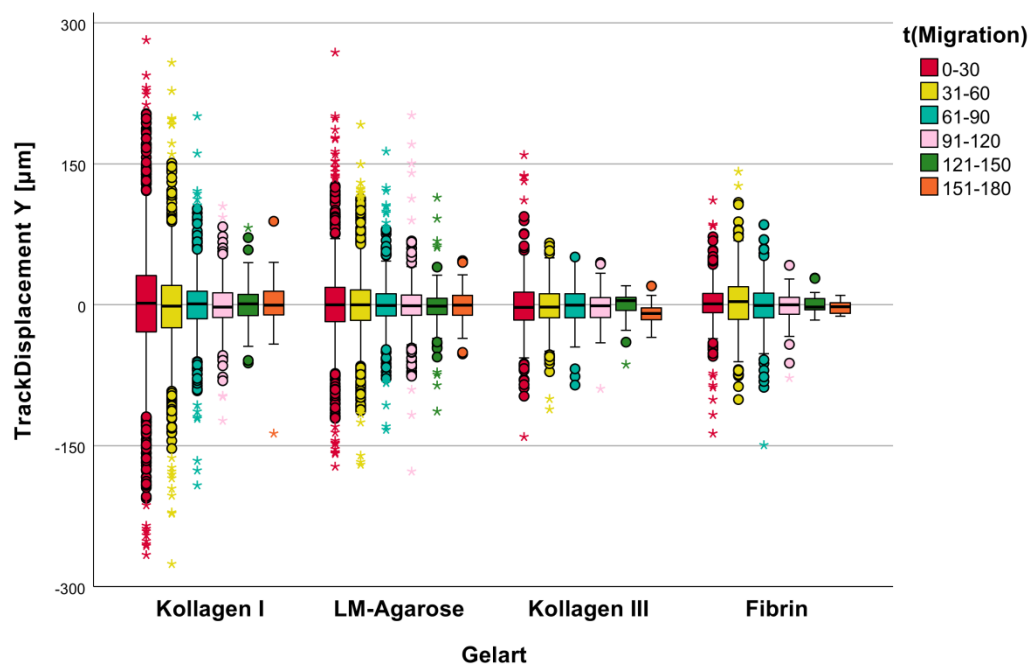


Abbildung 20: Gruppiertes Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände der Messgröße TrackDisplacementY, sortiert nach Gelart und Beobachtungsabschnitt

Der Parameter TrackDisplacementY wies in keinem Gel Normalverteilung auf. Die Auswertung ergab Folgendes:

Tabelle 22: Übersicht über die Mediane (erste Zeile ohne Klammern) und Interquartilabstände (zweite Zeile in Klammern) des Parameters TrackDisplacementY

	0-30	31-60	61-90	91-120	121-150	151-180
Kollagen I	1,7µm (60,0µm)	-1,3µm (45,2µm)	1,0µm (29,5µm)	-2,5µm (26,6µm)	1,0µm (22,9µm)	-0,4µm (25,9µm)
LM-Agarose	-0,1µm (36,7µm)	0,0µm (32,6µm)	-0,7µm (23,5µm)	-1,1µm (21,7µm)	-1,4µm (17,6µm)	-0,3µm (21,2µm)
Kollagen III	-2,7µm (30,1µm)	-2,3µm (25,8µm)	-0,3µm (25,8µm)	-1,1µm (21,4µm)	4,3µm (15,9µm)	-9,3µm (13,9µm)
Fibrin	1,0µm (20,6µm)	3,3µm (35,0µm)	-0,6µm (26,5µm)	0,0µm (18,4µm)	-2,3µm (12,4µm)	-2,1µm (13,0µm)

Der Parameter TrackDisplacementY nahm in den Experimenten im Median Werte zwischen $-2,7\mu\text{m}$ und $+3,3\mu\text{m}$ in den ersten vier Beobachtungsabschnitten an. In den letzten beiden Abschnitten wurden in Kollagen III Werte von $-9,3\mu\text{m}$ bis $+4,3\mu\text{m}$ beobachtet, wobei in den übrigen Gelen in diesen Abschnitten Werte zwischen $-2,3\mu\text{m}$ und $+1,0\mu\text{m}$ festgestellt wurden.

3.2.2 Ergebnisse Immuneffekte

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Einzelauswertung der PMN-Immuneffekte besprochen. Tabelle 23 gibt zunächst einen Überblick über die ermittelten absoluten Ergebniswerte, über die Fallzahlen der jeweiligen Gelarten und über die zeitliche Beziehung der einzelnen Immuneffekte zueinander. Anschließend erfolgt eine vergleichende Analyse der Reihenfolge der Immuneffekte. Nachfolgend wird eine graphische Darstellung der einzelnen Parameterwerte und die Ergebnispräsentation der statistischen Auswertung vorgenommen.

3.2.2.1 Übersicht Ergebnisse der Immuneffekte

Tabelle 23 gibt getrennt nach den jeweiligen Gelarten einen Überblick über die Ergebnisse der einzelnen Immuneffekte der PMN-Funktionalitätsprüfung.

Tabelle 23: Übersicht über die **absoluten Ergebnismittelwerte** der Immuneffekte \pm Standardabweichungen [**min**] und über die (**Fallzahlen**) der jeweiligen Gelarten; Angabe eines relativen Maßes für den zeitlichen Abstand der Immuneffekte (Quotientenbildung, rechte Hälfte der Tabelle)

Gelart	$T_{\max}ROS$	ET_{50} MPO	ET_{50} NETosis	$\frac{T_{\max}ROS}{ET_{50}NETosis} \cdot 100$	$\frac{ET_{50}MPO}{ET_{50}NETosis} \cdot 100$	$\frac{T_{\max}ROS}{ET_{50}MPO} \cdot 100$
	[min]/ (Fallzahl)	[min]/ (Fallzahl)	[min]/ (Fallzahl)	[%]	[%]	[%]
Kollagen I	148,1	204,2	251,6			
	$\pm 32,1/$ (14)	$\pm 76,4/$ (11)	$\pm 59,0/$ (15)	58,9	81,2	72,5
LM-Agarose	138,7	267,1	246,6			
	$\pm 15,1/$ (16)	$\pm 21,4$ (12)	$\pm 33,3/$ (17)	56,2	108,3	52,0
Kollagen III	47,9	155,1	186,2			
	$\pm 7,1$ (22)	$\pm 52,9$ (13)	$\pm 94,5$ (20)	25,7	83,3	30,9
Fibrin	157,0	165,4	287,3			
	$\pm 14,3$ (17)	$\pm 25,9$ (12)	$\pm 41,9$ (17)	54,6	57,7	95,0

Betrachtet man anhand Tabelle 23 die Reihenfolge der auftretenden Immuneffekte, so lässt sich erkennen:

In Gelen aus Kollagen I, Kollagen III und Fibrin wurde eine definierte Abfolge beobachtet. Zuerst wurde das Maximum der ROS-Produktion ($T_{\max}ROS$) erreicht. Anschließend war der halbmaximale Effekt der MPO-Freisetzung ($ET_{50}MPO$) vor dem halbmaximalen Effekt der NETosis ($ET_{50}NETosis$) erkennbar. Bei Matrices aus LM-Agarose fand sich eine andere Reihenfolge. Auch hier wurde als erstes $T_{\max}ROS$ festgestellt. Danach setzte jedoch vor Erreichen des $ET_{50}MPO$ die halbmaximale NETosis ($ET_{50}NETosis$) ein.

Die einzelnen Zeiten der Immuneffekte wurden durch Quotientenbildung zueinander in Beziehung gesetzt (siehe Tabelle 23, rechte Hälfte). Die dadurch erhaltene relative Beziehung diente zur Einschätzung der zeitlichen Relation beziehungsweise als Maß für den zeitlichen Abstand zwischen den einzelnen Immuneffekten in den verschiedenen Gelen.

3.2.2.2 Ergebnisse ROS-Produktion

Die ausgewerteten Ergebnisse von T_{\max}^{ROS} sind in Abbildung 21 graphisch dargestellt und zeigten nach Ausschluss dreier unplausibler Werte bei Kollagen III und LM-Agarose in den einzelnen Gelarten jeweils Normalverteilung.

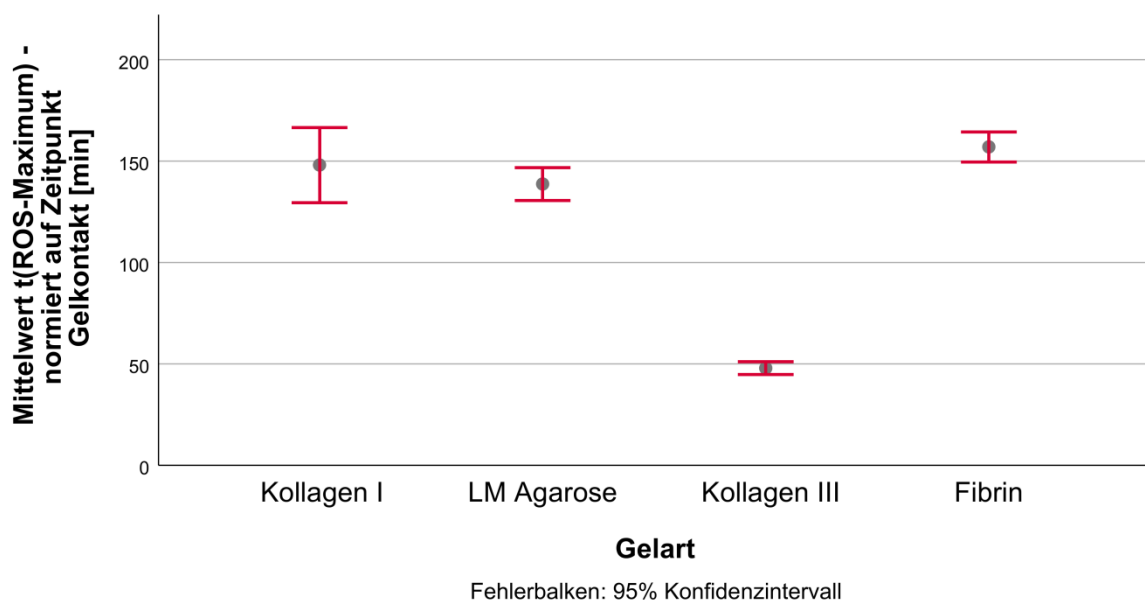


Abbildung 21: Mittelwerte des Parameters T_{\max}^{ROS} , getrennt nach den jeweiligen Gelarten (Fehlerbalkendarstellung: 95% Konfidenzintervall); Unterschiede zwischen Kollagen III und den übrigen Gelarten beziehungsweise zwischen LM-Agarose und Fibrin feststellbar

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied über alle Untergruppen ($F(3;28,454)=393,090$; $p<0,001$). Es lag keine Varianzhomogenität vor (Levene: $F(3,65)=9,117$; $p<0,001$). Der MW T_{\max}^{ROS} im Referenzgel Kollagen I unterschied sich vom MW T_{\max}^{ROS} in Kollagen III mit einer mittleren Differenz (MD) der MW von $100,2 \pm 8,7$ min ($p<0,001$). Der MW T_{\max}^{ROS} in Kollagen III unterschied sich zudem signifikant, von dem in LM-Agarose mit einer mittleren Differenz der MW von $90,8 \pm 4,1$ min ($p<0,001$) und dem MW T_{\max}^{ROS} , in Fibrin, mit einer MD der MW von $109,1 \pm 3,8$ min ($p<0,001$). Die ROS-Produktion der Granulozyten in Kollagen-III-Matrizes fand ihr Maximum im Vergleich zu den anderen Gelen zu einem früheren Zeitpunkt. Zudem war ein signifikanter Unterschied der MW T_{\max}^{ROS} in den Gelen

LM-Agarose und Fibrin mit einer MD der MW von $18,3 \pm 5,1$ min ($p=0,007$) feststellbar, wobei sich T_{\max} ROS in LM-Agarose zu einem früheren Zeitpunkt als in Fibrin zeigte.

3.2.2.3 Ergebnisse MPO-Freisetzung

Die ermittelten Werte des Parameters ET_{50} MPO wurden in Abbildung 22 graphisch dargestellt und wiesen für jede Gelart Normalverteilung auf.

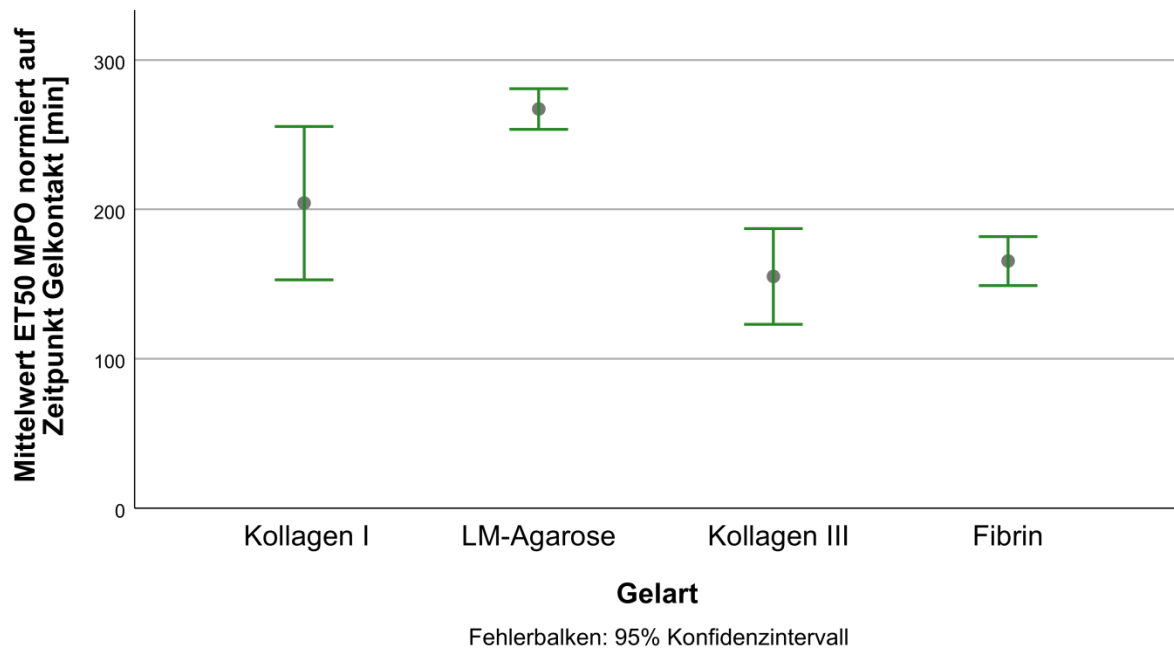


Abbildung 22: Mittelwerte des Parameters ET_{50} MPO getrennt nach Gelarten (Fehlerbalkendarstellung mit 95% Konfidenzintervall); Unterschiede zwischen LM-Agarose und Kollagen III beziehungsweise zwischen LM-Agarose und Fibrin feststellbar

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied über alle Untergruppen ($F(3;22,664)=41,500$; $p<0,001$). Es lag keine Varianzhomogenität vor (Levene: $F(3,44)=8,564$; $p<0,001$).

Es konnte kein Unterschied zwischen den MW ET_{50} MPO des Referenzgels Kollagen I mit den Werten der restlichen Gele festgestellt werden. Der Mittelwert ET_{50} MPO von LM-Agarose war mit einer MD der MW von $112,1 \pm 15,9$ min ($p<0,001$) signifikant später als in Kollagen III; die MW ET_{50} MPO von LM-Agarose waren mit einer MD der MW von $101,7 \pm 9,7$ min ($p<0,001$) gegenüber denen des Fibrin signifikant erhöht.

3.2.2.4 Ergebnisse NETosis

Es konnte festgestellt werden, dass in **allen** Gelarten nach Ablauf des jeweiligen Versuchs **alle** migrierenden Zellen NETosis einleiteten.

Die ermittelten Werte des Parameters $ET_{50}NETosis$ wurden in Abbildung 23 graphisch dargestellt und wiesen, nach Ausschluss eines unplausiblen Wertes in Kollagen III, Normalverteilung auf.

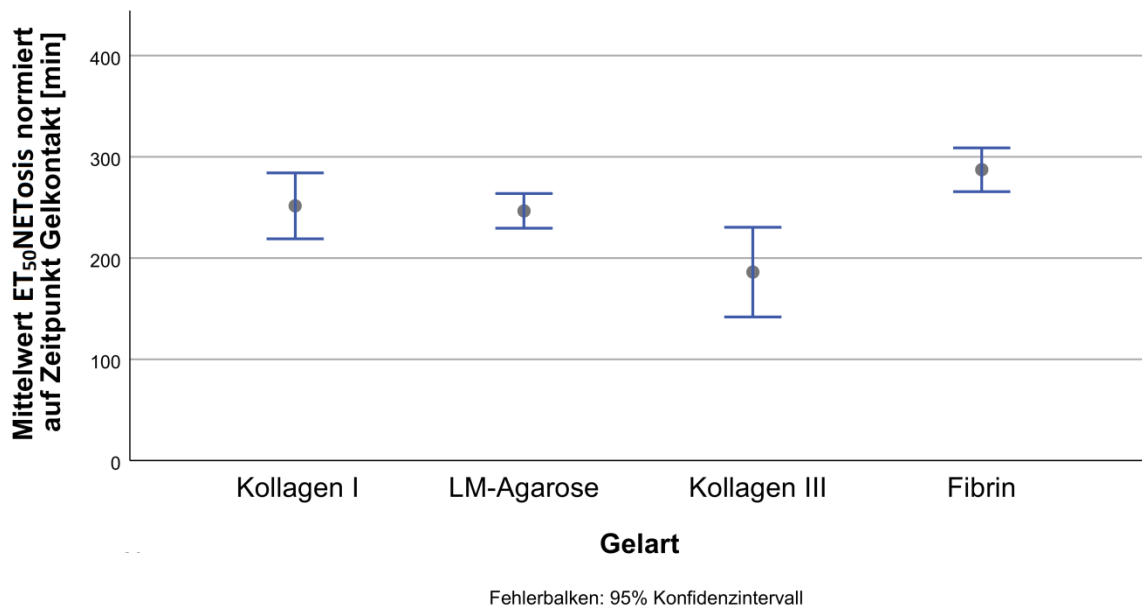


Abbildung 23: Mittelwerte des Parameters $ET_{50}NETosis$ getrennt nach Gelarten (Fehlerbalkendarstellung durch 95% Konfidenzintervall); Unterschiede zwischen LM-Agarose und Fibrin beziehungsweise Kollagen III und Fibrin feststellbar

Ein eindeutiger Unterschied wurde über allen Untergruppen festgestellt ($F(3;34,426)=7,014$; $p=0,001$). Varianzhomogenität lag nicht vor (Levene: $F(3,65)=7,576$; $p<0,001$).

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den MW $ET_{50}NETosis$ des Referenzgels Kollagen I mit den übrigen MW $ET_{50}NETosis$ der drei anderen Gelarten. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen den MW $ET_{50}NETosis$ von LM-Agarose und Fibrin mit einer MD der MW von $40,8 \pm 13,0$ min ($p=0,022$) und zwischen Kollagen III und Fibrin mit einer MD der MW von $101,2 \pm 23,4$ min ($p=0,001$) festgestellt, wobei in Fibrin die MW $ET_{50}NETosis$ am spätesten beobachtet wurden. Der Signifikanzwert zwischen den MW $ET_{50}NETosis$ von Kollagen I und Fibrin lag (mit $p=0,096$) über dem festgelegten Signifikanzniveau.

3.2.3 Ergebnisse verschiedener Korrekturzeitpunkte am Beispiel $T_{\max ROS}$ in Kollagen I

Bedingt durch den allgemeinen Versuchsaufbau kamen als Korrekturzeitpunkte folgende Versuchsschritte in Frage:

- Zeitpunkt der Blutabnahme,
- Zeitpunkt des Isolierungsbeginns
- Zeitpunkt des Gelkontaktes

Als Maß für die Störanfälligkeit diente die Standardabweichung (SD) des Mittelwerts. Es wurde ein exemplarischer Vergleich der Standardabweichungen der ROS-Maxima im Referenzgel Kollagen I für die unterschiedlichen Korrekturzeitpunkte durchgeführt (siehe Tabelle 24). In allen Vergleichsgruppen wurde Normalverteilung beobachtet.

Tabelle 24: Vergleichende Übersicht der Standardabweichungen der Mittelwerte der ROS-Maxima im Referenzgel Kollagen I

Korrekturzeitpunkt	Blutabnahme	Isolierungsbeginn	Gelkontakt
Standardabweichung	36,4 min	36,2 min	32,1 min

Die kleinste SD wurde beim Korrekturzeitpunkt Gelkontakt beobachtet. Die SD der Korrekturen nach Blutabnahme und Isolierungsbeginn unterschieden sich um 0,2 min, waren jedoch beide größer als die SD des Gelkontakts.

4 Diskussion

Die PMN-Funktionalitätsprüfung in den unterschiedlichen extrazellulären Gelmatrizes Kollagen I und III, LM-Agarose und Fibrin hat gezeigt, dass die EZM einen Einfluss auf die Funktionen neutrophiler Granulozyten ausübt.

Zusammenfassend können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

- Kollagen III hat einen stärker hemmenden, LM-Agarose und Fibrin haben einen leicht hemmenden Einfluss auf die PMN-Migration im Vergleich zum Referenzgel Kollagen I. Dabei unterliegt nicht nur die Migrationslänge sondern auch die Richtung und Zielgerichtetheit der Migration einer Beeinflussung.
- Kollagen III hat im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf der ROS-Produktion einen beschleunigenden Einfluss. Fibrin besitzt einen verzögernden Einfluss auf die NETosis. LM-Agarose wirkt hemmend auf den Verlauf der MPO-Freisetzung.

- Während die Reihenfolge der Immuneffekte der Abfolge ROS-Produktion, MPO-Freisetzung, NETosis folgte, scheint kein starres zeitlich definiertes Schema zu existieren, nach dem diese Immuneffekte vollzogen werden.

In den nachfolgenden Kapiteln wird zunächst eine Bewertung der extrazellulären Gelmatrizes, die im Zuge der in Kapitel 2.2 beschriebenen Vorversuchsreihen entstanden sind, vorgenommen. Als nächstes werden die unter Punkt 3.2.2 festgehaltenen Ergebnisse der PMN-Funktionalitätsprüfung diskutiert. Abschließend wird auf Besonderheiten und Limitierungen der verwendeten Methodik und des in vitro Untersuchungsmodells näher eingegangen.

4.1 Gelherstellungs- und Anwendungsmethoden der Vorversuchsreihen

In Kapitel 4.1 werden zunächst die Grundsätze der Matrix-Methodenentwicklung der Vorversuchsreihen thematisiert. Anschließend wird auf sich ergebende Limitierungen der für die PMN-Funktionalitätsprüfung verwendeten EZM-Gele näher eingegangen.

4.1.1 Grundsätze der Matrix-Methodenentwicklung

Die Entwicklung der einzelnen Matrizes stand unter der Maxime, physiologisch relevante extrazelluläre Gelmatrizes zu entwickeln. Die Gelarten wurden so ausgewählt, dass PMNs auch in vivo tatsächlich mit derartigem EZM-Material in Kontakt kommen, was bei Kollagen I, II und III, sowie Fibrin der Fall ist. Agarose wurde zusätzlich ausgewählt, um zu testen, ob sich PMNs in einem Material, welches nicht in tierischen Körpern vorkommt, anders verhalten als in Materialien des menschlichen Körpers.

Die Arbeit mit dreidimensionalen Hydrogelen wurde von Islam et al. plakativ als „fragil“ bezeichnet [69]. Mit den unter Punkt 2.2 beschriebenen Modifizierungen wurde versucht, die „Fragilität“ der einzelnen Hydrogelarten zu überwinden, des Weiteren den unter Punkt 1.4 beschriebenen Anforderungen zu genügen und stabile Untersuchungsbedingungen zu schaffen. Für die Gelarten Kollagen I und III, Fibrin sowie LM-Agarose (als Vertreter der Agarosegruppe) konnte ein Beobachtungssystem etabliert werden. Für Kollagen II gelang dies nicht.

Ursprünglich war angedacht, auch verschiedene Konzentrationen der jeweiligen Gelarten untereinander zu vergleichen. Wie unter Punkt 2.2 beschrieben, zeigte sich in mehreren Vorversuchsreihen jedoch, dass eine PMN-Funktionsprüfung nur in einem sehr begrenzten

Konzentrationsbereich der jeweiligen Gelarten durchgeführt werden konnte, weshalb letztlich auf eine vergleichende Analyse zwischen verschiedenen Konzentrationen verzichtet wurde.

An dieser Stelle sei noch angemerkt, dass für die Herstellung der Matrizes ausschließlich nichtmenschliches Material verwendet wurde. Daher sollte die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen auch in diesem Punkt kritisch betrachtet werden.

Das unter Punkt 2.2.1 beschriebene Aushärtungsverfahren für Kollagen-I-Matrizes (bei 37°C, 5% CO₂ und 50% Luftfeuchtigkeit) erzielte im Vergleich mit anderen Verfahren über mehrere Vorversuche mit verschiedenen Gelarten insgesamt die besten Ergebnisse hinsichtlich Stabilität, Kontinuität und Reproduzierbarkeit der Matrizes. Aus diesem Grund und wegen der Vergleichbarkeit der Gele untereinander wurde es als einheitliches Aushärtungsverfahren mit einer dem Referenzgel Kollagen I angeglichenen Aushärtungszeit von 30 min gewählt.

Die Hämatoxylinfärbung wurde eingesetzt (siehe Punkt 2.2.7), um die Qualität und Integrität der Gele auch makroskopisch überprüfen zu können. Durch diese Qualitätskontrolle wurde sichergestellt, dass keine fehlerhaften Matrizes in die Auswertung aufgenommen wurden.

Die Zugabe des Nährmediums RPMI zu den EZM-Gelansätzen verlängerte die Lebensfähigkeit der PMNs und verzögerte apoptotische Veränderungen. Da bei längerer Inkubation mit verschiedenen Nährmedien durchaus mit einer Beeinflussung der PMN-Aktivität durch das Nährmedium zu rechnen ist, wurde darauf geachtet, dass mit RPMI in allen Gelarten nur dasselbe Nährmedium Anwendung fand (siehe Punkt 4.1.1.6) [85, 86].

In mehreren Studien – u.a. von Chenoweth et al. und Trevani et al. – wurde gezeigt, dass der pH-Wert der extrazellulären Umgebung einen Einfluss auf Funktionen von PMNs ausüben kann [87, 88]. Es wurde daher auf eine Einstellung des pH-Wertes um den Neutralpunkt geachtet, da in diesem Bereich gut reproduzierbare Ergebnisse erwartet wurden [87]. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde versucht, vorrangig das Puffersystem CO₂/HCO₃⁻ zu verwenden, da dieses physiologisch die bedeutendste Rolle bei der extrazellulären Pufferung im menschlichen Körper übernimmt [88]. Wenn jedoch (wie bei Kollagen III) Puffersysteme nicht ausreichend waren, wurde auf stärker alkalisierende Substanzen wie NaOH zurückgegriffen.

Im Folgenden werden für jede Gelart getrennt die einzelnen Modifikationsschritte nochmals aufgegriffen und erläutert.

4.1.1.1 Kollagen I

Die Tatsache, dass durch die Versuchsvorschrift *Application Note 26* der Firma IBIDI eine für den Versuchsaufbau dieser Arbeit geeignete Kollagen-I-Matrix hergestellt werden konnte, bestätigte die positiven Resultate von Doblinger et al., Bredthauer et al. und Pai et al., die dieselbe Versuchsvorschrift zur Herstellung von Kollagen-I-Matrizes nutzten [67, 74, 89, 90].

4.1.1.2 Kollagen II

In Anlehnung an die Herstellungsmethode der Kollagen-I-Matrix wurde auch für Kollagen II versucht, durch Modifikation einzelner Bestandteile und Herstellungsverfahren eine Matrix herzustellen, die die am Anfang der Arbeit (siehe Punkt 1.4) beschriebenen Anforderungen erfüllte. Anfänglich überzeugten jedoch Gele der ersten Vorversuchsreihe (siehe Tabelle 2) aufgrund zu saurer pH-Werte, inhomogener Verteilungsmuster im Kanal und zum Teil nicht gegebener PMN-Funktionalität, nicht (siehe Punkt 3.1.2.1). Ebenso wiesen Gele der zweiten Vorversuchsreihe (siehe Tabelle 3) aufgrund einer fehlenden Reproduzierbarkeit und einer nicht vorhandenen PMN-Migrationsfähigkeit (siehe Punkt 3.1.2.2) eine minderwertige Qualität auf. Beide Vorversuchsreihen nutzten Kollagen II aus Rinderknorpel (6), sodass sich als Fazit formulieren ließ:

Gele mit Kollagen II aus Rinderknorpel (6) waren für die Funktionsprüfung von PMNs nicht geeignet.

Da nach Sixt et al. das Initialmaterial, aus dem das Kollagen gewonnen wurde, Einfluss auf die späteren Geleigenschaften hat, wurden eine dritte und eine vierte Vorversuchsreihe (siehe Tabelle 4 & Tabelle 5) mit einem alternativen Kollagen-II-Produkt aus Huhnknorpel (11) vorgenommen [71]. Diese brachten jedoch trotz Anpassungen der Aushärtungszeit und -bedingungen (siehe Punkt 2.2.2) keinen geeigneten Ansatz zur PMN-Funktionsprüfung hervor (siehe Punkte 3.1.2.3 & 3.1.2.4).

Insgesamt fehlte den Gelmatrizes aus Kollagen II die nötige Stabilität oder die Zellen konnten aufgrund einer zu steifen Matrix nicht migrieren. Folglich lässt sich als Fazit der bisherigen Ergebnisse der Kollagen-II-Vorversuche formulieren:

Matrizes aus Kollagen II eigneten sich nicht für 3D-Chemotaxisexperimente in μ Slide-Chemotaxiskammern[®] von IBIDI.

4.1.1.3 Kollagen III

Beim Kollagen III wurde zunächst die unter Punkt 2.2.1 beschriebene Methodik angewendet. Das verwendete Kollagen III musste jedoch mit 0,5 M Essigsäure in einer im Vergleich zu den Kollagen I und II höheren Konzentration gelöst werden. Daher reichte bei den Experimenten der **ersten** Vorversuchsreihe die Menge des verwendeten Puffers nicht aus, um den Lösungsansatz zu neutralisieren. Der saure pH-Wert verhinderte eine Polymerisation des Kollagens (siehe Tabelle 6) [74, 91].

Ein Versuch zur Herstellung eines konzentrierteren Puffers ($>7,5\%$ NaHCO_3) scheiterte am Löslichkeitsunvermögen von NaHCO_3 . Daher wurde in der **zweiten** Vorversuchsreihe zur Neutralisierung eine 1 M NaOH-Lösung verwendet. Die genaue Einhaltung der Reihenfolge bei der Zusammengabe der Bestandteile war notwendig, um die Lösung bereits vor Zugabe der PMNs zu neutralisieren.

Trotz Einhaltung der Reihenfolge besaßen die Gele der zweiten Vorversuchsreihe durch die Verwendung von NaOH einen insgesamt zu basischen pH-Wert (siehe Tabelle 7). Darüber hinaus wiesen Kollagen-III-Gele der Konzentration $0,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ eine zu geringe Konzentration auf, um im Kanal stabil zu werden. Deshalb wurde im Rahmen der dritten Vorversuchsreihe versucht den pH-Wert von Gelen der Konzentrationen $1,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ schrittweise an einen neutralen pH-Wert anzupassen (siehe Tabelle 8).

Obwohl die in den anfänglichen Ansätzen der **dritten** Vorversuchsreihe hergestellten Gele ($c = 1,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$) homogen fest wurden, war aufgrund des zu basischen Milieus (pH zwischen 8 und 10) der größte Anteil der Zellen bereits unmittelbar nach Aushärtung tot. Erst im weiteren Verlauf konnte durch Reduzierung des Anteils von NaOH der Anteil der toten Zellen verringert werden. In Gelen mit neutralem pH-Wert (pH = 7,0) konnte zwar das Überleben der PMNs auf ein Maximum gesteigert werden, die PMNs zeigten jedoch keine Migration.

Da eine zu hohe Konzentration als Hindernis für die Migration interpretiert wurde, wurde in einer **vierten** Vorversuchsreihe der pH-Wert von Gelen mit geringerer Konzentration ($c = 1,0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$) schrittweise an den Neutralpunkt angepasst (siehe Tabelle 9). Es zeigte sich früh, dass in diesen Gelen alle ausgewählten PMN-Funktionen ausgeprägt waren. Allerdings lag T_{maxROS} vor dem bisher gewählten Beobachtungszeitfenster (siehe Punkt 2.4.3). Um T_{maxROS} auch in Kollagen-III-Gelen im Mikroskop aufzeichnen zu können, wurde trotz des

Risikos einer schlechteren Vergleichbarkeit der Kompromiss eingegangen, die Aushärtungszeit von 30 min auf 15 min zu verkürzen.

Durch diese Vorgehensweise konnten alle ausgewählten PMN-Funktionen in Matrices aus Kollagen III erfasst und quantifiziert werden.

4.1.1.4 Agarose

Da Matrices der Vorversuchsreihe Agarose keine reproduzierbaren Ergebnisse hervorbrachten (siehe Punkt 3.1.4), wurde der Ansatz mit dem in dieser Vorversuchsreihe verwendeten Agaroseprodukt aus Rinderknorpel (6) nicht weiterverfolgt. Der ausschlaggebende Grund hierbei war vor allem die Tatsache, dass sich das Gel nicht homogen im Kanal verteilen ließ, und oftmals eine Desintegration einsetzte.

4.1.1.5 Low-Melting-Agarose

Der Temperaturunterschied zwischen dem aufgeheiztem, flüssigem Agarosegel (90°C) und der letztendlichen Temperatur im Mikroskop (37°C) war in der Vorversuchsreihe Agarose erheblich (siehe 2.2.4). Die Tatsache, dass bei unterschiedlichen Temperaturen unterschiedliche Mengen an Gasen im Gel gelöst sind, könnte einen Einfluss auf das Verhalten des Agarose-Materials (13) in den Kanälen haben. Daher wurde versucht, diesen Temperaturunterschied zu minimieren, was durch Verwendung von LM-Agarose (16) aufgrund des geringeren Gelierpunktes ($\leq 65^{\circ}\text{C}$) erreicht werden konnte.

Die im Rahmen der Vorversuchsreihe LM-Agarose hergestellten Gele bildeten zwar im IBIDI-Kanal größtenteils homogene, stabile Matrices, neigten jedoch verstärkt zu Rissbildungen (siehe 3.1.5). Gele mit Rissbildungen waren unter anderem aufgrund des Risikos einer mechanischen Beeinflussung der PMN-Migration für weitere Experimente unbrauchbar. Einzig LM-Agarosegele der Konzentration $2,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ zeigten keine Rissbildung. Da in Matrices dieser Gelkonzentration außerdem alle ausgewählten PMN-Funktionen beobachtet werden konnten, waren alle unter Punkt 1.4 beschriebenen Anforderungen erfüllt. Dadurch konnten LM-Agarosegele (mit $c = 2,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$) für den PMN-Funktionsvergleich verwendet werden.

4.1.1.6 Fibrin

Matrizes aus Fibrin würden (wie bei Moghe et al. beschrieben) nach Zusammengabe der Komponenten bei 37°C bereits innerhalb von 5 min aushärten [24]. Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit mit den anderen Gelarten wurde die Aushärtungszeit des Fibringels um 25 min an die Aushärtungszeit des Referenzgels Kollagen I (30 min) angepasst.

Da ein Effekt des Nährmediums auf die PMNs bis dato nicht vollends ausgeschlossen werden konnte (siehe Punkt 4.1.1), wurden Matrizes, bei denen unterschiedlichen Nährmedien (M199 und RPMI 1640) verwendet wurden, qualitativ miteinander verglichen. Die Versuche der zweiten Vorversuchsreihe bestätigten, dass kein qualitativer Unterschied zwischen Fibringelen der verschiedenen Nährmedien bestand (siehe Punkt 3.1.6). Für die Fibrinhauptversuche wurde daher in Analogie zu den anderen Gelarten sowohl für die Verdünnung der Thrombinausgangslösung als auch für die Resuspendierung der PMNs RPMI als Nährmedium verwendet.

4.1.2 Limitierungen der entwickelten Matrizes

Im Zusammenhang mit der Vorgehensweise zur Einstellung des pH-Werts, aber auch der Anpassung der Aushärtungszeiten an das Referenzgel Kollagen I, ist die Frage angebracht, ob die jeweiligen Vorgehensweisen einzelner Gelarten mit einer Einschränkung der Vergleichbarkeit einhergingen. Im Folgenden wird daher eine genaue Analyse vorgenommen.

4.1.2.1 Limitierung durch die Anpassung der Aushärtungszeit

Mit der in dieser Arbeit verwendeten Methodik konnten die Versuchsansätze während der Aushärtungszeit nicht im Mikroskop beobachtet werden. Dies erwies sich als Nachteil, da diese Zeit daher der Auswertung nicht zur Verfügung stand („Blindbereich“). An dieser Stelle sei erwähnt, dass nach Moghe et al. die Aushärtungszeit für Fibrin auf 5 min begrenzt werden könnte [24]. Der „Blindbereich“ bei LM-Agarose könnte (wie bei Jacob et al.) ebenso auf 15 min verkürzt werden, würde man keinen Vergleich der Gele ansetzen, sondern jedes Gel für sich betrachten [92].

Um $T_{\max ROS}$ auch in Kollagen III im Mikroskop beobachten zu können, wurde die Aushärtungszeit auf 15 min verkürzt. Daher startete die mikroskopische Beobachtung 15 min früher und eine Anpassung der Beobachtungszeiträume wurde notwendig (siehe Punkt 2.4.3). Hätte man diese Anpassung nicht durchgeführt, wäre es in der Folge zu einer inkorrekten Auswertung gekommen, da man in Bezug auf den Referenzpunkt unterschiedliche Zeiträume miteinander verglichen hätte.

4.1.2.2 Limitierung durch die pH-Werteinstellung

Laut einer von Trevani et al. publizierten Studie steigert zwar der extrazelluläre pH-Wert alleine für sich genommen weder die ROS-Produktion noch die MPO-Freisetzung. Es wurde jedoch beschrieben, dass PMNs bei zusätzlicher Anwesenheit von fMLP in saurem Milieu vermehrt H_2O_2 freisetzen [88]. Es ließe sich nun argumentieren, dass bei der Herstellung der Kollagen-III-Matrix eine saubere pH-Wert Einstellung auf einen neutralen Wert nicht adäquat erfolgte und ein verfrühter $T_{\max}\text{ROS}$ (vgl. Punkt 3.1.3.4) allein auf diesen Sachverhalt zurückzuführen ist.

Dagegen spricht jedoch, dass in Gelen der vierten Vorversuchsreihe Kollagen III die ROS-Produktion der meisten PMNs schon vor der Zugabe von fMLP beendet war (siehe Punkt 3.1.3.4), und nach Trevani et al. ein saurer pH-Wert ohne Anwesenheit von fMLP keine gesteigerte ROS-Produktion bewirkt. Zudem wurde von Trevani et al. nachgewiesen, dass PMNs in saurem Milieu eine deutlich verspätete Apoptose und eine verlängerte Lebensdauer aufwiesen [88]. In den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass die NETosis in Kollagen III (mit einem $\text{MW}(\text{ET}_{50}\text{NETosis}) = 186,2 \pm 94,5$ min) im Vergleich zu den anderen Gelen früh einsetzte (vgl. Punkt 4.2.1.8).

4.1.2.3 Limitierung durch einen zeitversetzten Kontakt zu fMLP

In einer kritischen Betrachtungsweise kann der in Kollagen III verfrühte $T_{\max}\text{ROS}$ damit begründet werden, dass die Zellen in Kollagen III schon 15 min vor den anderen Gelen in Kontakt mit dem Chemokin fMLP kamen. Betrachtete man jedoch die Mittelwerte von $T_{\max}\text{ROS}$ und $\text{ET}_{50}\text{NETosis}$, so divergieren die signifikanten Mittelwertunterschiede deutlicher als 15 min (vgl. Tabelle 23). Zusätzlich sollte in diese Überlegung mit einfließen, dass es nach Kim und Wu rund 80 min dauert, bis sich ein steady-state des fMLP-Gradienten eingestellt hat, was einen um 15 min früheren fMLP-Kontakt wiederum relativiert [93].

4.2 Funktionalitätsprüfung neutrophiler Granulozyten

Im Folgenden wird zunächst eine Bewertung der unter Punkt 3.2 zusammengefassten Ergebnisse der PMN-Funktionalitätsprüfung vorgenommen. Im Anschluss daran werden die Untersuchungsbedingungen und –schritte der PMN-Funktionalitätsprüfung aufgegriffen und analysiert.

4.2.1 Ergebnisse Funktionalitätsprüfung der neutrophilen Granulozyten

In den nachfolgenden Abschnitten werden die durch die Experimente gewonnenen Ergebnisse (siehe Punkt 3.2) zusammengefasst, interpretiert und im Kontext bestehender wissenschaftlicher Fachliteratur diskutiert.

4.2.1.1 Ausbildung eines Chemokingradienten

In dieser Arbeit wurde fMLP als Chemokin gewählt, da es sich bei fMLP um ein sogenanntes „End-Target“ Chemokin handelt, welches PMNs in vivo durch die EZM des Gewebes zur Läsionsstelle leitet (siehe Punkt 1.1.2) [26]. Durch das unterschiedliche Befüllen der Reservoirs mit fMLP beziehungsweise RPMI konnte in den zur PMN-Funktionalitätsprüfung verwendeten EZM-Gelen ein linearer Chemokingradient erzeugt und dadurch ein stabiler Untersuchungszustand (steady-state) erzielt werden [94]. Belege dafür sind die für alle Gelarten durchweg positiven TDX-Mittelwerte und die durchweg um den Nullpunkt schwankenden TDY-Werte (siehe Punkt 3.2.1.8). Insgesamt wird dadurch signalisiert, dass sich die Hauptmigrationsrichtung der PMNs auf den linearen Chemokingradienten zubewegte.

Zusätzlich konnte durch die Qualitätskontrolle der μ -Slide-Kammern mittels Hämatoxylin gezeigt werden, dass die letztendlich verwendeten Matrices ausreichende Stabilität aufwiesen, da zu keinem Zeitpunkt Hämatoxylin in die Kammern beziehungsweise von einem Reservoir zum anderen gelangte. Vergleicht man diese Erkenntnisse mit der zu diesem Themenbereich vorliegenden Fachliteratur, so stellt man eine Diskrepanz zu einer zusammenfassenden Beobachtung von Toetsch et al. fest, in der postuliert wird, dass in Agarose keine Feinkontrolle eines Chemokingradienten möglich ist [63]. Die gerade beschriebenen Ergebnisse stehen diesem Postulat jedoch entgegen, weshalb die Ausbildung eines linearen Chemokingradienten bei den Gelarten dieser Forschungsarbeit als erwiesen anzusehen ist.

4.2.1.2 Übersicht über den Migrationsverlauf

In allen vier Gelarten fiel die Anzahl der detektierten Tracks und damit die Zahl sich bewegender PMNs im Laufe der Beobachtungsdauer größtenteils bis zum letztendlichen Stillstand (siehe Tabelle 16). Auffallend war, dass in Kollagen III die Anzahl der getrackten Zellen von Abschnitt (61-90) mit $n = 118$ rapide auf $n = 37$ im Abschnitt (91-120) und letztlich auf $n = 18$ im Abschnitt (121-150) rasant fiel. Ein solch rapider Abfall der Trackzahlen wurde bei den anderen Gelarten nicht beobachtet (vgl. Tabelle 16).

Der beobachtete kontinuierliche Abfall der Migrationsstrecken in Matrices aus Kollagen I, LM-Agarose und Fibrin von jeweils höchsten Werten in den ersten beiden Abschnitten (0-30 & 31-60) auf niedrigste Werte in den letzten Abschnitten (121-150 & 151-180, siehe Tabelle 16), stimmte mit Beobachtungen früherer Studien überein, die ausschließlich Kollagen I als Matrix verwendeten [66, 67].

Die Wahl der EZ-Gelmatrix scheint damit keinen Einfluss auf die Grundsätzlichkeit, jedoch sehr wohl auf die Geschwindigkeit des Abfalls der TL über die Beobachtungszeit zu haben. Unter Einbeziehung des gerade beschriebenen Sachverhaltes und der Beobachtung, dass in allen Gelarten alle migrierenden PMNs zum Ende des jeweiligen Versuchs NETosis eingeleitet hatten (siehe Punkt 3.2.2.4), lässt sich postulieren:

Die NETosis ist zumindest im Gewebe der Standardtod aller PMNs. Dadurch wird ein Sistieren der Migration erzwungen.

4.2.1.3 Migrationslängen in den einzelnen Abschnitten

Die Parameterwerte und statistischen Analyseergebnisse, die der folgenden Ergebnisinterpretation zu Grunde liegen, sind den Tabellen 16, 17, 18 und 19 zu entnehmen. Betrachtete man die TrackLength als Maß für die PMN-Beweglichkeit und verglich sie in den ersten drei Migrationsabschnitten jeweils zwischen den einzelnen Gelarten, so ließ sich ein Einfluss der EZM auf die PMN-Beweglichkeit feststellen. Dies wird durch die Existenz von signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Gelen in **jedem** der drei ersten Abschnitte deutlich.

Am eindrucklichsten lässt sich dieser Sachverhalt im ersten Abschnitt (0-30) erkennen. Dort unterschieden sich die Mediane der TL **aller** Gele signifikant voneinander. Die größte Migrationsfähigkeit der PMNs wurde in diesem Abschnitt in Kollagen I beobachtet. Einen gegenüber Kollagen I leicht hemmenden Effekt hatte Fibrin. Auch LM-Agarose wirkte gegenüber Matrices aus Kollagen I und Fibrin hemmend auf die PMN-Migration. Zwar fehlte im Abschnitt (31-60) die Signifikanz von Fibrin gegenüber Kollagen I; ein hemmender Effekt von LM-Agarose gegenüber Kollagen I und Fibrin konnte jedoch auch hier nachgewiesen werden. In Abschnitt (61-90) ließen sich hemmende Wirkungen von Fibrin und LM-Agarose gegenüber Kollagen I auf die Migrationsfähigkeit der PMNs beobachten.

Kollagen III schien durch im Vergleich durchweg niedrigere Migrationslängen und einen sehr frühen Stillstand der PMNs über alle Beobachtungsabschnitte hinweg den am stärksten hemmenden Effekt auf die PMN-Migration auszuüben.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine Molekularmechanismen betrachtet wurden, lassen sich die Ergebnisse dennoch in den Kontext der unter Punkt 1.2.2 aufgeführten wissenschaftlichen Literatur einordnen.

Zunächst stehen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse im Widerspruch zu einem von Nourshargh et al. im Rahmen eines Nature-Reviews publizierten Postulats. Danach könnten Leukozyten zwischen einem Integrin-abhängigen und einem Integrin-unabhängigen Modus unterscheiden. Diesem Postulat folgend wäre ihre amöboide Fortbewegungsart nicht von der Zusammensetzung der EZM abhängig [19]. Die signifikanten Unterschiede der Migrationslängen in den unterschiedlichen Gelmatrizes sprechen jedoch für eine Beeinflussung der Migration durch die EZM.

Wie Kuntz et al. durch verschiedene Zusätze zu Kollagenmatrizes feststellten, können dieser Beeinflussung der PMN-Migration durch die EZM verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Zum einen bilden EZMs durch verwobene molekulare Netzwerke räumlich-sterische Barrieren für die Zellmigration. Daher wäre es denkbar, dass die Verschiedenheit der faserigen Strukturen der unterschiedlichen Gele, die Beweglichkeit der PMNs auf eine räumlich-sterische Weise beeinflusst [52, 55]. Zum anderen könnte die unterschiedliche Beschaffenheit der EZMs unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Zellen und Fasern des Gels bewirken [55]. So ist es denkbar, dass Zellwechselwirkungen möglicherweise vermittelt durch Integrine mit den verschiedenen EZMs, intrazelluläre biochemische Signale erzeugen, die die Zellmotilität innerhalb des Gels beeinflussen [95].

Der hemmende Einfluss von Kollagen III auf die Migration bestätigt die von Lindbom et. al. beschriebene Beobachtung, dass die Chemotaxis von PMNs auch von der relativen Häufigkeit von Matrixproteinen innerhalb des Gewebes beeinflusst wird. Führt man diesen Gedanken weiter, so könnte das bedeuten, dass Kollagen III, wenn es im Überfluss in der EZM vorkommt, die Bindungsstärke zwischen den Integrinen und ihren Liganden stark erhöht und auf diese Weise der Beweglichkeit entgegenwirkt. LM-Agarose und Fibrin würden folglich die Bindungsstärke im Vergleich zum Kollagen I nur leicht erhöhen, was einen leicht hemmenden Effekt der Beweglichkeit zur Folge hätte [22].

Die unterschiedlichen Migrationslängen könnten neben der Beeinflussung der Bindungsstärke gleicher Integrinsubtypen auch dadurch erklärt werden, dass in den verschiedenen Matrizes jeweils andere Integrin-Unterformen beziehungsweise andere EZM-Rezeptoren die Zell-EZM-Wechselwirkung vermitteln.

Eine Publikation von Leitinger und Hohenester aus dem Jahr 2007 wird herangezogen, um die Theorie, dass andere Integrin-Unterformen bzw. andere EZM-Rezeptoren auf PMNs für die unterschiedlichen Migrationslängen verantwortlich sind, zu diskutieren. Sie beschrieben bereits verschiedene Kollagenrezeptoren auf Immunzellen, die jeweils spezifisch an einzelne Kollagenarten binden, was sich in einer unterschiedlichen Kontrolle des Zellverhaltens von Immunzellen auswirken könnte [96]. Zudem wurden bereits verschiedene Subtypen von β 1-Integrinen auf der Oberfläche von PMNs beschrieben, die zwar an einige EZM-Komponenten wie Fibronectin banden, jedoch keine Bindung mit anderen EZM-Komponenten wie Kollagen I oder IV eingingen. Laut Sixt et al. können solch spezifisch-integrinvermittelten PMN-EZM-Wechselwirkungen, spezifische Informationen an die Zellen signalisieren, die eine Kontrolle auf die PMN-Bewegung in Entzündungsherden ausüben können [97, 97]. Demnach wäre es denkbar, dass für Kollagen I und III, Fibrin sowie LM-Agarose jeweils unterschiedliche Adhäsionsrezeptoren existierten, die eine unterschiedliche Migrationslänge der PMNs in den verschiedenen Matrices erklären könnten.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der Auswertung der Migrationslängen ein von Loike et al. bereits 1995 formuliertes Fazit: PMN-Chemotaxis wird durch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix reguliert [98].

4.2.1.4 Richtung, Geschwindigkeit und Zielgerichtetheit der Migration

Die computergestützte Softwareauswertung ermöglichte neben der Betrachtung der Migrationslängen eine genauere Analyse des PMN-Migrationsprozesses.

Die Parameter TrackLength und TrackSpeedMean sind in der Theorie durch mathematische Gesetze direkt proportional miteinander verknüpft. Vergleicht man die tatsächlichen Verläufe beider Parameter, so wird diese Korrelation auch in den Experimenten bestätigt (vgl. Tabelle 16 und Punkt 3.2.1.7). Die Tatsache, dass sich diese Proportionalität in den Ergebnissen widerspiegelt, ist zum einen als Vorteil der Exaktheit der maschinellen Auswertung zu werten, zum anderen lässt sich erkennen, dass unter der Voraussetzung definierter Zeiträume der Parameter TSM neben dem Parameter TL in allen Gelen auch als Maß für die Migrationsfähigkeit der PMNs verwendet werden könnte, wie dies bei bereits durchgeführten Studien (u.a. von Weckmann et al.) Anwendung fand [27].

Die Wahl der Matrix scheint sich zudem auf die TrackDisplacementLength auszuwirken, was man an den signifikanten Unterschieden in den ersten drei Abschnitten (0-30 & 31-60 & 61-90) erkennen kann (siehe Tabelle 20). Auffallend wurden in Fibrin in den ersten beiden

Abschnitten (0-30 & 31-60) signifikant niedrigere TDL-Werte beobachtet als in den übrigen Gelen. Da in Fibrin und Kollagen I ähnliche TL-Werte erreicht wurden (siehe Tabelle 16), war die PMN-Migration in Fibrin in Folge niedrigerer TrackStraightness-Werte (siehe Abbildung 17) ungerichteter als in den übrigen Gelen.

Dies kann dadurch begründet sein, dass sich in Fibrin ein Chemotaxisgradient schwieriger und langsamer ausbildete. Dazu passen würde die steigende TrackStraightness gegen Ende des Versuchsverlaufs (siehe Abbildung 17); oder aber PMNs können durch Beeinflussung der Fibrin-EZM chemotaktischen Gradienten weniger folgen als in anderen EZMs aus Kollagen oder LM-Agarose. Letztere Annahme würde die von Burns et al. beschriebene Beobachtung bestätigen, dass die Hafteigenschaften verschiedener EZM-Elemente (in diesem Falle des Fibrins) nicht nur die Geschwindigkeit, beziehungsweise nicht nur die Migrationslänge, sondern auch die Richtung der Leukozytenbewegung beeinflussen kann [21]. Die Tatsache, dass PMNs bei der Extravasation den Weg des geringsten Widerstands zu wählen scheinen, lässt Spekulationen zu, dass auch bei der Migration durch das Interstitium das Prinzip des geringsten Widerstands Anwendung findet [5].

4.2.1.5 Abfolge der Immuneffekte

Die Abfolge der Immuneffekte folgte in den Gelen Kollagen I und III sowie Fibrin folgendem Schema: ROS-Produktion, MPO-Freisetzung und am Schluss NETosis. Diese Abfolge stimmt mit früheren Beobachtungen von Doblinger et al. überein und ist in der gegenwärtigen Fachliteratur anerkannt. Sie spiegelt wider, dass zuerst ROS und MPO durch Degranulation freigesetzt werden, während final die NETosis eintritt [43, 67, 99].

In LM-Agarose fand wie erwartet die ROS-Produktion als erster Immuneffekt ein Maximum, dann wurde jedoch zuerst $ET_{50}NETosis$ und erst danach $ET_{50}MPO$ erreicht (siehe Tabelle 23). Dies lässt sich bei einem Unterschied der MW, der kleiner als die SD ist (vgl. Tabelle 23), am ehesten aufgrund Ungenauigkeiten der Messmethode, begründen. Eine abweichende Reihenfolge kann unter Einbezug problemrelevanter Fachliteratur nicht erklärt werden.

Dadurch, dass die einzelnen Zeiten der Immuneffekte zueinander in Beziehung gesetzt wurden (siehe Tabelle 23, rechte Hälfte Prozentangaben), erhielt man ein relatives Maß für die Abfolge der Immuneffekte. Ähnliche Relationswerte wurden lediglich bei den Gelen Kollagen I, Kollagen III und Fibrin bezüglich des Quotienten $\frac{T_{max}ROS}{ET_{50}NETosis}$ festgestellt. Ebenso wies der Quotient $\frac{ET_{50}MPO}{ET_{50}NETosis}$ in den Gelen Kollagen I und Kollagen III ähnliche Werte auf.

Folglich variierte in Abhängigkeit der Gelmatrix der zeitliche Abstand zwischen den Effekten. Diese Tatsache spricht dafür, dass kein fixes zeitlich definiertes Schema, nach dem diese Effekte nacheinander vollzogen werden, zu existieren scheint.

4.2.1.6 ROS-Produktion

Die Ergebnisse der mikroskopischen Beobachtung und anschließender Auswertung zeigten, dass die Wahl der EZM-Matrix einen Einfluss auf die ROS-Produktion von PMNs hat. Am eindrucksvollsten wurde dies bei Kollagen III mit einem im Vergleich signifikant früheren MW $T_{\max}\text{ROS}$ bei $47,9 \pm 7,1$ min sichtbar. Daraus lässt sich ableiten, dass PMNs in Gel-Matrizes aus Kollagen III zu verstärkter ROS-Produktion neigen. Der EZM-Einfluss auf die ROS-Produktion der PMNs konnte zudem in Fibrin mit einem (in Bezug auf LM-Agarose) verspäteten $T_{\max}\text{ROS}$ festgestellt werden (siehe Tabelle 23).

Dadurch bestätigten die Ergebnisse dieser Arbeit ein von Nathan et al. bereits 1989 veröffentlichtes Postulat, wonach der zytokin-induzierte Respiratory Burst von PMNs und damit die ROS-Produktion von PMNs abhängig ist von Interaktionen mit der EZM [100]. An dieser Stelle ist also festzuhalten, dass Vergleiche von Laborergebnissen bezüglich der ROS-Produktion von PMNs stets kritisch betrachtet werden sollten, wenn PMNs in unterschiedliche Gelmatrizes eingebettet wurden.

4.2.1.7 MPO-Freisetzung

Die ausgewerteten Daten zeigten, dass EZ-Gelmatrizes auch in Bezug auf die MPO-Freisetzung einen signifikanten Einfluss auf PMNs ausübten. So war die MPO-Freisetzung in LM-Agarose mit MW = $267,1 \pm 21,4$ min im Vergleich zu den anderen Gelen verspätet. Statistische Signifikanz wurde jedoch nur gegenüber Kollagen III und Fibrin erlangt, gegenüber Kollagen I nicht. Nichtsdestotrotz scheint die Wahl der EZ-Gelmatrix die MPO-Freisetzung von PMNs zu beeinflussen. Folglich ist in Bezug auf die MPO-Freisetzung von PMNs ein Vergleich verschiedener chemotaktischer Forschungsarbeiten nicht möglich, wurden die PMNs in unterschiedliche dreidimensionale Matrizes eingebettet.

Eine unkontrollierte MPO-Freisetzung durch PMNs birgt (ähnlich einer übermäßigen ROS-Produktion) die Gefahr von Gewebeschädigungen, die mit negativen Verläufen verschiedener inflammatorischer Krankheiten wie Rheumatoider Arthritis oder akuter sowie chronischer Pneumonie assoziiert ist [31]. Die Kenntnis der Molekularmechanismen, die hinter einer gehemmten MPO-Freisetzung in LM-Agarose stehen, wären hilfreich, um eine

medikamentöse Eindämmung einer PMN-Überreaktion bei akut- wie chronisch-inflammatorischen Krankheiten zu entwickeln.

4.2.1.8 NETosis

Bei der Betrachtung der PMN-NETosis fiel auf, dass in Fibrin der ET₅₀NETosis mit einem MW = 287,3 ± 41,9 min am spätesten beobachtet wurde. Statistische Signifikanz wurde nur gegenüber LM-Agarose und Kollagen III erreicht. Gegenüber Kollagen I wurde ebenso eine verspätete NETosis beobachtet, die statistische Signifikanz wurde (mit p=0,096) jedoch verfehlt. Dennoch lässt sich ein signifikanter Einfluss der EZM-Gele auf die NETosis erkennen, wobei Gelmatrizes aus Fibrin hemmend auf die NETosis von PMNs zu wirken schienen.

Festzuhalten ist auch hier, dass beim Vergleich verschiedener in vitro PMN-Chemotaxis-Studien, bezüglich der NETosis der Einfluss der Matrix berücksichtigt werden muss.

Darüber hinaus kann die in Fibrin verspätet beobachtete NETosis in einen größeren Zusammenhang eingeordnet werden. Es wurde in aktuellen Studien zur Sepsis festgestellt, dass eine übermäßige Bildung von NETs mit der Entwicklung von Organschäden korreliert, und NETs mit einer gesteigerten Disseminierten intravaskulären Gerinnung (DIC) assoziiert sind [33, 101]. Auch scheinen NETs zu einer höheren Thromboseneigung bei Patienten mit SLE, COVID-19 und einer frühzeitigen Filterverstopfung beim Langzeiteinsatz der Extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) auf Intensivstationen beizutragen [41, 102–105].

NETs werden bei infektiösen oder nicht infektiösen Erkrankungen unter anderem auch innerhalb des Gefäßsystems gebildet. Eine Studie von Fuchs et al. legte dar, dass NETs dort durch Bildung eines Gerüsts prokoagulierend wirken können. So wirken NETs zum einen stimulierend in Bezug auf Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten. Zum anderen fördern NETs durch Bindung von Fibrinogen die Ausbildung thrombinabhängiger Fibrinbildung. Es wurde beobachtet, dass NETs und Fibrin in vitro kolokalisieren. Fuchs et al. stellten basierend darauf die Vermutung auf, dass NETs eng mit Fibrinsträngen im Thrombus interagieren und somit die Thrombusorganisation und -stabilität beeinflussen können [102].

Die unter Punkt 3.2.2.4 beschriebenen Ergebnisse lassen keine Interpretation einer Interaktion von NETs mit fertigen Fibrinthromben zu. In diesem Kontext ist jedoch sehr interessant, dass PMNs, wenn sie in Kontakt mit Fibrin kommen, verzögert NETosis betreiben. Die Daten

könnten so interpretiert werden, dass Fibrin Signale an PMNs übermittelt, die eine Verzögerung eines Zelltods im Sinne einer NET-Produktion bewirken.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass NETs beziehungsweise NETosis die Bildung und Stabilisierung von Fibrinthromben fördern; Fibrin hemmt jedoch NETosis und damit die Bildung von NETs. Führt man diesen Gedanken konsequent fort, so würde dies die Existenz eines negativen Rückkopplungsmechanismus bedeuten. Das wirft die Frage auf, ob es einen Fibrin-getriggerten NETosis-Verzögerungsmechanismus und damit letztendlich einen Fibrin gesteuerten Verzögerungsmechanismus der NETosis-vermittelten Thrombose gibt. Während frühere Ansätze (u.a. von Bredthauer et al.) keinen Einfluss von medikamentösen Gerinnungshemmern (Heparinen und Argatroban) auf die NETosis von PMNs nachweisen konnten, hätte man mit der PMN-Fibrin-Interaktion womöglich einen Angriffspunkt, um die koagulationsfördernde Wirkung von PMNs zu hemmen [89].

4.2.1.9 Kollagen I als Referenzgel

Interessanterweise ergeben sich bei allen drei beobachteten Immuneffekten fast keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Referenzgel Kollagen I und den übrigen Gelen. Einzig der Unterschied bei der ROS-Produktion zwischen Kollagen I und Kollagen III erreichte statistische Signifikanz. Zudem zeigten die im Vergleich längsten Migrationslängen, dass PMNs sich in Kollagen I sehr gut bewegen konnten.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte darin liegen, dass PMNs durch Gele aus Kollagen I im Vergleich am wenigsten stark beeinflusst werden, und Kollagen I somit günstige in vitro Untersuchungsbedingungen bereitstellt. Im Hinblick auf die Untersuchung weiterer Einflüsse, wie zum Beispiel der Einfluss von Lokalanästhetika oder Gerinnungshemmern auf granulozytenspezifische Funktionen, ist Kollagen I als EZM-Gel zu empfehlen [67, 89].

4.2.2 Besonderheiten und Limitierungen des In-vitro-Untersuchungsmodells

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, möglichst allgemeingültige Ergebnisse zum Verhalten von PMNs in EZM zu generieren. Anhand von Kenntnissen in der Fachliteratur wurden dafür geeignete Untersuchungsbedingungen und -schritte ausgewählt, die nachfolgend aufgegriffen und erörtert werden.

4.2.2.1 Gewinnungs- und Isolierungsmethoden neutrophiler Granulozyten

Nach Elghetany et al. kann die Wahl der Antikoagulanzen in Blutabnahmeröhrchen Auswirkungen auf einzelne Funktionen von PMNs haben [85]. In den Versuchen dieser Arbeit wurden Lithium-Heparin-Blutentnahmeröhrchen zur Vollblutgewinnung verwendet, da das Heparin-Antikoagulanzen sich in einer von Hodge et al. publizierten Studie als die für die Durchführung von funktionellen PMN-Assays geeignetste Substanz herausstellte [86]. Die Vorteile der PMN-Isolierung aus Vollblut durch physikalische Dichtegradientenzentrifugation (Leuko-/Lymphospin-Technik) lagen in erster Linie in einer geringen Anzahl an Waschschrinen. Elghetany et al. beschrieben letzteres als vorteilhaft bezüglich einer Vermeidung von Störsignalen, wenn (wie in dieser Arbeit geschehen) fluoreszenzmarkierte Antikörper im Versuchsaufbau verwendet wurden [87].

4.2.2.2 Anpassung der Temperatur- und Umgebungsbedingungen

Elghetany et al. berichteten außerdem darüber, dass die Temperatur PMNs hinsichtlich ihrer Aktivität zu beeinflussen scheint [85]. Forsyth und Levinsky stellten bereits 1990 fest, dass durch Abkühlen auf 4°C und anschließendes Wiederaufwärmen auf 21°C (respektive 37°C) unter anderem β 2-Integrine hochreguliert werden [106]. Da noch nicht vollständig geklärt ist, ob bei der interstitiellen Migration auch β 2-Integrine beteiligt sind (siehe Punkt 1.1.1.2), könnte sich das Abkühlen und Wiederaufwärmen auf die interstitielle Migration auswirken. Zusätzlich scheint nach Schleiffenbaum et al. die Temperatur die Degranulation der PMNs zu beeinflussen. Daher wurde Wert darauf gelegt, bei den einzelnen Methodenschritten den Temperaturbereich von 21°C bis 37°C nicht zu verlassen [107]. Zwar wurde bei der Herstellung einer LM-Agarosematrix LM-Agarose zur Verflüssigung auf 66°C erhitzt; durchgeführte Messungen ergaben jedoch, dass zum Zeitpunkt der Zugabe der PMN-Suspension eine Temperatur von 37°C im fertigen Gemisch nicht überschritten wurde.

4.2.2.3 Vorteile und Limitierungen des In-vitro-Untersuchungssystems

Die in dieser Arbeit verwendeten μ -slide-Chemotaxiskammern[®] von IBIDI (15) eigneten sich zur Simulation von in vivo Bedingungen des Interstitiums, da dadurch die Zellen in eine Matrix eingebettet werden konnten (siehe Punkt 1.2.3) [64, 93]. Zwar wurden durch die μ -slide-Kammern über einen langen Zeitraum stabile Untersuchungsbedingungen geschaffen; grundsätzlich handelte es sich jedoch um ein statisches System [65, 108]. Ein interstitieller Fluss, der den mechanischen Veränderungen im menschlichen Gewebe durch den Blutfluss entspricht, fehlte. Obwohl die in eine Gelmatrix eingebetteten PMNs physikalischen

Scherkräften ausgesetzt waren, unterschieden sich diese Kräfte deutlich von der Diversität in der Physiologie [63]. Die größte Limitierung des verwendeten Aufbaus mit all seinen Vorteilen dürfte jedoch das Fehlen eines sehr wichtigen Schrittes in der PMN-Migrationskaskade sein: die Migration von PMNs aus dem Blutgefäß durch das Endothel zum Gewebe [63].

4.2.2.4 Determinierung der Auswertungskriterien

Die Software Imaris[®] ermöglichte es, die über den Zeitraum der mikroskopischen Beobachtung in Einzelbildern aufgenommenen Prozesse detailliert zu evaluieren, deren Zusammenhänge zu identifizieren und schließlich in individuelle Parameter zu quantifizieren.

Pierzalchski et al. beschrieben als Nachteil von Dichtegradientenzentrifugation, dass diese eine begrenzte Spezifität aufweist. Deshalb musste davon ausgegangen werden, dass das erhaltene Zellisolat keine absolute PMN-Reinheit aufwies [109]. Daher wurden in Imaris[®] bei der Migrationsauswertung die unter Punkt 2.4.1.1 aufgeführten Filter festgelegt, um einer fälschlichen Detektion kleinerer Zellen (wie Thrombozyten) und nur tatsächlich migrierende Zellen (PMNs) in die Auswertung mit aufzunehmen [6]. Durch weitere Anpassungen der Auswertungskriterien (siehe Punkt 2.4.1.2) wurde größtenteils sichergestellt, dass zur Analyse der Immuneffekte hauptsächlich PMNs einbezogen wurden, wobei die Summe der Fläche aller zu einem Zeitpunkt aktivierten (fluoreszierenden) Zellen ein Maß für die Höhe der spezifischen Funktionen der einzelnen Zellen darstellte.

4.2.2.5 Wahl des allgemeinen Referenzzeitpunktes

Alle ermittelten Zeitwerte bezogen sich erhebungsbedingt zunächst auf den Start der mikroskopischen Beobachtung. Da die Gele unterschiedliche Aushärtungszeiten besaßen, und um den Störeffekt variabler Verarbeitungszeiten zu minimieren, wurde als einheitlicher Startpunkt der Zeitpunkt des ersten Kontaktes von PMNs und Gelmatrix gewählt. Alle berechneten Zeiten und Beobachtungszeiträume wurden auf diesen Zeitpunkt normiert, da sich dieser in einer vergleichenden Analyse (siehe Punkt 3.2.3) durch die geringste Standardabweichung als am geringsten störanfällig erwies.

4.2.3 Assoziation der gesteigerten Aktivierung von Neutrophilen in Kollagen III mit inflammatorischen Erkrankungen

PMNs können bei infektiösen oder autoimmunen Erkrankungen Gewebeschäden als Folge einer schlecht kontrollierten PMN-Aktivierung vermitteln, weshalb PMNs in die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen mit einbezogen wurden [110]. Vor allem die PMN-vermittelte

extrazelluläre ROS-Freisetzung, spielt eine wichtige Rolle bei oxidativen Schäden durch EZM und kann das Fortschreiten von Entzündungskrankheiten fördern [111].

Betrachtet man das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell trotz aller Limitierung als Abbild der (patho-)physiologischen Realität, so lässt sich möglicherweise die verstärkte ROS-Produktion und gehemmte Migration in Kollagen III mit PMN-assoziierten Krankheiten, wie ARDS und Pyoderma Gangränosum (PG), in Zusammenhang bringen.

Gade et al. zu Folge besitzen neutrophil-inflammatorische Erkrankungen der Haut (PG) und der Lunge (ARDS) eine enge Verbindung [112], wobei nach Watanabe et al. eine aggressive Krankheitsaktivität von PG sogar ein ARDS auslösen kann [113]. In diesem Zusammenhang ist auffallend, dass bei beiden Erkrankungen PMNs maßgeblich an der Pathologie beteiligt sind und beide Erkrankungen ihren Fokus in Kollagen-III-reichen Geweben haben (siehe unten).

4.2.3.1 Pyoderma Gangränosum

Die Ätiologie von PG ist noch weitgehend unbekannt und die pathophysiologischen Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt [114]. Obwohl es verschiedene Erscheinungsformen von PG gibt, werden bei allen Formen subepidermale und dermale Infiltrate von morphologisch reifen PMNs beobachtet, welche jedoch eine abnormale Chemotaxis und bakterizide Fähigkeit besitzen, sowie eine Überexpression und Dysregulation von Integrinen aufweisen [45, 115, 116].

An diesen Infiltratorten der Subepidermis und der Dermis kommt Kollagen III in der EZM gehäuft vor. Kollagen III bildet das flächige Netz der Lamina Fibroreticularis der Basalmembran, die sich an der basolateralen Seite des epidermalen Epithels befindet und letztendlich die Verankerung des Epithels am subepithelialen Gewebe der papillären Dermis vermittelt. Das räumliche Netz der papillären Dermis besteht wiederum zu einem Großteil aus Kollagen-III-Fibrillen, die über fibrilläre Anker wiederum mit der Basalmembran (Lamina Densa) verbunden sind [117].

4.2.3.2 Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS)

ARDS kann als Komplikation einer Pneumonie oder Aspiration direkt oder als Folge einer Sepsis oder eines Traumas auftreten. PMNs wandern im Rahmen einer Inflammationsreaktion ins Lungenparenchym ein und setzen dabei neben weiteren Substanzen auch ROS frei. Diese können zu einer Schädigung von alveolaren Strukturen beitragen, welche in einer höheren

parazellulären Permeabilität resultieren und letztendlich im akuten Lungenversagen enden können [39].

Im Lungenparenchym, in das PMNs beim ARDS einwandern, hat Kollagen III eine wichtige Bedeutung. Die Fibrillen der Alveolarwände und -septen bestehen größtenteils aus Kollagen III [118, 119]. Zudem ist auch hier wie in der Haut die Lamina Fibroreticularis der Basalmembran über Ankerfibrillen mit den Kollagen-III-Fibrillen des Interstitiums verbunden [21]. Wie Pugin et al. beschrieben, findet überdies bereits in der Frühphase des ARDS an den Alveolen eine intensive Inflammation und eine erhöhte Synthese von Kollagen III statt [120].

4.2.3.3 Fazit der Assoziationsbeobachtungen

Bei den ausgewählten Vertretern von infektiösen und autoimmunen PMN-Krankheiten scheint der Hauptfokus jeweils in Kollagen-III-reichem Gewebe zu liegen. Zudem scheint Kollagen III in Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch bei gesunden Probanden die PMNs bezüglich Migration und ROS-Produktion in einen anderen Aktivierungszustand zu versetzen.

Obwohl es bisher keine Untersuchungen bezüglich einer Verknüpfung gab, und eine valide Datenlage nicht existiert, bieten die Beobachtungen Spielraum für Spekulationen, dass eine Interaktion von PMNs in Kollagen III mit pathophysiologischen Vorgängen von Haut (PG) oder Lunge (ARDS) in Zusammenhang stehen könnte. Einen Beweis kann die vorliegende Arbeit nicht erbringen. Die weitere Aufklärung von inflammationsfördernden Einflüssen des Kollagen III auf PMNs könnte jedoch dazu beitragen, molekulare Pathomechanismen sowohl infektiöser, als auch autoimmuner Erkrankungen besser zu verstehen.

4.3 Zusammenfassende Bewertung

Neutrophile Granulozyten bilden eine erste Verteidigungslinie gegenüber Pathogenen und sind daher ein essenzieller Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Chemotaktische Migration, ROS-Produktion, MPO-Freisetzung und NETosis gehören zu den Schlüsselfunktionen der PMN-Immunabwehr. Diese müssen einer strengen Regulation unterliegen, da sowohl Neutropenie als auch PMN-Überreaktionen alarmierende und zum Teil lebensbedrohliche Zustände sind [13].

Obwohl PMNs bei diesen pathophysiologischen Prozessen sicherlich nicht die einzigen schädlichen Faktoren sind, können sie doch Schlüsselrollen bei der Entstehung und

Aufrechterhaltung pathophysiologischer Prozesse übernehmen [39]. Vor dem Hintergrund, dass fehlgeleitete PMN-Aktivierungen in hohem Maße von im Interstitium ablaufenden Aktivitäten abhängen können, versuchte die vorliegende Arbeit, Einflüsse der PMN-Umgebung, also der umgebenden interstitiellen Matrix, auf Funktionen der PMNs zu untersuchen [22].

Die aufgezeigten und diskutierten Ergebnisse widerlegten die Forschungshypothese, dass die Wahl der Matrix bei Chemotaxisgradienten keinen Einfluss auf die Funktionen der PMNs ausübt. Es ergaben sich zwischen den einzelnen Matrices in allen untersuchten Parametern signifikante Unterschiede, was eine Beeinflussung der PMN-Funktionen Migration, ROS-Produktion, MPO-Freisetzung und NETosis belegt.

Daher lässt sich folgende zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse als Antwort auf die Forschungsfrage vornehmen:

- Werden Chemotaxisstudien von PMNs in unterschiedlichen Matrices durchgeführt, so können diese nicht ohne weiteres in Bezug auf PMN-Funktionen miteinander verglichen werden.
- Die Migration war von Wechselwirkungen mit der Gelmatrix abhängig. So hatte Kollagen III einen größeren Hemmeffekt auf die PMN-Beweglichkeit. Fibrin und LM-Agarose hatten im Vergleich zum Kollagen III einen leicht hemmenden Effekt auf die Beweglichkeit. Die Ergebnisse zeigten, dass nicht nur Migrationslängen, sondern auch die Richtung der Bewegung durch die EZM-Gele beeinflusst wurden. Eine integrin-vermittelte Interaktion der EZM mit den PMNs stünde im Einklang mit früheren (u.a. von Lindbom et. al., Leitinger und Hohenester oder Sixt et al. publizierten) Studien, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht bewiesen werden [22, 96, 97].
- Die ROS-Produktion war von Wechselwirkungen der PMNs mit der Gelmatrix abhängig. So zeigte sich in Kollagen III im Vergleich mit den anderen Gelen eine verfrühte und in Fibrin eine im Vergleich zu LM-Agarose verspätete ROS-Produktion.
- Die Kenntnis der Molekularmechanismen, die hinter einer hemmenden MPO-Freisetzung in LM-Agarose stehen, wären hilfreich, um eine medikamentöse Eindämmung einer PMN-Überreaktion bei akut- wie chronisch-inflammatorischen Krankheiten zu entwickeln.

- Einem hemmenden Effekt von Fibrin auf die NETosis könnte ein negativer Rückkopplungsmechanismus als Regulationsmaßnahme bei gesteigerter NET-vermittelter Thrombusbildung zugrunde liegen. Würde man die Existenz einer derartigen Rückkopplung sichern, könnte man sich die molekularen Mechanismen zu Nutze machen, um Substanzen zu entwickeln, die PMN-vermittelte thrombotische Komplikationen wie ECMO-Filterverstopfung, Thrombosen bei SLE, COVID-19 oder DIC bei Sepsis hinauszögern beziehungsweise verhindern.

Die Erforschung und Beeinflussung integrin-vermittelter Zell-Matrix-Interaktionen bietet nicht nur in der Grundlagenforschung ein lohnendes Thema, sondern ist schon heute eine wichtige Therapiesäule in der Behandlung inflammatorischer Erkrankungen. So werden mit Natalizumab zur Behandlung der Multiplen Sklerose oder mit Vedolizumab zur Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, bereits heute monoklonale Antikörper eingesetzt, die eine integrin-vermittelte Wechselwirkung von Lymphozyten mit ihrer Umgebung hemmen [121, 122]. Daher wäre es im Sinne einer therapieorientierten Forschung wünschenswert in zukünftigen Studien auch die Interaktionen von PMNs mit ihrer Umgebung weiter zu erforschen, um eine mögliche Integrin-Beteiligung aufzuklären.

Abschließend wurde festgestellt, dass die PMN-assoziierten Erkrankungen Pyoderma Gangränosum und ARDS Läsionsfoki in EZM aus Kollagen III reichem Gewebe besitzen. Diese Feststellung wurde mit einer gehemmten Migration und einer verfrühten ROS-Produktion in EZM aus Kollagen III als Ergebnisse dieser Arbeit in Verbindung gebracht. Diese Verbindung könnte vor dem Hintergrund, dass eine fundierte Datengrundlage zu einem möglichen Zusammenhang in der Literatur bislang fehlt, als Anreiz für Fragestellungen künftiger Studien gesehen werden.

5 Zusammenfassung

Festzuhalten ist, dass die verwendeten Methoden zielführend waren, eine Funktionsprüfung von neutrophilen Granulozyten in verschiedenen extrazellulären Matrices außerhalb des Körpers durchzuführen. Anders als in früheren Studien wurden nicht nur Migration, sondern auch ROS-Produktion, MPO-Freisetzung und NETosis der PMNs in den verschiedenen Matrices Kollagen I und III, LM-Agarose und Fibrin gleichzeitig beobachtet und analysiert.

Mit dieser Arbeit konnte ein Einfluss ausgewählter EZM-Komponenten auf spezifische Funktionen von neutrophilen Granulozyten (Migration, ROS-Produktion, MPO-Freisetzung, NETosis) nachgewiesen werden.

Obwohl die verwendeten Methoden Limitierungen aufwiesen, und die *in vivo* Bedingungen nicht holistisch nachstellbar waren, bieten die Methoden dieser Arbeit eine gute Möglichkeit den Einfluss einzelner Komponenten der komplexen extrazellulären Matrix auf Funktionen von PMNs herauszufiltern und zu untersuchen. Ein besseres Verständnis der molekularen Wirkmechanismen könnte den Weg für einen breiteren Einsatz bereits etablierter entzündungshemmender Therapien ebnen und darüber hinaus dazu beitragen, alternative Mittel und Wege zur Manipulation von Inflammationsantworten zu entdecken und weiterzuentwickeln [19, 51].

Zu diesem Zweck ist die Aufdeckung der genauen molekularen Mechanismen, die dem Einfluss der EZM auf die ausgewählten PMN-Funktionen zu Grunde liegen, von entscheidender Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Molekularmechanismen nicht ausführlich beleuchtet. Durch eine bestmögliche *In-vitro*-Nachahmung physiologischer Bedingungen, können die in dieser Arbeit verwendeten *In-vitro*-Methoden jedoch für weitere molekulare Forschung auf diesem Gebiet empfohlen werden. Die wahre physiologische Relevanz kann indessen nur durch *In-vivo*-Modelle überprüft werden [51].

Der Anspruch an künftige Studien sollte daher sein, die bestehenden Modelle unter ständiger Verwendung der neuesten Technik weiter auszufeuern und zu vervollkommen. Nur durch eine bestmögliche Nachahmung der Zustände des menschlichen Körpers bei akut-beziehungsweise chronisch-inflammatorischen Erkrankungen können neutrophile Schlüsselmechanismen und Signalwege entdeckt und effektive Behandlungsmethoden entwickelt werden [123].

Nur so können wir diese „allumfassende Maschinerie“ zur Sicherstellung der Integrität des menschlichen Organismus besser verstehen [3]. Unser Immunsystem.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Murphy K, Weaver C. Principles of innate immunity. In: Murphy K, Weaver C, Hrsg. Janeway's immunobiology. 9. Auflage. New York, London: GARLAND Science; 2017. S. 1–11.
- [2] Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010; 327(5963): S. 291–295.
- [3] Sattler S. The role of the immune system beyond the fight against infection. In: Sattler S, Kennedy-Lydon T, Hrsg. The immunology of cardiovascular homeostasis and pathology. Cham: Springer International Publishing; 2017. S. 3–10.
- [4] Quinn MT, DeLeo FR. Preface. In: Quinn MT, DeLeo FR, Hrsg. Neutrophil Methods and Protocols. 2. Auflage. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2014. S. vii–viii.
- [5] Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(3): S. 159–175.
- [6] Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Blut und Blutbildung. In: Lüllmann-Rauch R, Paulsen F, Hrsg. Taschenlehrbuch Histologie. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012. S. 280–303.
- [7] Turowski P. Segmentkernige Granulozyten in der Pappenheimfärbung. Abbildung abgedruckt mit freundlicher Genehmigung des Labors für pädiatrische Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Regensburg. 2021.
- [8] McCracken JM, Allen L-AH. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *J Cell Death* 2014; 7: S. 15–23.
- [9] Saverymuttu SH, Peters AM, Keshavarzian A, Reavy HJ, Lavender JP. The kinetics of ¹¹¹Indium distribution following injection of ¹¹¹Indium labelled autologous granulocytes in man. *British Journal of Haematology* 1985; 61(4): S. 675–685.
- [10] Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev* 2016; 273(1): S. 357–370.
- [11] Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 2010; 31(8): S. 318–324.
- [12] Murphy K, Weaver C. Pattern recognition by cells of the innate immune system. In: Murphy K, Weaver C, Hrsg. Janeway's immunobiology. 9. Auflage. New York, London: GARLAND Science; 2017. S. 77–106.

- [13] Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol* 2011; 32(10): S. 452–460.
- [14] Murphy K, Weaver C. Induced innate responses to infection. In: Murphy K, Weaver C, Hrsg. *Janeway's immunobiology*. 9. Auflage. New York, London: GARLAND Science; 2017. S. 107–133.
- [15] Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 2011; 17(11): S. 1381–1390.
- [16] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(9): S. 678–689.
- [17] Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: A molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* 2006; 203(12): S. 2569–2575.
- [18] Salvermoser M, Begandt D, Alon R, Walzog B. Nuclear deformation during neutrophil migration at sites of inflammation. *Front Immunol* 2018; 9: S. 2680.
- [19] Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: Leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(5): S. 366–378.
- [20] Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(9): a005074.
- [21] Burns AR, Smith CW, Walker DC. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev* 2003; 83(2): S. 309–336.
- [22] Lindbom L, Werr J. Integrin-dependent neutrophil migration in extravascular tissue. *Semin Immunol* 2002; 14(2): S. 115–121.
- [23] Friedl P, Borgmann S, Bröcker EB. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: Lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol* 2001; 70(4): S. 491–509.
- [24] Moghe PV, Nelson RD, Tranquillo RT. Cytokine-stimulated chemotaxis of human neutrophils in a 3-D conjoined fibrin gel assay. *J Immunol Methods* 1995; 180(2): S. 193–211.
- [25] Petri B, Sanz M-J. Neutrophil chemotaxis. *Cell Tissue Res* 2018; 371(3): S. 425–436.

- [26] Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubes P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol* 2002; 159(1): S. 91–102.
- [27] Weckmann M, Becker T, Nissen G, Pech M, Kopp MV. SiMA: A simplified migration assay for analyzing neutrophil migration. *Cytometry A* 2017; 91(7): S. 675–685.
- [28] Malech HL, DeLeo FR, Quinn MT. The role of neutrophils in the immune system: An overview. In: Quinn MT, DeLeo FR, Hrsg. *Neutrophil Methods and Protocols*. 2. Auflage. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2014. S. 3–10.
- [29] Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998; 92(9): S. 3007–3017.
- [30] El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie J-C, Gougerot-Pocidal M-A, Dang PM-C. Priming of the neutrophil respiratory burst: Role in host defense and inflammation. *Immunol Rev* 2016; 273(1): S. 180–193.
- [31] Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys* 2018; 640: S. 47–52.
- [32] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303(5663): S. 1532–1535.
- [33] Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; 13(4): S. 463–469.
- [34] Hart J. Inflammation: Its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care* 2002; 11(6): S. 205–209.
- [35] Chen Y, Junger WG. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol* 2012; 844: S. 115–124.
- [36] Arnold DE, Heimall JR. A review of chronic granulomatous disease. *Adv Ther* 2017; 34(12): S. 2543–2557.
- [37] van de Vijver E, van den Berg TK, Kuijpers TW. Leukocyte adhesion deficiencies. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013; 27(1): S. 101–116, viii.
- [38] Spoor J, Farajifarda H, Rezaeia N. Congenital neutropenia and primary immunodeficiency diseases. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2019; 133: S. 149–162.

- [39] Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol* 2011; 89(3): S. 359–372.
- [40] Shen X-F, Cao K, Jiang J-P, Guan W-X, Du J-F. Neutrophil dysregulation during sepsis: An overview and update. *J Cell Mol Med* 2017; 21(9): S. 1687–1697.
- [41] Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine* 2020; 58(102925): S. 1–9.
- [42] Benard Stefan. Chemisches Signal und biologische Antwort: Modulation der Generierung reaktiver Sauerstoffverbindungen aus neutrophilen Granulozyten. Leipzig: Akademische Verlagsanstalt Engelsdorf; 2000. S. 1-5.
- [43] Gupta S, Kaplan MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *nrneph* 2016; 12(7): S. 402–413.
- [44] Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The balancing act of neutrophils. *Cell Host & Microbe* 2014; 15(5): S. 526–536.
- [45] Alavi A, French LE, Davis MD, Brassard A, Kirsner RS. Pyoderma Gangrenosum: An update on pathophysiology, diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2017; 18(3): S. 355–372.
- [46] Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β . *Nature* 1993; 361(6407): S. 79–82.
- [47] Rot A. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: Role in neutrophil emigration. *Immunology Today* 1992; 13(8): S. 291–294.
- [48] Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK, Proudfoot AE. Regulation of protein function by glycosaminoglycans -- as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: S. 385–410.
- [49] Wang L, Fuster M, Sriramarao P, Esko JD. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat Immunol* 2005; 6(9): S. 902–910.
- [50] Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. Leukocyte extravasation: Chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 2002; 100(12): S. 3853–3860.

- [51] Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(10): S. 712–723.
- [52] van Goethem E, Poincloux R, Gauffre F, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V. Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: Differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J Immunol* 2010; 184(2): S. 1049–1061.
- [53] Jennings RT, Knaus UG. Neutrophil migration through extracellular matrix. *Methods Mol Biol* 2014; 1124: S. 209–218.
- [54] Cox EA, Huttenlocher A. Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microsc. Res. Tech.* 1998; 43(5): S. 412–419.
- [55] Kuntz RM, Saltzman WM. Neutrophil motility in extracellular matrix gels: Mesh size and adhesion affect speed of migration. *Biophysical Journal* 1997; 72(3): S. 1472–1480.
- [56] Konrad FM, Wohler J, Gamper-Tsigaras J, Ngamsri K-C, Reutershan J. How adhesion molecule patterns change while neutrophils traffic through the lung during inflammation. *Mediators of Inflammation* 2019; (1208086): S. 1–16.
- [57] Lin W-C, Fessler MB. Regulatory mechanisms of neutrophil migration from the circulation to the airspace. *Cell Mol Life Sci* 2021; 78(9): S. 4095–4124.
- [58] Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK, Kelley DG, Marconcini LA et al. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest* 2006; 116(3): S. 753–759.
- [59] Ospelt C, Gay S. TLRs and chronic inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2010; 42(4): S. 495–505.
- [60] Weathington NM, van Houwelingen AH, Noerager BD, Jackson PL, Kraneveld AD, Galin FS et al. A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat Med* 2006; 12(3): S. 317–323.
- [61] Gaggar A, Jackson PL, Noerager BD, O'Reilly PJ, McQuaid DB, Rowe SM et al. A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *The Journal of Immunology* 2008; 180(8): S. 5662–5669.
- [62] Nissen G, Hollaender H, Tang FSM, Wegmann M, Lunding L, Vock C et al. Tumstatin fragment selectively inhibits neutrophil infiltration in experimental asthma exacerbation. *Clinical & Experimental Allergy* 2018; 48(11): S. 1483–1493.

- [63] Toetsch S, Olwell P, Prina-Mello A, Volkov Y. The evolution of chemotaxis assays from static models to physiologically relevant platforms. *Integr Biol (Camb)* 2009; 1(2): S. 170–181.
- [64] Parkhurst MR, Saltzman WM. Quantification of human neutrophil motility in three-dimensional collagen gels. Effect of collagen concentration. *Biophysical Journal* 1992; 61(2): S. 306–315.
- [65] Zengel P, Nguyen-Hoang A, Schildhammer C, Zantl R, Kahl V, Horn E. μ -Slide Chemotaxis: A new chamber for long-term chemotaxis studies. *BMC Cell Biol* 2011; 12: S. 21.
- [66] Hattenkofer M, Gruber M, Metz S, Pfaehler S-M, Lehle K, Trabold B. Time course of chemotaxis and chemokinesis of neutrophils following stimulation with IL-8 or FMLP. *Eur J Inflamm* 2018; 16: S. 1–8.
- [67] Dobliger N, Bredthauer A, Mohrez M, Hähnel V, Graf B, Gruber M et al. Impact of hydroxyethyl starch and modified fluid gelatin on granulocyte phenotype and function. *Transfusion* 2019: S. 2121–2130.
- [68] Keenan TM, Folch A. Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab Chip* 2007; 8(1): S. 34–57.
- [69] Islam LN, McKay IC, Wilkinson PC. The use of collagen or fibrin gels for the assay of human neutrophil chemotaxis. *J Immunol Methods* 1985; 85(1): S. 137–151.
- [70] Reid G, Lackie J, Gorham S. The behaviour of BHK cells and neutrophil leukocytes on collagen gels of defined mechanical strength. *Cell Biology International Reports* 1990; 14(11): S. 1033–1045.
- [71] Sixt M, Lämmermann T. In vitro analysis of chemotactic leukocyte migration in 3D environments. *Methods Mol Biol* 2011; 769: S. 149–165.
- [72] Nelson RD, Quie PG, Simmons RL. Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *The Journal of Immunology* 1975; 115(6): S. 1650–1656.
- [73] Agrawal N, Toner M, Irimia D. Neutrophil migration assay from a drop of blood. *Lab Chip* 2008; 8(12): S. 2054–2061.

[74] IBIDI GmbH. Application Note No. 26: Fabrication of Collagen I Gels [Version 2.4]; 2014 [Abrufdatum: 01.05.2020, 18.00 Uhr]. Verfügbar unter URL:

https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN26_CollagenI_protocols.pdf.

[75] Jurgens WJFM, Lu Z, Zandieh-Doulabi B, Kuik DJ, Ritt MJPF, Helder MN.

Hyperosmolarity and hypoxia induce chondrogenesis of adipose-derived stem cells in a collagen type 2 hydrogel. *J Tissue Eng Regen Med* 2012; 6(7): S. 570–578.

[76] Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol* 1997; 139(5): S. 1349–1360.

[77] PluriSelect Life Science UG & Co. KG. Density Gradient Media Flyer (Abbildung modifiziert durch Richard Kraus). Mit freundlicher Genehmigung der PluriSelect Life Science UG [Abrufdatum: 12.09.2019, 11.20 Uhr]. Verfügbar unter URL:

https://www.pluriselect.com/de_de/mwdownloads/download/link/id/39/.

[78] Omelon S, Georgiou J, Habraken W. A cautionary (spectral) tail: Red-shifted fluorescence by DAPI–DAPI interactions. *Biochem Soc Trans* 2016; 44(1): S. 46–49.

[79] de Buhr N, von Köckritz-Blickwede M. How neutrophil extracellular traps become visible. *Journal of Immunology Research* 2016; (4604713): S. 1–13.

[80] IBIDI GmbH. Application Note No. 17 (Abbildung modifiziert durch Richard Kraus). Mit freundlicher Genehmigung der IBIDI GmbH [Abrufdatum: 12.09.2018, 18.50 Uhr]. Verfügbar unter URL:

https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN17_Chemotaxis2Dand3D.pdf.

[81] IDG Business Media GmbH. Voxel statt Pixel: Aktuelle Methoden der 3D-Darstellung. *Computerwoche*; 05/1991 [Abrufdatum: 11.02.2019, 10.30 Uhr]. Verfügbar unter URL:

<https://www.computerwoche.de/a/voxel-statt-pixel-aktuelle-methoden-der-3d-darstellung>.

[82] Noak K. Polynomrechner: Ableitungssoftware für Polynome. Matheretter; 2018 [Zuletzt geprüft am 06.02.2019, 15.30 Uhr]. Verfügbar unter URL:

<https://www.matheretter.de/rechner/polynomrechner>.

[83] Brünner A. Software zur Nullstellenbestimmung von Polynomen: Version: 22. 5. 2004 [Zuletzt geprüft am 06.02.2019, 11.00 Uhr]. Verfügbar unter URL: <https://www.arndt-bruenner.de/mathe/scripts/polynome>.

- [84] Schwarz J, Bruderer Enzler H. UZH - Methodenberatung: Statistik: Universität Zürich [Abrufdatum: 14.11.2019, 18.30 Uhr]. Verfügbar unter URL: <https://www.methodenberatung.uzh.ch/de.html>.
- [85] Elghetany MT, Davis BH. Impact of preanalytical variables on granulocytic surface antigen expression: A review. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 2005; 65B(1): S. 1–5.
- [86] Hodge G, Flower R, Han P. Optimal storage conditions for preserving granulocyte viability as monitored by Annexin V binding in whole blood. *J Immunol Methods* 1999; 225(1-2): S. 27–38.
- [87] Chenoweth DE, Rowe JG, Hugli TE. A modified method for chemotaxis under agarose. *J Immunol Methods* 1979; 25(4): S. 337–353.
- [88] Trevani AS, Andonegui G, Giordano M, López DH, Gamberale R, Minucci F et al. Extracellular acidification induces human neutrophil activation. *The Journal of Immunology* 1999; 162(8): S. 4849–4857.
- [89] Bredthauer A, Kopfmüller M, Gruber M, Pfaehler S-M, Lehle K, Petermichl W et al. Therapeutic anticoagulation with argatroban and heparins reduces granulocyte migration: Possible impact on ECLS-Therapy? *Cardiovascular Therapeutics* 2020; (26): S. 1–10.
- [90] Pai D, Gruber M, Pfaehler S-M, Bredthauer A, Lehle K, Trabold B. Polymorphonuclear cell chemotaxis and suicidal NETosis: Simultaneous observation using fMLP, PMA, H7, and live cell imaging. *Journal of Immunology Research* 2020: S. 1–10.
- [91] Wolf K, Te Lindert M, Krause M, Alexander S, Te Riet J, Willis AL et al. Physical limits of cell migration: Control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J Cell Biol* 2013; 201(7): S. 1069–1084.
- [92] John JT, Sieber OF. Chemotactic migration of neutrophils under agarose. *Life Sci* 1976; 18(2): S. 177–181.
- [93] Kim BJ, Wu M. Microfluidics for mammalian cell chemotaxis. *Annals of Biomedical Engineering* 2012; 40(6): S. 1316–1327.
- [94] Li Jeon N, Baskaran H, Dertinger SKW, Whitesides GM, van de Water L, Toner M. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nat Biotechnol* 2002; 20(8): S. 826–830.
- [95] Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: The road taken. *Science* 1995; 268(5208): S. 233–239.

- [96] Leitinger B, Hohenester E. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biology* 2007; 26(3): S. 146–155.
- [97] Sixt M, Hallmann R, Wendler O, Scharffetter-Kochanek K, Sorokin LM. Cell adhesion and migration properties of β 2-integrin negative polymorphonuclear granulocytes on defined extracellular matrix molecules. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(22): S. 18878–18887.
- [98] Loike JD, el Khoury J, Cao L, Richards CP, Rascoff H, Mandeville JT et al. Fibrin regulates neutrophil migration in response to interleukin 8, leukotriene B4, tumor necrosis factor, and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Exp Med* 1995; 181(5): S. 1763–1772.
- [99] Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 2012; 198(5): S. 773–783.
- [100] Nathan C, Srimal S, Farber C, Sanchez E, Kabbash L, Asch A, Gailit J, Wright SD. Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: Dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J Cell Biol* 1989; 109(3): S. 1341–1349.
- [101] Delabranche X, Stiel L, Severac F, Galois A-C, Mauvieux L, Zobairi F et al. Evidence of Netosis in septic shock-induced disseminated intravascular coagulation. *Shock* 2017; 47(3): S. 313–317.
- [102] Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *PNAS* 2010; 107(36): S. 15880–15885.
- [103] Birkenmaier C, Dornia C, Lehle K, Müller T, Gruber M, Philipp A et al. Analysis of thrombotic deposits in extracorporeal membrane oxygenators by high-resolution microcomputed tomography. *ASAIO Journal* 2020: S. 1–7.
- [104] Steiger T, Foltan M, Philipp A, Mueller T, Gruber M, Bredthauer A et al. Accumulations of von Willebrand factor within ECMO oxygenators: Potential indicator of coagulation abnormalities in critically ill patients? *Artif Organs* 2019; 43(11): S. 1065–1076.
- [105] Wilm J, Philipp A, Müller T, Bredthauer A, Gleich O, Schmid C et al. Leukocyte adhesion as an indicator of oxygenator thrombosis during extracorporeal membrane oxygenation therapy? *ASAIO Journal* 2018; 64(1): S. 24–30.
- [106] Forsyth KD, Levinsky RJ. Preparative procedures of cooling and re-warming increase leukocyte integrin expression and function on neutrophils. *J Immunol Methods* 1990; 128(2): S. 159–163.

- [107] Schleiffenbaum B, Moser R, Patarroyo M, Fehr J. The cell surface glycoprotein Mac-1 (CD11b/CD18) mediates neutrophil adhesion and modulates degranulation independently of its quantitative cell surface expression. *The Journal of Immunology* 1989; 142(10): S. 3537–3545.
- [108] Pepperell EE, Watt SM. A novel application for a 3-dimensional timelapse assay that distinguishes chemotactic from chemokinetic responses of hematopoietic CD133+ stem/progenitor cells. *Stem Cell Research* 2013; 11(2): S. 707–720.
- [109] Pierzchalski A, Mittag A, Bocsi J, Tarnok A. An innovative cascade system for simultaneous separation of multiple cell types. *PLOS ONE* 2013; 8(9): e74745.
- [110] Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* 2014; 9: S. 181–218.
- [111] Jaganjac M, Cipak A, Schaur RJ, Zarkovic N. Pathophysiology of neutrophil-mediated extracellular redox reactions. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2016; 21: S. 839–855.
- [112] Gade M, Studstrup F, Andersen AK, Hilberg O, Fogh C, Bendstrup E. Pulmonary manifestations of pyoderma gangrenosum: 2 cases and a review of the literature. *Respiratory medicine* 2015; 109(4): S. 443–450.
- [113] Watanabe M, Natsuga K, Ota M, Ito K. Pyoderma Gangrenosum associated with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Med* 2016; 129(2): S. 17–18.
- [114] Gameiro A, Pereira N, Cardoso JC, Gonçalo M. Pyoderma gangrenosum: Challenges and solutions. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2015; 8: S. 285–293.
- [115] Ahronowitz I, Harp J, Shinkai K. Etiology and management of Pyoderma Gangrenosum. *Am J Clin Dermatol* 2012; 13(3): S. 191–211.
- [116] Adachi Y, Kindzelskii AL, Cookingham G, Shaya S, Moore EC, Todd III RF et al. Aberrant neutrophil trafficking and metabolic oscillations in severe Pyoderma Gangrenosum. *Journal of Investigative Dermatology* 1998; 111(2): S. 259–268.
- [117] Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Haut und Hautanhangsgebilde. In: Lüllmann-Rauch R, Paulsen F, Hrsg. *Taschenlehrbuch Histologie*. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012. S. 550–576.
- [118] Raghu G, Striker LJ, Hudson LD, Striker GE. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131(2): S. 281–289.

- [119] Shiomi T, Okada Y, Foronjy R, Schiltz J, Jaenish R, Krane S et al. Emphysematous changes are caused by degradation of type III collagen in transgenic mice expressing MMP-1. *Exp Lung Res* 2003; 29(1): S. 1–15.
- [120] Pugin J, Verghese G, Widmer MC, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1999; 27(2): S. 304–312.
- [121] Rosario M, Dirks NL, Milch C, Parikh A, Bargfrede M, Wyant T et al. A review of the clinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, and immunogenicity of Vedolizumab. *Clin Pharmacokinet* 2017; 56(11): S. 1287–1301.
- [122] Iaffaldano P, Lucchese G, Trojano M. Treating multiple sclerosis with natalizumab. *Expert Rev Neurother* 2011; 11(12): S. 1683–1692.
- [123] Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P, Luscinskas FW. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol* 2011; 32(10): S. 461–469.

7 Anhang

7.1 Details und nähere Informationen zu verwendeten Materialien und Geräten

- (1) 10 x Minimum-Essential-Medium: „10 x MEM“ (M0275; Sigma-Aldrich)
- (2) Nährmedium RPMI 1640: ohne L-glutamine, ohne phenolred, mit $2.0 \frac{g}{L}$ NaHCO_3 (P04-16516, Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland)
- (3) Natriumbikarbonat-Lösung 7,5 % (S8761; Sigma-Aldrich)
- (4) Kollagen I: Type I Bovine Collagen Solution, PureCol (5005, Advanced Biomatrix, San Diego, USA)
- (5) Indikatorpapier (90201, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- (6) Kollagen II aus Rinderknorpel: Collagen II from bovine cartilage (C1188, Sigma-Aldrich)
- (7) Essigsäure (338826; Sigma-Aldrich)
- (8) Natriumhydroxid-Lösung, NaOH (1091371000, Sigma-Aldrich)
- (9) Natriumhydrogencarbonat-Pulver, NaHCO_3 (S5761, Sigma-Aldrich)
- (10) Hepes-Puffer-Lösung, 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonsäure (83264, Sigma-Aldrich)
- (11) Kollagen II aus Knorpel vom Huhn: Collagen from Chicken Cartilage (C9301, Sigma-Aldrich)
- (12) Kollagen III aus Rinderhaut: 90% Kollagen III aus Rinderhaut, 10% Rinder Kollagen I und <0,5% nicht Kollagenproteine (CC078, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- (13) Agarose (A9539, Sigma-Aldrich)
- (14) Hanks' Balanced Salt Solution: „HBSS“ (H6648, Sigma-Aldrich)
- (15) Fetales Kälberserum: „FKS“ (F7524, Sigma-Aldrich)

- (16) Low-Melting-Agarose: „LM-Agarose“ (9414, Sigma-Aldrich)
- (17) Fibrinogen aus Rinderplasma: enthält mehr als 95% gerinnungsfähiges Protein
(341573-1GM, Merck)
- (18) Thrombin: Aktivität: 1KU (605157-1KU, Merck; Lot.Nr.: : 2971074)
- (19) Dulbecco's-Phosphate-Buffered-Saline-Waschpuffer: „PBS“-Puffer mit Ca^{2+} -Ionen
(D1283, Sigma Aldrich)
- (20) Medium 199: mit Earles Salzen (M3769: Sigma-Aldrich)
- (21) Safety-Multifly-Kanüle: 0,9 x 19 mm (156354, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht,
Deutschland)
- (22) Blutabnahmeröhrchen Lithium-Hepatin (S-Monovette[®] 7,5 mL 01.1604, Sarstedt AG)
- (23) Zentrifugenröhrchen (Corning[®], Falcon[™] Zentrifugenröhrchen, CORN430790,
Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland)
- (24) Leuko-Spin-Medium: PluriSpin (60-00091, PluriSelect Life Science – Worldwide,
Leipzig, Deutschland)
- (25) PBMC-Spin-Medium/Lympho-Spin-Medium (60-00092, pluriSelect Life Science)
- (26) Zentrifuge: Heraeus[™], Megafuge 1.0 R, ThermoFisher Scientific, Langenselbold,
Deutschland)
- (27) Neubauer-Zählkammer: Neubauer-improved (0640030, Paul Marienfeld GmbH & Co.
KG, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- (28) Dulbecco's-Phosphate-Buffered-Saline-Waschpuffer: „PBS“-Puffer (D8537; Sigma-
Aldrich, St.Louis, USA)
- (29) Dihydrorhodamin-123-Färbelösung: „DHR“ (D23806, Thermo Fisher Scientific,
Waltham, USA) in Dimethylformamid ($c(\text{DMF}) = \frac{10\text{mg}}{26,2\text{mL}}$)
- (30) N,N-Dimethylformamid: „DMF“ (D4551, Sigma-Aldrich)
- (31) 4',6-Diamidin-2-phenylindol: „DAPI“ (D9542, Sigma-Aldrich)
- (32) Antikörper Anti-MPO-APC (REA 491, Miltenyl Biotec, Deutschland)
- (33) μ Slide-Chemotaxiskammern[®] (80326, Firma IBIDI, Martinsried, Deutschland)

- (34) Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin: „FMLP“ (F3506, Sigma-Aldrich)
- (35) *ibidi Heating System* und *ibidi Gas incubation System for CO₂*: Stage Top Incubation System, Universal Fit, for 1 Chamber, CO₂/O₂ (10722, Firma IBIDI)
- (36) Inversionsmikroskop Leica DMi 8 (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- (37) Fluoreszenzkamera: Leica DFC9000 GT (Leica Mikroskopie)
- (38) Harmonic Compound Objektiv: HC, PL FL L20x/0,40 CORR PH1 (Leica Mikroskopie)
- (39) CoolLED pE-4000 (CoolLED Ltd., Andover, Großbritannien)
- (40) Filterwürfel DAPI/FI (Leica Mikroskopie)
- (41) LED QUAD Filterwürfel (Chroma Technology Corp., Bellows Falls, USA)
- (40/41) Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Absorptionsfilter

Die für die einzelnen Immuneffekte verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter sind **hervorgehoben** unter Angabe der jeweiligen Färbemethode in Klammern:

	DAPI/FI	LED QUAD
Anregungsfilter (Einlassbereich) [nm]	380-410 (DAPI); 472-498 (DHR)	350-380; 460-480; 522-548; 615-635 (Anti-MPO-APC)
Di- bzw. polychroitischer Filter [nm]	418; 502	405; 485; 555; 645
Emissionsfilter (Ausgangsfilter) [nm]	424-460 (DAPI); 505-545 (DHR)	410-450; 492-518; 560-590;
Low-Pass Filter [nm]	-	650 (Anti-MPO-APC)

- (42) Softwareplattform: Leica Application Suite X Version 3.4.18368.2 (Leica Mikroskopie)
- (43) Computersoftware Imaris[®]: Version 9.0.2 (Bitplane AG, Zürich, Schweiz)
- (44) Kalkulationsprogramm Excel[®] 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- (45) Computersoftware Phoenix[®] 8.0.0 (Certara L.P., Princeton, USA)
- (46) Datenauswertungs-/Analyseprogramm IBM SPSS[®] Statistics 25 (IBM, Armonk, USA)

7.2 Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
C5a	aktivierter Komplementfaktor C5
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COVID-19	Coronavirus induced disease 2019
CXCL8	C-motif-chemokine-ligand-8
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHR	1,2,3-Dihydrorhodamin
DIC	Disseminierte intravaskuläre Gerinnung
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET ₅₀ MPO	Zeitpunkt der halbmaximalen MPO-Freisetzung
ET ₅₀ NETosis	Zeitpunkt des halbmaximalen NETosis-Effekts
EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	Fetales Kälberserum
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
GAG	Glycosaminoglycan
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
HBSS	Hanks´ Balanced Salt Solution
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HOCl	Hypochlorige Säure
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
ICAM-2	interzelluläres Adhäsionsmolekül-2
IQR	Interquartilsabstand
LM-Agarose	Low-Melting-Agarose
LTB ₄	Leukotrien B ₄
M199	Medium 199
MD	Mittleren Differenz
MEM	Minimum essential medium
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NADP(H)	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat

NaOH	Natriumhydroxid
NET	Neutrophil extracellular trap
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OH•	Hydroxylradikal
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PG	Pyoderma Gangränosum
PMN	polymorphnukleäre Zelle
RA	Rheumatoide Arthritis
ROS	Reactive oxygen species
SD	Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
TDL	TrackDisplacementLength
TDX	TrackDisplacement X
TDY	TrackDisplacement Y
TL	TrackLength
TmaxROS	Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion
TSM	TrackSpeedMean
UKR	Universitätsklinikum Regensburg
UZH	Universität Zürich
VCAM-1	Vascular-cell-adhesion-protein

7.3 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Segmentkernige neutrophile Granulozyten neben Erythrozyten und Thrombozyten im Blutausstrich in der Pappenheim-Färbung</i>	11
<i>Abbildung 2: Schematischer Überblick über den Projektplan zur Überprüfung der Forschungshypothese</i>	25
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation mittels Leuko-/Lymphospin-Technik</i>	36
<i>Abbildung 4: Zählfläche der Neubauer-Zählkammer, mittels der die Zellzahl pro mL ermittelt wurde</i>	37
<i>Abbildung 5: Aufbau der μSlide-Chemotaxiskammern®</i>	38
<i>Abbildung 6: Schematischer Überblick über die einzelnen Schritte der Auswertung</i>	41
<i>Abbildung 7: Darstellung der Migrationsauswertung durch Spots (graue Kugeln) und Tracks (blaue Linien) in Imaris®</i>	43

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Beziehung der ROS-Produktion über die Gesamtzeit des Versuches (links) und Auswahl des Maximumbereiches (rechts) mit Darstellung der Berechnung eines Polynom dritten Grades (Trendlinie) zur Bestimmung des $T_{max,ROS}$ durch Ableitung und Nullstellenbestimmung	45
Abbildung 9: Mathematische Formel und graphische Darstellung einer Funktion zur Berechnung der ET_{50} -Werte von NETosis und MPO-Freisetzung durch Phoenix®	46
Abbildung 10: Einteilung und Anpassung der Migrationsauswertung in 30-min-Blöcke, Darstellung der Beziehung	48
Abbildung 11: Makroskopische Überprüfung der Integrität der Matrices (hier am Beispiel eines LM-Agarosegels) mittels Hämatoxylin-Färbelösung	53
Abbildung 12: Übersicht über die Migrationsstrecken der Granulozyten (TrackLength [μ m]), aufgeteilt nach Beobachtungszeiträumen und Gelarten.....	55
Abbildung 13: Einfacher Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TrackLength im Zeitraum "0-30".....	57
Abbildung 14: Einfacher Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TrackLength im Zeitraum "31-60".....	58
Abbildung 15: Einfacher Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände des Parameter TrackLength im Zeitraum "61-90"	59
Abbildung 16: Gruppierter Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TrackDisplacementLength	60
Abbildung 17: Gruppierter Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TrackStraightness	61
Abbildung 18: Gruppierter Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TrackSpeedMean	62
Abbildung 19: Gruppierter Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände der Messgröße TrackDisplacement X.....	63
Abbildung 20: Gruppierter Boxplot zur Veranschaulichung der Mediane und Interquartilsabstände der Messgröße TrackDisplacement Y.....	64
Abbildung 21: Mittelwerte des Parameters $T_{max,ROS}$, getrennt nach den jeweiligen Gelarten.....	67
Abbildung 22: Mittelwerte des Parameters $ET_{50}MPO$ getrennt nach Gelarten	68
Abbildung 23: Mittelwerte des Parameters $ET_{50}NETosis$ getrennt nach Gelarten	69

7.4 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Bestandteile der Referenzmatrix aus Kollagen I</i>	27
<i>Tabelle 2: Bestandteile von Kollagen-II-Matrizes aus Rinderkollagen (erste Vorversuchsreihe)</i>	27
<i>Tabelle 3: Bestandteile von Kollagen-II-Matrizes aus Rinderkollagen mit Alternativpuffer (zweite Vorversuchsreihe)</i>	28
<i>Tabelle 4: Bestandteile von Kollagen-II-Matrizes aus Huhnkollagen (dritte Vorversuchsreihe)</i>	28
<i>Tabelle 5: Bestandteile von Kollagen-II-Matrizes aus Huhnkollagen mit verlängerter Aushärtungszeit (vierte Vorversuchsreihe)</i>	29
<i>Tabelle 6: Bestandteile von Kollagen-III-Matrizes der ersten Vorversuchsreihe</i>	30
<i>Tabelle 7: Bestandteile von Kollagen-III-Gelen der zweiten Vorversuchsreihe</i>	30
<i>Tabelle 8: Bestandteile von Kollagen-III-Gelen der dritten Vorversuchsreihe</i>	31
<i>Tabelle 9: Bestandteile von Kollagen-III-Gelen der vierten Vorversuchsreihe</i>	31
<i>Tabelle 10: Bestandteile der hergestellten Agarosematrizes</i>	32
<i>Tabelle 11: Bestandteile der hergestellten Gele aus Low-Melting-Agarose</i>	33
<i>Tabelle 12: Bestandteile der hergestellten Fibringele zur PMN-Funktionalitätsprüfung</i>	35
<i>Tabelle 13: Übersicht über Detektionseigenschaften der verschiedenen Immuneffekte</i>	40
<i>Tabelle 14: Zur Quantifizierung der Migration erfasste Parameter</i>	43
<i>Tabelle 15: Bestandteile der für die PMN-Funktionalitätsprüfung verwendeten extrazellulären Gelmatrizes</i>	54
<i>Tabelle 16: Tabellarische Übersicht der Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TrackLength</i>	56
<i>Tabelle 17: Übersicht über die Ergebnisse der Post-Hoc-Testung des Parameters TrackLength im Abschnitt "0-30"</i>	57
<i>Tabelle 18: Übersicht über die Ergebnisse der Post-Hoc-Testung des Parameters TrackLength im Abschnitt "31-60"</i>	58
<i>Tabelle 19: Übersicht über die Ergebnisse der Post-Hoc-Testung des Parameters TrackLength im Abschnitt "61-90"</i>	59
<i>Tabelle 20: Übersicht über die Mediane und Interquartilsabstände des Parameters TDL</i>	60
<i>Tabelle 21: Übersicht über die Mediane und Interquartilsabstände der Messgröße TrackDisplacement X</i>	64
<i>Tabelle 22: Übersicht über die Mediane und Interquartilabstände der Messgröße TrackDisplacement Y</i>	65
<i>Tabelle 23: Übersicht über die absoluten Ergebnismittelwerte der Immuneffekte der jeweiligen Gelarten</i>	66
<i>Tabelle 24: Vergleichende Übersicht der Standardabweichungen der Mittelwerte der ROS-Maxima im Referenzgel Kollagen I</i>	70

7.5 Ärztlicher Aufklärungsbogen, Einwilligungserklärung zur Studienteilnahme und Datenschutzerklärung

Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung für freiwillige Studienteilnehmer (Probanden)

AN_FO_30.05.2018_GrM



Probandenaufklärung und Einwilligungserklärung

Titel der Studie

498

FUNKTIONALITÄTSPRÜFUNG VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN IN DREIDIMENSIONALEN MATRIZES

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband,

möglicherweise möchten Sie an unserer Studie mit dem oben genannten Titel teilnehmen. Hiermit möchten wir Sie über den Zweck der Studie und die möglicherweise für Sie entstehenden Risiken aufklären.

Im Rahmen der Studie untersuchen wir das Verhalten von Granulozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Gelmatrizes. Hierbei werden neben der Migrationsfähigkeit weitere Eigenschaften der Granulozyten, im Speziellen NETosis, ROS-Produktion und Produktion des Enzyms Myeloperoxidase, betrachtet.

Um die Messungen vornehmen zu können, entnehmen wir bei Ihnen Blut aus einer Vene im Bereich der Ellenbeuge. Hierzu wird nach Desinfektion der Haut und Anlage einer Manschette am Oberarm eine Vene punktiert und maximal 10 ml Blut werden entnommen.

Risiken, die bei der Blutentnahme auftreten können (SOP Blutentnahme) und Maßnahmen, um das Auftreten von Komplikationen zu verhindern:

- Bei möglicherweise auftretenden Kreislaufproblemen wird die Blutentnahme sofort abgebrochen, der Probanden sollte sich hinlegen und die Beine hochlagern.
- Hämatome die manchmal nach der Blutentnahme auftreten, werden reduziert, wenn der Proband konsequent auf die Punktionsstelle drückt (5 Minuten!). Durch Beugen des Ellenbogengelenks hingegen werden Hämatome gefördert.
- Eine Infektion der Einstichstelle ist möglich, wird aber durch adäquate Desinfektion verhindert.
- Die Möglichkeit einer Venenentzündung (Phlebitis) ist nicht auszuschließen.

Ich bin ausführlich über Wesen, Bedeutung und Risiken und Tragweite der Studienteilnahme aufgeklärt worden.

Ich hatte die Gelegenheit über die Durchführung der Studie zu sprechen.

Alle meine Fragen wurden verständlich und umfänglich beantwortet.

Hiermit bestätige ich, über den Inhalt der Studie und über mögliche Risiken für mich aufgeklärt worden zu sein.

Vor- und Nachname: _____

Regensburg, den _____

Unterschrift der/des Probandin/Probanden

Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung für freiwillige Studienteilnehmer (Probanden)

AN_FO_30.05.2018_GrM



Erklärung zum Datenschutz:

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie personenbezogene Daten und Angaben auf elektronischen Datenträgern aufgezeichnet, gespeichert und verarbeitet werden. **Ich bin damit einverstanden, dass die Studienergebnisse in nicht entschlüsselbarer (anonymer) Form, die keinen Rückschluss auf meine Person zulassen, veröffentlicht werden.** Ferner erkläre ich mich einverstanden, dass an der Studie beteiligte Personen in die mit meinen Personalien versehenen Akten Einsicht nehmen dürfen.

- Probandenaufklärung und Einverständniserklärung werden auf das jeweilige Projekt eingescannt.
- Zugriff auf die jeweiligen Projekte haben nur die an der Studie beteiligten, vom Projektleiter autorisierte Personen und der Direktor der Klinik für Anästhesie (Prof. Dr. B. Graf) und der EDV Beauftragte der Klinik für Anästhesie (PD Dr. M. Kieninger).
- Daten der Probanden werden auf dem gesicherten Netzlaufwerk der Forschung der Klinik für Anästhesie gespeichert. Daher gelten die Datenschutz- und Verschwiegenheitspflichten des UKR und des öffentlichen Dienstes.
- Nach Abschluss des Projekts werden die Daten auf einer Festplatte/DVD für 10 Jahre in einem zugangsbeschränkten Raum aufbewahrt.

Einverständniserklärung:

Ich habe das Recht, jederzeit mündlich oder schriftlich, ohne Angabe von Gründen, meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zurückzuziehen **und einer Weiterverarbeitung meiner Daten und Proben zu widersprechen und ihre Löschung bzw. Vernichtung zu verlangen.**

Ich habe darüber hinaus den Text der Probandenaufklärung, die Einwilligungserklärung und die hier abgedruckte Datenschutzerklärung gelesen, verstanden und jeweils eine Kopie erhalten.

Hiermit willige ich ein als Proband/Probandin an der Studie teilzunehmen.

Vor- und Nachname: _____

Geburtsdatum: _____

Anschrift: _____

Regensburg, den _____

Unterschrift der/des Probandin/Probanden

Regensburg, den _____

Unterschrift der/des aufklärenden Ärztin/Arztes

8 Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2018 bis Juni 2021 am Lehrstuhl für Anästhesiologie am Klinikum der Universität Regensburg.

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Kieninger für die vertrauensvolle Überlassung des Themas, die großartige Unterstützung bei dessen Bearbeitung und sein immerwährendes Interesse am Fortgang der Arbeit danken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an Herrn Dr. rer. nat. Michael Gruber aussprechen, der durch seine freundschaftliche und immer hilfsbereite Betreuung maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein weiterer Dank gilt Frau Sigrid Bamberger, Frau Gabriele Bollwein, Frau Marion Schindler, Frau Ruth Späth und Herrn Simon Tümmeler für ihre Unterstützung bei technischen Arbeiten im Labor.

Frau Regina Lindner möchte ich für ihre Ideen zur Lösung und Optimierung der Gelherstellungsverfahren, für ihre Korrekturen und für ihre weitere Unterstützung bei der Auswertung zur Publikation danken.

Darüber hinaus möchte ich danken:

Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Graf für die Möglichkeit, die Dissertation am Lehrstuhl für Anästhesiologie zu erstellen.

Frau Petra Turowski und dem Team des Forschungslabors für pädiatrische Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Regensburg für die Anfertigung und Bereitstellung von Bildmaterial der Pappenheimfärbung.

Allen freiwilligen Blutspendern, im Besonderen Herrn Korbinian Groß und Herrn Simon Löffelmann, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.

Weiterhin möchte ich danken:

Frau Delou Pai für ihre Hilfe bei der Überwindung der Startschwierigkeiten und für ihre Lösungsvorschläge bei auftauchenden Hindernissen.

Herrn Sandro Christoph und Herrn Florian Zeman für ihre statistischen Beratungen und Hilfestellungen.

Für die kollegiale Zusammenarbeit möchte ich mich bei all meinen Mitdoktoranden bedanken, insbesondere bei:

Frau Nina Dobliger, Frau Gesche Kolle, Frau Mareike-Viola Laumbacher, Herrn Daniel Panter

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Hans-Jürgen Hackl bedanken, der mein Interesse zur Medizin weckte und mich auf meinem Weg zum Arztberuf jederzeit unterstützte.

Ferner möchte ich mich bei Frau Gerti Erhard für ihre sprachlichen Korrekturen und für ihre wertvollen Ratschläge bedanken.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Familie, allen voran meiner Schwester und meinen Eltern, für ihre Unterstützung und für ihren großen Rückhalt danken. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

9 Lebenslauf

10 Erklärung zum Promotionsverfahren

Nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Richard Felix Kraus, geboren am 29. Oktober 1995 in Kötzing

Ich erkläre,

- dass ich den Doktorgrad der Medizin nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe.
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des medizinischen Doktorgrades zugelassen bin.
- dass ich die medizinische Doktorprüfung nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe.

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen.
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Furth im Wald, 04. Juli 2021

Richard Felix Kraus