AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ANÄSTHESIOLOGIE
PROF. DR. BERNHARD GRAF
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Live-cell-imaging – Ein multiparametrisches Werkzeug zur Analyse zellulärer Entzündungsreaktionen nach Priming mit TNFα, Nimodipin und Dexamethason

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Korbinian Groß

2021

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ANÄSTHESIOLOGIE
PROF. DR. BERNHARD GRAF
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Live-cell-imaging – Ein multiparametrisches Werkzeug zur Analyse zellulärer Entzündungsreaktionen nach Priming mit TNFα, Nimodipin und Dexamethason

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Korbinian Groß

2021

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Martin Kieninger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Proescholdt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2022

Allen meinen Lieben
sowie den schönen Künsten
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen ..... - 8 -

1. Einleitung ..... - 9 -

1.1. *Live-cell-imaging* als probates Werkzeug zur Erforschung von zellulären Vorgängen .. - 9 -

1.2. Neutrophile Granulozyten ..... - 10 -

1.2.1. Migration in betroffenes Gewebe ..... - 11 -

1.2.2. Intrazelluläre Bekämpfung von Bakterien: Phagozytose und Oxidativer Burst ..... - 12 -

1.2.3. Extrazelluläre Bekämpfung von Bakterien: NETosis ..... - 13 -

1.3. TNFα als Einflussfaktor auf das angeborene Immunsystem ..... - 14 -

1.3.1. Wirkungsweisen von TNFα ..... - 14 -

1.3.2. TNFα im Zusammenspiel mit Neutrophilen Granulozyten ..... - 14 -

1.4. Subarachnoidalblutungen (SAB) und Nimodipin ..... - 15 -

1.4.1. Definition, Einteilung und Epidemiologie der SAB ..... - 15 -

1.4.2. Ätiologie und Symptomatik der nicht-traumatischen SAB ..... - 16 -

1.4.3. Refraktäre zerebrale Vasospasmen als mögliche Komplikation der SAB und die Rolle der NETs..... - 17 -

1.4.4. CIAN-Therapie zur Vasospasmustherapie ..... - 17 -

1.5. Covid-19 und Dexamethason ..... - 18 -

1.4.1 Das Krankheitsbild Covid-19 ..... - 18 -

1.4.2 Letalität ..... - 18 -

1.4.3 Dexamethason zur Behandlung schwerer Fälle und Senkung der Letalitätsrate ... - 19 -

1.6. Zielsetzung und Untersuchungsgegenstand ..... - 20 -

1.7. Studiendesign ..... - 21 -

2. Material und Methoden ..... - 25 -

2.1. Votum der Ethikkommission ..... - 25 -

2.2. Allgemeine Geräte und Materialien ..... - 25 -

2.3. Materialien zur Granulozyten-Isolierung ..... - 26 -

2.4. Materialien zur Mikroskopie ..... - 27 -

2.5. Methodik der Versuche am Leica-Mikroskop ..... - 28 -

2.5.1. Versuchsvorbereitung: Gelherstellung und Verdünnung von Nimodipin, Dexamethason sowie TNFα ..... - 28 -

2.5.2. Vorbereiten der Mikroskopie ..... - 32 -

2.5.3. Mikroskopieren und Systematik der Auswertung ..... - 34 -
2.5.4. Bearbeitung und Aufbereitung der Daten mit der Imaris Software ..... - 35 -
2.5.5. Datenkonvertierung und Statistische Auswertung der ROS-Produktion ..... - 37 -
2.5.6. Datenkonvertierung und statistische Auswertung der NETosis und der MPO-Freisetzung ..... - 38 -
2.5.7. Datenkonvertierung und statistische Auswertung der Migration ..... - 39 -
2.5.8. Statistik ..... - 41 -

3. Ergebnisse ..... - 42 -

3.1. Ergebnisse: FKS1,7% versus FKS10% versus Humanplasma1,7% ..... - 42 -

3.1.1 ROS-Produktion und NETosis ..... - 42 -
3.1.2 Migration ..... - 45 -

3.2. Ergebnisse: Granulozyten in Humanplasma nach Priming mit TNFα ..... - 48 -

3.2.1 ROS-Produktion und NETosis ..... - 48 -
3.2.2 Migration ..... - 48 -

3.3. Ergebnisse: Granulozyten unter Zugabe von Nimodipin und Methanol ..... - 50 -

3.3.1 ROS-Produktion und NETosis ..... - 51 -
3.3.2 Migration ..... - 52 -

3.4. Ergebnisse: Granulozyten unter Zugabe von Dexamethason und DMSO ..... - 55 -

3.4.1 ROS-Produktion und NETosis ..... - 55 -
3.4.2 Migration ..... - 56 -

4. Diskussion ..... - 59 -

4.1. FKS in verschiedenen Konzentrationen versus Humanplasma ..... - 59 -
4.2. Priming mit TNFα ..... - 62 -
4.3. Nimodipin und Methanol ..... - 62 -
4.4. Dexamethason und DMSO ..... - 64 -

5. Zusammenfassung ..... - 66 -

6. Anhang ..... - 67 -

6.1. Abbildungsverzeichnis ..... - 67 -
6.2. Tabellenverzeichnis ..... - 69 -
6.3. Formelverzeichnis ..... - 69 -
6.4. Literatur ..... - 70 -

7. Probandenaufklärung und Einwilligungserklärung, Datenschutzerklärung und Probandenfragebogen ..... - 76 -

8. Danksagung ..... - 3 -

9. Lebenslauf..... - 4 -

10. Erklärung zum Promotionsverfahren..... - 5 -

Verzeichnis der Abkürzungen

AUC	area under the curve
CIAN	kontinuierliche intra-arterielle Nimodipin-Therapie
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DHR	Dihydrorhodamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FKS	fetales Kälberserum
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsions Molekül 1
IL-1β	Interleukin 1 beta
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MPO	Myeloperoxidase
N	Stichprobenumfang
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NET	neutrophiles extrazelluläres Netz
PMN	Polymorphnukleärer neutrophiler Granulozyt
PBS	Phosphate buffered saline
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium
SAB	Subarachnoidalblutung
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SOD	Superoxiddismutase
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR1/2	Tumornekrosefaktorrezeptor 1/2
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül

1. Einleitung

1.1. *Live-cell-imaging* als probates Werkzeug zur Erforschung von zellulären Vorgängen

Die Methodik des *live-cell-imaging* stellt in der wissenschaftlichen Praxis eine überaus probate Methode zur Untersuchung von Zellen auf ihre Eigenschaften und deren Veränderbarkeit dar. Zellfunktionen wie die Sezernierung von Enzymen oder anderer chemisch detektierbarer Verbindungen sowie mechanische Funktionen, beispielsweise die Fähigkeit zur Migration, können mittels *live-cell-imaging* aufgezeichnet werden.

Die einfache Anpassung von Parametern des Setups zur Erforschung von Zellen ermöglicht einen detaillierten Einblick in zelluläre Vorgänge analog zu denen im menschlichen Organismus. Diese lassen sich mithilfe dieser *in-vitro*-Methodik über einen langen Zeitraum unter stabilen Bedingungen beobachten.

Zur Untersuchung von Neutrophilen Granulozyten (PMN) ist die Anwendung dieser Methode ein gängiges Verfahren. Dabei gilt es, dieses Verfahren schrittweise zu optimieren. Zur Anregung der Chemotaxis der Granulozyten hat sich der Lockstoff fMLP bewährt [1,2].

Um die sezernierten Enzyme und Verbindungen von PMNs für das Mikroskop sichtbar zu machen, eignen sich beispielsweise auch Antikörper [3].

Um die Vergleichbarkeit dieser Methodik mit den Vorgängen im menschlichen Körper weiter zu erhöhen, können und müssen noch einige Anpassungen getätigt werden. Die Darstellbarkeit zellulärer Vorgänge steht immer in Konkurrenz zum Wohlergehen der Zellen. Ein wichtiger Faktor in diesem Zusammenhang ist das zur Aufnahme der Zellen verwendete Medium, welches einerseits die Umweltbedingungen determiniert und andererseits eine Ernährungs- und Lebenserhaltungsfunktion für die Zellen innehat [4].

Nach Köckritz-Blickwede et al. sollte besonderes Augenmerk auf eben diese Mediumparameter gelegt werden. So steht zur Diskussion, ob statt des verwendeten fetalen Kälberserums (FKS) zur Aufnahme und Ernährung der Granulozyten während des Beobachtungszeitraums – wie von Neubert et al. vorgeschlagen - humanes Blutplasma eine besser geeignete Alternative darstellt [5,6].

1.2. Neutrophile Granulozyten

Das menschliche Immunsystem hat die Aufgabe den Körper vor Pathogenen wie Viren, Bakterien, Pilzen etc. zu schützen. Es gliedert sich in die folgenden, in der Abbildung 1 dargestellten, Bestandteile.

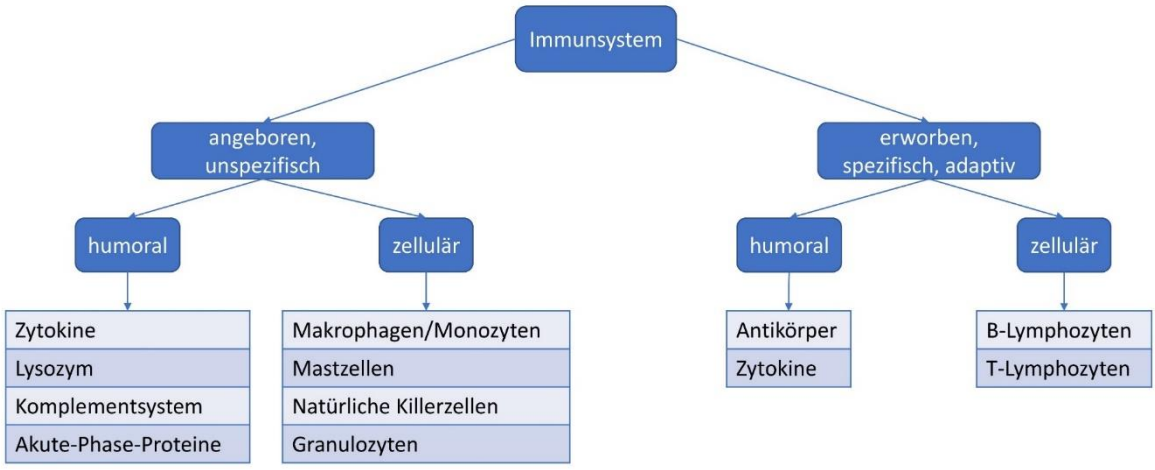

Abbildung 1: Bestandteile der menschlichen Immunabwehr

Die Neutrophilen Granulozyten, auch polymorphnukleäre Leukozyten (PMNs) genannt, stehen der Immunabwehr zur Verfügung, wenn Krankheitserreger die äußeren Abwehrbarrieren des Körpers wie beispielweise die intakte Haut oder schleimbesetzte Epithelien bereits überwunden haben [7].

Von den 4.000 bis 10.000 Leukozyten pro Mikroliter Blut beträgt der Anteil der PMN etwa 50 bis 70 Prozent. Sie werden im Knochenmark in einem circa 8 Tage dauernden Prozess aus der Vorstufe des sogenannten Myeloblasten über mehrere Zwischenstufen gebildet. Die Menge an produzierten Zellen kann bis zu $2x10^{11}$ pro Tag betragen [8]. Wie seit bereits über 60 Jahren bekannt finden sich PMN im menschlichen Körper sowohl in der Blutzirkulation als auch im Gewebe als Reserveeinheiten, die auf Abruf aktiviert und ins zurück Blut rekrutiert werden können [9]. Beide Anteile halten sich prozentual die Waage. Für die Zellen, die bei Bedarf rekrutiert werden können, hat sich der Begriff *marginated pool* bzw. *marginated reservoir* etabliert [8]. Die durchschnittliche Lebensdauer von Neutrophilen Granulozyten beträgt laut Pillay et al. 5,4 Tage [10].

1.2.1. Migration in betroffenes Gewebe

Als die bereits vielfach so bezeichnete „schnelle Eingreiftruppe“ des Immunsystems können PMN, die zuvor durch verschiedene Faktoren wie beispielsweise die Zytokine Tumornekrosefaktor alpha (TNFα) und Interleukin 1 beta (IL-1β) aus Makrophagen oder schlicht durch Bakterienbestandteile aktiviert wurden, innerhalb von Minuten an gezielter Stelle die Blutbahn verlassen. An den postkapillären Venolen, den bevorzugten Austrittsorten der PMN, kommt es erst zum zytokinvermittelten „rolling“, welches durch endotheliale Zelladhäsionsmoleküle, die Selektine, und passende Selektinliganden auf der Leukozytenoberfläche ermöglicht wird. Es kommt zu losen Haftkontakten, welche durch die Strömungskräfte der Blutzirkulation abgeschert und daraufhin wieder neu ausgebildet werden.

In Folge bilden sich weitere Adhäsionsmoleküle auf dem Endothel, wiederum vermittelt durch Zytokine. Unter anderem wird das Molekül ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) ausgebildet. Zudem bilden sich auf dem Granulozyten chemokinvermittelt die sogenannten Integrine, welche ans Endothel binden können. Die PMN flachen sich durch Umbau des Zellskeletts ab (Abbildung 2).

Die Transmigration durch das Endothel, auch als Leukodiapedese bezeichnet, erfolgt entweder transzellulär durch den Zellkörper der Endothelzelle oder parazellulär zwischen den Kontaktpunkten der Endothelzellen.

Mittels enzymatisch getriggerter Auflösung der Basallamina ist es den Granulozyten unter Zuhilfenahme der Pseudopodien, den Leitfortsätzen der wandernden Zellen, möglich, zum jeweiligen Infektionsherd, angelockt durch Chemokine, zu migrieren und dort die Schädigung des Gewebes mit einer Entzündungsreaktion zu bekämpfen.

Innerhalb von Stunden sammeln sich große Zahlen der Zellen an diesen Stellen und rekrutieren des Weiteren Monozyten und Makrophagen [8].

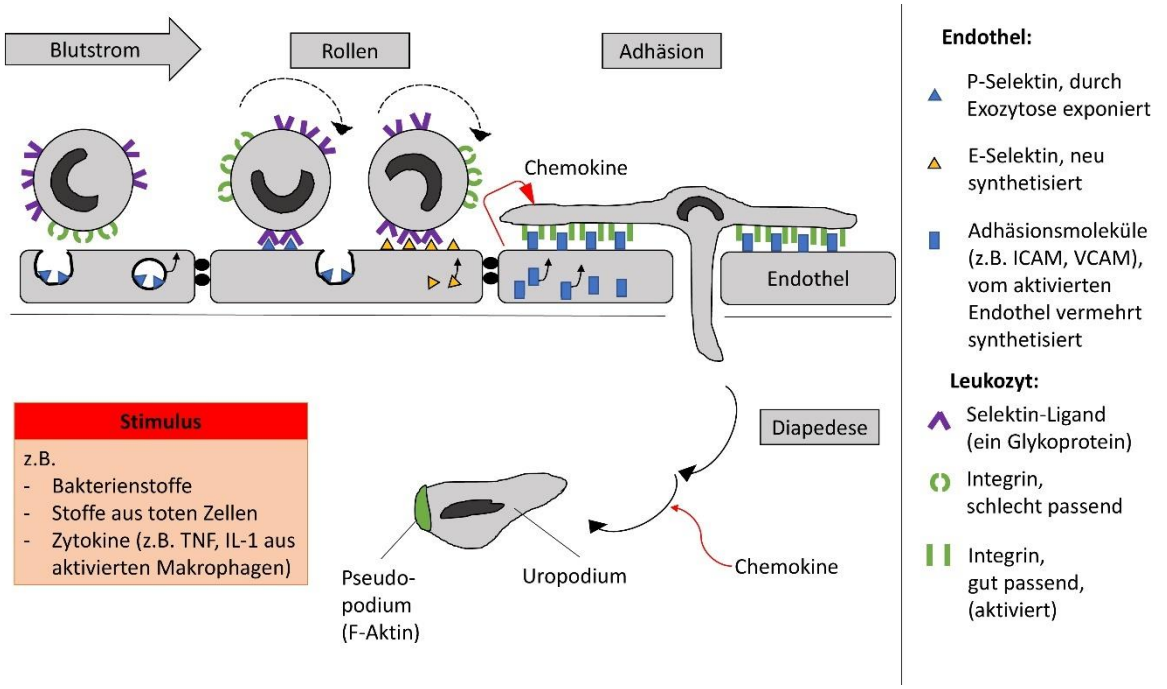

Abbildung 2: Emigration der Leukozyten; eigene Darstellung nach Lüllmann-Rauch R. et al., Taschenlehrbuch Histologie, 5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 2015

1.2.2. Intrazelluläre Bekämpfung von Bakterien: Phagozytose und Oxidativer Burst

Sind die PMNs am Ort des Infektherdes angekommen, so steht ihnen als „Eingreiftruppe“ ein breit gefächertes „Waffenarsenal“ zur Verfügung. Zunächst haben sie die Möglichkeit Bakterien und andere Mikroorganismen intrazellulär zu bekämpfen. Es geschieht dies durch die Aufnahme der unerwünschten Erreger in phagozytotische Vakuolen, die Phagosomen. Damit einher geht die Aktivierung der NADPH-Oxidase, ein Enzymkomplex auf der Membran der Phagosomen. Dieser wandelt molekularen Sauerstoff in reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie das Superoxidanion (O_2^-) um. In der Folge kann durch die Aktivität des Enzyms Superoxiddismutase (SOD) Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen. Diese reaktiven Sauerstoffspezies werden in das Phagosom abgegeben. Zeitgleich wird das Enzym Myeloperoxidase gebildet, welches die Reaktion von Cl^- und H_2O_2 zu hypochloriger Säure katalysiert. Diese ist stark mikrobizid und stellt die stärkste oxidative „Waffe“ des Neutrophilen Granulozyten dar [11,12] Ein Zusammenspiel des intrazellulären und extrazellulären Weges zur Bekämpfung von Bakterien und anderen Mikroorganismen steht zur Diskussion [13].

1.2.3. Extrazelluläre Bekämpfung von Bakterien: NETosis

Es besteht für PMNs des Weiteren die Option, Bakterien mit extrazellulären Netzen, den Neutrophil Extracellular Traps (NETs), einzufangen und abzutöten. Diese bestehen aus Fäden entfalteter DNA und sind mit Histonen, Enzymen wie Myeloperoxidase und Elastase und verschiedenen antimikrobiellen Proteinen aus den Granulae der Neutrophilen besetzt [14]. Das im Zuge der NET-Bildung von Statten gehende Absterben der jeweiligen Zelle ist derzeit Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Mögliche „Schlachtfelder“ der „schnellen Eingreiftruppe“ der Granulozyten für die NETosis sind das Interstitium sowie die Widerstandsgefäße des Blutkreislaufes, die dadurch in ihrer Mikrozirkulation behindert werden können [15]. Manche Bakterien beherrschen die Strategie, DNase zu bilden und auf diese Art und Weise den NETs zu entkommen [13], 7].

NETs spielen eine Rolle in der Pathophysiologie einer stetig steigenden Anzahl von Krankheiten. Von Diabetes über Autoimmunerkrankungen bis hin zu Krebserkrankungen reicht dabei die Spannweite. Neue therapeutische Methoden, die auf den Prozess der NET-Bildung abzielen, gewinnen dadurch an Bedeutung [16].

Sowohl schädliche als auch einen positiven Effekt bewirkende Folgen der NETosis sind Gegenstand der Diskussion und haben eine hohe Bedeutsamkeit bei der Suche nach therapeutischen Ansätzen in Bezug auf die Bildung von NETs [16].

1.3. TNFα als Einflussfaktor auf das angeborene Immunsystem

Die folgenden Unterkapitel verdeutlichen die Rolle von TNFα im Zusammenhang mit der menschlichen Immunabwehr.

1.3.1. Wirkungsweisen von TNFα

Der Tumornekrosefaktor alpha ist ein entscheidender Faktor bei der angeborenen Immunreaktion des menschlichen Organismus gegen Viren und bakterielle Pathogene. Das Zytokin ist ein proinflammatorisch wirkendes Element der Signalkaskade beim Zustandekommen einer Entzündungsreaktion. TNFα reguliert das Ausmaß und die Dauer eines Entzündungsgeschehens und verhindert somit das Auftreten von autoimmunen Erkrankungen und die Entwicklung von Tumoren [17].
Gebildet wird TNFα von Makrophagen und Monozyten bei akuten Entzündungsvorgängen im Organismus [18].
Der Signalweg führt dabei über die zwei Rezeptoren TNFR1 und TNFR2, welche beide auf der Oberfläche von Neutrophilen Granulozyten exprimiert werden können [19,20].

1.3.2. TNFα im Zusammenspiel mit Neutrophilen Granulozyten

Eine Wechselwirkung zwischen TNFα und Neutrophilen Granulozyten im Zuge der Immunantwort bei einem viralen Infekt stellt nach Rivadeneyra et al. die durch TNFα getriggerte Freisetzung des Enzyms Myeloperoxidase durch die Granulozyten und die Bildung von NETs dar [21].
Des Weiteren wird laut Hyun et al. die Rekrutierung von Neutrophilen mittels Migration hin zum Entzündungsherd durch TNFα beeinflusst [22].

1.4. Subarachnoidalblutungen (SAB) und Nimodipin

Die folgenden Unterkapitel geben einen Einblick in die Thematik der SAB und deren Therapie mit Nimodipin.

1.4.1. Definition, Einteilung und Epidemiologie der SAB

Eine SAB, eine Einblutung in den Subarachnoidalraum, dem liquorgefüllten Raum zwischen Pia Mater und Arachnoidea, kann traumatischer Natur sein als Folge eines Schädel-Hirn-Traumas (SHT), jedoch auch nicht-traumatischer Natur, wenn es, wie in Abbildung 3 dargestellt, zu spontan auftretenden Rupturen der Hirnbasisgefäße nach Aneurysmen kommt [23].

Bei den nicht-traumatischen Blutungen, welche weltweit etwa 5 Prozent aller Schlaganfälle ausmachen, lassen sich die selteneren (15%) SAB ohne Aneurysmanachweis von den weitaus häufiger auftretenden (85%) aneurysmatischen SAB unterscheiden. Die Inzidenz liegt in der westlichen Welt bei 6 bis 9 auf 100.000 Personen, vorwiegend betroffen sind dabei Patienten mittleren Alters, im Mittel um die 50-55 Jahre [24, 25, 26]. Die Letalitätsrate liegt bei 25 bis 35 Prozent [24].

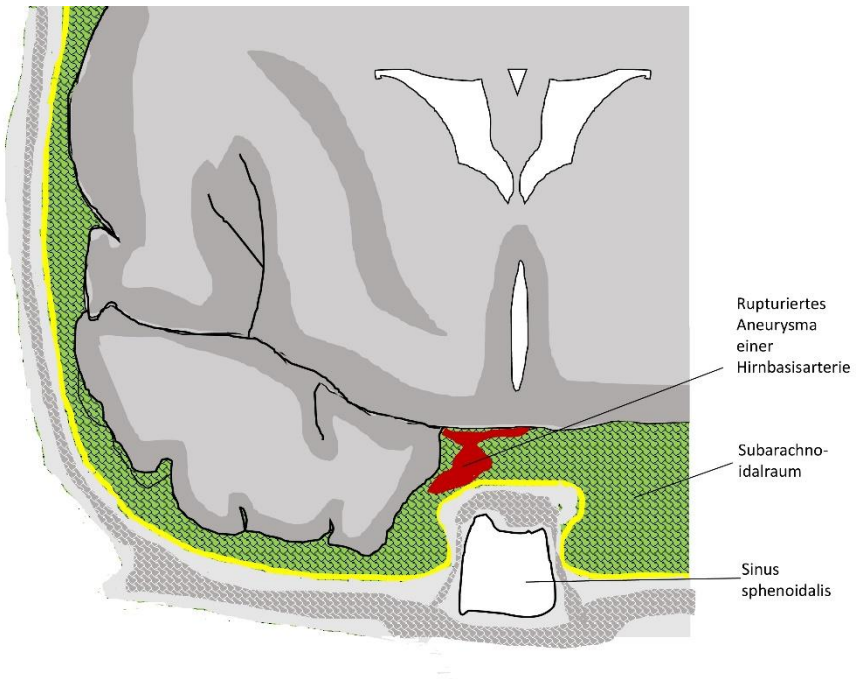

Abbildung 3: schematische Darstellung der Lokalisation einer Subarachnoidalblutung (SAB), eigene Darstellung nach Aumüller G., Duale Reihe Anatomie, 4. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 2017

1.4.2. Ätiologie und Symptomatik der nicht-traumatischen SAB

Der Circulus arteriosus cerebri (Willisii) sowie die daraus hervorgehenden gehirnversorgenden Arterien befinden sich im sogenannten Subarachnoidalraum. Jene Blutgefäße erweisen sich als besonders kritische Stellen für Aneurysmen, also dünnwandige Aussackungen der Gefäßwände, bedingt durch eine unzureichend ausgebildete Tunica Media (Abbildung 4). Es besteht die Möglichkeit von spontan auftretenden Rupturen der Aneurysmen, gleichbedeutend mit einem Blutausstrom in den Liquorraum und damit einem Anstieg des intrakraniellen Drucks, den bereits benannten Subarachnoidalblutungen. Symptomatisch für diesen blutungsbedingten Druckanstieg sind extreme „Vernichtungskopfschmerzen“, bedingt durch Reizungen der Hirnhäute, sowie Vigilanzminderung und Meningismus.

Prädisponiert für eine SAB sind Patienten mit arterieller Hypertension. Weiterhin können Rauchen und Alkoholmissbrauch als Risikofaktoren angesehen werden [25].

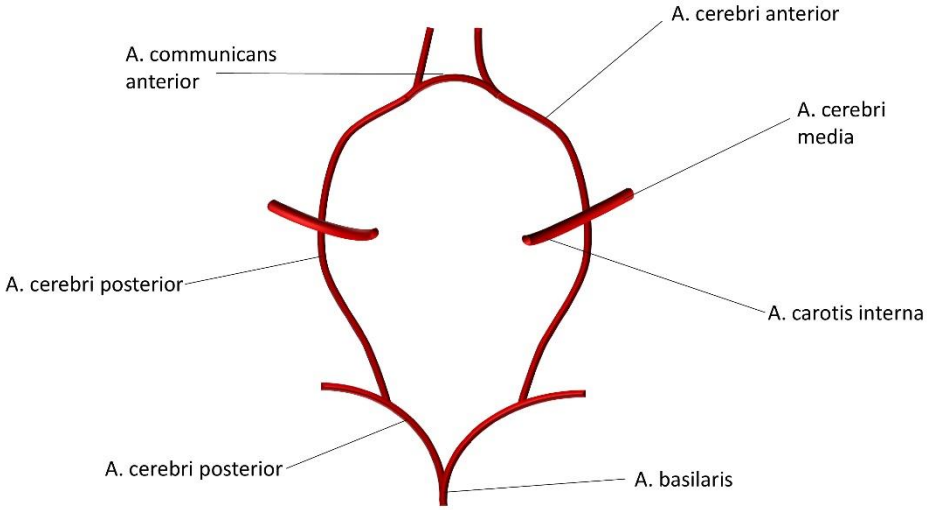

Abbildung 4: Circulus arteriosus cerebri („Willisii“), eigene Darstellung nach Aumüller G., Duale Reihe Anatomie, 4. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 2017

1.4.3. Refraktäre zerebrale Vasospasmen als mögliche Komplikation der SAB und die Rolle der NETs

Neben Rezidivblutungen (4-13,6%) und Hydrozephalus (15-87%) zählen refraktäre zerebrale Vasospasmen und daraus resultierende sekundäre Ischämien mit einer Auftrittshäufigkeit von 20 bis 40 Prozent zu den wichtigsten Komplikationen der SAB, die auch einen nicht unerheblichen Beitrag zur hohen Letalität des Krankheitsbildes leisten [26,27].

Eine Verengung der angiographisch darstellbaren Hirnbasisgefäße geschieht vornehmlich 7 bis 10 Tage nach Ruptur des Aneurysmas und bildet sich spontan zurück nach in etwa 21 Tagen. Die Pathogenese der Vasospasmen ist derzeit Gegenstand der Forschung und noch nicht genau verstanden. Des Weiteren imponieren die Gefäßverengungen durch unterschiedliche Schweregrade der durch sie verursachten Ischämie, welche nicht immer in einen symptomatischen Verlauf münden müssen [28].

1.4.4. CIAN-Therapie zur Vasospasmustherapie

Die CIAN-Therapie (Continuous Intra-arterial Nimodipine Infusion) zur Vermeidung von sekundären Ischämien nutzt den Calciumantagonisten Nimodipin, der die Frequenz des Auftretens der Gefäßverengungen reduzieren soll [29]. Es wird vermutet, dass dies durch ein Entgegenwirken gegen den Calciumeinstrom in die Muskelzelle der Tunica Media der betroffenen Arterie geschieht. Jedoch ist der genaue Wirkmechanismus der einen calciumantagostischen Effekt ausübenden Medikamente noch nicht vollständig geklärt. Es steht zur Diskussion, ob die Perfusion des Gewebes und damit der Schutz vor weiterer Infarktgefahr auch durch eine Wechselwirkung von Nimodipin mit Leukozyten, insbesondere mit Neutrophilen Granulozyten, aufrechterhalten wird [30].

Dabei stellt sich auch die Frage, welche Dosierung des arteriell verabreichten Nimodipins sich für die Patientengabe eignet, um etwaige Blutdruckabfälle während der standardmäßigen 21-tägigen Gabedauer zu verhindern [31].

1.5. Covid-19 und Dexamethason

Die folgenden Unterkapitel geben einen kurzen Abriss über das derzeit die Medien bestimmende Thema Covid-19 und die Therapie dieser Erkrankung durch das Glucocorticoid Dexamethason.

1.4.1 Das Krankheitsbild Covid-19

Ende des Jahres 2019 verbreitete sich ein neues Virus aus der Familie der Coronaviridae, das *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2; Abbildung 5), von China aus über den gesamten Planeten. Die Symptomatik dieser durch das Virus verursachten Erkrankung „Covid-19“ zeigt eine große Bandbreite von kaum vorhandenen oder nur milde ausgeprägten Infektionen bis hin zu schweren Krankheitsverläufen oder gar zum Tod [32].

Laut Zuo et al. können die von Neutrophilen Granulozyten gebildeten NETs als Marker für die Schwere von Krankheitsverläufen von Covid-19 gesehen werden [33].

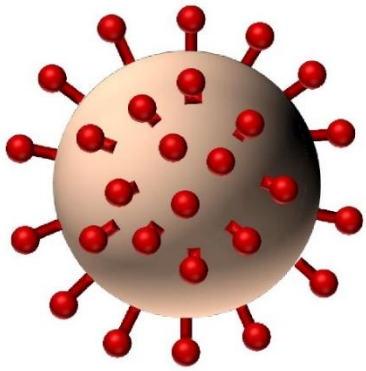

Abbildung 5: Eine Illustration des Coronavirus (SARS-CoV-2)

Charakteristische milde Symptome der Covid-19-Infektion sind nach Li et al. Schnupfen, Husten und Abgeschlagenheit sowie Kopfschmerz, Übelkeit und Erbrechen [34]. Größere Gefahr besteht bei schweren Verläufen im akuten Lungenversagen. Bei den intensivpflichtigen Patienten besteht aufgrund der Analgosedierung die Notwendigkeit einer künstlichen Beatmung [35]. Weiterer Befall von Organen und Langzeitschäden nach überstandener Akutinfektion sind derzeit noch Gegenstand der Forschung [36].

1.4.2 Letalität

Todesfälle nach einer Covid-19-Infektion sind laut Liu et al. größtenteils bei Patienten mit bestehenden Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus, kardiovaskulären

Erkrankungen und chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen sowie Hypertonie nachgewiesen. Es besteht auch ein Zusammenhang zwischen Lebensalter und dem Letalitätsrisiko von Patienten [37]. Während nach Perez-Saez et al. die Letalitätsrate in der Gesamtbevölkerung bei 0,64% liegt, beträgt in der als Risikogruppe bezeichneten Menge der über 65-jährigen Patienten die Letalitätsrate bei 5,6% [38].

1.4.3 Dexamethason zur Behandlung schwerer Fälle und Senkung der Letalitätsrate

Im März 2020 sorgte eine britische Studie weltweit für Aufsehen. Laut Ledford et al. soll das Glucocorticoid Dexamethason die Todesrate von Covid-19-Infektionen um bis zu einem Drittel senken [39].

In dieser Studie wurde Patienten mit nachgewiesener Coronavirus-Infektion 10 Tage lang eine Dexamethason-Dosis von 6mg pro Tag verabreicht [40].

Bei Patienten, bei denen eine Respiratortherapie notwendig war, konnte die Letalitätsrate um 33% gesenkt werden. Bei Patienten mit mittelschwerem Verlauf, das heißt mit unterstützender therapeutischer Sauerstoffgabe, erkannte man eine Senkung der Letalitätsrate um 20%.

Wenn eine Beatmung oder Unterstützung nicht indiziert war, die Patienten also eine mildere Form der Infektion durchliefen, konnte kein Effekt von Dexamethason auf den Heilungsprozess nachgewiesen werden [41,42].

Eine mögliche Erklärung hierfür stellt die immunsupprimierende Wirkung von Dexamethason dar. Die Entzündungsreaktion des Organismus wird reduziert [41]. Patienten, die einen schweren Verlauf der Covid-19-Infektion durchleben, haben mit einer überschießenden Immunreaktion ihres Körpers zu kämpfen, dem sogenannten Zytokin-Freisetzungssyndrom oder auch Zytokinsturm genannt [43].

Dexamethason dämpft diese Hyperreaktion des Organismus und erleichtert den Weg zur Genesung. Im Zuge einer weniger schwerwiegenden Erkrankungsform kann die körpereigene Abwehr den viralen Einfluss selbst eindämmen und die Gabe von Dexamethason hätte eine kontraproduktive Wirkung [44].

Des Weiteren zeigt eine Studie aus dem Jahr 2015 von Alabdullah et al. einen Einfluss von Dexamethason auf bovine Neutrophile Granulozyten, welcher auch in der humanen Anwendung von Dexamethason zur Behandlung von Covid-19 einen interessanten Ansatzpunkt darstellen könnte [45].

Aufgrund der Brisanz der Thematik der Therapie von Covid-19 und der Verfügbarkeit von Dexamethason verdient diese Fragestellung ein besonderes Augenmerk [46].

1.6. Zielsetzung und Untersuchungsgegenstand

Die Zielsetzung dieser Promotionsarbeit lag in der Weiterentwicklung und Optimierung der gängigen Methodik zur Analyse der Granulozytenfunktionalität. Nach Erfahrungen früherer Studien muss besondere Sorgfalt auf die Wahl des richtigen Mediums zur Aufnahme der Granulozyten gelegt werden. Deshalb werden in der vorliegenden experimentellen Doktorarbeit die beiden gängigen Medien, fetales Kälberserum (FKS) sowie humanes Blutplasma, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Immunaktivität der Zellen verglichen.

Des Weiteren wird ein Augenmerk auf die Veränderung der Zellaktivität nach Inkubation der Zellen mit dem Tumornekrosefaktor α (TNFα) in verschiedenen Konzentrationen gelegt, um dessen Einfluss zu quantifizieren.

Die Methodik soll außerdem auch in *in-vitro*-Versuchen angewendet werden, sodass über mögliche Wechselwirkungen von bestimmten Medikamenten mit den Granulozyten bzw. ihren Eigenschaften eine Aussage getroffen werden kann.

Es sind dies einerseits der Calcium-Antagonist Nimodipin, welcher bei den oben genannten Vasospasmen nach SAB zum Einsatz kommt. Unterschiedlich hohe Konzentrationen des Medikaments kommen dabei zum Einsatz.

Andererseits wird das Glucocorticoid Dexamethason, das wie erwähnt bei Patienten mit schwerem Covid-19-Verlauf einen Benefit bewirkt, in verschiedenen Konzentrationen hinsichtlich seiner Wirkung auf PMNs getestet

Dieser Zielsetzung folgend wurden die Länge der Migrationsstrecken der PMN, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Freisetzung des Enzyms Myeloperoxidase (MPO) und von granulozytärer DNA in Form von NET-Bildung der genauestens betrachtet.

Mittels vergleichender Gegenüberstellung dieser Parameter sollen statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Gruppen identifiziert werden. Die Gruppen gliedern sich in Testreihen der verschiedenen Medium-Parameter - Humanplasma und fetales Kälberserum - mit und ohne TNFα-Aktivierung sowie in Versuchsansätze mit Zusatz den beiden genannten Medikamenten. Außerdem werden zur Kontrolle Ansätze erstellt, in welchen die jeweiligen Lösungsmittel der Medikamente in analoger Konzentration bezüglich ihres Einflusses auf die PMN untersucht werden.

1.7. Studiendesign

Nach folgendem Schema (Abbildung 6) gliedert sich die Systematik dieser experimentellen Dissertation. Die in Klammern gesetzten Zahlen bezeichnen dabei die jeweilige Versuchsanzahl.

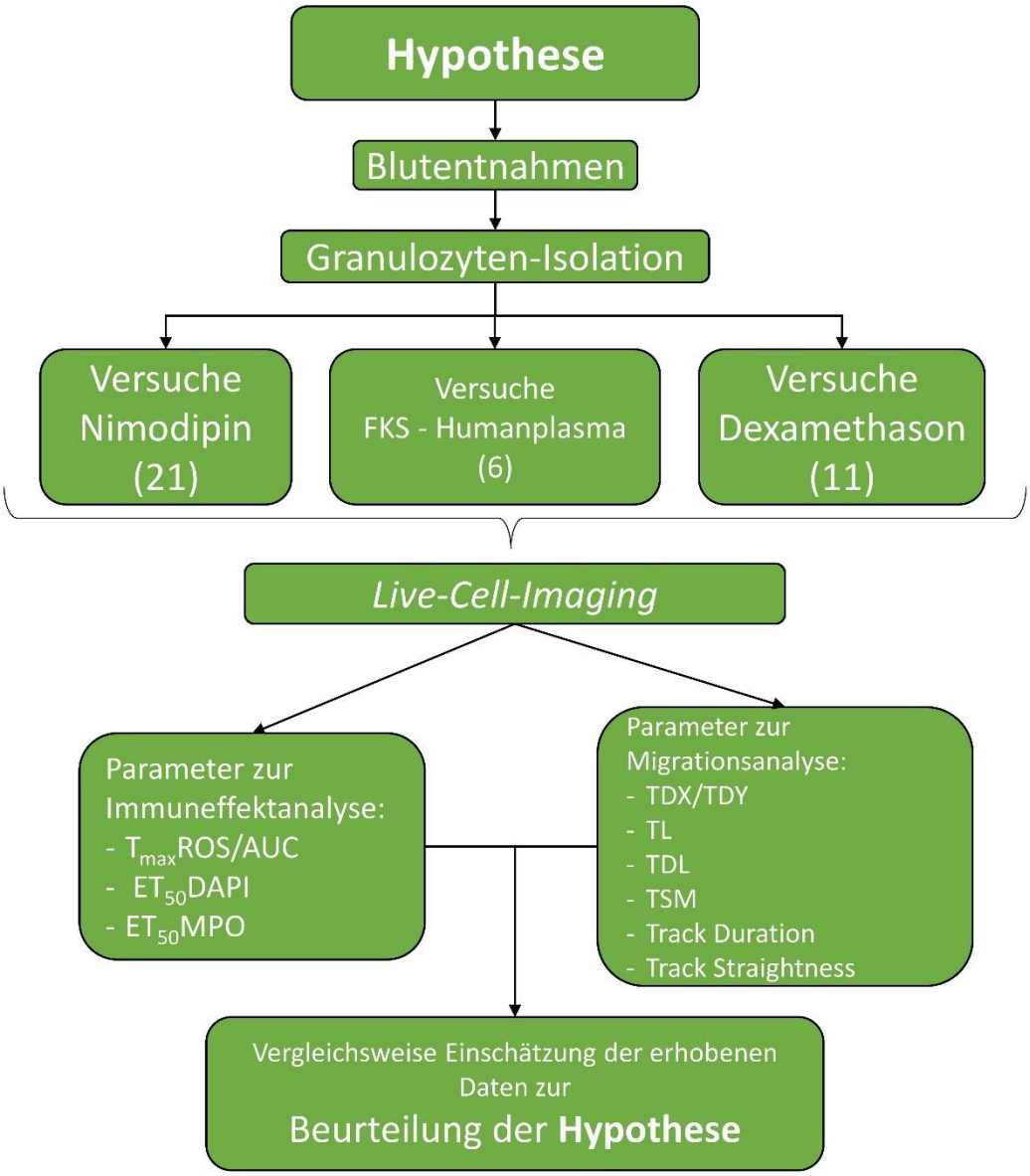

Abbildung 6: Studiendesign

Das folgende Flowchart (Abbildung 7) visualisiert die angewendeten Verfahren bei der Durchführung der Versuche zum Vergleich von FKS mit Humanplasma als Nährmedium der Granulozyten.

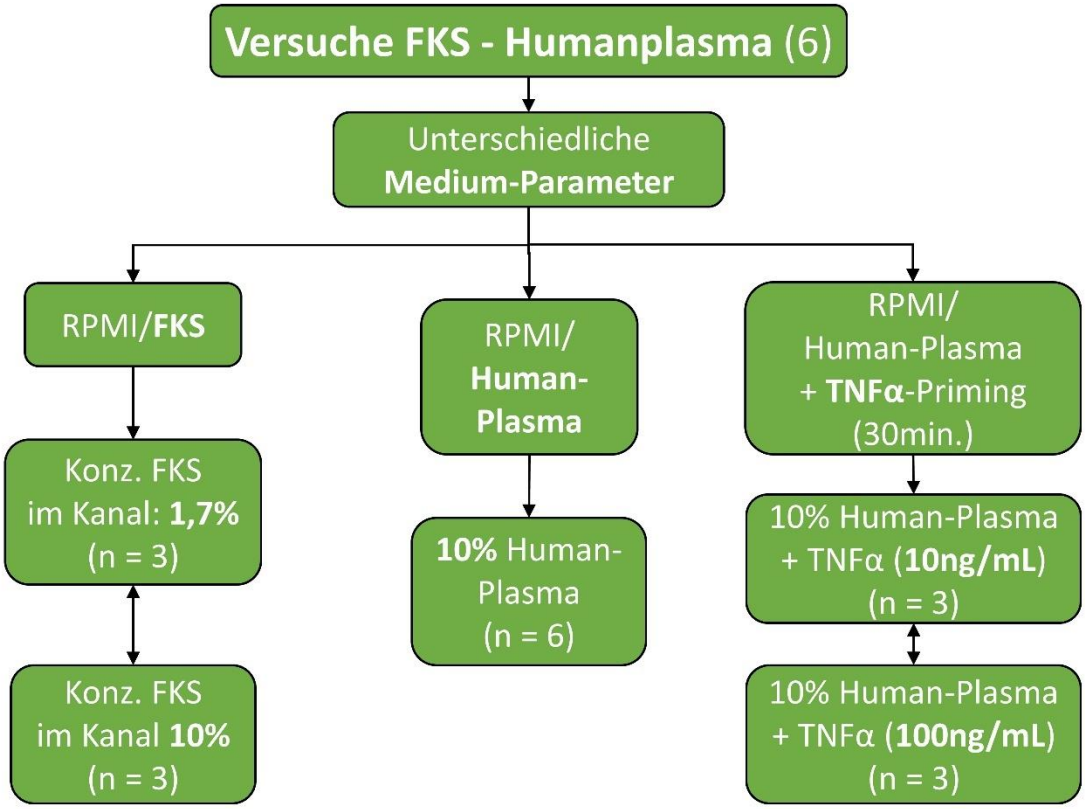

Abbildung 7: Versuche zum Vergleich FKS mit Humanplasma sowie mit und ohne TNFalpha-Priming

Die Systematik der Versuche mit Nimodipin respektive des Lösungsmittels Methanol (MeOH) wird in nachfolgendem Schema (Abbildung 8) beschrieben.

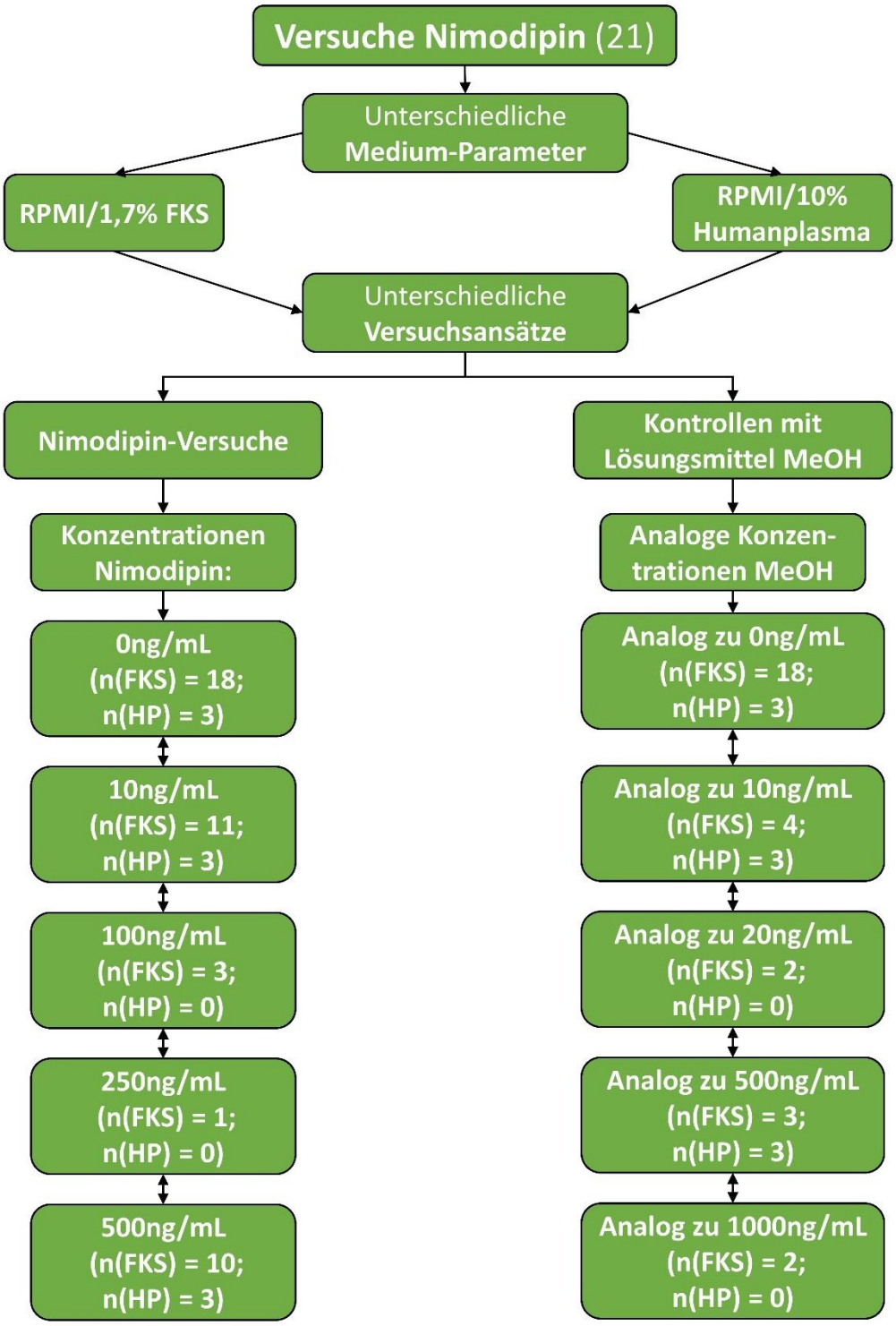

Abbildung 8: Versuche mit Nimodipin bzw. Methanol

Die zur Untersuchung des Einflusses von Dexamethason beziehungsweise des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) durchgeführten Versuche werden in der kommenden Abbildung 9 veranschaulicht.

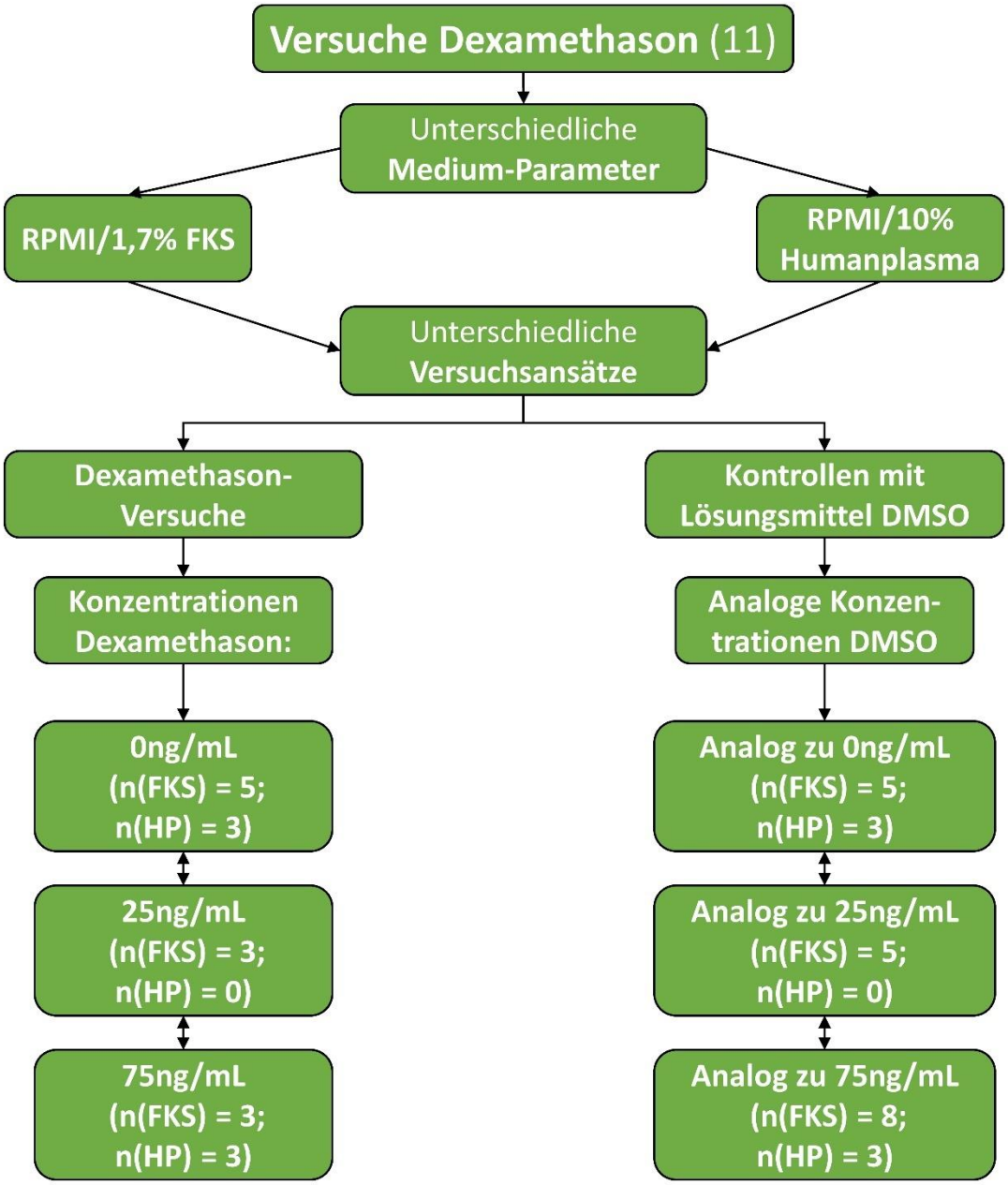

Abbildung 9: Versuche mit Dexamethason bzw. DMSO

2. Material und Methoden

Die folgenden Punkte beinhalten die für die Versuchsdurchführung benötigten Geräte, Chemikalien und Materialien.

2.1. Votum der Ethikkommission

Die Durchführung dieser Studie entspricht den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes und wurde durch die lokale Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg (Aktenzeichen 19-1519-101) genehmigt.

2.2. Allgemeine Geräte und Materialien

CO_2-Inkubator Heracell 150i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Wasserbad ohne integriertes Thermometer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad ThermoHaake SWB25	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Biofuge stratos	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Heraeus™,Megafuge 1.0 R Zentrifuge	ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Herasafe KS 18 biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II	ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
DM IRB Mikroskop	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
MS2 Minishaker IKA JK	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Rollenmischer SRT9D	Stuart, Staffordshire, England
Inkubator Lab-Therm LT-W	Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz
PIPETMAN® Classic P200 Pipette	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
PIPETMAN® Classic P1000 Pipette	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Multipipette M4	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Combitips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

accu-jet® pro Pipettierhelfer	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten 5mL – 50mL	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland; BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Vakuumpumpe	VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Cellstar® Tubes, 15mL, PP	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Rotilabo®-Reaktionsgefäße PP, farblos, 1,5mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Druckminderer	Linde

Tabelle 1: Allgemeine Materialien und Geräte

2.3. Materialien zur Granulozyten-Isolierung

Safety-Multifly-Kanüle 0,9 x 19mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Monovette Lithium-Heparin 5,5mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 7,5mL LH	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Pur-Zellin Zellstofftupfer	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Venenstauschlauch	Kimetec GmbH, Ditzingen, Deutschland
Softasept N	Braun, Melsungen, Deutschland
Cutiplast steril 7,2 x 5cm	Smith & Nephew GmbH, Hamburg, Deutschland
Leuko Spin Medium, pluriSpin	pluriSelect Life Science – Worldwide, Leipzig, Deutschland
Lympho Spin Medium, pluriSpin	pluriSelect Life Science – Worldwide, Leipzig, Deutschland

Tabelle 2: Materialien zur Granulozyten-Isolierung

2.4. Materialien zur Mikroskopie

Zählkammer Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser (Menzel-Gläser)	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
RPMI 1640 without l-glutamine, phenolred, with sodium bicarbonate	PAN BIOTECH, Aidenbach, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anti-MPO-APC, human (anti-MPO)	Miltenyl Biotec, Deutschland
4′,6-Diamidin-2-phenylindol (im folgenden "DAPI"), verdünnt zu 0,5 µg/mL	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, Product of Israel
Dihydrorhodamine 123 (im folgenden "DHR"), 1mM in DMF (10mg/26,2mL DMF)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Aqua Dest	Laborintern destilliert
Minimum Essential Medium Eagle 10x with Earle's salts, without l-glutamine and sodium bicarbonate	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, Product of United Kingdom
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	VWR International GmbH (Radnor, Pennsylvania, USA)
RPMI 1640, w/o: L-Glutamine, w/o: Phenol red, w: 2 g/L $NaHCO_3$	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
PureCol Type I Bovine Collagen Solution (3mg/mL) (Kollagen)	Advanced BioMatrix , Carlsbad, USA
µ-Slide Chemotaxis ibiTreat	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Lids for µ-Slide Chemotaxis	Ibidi, Martinsried, Deutschland
N-Formyl-Met-Leu-Phe ≥97% 50mg (HPLC) (im folgenden "fMLP"), 1mM verdünnt zu 10nM	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Inversmikroskop DMi8	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Ibidi Gas Mixer	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Ibidi Temperature Controller	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Ibidi Heating System, Universal Fit, for 1 Chamber	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Ibidi Gas Incubation System for CO_2	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Leica DFC9000 GT Kamera	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Objektiv HC, PL FL L20x/0,40 CORR PH1	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtquelle CoolLED pE-4000	CoolLED Ltd, Andover, Großbritannien
LED QUAD Filterwürfel	Chroma Technology Corp., Vermont, USA
DUAL Filterwürfel	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

Leica Application Suite 3.4.2.18368 Softwareplattform Leica Apllication Suite X	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

Tabelle 3: Materialien zur Mikroskopie

2.5. Methodik der Versuche am Leica-Mikroskop

Die im Zuge der Versuchsdurchführung angewendeten Methoden werden in den folgenden Punkten behandelt.

In den folgenden Unterkapiteln wird der Versuchsaufbau modellhaft umrissen.

2.5.1. Versuchsvorbereitung: Gelherstellung und Verdünnung von Nimodipin, Dexamethason sowie TNFα

Um im Nachgang die Granulozyten unter dem Mikroskop beobachten zu können, wurde 10 bis 24 Stunden vor Beginn der Mikroskop-Aufnahmen die Kollagen-Gelmatrix in einem 0,5mL- Reaktionsgefäß angesetzt. Hierfür wurden 20µL MEM mit 20µL deionisiertem Wasser, 10µL Sodiumbicarbonat und 50µL RPMI vermengt und der Ansatz bis zum Moment des Gebrauchs in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Bei den Versuchen mit dem Tumornekrosefaktor alpha (TNFα) wurde dieser zur Aktivierung der Granulozyten in den Konzentrationen 10ng/mL bzw. 100ng/mL eingesetzt.

Das Medikament Nimodipin, welches als Stammlösung mit einer Konzentration von 40µg/mL vorlag, wurde in bestimmte Konzentrationen vorverdünnt, um später dann in den Reaktionsansatz der µ-ibidi-Slides hinzugegeben zu werden. Bei den Kontrollversuchen mit Nimodipins reinem Lösungsmittel Methanol wurde ebenso verfahren und es wurden analoge Verdünnungen hergestellt. Zur Herstellung der Verdünnungen wurde RPMI/10%FKS, RPMI/60%FKS bzw. aus der Blutentnahme gewonnenes RPMI/10% Humanplasma verwendet.

Der einerseits eingesetzten Konzentration Nimodipins von 10ng/mL stand eine analoge Methanolkonzentration von 0,0625‰ gegenüber. Bei der Nimodipinkonzentration von 500ng/mL entsprach die Konzentration des Lösungsmittels Methanol 3,125‰.

Bei Dexamethason wurden Konzentrationen von 25ng/mL und 75ng/mL eingesetzt, denen analoge Konzentrationen des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) von

0,16‰ und 0,50‰ gegenüberstanden. Folgende Abbildungen 10 und 11 erläutern die genauen Verdünnungsschritte.

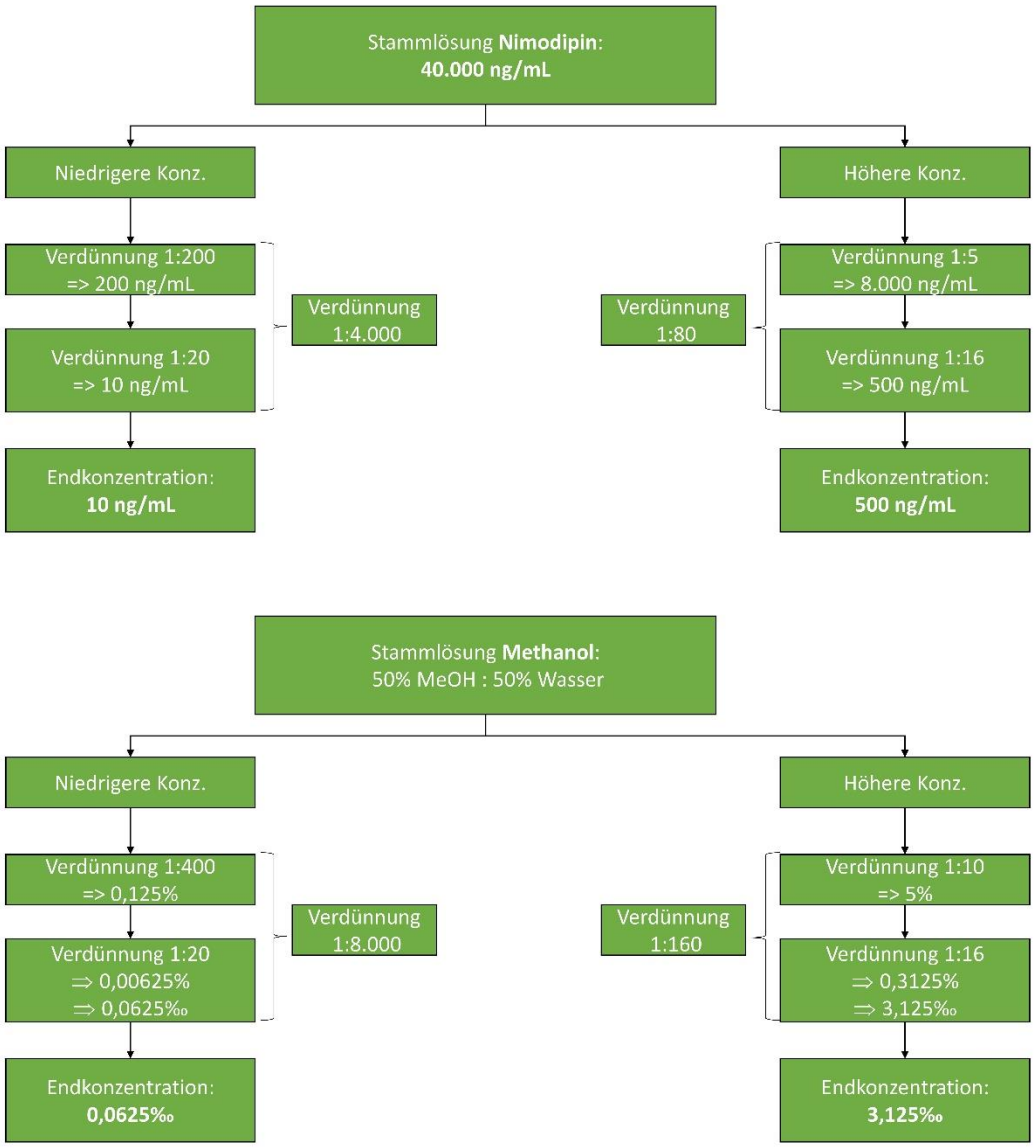

Abbildung 10: Schema der Verdünnungen von Nimodipin bzw. Methanol

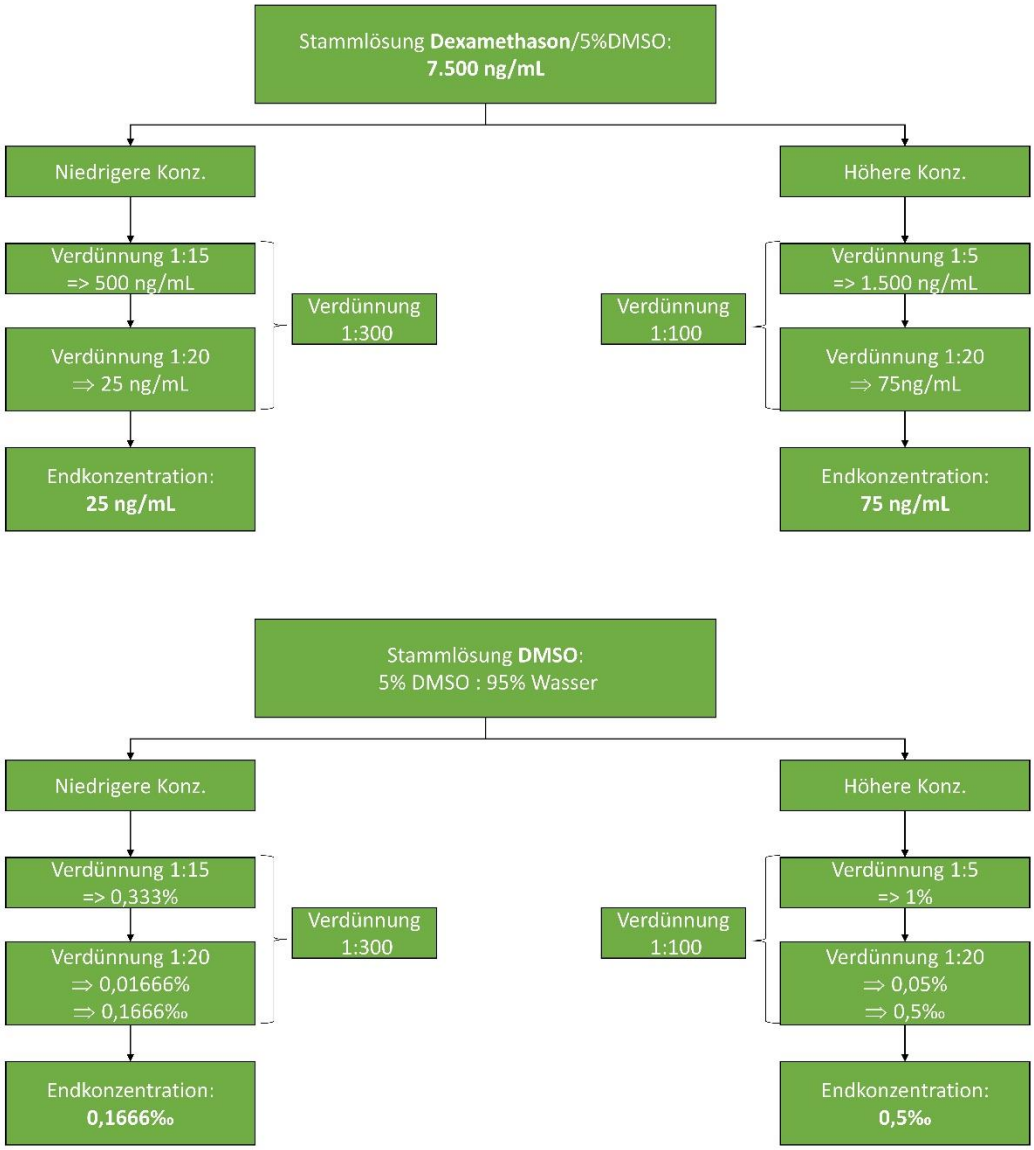

Abbildung 11: Schema der Verdünnungen von Dexamethason bzw. DMSO

Im Vorfeld der Blutentnahme wurde die Isolation der Granulozyten vorbereitet, indem die zur Isolierung nötigen Trennmedien der gekühlten Lagerung entnommen und auf Raumtemperatur gebracht wurden.

Dies diente dazu, den Dichteunterschied der Trennmedien zu erreichen und die Aktivität der Granulozyten nicht unerwünscht zu verringern. Daraufhin wurden in zwei 15mL-Reaktionsgefäße jeweils 3mL Leukospin-Medium mit 3mL Lymphospin-Medium überschichtet. Der Dichteunterschied zwischen beiden Medien erleichterte die Auftrennung der Blutbestandteile beim Zentrifugationsvorgang in verschiedene Schichten innerhalb des Reaktionsgefäßes.

Nach abgeschlossener Risikoaufklärung und Unterschreiben der Einverständniserklärung wurden dem Probanden gemäß dem positiv beschiedenen Ethikvotum (19-1519-101) in der Ellenbeuge 7,5mL venöses Vollblut in eine Lithium-/Heparin-Monovette entnommen. Davon wurde einerseits 1mL in ein 1,5mL Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend für 5 Minuten mit 1.620g ohne Bremse zentrifugiert, um daraus 500µL humanes Blutplasma zu gewinnen. Dies wurde in den Versuchen, bei denen Humanplasma zur Verwendung kam, mit RPMI auf eine 10%ige Lösung eingestellt. Andererseits wurden aus der Monovette jeweils 3mL vorsichtig in die vorbereiteten 15mL-Reaktionsgefäße mit den beiden vorgelegten Spin-Medien pipettiert, ohne die drei Schichten zu vermischen. Im Anschluss wurde das Zentrifugenröhrchen mit 756 g für 20 min bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Eine Auftrennung der verschiedenen Blutbestandteile war nach Abschluss der Zentrifugation mittels unterschiedlicher Dichtegradienten deutlich zu erkennen (Abbildung 12).

Um zu verhindern, dass Lymphozyten und Thrombozyten in das Granulozytenkonzentrat gelangten, wurden das Blutplasma und der Lymphozentenring abgesaugt. Aus beiden Röhrchen wurden jeweils 200µL des Granulozytenrings abpipettiert.

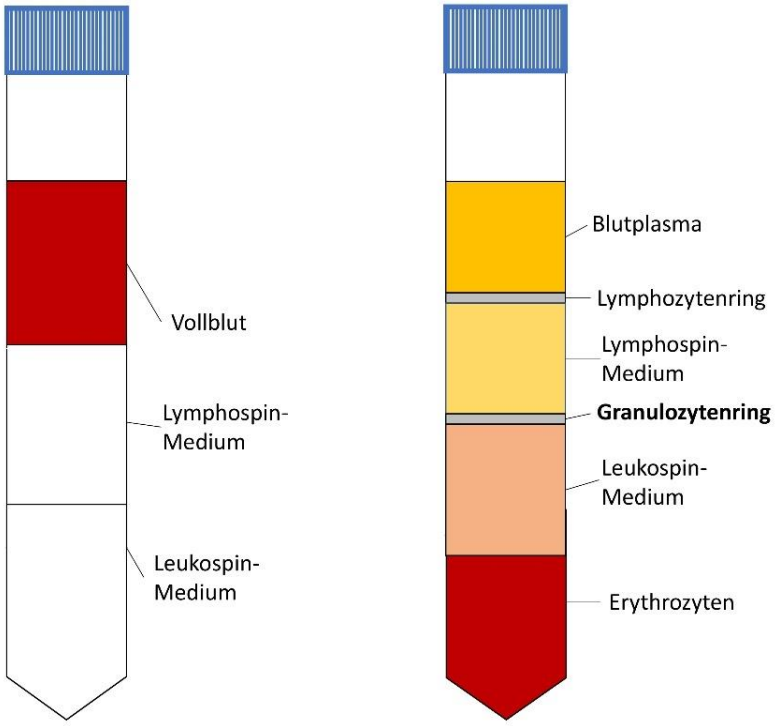

Abbildung 12: Blutprobe mit Lymphospin/Leukospin vor und nach der Zentrifugierung

2.5.2. Vorbereiten der Mikroskopie

Zeitgleich zum Zentrifugationsvorgang der Blutprobe wurden die zur Mikroskopie notwendigen Farbstoffe und anderen Chemikalien hinzupipettiert. DHR (100µL) und DAPI (10µL) sowie der Lockstoff fMLP (10µL) wurden mit RPMI/10%FKS bzw. RPMI/10%Humanplasma auf einen Milliliter fertig zum Gebrauch verdünnt. Die insgesamt 400µL Granulozytenkonzentrat, die aus der Dichtegradientenzentrifugation gewonnen werden konnten, wurden auf eine Zellsuspension mit der Konzentration von 18 Millionen Zellen pro Milliliter eingestellt, sodass eine annähernd einheitliche Zellanzahl in den ibidi-Kanälen bei den verschiedenen Versuchen erreicht werden konnte. Die Zellzahl wurde mittels Neubauerzählkammer ermittelt. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation ohne Bremse für 5 Minuten bei 216 g. Die Zellen setzten sich ab Boden des Reaktionsgefäßes ab, der Überstand konnte abgehoben werden und das entstandene Zellpellet mit dem zuvor berechneten Volumen an Nährmedium RPMI/10%FKS, dem 6-fach höher konzentrierten RPMI/60%FKS beziehungsweise RPMI/10%Humanplasma auf die gewünschte Konzentration eingestellt werden.

Das eingesetzte FKS unterschied sich in den Bedingungen wie es angesetzt wurde. Die ersten 18 Versuche dieser experimentellen Doktorarbeit wurden mit RPMI/10%FKS durchgeführt, welches zuvor dem Gefrierschrank entnommen und aufgetaut worden war. In den darauffolgenden Versuchen wurde mit am selbem Tag frisch angesetztem RPMI/10%FKS gearbeitet.

Bei den Versuchen mit TNFα wurden die beiden gewählten Konzentrationen 10ng/mL bzw. 100ng/mL in das jeweilige Reaktionsgefäß für den Kanal eingesetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Unmittelbar vor dem Befüllen der Ibidi-Slides wurde die Kollagengelmatrix mit den Zellen fertiggestellt, um ein verfrühtes Aushärten zu verhindern. In den fertigen Matrix-Ansatz (MEM, Sodiumbicarbonat, dest. Wasser, RPMI) wurden die drei vorverdünnten Fluoreszenzfarbstoffe mit folgenden Volumina beigefügt:

- 10µL anti-human-Myeloperoxidase Antikörper (0,5µg/mL)
- 5µL DAPI (0,5µg/mL)
- 3µL DHR (1µg/mL)

Von der Granulozyten-Suspension mit der genormten Zellkonzentration von 18 Millionen Zellen pro Milliliter kamen unter vorsichtigem Pipettieren 50µL in den Gelmatrix-Cup. Außerdem hinzugegeben wurden die Medikamente Nimodipin bzw. Dexamethason respektive deren Lösungsmittel Methanol bzw. DMSO in den zuvor eingestellten Konzentrationen. Zuletzt wurden 200µL PureCol beigemengt und homogen vermischt.

Während 6,5µL des Gels in die Kanäle pipettiert wurden, blieben die Reservoirs des ibidi-Slides mit Verschlusskappen verdeckt, um ein Austreten der Gelmatrix in diese zu verhindern (Abbildung 13). Nach Beendigung des Füllvorgangs wurden die Verschlusskappen der Reservoirs entfernt und die Kanäle mit selbigen verschlossen. 30 Minuten lang wurde das Slide in den 37°C warmen Brutschrank zum Inkubieren gegeben, sodass die Gelmatrix aushärten konnte. Während der Inkubationszeit wurden bereits die Voreinstellungen am Mikroskop vorgenommen.

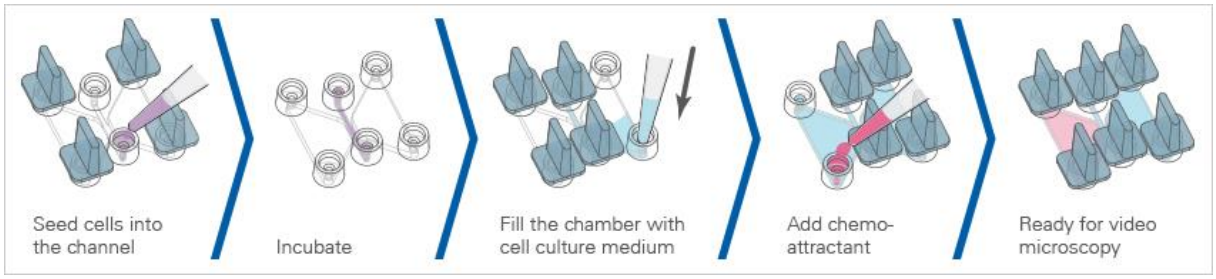

Abbildung 13: Befüllen der Ibidi-Slide, https://ibidi.com/img/cms/applications/chemotaxis/CH_workflow_01_quer.jpg

Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationszeit wurden unverzüglich die insgesamt sechs Reservoire mit 65µL der entsprechenden Substanzen, ebenso in vorsichtigen Pipettiervorgängen, befüllt. Das Lockmedium fMLP wurde in die drei linken Reservoire jedes Kanals appliziert (Abbildung 14). In die drei rechten Reservoire der Kanäle kam als Nährmedium für die Granulozyten RPMI/10%FKS bzw. RPMI/10%Humanplasma.

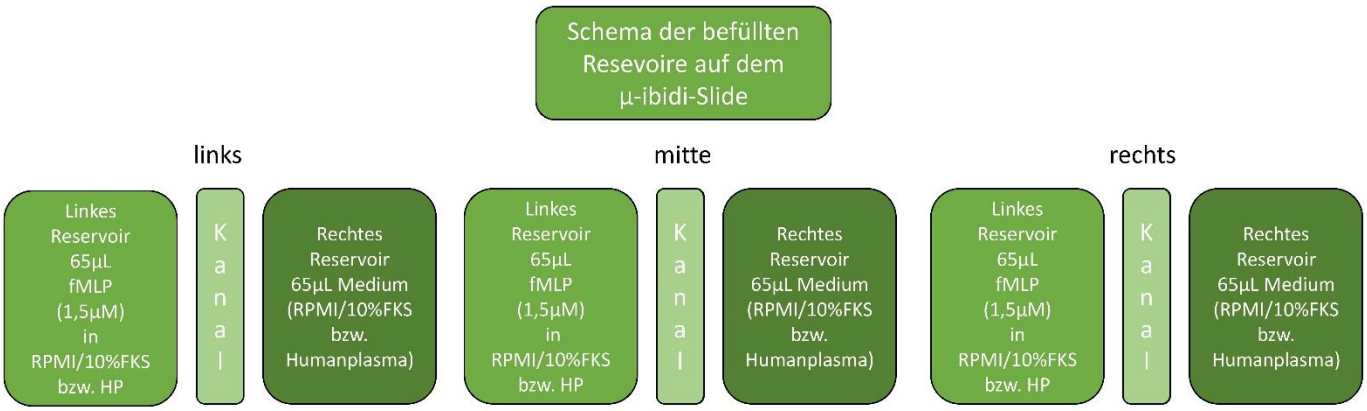

Abbildung 14: Schema der befüllten Reservoire

2.5.3. Mikroskopieren und Systematik der Auswertung

Während der Mikroskopieaufnahmezeit wurde die Klimakammer mit Druckluft belüftet. Weiterhin herrschten in beiden Versuchsgruppen folgende definierte Umgebungsbedingungen (Tabelle 4).

CO_2	5 Volumen-%
Temperatur	35°C
Luftfeuchtigkeit	50%

Tabelle 4: Bedingungen in der Klima-Kammer

Die Mikroskopversuche hatten zwei verschiedene Zeiträume der Mikroskopiedauer. Die Versuche in FKS-Medium liefen circa 6,5 Stunden wohingegen die Versuche mit Humanplasma aufgrund längerer Aktivität der Granulozyten 20 Stunden Laufzeit bekamen.

Innerhalb eines Zeitraumes von circa 6,5 Stunden wurden je Ibidi-Kanal ungefähr alle 30 Sekunden vier Aufnahmen gemacht, eine davon im Phasenkontrastmodus sowie drei Fluoreszenzbilder für die jeweiligen Farbstoffe MPO, DHR und DAPI. Bei den 20 Stunden laufenden Versuchen erfolgten die Aufnahmen circa alle 45 Sekunden.

Nach folgendem Schema in Abbildung 15 erfolgte die Auswertung der Mikroskopversuche:

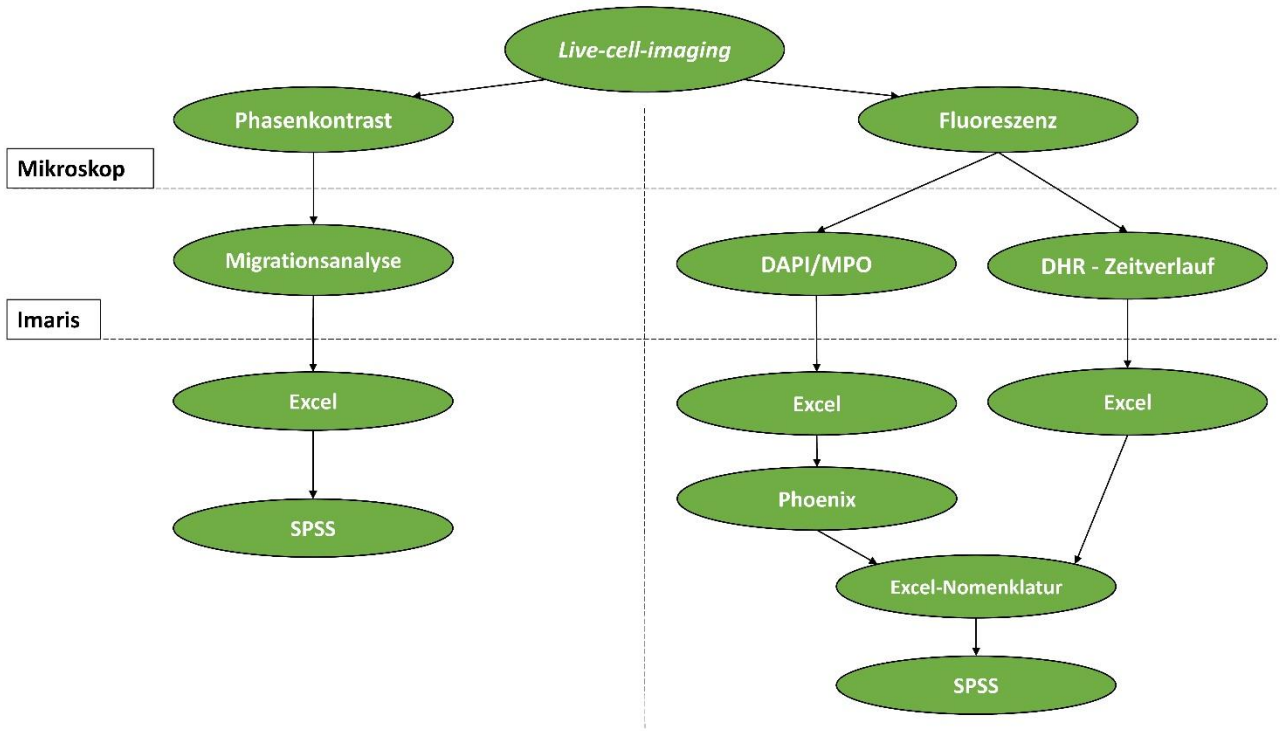

Abbildung 15: Systematik der Auswertung der Mikroskopversuche

2.5.4. Bearbeitung und Aufbereitung der Daten mit der Imaris Software

Zur Auswertung der Aufnahmen des Leica-Mikroskops ist es notwendig, die Bilddateien in quantifizierbare Daten zu übersetzen. Die Imaris Software ermöglicht es, verschiedene Parameter in den unterschiedlichen Aufnahme-Kanälen zu berechnen und somit eine Vergleichbarkeit der Daten herzustellen. Abbildung 16 gibt einen Überblick über die verwendeten Messmethoden zur Gewinnung von Daten für die betrachteten Parameter.

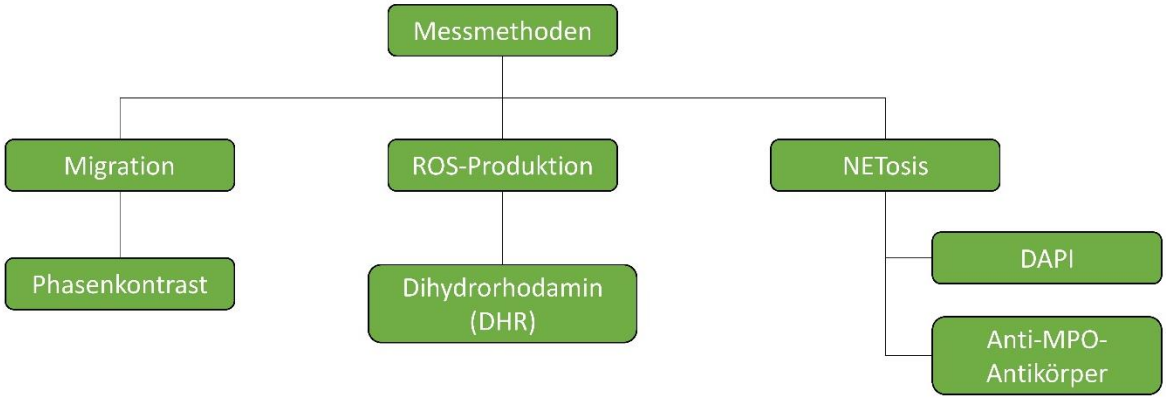

Abbildung 16: Messmethoden der Mikroskopversuche

Im Zuge der Analyse der Migration wird ein einzelner Granulozyt durch einen Algorithmus erkannt und dieser verfolgt die Zelle über den gesamten Zeitraum der Mikroskopieaufnahme von einem Bild zum nächsten (tracken). Das Migrationsverhalten der Granulozyten vermindert sich mit fortschreitender Zeit. Daher wurde eine Unterteilung der Aufnahmezeit in Abschnitte von jeweils 30 bzw. 45 Minuten, also 60 Frames, vorgenommen, sodass ein detaillierterer Vergleich der einzelnen Parameter erfolgen konnte. Weiterhin ist die Zellmigration in FKS nach 2,5 Stunden weitestgehend abgeschlossen, weshalb lediglich die ersten fünf Abschnitte bei der Auswertung von Bedeutung waren. In Humanplasma wurde aufgrund nicht so rasch abfallender Migrationsaktivität der Beobachtungszeitraum auf 20 Stunden ausgeweitet. Bei zwei Aufnahmezyklen pro Minute umfasst der beobachtete Zeitraum in den FKS-Versuchen also die ersten 300 Aufnahmeserien. Um mögliche Störfaktoren zu dezimieren, wurden bestimmte Ausschlusskriterien in den Einstellungen festgelegt (Tabelle 5).

Parameter	**Auschlussbereich**	**Begründung**
Track Length	≥ 25µm	Zellen, die weniger weit wandern, sind vermutlich keine PMN
Track Duration	≥ 900s	Zellen, die weniger lang gewandert sind, wurden vermutlich zu kurz getrackt

Tabelle 5: Ausschlusskriterien zur Verminderung der Einflussnahme durch Störfaktoren

Bei den Farb-Fluoreszenz-Aufnahmen wurde mithilfe der Surface-Funktion die Summe der fluoreszierenden Flächen der jeweiligen Farbe pro Frame ermittelt. So konnten zeitliche Parameter der jeweiligen Fluoreszenz-Emission innerhalb der gesamten Aufnahme bestimmt werden. Die verhältnismäßig geringen Veränderungen von Frame zu Frame erlaubten eine Berücksichtigung lediglich jedes fünften Aufnahmezyklus, also bei FKS circa alle 150 bzw. bei Humanplasma alle 225 Sekunden).

2.5.5. Datenkonvertierung und Statistische Auswertung der ROS-Produktion

Zur statistischen Auswertung der ROS-Produktion mussten die in Imaris erhaltenen Daten zuerst in eine Excel-Tabelle exportiert werden. Dabei erhielt man pro Frame (alle 150 bzw. 225 Sekunden) eine Flächensumme der DHR-Fluoreszenz. Mittels Umsetzung der Zahlenwerte der Tabelle in eine graphische Ansicht (Abbildung 17) ergab sich eine Funktion, deren Maximalwert als Nullstelle der ersten Ableitung berechnet wurde. Zur Berechnung wurde ein Ableitungsrechner aus dem Internet verwendet [47].

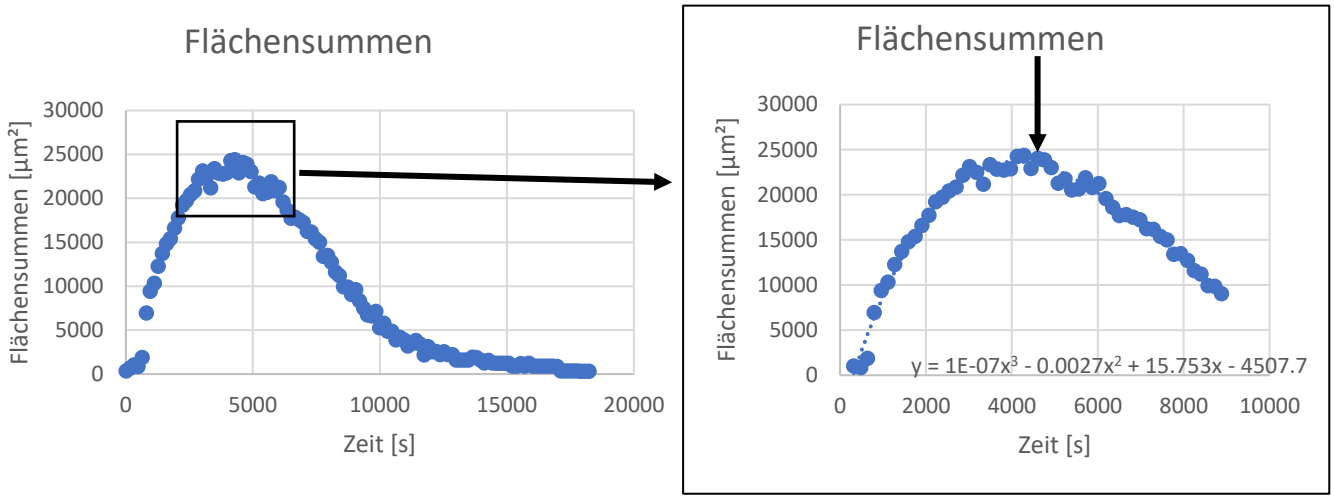

Abbildung 17: Zeitpunkt maximaler ROS-Produktion am Maximum der Fluoreszenzdetektion

Dem Wert der Nullstelle auf der Abszisse entsprach dabei der Zeitpunkt der maximalen Summe an fluoreszierenden Flächen. Dieser X-Wert der jeweiligen Nullstelle wurde für jeden Kanal der µ-ibidi-Slides eines jeden Versuches ermittelt.

Außerdem wurde im Rahmen der Analyse der ROS-Produktion der im Zuge dieser Dissertation neu eingeführte Parameter *„area under the curve“ (AUC)* betrachtet. Dieser entspricht der Fläche unter dem Graphen der ROS-Produktion in µm². Dabei wurden die Werte stets über die Dauer des kompletten Beobachtungszeitraums von etwa 20 Stunden aufsummiert, um eine Vergleichbarkeit herzustellen. Eine große Fläche entspricht dabei vielen Zellen, die lange Zeit ROS-Produktion aufweisen. Umgekehrt bedeuten kleine Flächen, dass es nur wenige Zellen sind, welche auch nur kurzzeitig ROS-Produktion zeigen.
Zur endgültigen statistischen Berechnung wurde das Programm SPSS herangezogen, wobei hierfür die entsprechende Excel-Tabelle in das Programm importiert werden musste. Zunächst erfolgte eine Testung auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test und im Anschluss dementsprechend ein T-Test mit unabhängigen Stichproben bei normalverteilter Variable bzw. der nichtparametrische Man-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilter Variable. Verglichen wurden dabei Granulozyten in FKS 1,7%-Medium mit solchen in 10%FKS-Medium sowie in 1,7%Humanplasma-Medium. Außerdem wurden PMNs unter Nimodipin-Einfluss bzw. den entsprechenden Methanol-Konzentrationen sowie unter Dexamethason-Einfluss und den entsprechenden DMSO-Konzentrationen verglichen. Zusätzlich lag das Augenmerk auf Granulozyten, welche mit TNFα aktiviert worden waren.

2.5.6. Datenkonvertierung und statistische Auswertung der NETosis und der MPO-Freisetzung

Nach vorausgegangener Konvertierung der Imaris-Daten in Excel wurden diese in die Software Phoenix übertragen. Diese erstellte für jeden µ-Slide-Kanal jedes Versuchs einen Graphen, bei dem die Summe der fluoreszierenden Fläche gegen die Zeit (ca. alle 150s bzw. 225s) aufgetragen wurde.
Zusätzlich ergaben sich aus Phoenix verschiedene Parameter (Abbildung 18), welche in eine Excel-Tabelle konvertiert wurden. Diese Excel-Datei konnte wiederum in SPSS importiert werden. In der Folge wurden statistische Berechnungen, analog derer bei den Werten für die ROS-Produktion (3.1.6), unternommen.

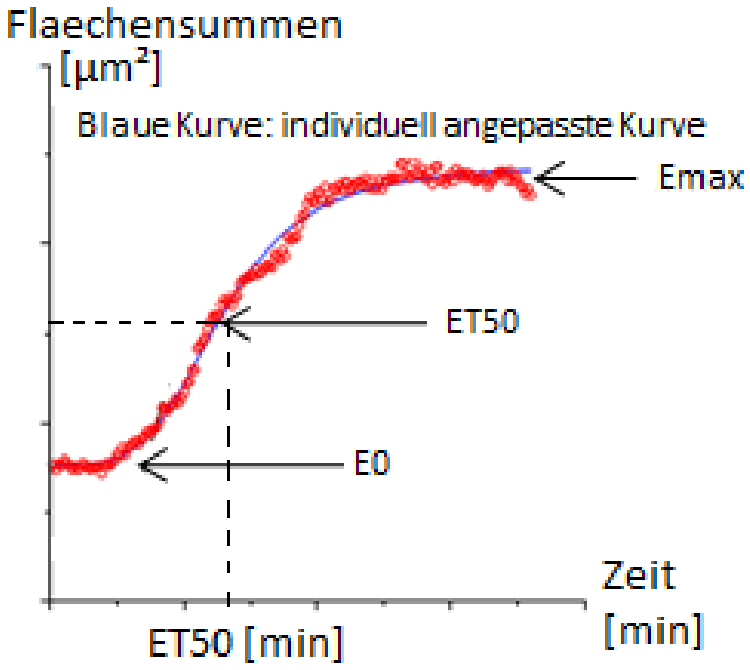

Abbildung 18: ET50-Wert als Zeitpunkt halbmaximaler DNA-(NETosis) bzw. MPO-Freisetzung

Mithilfe der folgenden Formel wurden die ET_{50}-Werte für die NETosis ermittelt:

$$E = E_0 + \frac{Emax \times T^y}{ET_{50}^y + T^y}$$

Formel 1: Berechnung der ET_{50}-Werte der NETosis

2.5.7. Datenkonvertierung und statistische Auswertung der Migration

Im Rahmen der Zellmigrationsauswertung wurden die von der Software Imaris errechneten Zahlenwerte erneut in eine Excel-Datei exportiert. Um das Migrationsverhalten der Granulozyten in FKS zu analysieren, wurde die Phasenkontrast-Aufnahme der 3 Kanäle in 30-minütige Abschnitte unterteilt (jeweils 60 Frames). Es wurde ein Unterschied zwischen FKS, welches aus dem Gefrierschrank aufgetaut wurde, und frisch angesetztem FKS festgestellt. In frischem FKS wurde der Beobachtungszeitraum auf 20 Stunden mit einer Einteilung in 45-Minuten-Abschnitte verlängert. Für die Analyse in Humanplasma betrug die Länge der Abschnitte 45 Minuten, wobei die zeitabhängigen Parameter, wie beispielsweise die Track Length, auf dasselbe Maß wie die FKS-Versuche normiert wurden, um eine Vergleichbarkeit zu schaffen.

Für jeden relevanten Parameter ergaben sich somit zeitlich differenzierte Werte pro Kanal (Tabelle 6).

Migrationsparameter:	
Track Displacement X	Track Speed Mean
Track Displacement Y	Track Speed Min
Track Displacement Length	Track Straightness
Track Duration	ET_{50} Track Length
Track Length	E_0 Track Length
Track Speed Max	

Tabelle 6: Migrationsparameter zur Auswertung

Der ET_{50}-Track-Length ist ein im Zuge dieser Dissertation neu eingeführter Parameter. Er beschreibt den Zeitpunkt an dem sich die Migrationsaktivität der Granulozyten bezüglich der Track Length in µm auf die Hälfte des anfänglichen Niveaus reduziert hat. Bei der Auswertung wurde ebenso auf das Programm Phoenix zurückgegriffen, um diese ET_{50}-Werte zu ermitteln. Folgende Formel wurde dafür angewendet:

$$E = E_0 - \frac{Emax \times T^y}{ET_{50}^y + T^y}$$

Formel 2: Berechnung der ET_{50}-Werte für die Mediane der Track Length

Anschließend wurde eine Auftragung der gesammelten Daten aus Phoenix in Excel vorgenommen.

Der E_0-Wert für die Track Length in µm bezeichnet diejenige Migrationsstrecke der Granulozytenpopulation, welche diese zu Beginn des Beobachtungszeitraums zurücklegen kann.

2.5.8. Statistik

Jede untersuchte Gruppe wurde auf Vorliegen einer Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft.

Wenn eine Normalverteilung vorlag, so wurde bei zwei zu vergleichenden Gruppen ein T-Test zur Überprüfung der Signifikanz durchgeführt.

Bei mehreren verglichenen Gruppen wurde auf die einfaktorielle Varianzanalyse zurückgegriffen. Zur Präsentation der Ergebnisse wurden in diesem Fall die Mittelwerte mit Standardabweichung herangezogen.

Wenn keine Normalverteilung vorlag, so wurde bei zwei zu vergleichenden Gruppen der Mann-Whitney-U-Test vollzogen.

Bei mehreren Gruppen kam der Kruskal-Wallis-Test mit paarweise multiplen Comparisons zur Anwendung. Die Ergebnisse wurden mit den Medianwerten sowie Minium und Maximum zur Präsentation gebracht.

Im Ergebnisteil wiedergegebene Boxplots und Mediane bedeuten automatisch, dass keine Normalverteilung der Resultate vorlag.

Von statistischer Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ ausgegangen.

3. Ergebnisse

Insgesamt nahmen 15 Probanden an diesem Projekt teil. Von einigen wurden mehrmals Blutproben für verschiedene Versuche entnommen.

Beginnend mit der Versuchsreihe zum Vergleich FKS 1,7% mit FKS 10% und Humanplasma 1,7% werden die Resultate, im Anschluss auch für die Testreihen mit Medikamenten und Aktivierungssubstanzen, im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Funktionalität der Granulozyten beschrieben.

Im Zuge der Analyse der Migration wurde das Augenmerk stets auf die 50 Zellen gelegt, welche am weitesten gewandert sind.

3.1. Ergebnisse: FKS1,7% versus FKS10% versus Humanplasma1,7%

Die folgenden Unterkapitel geben einen Überblick über die Resultate der Versuche zum Vergleich von FKS in verschiedenen Konzentrationen und Humanplasma.

3.1.1 ROS-Produktion und NETosis

Begonnen werden soll mit der Vorstellung der Ergebnisse der Farbauswertung, welche in Abbildung 19 und in Tabelle 7 grafisch dargestellt wird. Werte für ET_{50}NETosis oder t_{max}ROS über 1200 wurden ausgeschlossen, da diese den Beobachtungszeitraum übersteigen.

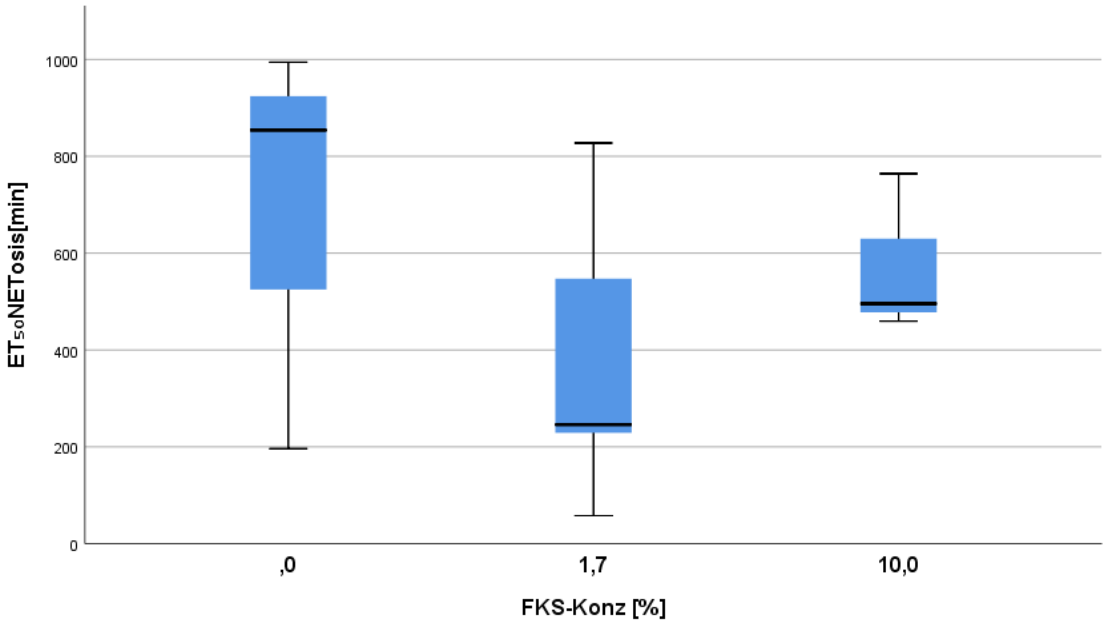

Abbildung 19: ET_{50}-Werte der NETosis in Abhängigkeit zur FKS- bzw. Humanplasma-Konzentration

Mediumkonz. [%]	N	N ausgeschlossene Fälle	Median	Minimum	Maximum	Ausschlussgrund
Hum.Pl. 1,7	3	2	854	196	994	ET_{50}NETosis > 1200
FKS 1,7	13	2	246	57.8	828	ET_{50}NETosis > 1200
FKS 10	3	0	496	460	764	ET_{50}NETosis > 1200

Tabelle 7: statistischer Vergleich der einzelnen Mediumparameter der ET_{50}-Werte für die NETosis [min]

Der Medianwert der ET_{50}-Werte für die NETosis, also dem Zeitpunkt zu welchem die Hälfte der Granulozyten in die NETosis gegangen ist, liegt bei der FKS-Konzentration von 1,7% bei circa 246 Minuten, bei der FKS-Konzentration von 10% liegt er bei 496 Minuten. Der Median für Humanplasma liegt bei etwa 854 Minuten. Es konnte keine Normalverteilung nachgewiesen werden. Der anschließende Vergleich der Mediane in den drei Gruppen ergab keine statistisch signifikante Unterscheidung der Gruppen (p = 0,411).

Für die ROS-Produktion, dargestellt in Abbildung 20 und Tabelle 8, ergaben sich die folgenden t_{max}ROS-Median-Werte. Bei der FKS-Konzentration von 1,7% liegt dieser bei circa 116 Minuten, für 10% FKS bei 218 Minuten. In den Kanälen mit Humanplasma ergab sich ein Median von 121 Minuten. Beim Vergleich der Mediane in den drei Gruppen ergab sich keine statistisch signifikante Unterscheidung der Gruppen (p = 0,647).

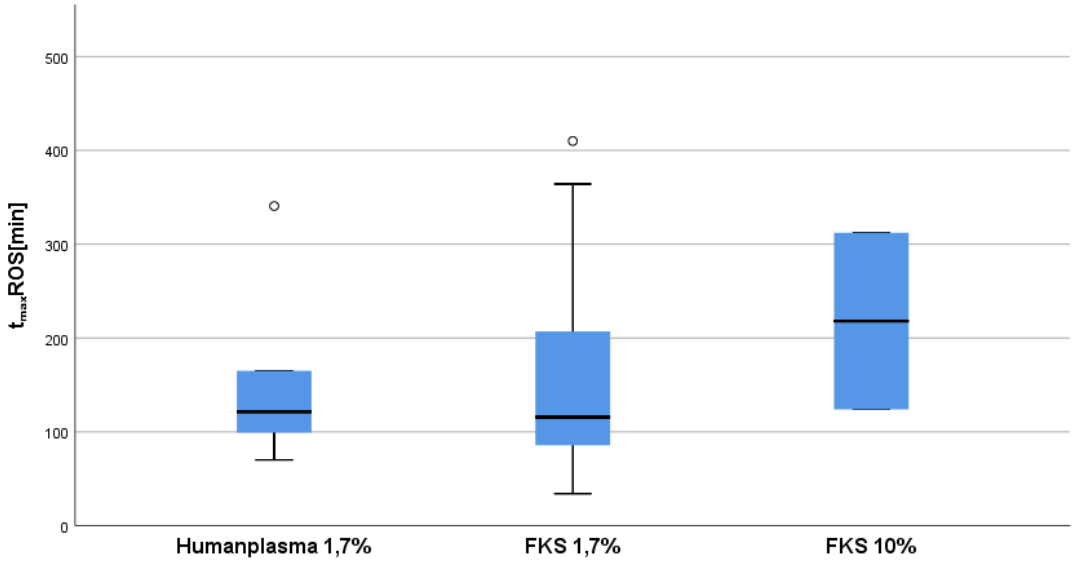

Abbildung 20: Mediane der t_{max}ROS-Werte in Abhängigkeit von der FKS- bzw. Humanplasma-Konzentration

Mediumkonz. [%]	N	N ausgeschlossene Fälle	Median	Minimum	Maximum	Ausschlussgrund
Hum.Pl. 1,7	5	0	121	70.1	341	t_{max}ROS > 1200
FKS 1,7	13	0	116	34.0	410	t_{max}ROS > 1200
FKS 10	2	0	218	124	312	t_{max}ROS > 1200

Tabelle 8: statistischer Vergleich der einzelnen Mediumparameter der Medianwerte für t_{max}ROS [min]

Für die Mediane der *„area under the curve“ (AUC)* ergaben sich bei der Auswertung der Daten folgende Werte, welche in Abbildung 21 und in Tabelle 9 aufgeführt werden. Für FKS in der Konzentration von 1,7% beträgt der Median der AUC 256 µm², für 10% FKS liegt er bei 303 µm². Humanplasma ergab einen Median von 35,2 µm². Der daraufhin durchgeführte Vergleich der Mediane in den drei Gruppen ergab keine statistisch signifikante Unterscheidung der Gruppen (p = 0,094).

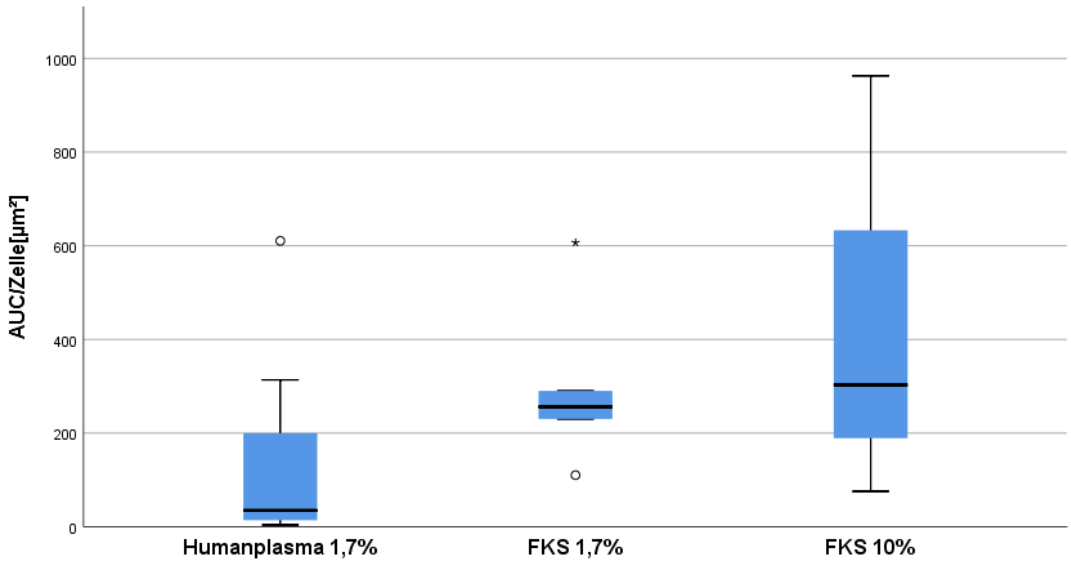

Abbildung 21: Mediane der AUC in Abhängigkeit von der FKS- bzw. Humanplasma-Konzentration

Mediumkonz. [%]	N	N ausgeschlossene Fälle	Median	Minimum	Maximum	Ausschlussgrund
Hum.Pl. 1,7	12	0	35.2	4.04	610	/
FKS 1,7	5	0	256	110	607	/
FKS 10	3	0	303	75.8	963	/

Tabelle 9:statistischer Vergleich der einzelnen Mediumparameter der Medianwerte für AUC/Zelle [µm²]

3.1.2 Migration

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Migrationsanalyse dargestellt. Abbildung 22 zeigt die Abnahme der Track Length in Abhängigkeit von der Zeit für die jeweiligen Medium-Parameter.

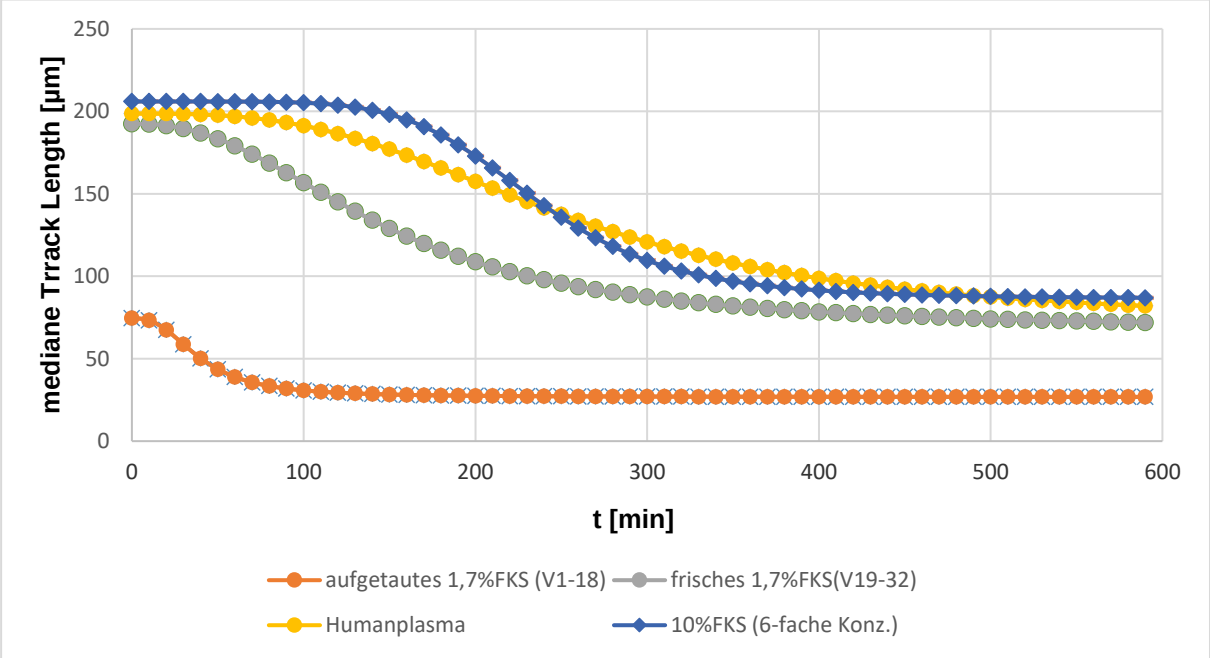

Abbildung 22: mediane Track Length [µm] in Abhängigkeit von der Zeit für die verschiedenen eingesetzten Mediumparameter

Der ET_{50}-Wert für die Migrationsstrecken der PMNs bezeichnet den Zeitpunkt an dem die meisten der Granulozyten nur noch 50 Prozent ihrer maximalen Track Length in µm erreichen.

Der Median dieses ET_{50}-Migration-Wertes liegt für das aufgetaute 1,7%FKS-Medium bei circa 39 Minuten, für das frisch angesetzte 1,7%FKS-Medium bei etwa 148 Minuten. Für die 6-fache FKS-Konzentration, also 10%, liegt der Wert des Medians bei 235 Minuten und für Humanplasma als verwendetes Medium bei 255 Minuten.

Es konnte keine Normalverteilung nachgewiesen werden. Der anschließende Vergleich der Mediane in den vier Gruppen ergab statistisch signifikante Unterschiede einzelner Parameter, dargestellt in Abbildung 23 und Tabelle 10.

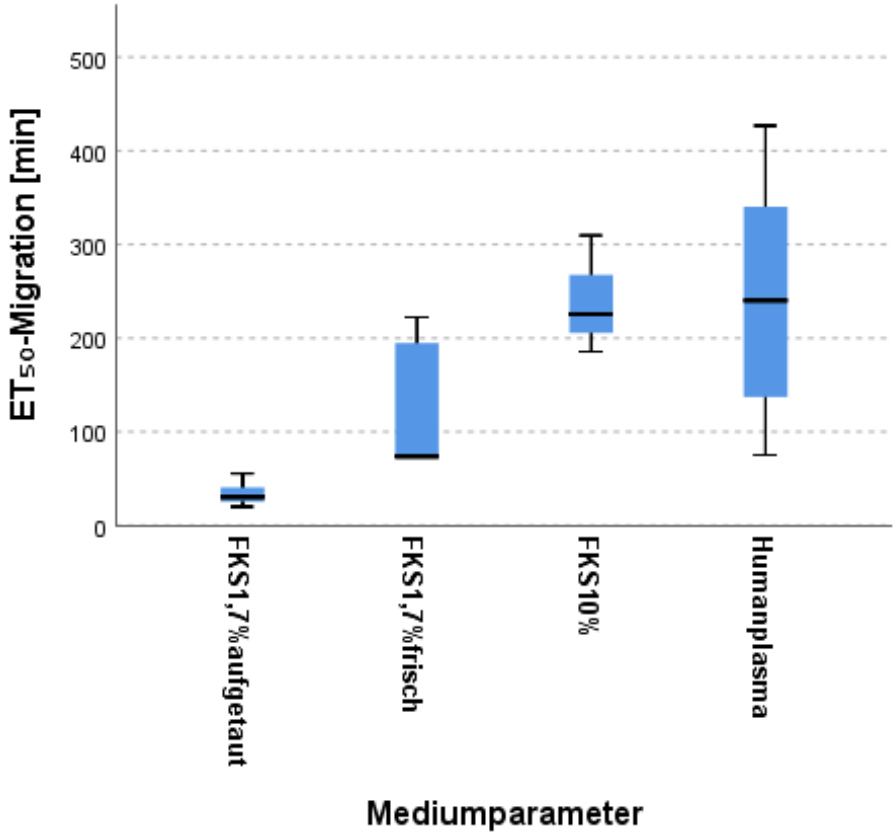

Abbildung 23: ET50-Migrationswerte [min] für die einzelnen Mediumparameter

Sample 1-Sample 2	Korr. Sig.[a]
FKS1,7%aufgetaut-FKS1,7%frisch	,091
FKS1,7%aufgetaut-Humanplasma	,000
FKS1,7%aufgetaut-FKS10%	,012
FKS1,7%frisch-Humanplasma	,547
FKS1,7%frisch-FKS10%	1,000
Humanplasma-FKS10%	1,000

Tabelle 10: statistische Vergleiche der ET_{50}-Migrationswerte [min] der einzelnen Mediumparameter

Der E_0-Wert der Track Length bezeichnet diejenige Migrationsstrecke in µm, die ein Granulozyt zu Beginn des Beobachtungszeitraum zurücklegt.

Für die E_0-Werte der Track Lengths der Granulozyten im jeweiligen Medium in µm ergab sich nach Überprüfung auf Normalverteilung und anschließendem Vergleich der Gruppen mit errechneten statistisch signifikanten Unterschieden folgendes Bild (Abbildung 24, Tabelle 11).

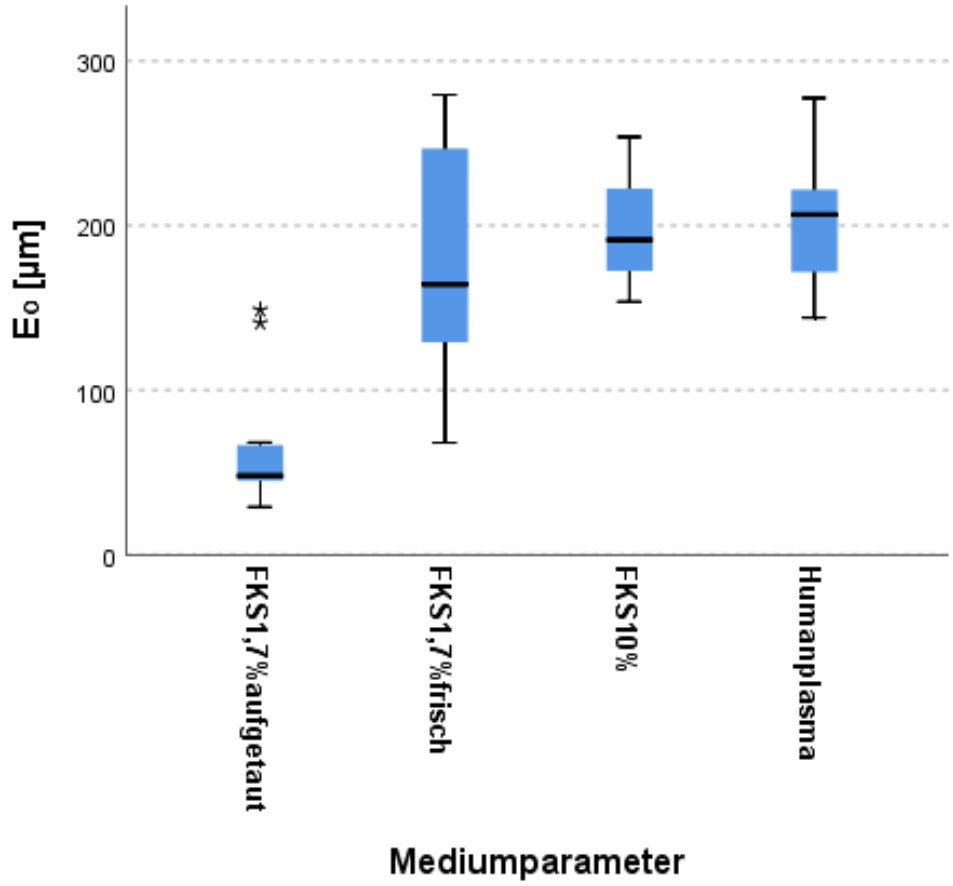

Abbildung 24: E_0-Werte [µm] der Track Lengths für die einzelnen Mediumparameter

Sample 1-Sample 2	Korr. Sig.[a]
FKS1,7%aufgetaut-FKS1,7%frisch	,011
FKS1,7%aufgetaut-FKS10%	,073
FKS1,7%aufgetaut-Humanplasma	,000
FKS1,7%frisch-FKS10%	1,000
FKS1,7%frisch-Humanplasma	1,000
FKS10%-Humanplasma	1,000

Tabelle 11: statistische Vergleiche der E_0-Werte [µm] der einzelnen Mediumparameter

3.2. Ergebnisse: Granulozyten in Humanplasma nach Priming mit TNFα

Die Versuchsreihen, die die Untersuchung von mit TNFα vorbehandelten Granulozyten zum Ziel hatten, lieferten die im Folgenden dargestellten Ergebnisse.

3.2.1 ROS-Produktion und NETosis

Zur Analyse dieser Versuchsreihe wurden zuvor Werte, welche außerhalb des Beobachtungszeitraums von 1200 Minuten lagen, ausgeschlossen. Aufgrund der dadurch verringerten Fallzahlen werden hier lediglich die Medianwerte angegeben ohne weitere statistische Angaben zu machen. Bei der Farbauswertung zeigte sich für den ET_{50}-Wert der NETosis das folgende Resultat: der Median für die NETosis ohne vorherige TNFα-Inkubation liegt bei einer Fallzahl von 3 – nach Wegfall von 2 gemessenen Werten - bei circa 854 Minuten. Bei Inkubation mit TNFα in einer Konzentration von 10ng/mL nach 30-minütiger Inkubation beträgt bei einer Fallzahl von 2 und einem weggefallenem Wert der ET_{50}-Medianwert 627 Minuten, wohingegen bei einer Konzentration von 100ng/mL und gleichbleibender Inkubationsdauer der Medianwert bei einer Fallzahl von 1 und Wegfall eines Wertes bei 609 Minuten liegt.

3.2.2 Migration

Bei Betrachtung der Migrationsergebnisse ergab sich folgendes Bild (Abbildung 25).

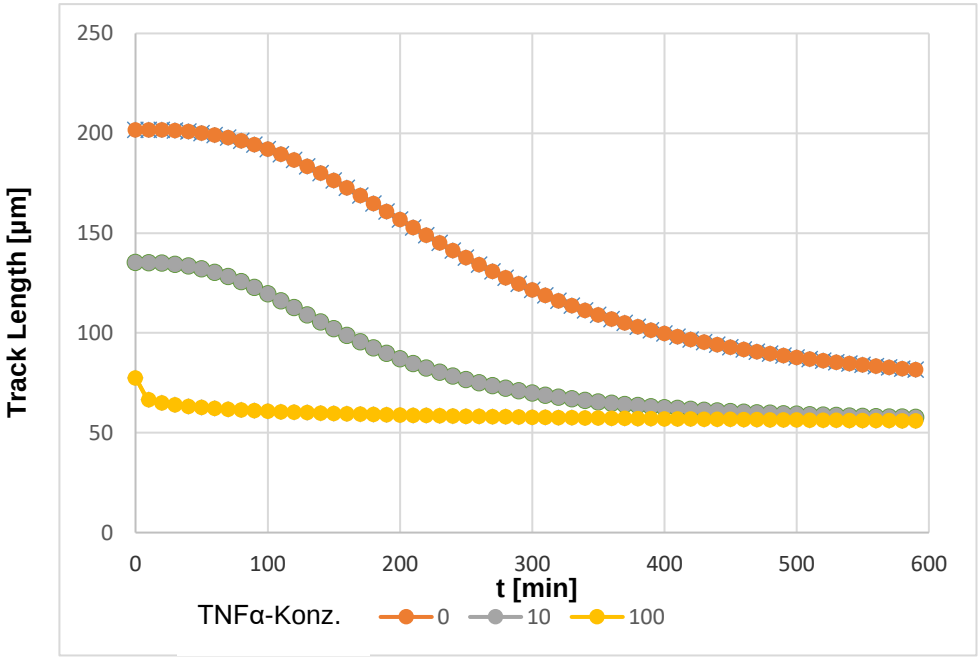

Abbildung 25: Track Length in Abhängigkeit von der zum Priming eingesetzten TNFalpha-Konzentration

Die aus dem Diagramm ermittelten ET_{50}-Werte für die Migrationsstrecke der Granulozyten liegen für TNFα in der Konzentration 0ng/mL bei 256 Minuten, für 10ng/mL bei 172 Minuten und für 100ng/mL im nicht mehr bestimmbaren Bereich.
Bei den statistischen Berechnungen in Bezug auf die gefundenen Werte konnte keine Normalverteilung nachgewiesen werden. Die Mediane der ET_{50}-Migrationswerte, dargestellt in Abbildung 26, unterscheiden sich nicht signifikant (p=0,700).

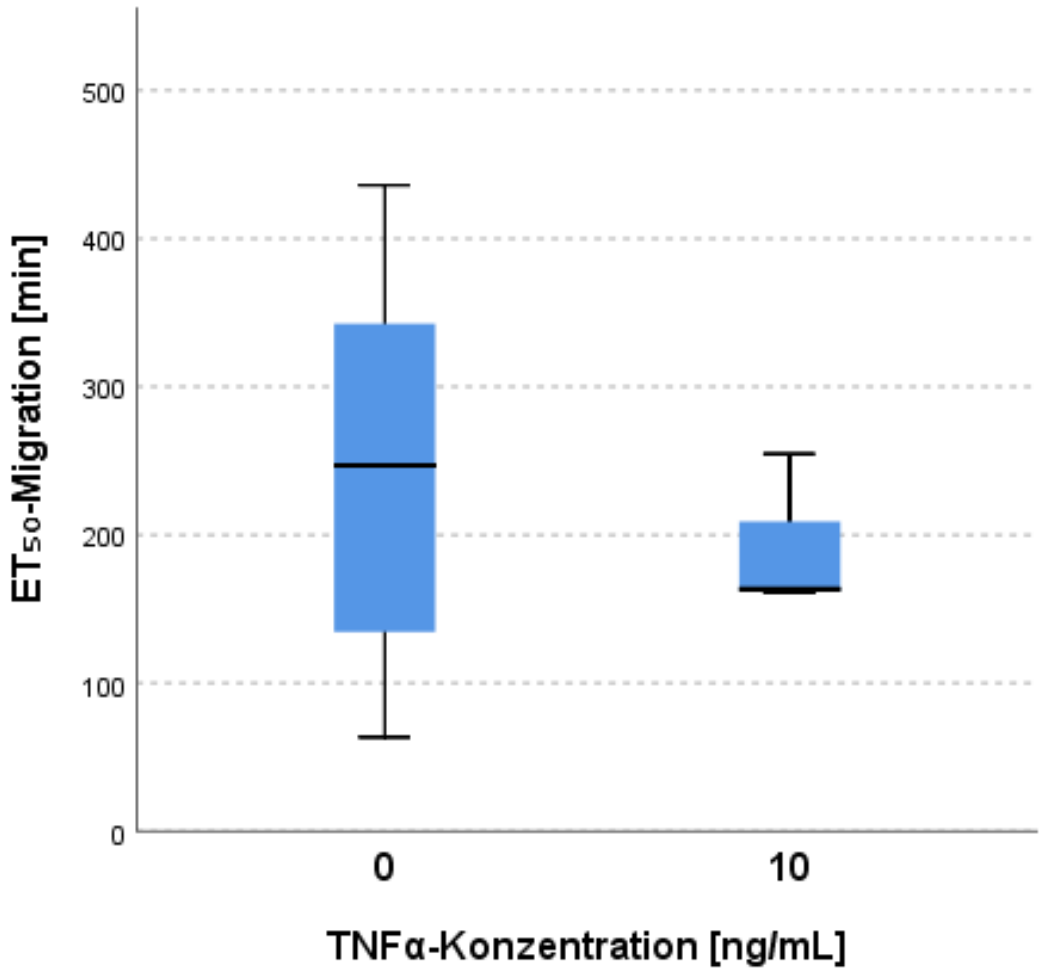

Abbildung 26: ET_{50}-Migrationswerte [min] der einzelnen Konzentrationen von TNFα

Für die E_0-Werte der Track Lengths der Granulozyten für die verschiedenen Konzentrationen von TNFα ergab sich folgendes Bild (Abbildung 27, Tabelle 12). Im Zuge der statistischen Auswertung war keine Normalverteilung der Werte nachweisbar. Die E_0-Werte der verschiedenen Gruppen unterscheiden sich zum Teil, wie in Tabelle 12 dargestellt, statistisch signifikant.

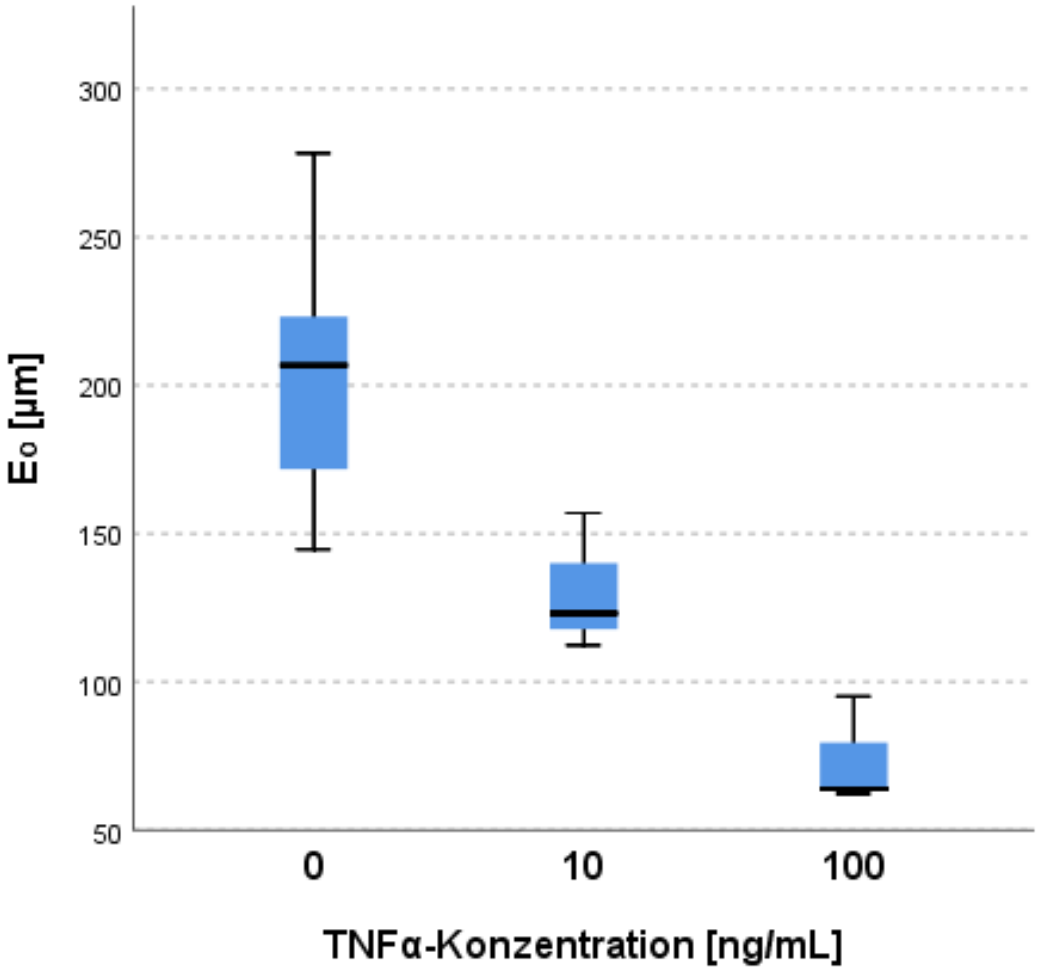

Abbildung 27: E_0-Werte [µm] der Track Lengths für die verschiedenen Konzentrationen von TNFα

Sample 1-Sample 2	Korr. Sig.[a]
100-10	1,000
100-0	,008
10-0	,159

Tabelle 12: statistische Vergleiche der E_0-Werte der Track Lengths für die verschiedenen TNFα-Konzentrationen [ng/mL]

3.3. Ergebnisse: Granulozyten unter Zugabe von Nimodipin und Methanol

Bei den Versuchen zur Testung von Granulozytenfunktionalität unter Einfluss von Nimodipin und Methanol kam sowohl FKS als auch Humanplasma zum Einsatz. Die Versuche mit FKS enthielten dabei ausschließlich dem Gefrierschrank entnommenes und aufgetautes FKS, sodass die erhaltenen Werte nicht mit denen von frisch angesetztem FKS verglichen werden können. Allerdings lässt sich ein Vergleich zur Kontrollgruppe mit altem FKS ohne Zugabe von Nimodipin und Methanol ziehen.

3.3.1 ROS-Produktion und NETosis

Die Auswertung der farbspezifischen Ergebnisse erfolgte mit Fokus auf die Versuchsreihen mit FKS, wie folgende Darstellung (Abbildung 28, Tabelle 13) zeigt.

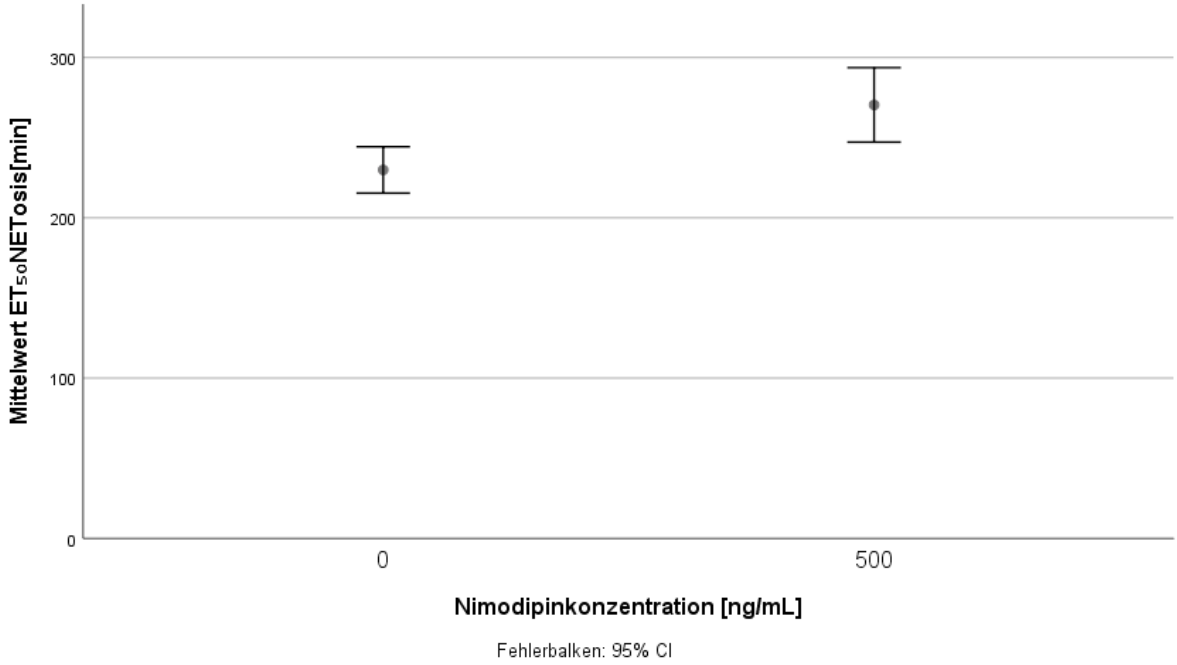

Abbildung 28: Mittelwerte der ET_{50}-Werte für die NETosis in Abhängigkeit von der Nimodipinkonzentration (in FKS1,7%-Medium)

Nimodipinkonz. [ng/mL]	N	N ausgeschlossene Fälle	Mittelwert	Std.-Abweichung	p-Wert	Ausschlussgrund
0	6	1	230	13.8	0.005	ET_{50}NETosis > 400
500	7	1	270	25.1		ET_{50}NETosis > 400

Tabelle 13: statistische Angaben zu den Mittelwerten der ET_{50}NETosis-Werte in Abhängigkeit von der Nimodipinkonzentration [ng/mL]

Der Mittelwert für den ET_{50}-NETosis-Wert für Granulozyten, welche nicht mit Nimodipin versetzt wurden, liegt bei 230 Minuten. Zellen, die eine Zugabe von 500ng/mL Nimodipin erfuhren, zeigen einen signifikant niedrigeren Mittelwert von 270 Minuten (p=0.005).

3.3.2 Migration

Bei Auswertung der Migration wurden die Testreihen mit Nimodipin respektive Methanol sowohl in 1,7% FKS als auch in 1,7% Humanplasma beachtet. Abbildung 29 gibt die Ergebnisse wieder.

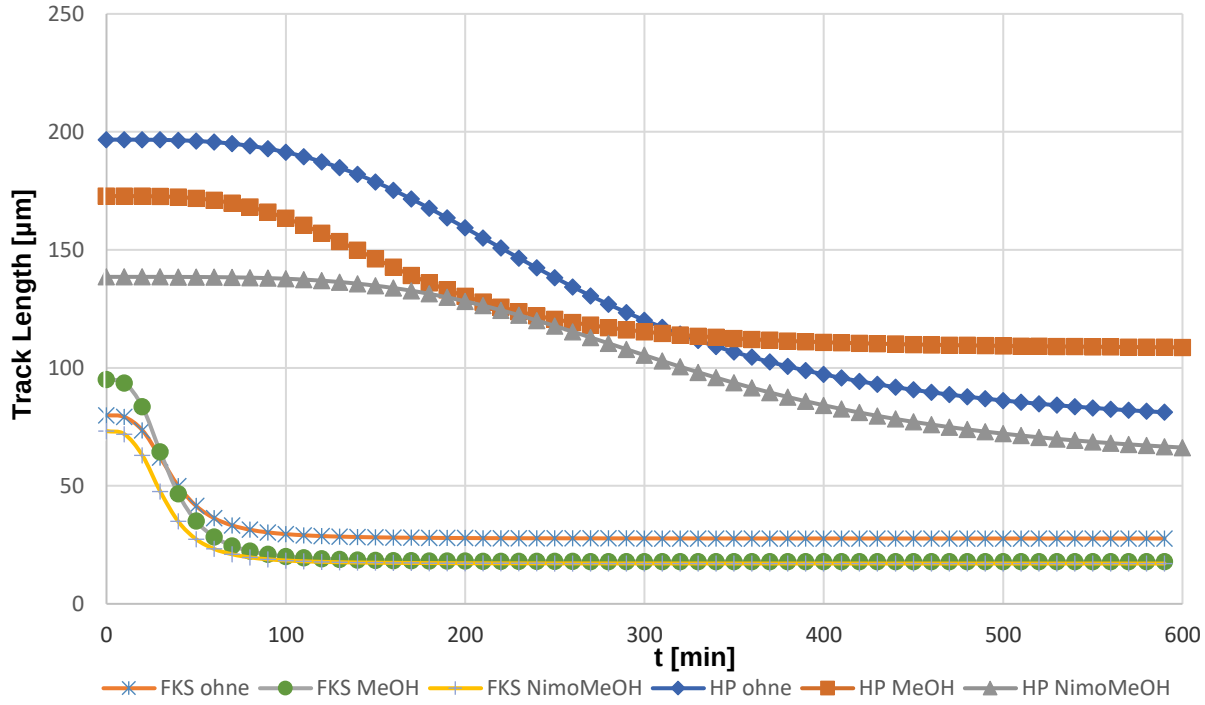

Abbildung 29: Track Length der PMNs in Abhängigkeit von der Zeit für die verschiedenen eingesetzten Medium-Parameter

Die aus obiger Abbildung ermittelten ET_{50}-Werte für die Migrationsstrecken der PMNs betragen für 1,7% aufgetautes FKS ohne Zusätze 36 Minuten. Mit Methanol liegt der Median bei 34 Minuten, mit Nimodipin und Methanol bei 31 Minuten.

In Humanplasma zeigt sich ein medianer ET_{50}-Migrationswert ohne Zusätze bei 258 Minuten. Mit zusätzlichem Methanol liegt dieser bei 166 Minuten, bei Nimodipin mit Methanol bei 326 Minuten.

Die ET_{50}-Migrationswerte sowie die E_0-Werte in aufgetautem 1,7% FKS wurden auf Normalverteilung getestet. Die Gruppen gliedern sich in die Kontrolle und in die Testreihen mit Methanol und Nimodipin in Methanol gelöst, welche zusammengefasst wurden.

Dabei konnte weder für die ET_{50}-Migrationswerte noch für die E_0-Werte für die Migration eine Normalverteilung nachgewiesen werden. Beim anschließend

durchgeführten Mann-Whitney-U-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, weder beim ET_{50}-Migrationswert (p=0,065) noch beim E_0-Wert für die Migration (p=0,295), festgestellt werden. Abbildung 30 veranschaulicht dieses Ergebnis.

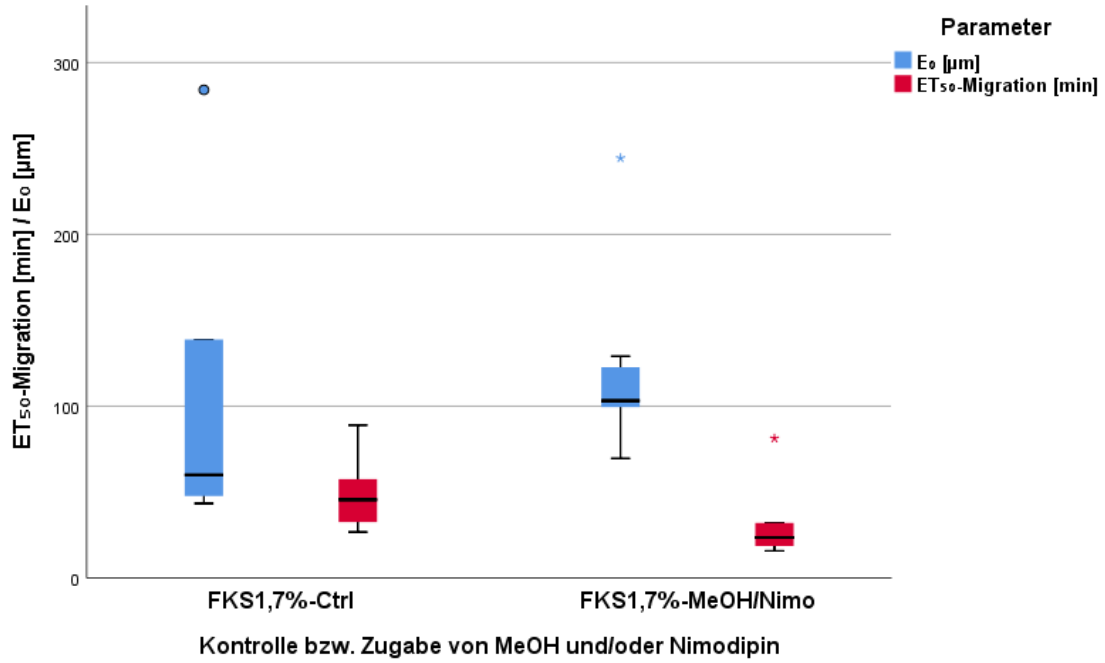

Abbildung 30: Migrationsparameter unter den verschiedenen Bedingungen in FKS1,7% bei der Testung von Nimodipin

Auch die ET_{50}-Migrationswerte sowie die E_0-Werte in 1,7% Humanplasma wurden auf Normalverteilung getestet. Die Gruppen gliedern sich in die Kontrolle und in die Testreihen mit Methanol und Nimodipin in Methanol gelöst, welche zusammengefasst wurden.

Für die ET_{50}-Migrationswerte und die E_0-Werte für die Migration lag jeweils keine Normalverteilung vor. Im Zuge der anschließenden Testung nach Mann-Whitney-U konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, weder beim ET_{50}-Migrationswert (p=0,661) noch beim E_0-Wert für die Migration (p=0,583), festgestellt werden. Dieses Ergebnis wird durch Abbildung 31 dargestellt.

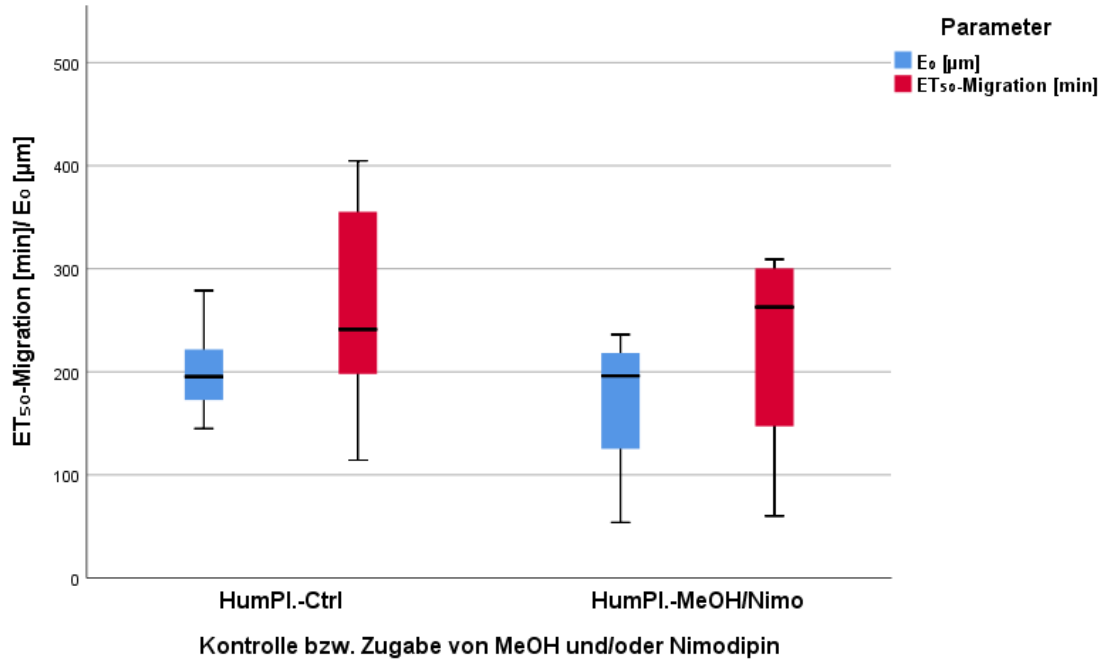

Abbildung 31: Migrationsparameter unter den verschiedenen Bedingungen in Humanplasma1,7% bei der Testung von Nimodipin

3.4. Ergebnisse: Granulozyten unter Zugabe von Dexamethason und DMSO

Auch die Versuche mit Dexamethason und DMSO wurden in 1,7% FKS, diesmal in frischem Ansatz, und 1,7% Humanplasma durchgeführt.

3.4.1 ROS-Produktion und NETosis

Die ET_{50}-Migration-Medianwerte, die in Abbildung 32 und Tabelle 14 dargestellt werden, stammen aus den Versuchen in FKS. ET_{50}-Werte über 400 wurden dabei ausgeschlossen, da diese außerhalb des Beobachtungszeitraums liegen.

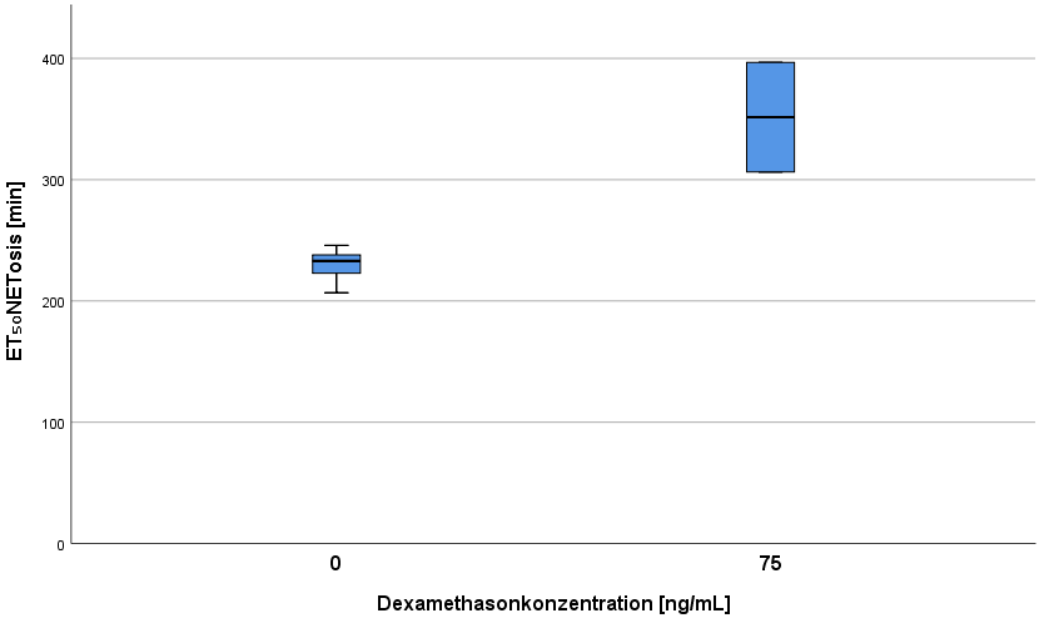

Abbildung 32: ET_{50}-Werte der NETosis der PMNs abhängig von der DMSO-Konzentration aufgeteilt nach der Dexamethason-Konzentration (in 1,7%FKS)

Dexamethason -konz. [ng/mL]	N	N ausgeschlossene Fälle	Median	Minimum	Maximum	Ausschlussgrund
0	6	1	233	207	246	ET_{50}NETosis > 400
75	2	1	351	306	397	ET_{50}NETosis > 400

Tabelle 14: statistische Angaben zu den Medianen der ET_{50}NETosis-Werte in Abhängigkeit von der Dexamethasonkonzentration [ng/mL]

Für die PMNs ohne Zusatz von Dexamethason in 1,7%FKS-Nährmedium ergibt sich ein medianer ET_{50}-Wert für die NETosis von 233 Minuten. Dabei beträgt die Fallzahl nach Wegfall eines Falles 6. Mit zusätzlichem Dexamethason liegt er bei 351 Minuten. Die Fallzahl beschränkt sich nach einem ausgeschlossenen Fall auf 2. Daher wurde keine Normalverteilung angenommen. Der daraufhin durchgeführte Vergleich der Mediane der beiden Gruppen ergab keine statistisch signifikante Unterscheidung der Gruppen (p = 0,071).

3.4.2 Migration

Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Dexamethason und DMSO für die Migration.

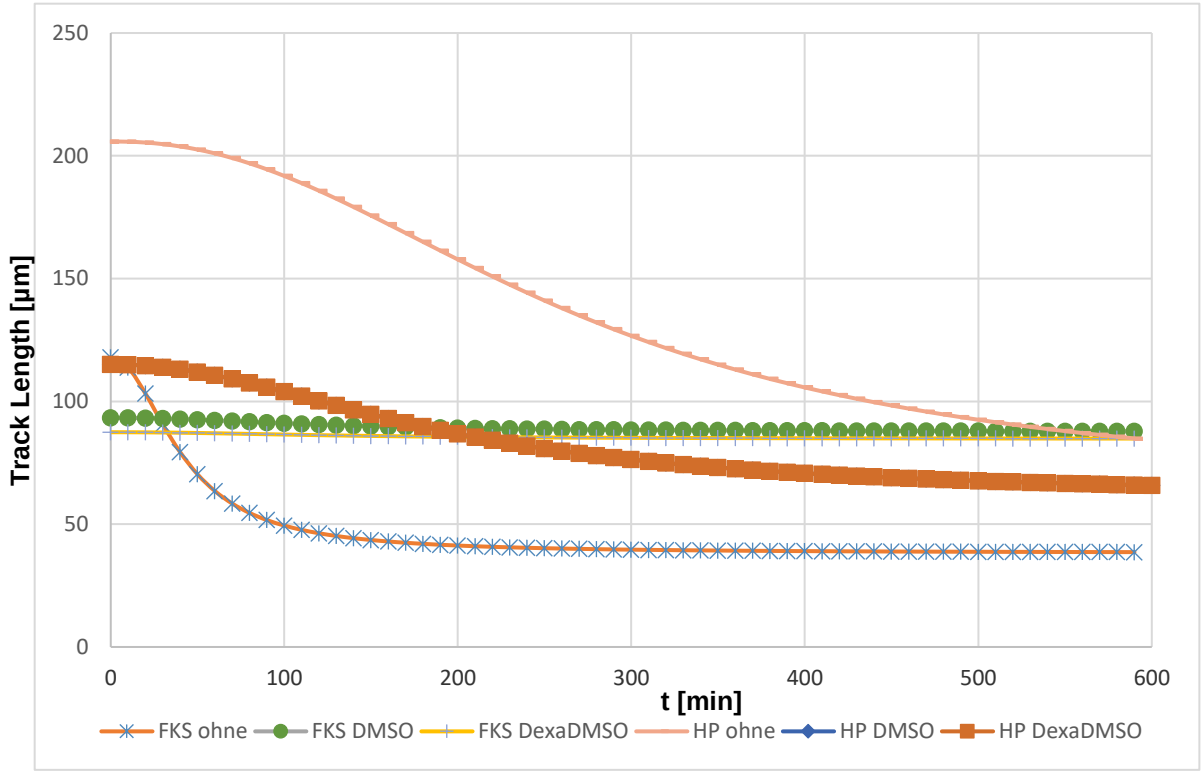

Abbildung 33: Track Length in Abhängigkeit von der Zeit für die verschiedenen eingesetzten Mediumparameter

Der Median der ET_{50}-Werte für Neutrophile bei 1,7%FKS ohne Zusätze liegt bei 41 Minuten. Mit DMSO in 1,7% FKS kommt man auf 124 Minuten, mit Dexamethason auf 133 Minuten. In Humanplasma ergibt sich ohne Zusätze ein Median von 271 Minuten, mit DMSO von 281 Minuten. Bei Zugabe von Dexamethason beträgt der mediane ET-50-Wert 190 Minuten.

Die ET_{50}-Migrationswerte sowie die E_0-Werte in frisch angesetztem 1,7% FKS wurden auf Normalverteilung getestet. Die Gruppen gliedern sich in die Kontrolle und in die Testreihen mit DMSO und Dexamethason in DMSO gelöst, welche zusammengefasst wurden. Die statistischen Berechnungen für diese Werte ergaben keine Normalverteilung. Im Rahmen der anschließenden Testung nach Mann-Whitney-U konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, weder beim ET_{50}-Migrationswert (p=0,283) noch beim E_0-Wert für die Migration (p=0,503), festgestellt werden. In Abbildung 34 wird dieses Ergebnis veranschaulicht.

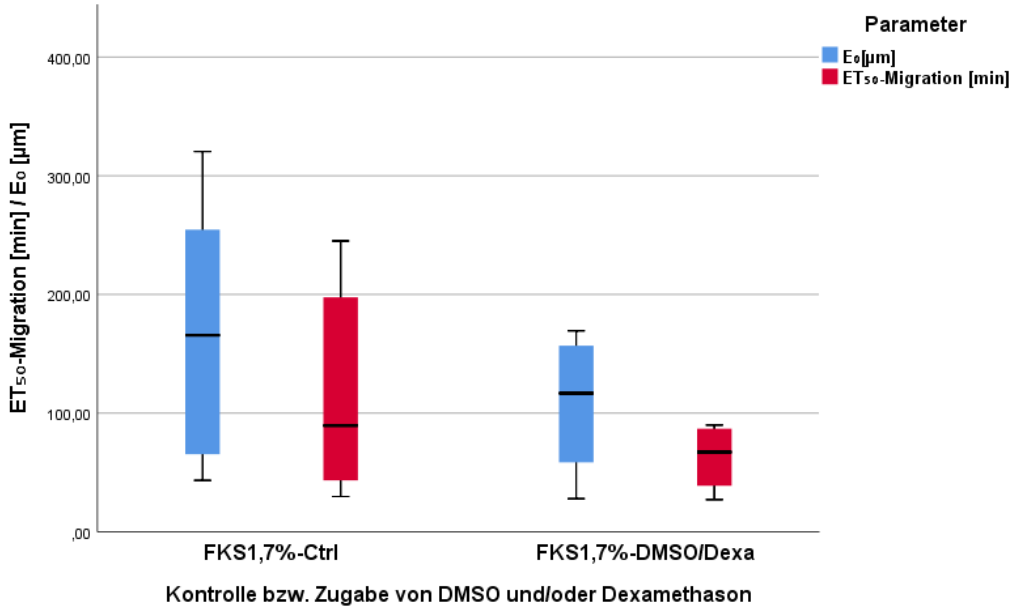

Abbildung 34: Migrationsparameter unter den verschiedenen Bedingungen in FKS1,7% bei der Testung von Dexamethason

Die ET_{50}-Migrationswerte sowie die E_0-Werte in Humanplasma 1,7% wurden auf Normalverteilung getestet. Die Gruppen gliedern sich in die Kontrolle und in die Testreihen mit DMSO und Dexamethason in DMSO gelöst, welche zusammengefasst wurden.

Weder für die ET_{50}-Migrationswerte noch für die E_0-Werte war eine Normalverteilung nachweisbar. Im Kontext des anschließend durchgeführten Mann-Whitney-U-Tests konnte für den ET_{50}-Migrationswert kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (p=0,066).

Beim E_0-Wert für die Migration wurde ebenfalls keine statistisch signifikante Unterscheidung nachgewiesen (p=1,000).

In Abbildung 35 wird dieses Ergebnis dargestellt.

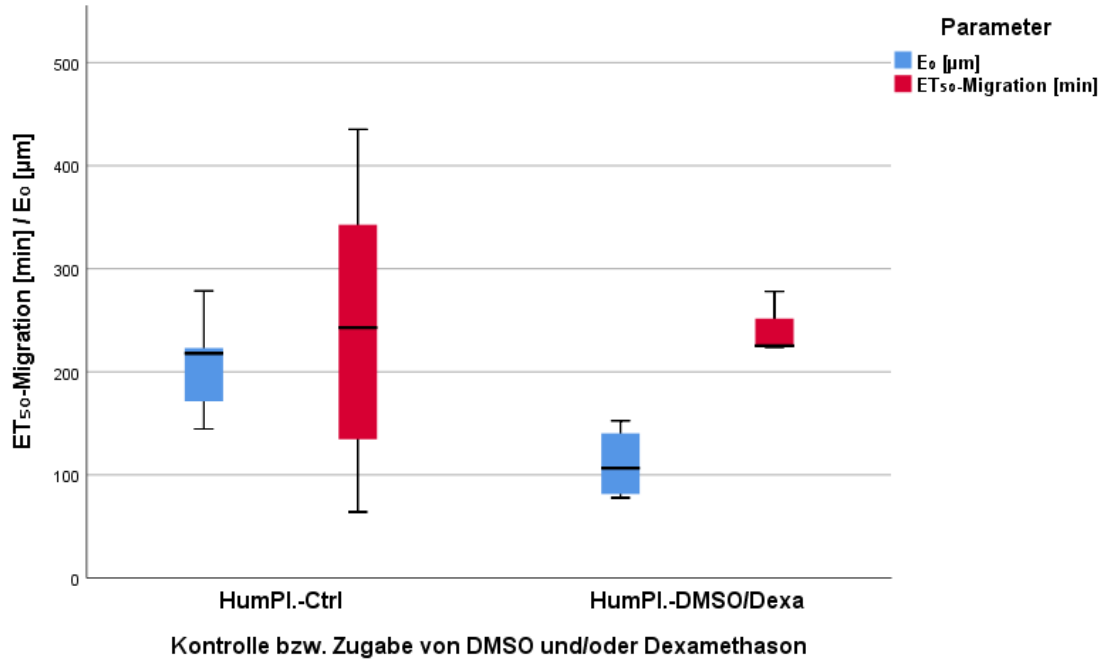

Abbildung 35: Migrationsparameter unter den verschiedenen Bedingungen in Humanplasma1,7% bei der Testung von Dexamethason

4. Diskussion

In den folgenden Unterkapiteln sollen die eben genannten Ergebnisse eingeordnet werden. Vergleiche mit der existierenden Literatur und damit dem Stand der Forschung werden angestellt.

Damit soll die Weiterentwicklung der Methode des *live-cell-imaging* beurteilt werden, genauso wie der Einfluss der TNFα-Aktivierung auf die PMNs.

Mögliche Effekte des Calciumantagonisten Nimodipin sowie des Glucocorticoids Dexamethason auf die Neutrophilen Granulozyten und damit verbundene Angriffspunkte bei der Suche nach Granulozyten-basierten Therapien sollen diskutiert werden.

4.1. FKS in verschiedenen Konzentrationen versus Humanplasma

Der Medianwert für die ET_{50}NETosis-Werte in Humanplasma liegt bei circa 854 Minuten. Allerdings muss dieser Wert mit äußerster Vorsicht betrachtet werden. Realistisch betrachtet liegt dieser weit außerhalb der Beobachtungszeitraums von 20 Stunden aufgrund der auch nach 20 Stunden immer noch recht aktiven Migration der Neutrophilen Granulozyten.

Der ET_{50}-NETosis-Wert für 1,7%FKS liegt in etwa bei 246 Minuten. Doblinger et al. fanden in ihrer Studie mit einem medianen ET_{50}-NETosis-Wert für 1,7%FKS von 241 Minuten nahezu dasselbe Resultat [3]. Der Wert für 10%FKS, der bei circa 496 Minuten liegt, fügt sich gut ins Bild. Diese Ergebnisse sprechen für eine lebenserhaltende Funktion des Mediums FKS für die Granulozyten, welche von der Konzentration des eingesetzten FKS abhängt.

Die Analyse der t_{max}ROS-Werte ist durchaus unter Vorbehalt zu betrachten. Viele der mithilfe von Excel erstellten Kurven für die t_{max}ROS-Produktion über die Zeit zeigten keinen Verlauf mit einem genau definierbaren Peak. Stattdessen zeigten viele der Graphen ein Plateau, aus welchem kein Maximum abzulesen war.

Daher wurde zur Analyse der ROS-Produktion der Parameter der *„area under the curve“ (AUC)* eingeführt.

Dieser zeigt für FKS1,7% und FKS10% eine ziemlich große Ähnlichkeit mit einem Betrag von 256 bzw. 303 µm². Für Humanplasma weicht dieser Wert mit 35,2 µm² stark nach unten ab. Dies fügt sich aufgrund der lange andauernden Migrationsfunktion der Granulozyten in diesem Medium gut ins Bild. Die chemotaktische Migration der PMNs wird nicht durch eine Aktivierung und infolge durch ROS-Produktion und NETosis inhibiert.

Ins Auge springt die massiv unterschiedliche Wirkung von altem, eingefrorenem FKS und frisch angesetztem FKS. Dies ist möglicherweise die Folge einer Verunreinigung des FKS durch bakteriellen Befall, wie Abbildung 36 zeigt.

Höhere Konzentration von FKS hebt den ET_{50}-Wert der Track Length an. Er nähert sich dabei dem von Humanplasma an. Offenbar scheint die Nährstoffversorgung der Granulozyten in höher konzentriertem FKS verbessert. Statistisch signifikante Unterschiede zeigen sich zwischen dem aufgetauten FKS1,7% und FKS10% ($p=0,012$) sowie zwischen dem aufgetauten FKS1,7% und Humanplasma1,7% ($p>0,001$). Die ET_{50}-Werte für FKS10% von 235 Minuten und Humanplasma1,7% von 255 Minuten in signifikantem Unterschied zum Wert für aufgetautes FKS1,7% (39 Minuten) untermauern die These der verbesserten Nährstoffversorgung der Neutrophilen im Versuchsansatz.

Die E_0-Werte, die sich von aufgetautem zu frischem FKS1,7% ($p=0,011$) und von aufgetautem FKS1,7% zu Humanplasma1,7% ($p<0,001$) signifikant unterschieden, bedeuten eine initial höhere mediane Track Length bei frischem FKS1,7% beziehungsweise Humanplasma1,7%. Dies lässt ebenso auf die verbesserte Ernährungssituation der PMNs schließen.

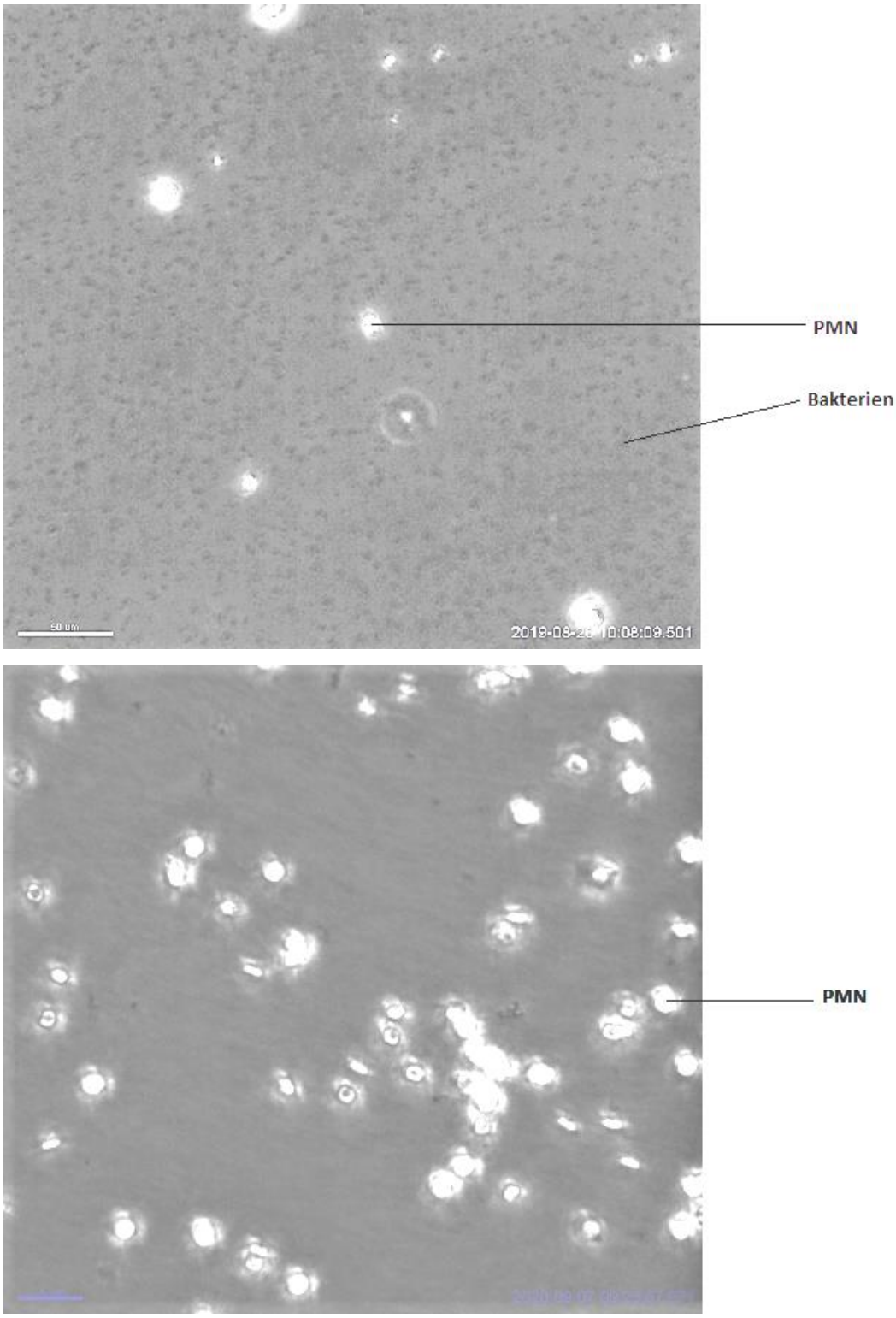

Abbildung 36: oben ein Kanal mit offensichtlichem Bakterienbefall, unten ein nicht durch Bakterien verunreinigter Kanal

4.2. Priming mit TNFα

Die ET_{50}-Werte für die Migration von Granulozyten in humanem Blutplasma nach TNFα-Priming lagen niedriger als für Granulozyten, die nicht mit TNFα vorbehandelt wurden. Beziehungsweise lagen diese überhaupt im bestimmbaren Bereich. Dies spricht für eine Aktivierung der Granulozyten, abhängig von der eingesetzten TNFα-Konzentration. Je höher konzentriert die Aktivierungssubstanz, desto früher zeigt sich der ET_{50}-Migrationswert.

Zwar konnte zwischen den ET_{50}-Migrationswerten kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, jedoch unterscheidet sich der E_0-Wert für die Track Length der TNFα-Konzentration 100ng/mL signifikant vom E_0-Wert der Kontrollgruppe ohne Zugabe von TNFα (p=0,008). Die initiale Track Length der Granulozyten nimmt mit zunehmender Konzentration des eingesetzten TNFα ab.

Dafür spricht auch der frühere NETosis-Zeitpunkt der mit 10ng/mL TNFα vorbehandelten Neutrophilen, welcher mit 627 Minuten wesentlich vor dem der nicht aktivierten Granulozyten liegt (854 Minuten). Für die mit 100ng/mL TNFα vorbehandelten Granulozyten lag dieser Wert bei 609 Minuten.

Hierbei gibt es eine Überschneidung mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen. Nach Khandpur et al. werden die Granulozyten aktiviert und die NETosis wird durch das Zytokin TNFα induziert [48]. Arokiasamy et al. haben gezeigt, dass TNFα auch einen großen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Neutrophilen Granulozyten zeigt. Die PMNs werden geradezu „dirigiert“ [49].

Weitere Versuchsaufbauten in diesem Bereich zur Erhöhung der Fallzahl und zum noch tiefgreifenderen Verständnis der Rolle von TNFα in diesem System sind sicherlich lohnenswert.

4.3. Nimodipin und Methanol

Bei Betrachtung der ET_{50}-NETosis-Mittelwerte stach der Unterschied der Werte für Granulozyten in FKS ins Auge. Für den Ansatz ohne Nimodipin lag der Wert bei 230 Minuten, während er für den Ansatz mit 500ng/mL Nimodipin bei 270 Minuten und daher signifikant höher lag. Dies spricht für einen lebenserhaltenden Effekt des Medikaments auf die Zellen.

In Humanplasma zeigte sich ein früheres Migrations-Halbmaximum, wenn kein zusätzliches Nimodipin zugegeben wurde. Wenngleich kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte, verzögert Nimodipin den ET_{50}-Migrationswert tendenziell.

Shima et al. bestätigen diese Annahme und geben als mögliche Begründung für die spätere Aktivierung der Granulozyten die Unterschiede zwischen den verschiedenen Enantiomeren der Calciumkanal-Blocker an [50]. Auch Haga et al. sahen bereits in ihrer Studie von 1996 einen inhibitorischen Effekt von Nimodipin auf Neutrophile Granulozyten [30].

Bezogen auf die Behandlung von subarachnoidalen Blutungen mit Nimodipin stellt sich noch die Frage nach der Nutzbarkeit dieser Ergebnisse für therapeutische Zwecke. Dabei spielt neben der Dosis auch die Dauer der Nimodipingabe eine bedeutsame Rolle. Sokolowski et al. haben gezeigt, dass Nimodipin das Outcome von Patienten mit stattgehabter SAB wesentlich verbessert hat. Laut dieser Studie könnte sich weitere Forschung zur Klärung dieses Sachverhalts und zur genaueren Detektion von Faktoren, die eine Vorhersage über die notwendige Nimodipingabe zur Therapie ermöglichen, als sinnvoll erweisen [51].

Chou et al. und Bacigaluppi et al. untersuchten jeweils in ihren Studien den möglichen Einfluss von Entzündungsprozessen als treibende Kraft für die Entstehung von zerebralen Vasospasmen nach einer SAB. Dabei wurden die Konzentrationen von zirkulierenden Immunzellen, unter anderem auch Neutrophilen Granulozyten, bei Patienten mit auftretenden Vasospasmen und bei Patienten ohne diese Komplikation ermittelt. In beiden Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Konzentration an zirkulierenden PMNs und dem Auftreten von Vasospasmen sowie dem Outcome von Patienten mit SAB aufgezeigt. Eine erhöhte PMN-Konzentration ist demnach assoziiert mit konsekutiven Vasospasmen und verschlechtertem Outcome. Die Konzentration von NETotischen Neutrophilen Granulozyten bei Patienten, die diese Komplikation erlitten, unterschied sich dabei statistisch signifikant von derjenigen bei Patienten ohne Auftreten von zerebralen Vasospasmen nach einer SAB [52,53].

Eine gezielte inhibitorische Beeinflussung der Neutrophilen Granulozyten durch den Calciumkanalblocker Nimodipin ist somit ein attraktiver Ansatzpunkt zur Behandlung von Patienten mit diesem Krankheitsbild und verdient infolgedessen ein Augenmerk bei der weiteren Forschung in diesem Bereich.

4.4. Dexamethason und DMSO

Die ET_{50}-Migrations-Medianwerte der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Dexamethason/DMSO unterscheiden sich nicht statistisch signifikant. Daher kann in diesem Zusammenhang von keinem nennenswerten Effekt des Medikaments auf die Granulozyten ausgegangen werden.

Die ET_{50}-NETosis-Mediane zeigen einen erkennbaren Unterschied. Der mediane ET_{50}-NETosis-Wert für die Granulozyten, die mit Dexamethason versetzt wurden, lag mit 351 Minuten weitaus höher als für Granulozyten aus der Kontrollgruppe (233 Minuten).

Dies gibt Anlass zur Annahme, dass das Glucocorticoid Dexamethason die PMNs beeinflusst. Die Lebensdauer der Zellen wird durch das Glucocorticoid verlängert.

Hiemstra et al. bestätigen diese Annahme in ihrer Studie aus dem Jahr 2017, in welcher ebenfalls eine verspätete Apoptose der Granulozyten nach Behandlung mit Dexamethason nachgewiesen werden konnte [54]. Dasselbe Bild zeigen Erkenntnisse von Liles et al. sowie von Kato et al., die ebenso einen protektiven Effekt von Dexamethason auf humane PMNs durch verzögerte Apoptose nachweisen konnten [55,56].

Im Zuge der Behandlung von Patienten mit Covid-19 mit dem Glucocorticoid Dexamethason wirft sich die Frage nach der Anwendbarkeit dieser Ergebnisse auf. Eine Dexamethasongabe reduziert nach Tomazini et al. die Sterblichkeitsrate sowie die notwendige Beatmungsdauer von Covid-19-Patienten [57].

Laut der Studie von Shimizu et al. liegt ein möglicher Ansatzpunkt für eine gezielte Therapie im Verständnis der Immunpathogenese der durch das SARS-CoV-2 ausgelösten Krankheit und einer daraus entwickelten Strategie.

Nach Shimizu et al. werden im Laufe der Immunantwort auf das Virus unter anderem Neutrophile rekrutiert und somit durch das angeborene Immunsystem bei 80% der infizierten Patienten das Virus eliminiert. Bei den verbleibenden infizierten Patienten kommt es zur Virusreplikation und somit zu einer erneuten exzessiven Aktivierung des angeborenen Immunsystems, unter anderem von PMNs. Dies führt zu einer überschießenden Reaktion des menschlichen Organismus und dabei auch zu moderaten bis schweren Lungenschädigungen [58].

Diese Schädigungen werden laut Lee et al. auch durch die NETosis der Neutrophilen Granulozyten hervorgerufen. Ein stark aktiviertes angeborenes Immunsystem, wie es bei einer Infektion mit SARS-CoV-2 nachweisbar ist, bedingt ein erhöhtes Vorkommen der *neutrophil extracellular traps*. Ein Monitoring sowie eine Beeinflussung dieser Anhäufung von NETs bei Covid-19-Patienten stellt demnach eine Option zur Diagnose und Therapie dieses Krankheitsbildes dar. Eine gesteuerte, herabgesetzte NETosis ist nach Lee et al. zweckmäßig zur Entwicklung einer medikamentösen Therapie [59].

Die in der vorliegenden Arbeit gesehene verlängerte Lebensdauer der Neutrophilen Granulozyten durch Dexamethason, die mit einer Reduktion der NETosis einhergeht, gibt Anlass zur Annahme, dass das Glucocorticoid über diesen Mechanismus wirkt. Zur Untermauerung dieser Annahme könnte sich weitere Forschung in diesem Bereich als lohnenswert herausstellen.

5. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit der Erkenntnis frisch angesetztes FKS beziehungsweise Humanplasma zum Reaktionsansatz hinzuzugeben, die Methodik der Analyse von Granulozytenfunktionen maßgeblich verbessert wurde. Der lebenserhaltende Effekt auf die Granulozyten bei frischem FKS und Humanplasma erlaubt eine unverfälschtere Beurteilung der untersuchten Parameter, besonders im Hinblick auf die Analyse der Migration. Bei den Versuchen mit Humanplasma konnte jedoch die Auswertung der Daten der NETosis kein definitives Ergebnis bringen. Wesentlich längere Beobachtungszeiträume bei der Untersuchung der Granulozyten wären hierzu notwendig.

Eine Bereicherung für die Analyse der ROS-Produktion stellt der zusätzlich zum t_{max}-ROS-Wert eingeführte Parameter *„area under the curve“ (AUC)* dar, welcher auch Aussagen über das Verhalten der Granulozyten bezüglich ihrer ROS-Produktion erlaubt, wenn diese keinen exakt definierbaren Peak zeigt.

Mit den außerdem neu eigeführten Parametern ET_{50}-Migration und E_0-Migration konnte ein neuer Aspekt für die Analyse der Migrationsaktivität der Granulozyten gewonnen werden. Der Parameter E_0-Migration erlaubt Aussagen über die initiale Beeinflussung der Granulozyten durch verschiedene Zusätze zum Reaktionsansatz im Hinblick auf ihre Migrationsaktivität. Mithilfe des ET_{50}-Migrationsparameters kann die Veränderung der Migrationsaktivität von Neutrophilen über die Länge des Beobachtungszeitraums beurteilt und somit zwischen unterschiedlichen Bedingungen im Reaktionsansatz verglichen werden.

Der Einfluss von TNFα auf die Funktionalität von Neutrophilen wurde zudem deutlich gezeigt. Die Zellen gehen wesentlich früher in die NETosis. Weitere Forschung in diesem Bereich könnte sich als durchaus sinnvoll erweisen.

Aus der Versuchsreihe mit Nimodipin lässt sich ein inhibitorischer Effekt des Medikaments auf die Neutrophilen Granulozyten postulieren. Entzündungsreaktionen werden also vermindert, was ein geeigneter Ansatzpunkt für Granulozyten-basierte Therapien sein kann. Weitere Untersuchungen sind als zielführend zu erachten.

Bezüglich Dexamethason konnte ebenso ein inhibitorischer Effekt auf PMNs vermutet werden. Zukünftige Forschungen in diesem Zusammenhang dürfen auf vielversprechende Erkenntnisse hoffen lassen.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bestandteile der menschlichen Immunabwehr ..... - 10 -
Abbildung 2: Emigration der Leukozyten; eigene Darstellung nach Lüllmann-Rauch R. et al., Taschenlehrbuch Histologie, 5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 2015 ... - 12 -
Abbildung 3: schematische Darstellung der Lokalisation einer Subarachnoidalblutung (SAB), eigene Darstellung nach Aumüller G., Duale Reihe Anatomie, 4. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 2017 ..... - 15 -
Abbildung 4: Circulus arteriosus cerebri („Willisii“), eigene Darstellng nach Aumüller G., Duale Reihe Anatomie, 4. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 2017 ..... - 16 -
Abbildung 5: Eine Illustration des Coronavirus (SARS-CoV-2) ..... - 18 -
Abbildung 6: Studiendesign ..... - 21 -
Abbildung 7: Versuche zum Vergleich FKS mit Humanplasma sowie mit und ohne TNFalpha-Priming ..... - 22 -
Abbildung 8: Versuche mit Nimodipin bzw. Methanol ..... - 23 -
Abbildung 9: Versuche mit Dexamethason bzw. DMSO ..... - 24 -
Abbildung 10: Schema der Verdünnungen von Nimodipin bzw. Methanol ..... - 29 -
Abbildung 11: Schema der Verdünnungen von Dexamethason bzw. DMSO ..... - 30 -
Abbildung 12: Blutprobe mit Lymphospin/Leukospin vor und nach der Zentrifugierung ..... - 31 -
Abbildung 13: Befüllen der Ibidi-Slide, https://ibidi.com/img/cms/applications/chemotaxis/CH_workflow_01_quer.jpg..... - 33 -
Abbildung 14: Schema der befüllten Reservoire ..... - 34 -
Abbildung 15: Systematik der Auswertung der Mikroskopversuche ..... - 35 -
Abbildung 16: Messmethoden der Mikroskopversuche ..... - 36 -
Abbildung 17: Zeitpunkt maximaler ROS-Produktion am Maximum der Fluoreszenzdetektion ..... - 37 -
Abbildung 18: ET50-Wert als Zeitpunkt halbmaximaler DNA-(NETosis) bzw. MPO-Freisetzung ..... - 39 -
Abbildung 19: ET_{50}-Werte der NETosis in Abhängigkeit zur FKS- bzw. Humanplasma-Konzentration ..... - 42 -
Abbildung 20: Mediane der t_{max}ROS-Werte in Abhängigkeit von der FKS- bzw. Humanplasma-Konzentration ..... - 43 -

Abbildung 21: Mediane der AUC in Abhängigkeit von der FKS- bzw. Humanplasma-Konzentration ..... - 44 -
Abbildung 22: mediane Track Length [µm] in Abhängigkeit von der Zeit für die verschiedenen eingesetzten Mediumparameter ..... - 45 -
Abbildung 23: ET50-Migrationswerte [min] für die einzelnen Mediumparameter .. - 46 -
Abbildung 24: E_0-Werte [µm] der Track Lengths für die einzelnen Mediumparameter - 47 -
Abbildung 25: Track Length in Abhängigkeit von der zum Priming eingesetzten TNFalpha-Konzentration..... - 48 -
Abbildung 26: ET_{50}-Migrationswerte [min] der einzelnen Konzentrationen von TNFα. - 49 -
Abbildung 27: E_0-Werte [µm] der Track Lengths für die verschiedenen Konzentrationen von TNFα..... - 50 -
Abbildung 28: Mittelwerte der ET_{50}-Werte für die NETosis in Abhängigkeit von der Nimodipinkonzentration (in FKS1,7%-Medium) ..... - 51 -
Abbildung 29: Track Length der PMNs in Abhängigkeit von der Zeit für die verschiedenen eingesetzten Medium-Parameter ..... - 52 -
Abbildung 30: Migrationsparameter unter den verschiedenen Bedingungen in FKS1,7% bei der Testung von Nimodipin ..... - 53 -
Abbildung 31: Migrationsparameter unter den verschiedenen Bedingungen in Humanplasma1,7% bei der Testung von Nimodipin ..... - 54 -
Abbildung 32: ET50-Werte der NETosis der PMNs abhängig von der DMSO-Konzentration aufgeteilt nach der Dexamethason-Konzentration (in 1,7%FKS)... - 55 -
Abbildung 33: Track Length in Abhängigkeit von der Zeit für die verschiedenen eingesetzten Mediumparameter ..... - 56 -
Abbildung 34: Migrationsparameter unter den verschiedenen Bedingungen in FKS1,7% bei der Testung von Dexamethason ..... - 57 -
Abbildung 35: Migrationsparameter unter den verschiedenen Bedingungen in Humanplasma1,7% bei der Testung von Dexamethason ..... - 58 -
Abbildung 36: oben ein Kanal mit offensichtlichem Bakterienbefall, unten ein nicht durch Bakterien verunreinigter Kanal ..... - 61 -

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Materialien und Geräte ..... - 26 -
Tabelle 2: Materialien zur Granulozyten-Isolierung ..... - 26 -
Tabelle 3: Materialien zur Mikroskopie ..... - 28 -
Tabelle 4: Bedingungen in der Klima-Kammer ..... - 34 -
Tabelle 5: Ausschlusskriterien zur Verminderung der Einflussnahme durch Störfaktoren ..... - 36 -
Tabelle 6: Migrationsparameter zur Auswertung ..... - 40 -
Tabelle 7: statistischer Vergleich der einzelnen Mediumparameter der ET_{50}-Werte für die NETosis [min] ..... - 43 -
Tabelle 8: statistischer Vergleich der einzelnen Mediumparameter der Medianwerte für t_{max}ROS [min] ..... - 44 -
Tabelle 9:statistischer Vergleich der einzelnen Mediumparameter der Medianwerte für AUC/Zelle [µm²] ..... - 44 -
Tabelle 10: statistische Vergleiche der ET_{50}-Migrationswerte [min] der einzelnen Mediumparameter ..... - 46 -
Tabelle 11: statistische Vergleiche der E_0-Werte [µm] der einzelnen Mediumparameter ..... - 47 -
Tabelle 12: statistische Vergleiche der E_0-Werte der Track Lengths für die verschiedenen TNFα-Konzentrationen [ng/mL] ..... - 50 -
Tabelle 13: statistische Angaben zu den Mittelwerten der ET_{50}NETosis-Werte in Abhängigkeit von der Nimodipinkonzentration [ng/mL] ..... - 51 -
Tabelle 14: statistische Angaben zu den Medianen der ET_{50}NETosis-Werte in Abhängigkeit von der Dexamethasonkonzentration [ng/mL] ..... - 55 -

6.3. Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der ET_{50}-Werte der NETosis ..... - 39 -
Formel 2: Berechnung der ET_{50}-Werte für die Mediane der Track Length ..... - 40 -

6.4. Literatur

1. Pai D, Gruber M, Pfaehler SM, 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;2020. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32879894/.
2. 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;16:205873921881917.
3. Doblinger 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;59:2121–2130.
4. Cole R. Live-cell imaging. Cell adhesion & migration 2014;8:452–459.
5. Neubert E, Senger-Sander SN, Manzke VS, Busse J, Polo E, Scheidmann SEF, et al. Serum and Serum Albumin Inhibit in vitro Formation of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). Frontiers in immunology 2019;10:12.
6. Köckritz-Blickwede M von, Chow OA, Nizet V. Fetal calf serum contains heat-stable nucleases that degrade neutrophil extracellular traps. Blood 2009;114:5245–5246.
7. Yin C, Heit B. Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules. Cell and tissue research 2018;371:455–471.
8. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. Physiological reviews 2019;99. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30758246/.
9. Mauer AM, Athens JW, Ashenbrucker H, Cartwright GE, Wintrobe MM. LEUKOKINETIC STUDIES. II. A METHOD FOR LABELING GRANULOCYTES IN VITRO WITH RADIOACTIVE DIISOPROPYLFLUOROPHOSPHATE (DFP). The Journal of clinical investigation 1960;39:1481–1486.
10. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, Boer RJ de, Borghans JAM, et al. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. Blood 2010;116:625–627.
11. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. The Journal of biological chemistry 2006;281:39860–39869.

12. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. Archives of biochemistry and biophysics 2002;397:342–344.
13. Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. Journal of leukocyte biology 2012;92:841–849.
14. Perdomo J, Leung HHL, Ahmadi Z, Yan F, Chong JJH, Passam FH, et al. Neutrophil activation and NETosis are the major drivers of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. Nature communications 2019;10:1322.
15. Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. eLife 2017;6.
16. Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. Biomolecules 2019;9.
17. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Crameri R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β, and TNF-α: Receptors, functions, and roles in diseases. The Journal of allergy and clinical immunology 2016;138:984–1010. Epub 28. August 2016.
18. Idriss HT, Naismith JH. TNF? and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). Microsc. Res. Tech. 2000;50:184–195.
19. Gough P, Myles IA. Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. Frontiers in immunology 2020;11:585880. Epub 25. November 2020.
20. Hasegawa M, Nishii C, Ohashi A, Tomita M, Nakai S, Murakami K, et al. Expression of tumor necrosis factor receptors on granulocytes in patients with myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. Nephron. Clinical practice 2009;113:c222-33. Epub 18. August 2009.
21. Rivadeneyra L, Charó N, Kviatcovsky D, La Barrera S de, Gómez RM, Schattner M. Role of neutrophils in CVB3 infection and viral myocarditis. Journal of molecular and cellular cardiology 2018;125:149–161. Epub 27. Oktober 2018.
22. Hyun Y-M, Hong C-W. Deep insight into neutrophil trafficking in various organs. Journal of leukocyte biology 2017;102:617–629. Epub 21. Juni 2017.

23. Bowles E. Cerebral aneurysm and aneurysmal subarachnoid haemorrhage. Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987) 2014;28:52–59.
24. Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. The Lancet Neurology 2009;8:355–369. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-073l_S1_Subarachnoidalblutung_2012_abgelaufen.pdf.
25. D'Souza S. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. Journal of neurosurgical anesthesiology 2015;27:222–240.
26. Dupont SA, Wijdicks EFM, Lanzino G, Rabinstein AA. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an overview for the practicing neurologist. Seminars in neurology 2010;30:545–554.
27. Frontera JA, Claassen J, Schmidt JM, Wartenberg KE, Temes R, Connolly ES, et al. PREDICTION OF SYMPTOMATIC VASOSPASM AFTER SUBARACHNOID HEMORRHAGETHE MODIFIED FISHER SCALE. Neurosurgery 2006;59:21–27. https://academic.oup.com/neurosurgery/article-pdf/59/1/21/32571305/00006123-200607000-00003.pdf.
28. Connolly ES, Rabinstein AA, Carhuapoma JR, Derdeyn CP, Dion J, Higashida RT, et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/american Stroke Association. Stroke 2012;43:1711–1737.
29. van Gijn J, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. Brain : a journal of neurology 2001;124:249–278.
30. Haga Y, Dumitrescu A, Zhang Y, Stain-Malmgren R, Sjöquist PO. Effects of calcium blockers on the cytosolic calcium, H2O2 production and elastase release in human neutrophils. Pharmacology & toxicology 1996;79:312–317.
31. Kieninger M, Gruber M, Knott I, Dettmer K, Oefner PJ, Bele S, et al. Incidence of Arterial Hypotension in Patients Receiving Peroral or Continuous Intra-arterial Nimodipine After Aneurysmal or Perimesencephalic Subarachnoid Hemorrhage.
32. Esakandari H. A comprehensive review of COVID-19 characteristics. Biol Proced Online 2020. DOI: 10.1186/s12575-020-00128-2.

33. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) as markers of disease severity in COVID-19. medRxiv : the preprint server for health sciences 2020.
34. Li L-Q, Huang T, Wang Y-Q, Wang Z-P, Liang Y, Huang T-B, et al. COVID-19 patients' clinical characteristics, discharge rate, and fatality rate of meta-analysis. Journal of medical virology 2020;92:577–583.
35. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. JAMA 2020;324:782–793.
36. Wu T, Zuo Z, Kang S, Jiang L, Luo X, Xia Z, et al. Multi-organ Dysfunction in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis. Aging and disease 2020;11:874–894.
37. Liu J, Liu S. The management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Journal of medical virology 2020.
38. Perez-Saez J, Lauer SA, Kaiser L, Regard S, Delaporte E, Guessous I, et al. Serology-informed estimates of SARS-COV-2 infection fatality risk in Geneva, Switzerland; 2020.
39. Ledford H. Coronavirus breakthrough: dexamethasone is first drug shown to save lives. Nature 2020;582:469.
40. Horby P, Lim WS, Emberson J, Mafham M, Bell J, Linsell L, et al. Effect of Dexamethasone in Hospitalized Patients with COVID-19: Preliminary Report; 2020.
41. Hussman JP. Cellular and Molecular Pathways of COVID-19 and Potential Points of Therapeutic Intervention. Frontiers in Pharmacology 2020;11.
42. Tomazini BM, Maia IS, Bueno FR, Silva MVAO, Baldassare FP, Costa ELV, et al. COVID-19-associated ARDS treated with DEXamethasone (CoDEX): Study design and rationale for a randomized trial; 2020.
43. Soy M, Keser G, Atagündüz P, Tabak F, Atagündüz I, Kayhan S. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. Clinical rheumatology 2020;39:2085–2094. Epub 30. Mai 2020.
44. Theoharides TC, Conti P. Dexamethasone for COVID-19? Not so fast. Journal of biological regulators and homeostatic agents 2020;34.

45. Alabdullah HA, Fox LK, Gay JM, Barrington GM, Mealey RH. Effects of dexamethasone and Mycoplasma bovis on bovine neutrophil function in vitro. Veterinary immunology and immunopathology 2015;164:67–73.
46. Mahase E. Covid-19: Low dose steroid cuts death in ventilated patients by one third, trial finds. BMJ (Clinical research ed.) 2020;369:m2422.
47. David Scherfgen. Ableitungsrecher. https://www.ableitungsrechner.net/ (accessed 03. November 2020).
48. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. Science translational medicine 2013;5:178ra40.
49. Arokiasamy S, Zakian C, Dilliway J, Wang W, Nourshargh S, Voisin M-B. Endogenous TNFα orchestrates the trafficking of neutrophils into and within lymphatic vessels during acute inflammation. Scientific reports 2017;7:44189.
50. Shima E, Katsube M, Kato T, Kitagawa M, Hato F, Hino M, et al. Calcium channel blockers suppress cytokine-induced activation of human neutrophils. American journal of hypertension 2008;21:78–84.
51. Sokolowski JD, Chen C-J, Soldozy S, Mastorakos P, Burke RM, Nguyen JM, et al. Nimodipine after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Fourteen-day course for patients that meet criteria for early hospital discharge. Clinical Neurology and Neurosurgery 2021;200:106299. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303846720306429.
52. Chou SH-Y, Feske SK, Simmons SL, Konigsberg RGJ, Orzell SC, Marckmann A, et al. Elevated peripheral neutrophils and matrix metalloproteinase 9 as biomarkers of functional outcome following subarachnoid hemorrhage. Translational stroke research 2011;2:600–607. Epub 10. November 2011.
53. Bacigaluppi S, Ivaldi F, Bragazzi NL, Benvenuto F, Gallo F, D'Andrea A, et al. An Early Increase of Blood Leukocyte Subsets in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Is Predictive of Vasospasm. Frontiers in neurology 2020;11:587039. Epub 21. Dezember 2020.
54. Hiemstra IH, van Hamme JL, Janssen MH, van den Berg TK, Kuijpers TW. Dexamethasone promotes granulocyte mobilization by prolonging the half-life of

granulocyte-colony-stimulating factor in healthy donors for granulocyte transfusions. Transfusion 2017;57:674–684.
55. Liles WC, Dale DC, Klebanoff SJ. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. Blood 1995;86:3181–3188.
56. Kato T, Takeda Y, Nakada T, Sendo F. Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro. Natural immunity 1995;14:198–208.
57. Tomazini BM, Maia IS, Cavalcanti AB, Berwanger O, Rosa RG, Veiga VC, et al. Effect of Dexamethasone on Days Alive and Ventilator-Free in Patients With Moderate or Severe Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19: The CoDEX Randomized Clinical Trial. JAMA 2020;324:1307–1316.
58. Shimizu Y. Understanding the immunopathogenesis of COVID-19: Its implication for therapeutic strategy. World Journal of Clinical Cases 2020;8:5835–5843. https://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v8/i23/5835.htm.
59. Lee YY, Park HH, Park W, Kim H, Jang JG, Hong KS, et al. Long-acting nanoparticulate DNase-1 for effective suppression of SARS-CoV-2-mediated neutrophil activities and cytokine storm. Biomaterials 2021;267:120389. Epub 23. Oktober 2020.

7. Probandenaufklärung und Einwilligungserklärung, Datenschutzerklärung und Probandenfragebogen

Probanden Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung zur Untersuchung Fragebogen zur Blutentnahme AN_FO_20.02.2018_GrM	UKR Universitätsklinikum Regensburg

Probandenaufklärung und Einwilligungserklärung

Titel der Studie

530 – Wirkung von Nimodipin auf Granulozytenfunktion

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 basophilen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten unter Einwirkung von Nimodipin. Mithilfe von Farbstoffen können die Zellen differenziert betrachtet und analysiert werden. Im Speziellen wären das Eigenschaften wie Migration, ROS-Produktion und Produktion des Enzyms Myeloperoxidase.

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 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, können am besten verhindert werden, wenn der Proband konsequent auf die Punktionsstelle drückt (5 Minuten!). Durch beugen des Ellenbogengelenks werden Hämatome gefördert.
- Infektion an der Einstichstelle ist möglich, wird aber durch adäquate Desinfektion verhindert
- Die Möglichkeit einer Venenentzündung (Phlebitis) ist nicht auszuschließen.

Ich bin ausführlich über Wesen, Bedeutung, Risiken und Tragweite der Studie 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 die mögliche Risiken für mich aufgeklärt worden zu sein.

Vor- und Nachname: _____

Regensburg, den_____ _____

Unterschrift der/des Probandin/Probanden

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 auch 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. B. Graf) und der EDV Beauftragte der Klinik für Anästhesie (Dr. M. Kieninger)
- Im Falle unerwünschter Wirkungen dürfen die verschlüsselten Daten an den Datenschutzbeauftragten der Klinik für Anästhesie und an die zuständige Bundesoberbehörde weitergegeben werden.
- Daten der Probanden werden auf dem gesicherten Netzlaufwerk der Forschung der Klinik für Anästhesie gespeichert.
- Sofern die Daten zur Veröffentlichung erforderlich sind, dürfen sie in verschlüsselter Form im Rahmen einer wissenschaftlichen Veröffentlichung an ein dafür und nach Maßstäben guter wissenschaftlicher Praxis ausgewähltes Journal weitergegeben werden.
- Nach Abschluss des Projekts werden die Daten auf einer Festplatte/DVD für 10 Jahre in einem zugangsbeschränktem 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 verlangen kann.

Ich habe darüber hinaus den Text der Probandenaufklärung, die Einwilligungserklärung und der hier nachfolgenden abgedruckten Datenschutzerklärung gelesen, verstanden und eine Kopie bekommen.

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

Fragebogen zur Blutentnahme

Projektnummer: 530 Probandennummer: _____ Entnahmezeitpunkt: ____:____
Datum: ___.___._____ Name des Blutentnehmenden: _____
Bitte beantworten sie die nachstehenden Fragen ehrlich und gewissenhaft. Sie helfen uns damit Schwankungen in der Funktion der untersuchten Blutbestandteile besser zu verstehen. Sollten Sie einzelne Fragen (außer den Ausschlussfragen) nicht beantworten möchten, so lassen Sie die betreffenden Fragen aus. Die Gesundheitsfragen dienen **nicht** dazu, Sie von der Teilnahme auszuschließen, sondern lediglich um die Ergebnisse besser interpretieren zu können.

Ausschlussfragen		
Sind bei Ihnen jemals Infektionskrankheiten wie HIV oder Hepatitis C festgestellt worden?	nein☐	ja☐
Bluten Sie nach einer Verletzung ungewöhnlich stark oder lange?	nein☐	ja☐
Ist bei Ihnen jemals eine Erkrankung des Immunsystems oder eine andere chronische Erkrankung die mit einer Veränderung des Immunsystems einhergeht festgestellt worden?	nein☐	ja☐
Fragen zur Person		
Alter:_____Jahre Geschlecht: m☐ w☐ Körpergröße:_____cm Gewicht:____kg		
Gesundheitsfragen:		
Fühlen Sie sich gesund? Wichtig: bitte teilen Sie uns nachträglich mit, falls Sie sich innerhalb der nächsten zwei Tage krank fühlen!	nein☐	ja☐
Haben Sie sich vor kurzem intensiv körperlich betätigt? (z.B. Sport, mit dem Fahrrad zur Klinik gefahren etc.)	nein☐	ja☐
Rauchen Sie? Falls ja: wann haben Sie zuletzt geraucht (Datum + Uhrzeit)? ___.___.___ um ___:___Uhr Nicht ausfüllen: Δt=_____min	nein☐	ja☐
Haben Sie in letzter Zeit Medikamente eingenommen? Falls ja, wann und welche? _____	nein☐	ja☐
Sind bei Ihnen Allergien bekannt? Falls ja, auf welche Stoffe? _____	nein☐	ja☐
Wurde Ihnen die Milz entnommen?	nein☐	ja☐
Nur für Frauen: Könnten Sie theoretisch schwanger sein?	nein☐	ja☐

Ich bestätige die Richtigkeit der oben gemachten Angaben, und bin mir bewusst, dass falsche Angaben die zu einer Gefährdung des Laborpersonals führen könnten strafrechtliche Konsequenzen haben können. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die oben gemachten Angaben pseudonymisiert in die Studie einbezogen werden.

_____, den _____ _____
Ort Datum Unterschrift Proband

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Martin Kieninger, für die Überlassung des Themas sowie für die exzellente Betreuung sehr herzlich bedanken. Die unkomplizierte Zusammenarbeit mit dir und die stets äußerst raschen und hilfreichen Rückmeldungen beim Korrekturlesen waren Arbeitserleichterung und Motivation zugleich.

Ein ausgesprochen großer Dank geht an meinen Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Michael Gruber. Mit deiner angenehmen Art, deiner außerordentlich großen Hilfsbereitschaft und deiner unerschöpflichen Geduld sowie deinem Ideenreichtum hast du mir die konzentrierte und fortlaufende Bearbeitung des Themas erst ermöglicht. Ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können. Unsere vielen netten Gespräche, auch über die Musik und das Saxophon-Spielen, werden mir immer unvergessen bleiben.

Zudem möchte ich mich bei den anderen Mitgliedern des Laborteams des anästhesiologischen Forschungslabors für die harmonische Arbeitsatmosphäre bedanken. Allen voran bei Regina Lindner, die mir in vielen ratlosen Momenten eine wesentliche Stütze war. Des Weiteren bedanken möchte ich mich bei Sigrid Bamberger, Gabriele Bollwein, Marion Schindler, Ruth Spaeth und Simon Tümmler.

Ein weiterer Dank geht an all jene freiwilligen Probandinnen und Probanden, die mir mit ihrer Bereitschaft zur Blutentnahme die Durchführung des Projekts erst ermöglicht haben.

Ein aufrechtes Dankeschön gilt auch meinem alten Freund und Wegbegleiter Richard Kraus. Ohne dich wäre ich wohl überhaupt nicht zu dieser Arbeit gekommen.

Bedanken möchte ich mich des Weiteren bei meinem Freund und Mentor, Dr. med. dent. Michael Deglmann. Durch deine Erfahrungen und vielen hilfreichen Ratschläge das Zahnmedizinstudium betreffend hast du mir das Studium sehr erleichtert und mich hervorragend unterstützt.

Außerdem möchte ich mich bei Mama, Papa und meinem Bruder Kilian sowie bei Familie Macht von ganzem Herzen bedanken. Danke für den moralischen Rückhalt in allen Lebenslagen und die finanzielle Unterstützung. Ohne euch wäre dieses Studium nicht möglich gewesen.

Zuletzt ein herzliches Dankeschön an dich, meine liebe Annika. Danke für dein offenes Ohr und dafür, dass du immer für mich da bist.

9. Lebenslauf

10. Erklärung zum Promotionsverfahren

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

Korbinian Groß, geboren am 27. Februar 1996 in Cham

Ich erkläre,

- dass ich den Doktorgrad der Zahnmedizin nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe.
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des zahnmedizinischen Doktorgrades zugelassen bin.
- dass ich die zahnmedizinische 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, 27. Februar 2021

Korbinian Groß