

Aus der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg  
Prof. Dr. Timo Seyfried  
Anästhesiologie

Einfluss des Anästhetikums Propofol auf die Granulozytenfunktionalität im Sepsismodell

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Angela Geiger

2023



Aus der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg  
Prof. Dr. Timo Seyfried  
Anästhesiologie

Einfluss des Anästhetikums Propofol auf die Granulozytenfunktionalität im Sepsismodell

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Angela Geiger

2023

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig  
1.Berichterstatter: Prof. Dr. Timo Seyfried  
2.Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Schweikl  
Tag der mündlichen Prüfung: 9.Oktober 2023

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	8
1.1	Neutrophile Granulozyten .....	8
1.1.1	Migration .....	8
1.1.2	Oxidativer Burst .....	9
1.1.3	NETose .....	9
1.2	Propofol .....	10
1.3	Sepsis und Sepsismodell.....	10
2	Zielsetzung der Arbeit.....	12
2.1	Fragestellung .....	12
2.2	Studiendesign.....	13
3	Material und Methoden.....	16
3.1	Experimentelle Arbeitsschritte .....	16
3.1.1	Blutentnahme .....	16
3.1.2	Isolation der Granulozyten .....	17
3.1.3	Gelansatz .....	17
3.1.4	Fluoreszenzfarbstoffe .....	17
3.1.5	Propofol-Konzentrationen .....	18
3.1.6	LPS-Konzentrationen .....	20
3.1.7	Inkubation.....	22
3.1.8	Mikroskopie .....	23
3.1.9	Vorbereitung der PMNs Proben zur Betrachtung des Propofol-Effektes mit dem Durchflusszytometer (FACS) .....	24
3.1.10	Bestimmung des oxidativen Bursts der PMNs im Durchflusszytometer anhand der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) .....	25
3.1.11	Messung der Oberflächenproteine auf den PMNs im Durchflusszytometer.....	26
3.2	Auswertung der erhobenen Daten .....	27

3.2.1	Imaris.....	28
3.2.2	Excel.....	30
3.2.3	Phoenix.....	30
3.2.4	FlowJo .....	31
3.2.5	SPSS .....	33
4	Ergebnisse .....	34
4.1	Einfluss verschiedener Propofol- und LPS-Konzentrationen auf die Migration von PMNs	34
4.1.1	Effekte von Propofol auf die Migration .....	34
4.1.2	Einfluss von fMLP auf die Migration Propofol-exponierter PMNs .....	40
4.1.3	Einfluss von LPS auf die Migration Propofol-exponierter PMNs .....	43
4.2	Einfluss von Propofol auf die NETose und den oxidativen Burst der PMNs .....	56
4.2.1	Betrachtung der NETose anhand der ET50-Werte mit DAPI.....	56
4.2.2	Betrachtung des oxidativen Bursts anhand von Tmax ROS .....	58
4.2.3	Betrachtung der NETose anhand der ET50-Werte mit MPO.....	61
4.2.4	Einfluss von fMLP auf die Fluoreszenz Propofol-exponierter PMNs .....	63
4.3	Einfluss von Propofol auf den oxidativen Burst und die Expression von Oberflächenproteinen .....	65
4.3.1	Einfluss von Propofol auf den oxidativen Burst der PMNs im Durchflusszytometer anhand der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) .....	65
4.3.2	Einfluss von Propofol auf die Expression von Oberflächenproteinen der PMNs	
	68	
5	Diskussion.....	69
5.1	Diskussion der Methoden .....	69
5.2	Diskussion der Ergebnisse und mögliche molekulare Mechanismen des Einflusses von Propofol und LPS .....	71
6	Zusammenfassung.....	78
7	Anhang .....	79

8	Verzeichnisse .....	84
8.1	Abbildungsverzeichnis .....	84
8.2	Tabellenverzeichnis .....	88
8.3	Abkürzungsverzeichnis .....	91
8.4	Literaturverzeichnis .....	94

# 1 Einleitung

## 1.1 Neutrophile Granulozyten

Tagtäglich ist der menschliche Organismus einer Vielzahl an Erregern wie Bakterien, Pilzen, Parasiten oder Viren ausgesetzt. Die komplexen Abwehrmechanismen, welche uns vor diesen Pathogenen schützen, werden kurz als Immunsystem zusammengefasst. Ein essenzieller Bestandteil dessen ist das sogenannte „angeborene Immunsystem“. Dazu zählt unter anderem auch die zelluläre Immunantwort durch Leukozyten. Etwa 50 - 70 % der im Blut zirkulierenden Leukozyten gehören zu den neutrophilen Granulozyten, auch polymorphkernige Leukozyten (PMNs) genannt (1). Diese differenzieren sich im Knochenmark aus Stammzellen und werden anschließend in den Blutkreislauf freigesetzt. Dort haften sie an den Gefäßwänden oder zirkulieren, bis sie durch Infektionsmarker ins Gewebe gelockt werden. So erreichen sie als erste Immunzellen den Infektionsort und bekämpfen dort die Erreger mittels Phagozytose oder Freisetzung bakterizider Substanzen (2). Diese sind in den namensgebenden Granula der PMNs gespeichert. Sie können in drei verschiedene Kategorien unterteilt werden. Zum einen unspezifische (primäre) Granula, welche die Myeloperoxidase (MPO) und zur Erregerabwehr bedeutsame Proteasen enthalten. Weiter enthalten sie spezifische (sekundäre) Granula, welche neben anderen antimikrobiotischen Substanzen das Glykoprotein Lactoferrin beinhalten. Die gelatinasehaltigen (tertiären) Granula dienen hauptsächlich als Lager für Metalloproteasen (3, 4). Die essentielle Bedeutung der PMNs für die Erregerabwehr wird durch die gravierenden Folgen von Erkrankungen, welche die Funktionalität oder Menge der PMNs beeinflussen, deutlich (3). Bei einer angeborenen oder erworbenen Neutropenie kommt es demnach zu einer stark erhöhten Infektanfälligkeit bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen (5).

### 1.1.1 Migration

Die PMNs zirkulieren nach Freisetzung aus dem Knochenmark für wenige Stunden bis Tage im Blutkreislauf. Kommt es zu einer Infektion und der damit zusammenhängenden Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Lockstoffen, verlassen die PMNs das Vollblut. Diese sogenannten Chemokine können sowohl durch körpereigene Zellen (IL8, GRO- $\alpha$ , Komplement Faktoren C5a/C3a) als auch durch Bakterien oder andere Erreger (z.B. fMLP, LPS) freigesetzt werden (3). Nach Aktivierung der PMNs kommt es zunächst zu einer lockeren Adhärenz an das Gefäßendothel und sogenanntem „Rolling“ vermittelt über eine Wechselwirkung verschiedener Oberflächenmoleküle. Anschließend migrieren die PMNs mittels Diapedese durch die

Gefäßwand in das umliegende Gewebe. Durch Chemotaxis auf den Konzentrationsgradienten der jeweiligen Chemokine hin erreichen die Granulozyten den Infektionsherd (2,3).

### 1.1.2 Oxidativer Burst

Als erste Zellen des angeborenen Immunsystems am Infektionsort setzen die PMNs dort verschiedene antimikrobielle Mechanismen zur Erregerabwehr in Gang (3). Der sogenannte oxidative Burst ist mit der Produktion von „reactive oxygen species“ (ROS) assoziiert, welche bakterizide Wirkung entfalten. Nach Aktivierung der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase transferiert diese Elektronen auf molekularen Sauerstoff. Die dabei entstehenden Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) reagieren anschließend spontan oder mithilfe der Superoxiddismutase weiter zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Durch Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Superoxidanionen entstehen Hydroxylradikale ( $OH\cdot$ ), welche letztendlich durch Einfluss der Myeloperoxidase (MPO) zur hypochlorigen Säure (HOCl) reagieren (3, 6). Die Aktivierung der NADPH- Oxidase und damit des oxidativen Bursts kann durch eine Vielzahl an Faktoren getriggert werden (7) und involviert eine komplizierte Wechselwirkung verschiedenster Proteinbausteine und Co- Faktoren (6). Der genaue Ablauf ist jedoch noch nicht vollends geklärt und Gegenstand intensiver Forschung.

### 1.1.3 NETose

Ein weiterer Abwehrmechanismus der PMNs ist die neben anderen von Brinkmann, Reichard et al. 2004 beschriebene NETose (8). Die Freisetzung der sogenannten „neutrophil extracellular traps“ (NETs) erfolgt nach Aktivierung der PMNs durch verschiedene intrazelluläre Mechanismen. Großer Bedeutung werden dabei den reaktiven Sauerstoffspezies des oxidativen Bursts sowie einigen Enzymen wie der peptidylarginine Deiminase 4 (PAD4) zugeschrieben (9, 10). Der Inhalt der Granula wird dabei in das Zytosol extrahiert und darin enthaltene Enzyme, wie MPO und NE (neutrophile Elastase) wandern in den Zellkern und vermitteln eine Dekondensation des nukleären Chromatins. Anschließend kommt es zu einer Ruptur des Zellkerns und zu einer Vermischung von Chromatin und dem Inhalt von Granula (9, 11, 12). Die dabei entstehenden netzartigen Strukturen aus Chromatinfasern, Histonen und antimikrobiellen Peptiden wie unter anderem MPO, NE, Kathepsin G, Lactoferrin oder Calprotectin werden durch Perforation der Zellmembran in das umliegende Gewebe freigesetzt (3, 8, 10, 13). Die enthaltenen antimikrobiellen Peptide führen am Infektionsort zu einem

Abbau von Virulenzfaktoren und Pathogenen (8). Zudem hindern die NETs die Erreger an der freien Beweglichkeit und der Ausbreitung im Gewebe. Dieser Mechanismus wurde lange mit einem Sterben der NET-bildenden PMNs assoziiert, aber auch über die Möglichkeit einer vitalen NETose wurde diskutiert (14).

## 1.2 Propofol

Propofol (2, 6-Diisopropylphenol) ist ein intravenös injiziertes Anästhetikum mit sedativer und hypnotischer Wirkung. Aufgrund der kurzen Plasmahalbwertszeit und damit sehr guten Steuerbarkeit, sowie des schnellen Wirkeintritts und geringen Inzidenz von postoperativer Übelkeit und Erbrechen (PONV) ist es eines der am häufigsten gebräuchlichen Anästhetika für Narkoseeinleitung, -aufrechterhaltung und Sedierungen auf den Intensivstationen weltweit (15–17). Es findet Verwendung in nahezu allen Arten von chirurgischen Eingriffen und wird von der WHO als „unentbehrliches“ Arzneimittel gelistet (18). Es entfaltet seine Wirkung als Agonist an neuronalen GABAa (gamma-aminobutyric acid) Rezeptoren (13, 19, 16). Dabei handelt es sich um Liganden-aktivierte Ionenkanäle, welche nach Binden von Propofol an der beta-Untereinheit eine erhöhte Permeabilität für Chloridionen aufweisen und so zu einer Hyperpolarisation der Neuronen führen (13). Im klinischen Alltag wird der lipophile Wirkstoff in einer 10 % Sojaölemulsion verwendet.

Dem Anästhetikum wird zudem eine neuroprotektive und antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben, welche bereits durch eine Vielzahl an Studien verifiziert werden konnte (15, 20–22).

## 1.3 Sepsis und Sepsismodell

Der Zustand der Sepsis entspricht einer lebensbedrohlichen Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Antwort des Immunsystems auf eine Infektion (23). Nach einer Studie von Fleischmann et al. ist die Sepsis in Deutschland, nach Erkrankung des Herz- Kreislaufsystems und Krebs, die dritthäufigste Todesursache (24). Bei anhaltender Hypotension und steigenden Lactatwerten spricht man im Zusammenhang damit vom septischen Schock, welcher mit einer Mortalitätsrate von 40 % einhergeht (23). Dabei kommt es zu einem Angriff auf körpereigenes Gewebe und Organe.

Maßgeblich daran beteiligt ist eine übermäßige Freisetzung von proteolytischen Enzymen und Entzündungsmediatoren aus PMNs in den betroffenen Organen (25). Zwar ist die

Immunantwort von PMNs essentiell für die Erregerabwehr, jedoch ist diese aufgrund dieser Überreaktion auch mit einem schlechteren Outcome bei schweren Krankheitsbildern wie der Sepsis assoziiert (26–29).

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und führen zu einer Aktivierung des Immunsystems (30). Ein Nachweis von solchen Endotoxinen im Blut korreliert mit dem Auftreten einer Sepsis (31). Eine Reihe von Studien beschrieb bereits einen Einfluss von LPS auf die Aktivität der PMNs (32, 9, 33). Dementsprechend kann die Funktionalität der PMNs im „Sepsismodell“ durch den Zusatz von LPS nachgestellt werden.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

### 2.1 Fragestellung

Die Funktionalität der neutrophilen Granulozyten ist für unser Immunsystem von essenzieller Bedeutung. Wie bereits unter 1.1 erwähnt, führt ein Verlust von PMN-Funktionen wie NETose oder oxidativer Burst zu einer gravierenden Reduktion unserer Abwehr von Pathogenen. Jedoch wird auch vermehrt von einer „negativen Seite“ der PMN-Aktivität gesprochen (27, 34). So kann eine Überreaktion der PMNs in Zusammenhang mit der Sepsis oder posttraumatisch durch übermäßige NETose zu venösen Thromben und Organversagen führen (27, 35, 36). Hochaktuell präsentiert sich dieser Mechanismus derzeit in Bezug auf die COVID-19-Pandemie. Als Gegenstand intensiver Forschung werden unter anderem eine granulozytäre Überfunktionalität als Pathomechanismus bei schweren COVID-19 Infektionen diskutiert (37, 38). Bei einer Reihe von Obduktionen an verstorbenen Patienten konnten PMNs Infiltrate und sogar NETs nachgewiesen werden (39). Zudem wird diskutiert, dass mit steigender Menge an zirkulierenden PMNs auch der Schweregrad der Erkrankung zunimmt (40, 41). Verantwortlich dafür scheinen der Angriff des umliegenden Lungengewebes am Ort der Infektion sowie Organschäden durch Mikrothrombosen im gesamten Organismus zu sein (39). Die Reduktion dieser massiven Dysregulation von essenziellen Immunprozessen sollte demnach nicht nur in Bezug auf COVID-19, sondern auf allen mit ARDS (acute respiratory distress syndrome) oder Sepsis einhergehenden Krankheitsbildern von großem Interesse sein. Eine Möglichkeit ist der Einsatz entzündungshemmender Anästhetika wie Propofol (42, 43). Propofol wurde schon des Öfteren in Zusammenhang mit positivem Outcome bei Patienten mit Sepsis gebracht (44). Es konnten bereits einige Studien eine Hemmung von inflammatorischen Reaktionen durch Propofol in vivo und in vitro bestätigen (22, 44). Auch in Bezug auf COVID-19 sind derzeit die positiven Effekte von Propofol-Sedierungen Thema von Diskussionen (45, 46). Inwieweit Propofol die Immunantwort der neutrophilen Granulozyten beeinträchtigt ist demzufolge eine klinisch relevante Fragestellung und sollte daher im Rahmen dieser Studie genauer betrachtet werden. Neben der bereits mehrfach beobachteten Reduktion von PMN-Abwehrmechanismen, wie dem oxidativen Burst und der NETose, bleibt ein zeitlicher Einfluss durch Propofol auf diese Prozesse bislang unerforscht. Das in dieser Studie verwendete Leica Inversionsmikroskop sollte die kontinuierliche Betrachtung der PMN-Funktionalität über einen Zeitraum von etwa 7 h ermöglichen. Dabei sollten parallel oxidativer Burst, Migrationsverhalten und NETose der PMNs unter Einfluss verschiedener Propofol-Konzentrationen erfasst werden. Ergänzend

sollten anhand durchflusszytometrischer Messungen quantitative Effekte von Propofol auf die neutrophile ROS-Produktion sowie die Expression verschiedener Oberflächenproteine gesammelt werden.

Kontrovers ist bislang der Einfluss der im klinischen Alltag eingesetzten Propofol-Suspension und den darin enthaltenen Sojaölen. Es wurde bereits die These aufgestellt, dass ein etwaiger Einfluss von Propofol auf die PMN-Funktion lediglich auf diesen Sojaölen beruhen würde (27). Daher sollte in der vorliegenden Studie anstatt der Propofol-Suspension in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöstes Propofol verwendet werden, um ein eindeutigeres Ergebnis zu ermöglichen. Um die physiologischen Bedingungen *in vivo* im Zustand kritischer Patienten auf der ICU (intensive care unit) besser zu simulieren, sollte zusätzlich der Effekt von Lipopolysacchariden (LPS) auf die PMNs betrachtet werden. LPS sollte dabei die Effekte einer bakteriellen Infektion auf die PMN-Funktionalität auslösen. Zudem sollte die Wechselwirkung von Propofol und LPS in Bezug auf die PMN-Aktivität betrachtet werden, um die Fragestellung nach dem Einfluss einer Propofol-Sedierung bei Patienten mit schwerwiegenden bakteriellen Infektionen auf die Überreaktion des Immunsystems zu beantworten. Zusammenfassend soll sich diese Arbeit also mit der Hypothese befassen, inwieweit ein schädlicher Effekt der PMN-Aktivität aufgrund einer überschießenden Immunreaktion im Rahmen einer Sepsis durch das Anästhetikum Propofol eingedämmt werden kann.

## 2.2 Studiendesign

Zur Beantwortung dieser Hypothese sollte zunächst die zeitliche Betrachtung der Funktionalität der PMN (Migrationsverhalten, ROS-, MPO- und DAPI-Freisetzung) mit dem Inversionsmikroskop Leica DMi8 erfolgen. Dieses ermöglichte eine zeitliche Untersuchung der Aktivität über einen Zeitraum von etwa 7 h. Die untersuchten humanen PMNs wurden nach der Blutentnahme von gesunden Spendern isoliert und *in vitro* mit je zwei verschiedenen Propofol-Konzentrationen oder ohne Propofol (Kontrollwert) inkubiert. Anschließend wurden die inkubierten PMNs mithilfe des Lockstoffes fMLP (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin) aktiviert und die mikroskopische Betrachtung wurde begonnen. In der „Propofol-Versuchsreihe“ sollten zudem der Einfluss zweier verschiedener Konzentrationen des Lockstoffes getestet werden, um zusätzlich den Effekt der Aktivierung durch fMLP auf den Versuchsaufbau zu untersuchen. Der Großteil der Versuche sollte mit einer fMLP-

Konzentration von 10  $\mu$ M aktiviert werden, im Anschluss sollten noch drei Kontrollversuche mit 10 nM fMLP durchgeführt werden.

Die Angaben der Propofol-Konzentrationen in vivo bei einer Anästhesie variieren um 2 – 30  $\mu$ g/mL (27). Der Großteil der Studien geht jedoch von einer 6  $\mu$ g/mL Propofol-Konzentration aus (34, 47). Daher sollte in dieser Studie der Effekt der klinisch relevanten Menge von 6  $\mu$ g/mL Propofol auf die PMN-Funktionalität untersucht werden. Um eine mögliche Akkumulation im Serum bei Langzeit-Sedierungen mit abzudecken und einen Vergleichswert zur 6  $\mu$ g/mL Propofol-Konzentration zu erhalten, sollte zusätzlich der Effekt von 60  $\mu$ g/mL Propofol untersucht werden. Solche Langzeit-Sedierungen mit Propofol sind auch in der derzeitigen COVID-19-Pandemie gehäuft notwendig geworden. Dementsprechend sollte eine höhere Propofol-Konzentrationsspanne abgedeckt werden und zudem eine Vergleichbarkeit mit Studien, welche höhere Propofol-Konzentrationen untersuchten, erhalten bleiben. Insgesamt sollten 18 verwertbare Versuche mit diesem Aufbau durchgeführt werden, wobei jeder Versuch gleichzeitig einen Kontrollwert, 6  $\mu$ g/mL oder 60  $\mu$ g/mL Propofol enthielt. Im Vorfeld sollten bereits fünf Versuche zur Anpassung der Lösungsmittel-Konzentration durchgeführt werden.

Der Einfluss des Sepsismodell-Mediators LPS auf den bestehenden Versuchsaufbau sollte in einer anschließenden „LPS-Versuchsreihe“ untersucht werden. Hierfür wurde, neben einem Kontrollwert, der Effekt je einer LPS-Konzentration allein und in Kombination mit einer Propofol-Konzentration auf die PMNs-Funktionalität betrachtet. Der detaillierte Versuchsaufbau wird unter 3.1.6 genauer beschrieben. Pro Kombination aus LPS- und Propofol-Konzentration sollten jeweils drei Versuche durchgeführt werden. Bei misslungener Messung sollten jedoch gegebenenfalls zusätzliche Experimente durchgeführt werden.

Parallel zu den Versuchen mit dem Leica Inversionsmikroskop sollten Messungen mit einem Durchfluszytometer (FACS) durchgeführt werden. Dabei wurde die Expression verschiedener Oberflächenproteine (Antigene) der Granulozyten und der Oxidative Burst quantitativ erfasst. Die Oberflächenproteine CD11b (Integrin  $\alpha$ -M), CD62L (L-Selektin) und CD66b (CEACAM8) der PMNs wurden mit fluoreszierenden Farbstoffen, welche an spezifische Antikörper gekoppelt waren, bestimmt. Dadurch konnte ein Einfluss von Propofol auf deren Expression untersucht werden. Für die Antigen-Quantifizierung waren fünf Versuche geplant, der oxidative Burst sollte mit 15 Versuchen untersucht werden.

Die Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über den Ablauf der durchgeführten Versuche.

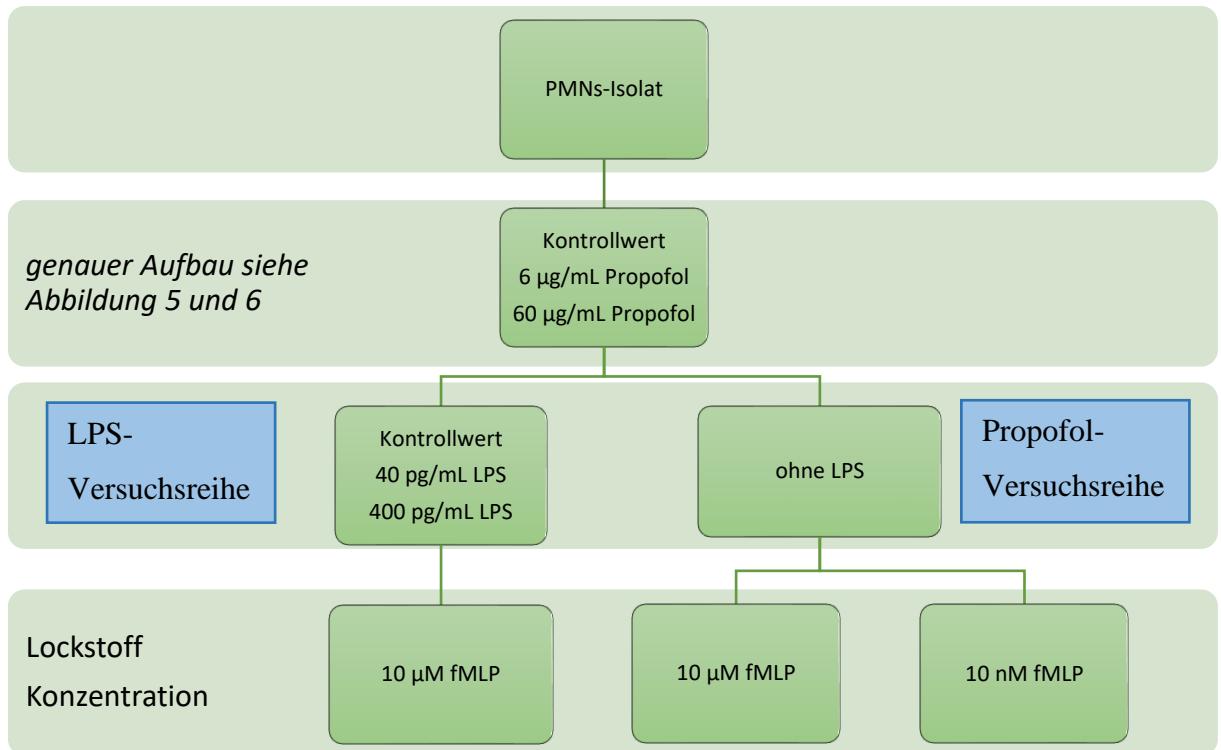


Abbildung 1: Übersichtsschema zu den Experimenten mit dem Leica Innversionsmikroskop als Detektionssystem. Der genaue Versuchsaufbau ist in den Abbildung 5 und 6 präsentiert.

Die dabei untersuchten Parameter sind in der Abbildung 2 abgebildet.

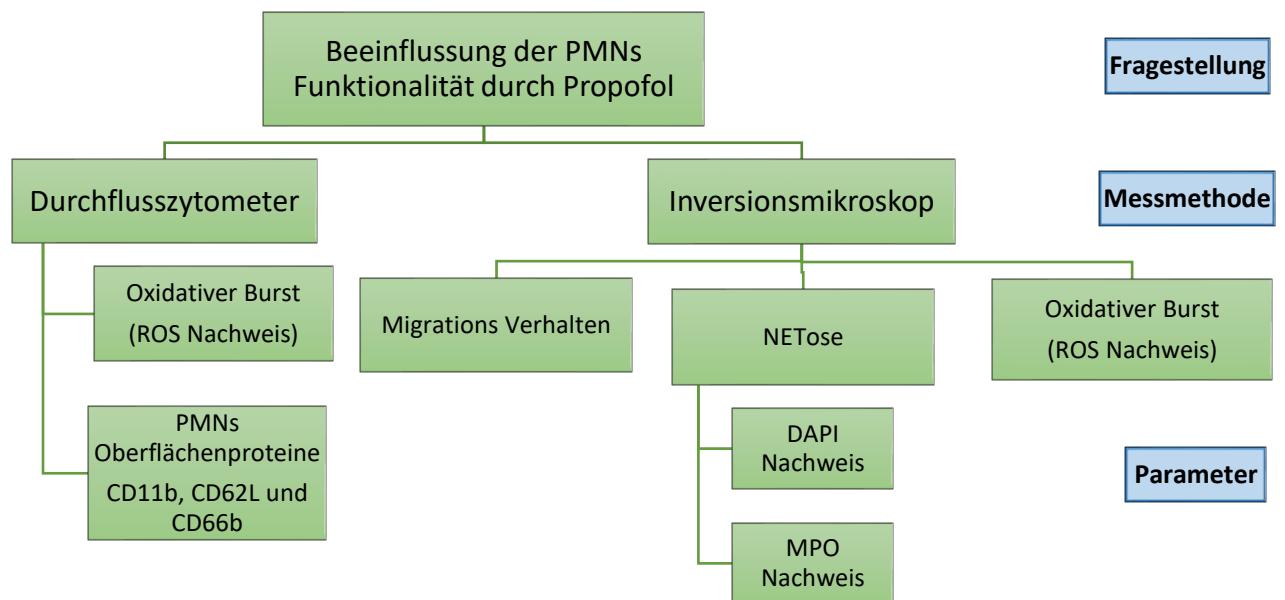


Abbildung 2: Messmethodik und untersuchte Parameter der PMNs-Funktionalität

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Experimentelle Arbeitsschritte

In diesen Abschnitt soll auf die verwendeten Materialien und Methoden eingegangen werden. Die Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über den Ablauf der Versuche mit dem Inversionsmikroskop als Detektionssystem. Ein Schema zu dem Versuchsablauf mit dem Durchflusszytometer als Detektionssystem findet sich unter 3.1.9.

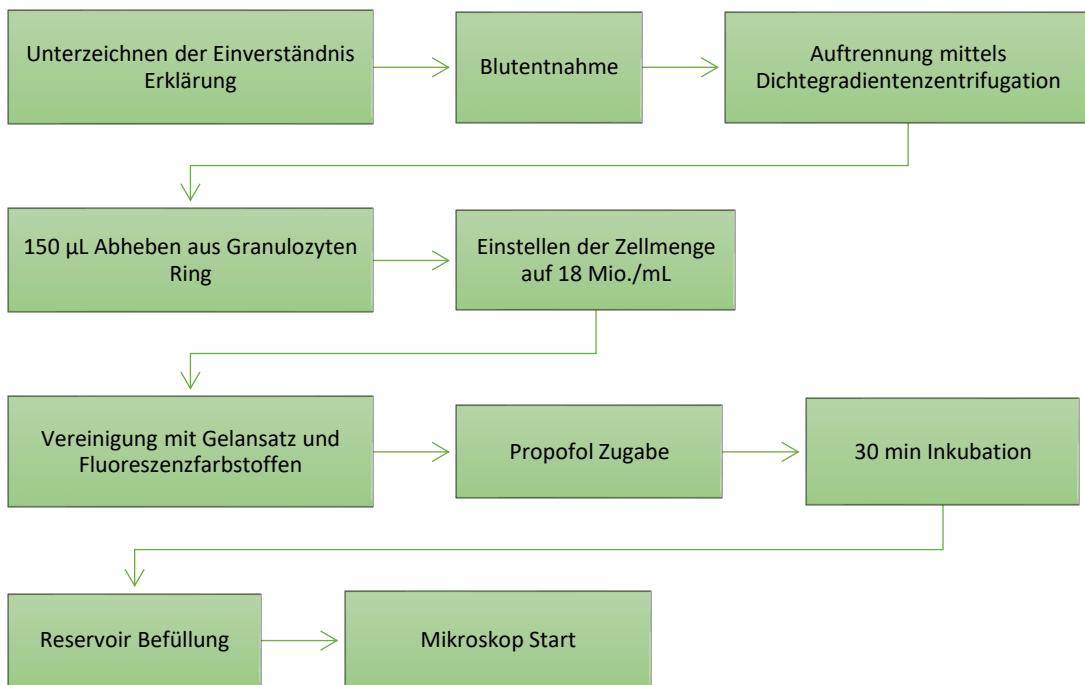


Abbildung 3: Fließdiagramm zur Darstellung der Arbeitsschritte des Experiments mit dem Leica-Inversionsmikroskop als Detektionssystem

##### 3.1.1 Blutentnahme

Die in den Versuchen untersuchten Granulozyten stammten aus Blutproben von gesunden Probanden (Ethikkomission der Universität Regensburg, Votum:18-1210-10). Nach der Aufklärung über mögliche Risiken und den Verwendungszweck sowie dem Unterzeichnen der Einverständniserklärung, wurde das Blut aus einer peripheren Vene in der Armbeuge entnommen. Dabei wurde zunächst desinfiziert und gestaut, um dann proximal mit einer Safety-Multifly-Kanüle drei bis neun Milliliter in eine S-Monovette mit Lithium-Heparin zu entnehmen.

### 3.1.2 Isolation der Granulozyten

Anschließend wurden aus der entnommenen Probe 3 mL unverdünntes Vollblut über je 3 mL Leukospin und 3 mL Lymphospin vorsichtig und ohne Vermischen der verschiedenen Medien in ein 15 mL Falcon-Röhrchen geschichtet. Dieses wurde dann für 20 Minuten bei 756 g bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Von der durch die Dichtegradientenzentrifugation in die verschiedenen Blutbestandteile aufgetrennten Probe wurden die oberen Schichten abgesaugt. Aus dem übrigen Volumen wurden dann mit einer Pipette 150 µL aus dem Granulozyten-Ring entnommen und zu 300 µL RPMI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum (RPMI + 10 % FKS) zugegeben. Aus dieser Zellsuspension wurden 5 µL entnommen und auf eine Neubauerkammer gegeben, um die Zellzahl unter einem Lichtmikroskop innerhalb von vier Quadranten auszuzählen. Anschließend wurde anhand dieser Zahl mit Formel 1 und Formel 2 die Menge an RPMI + 10 % FKS berechnet, welche für die benötigte Zellzahl von 18 Millionen/mL erforderlich war.

$$\text{Zellzahl(ZZ)/mL} = \left( \frac{\text{Granulozyten aus 4 Feldern}}{4} \right) * 16 * 10^3$$

Formel 1

$$\text{Endvolumen } (\mu\text{L}) = \frac{1000 \mu\text{L} * \text{ZZ/mL}}{18 \text{ Mio/mL}}$$

Formel 2

Nach einer weiteren Zentrifugation von 5 min bei 425 g wurde zu dem isolierten Zellpellet das berechnete Volumen hinzugegeben.

### 3.1.3 Gelansatz

Ein Aliquot von 50 µL der hergestellten Zellsuspension wurde dann mit einem am Vortag hergestellten Gelansatz vermischt. Dieser Ansatz aus 20 µL demineralisiertem Wasser, 20 µL MEM, 10 µL Natriumbikarbonatlösung und 50 µL RPMI 1640 wurde zuvor über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Neben den isolierten PMNs wurden diesem noch die drei im Folgendem beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffe hinzugegeben.

### 3.1.4 Fluoreszenzfarbstoffe

Als Fluoreszenzfarbstoffe für die Darstellung der Granulozytenfunktionalität wurden drei verschiedene Substanzen verwendet. Zum einen Dihydrorhodamin 123 (DHR) für die

Identifizierung von ROS, den sogenannten oxidativen Burst, bei welchem unteranderen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstand. Dabei lief eine Oxidationsreaktion des DHR mit Wasserstoffperoxid ab, wodurch Rhodamin 123 entstand. Dieses emittierte nach Anregung Licht in einem Längenwellenbereich von 534 nm. Die gemessene Emission diente als Identifikation des oxidativen Bursts. Da die ROS-Produktion in der noch intakten Zelle stattfand, war es bedeutsam, dass DHR durch die Zellwand diffundierte und so die Bildung von ROS innerhalb des PMN quantifiziert werden konnte (48, 49). Zur Färbung der NETose wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) verwendet. DAPI band nur an extrazelluläre DNS und war daher ein idealer Marker für die durch Apoptose extrahierten NETs, welche u. a. DNS aus den Granulozyten enthielten. Gemessen wurde diese Färbung bei 461 nm (50). Zuletzt wurde der MPO-Antikörper, der an Allophycocyanin (APC) gekoppelt vorlag, verwendet. Dieser band das Enzym Myeloperoxidase (MPO) und stellte dieses aufgrund der Emission von APC bei 660 nm unter dem Fluoreszenzmikroskop dar (51). Für den Gelansatz mit 50 µL Zellsuspension und 100 µL des am Vortag vorbereiteten Ansatzes wurden aus einer 1 µM DHR-Lösung 3 µL, 5 µL DAPI (0,5 µg/mL), und 10 µL Anti-MPO-APC (0,5 µg/mL) benötigt.

### 3.1.5 Propofol-Konzentrationen

Die verwendeten Chemotaxis-Kammern (Ibidi µ-Slide) enthielten drei verschiedene Kanäle mit je links und rechts seitlich verbundenen Reservoiren (Abbildung 4).

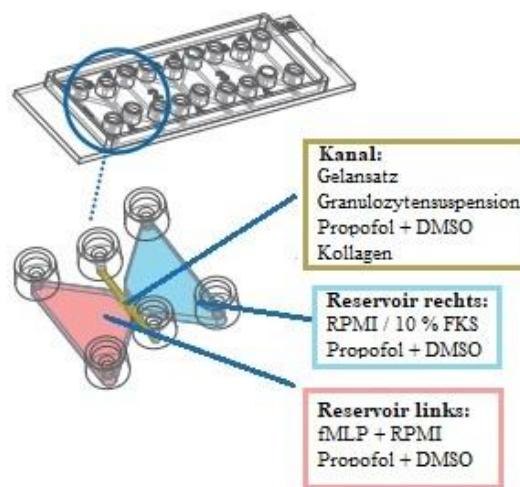


Abbildung 4: Basisschema der Ibidi-Slide-Befüllung. Dargestellt ist ein Ibidi-Slide mit drei Kanälen und jeweils links und rechts verbundenen Reservoiren. Zusätzlich ist eine exemplarische Vergrößerung eines Kanals mit Reservoirn sowie deren Inhalt gezeigt

Mithilfe dieses Aufbaus war es möglich, pro Probanden zwei Propofol-Konzentrationen und den Kontrollwert gleichzeitig zu untersuchen. Im Kanal befand sich dabei immer der Gelansatz mit Farbstoffen und den isolierten PMNs sowie der jeweiligen Propofol- oder DMSO-Konzentration. Im linken Reservoir war jeweils der Lockstoff fMLP enthalten. Dieser aktivierte die Granulozyten über ein membranständiges G-Protein, welches über eine intrazelluläre Kaskade zur  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung und Zellaktivierung führte (52). Das rechte Reservoir enthielt RPMI / 10 % FKS (Abbildung 4).

Für die Versuchsreihe mit Propofol wurde zu den drei Kanälen Propofol in je unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben. Der linke Kanal wurde dabei konstant mit einem Kontrollansatz, welcher nur das Lösungsmittel DMSO (0,39 %) enthielt, befüllt und diente daher als Kontrollwert. Dieselbe Konzentration an DMSO war in allen verwendeten Kanälen aller Versuche gleich. Im mittleren Kanal wurde die Konzentration 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol hinzugegeben, da dies, nach der derzeitigen Studienlage, der im klinischen Alltag verwendeten Plasma-Konzentration (47, 34) nach intravenöser Applikation entsprach. Als Vergleichswert war im rechten Kanal eine Propofol-Konzentration von 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  enthalten. Dadurch war es möglich, eine höhere Konzentrationsspanne abzudecken und eine Vergleichbarkeit mit Studien aufrecht zu erhalten, welche einen Plasmaspiegel von Propofol in einem Bereich zwischen 2 und 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nannten (27). Dieselben Konzentrationen waren parallel auch in den beiden Reservoiren links und rechts des entsprechenden Kanals enthalten, um eine Verdünnung im Laufe des Versuchs auszuschließen. Die Reservoirs enthielten ebenfalls 0,39 % DMSO, um auch hier eine Verdünnung zu umgehen (Abbildung 5).

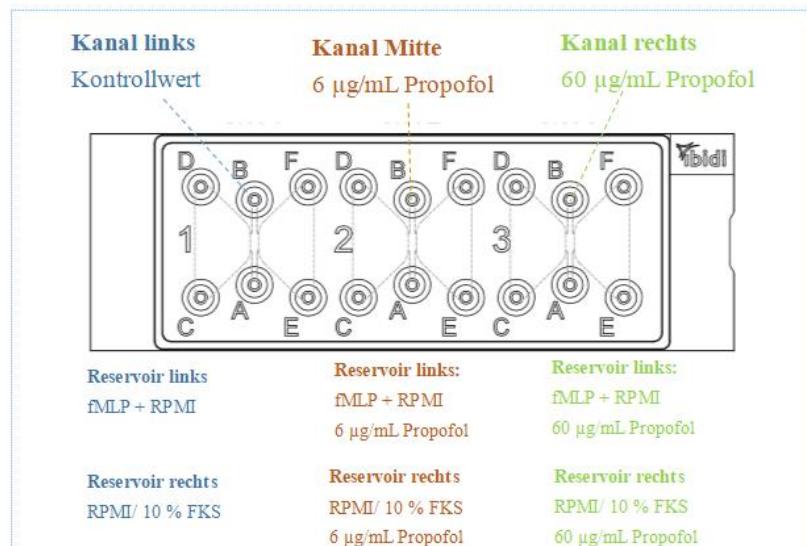


Abbildung 5: Übersicht der Kanal- und Reservoir-Befüllung in der Propofol-Versuchsreihe. Dargestellt sind die drei Kanäle mit jeweiliger Propofol-Konzentration, sowie die zugehörigen Reservoire und deren Befüllung. In der Graphik sind nicht alle Substanzen des Inhalts der Kanäle und Reservoire aufgelistet (vergleiche dazu den Fließtext).

Der DMSO-Kontrollwert wurde vor jedem Versuch neu hergestellt. Die Propofol-Konzentrationen wurden in 50 µL-Portionen eingefroren und kurz vor dem Versuch mit 450 µL RPMI angemischt. Aus diesen Mischungen wurden dann je 6,4 µL in die 100 µL aus Gelansatz, Farben und Kollagen pipettiert. Daraus resultierten die berechneten Endkonzentrationen von 6 µg/mL Propofol im mittleren sowie 60 µg/mL Propofol im rechten Kanal.

### 3.1.6 LPS-Konzentrationen

Nach Opal, Scannon et al. entsprach die LPS-Plasmakonzentration bei den 253 untersuchten Patienten mit Sepsis im Schnitt 400 pg/mL (33). Jedoch variierten die LPS-Plasmakonzentrationen enorm, so dass auch Werte unter 2 pg/mL beobachtet wurden. Daher wurde in dieser Studie neben 400 pg/mL LPS auch eine geringere Konzentration von 40 pg/mL LPS als Vergleichswert untersucht. Die Ibidi-Slides wurden entsprechend der Abbildung 6 befüllt.

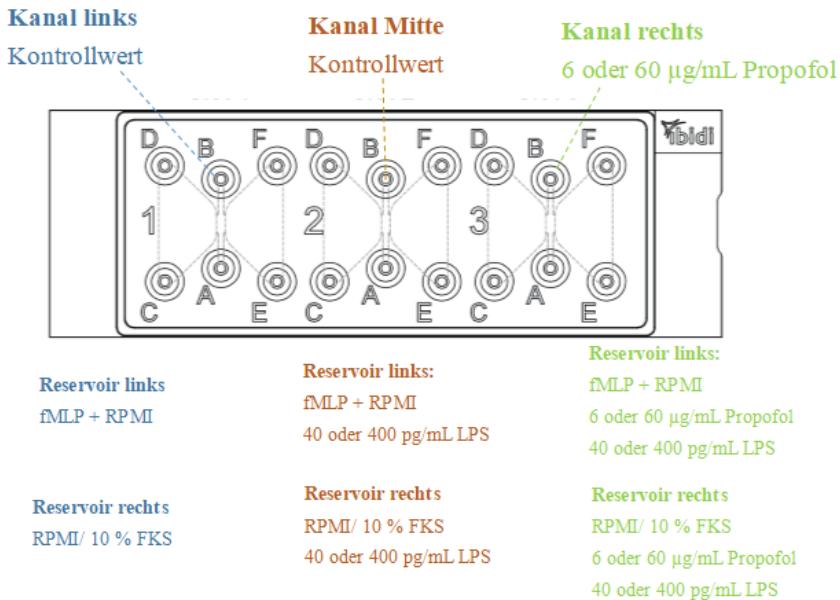


Abbildung 6: Übersicht der Kanal- und Reservoir-Befüllung in der LPS-Versuchsreihe. Dargestellt sind die drei Kanäle mit jeweiliger Propofol- und LPS-Konzentration sowie die zugehörigen Reservoire und deren Befüllung. In der Graphik sind nicht alle Substanzen des Inhalts der Kanäle und Reservoire aufgelistet (vergleiche dazu den Fließtext).

Es wurden immer je drei Versuche mit den unterschiedlichen Kombinationen aus Propofol- und LPS-Konzentrationen nach der folgenden Abbildung 7 durchgeführt.

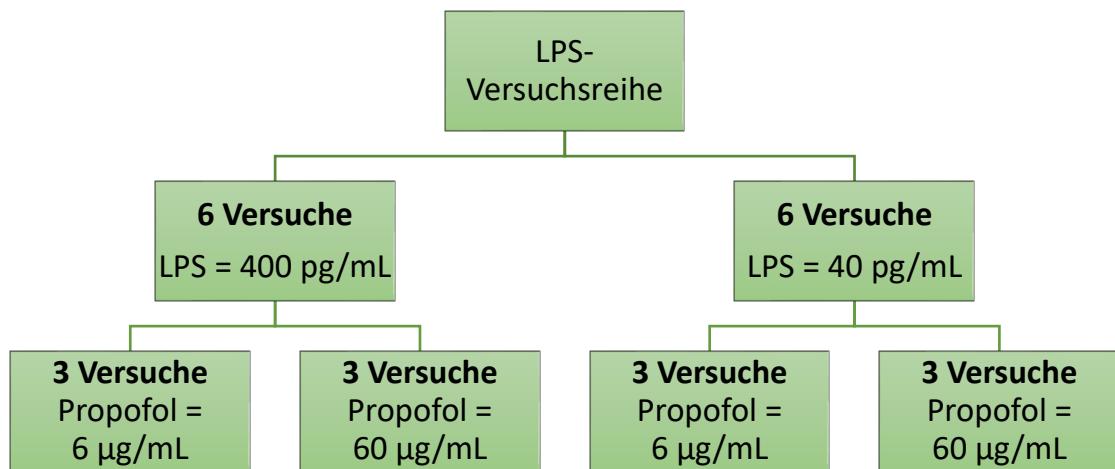


Abbildung 7: Versuchszahlen je LPS- und Propofol-Konzentration in der LPS-Versuchsreihe

Für die LPS-Versuchsreihe wurde derselbe Kontrollansatz mit einer Endkonzentration von DMSO = 0.39 % verwendet. Verwendet wurden entweder 40 oder 400 pg/mL LPS (Endkonzentration) nach dem Schema aus Abbildung 7.

Tabelle 1: Pipettierschema für Reservoir der LPS-Versuchsreihe. DMSO aus vorbereitetem Leerwert, LPS je nach Konzentration vorbereitete Vorverdünnungen, Propofol aus vorbereiteten Vorverdünnungen.

Kanal	Kontrolle		LPS		LPS	
	Links	Mitte	Links	Rechts	Links	Rechts
Reservoir	Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
DMSO- Ansatz	8,4 µL	8,4 µL	8,4 µL	8,4 µL		
LPS- Ansatz			8,7 µL	8,7 µL	8,7 µL	8,7 µL
Propofol- Ansatz					8,4 µL	8,4 µL
fMLP/RPMI (links) oder PRMI + 10 % FKS (rechts)	121,6 µL	121,6 µL	112,9 µL	112,9 µL	112,9 µL	112,9 µL

### 3.1.7 Inkubation

Die Befüllung der Kanäle erfolgte mit der unter 3.1.3 beschriebenen Matrix aus Gelansatz, Zellsuspension, Fluoreszenzfarbstoffen sowie Kollagen und der jeweiligen Propofol-Konzentration. Die Endkonzentrationen von Propofol, wie unter 3.1.5 beschrieben, entsprachen links 0 µg/mL, in der Mitte 6 µg/mL und rechts 60 µg/mL. Auf jeden der drei Ansätze wurden dann 50 µL Kollagen (Endgehalt 1,5 mg Kollagen, 1,67 % FKS) gegeben. Aus den fertigen Ansätzen wurden innerhalb von wenigen Minuten 6 µL in jeden der drei Kanäle vorsichtig mit speziellen IBIDI-Spitzen pipettiert. Mit durch „Plugs“ verschlossenen Kanalöffnungen wurde die Platte anschließend in einer Petrischale mit einem feuchten Papiertuch bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reservoir wurden nach der abgelaufenen Inkubationszeit mit 65 µL fMLP/RPMI links und RPMI + 10 % FKS vorsichtig mit den speziellen IBIDI-Spitzen befüllt. Für den Lockstoff fMLP wurden in der Propofol-Versuchsreihe zwei verschiedene Konzentrationen verwendet. Zunächst wurden 18 Versuche mit einer Ausgangskonzentration von fMLP = 10 µM im linken Reservoir durchgeführt. Diese Menge an fMLP sollte eine sofortige Aktivierung der isolierten PMNs veranlassen und den direkten Kontakt mit Krankheitserregern im Gewebe simulieren. Ähnlich hohe Konzentrations-Spannweiten von 10 nM bis 10 µM wurden bereits für andere Lockstoffe, wie Diazepam, beschrieben und sollten daher auch für fMLP verifiziert werden (53). Zusätzlich wurden noch Vergleichsmessungen mit 10 nM durchgeführt und die Messergebnisse aus vorangegangenen Studien in der Klinik für Anästhesiologie am UKR als Vergleichswerte betrachtet. Direkt im Anschluss wurden die fertig aufbereiteten Proben mikroskopiert.

Bei der LPS-Versuchsreihe wurden die Kanäle identisch vorbereitet, allerdings nur im rechten Kanal eine der beiden Propofol Konzentrationen nach dem unter 2.2 erläuterten Schema hinzugegeben. Bei den Reservoiren wurde wie unter 3.1.6 beschrieben verfahren und ebenfalls nach 30 min Inkubation links und rechts mit 65 µL der jeweiligen Mischung befüllt.

### 3.1.8 Mikroskopie

Die fertigen Chemotaxis-Kammern (Ibidi µ-Slide) wurden umgehend nach der Reservoir-Befüllung mikroskopiert (Inversionsmikroskop Leica DMi8). Die Probe befand sich dabei in einer Klimakammer mit 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C. Für alle Versuche wurden die gleichen Mikroskop-Einstellungen verwendet. Die Migrationsdaten wurden über Phasenkontrastaufnahmen erfasst. Für die unterschiedlichen Floreszenzen von DAPI, DHR und MPO wurden ein QUAD-Filter und ein DUAL-Filter nach Tabelle 2 verwendet. Anschließend wurde für 6:40 h alle 30 Sekunden von jedem Kanal in jeder der vier verschiedenen Einstellungen ein Bild angefertigt, was etwa 800 Einzelaufnahmen bei 100facher Vergrößerung entsprach. Jede dieser Aufnahmen wurde durch die LASX Software automatisiert als eine Bildfolge, dem jeweiligen Kanal und der Fluoreszenz zugeordnet, abgespeichert. Diese Daten wurden dann in Ims-Dateien konvertiert und mit dem Computerprogramm Imaris 9.0.2. (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) ausgewertet.

*Tabelle 2: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe DAPI, Rhodamin123, MPO- APC und deren Extinktions- und Emissionsmaxima, verwendete Belichtungswellenlängen und Filterwürfel sowie Filtereigenschaften. Alle Angaben in nm. Das Extinktionsmaximum entspricht der optimalen Extinktions-Längenwelle des jeweiligen Farbstoffes, die LED-Belichtung der verwendeten Längenwelle und das Emissionsmaximum der emittierten Längenwelle.*

<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>DAPI</b>	<b>Rhodamin 123</b>	<b>MPO-APC</b>
<b>Extinktionsmaximum [nm]</b>	359	507	650
<b>Emissionsmaximum [nm]</b>	461	529	660
<b>Led Belichtung [nm]</b>	385	490	635
<b>Filterwürfel [nm]</b>	DUAL	DUAL	QUAD
<b>Verwendeter Einlassfilter [nm]</b>	395/30	485/25	615-635
<b>Verwendeter Auslassfilter [nm]</b>	442/35	525/40	LP650
<b>Belichtungszeit [ms]</b>	30	150	500

### 3.1.9 Vorbereitung der PMNs Proben zur Betrachtung des Propofol-Effektes mit dem Durchflusszytometer (FACS)

Mithilfe des Durchflusszytometers (FACSCalibur) wurden quantitative Werte des oxidativen Bursts und der Expression der Oberflächenproteine CD11b (Integrin  $\alpha$ -M), CD62L (L-Selektin) und CD66b (CEACAM89) in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration gesammelt. Die dafür verwendeten Granulozyten-Proben wurden, wie unter 3.1.2 beschrieben, aus dem Vollblut gesunder Probanden isoliert. Allerdings wurden aus dem entstandenen Granulozyten-Ring jeweils 700  $\mu$ L entnommen. Die gewonnene Zellsuspension wurde außerdem nicht weiter verdünnt, sondern direkt in den Ansatz hinzugegeben. Die isolierten PMNs wurden anschließend nach der für die Burst-Messungen oder der Tabelle 4 für die Quantifizierung der Oberflächenproteine weiterverarbeitet.

### 3.1.10 Bestimmung des oxidativen Bursts der PMNs im Durchflusszytometer anhand der medianen Fluoreszenzintensität (MFI)

Der bereits unter 1.1 beschriebene oxidative Burst konnte durch Stimulation mit fMLP und PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) ausgelöst werden. Die dadurch intrazellulär erzeugten ROS führten zu einer Umwandlung des Farbstoffes Dihydrorhodamin 123 zu dem fluoreszierenden Rhodamin 123, welches mittels eines Fluoreszenzdetektors im FACS quantitativ bestimmt werden konnte. Die Abbildung 8 zeigt den Ablauf der Arbeitsschritte.

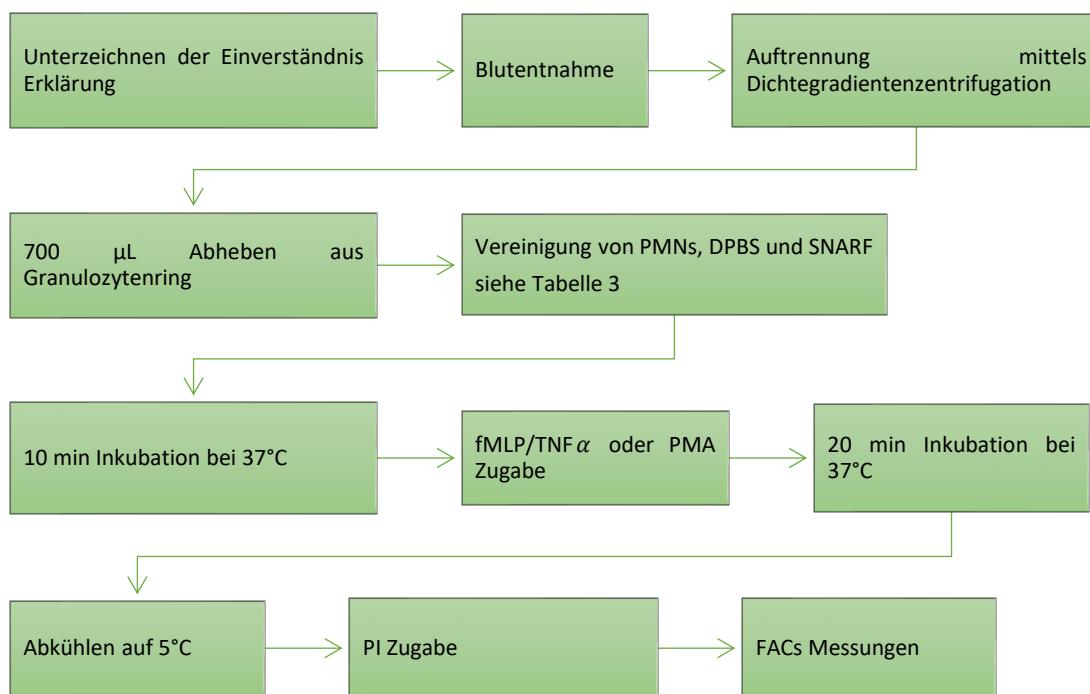


Abbildung 8: Schema zum Arbeitsablauf der durchflusszytometrischen Messungen. DPBS = Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, SNARF = Acetoxyethyl Ester, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, fMLP = N-Formyl-Met-Leu-Phe, PI = Propidium Iodide

Pro Probanden wurden immer ein Kontrollwert ohne Aktivierung der Granulozyten mit einem fMLP- und einem PMA-Wert verrechnet. PMA ist ein stärkerer Aktivator des oxidativen Bursts als fMLP/TNF $\alpha$  und diente als positiv Kontrolle. Die Proben wurden nach der Tabelle 3 vorbereitet, für jeden Messwert wurde immer ein Doppelansatz verwendet. Verglichen wurden jeweils ein Wert ohne jegliche Zugabe einer zusätzlichen Substanz, ein Kontrollwert mit 0,39 % DMSO, eine 6 µg/mL und 60 µg/mL Propofol-Probe mit einer identischen DMSO-Konzentration. Die gemessenen Werte wurden dann mit der Software FlowJo v X.0.7 bearbeitet.

Die gemessene Intensität von Rhodamin 123 wurde in den Ergebnissen als „Mediane Fluoreszenzintensität (MFI)“ bezeichnet.

*Tabelle 3:Arbeitsschritte der Burst-Messung. Alle Mengenangaben in  $\mu\text{L}$ , drei angesetzte „Röhrchen“ im Doppelansatz, die Arbeitsschritte wurden von links nach rechts durchgeführt, DHR= Dihydrorhodamine 123, DPBS =Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, SNARF = Acetoxymethyl Ester, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, fMLP = N-Formyl-Met-Leu-Phe, TNF $\alpha$  =Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , PI = Propidium Iodide*

Röhrchen	DPBS	ZELLEN	DHR/ SNARF	fMLP	PMA	PI
<b>Leerwert</b>	1000	30	10/ 10	<b>10 min im Wasserbad bei 37°C</b>	0      0	<b>20 min im Wasserbad bei 37°C, Danach 5 min Bei 4°C</b>
<b>fMLP + TNF<math>\alpha</math></b>	1000	30	10/ 10+ 10 TNF $\alpha$		10      0	10
<b>PMA</b>	1000	30	10/ 10		0      10	10

### 3.1.11 Messung der Oberflächenproteine auf den PMNs im Durchflusszytometer

Die Vorbereitung zur Bestimmung der Oberflächenproteine lief nach einem mit den Burst-Messungen vergleichbaren Schema ab (Abbildung 8).

Nach dem Abheben des Granulozyten-Ringes wurden diese jedoch nach dem Schema in Tabelle 4 weiterverarbeitet. Durch die Inkubation der PMNs mit den spezifischen Antikörpern konnten diese an die Oberflächenproteine CD11b/CD62l/CD66b der PMNs binden. Durch eine Kopplung von fluoreszierenden Farbstoffen an die Antikörper konnte deren Anzahl im Anschluss im FACS quantifiziert werden. Nach einer Aktivierung im Längenwellenbereich 488 nm und 635 nm wurde die Fluoreszenz durch vier Detektoren gemessen. Genauere Angaben zu den verwendeten Antikörpern und Farbstoffen werden im Punkt 3.2.4 aufgeführt. Es wurde für jeden Probanden ein Doppelansatz gemessen, welche bei der Auswertung miteinander verrechnet wurde. So konnten Aussagen über einen Einfluss auf die Expression der Oberflächenproteine in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration getroffen werden.

Tabelle 4: Arbeitsschritte zur Oberflächenprotein-Messung. Alle Mengenangaben in  $\mu\text{L}$ , zwei angesetzte „Röhrchen“ im Doppelansatz, Arbeitsschritte wurden von links nach rechts durchgeführt, ZF = Zentrifuge, DPBS = Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, CD11b (Integrin  $\alpha$ -M), CD62L (L-Selektin) und CD66b (CEACAM8)

Röhrchen	Zellen	DPBS	ZF	Über-stand Ent-nehmen	AK	Vortexen 15 min bei 4°C/ ohne Licht	DPBS	ZF	Über-stand Ent-nahmen	DPBS
<b>Leerwert</b>	30	1000	3 min 425g bei 4°C		0		2000	3 min 425g bei 4°C		200
<b>CD 11b/ 62L/ 66b</b>	30	1000			Je 5		2000			200

### 3.2 Auswertung der erhobenen Daten

In den folgenden Kapiteln werden die unterschiedlichen Softwares zur Datenanalyse kurz erläutert. Die Abbildung 9 zeigt einen Überblick über alle verwendeten Softwares und die entsprechenden Arbeitsschritte.

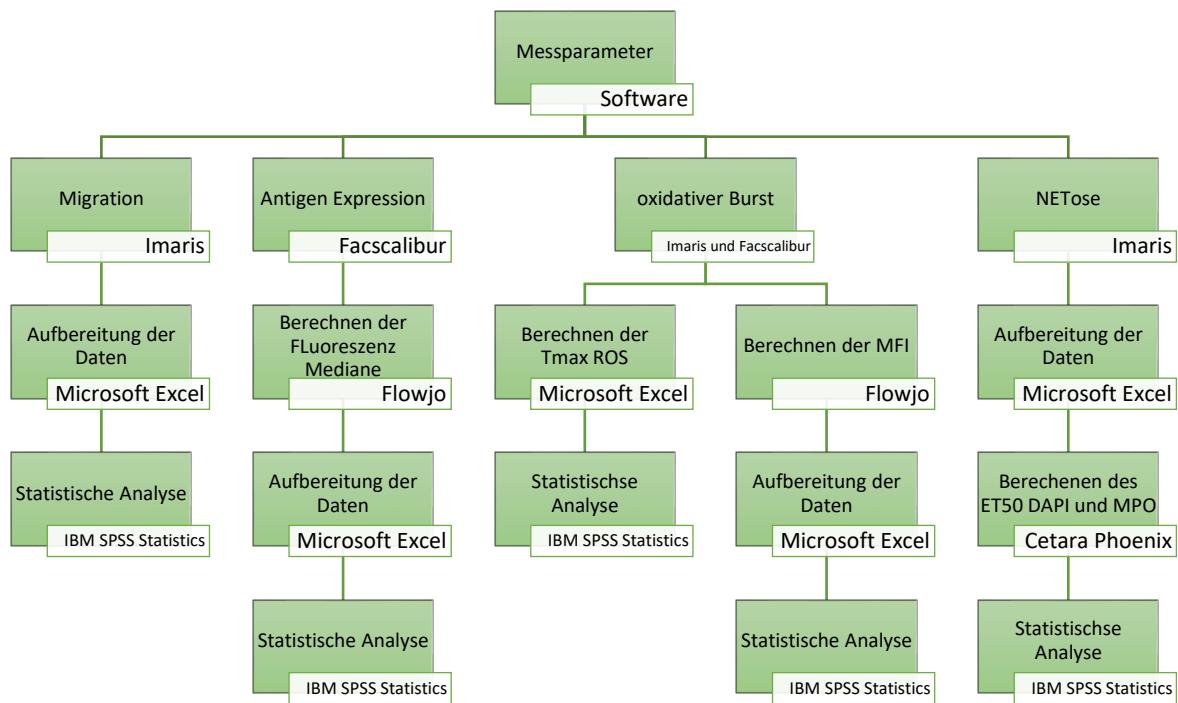


Abbildung 9: Überblick über verwendete Softwares zur Datenanalyse der mit dem Leica Mikroskop und mit FACS erfassten Messergebnisse.

### 3.2.1 Imaris

Alle gewonnenen Daten aus dem Leica Lichtmikroskop wurden nach ihrer Konvertierung in Imaris (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) weiterbearbeitet. Nach dem Zuschneiden der Bilderserien, um Artefakte an den Rändern der Kanäle zu entfernen, wurden Fluoreszenzbilder und Phasenkontrastbilder separat bearbeitet.

Die Migrationsdaten aus dem Phasenkontrast wurden in 30 - minütige Abschnitte ab Mikroskop-Start unterteilt. Von den daraus resultierenden Zeitfenstern, sogenannten „Zeit-Frames“, wurden nur die ersten fünf ab Mikroskop-Start betrachtet, da nach dieser Zeit kaum noch bewegliche PMNs vorhanden waren. In der endgültigen Auswertung wurden jedoch nur noch die ersten drei 30-minütigen Zeit-Frames verwertet, da sich in vorangegangen Studien in der Klinik für Anästhesiologie am UKR gezeigt hat, dass in diesem Zeitfenster der relevante Anteil der Migration stattfindet. Über die Funktion „Spots“ der Software war es möglich, mithilfe von „Daten Wizards“ aus allen im Kanal enthaltenen Zellen nur die PMNs zu erfassen. Diese wurden aufgrund von Größe und Intensität durch die Funktion „Quality“ erkannt. Anschließend wurden die „Tracks“ pro 30-minütigen Zeit-Frame verfolgt und abgespeichert. Jeder Zelle wurde so der zurückgelegte Weg zugeordnet.

Zusätzlich wurden Zellen herausgefiltert, welche eine maximale „Distance“, also zurückgelegte Wegstrecke, von 10 µm innerhalb eines Zeit-Frames überschreiten, um fehlerhafte Sprünge zwischen verschiedenen Zellen auszuschließen. In Excel exportiert wurden die Parameter Track Length, Track Displacement X & Y, Track Displacement Length, Track Speed Mean und Track Duration. Die Track Length (TL) beschrieb die innerhalb des definierten Zeit-Frames zurückgelegte Laufstrecke eines einzelnen PMN in µm. Das Track Displacement X (TDX) entsprach der, im jeweiligen Zeit Frame, in Richtung der X-Achse gelaufenen Strecke. Das Track Displacement Y (TDY) beschrieb parallel dazu die zum selben Zeitpunkt vorhandene Bewegung entlang der Y - Achse. Die Track Displacement Length (TDL) beschrieb die Wegstrecke der Zelle in positiver X - Richtung in Abhängigkeit der Y - Koordinate. Sie wurde anhand der Vektorberechnung erfasst.

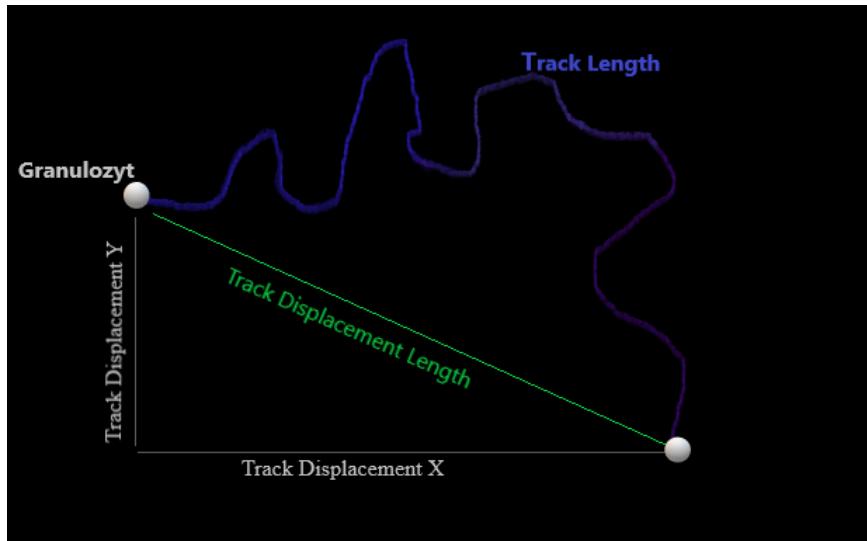


Abbildung 10: Exemplarische Laufstrecke eines Granulozyten unter dem Leica Lichtmikroskop innerhalb eines Zeit-Frames. Track Length (TL) entspricht der Gesamt- Laufstrecke, Track Displacement Length (TDL) entspricht der euklidischen Distanz, Track Displacement X entspricht der entlang der X- Achse zurückgelegten Laufstrecke, Track Displacement Y entspricht der entlang der Y-Achse zurückgelegten Laufstrecke

Die Track Speed Mean (TSM) entsprach der Geschwindigkeit der Migrationsbewegung eines PMN in  $\mu\text{m}/\text{s}$ . Diese wurde in der Auswertung auf Minuten umgerechnet und auf die 30-minütige Zeitspanne eines Zeit-Frames hochgerechnet, um einen anschaulicheren Wert zu erhalten. Der Parameter Track Duration beschrieb die Dauer, in welcher ein einzelner Track verfolgt werden konnte, und diente zum Ausschluss von PMNs, welche sich zu kurz in der Beobachtungsebene aufhielten.

Die Fluoreszenzbilder wurden dagegen nicht in zeitliche Abschnitte unterteilt. Es wurde aus dem kompletten Beobachtungszeitraum jeder fünfte Aufnahme-Zeitpunkt betrachtet und daraus die jeweiligen zeitlichen Maxima der Fluoreszenzen bestimmt. Hier wurden fluoreszenzabhängig mithilfe des Daten Wizards „Threshold“, welcher der nötigen Lichtintensität für eine Markierung als Granulozyt entspricht, und mittels „Area“, welche die Zellgröße beschreibt, die PMNs erkannt. Dadurch wurde vermieden, zu große oder zu kleine Zellen als solche zu markieren. So konnte man vor allem die häufig in geringen Anteilen noch im Isolat vorhandenen Lymphozyten oder Erythrozyten herausfiltern. Die Gesamtheit der für einen Zeitpunkt berechneten Flächensummen wurde jedem Zeitpunkt, in jeder der drei Floreszenzen zugeordnet. Diese Daten wurden dann weiter in Excel exportiert.

### 3.2.2 Excel

Die exportierten Tabellen für die MPO- und DAPI-Messergebnisse wurden in Excel bearbeitet, mit neuen Spalten zur Identifikation versehen und anschließend in die Software Phoenix 64 Version 8.0.0 geladen.

Aus den DHR-Daten wurde in Excel für jeden Kanal aller Versuche der graphische Verlauf der jeweiligen Flächensummen erstellt. Für diesen wurde eine polynomische Formel dritten Grades berechnet. Von dieser wurde zunächst die erste Ableitung bestimmt und davon wurden die Nullstellen berechnet. Diese ergaben nach Umrechnung in Minuten die jeweiligen Maxima der ROS-Produktion (Tmax-ROS) zu jedem Kanal.

Bei allen über das LEICA-Mikroskop erfassten Fluoreszenzwerten wurde die vor Mikroskop-Start abgelaufene Inkubationszeit addiert.

Alle exportierten Migration-Parameter wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefügt und direkt in der Statistik Software SPSS betrachtet.

### 3.2.3 Phoenix

Aus den bearbeiteten Excel-Tabellen wurden mittels der Software Phoenix 64 (Version 8.0.0) sigmoidale Kurven erstellt. Diese zeigten die Summe aller als DAPI/MPO erkannten Flächen pro Zeitpunkt. Für jeden dieser Kurvenverläufe wurden dann die Parameter ET50- (halbmaximales Wachstum der maximalen Flächensummen), E0- (initiale Effekthöhe), Emax- (maximale Effekthöhe) und  $\gamma$ -Wert (Synchronität der NETose) bestimmt. Diese wurden mittels Populationsanalyse an den jeweiligen Verlauf angepasst und mit der folgenden Formel berechnet.

$$E = E0 + \frac{Emax * T^\gamma}{(ET_{50}^\gamma + T^\gamma)}$$

*Formel 3: An Michaelis-Menten angelehnte Funktion zur Beschreibung des sigmoidalen Kurvenverlaufes der MPO- oder DAPI-Freisetzung.*

Der für diese Arbeit relevante Parameter war dabei der ET50-Wert. Anhand dessen ließ sich auf das zeitliche Maximum der Granulozyten-Aktivität rückschließen. Diese Methodik wurde bereits in vorangegangen Studien der Klinik für Anästhesiologie am UKR verwendet und beschrieben (54–56).

### 3.2.4 FlowJo

Die Software FlowJo v X.0.7 ermöglichte es, die in dem Durchflusszytometer mittels CellQuest Pro gesammelten Daten zu analysieren.

Zunächst wurden die PMNs aufgrund von Größe und Granularität identifiziert und die restlichen Zellen, vor allem Lymphozyten und Monozyten, ausgeschlossen. In einem weiteren Schritt wurden dann alle toten Zellen, welche aufgrund der Anfärbung durch Propidiumjodid identifiziert wurden, durch setzen von „Gates“ exkludiert (s. Abbildung 11). Die im „Burst Modus“ gemessene Intensität des durch die ROS-Produktion entstandenen Rhodamin123 wurde dann für die Gesamtheit der vorhandenen lebenden Granulozyten aufgrund einer nicht normalverteilten PMNs „Wolke“ (siehe Abbildung 11: 3. Gate) als Median berechnet und für jede Messung als Excel-Datei exportiert. In den entstandenen Tabellen wurden aus den Doppelmessungen der Mittelwert berechnet. Von allen PMA- oder fMLP-aktivierten PMNs-Messergebnissen wurde jeweils der zugehörige Kontrollwert abgezogen. Die fertige Datei wurde dann in SPSS ausgewertet.

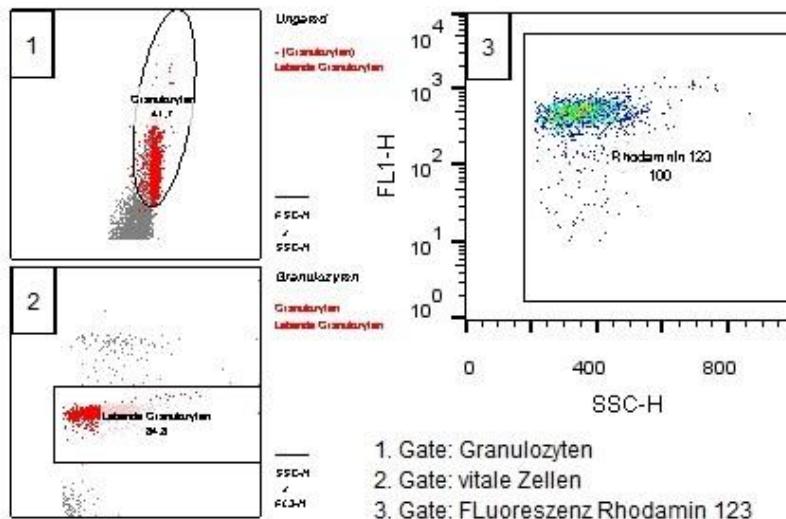


Abbildung 11: Beispielhafte Auswertung der Burst-Daten, 1. Gate: Markierung der Granulozyten-Wolke, 2. Gate: Markierung der vitalen Zellen, 3. Gate: Werte der Rhodamin-123-Fluoreszenz.

Die Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper an Oberflächenproteine wurde ebenfalls durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert und nach demselben Verfahren im FlowJo nach PMNs gefiltert. Anschließend wurde die Expression der Oberflächenproteine durch die gemessenen Intensitätsunterschiede der gekoppelten Farbstoffe quantifiziert (Abbildung 12).

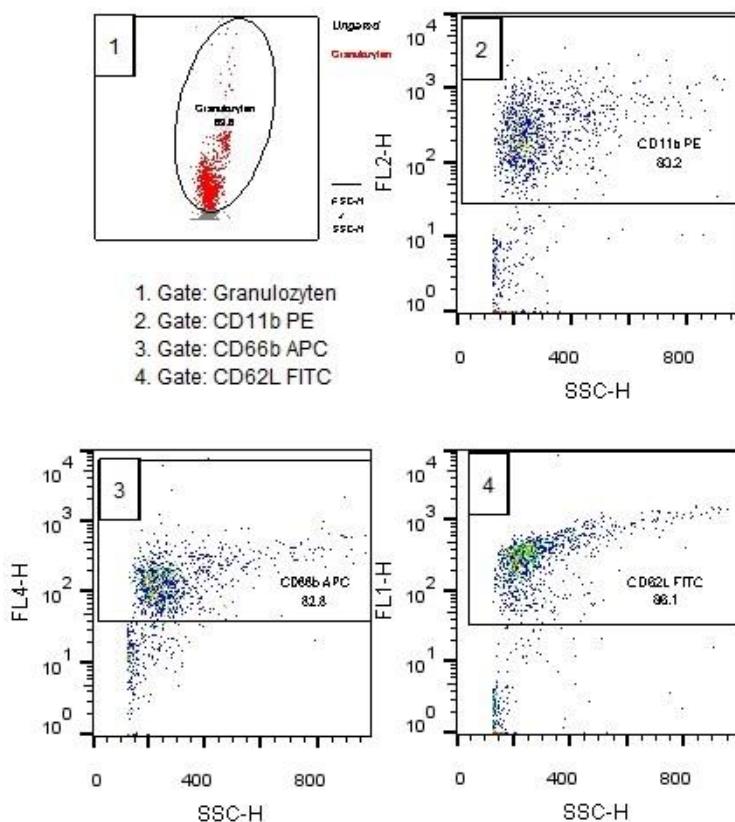


Abbildung 12: Beispielhafte Auswertung der drei verschiedenen Antikörper. 1. Gate: Markierung der Granulozyten Wolke, 2. Gate: Markierung der an den CD11b Antikörper gekoppelten Farbstoff PE, 3. Gate: Markierung der an den CD66b Antikörper gekoppelten Farbstoff APC, 4. Gate: Markierung der an den CD62L Antikörper gekoppelten Farbstoff FITC

An jeden der spezifischen Antikörper war ein anderer Farbstoff gekoppelt. Diese wurden in verschiedenen Längenwellenbereichen mittels Filter (abs.) angeregt, durch einen Bandpass-Filter (em.) aufgetrennt und letztlich an einer Photomultiplier-Diode gemessen. In Tabelle 5 sind die genauen Wellenlängenbereiche und Farbstoffdaten aufgelistet.

Tabelle 5: Längenwellenbereiche der Anregung mithilfe eines Lasers (abs.) plus Filter (em.) der Antikörper-gekoppelten Farbstoffe Phycoerythrin, Allophycocyanin, Fluoresceinisothiocyanat.

	CD11b	CD66b	CD62l
<b>Farbstoff</b>	Phycoerythrin (PE)	Allophycocyanin (APC)	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)
<b>Laser</b>	abs. 488 nm	abs. 635 nm	abs. 488 nm
<b>Bandpass-filter</b>	em. 585/42 nm	em. 661/16 nm	em. 530/30 nm

Nach dem Konvertieren und Bearbeiten in Excel wurden diese Daten zur statistischen Auswertung in SPSS importiert.

### 3.2.5 SPSS

Alle Excel-Tabellen mit den Daten aus den FACS- und LEICA Mikroskop-Versuchsreihen wurden in die Software IBM SPSS Statistics 25 zur statistischen Auswertung importiert. Von allen Daten wurden nur die als auswertbar markierten Versuche analysiert. Für die Migrationsdaten wurden zusätzlich alle Tracks mit einer Track Length kleiner 12 µm ausgeschlossen, was dem Durchmesser eines Granulozyten entsprach. Damit wurden alle bewegungslosen Zellen herausgefiltert. Eine weitere Voraussetzung war eine Track Duration über 900 s, um Zellen, welche nur kurzzeitig auf der erfassten Oberfläche erschienen und sich wieder aus der Fotoebene entfernten, nicht einzuberechnen.

Die statistische Signifikanz wurde für einen p - Wert < 0,05 angenommen. Zunächst wurden alle Datengruppen mit Hilfe des Kolmogorov – Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Für die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Parametern wurde aufgrund der Verteilungsfreiheit, der Kruskal – Wallis-Test und die One - Way - Anova verwendet. In Mehrfachvergleichen wurde die Bonferroni - Korrektur angewandt. Zusätzlich wurden zur graphischen Veranschaulichung Boxplots erstellt. Die „Box“ wird durch das 25. Perzentil (kleinster Nichtausreißer) als untere Begrenzung und durch das 75. Perzentil (größter Nichtausreißer) als obere Begrenzung gebildet. Somit enthält sie 50 % der erfassten Daten. Die Länge dieser Box entspricht dem Interquartilsbereich (IQR). Die „T-Balken“ entsprechen dem 1,5-fachen IQR. Die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern. Alle Werte außerhalb dieses Bereiches werden als Sterne abgebildet und zeigen Extremwerte.

Insgesamt wurden 31 Einzelversuche unter dem Leica Inversionsmikroskop mit je drei Kanälen ausgewertet. Dabei waren 18 nur mit Propofol (Propofol-Versuchsreihe) und 13 mit Propofol und LPS (LPS-Versuchsreihe) durchgeführt worden.

Es wurden 15 Durchflusszytometer-Versuche für die Burst-Messungen und fünf für die Oberflächenprotein-Messungen durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

Die Ergebnisse aus der statistischen Auswertung mittels SPSS der Daten aller Versuche wurden im Folgendem beschrieben. Dabei wurde zunächst der Einfluss von Propofol auf die Aktivität der PMNs betrachtet sowie der Einfluss unterschiedlicher fMLP-Konzentrationen als Lockstoff. Im Anschluss wurde die Veränderung der Ergebnisse durch den Einfluss von LPS analysiert. Zuletzt erfolgte die statistische Auswertung der quantitativen Beeinflussung der Funktionen der PMNs durch Propofol. Die Tabelle 6 zeigt zunächst eine Zusammenfassung der Eigenschaften aller Probanden.

*Tabelle 6: Eigenschaften der Probanden. Die Werte für Alter, Größe, Gewicht und BMI sind Mittelwerte, die Werte in Klammern entsprechen dem jeweiligen Minimal- bzw. Maximalwert.*

Eigenschaft	Wert
Anzahl an Probanden	34
Geschlecht	21 weiblich, 13 männlich
Alter (Jahre)	29 (21-59)
Größe (cm)	172 (158-196)
Gewicht (kg)	66 (50-101)
BMI	22,2 (17,9-28,1)

### 4.1 Einfluss verschiedener Propofol- und LPS-Konzentrationen auf die Migration von PMNs

Alle Ergebnisse unter dem Punkt 4.1.1 beziehen sich auf eine fMLP-Ausgangskonzentration von 10 µM im linken Reservoir. Unter 4.1.2 wurden anschließend die Ergebnisse mit einer 10 nM fMLP-Konzentration als Vergleichswerte betrachtet.

#### 4.1.1 Effekte von Propofol auf die Migration

Die verwendeten Ausschlusskriterien und Filter wurden unter 3.2.5 beschrieben.

Daraus resultierten 15 auswertbare Versuche für Propofol = 6 µg/mL und 14 auswertbare Versuche für Propofol = 60 µg/mL. Die Zahl der Kontrollwerte konnte durch ein Einbeziehen der LPS-Versuchsreihe (siehe Abbildung 1) auf 26 erhöht werden. Insgesamt ergab dies die in

der Tabelle 7 dargestellten Zahlen der erfassten PMNs-Tracks pro Zeit-Frame je Versuch. Innerhalb des 0 – 30 min Zeit-Frames konnten im Schnitt 352 Tracks erfasst werden. Es zeigte sich, dass unter dem Einfluss von Propofol im Laufe der Mikroskop- Aufnahmen die Zahl der erkannten PMNs abnahm.

*Tabelle 7: Mittlere Zellzahlen pro Zeit Frame in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60 mg/mL). Für Propofol = 0 µg/mL konnten zwischen 26- 25 Versuche pro Zeit Frame herangezogen werden, für Propofol = 6 µg/mL zwischen 15-14 Versuche pro Zeit Frame und für Propofol = 60 µg/mL 14 Versuche pro Zeit Frame.*

<b>ZEIT FRAME</b>	<b>0 – 30 min</b>	<b>31 – 60 min</b>	<b>61 – 90 min</b>
<b>0 µg/mL Propofol</b>	320	320	336
<b>6 µg/mL Propofol</b>	401	371	349
<b>60 µg/mL Propofol</b>	335	199	149

#### 4.1.1.1 Track Length (TL)

Die mediane TL der mit 6 oder 60 µg/mL Propofol inkubierten PMNs unterschied sich in allen betrachteten Zeit-Frames signifikant von den TLs der Kontrollgruppe. In dem Zeit Frame 31 – 60 min war der Unterschied der TL zwischen 6 µg/mL und 60 µg/mL Propofol bei  $p = 0,011$  signifikant. In allen anderen Zeit-Frames unterschieden sich die medianen Werte der TL mit  $p < 0,001$  signifikant zwischen 6 µg/mL, 60 µg/mL Propofol- und Kontrollwert.

Wie in Abbildung 13 zu sehen, führte eine Inkubation der PMNs mit Propofol konzentrationsabhängig zu einem Abfall der TL-Mediane der PMNs im Vergleich zum Kontrollwert in allen drei Zeit-Frames.

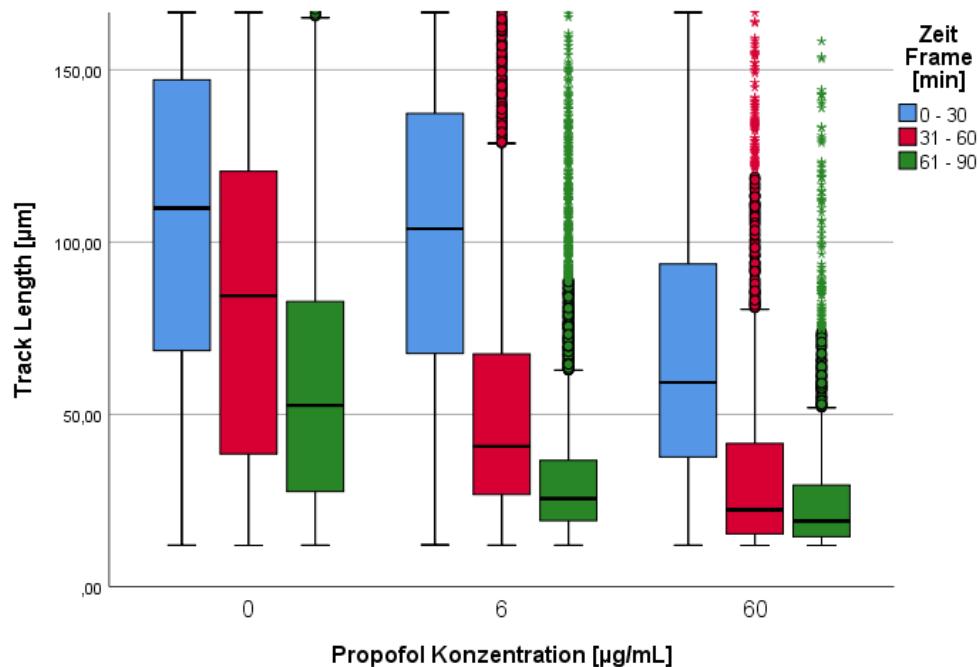


Abbildung 13: Track Length [ $\mu\text{m}$ ] abhängig von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] je Zeit-Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Zeit-Frames. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 26$ ,  $n(6 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 15$ ,  $n(60 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 14$ , individuelle Zellzahlen pro Zeitframe siehe Tabelle 7

In der Kontrollgruppe sind die Mediane der TL nach 60 min um 25,5  $\mu\text{m}$  im Vergleich zum 0 – 30 min Zeit-Frame gesunken (Tabelle 8). Dies entsprach einem relativen Abfall von 23 % innerhalb der ersten Stunde. Bei einer Präinkubation mit 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol fiel der Median der TL vom 0 – 30 min zum 31 – 60 min Zeit-Frame um 61 % ab und damit signifikant schneller als in der Kontrollgruppe. Ein ähnlicher Effekt konnte unter der zehnfachen Menge an Propofol (62 %,  $p < 0.001$ ) beobachtet werden. Auch zu Beginn der Messungen gab es eine Differenz der medianen TL der PMNs zwischen Kontrollwert und 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol von 46 % (Tabelle 8).

Tabelle 8: Mediane der Track Length [ $\mu\text{m}$ ], erste drei Zeit-Frames [min], in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].

		<b>Propofol</b>	<b>Propofol</b>	<b>Propofol</b>
		<b>0 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>6 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>60 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>
<b>Track Length (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	0 – 30 min	110	104	59,3
	31 – 60 min	84,4	40,7	22,3
	61 – 90 min	52,6	25,5	19,1

#### 4.1.1.2 Track Displacement X und Y

Die PMNs zeigten innerhalb des beobachteten Zeitfensters und unabhängig von der Propofol-Konzentration kaum gerichtete Bewegung in X - oder Y - Richtung. Die Mediane der TDX und TDY streuten um Null (Abbildung 14).

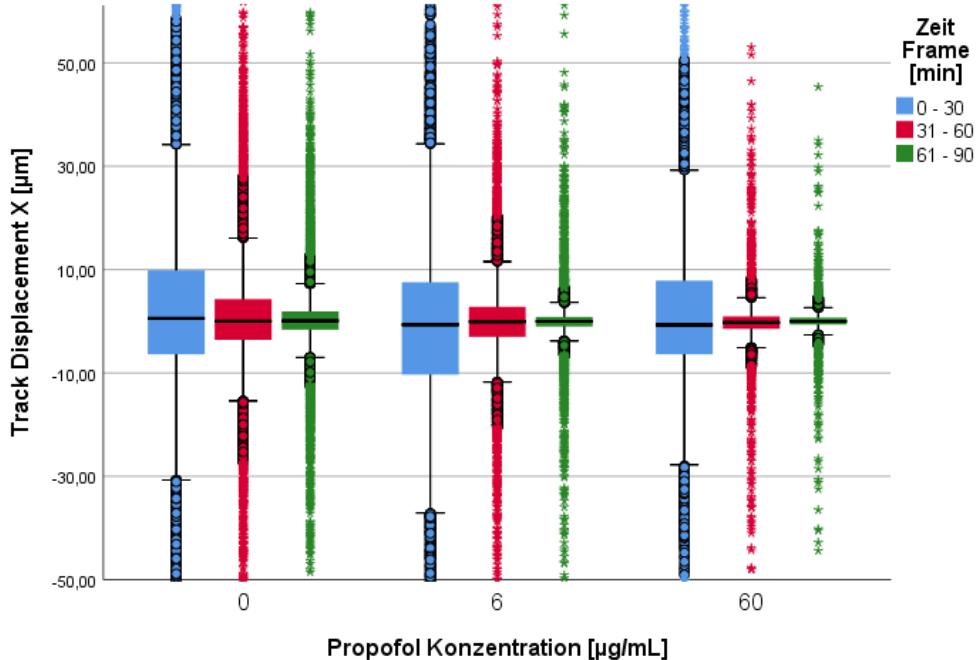


Abbildung 14: Track Displacement in X- Richtung [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit Frames [min]. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 26$ ,  $n(6 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 15$ ,  $n(60 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 14$ , individuelle Zellzahlen pro Zeitframe siehe Tabelle 7

Der Kruskal-Wallis-Test ergab im 0 – 30 min Zeit-Frame signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) zwischen den Werten, die mit den beiden Propofol-Konzentrationen erzielt wurden und dem Kontrollwert für die Mediane der TDX. Die Abbildung 14 zeigte, dass es sich hierbei um keine zentrale Richtung handelte. Auch in den folgenden Zeit-Frames variierten die Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Medianen der TDX der Propofol-Gruppen ohne eine eindeutige Richtung.

Auch die Ergebnisse für TDY waren mit abwechselnd signifikanten Unterschieden keiner bestimmten Richtung zuzuordnen (Abbildung 15).

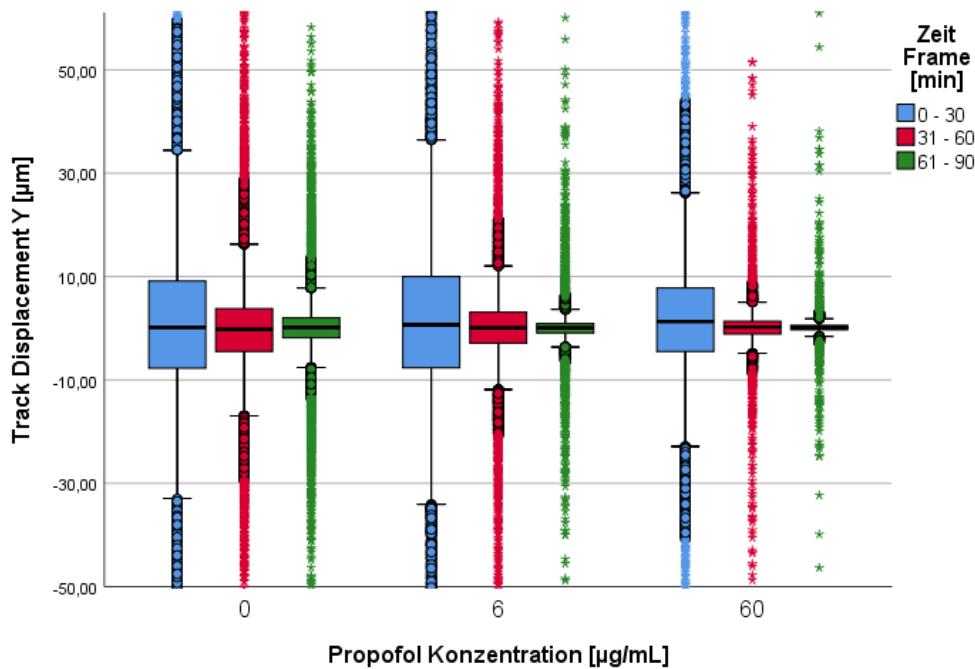


Abbildung 15: Track Displacement in Y- Richtung [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit Frames [min]. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 26$ ,  $n(6 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 15$ ,  $n(60 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 14$ , individuelle Zellzahlen pro Zeitframe siehe Tabelle 7

#### 4.1.1.3 Track Displacement Length (TDL)

Die Mediane der TDL in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration und des Zeit-Frames wurden in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Mediane der Track Displacement Length [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit-Frames [min].

		Propofol 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Propofol 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Propofol 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$
TDL [ $\mu\text{m}$ ]	0 – 30 min	17	17	13
	31 – 60 min	8,6	5,7	2,4
	61 – 90 min	3,9	1,7	0,9

Die mit 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol inkubierten PMNs verzeichneten dabei einen um 16 % stärkeren Abfall der TDL-Mediane als die PMNs der Kontrollgruppe. Die Unterschiede der TDL-Mediane zwischen den beiden Propofol-Gruppen und der Kontrollgruppe waren bis auf eine

Ausnahme (0 – 30 min Zeit Frame, zwischen 0 und 6 µg/mL Propofol) signifikant ( $p < 0,001$ ). Aus der Abbildung 16 wurde ersichtlich, dass eine Inkubation mit Propofol die TDL-Mediane der PMNs tendenziell absenkte.

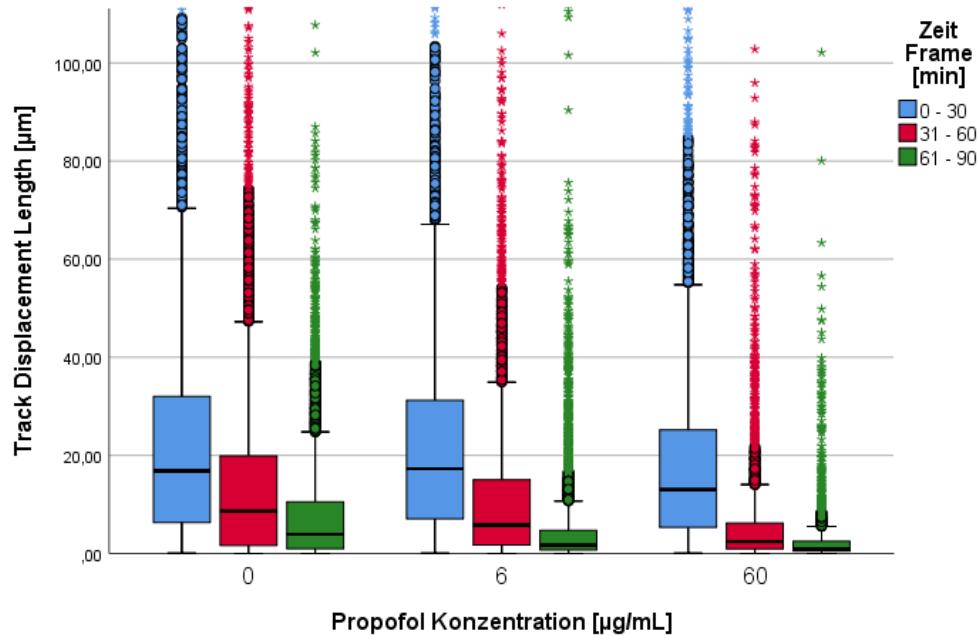


Abbildung 16: Track Displacement Length [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit-Frames [min]. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 26$ ,  $n(6 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 15$ ,  $n(60 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 14$ , individuelle Zellzahlen pro Zeitframe siehe Tabelle 7

#### 4.1.1.4 Track Speed Mean (TSM)

Die Mediane der TSM beider Propofol-Konzentrationen unterschieden sich innerhalb der drei Zeit-Frames sowohl untereinander als auch von denen der Kontrollwerte signifikant mit  $p < 0,001$  (Tabelle 10).

Tabelle 10: Mediane der Track Speed Mean [ $\mu\text{m}/30\text{min}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ], innerhalb der ersten drei Zeit-Frames.

	<b>Propofol</b>	<b>Propofol</b>	<b>Propofol</b>
	<b>0 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>6 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>60 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>
<b>Track Speed</b>	0 – 30 min	135	115
<b>Mean (<math>\mu\text{m}/30\text{min}</math>)</b>	31 – 60 min	104	43,2
	61 – 90 min	59,4	27,0
			19,8

Es konnte eine von der Propofol-Konzentration abhängige Verlangsamung der PMNs Track Speed Mean beobachtet werden. Zudem nahm die Mediane Track Speed Mean der PMNs innerhalb des Beobachtungszeitraumes unabhängig von der Propofol-Konzentration ab, jedoch signifikant schneller unter Propofol Einfluss.

#### 4.1.2 Einfluss von fMLP auf die Migration Propofol-exponierter PMNs

Der Einfluss der fMLP-Konzentration auf die granulozytäre Migration wurde hier an den Parametern Track Length und Track Displacement X exemplarisch dargestellt. Die Ergebnisse zu den übrigen Parametern TDY, TDL und TSM wurden tabellarisch im Anhang aufgeführt. Es wurden drei Versuche mit einer Ausgangskonzentration von 10 nM fMLP im linken Reservoir durchgeführt. Für die Beurteilung der Migration der PMNs konnten zwei Versuche ausgewertet werden.

Unter dem Einfluss von 10 nM fMLP unterschied sich die mediane TL der PMNs mit  $p = < 0,001$  innerhalb der beiden Propofol-Konzentrationen und zu der Kontrollgruppe signifikant in allen betrachteten Zeit-Frames. Im ersten Zeit-Frame war die TL der PMNs unter 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol um 43 % geringer als in der Kontrollgruppe (Tabelle 11).

Insgesamt konnte eine Reduktion der TL durch den Propofol-Einfluss beobachtet werden.

Tabelle 11: Mediane der Track Length [ $\mu\text{m}$ ], erste drei Zeit-Frames [min], in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g/mL}$ ], fMLP-Konzentration = 10 nM

		<b>Propofol</b> <b>0 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Propofol</b> <b>6 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Propofol</b> <b>60 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>
<b>Track</b>	0 – 30 min	51	29	38
<b>Length</b>	31 – 60 min	64	25	32
<b>(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	61 – 90 min	59	26	45

Der Vergleich der TL-Mediane zwischen den PMNs der beiden fMLP-Konzentrationen 10 nM und 10  $\mu\text{M}$  führte zu signifikanten Unterschieden ( $p < 0,001$ , Ausnahme: Zeit Frame 31-60 min, Propofol = 0  $\mu\text{g/mL}$ :  $p = 0,037$ ) bei separater Betrachtung aller Propofol-Konzentrationen und Zeit-Frames. Unter beiden fMLP-Konzentrationen führte Propofol zu einer Absenkung der medianen TL. Unter fMLP = 10 nM und Propofol = 60  $\mu\text{g/mL}$  stieg die mediane TL der PMNs im Vergleich zu den mit Propofol = 6  $\mu\text{g/mL}$  inkubierten PMNs wieder an.

Die Abbildung 17 zeigt exemplarisch den Vergleich der TL der PMNs unter dem Einfluss der fMLP- Konzentrationen 10 nM und 10  $\mu\text{M}$  innerhalb des Zeit Frames 31 – 60 min.

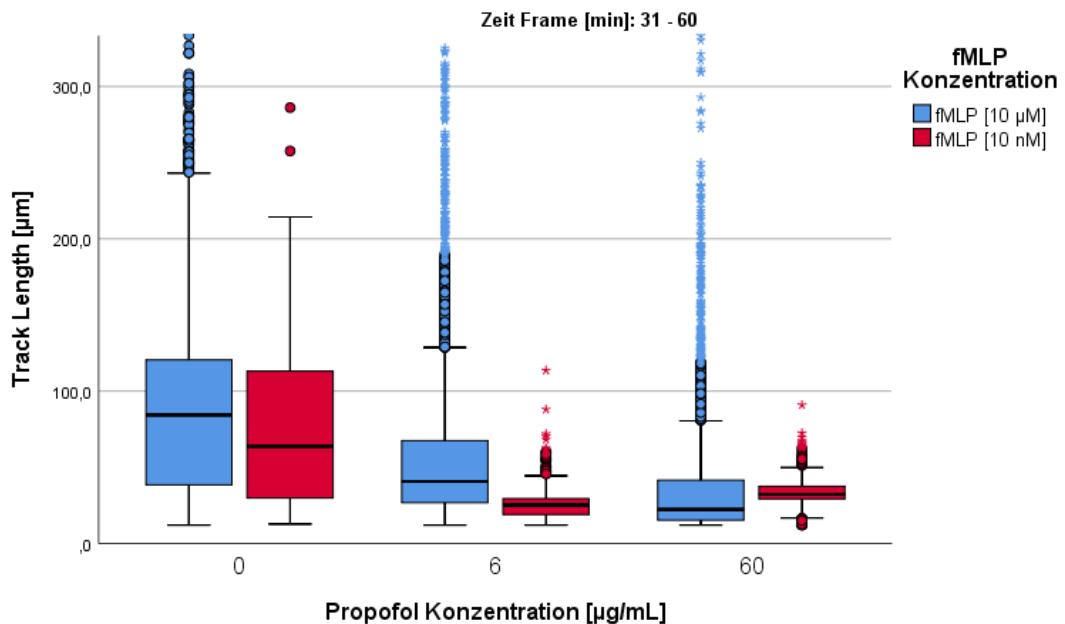


Abbildung 17: Track Length ( $\mu\text{m}$ ) in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60  $\mu\text{g/mL}$ ), aufgeteilt nach fMLP (10  $\mu\text{M}$  und 10 nM), innerhalb des Zeit-Frames 31 – 60 min. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(10 \text{ nM fMLP}) = 2$ .  $n(10 \mu\text{M fMLP})$  je  $n(0 \mu\text{g/mL Propofol}) = 26$ ,  $n(6 \mu\text{g/mL Propofol}) = 15$ ,  $n(60 \mu\text{g/mL Propofol}) = 14$

Die Betrachtung der medianen TDX unter dem Einfluss von 10 nM fMLP zeigte eine durch Propofol reduzierte Bewegung in X- Richtung (Abbildung 18).

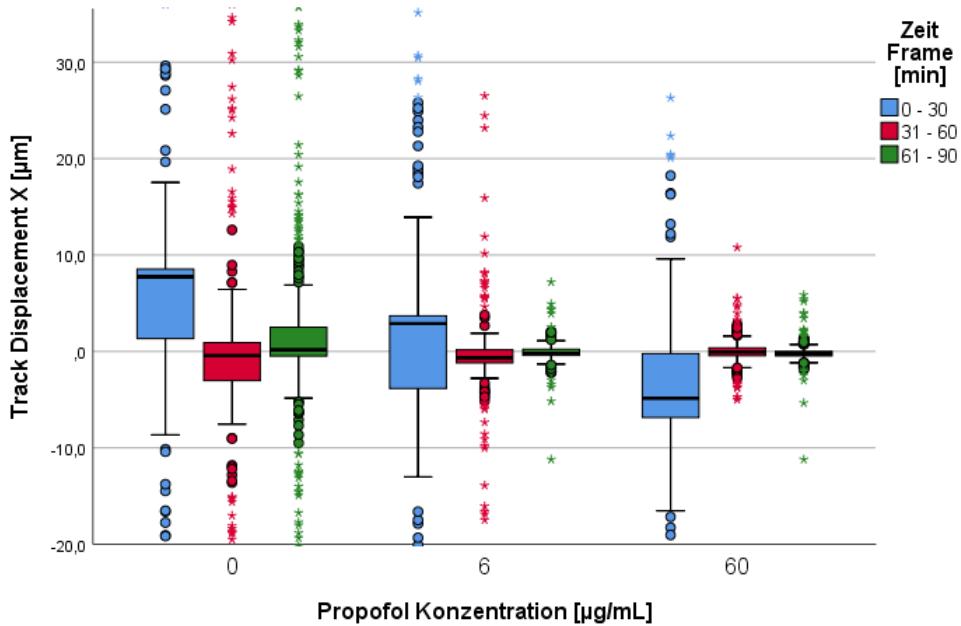


Abbildung 18: Track Displacement in X- Richtung [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit-Frames [min]. fMLP-Konzentration = 10 nM. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(10 \text{ nM fMLP}) = 2$

Innerhalb des ersten Zeit-Frames unterschied sich die TDX-Mediane beider Propofol-Gruppen signifikant vom Kontrollwert. In den übrigen Zeit-Frames waren nur teilweise signifikante Unterschiede zu beobachten.

Ein ähnliches Ergebnis lieferte der Vergleich der TDX-Mediane der PMNs nach Stimulation mit den fMLP-Konzentrationen 10 nM und 10  $\mu\text{M}$ . Im Zeit Frame 0 – 30 min unterschieden sich diese, aufgeteilt nach der Propofol-Konzentration, signifikant ( $p = <0,001$  bis 0,039) voneinander. In den nachfolgenden Zeit-Frames gab es nur noch vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den TDX-Werten, die mit den beiden fMLP-Konzentrationen erzielt wurden (Abbildung 19).

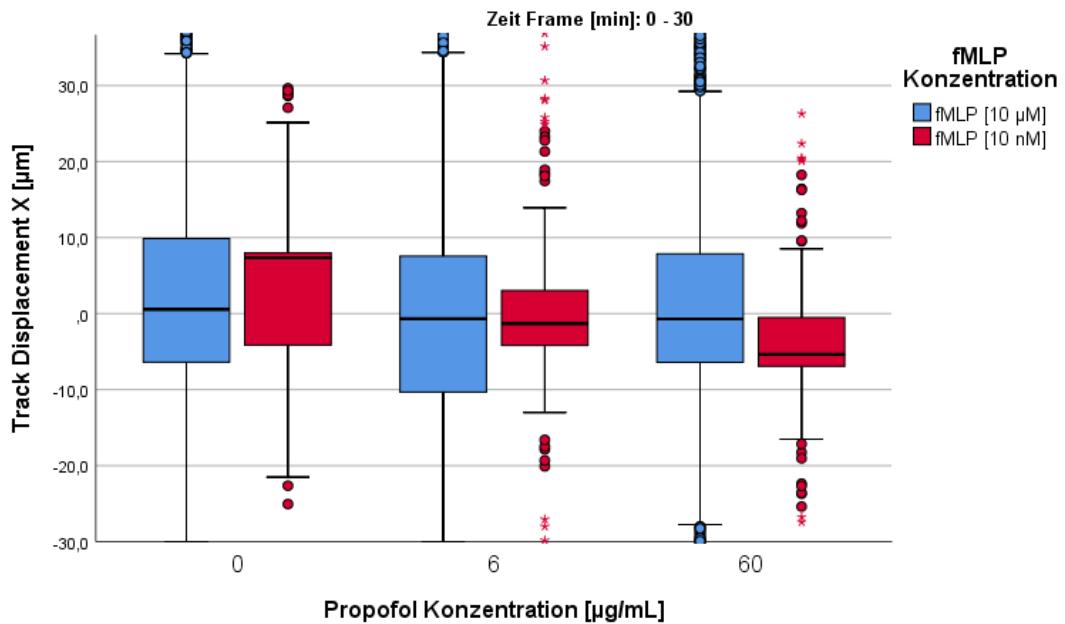


Abbildung 19: Track Displacement in X- Richtung [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] innerhalb des 0 – 30 min Zeit Frames. Vergleich der fMLP-Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 10 nM. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(10 \text{ nM fMLP}) = 2$ .  $n(10 \mu\text{M fMLP})$  je  $n(0 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Propofol}) = 26$ ,  $n(6 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Propofol}) = 15$ ,  $n(60 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Propofol}) = 14$

#### 4.1.3 Einfluss von LPS auf die Migration Propofol-exponierter PMNs

Die je Konzentration durchgeführten Versuche sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Anzahl der pro Kombination aus Propofol [0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] und LPS [0 – 40 – 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] durchgeführten Versuche.

	LPS 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	LPS 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$	LPS 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Propofol 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	26	6	7
Propofol 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15	3	4
Propofol 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$	14	3	3

##### 4.1.3.1 Track Length

Ohne eine vorangegangene Inkubation mit Propofol war im Boxplot, mit zunehmender LPS-Konzentration eine leichte Tendenz der TL-Mediane der PMNs nach oben zu beobachten (Abbildung 20).

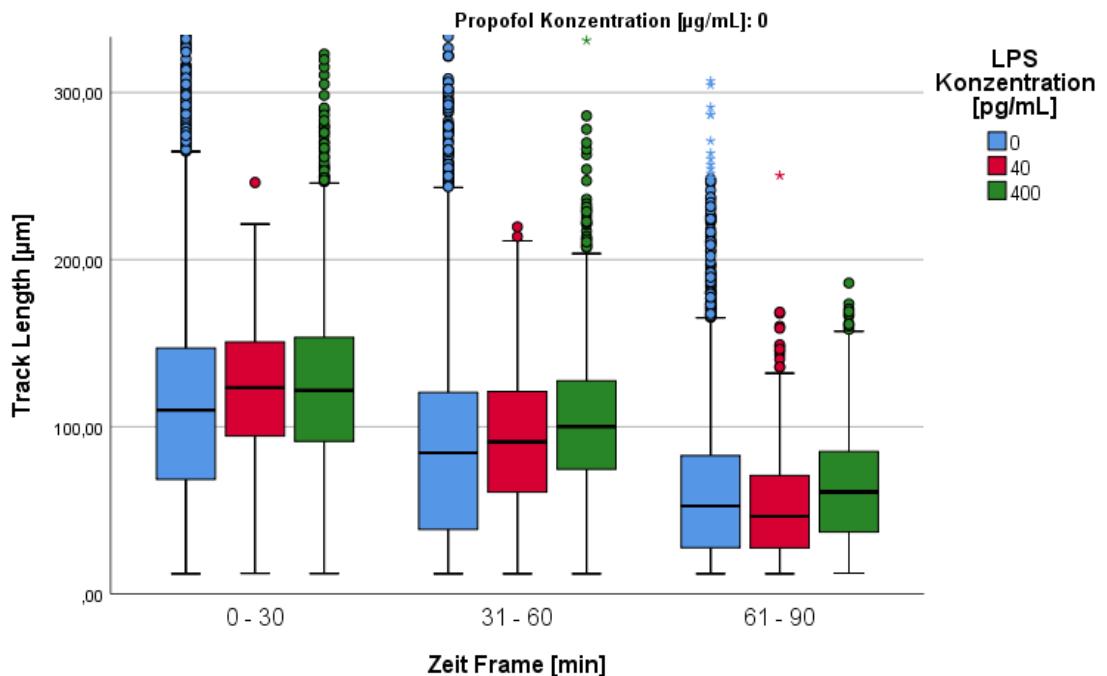


Abbildung 20: Track Length [ $\mu\text{m}$ ] abhängig von der LPS-Konzentration [0 – 40 – 400 pg/mL] je Zeit-Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Frames mit einer Propofol-Konzentration von 0  $\mu\text{g/mL}$ . Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \text{ pg/mL LPS}) = 26$ ,  $n(40 \text{ pg/mL LPS}) = 6$ ,  $n(400 \text{ pg/mL LPS}) = 7$

Die Mediane der TL (Tabelle 13) bestätigten diese unter LPS-Einfluss nach oben gerichtete Tendenz nur teilweise. Innerhalb der drei Zeit-Frames unterschieden sich die TL-Mediane der PMNs unter beiden LPS-Konzentrationen signifikant von denen des Kontrollwertes ( $p < 0,001$ ). Gleichzeitig führten 40 pg/mL LPS zu einem stärkeren Abfall der medianen TL der PMNs innerhalb des betrachteten Zeitfensters innerhalb einer PMNs-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Innerhalb der 0 – 90 min fiel die TL ohne LPS im Schnitt um 53 % im Vergleich zum Startwert. Mit 40 pg/mL LPS sank die TL hingegen um 62% im selben Zeitraum. Die zehnfache LPS-Konzentration führte zu einer Senkung um 50 % innerhalb der drei Zeit-Frames.

Tabelle 13: Mediane der Track Length [ $\mu\text{m}$ ] unter LPS-Einfluss und ohne Propofol aufgeteilt nach drei 30-minütigen Frames.

		LPS 0 pg/mL	LPS 40 pg/mL	LPS 400 pg/mL
<b>Track</b>	0 – 30 min	109,9	123,4	121,7
<b>Length</b>	31 – 60 min	84,4	91	100
<b>(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	61 – 90 min	52,6	46,4	61

Unter dem Einfluss von Propofol (6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) zeigte sich insgesamt, wie bereits unter 4.1.1.1 beschrieben, eine Senkung der TL-Mediane. Die Zugabe von LPS hatte keinen Effekt auf diese Senkung (Abbildung 21).

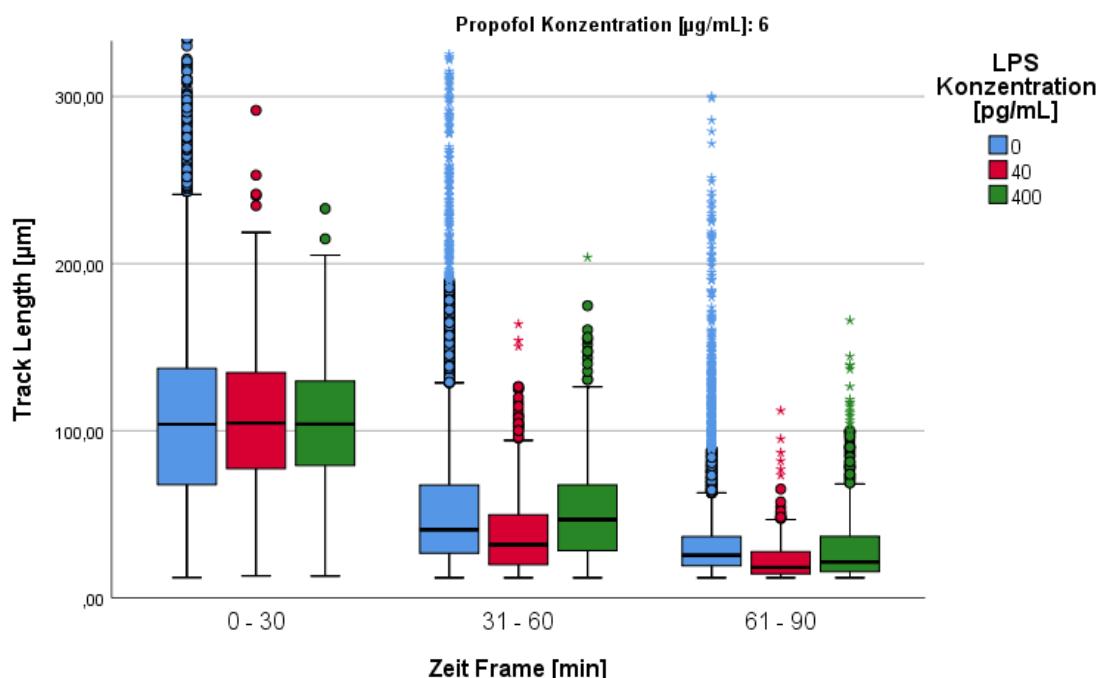


Abbildung 21: Track Length [ $\mu\text{m}$ ] abhängig von der LPS-Konzentration [0 – 40 – 400 pg/mL] je Zeit-Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Frames mit einer Propofol-Konzentration von 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \text{ pg/mL LPS}) = 15$ ,  $n(40 \text{ pg/mL LPS}) = 3$ ,  $n(400 \text{ pg/mL LPS}) = 4$

Die Betrachtung der Mediane der TL (Tabelle 14) zeigte, dass der Zusatz von LPS unter der Propofol-Konzentration von 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  keinen weiteren Einfluss auf die TL der PMNs hatte. Die Werte für die drei LPS-Kategorien unterschieden sich innerhalb des 0 – 30 min Zeit-Frames

nach dem Kruskal – Wallis-Test nicht signifikant. Die Signifikanzen für die 31 – 60 und 61 – 90 min Zeit-Frames variierten ohne gerichtete Tendenz.

Tabelle 14: Mediane der Track Length ( $\mu\text{m}$ ) mit 6  $\mu\text{g/mL}$  Propofol in Abhängigkeit von der LPS-Konzentraion (0 – 40 – 400  $\mu\text{g/mL}$ ) innerhalb der ersten eineinhalb Stunden

		LPS 0 $\mu\text{g/mL}$	LPS 40 $\mu\text{g/mL}$	LPS 400 $\mu\text{g/mL}$
Track	0 – 30 min	104	105	104
Length	31 – 60 min	40,7	31,8	46,9
( $\mu\text{m}$ )	61 – 90 min	25,5	18,2	21,4

Die Ergebnisse zur TL der PMNs aus der Gruppe der 60  $\mu\text{g/mL}$  Propofol-Konzentration wiesen eine, abhängig von der LPS-Konzentration, höhere TL im 0 – 30 min Zeit-Frame auf (Abbildung 22).

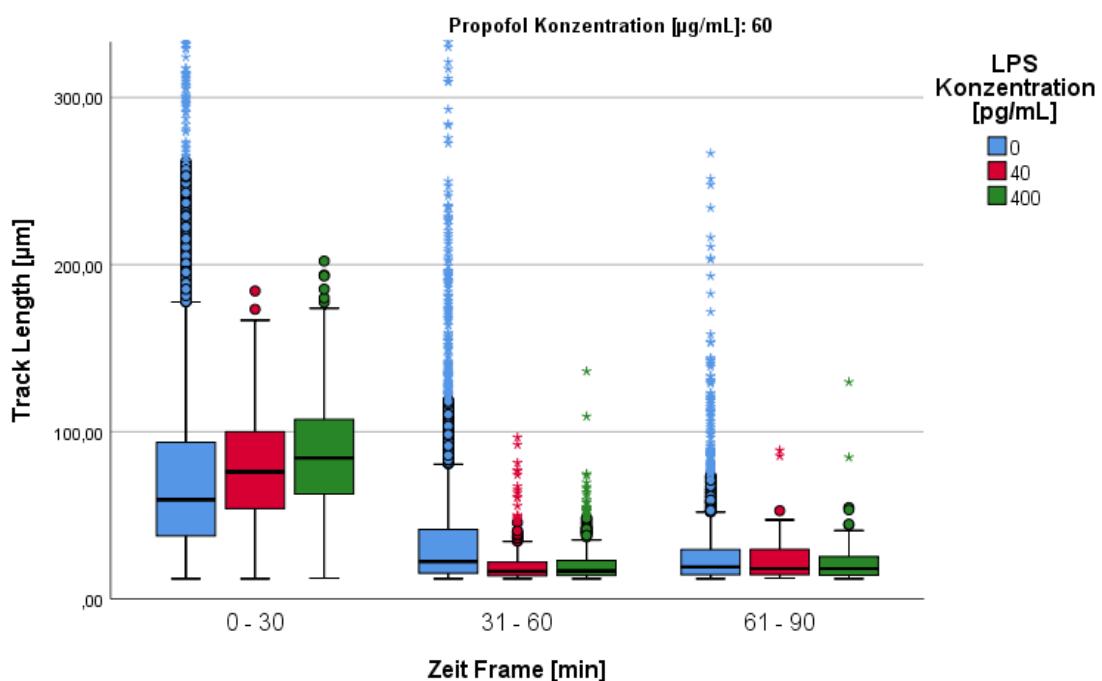


Abbildung 22: Track Length [ $\mu\text{m}$ ] abhängig von der LPS-Konzentration [0 – 40 – 400  $\mu\text{g/mL}$ ] je Zeit-Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Frames mit einer Propofol-Konzentration von 60  $\mu\text{g/mL}$ . Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \mu\text{g/mL} \text{ LPS}) = 14$ ,  $n(40 \mu\text{g/mL} \text{ LPS}) = 3$ ,  $n(400 \mu\text{g/mL} \text{ LPS}) = 3$

Dieser Einfluss beschränkte sich nur auf den 0 – 30 min Zeit-Frame, in welchem eine um 30 % erhöhte TL der PMNs in Anwesenheit von 400 pg/mL LPS im Vergleich zum Kontrollwert beobachtet werden konnte (Tabelle 15). In diesem Zeitfenster unterschied sich die TL aller LPS-Gruppen nach Kruskal - Wallis mit  $p < 0.001$  signifikant. Im 31 – 60 min Zeit-Frame unterschied sich die mediane TL der PMNs der beiden LPS-Gruppen vom Kontrollwert ( $p < 0.001$ ), diese aber nicht mehr untereinander. Die TL der PMNs sank innerhalb dieses Zeit-Frames abhängig von der LPS-Konzentration. Im 61 – 90 min Zeit Frame gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den TL Medianen der PMNs der LPS-Kategorien.

*Tabelle 15: Mediane der Track Length ( $\mu\text{m}$ ) mit 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol in Abhängigkeit von der LPS-Konzentraion (0 – 40 – 400 pg/mL) innerhalb der ersten eineinhalb Stunden*

		LPS 0 pg/mL	LPS 40 pg/mL	LPS 400 pg/mL
Track Length ( $\mu\text{m}$ )	0 – 30 min	59,3	76	84,3
	31 – 60 min	22,3	16,4	16,7
	61 – 120 min	19	18,1	18

Innerhalb des 31 – 60 min Zeit-Frames gab es einen Einbruch der TL der PMNs unter dem Einfluss von Propofol. Dieser wurde durch die Kombination mit LPS maßgeblich verstärkt (Abbildung 24).

Die Abbildung 23 zeigt die Abnahme der TL unter steigender Propofol-Konzentration ohne LPS.

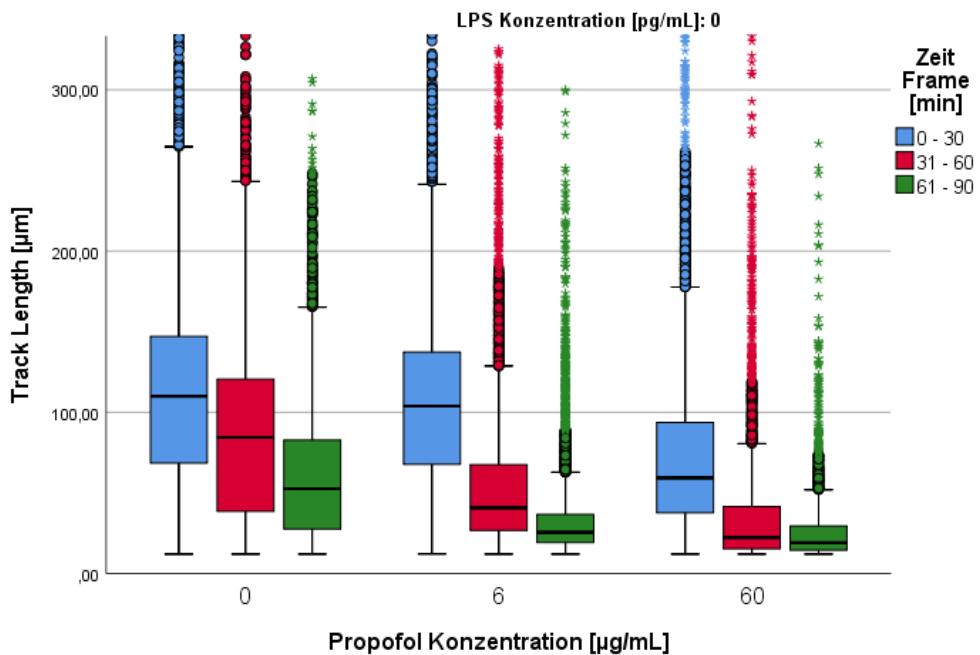


Abbildung 23: Track Length [ $\mu\text{m}$ ] abhängig von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g/mL}$ ] je Zeit-Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Frames mit einer LPS-Konzentration von 0 pg/mL. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \mu\text{g/mL} \text{ Propofol}) = 26$ ,  $n(6 \mu\text{g/mL} \text{ Propofol}) = 15$ ,  $n(60 \mu\text{g/mL} \text{ Propofol}) = 14$

In Abbildung 24 sieht man im Vergleich dazu die Reduktion der TL in Anwesenheit von 40 pg/mL LPS.

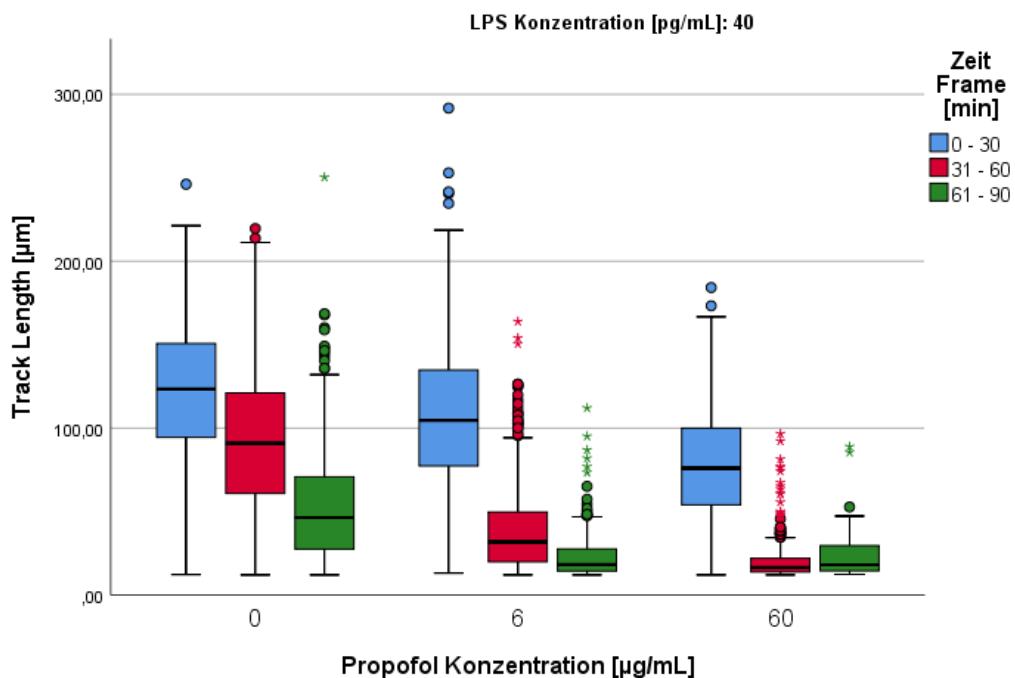


Abbildung 24: Track Length [ $\mu\text{m}$ ] abhängig von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] je Zeit-Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Frames mit einer LPS-Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte.  $n(0 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Propofol}) = 6$ ,  $n(6 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Propofol}) = 3$ ,  $n(60 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Propofol}) = 3$

Die TL der PMNs sank vom Zeit-Frame 0 – 30 min zum Zeit-Frame 31 – 60 min durch 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol um 61%, also um 38 % mehr als im Kontrollwert (Tabelle 8). Unter dem zusätzlichen Einfluss von 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS lag die Abnahme bei 70 % unter 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol im Vergleich zum Kontrollwert innerhalb desselben Zeitfensters. Mit 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol fiel der TL auf insgesamt 78 % unter den gleichen Bedingungen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Mediane der Track Length ( $\mu\text{m}$ ) in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) innerhalb der ersten drei Frames mit 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS.

Track Length ( $\mu\text{m}$ )	Propofol 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Propofol 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Propofol 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	0 – 30 min	31 – 60 min	61 – 120 min
Track Length ( $\mu\text{m}$ )	123,4	104,6	76
Length ( $\mu\text{m}$ )	91	31,8	16,4
Length ( $\mu\text{m}$ )	46,6	18,2	18,1

Die LPS-Konzentration von 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  führte zu ähnlichen Ergebnissen (Abbildung 25).

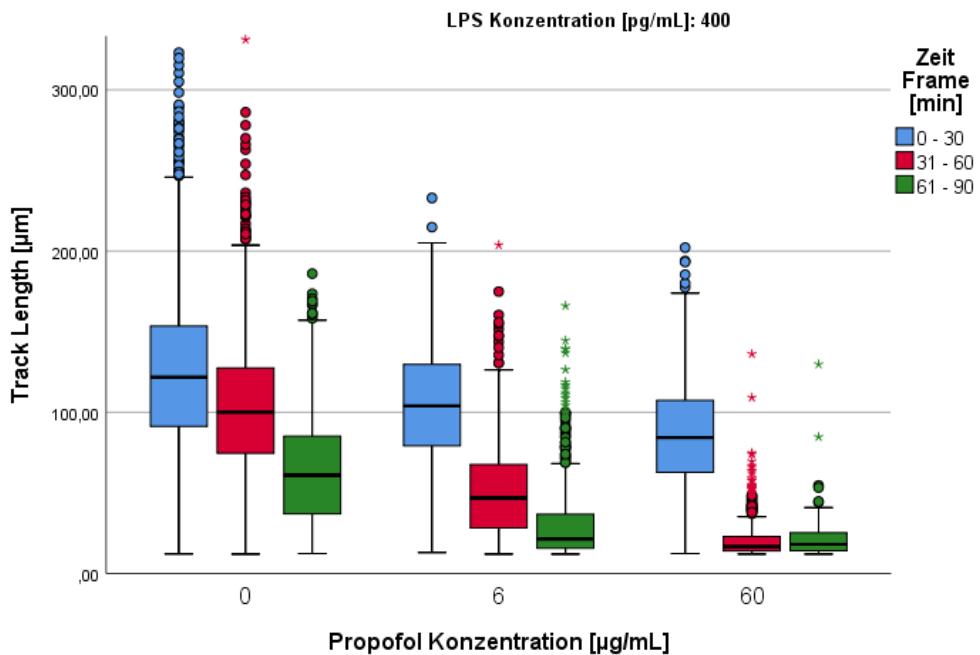


Abbildung 25: Track Length [ $\mu\text{m}$ ] abhängig von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] je Zeit-Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Frames mit einer LPS-Konzentration von 400  $\text{pg}/\text{mL}$ . Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 7$ ,  $n(6 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 4$ ,  $n(60 \mu\text{g}/\text{mL} \text{Propofol}) = 3$

Ohne Propofol fiel die TL der PMNs mit 400  $\text{pg}/\text{mL}$  LPS vom 0 – 30 min zum 31 – 60 min Zeit-Frame um 18 %, mit 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol um 55 % und mit 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol um 80 % (Tabelle 17).

Tabelle 17: Mediane der Track Length ( $\mu\text{m}$ ) in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) innerhalb der ersten drei Frames unter  $LPS = 400 \text{ pg}/\text{mL}$

	Propofol 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Propofol 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Propofol 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Track Length ( $\mu\text{m}$ )	0 – 30 min	121,7	104
	31 – 60 min	100,1	46,9
	61 – 120 min	61	21,4

#### 4.1.3.2 Track Displacement X und Y

Die Zugabe von LPS zu den PMNs führte zu keiner gerichteten Veränderung der Track Displacement X (Tabelle 18). Bei der Betrachtung von TDX, aufgeteilt nach den Propofol-

Konzentrationen und den Zeit-Frames, zeigte sich im 0 - 30 min Zeit-Frame ein signifikanter Unterschied zwischen den TDX-Medianen der PMNs beider LPS-Konzentrationen und dem Kontrollwert. Die TDX-Mediane der PMNs zwischen den beiden LPS-Konzentrationen unterschieden sich nicht voneinander. Dieses Ergebnis war sowohl ohne als auch mit 6 oder 60 µg/mL Propofol zu beobachten. Die p - Werte lagen zwischen 0,001 und 0,035.

*Tabelle 18: Mediane der TDX (µm), im 0 – 30 min Zeit-Frame. In Abhängigkeit von den Propofol- (0 – 6 – 60 µg/mL) und LPS- (0 – 40 – 400 pg/mL) Konzentrationen.*

		LPS 0 pg/mL	LPS 40 pg/mL	LPS 400 pg/mL
TDX (µm)	Propofol 0 µg/mL	0,56	- 0,75	0,36
	Propofol 6 µg/mL	- 0,69	- 0,97	0,84
	Propofol 60 µg/mL	- 0,72	0,84	2,36

In dem 31 – 60 min Zeit-Frame gab es, unabhängig von der Propofol-Konzentration, keine signifikanten Unterschiede zwischen den TDX-Medianen der beiden LPS-Gruppen und dem Kontrollwert. In dem 61 – 90 min Zeit-Frame waren einzelne signifikante Unterschiede der TDX-Mediane dieser Gruppen zu erkennen, jedoch sind diese ungerichtet.

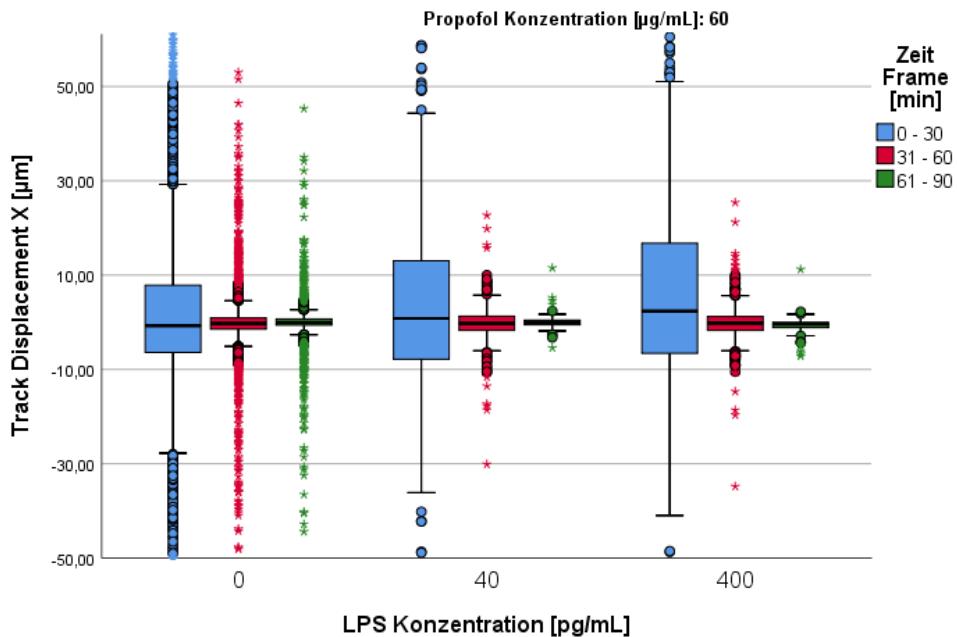


Abbildung 26: Track Displacement in X- Richtung [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von LPS-Konzentrationen [0 – 40 – 400 pg/mL] innerhalb der ersten drei 30 Minuten mit 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \text{ pg/mL LPS}) = 14$ ,  $n(40 \text{ pg/mL LPS}) = 3$ ,  $n(400 \text{ pg/mL LPS}) = 3$

Für die TDY-Messungen zeigte sich ein ähnliches Schema. Es konnten mit allen Propofol-Konzentrationen signifikante Unterschiede zwischen den TDY-Medianen der LPS-Gruppen zum Kontrollwert innerhalb des 0 – 30 min Zeit-Frames beobachtet werden. Alle TDY-Mediane der PMNs streuten allerdings mit geringer Varianz um 0  $\mu\text{m}$  (Abbildung 27). Die Betrachtung der TDY-Mediane zeigte keine erkennbare einheitliche Richtung des Einflusses von LPS auf die PMNs.

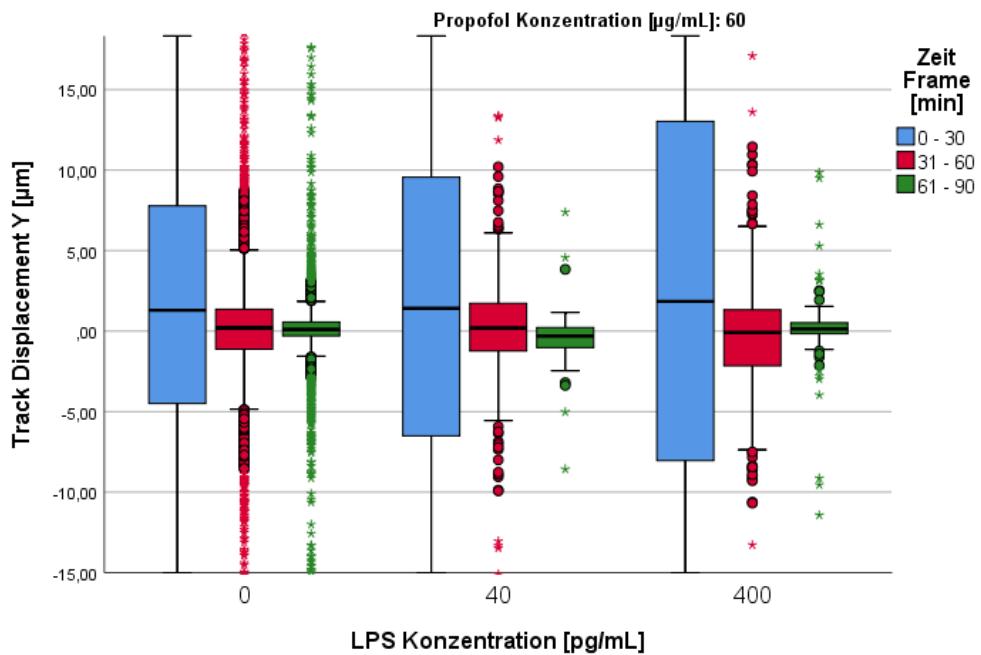


Abbildung 27: Track Displacement in Y- Richtung [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von LPS Konzentrationen [0 – 40 – 400 pg/mL] innerhalb der ersten drei 30 Minuten mit 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \text{ pg/mL LPS}) = 14$ ,  $n(40 \text{ pg/mL LPS}) = 3$ ,  $n(400 \text{ pg/mL LPS}) = 3$

#### 4.1.3.3 Track Displacement Length

Innerhalb des 0 – 30 min Zeit-Frames streuten die TDL-Mediane der PMNs in allen Kombinationen von LPS- und Propofol-Konzentrationen um 21  $\mu\text{m}$ . In diesem Zeitfenster konnten nur teilweise signifikante Unterschiede zwischen den TDL-Medianen der LPS-Gruppen und dem Kontrollwert unabhängig von der Propofol-Konzentration beobachtet werden. Die p – Werte lagen bei  $p = 0,021$  bis  $< 0,001$ . Die Differenzen der Mediane der TDL zwischen den LPS-Gruppen und dem Kontrollwert lagen bei maximal 7  $\mu\text{m}$  und wiesen keine eindeutige Richtung auf (Abbildung 28).

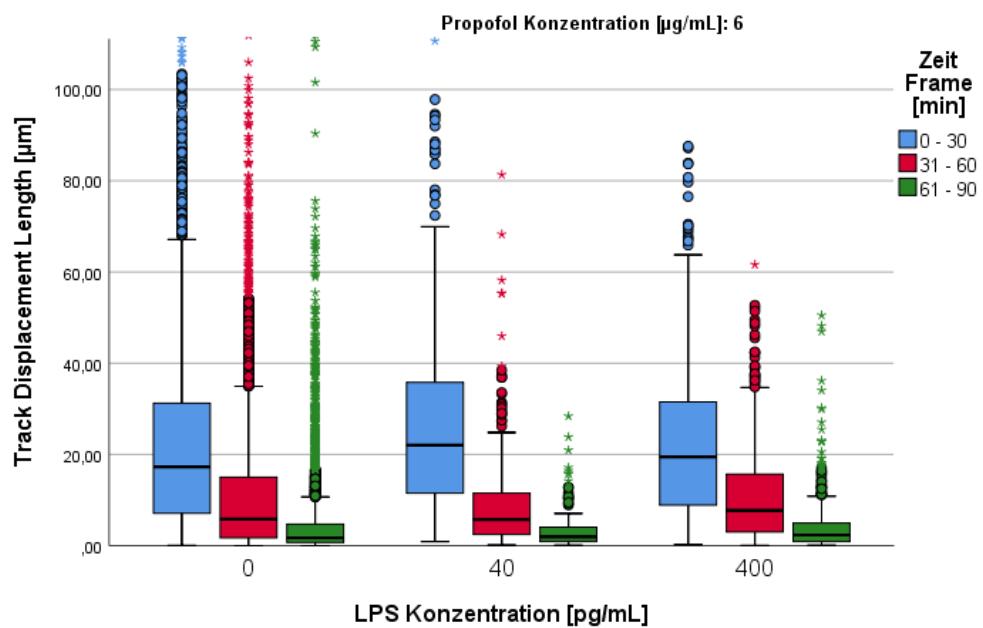


Abbildung 28: Track Displacement Length [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von LPS-Konzentrationen [0 – 40 – 400 pg/mL] innerhalb der ersten drei Zeit-Frames [min] mit 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \text{ pg/mL LPS}) = 15$ ,  $n(40 \text{ pg/mL LPS}) = 3$ ,  $n(400 \text{ pg/mL LPS}) = 4$

#### 4.1.3.4 Track Speed Mean (TSM)

Grundsätzlich sank die TSM im Laufe des Beobachtungszeitraums innerhalb eines Kanals (Tabelle 19).

Mit LPS stiegen die Mediane der TSM im 0 – 30 min Zeit-Frame. Eine Zugabe von Propofol führte im Zeit-Frame 0 – 30 min zu keiner Veränderung dieser Tendenz der TSM unter LPS (Tabelle 19, Tabelle 20). Bis auf wenige Ausnahmen unterschieden sich alle Mediane der TSM unter allen drei Propofol-Konzentrationen signifikant zwischen den einzelnen LPS-Gruppen und dem Kontrollwert. Die p – Werte lagen zwischen <0,001 und 0,014 (Ausnahme bei Propofol = 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  im Zeit Frame 0 – 30 min zwischen 40 und 400 pg/mL LPS, bei Propofol = 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  im Zeit Frame 31 – 60 min zwischen 40 und 400 pg/mL LPS und allen im Zeit-Frame 61 – 90 min unter Propofol 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Tabelle 19: Mediane der Track Speed Mean [ $\mu\text{m}/30\text{min}$ ] in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration [0 – 40 – 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit-Frames mit 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol.

		LPS	LPS	LPS
		0 pg/mL	40 pg/mL	400 pg/mL
<b>Track Speed Mean (<math>\mu\text{m}/30\text{min}</math>)</b>	0 – 30 min	135	163,8	154,8
	31 – 60 min	104,4	117	127,8
	61 – 90 min	59,4	52,2	73,8

In den 31 – 60 min und 61 – 90 min Zeit-Frames wurde der Effekt von LPS auf die TSM durch den Zusatz von 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oder 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol blockiert (Tabelle 20). Die Mediane der TSM im 31 – 60 min Zeit-Frame unterschieden sich nur noch teilweise zwischen den einzelnen LPS-Gruppen und dem Kontrollwert. Im 61 – 90 min Zeit-Frame gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen.

Tabelle 20: Mediane der Track Speed Mean [ $\mu\text{m}/30\text{min}$ ] in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration [0 – 40 – 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit-Frames mit 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol.

		LPS	LPS	LPS
		0 pg/mL	40 pg/mL	400 pg/mL
<b>Track Speed Mean (<math>\mu\text{m}/30\text{min}</math>)</b>	0 – 30 min	63,7	90,7	100
	31 – 60 min	22,9	16,6	16,7
	61 – 90 min	18,9	20,7	18,2

Die Kombination der Einflüsse von LPS und Propofol auf die PMNs führte zu einem Einbruch der TSM-Mediane vom 0 – 30 min zum 31 – 60 min Zeit-Frame (Abbildung 29). Die TSM-Mediane des 0 – 30 min Zeit-Frames sank innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums um 56 %, wenn die PMNs mit 400 pg/mL LPS und ohne Propofol inkubiert worden waren. Bei zusätzlicher Inkubation mit 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol lag die Abnahme der TSM-Mediane vom Ausgangswert bei 84 % (Propofol = 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 82 %).

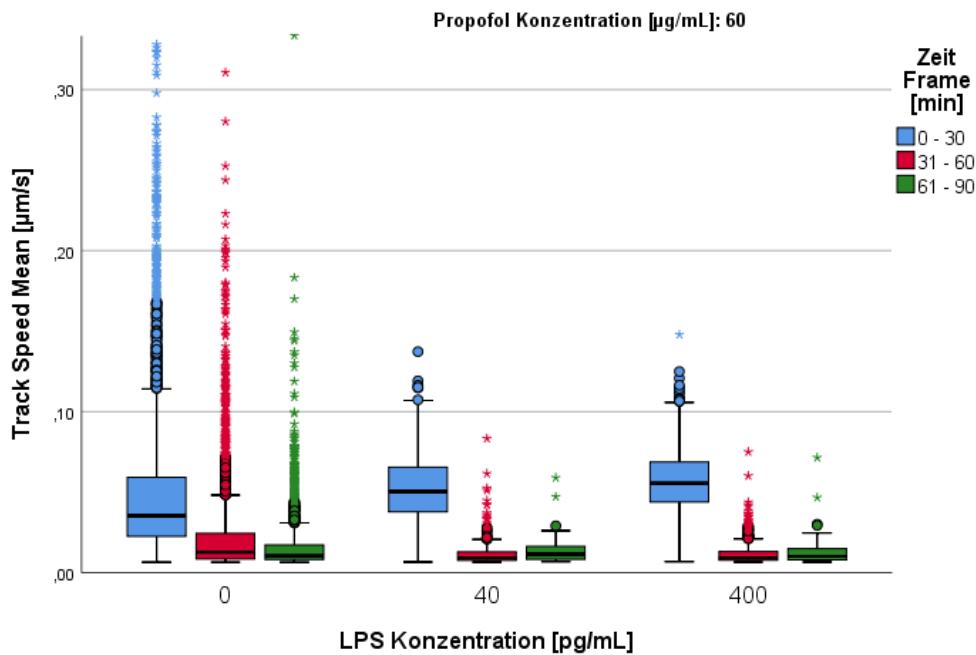


Abbildung 29: Track Speed Mean [ $\mu\text{m}/\text{s}$ ] in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration [0 – 40 – 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit-Frames [min] mit 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. Extremwerte und Ausreißer liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.  $n(0 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ LPS}) = 14$ ,  $n(40 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ LPS}) = 3$ ,  $n(400 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ LPS}) = 3$

## 4.2 Einfluss von Propofol auf die NETose und den oxidativen Burst der PMNs

Die Ergebnisse zur zeitlichen Betrachtung der granulozytären NETose und ROS-Freisetzung unter dem Einfluss von Propofol und LPS werden im Folgenden erläutert. Zunächst wurden die Ergebnisse mit einer fMLP- Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  im linken Reservoir betrachtet. Diese Ergebnisse wurden unter 4.2.4 mit denjenigen, die mit 10 nM fMLP im linken Reservoir erzielt wurden, verglichen.

### 4.2.1 Betrachtung der NETose anhand der ET50-Werte mit DAPI

Insgesamt konnten 28 Versuche für den Kontrollwert ausgewertet werden. Für die Propofol-Konzentrationen 6 und 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  waren jeweils 15 Versuche auswertbar. Alle Versuchszahlen sind in der Tabelle 21 aufgelistet.

Tabelle 21: Fallzahlen der auswertbaren DAPI-Versuche mit LPS (0 – 40 – 400 pg/mL) und Propofol (0 – 6 – 60 µg/mL)

	Propofol 0 µg/mL	Propofol 6 µg/mL	Propofol 60 µg/mL
AUSWERTBARE VERSUCHE	LPS 0 pg/mL	28	15
	LPS 40 pg/mL	6	3
	LPS 400 pg/mL	7	4

Bei Betrachtung der ET50-Mediane nach Färbung mit DAPI, unter Ausschluss aller Versuche aus der LPS-Versuchsreihe, zeigte sich in den Werten der 0 und 60 µg/mL Propofol-Konzentrationen mit  $p = 0,004$  ein signifikanter Unterschied (Abbildung 30).

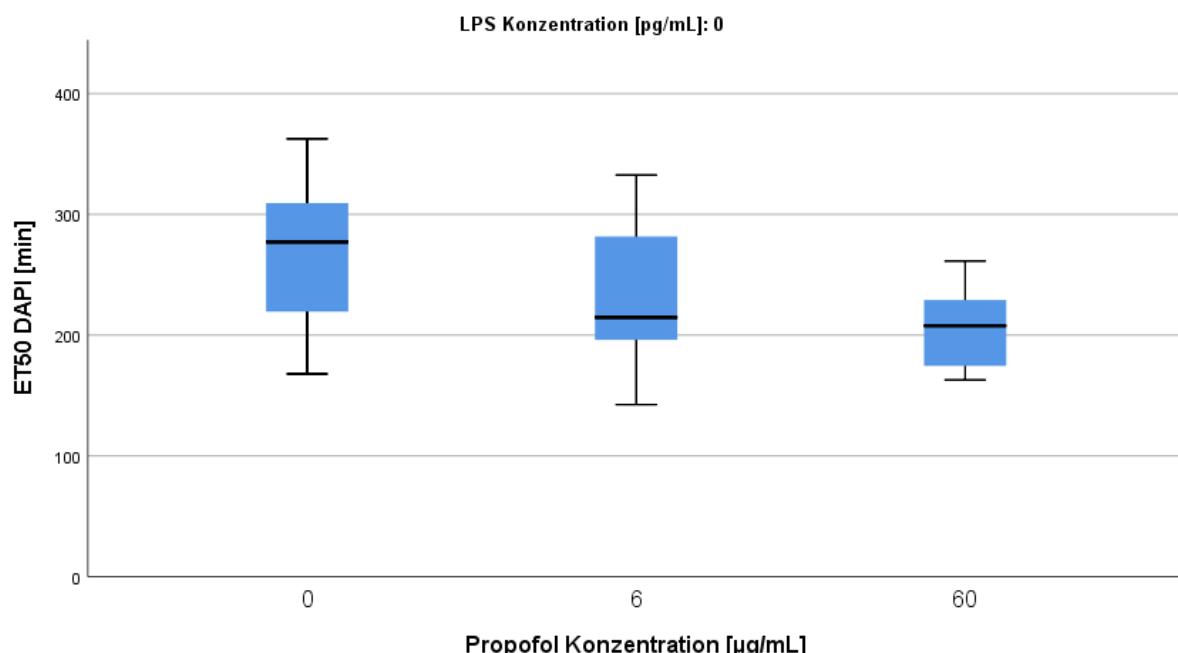


Abbildung 30: ET50 von DAPI (halbmaximaler Zeitpunkt der DAPI-Freisetzung) in Minuten in Abhängigkeit von Propofol (0 – 6 – 60 µg/mL mit einer LPS-Konzentration von 0 pg/mL. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte.  $n(0 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Propofol}) = 28$ ,  $n(6 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Propofol}) = 15$ ,  $n(60 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Propofol}) = 15$

Dabei fiel der mediane ET50-Wert mit 60 µg/mL Propofol um 69 min im Vergleich zum Kontrollwert, was einer Abnahme von 25 % Prozent entsprach. Auch die Propofol-Konzentration von 6 µg/mL führte zu einer Reduktion des Medians um 62 min (22 %) im Vergleich zum Kontrollwert (Tabelle 22).

Tabelle 22: Mediane der ET50 von DAPI (halbmaximaler Zeitpunkt der DAPI-Freisetzung) in Minuten in Abhängigkeit von Propofol (0 – 6 – 60 µg/mL) und LPS (0 – 40 – 400 pg/mL).

		<b>Propofol</b> <b>0 µg/mL</b>	<b>Propofol</b> <b>6 µg/mL</b>	<b>Propofol</b> <b>60 µg/mL</b>
<b>ET50</b>	LPS 0 pg/mL	277	215	208
<b>DAPI</b> <b>[min]</b>	LPS 40 pg/mL	312	280	252
	LPS 400 pg/mL	230	267	240

Die Zugabe von LPS in der Konzentration 40 pg/mL führte in Kombination mit beiden Propofol-Konzentrationen zu einer signifikanten ( $p = 0.018$ ) Abnahme der ET50- Medianen im Vergleich zum Kontrollwert. Die halbmaximale DAPI-Produktion wurde dabei mit 6 µg/mL Propofol um 32 min und mit 60 µg/mL um 60 min (19 %) beschleunigt. Demnach schwächte die Zugabe von 40 pg/mL LPS den Einfluss der Propofol-Präinkubation auf die ET50-Mediane der PMNs ab. Mit 400 pg/mL LPS zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medianen der ET50 des Kontrollwertes und der beiden Propofol-Konzentrationen. Die ET50 wurde konzentrationsabhängig durch Propofol schneller erreicht (Tabelle 22). LPS schwächte diese Tendenz ab. Bei Vergleich der LPS- Kategorien (Kontrollwert, 40 und 400 pg/mL) untereinander, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Lediglich zwischen 40 und 400 pg/mL LPS ohne Einfluss von Propofol gab es einen mit  $p = 0,05$  signifikanten Unterschied zwischen den ET50- Medianen. Es konnte jedoch grundsätzlich eine Verlangsamung der ET50-Mediane durch die Zugabe von 40 pg/mL LPS beobachtet werden.

#### 4.2.2 Betrachtung des oxidativen Bursts anhand von Tmax ROS

Die für die Bestimmung von Tmax ROS auswertbaren Versuchszahlen sind in der Tabelle 23 für alle LPS- und Propofol-Konzentrationen aufgelistet.

Tabelle 23: Fallzahlen der auswertbaren Versuche zur Bestimmung der Tmax ROS für alle LPS- (0 – 40 – 400 pg/mL) und Propofol- (0 – 6 – 60 µg/mL) Konzentrationen.

		Propofol 0 µg/mL	Propofol 6 µg/mL	Propofol 60 µg/mL
<b>AUSWERTBARE VERSUCHE</b>	LPS 0 pg/mL	28	15	15
	LPS 40 pg/mL	6	3	3
	LPS 400 pg/mL	7	4	3

Unter Zugabe von Propofol zu den PMNs zeigte sich ein mit  $p = 0,003$  signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der Tmax ROS des Kontrollwerts und der Werte, die mit 60  $\mu\text{g/mL}$  Propofol gemessen wurden. Eine Erhöhung der Propofol-Konzentration beschleunigte tendenziell die ROS-Produktion (Abbildung 31).

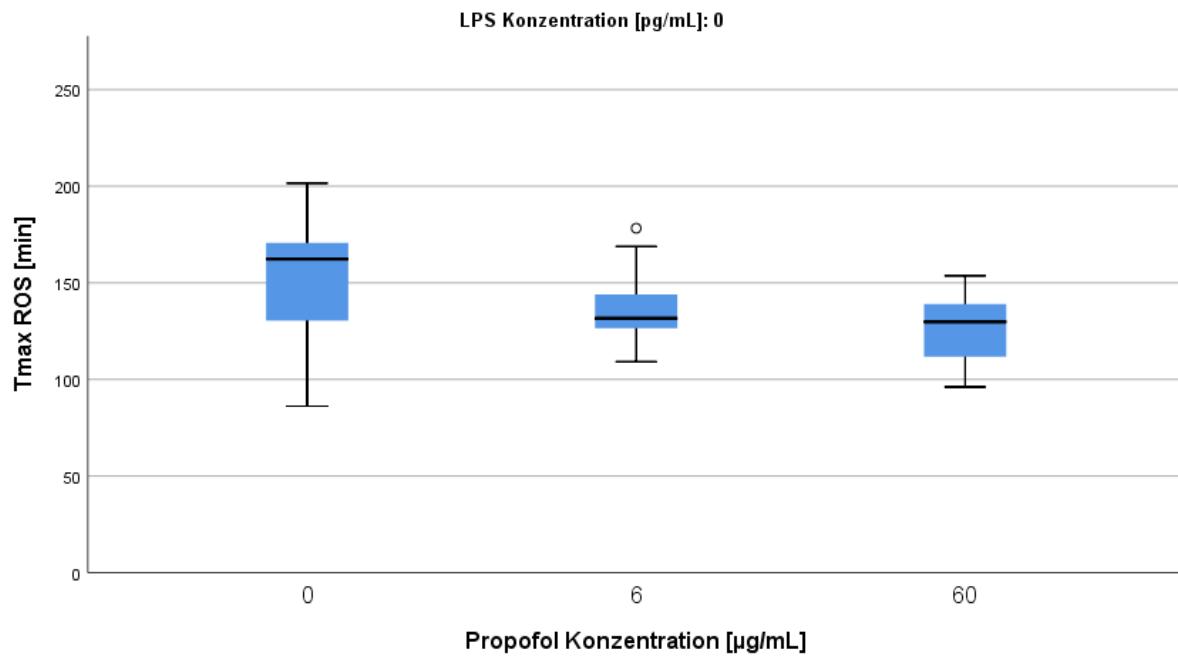


Abbildung 31: Tmax-ROS (Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion) in Minuten in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60  $\mu\text{g/mL}$ ) mit einer LPS-Konzentration von 0  $\mu\text{g/mL}$ . Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte.  $n(0 \mu\text{g/mL} \text{ Propofol}) = 28$ ,  $n(6 \mu\text{g/mL} \text{ Propofol}) = 15$ ,  $n(60 \mu\text{g/mL} \text{ Propofol}) = 15$

Der Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion wurde durch beide Propofol-Konzentrationen um etwa 30 min beschleunigt. Das bedeutet, die PMNs setzten um 19 % schneller ROS frei als ohne den Einfluss von Propofol (Tabelle 24).

Tabelle 24. Mediane der Tmax ROS (Zeitpunkt der maximalen ROS Produktion) in Minuten in Abhängigkeit aller Propofol-Konzentrationen (0 – 6 – 60 µg/mL) und LPS (0 – 40 – 400 pg/mL).

	<b>Propofol</b>	<b>Propofol</b>	<b>Propofol</b>
	<b>0 µg/mL</b>	<b>6 µg/mL</b>	<b>60 µg/mL</b>
<b>Tmax</b>	LPS 0 pg/mL	162	132
<b>ROS</b>	LPS 40 pg/mL	167	154
<b>[min]</b>	LPS 400 pg/mL	150	141
			152

Ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,039$ ) zwischen den Tmax ROS-Werten des Kontrollwertes und der Werte mit 60 µg/mL Propofol war auch bei einer zusätzlichen LPS-Konzentration von 40 pg/mL erkennbar. Dabei führte Propofol zu einer Beschleunigung von 25 min, also 15 %, der Tmax ROS im Vergleich zum Kontrollwert (Abbildung 32).

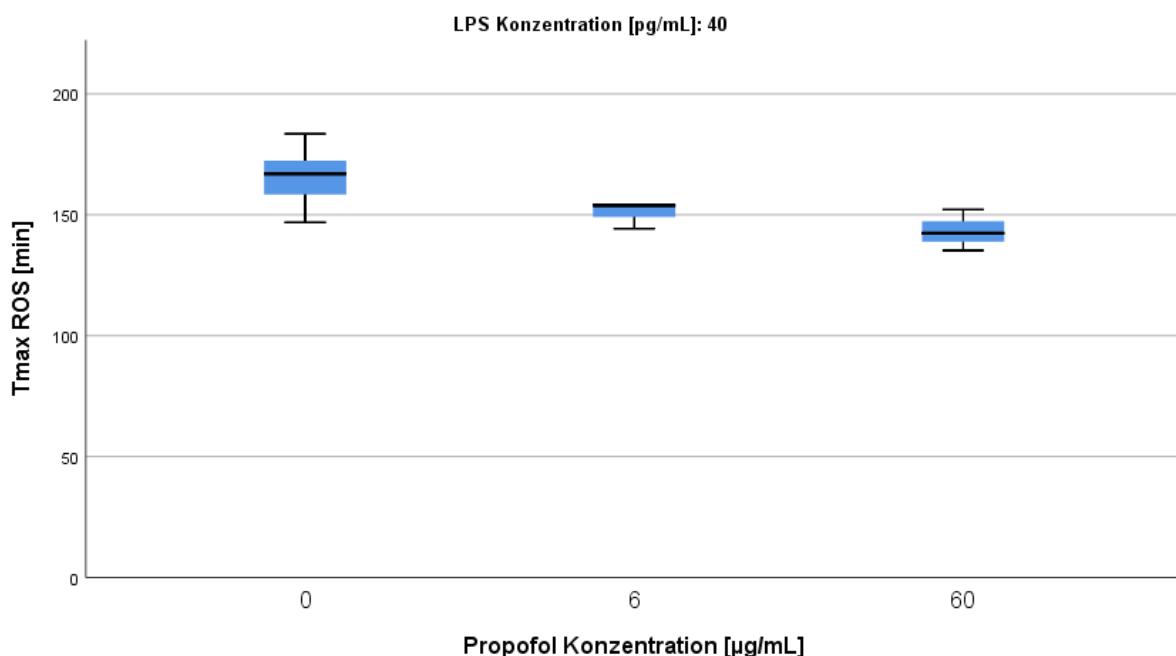


Abbildung 32: Tmax ROS (Zeitpunkt der maximalen ROS Produktion) in Minuten in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentrationen (0 – 6 – 60 µg/mL) mit einer LPS-Konzentration von 40 pg/mL. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte.  $n(0 \text{ } \mu\text{g/mL Propofol}) = 6$ ,  $n(6 \text{ } \mu\text{g/mL Propofol}) = 3$ ,  $n(60 \text{ } \mu\text{g/mL Propofol}) = 3$

Bei der LPS-Konzentration 400 pg/mL gab es bei keiner der beiden Propofol-Gruppen einen signifikanten Unterschied der Tmax ROS-Mediane zur Kontrollgruppe mehr. Es konnte keine

Verkürzung der Tmax ROS durch Propofol beobachtet werden, die Zeitpunkte waren unter allen drei Propofol-Konzentrationen weitgehend konstant.

Bei Vergleich der Tmax ROS-Mediane der zwei LPS-Konzentrationen und des Kontrollwertes gab es keine signifikanten Unterschiede. Es konnte jedoch tendenziell eine Verlangsamung der Tmax ROS durch 40 pg/mL LPS beobachtet werden.

#### 4.2.3 Betrachtung der NETose anhand der ET50-Werte mit MPO

Die Tabelle 25 zeigt einen Überblick über die Versuchszahlen mit auswertbarer MPO-Anfärbung.

Tabelle 25: Fallzahl der auswertbaren ET50 MPO Versuche für alle LPS-(0 – 40 – 400 pg/mL) und Propofol-(0 – 6 – 60 µg/mL) Konzentrationen.

		Propofol 0 µg/mL	Propofol 6 µg/mL	Propofol 60 µg/mL
AUSWERTBARE VERSUCHE	LPS 0 pg/mL	18	12	15
	LPS 40 pg/mL	3	3	3
	LPS 400 pg/mL	5	3	3

Die zeitliche Betrachtung der MPO-Freisetzung führte zu vergleichbaren Ergebnissen wie die der DHR- oder DAPI-Messungen. Ohne LPS gab es einen mit  $p = 0,006$  signifikanten Unterschied zwischen den Medianen der ET50 MPO des Kontrollwerts und der Werte, die mit 60 µg/mL Propofol ermittelt wurden (Abbildung 33).

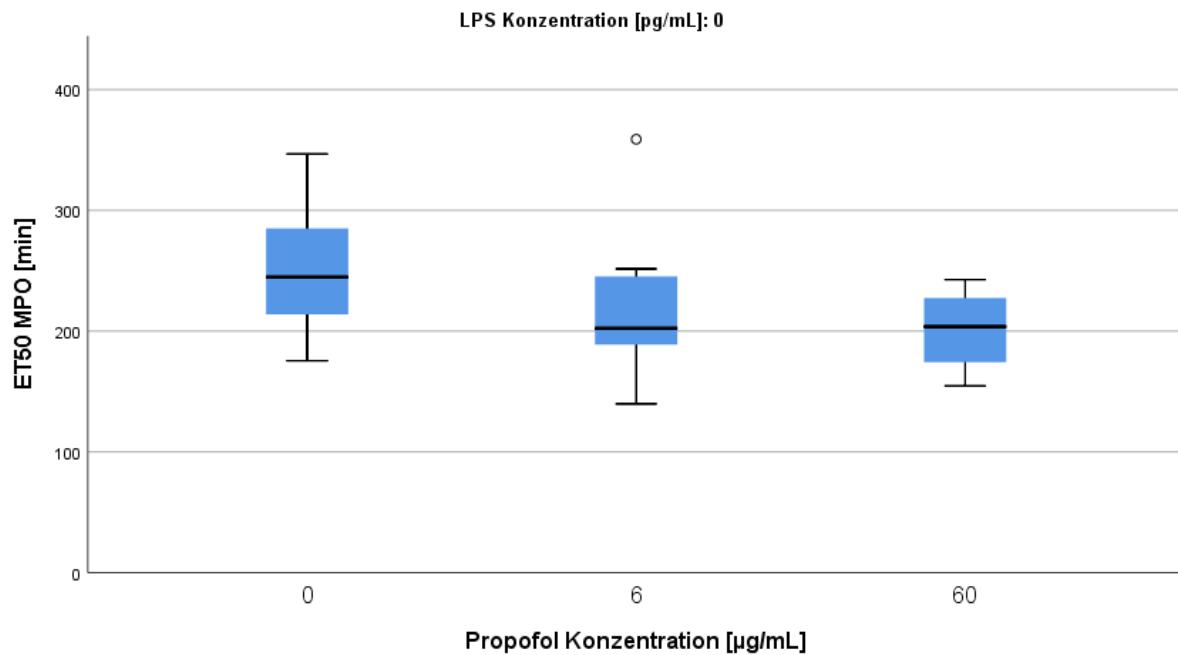


Abbildung 33: ET50 von MPO (halbmaximaler Zeitpunkt der MPO Freisetzung) in Minuten in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60 µg/mL) mit einer LPS Konzentration von 0 pg/mL. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. n(0 µg/mL Propofol) = 18, n(6 µg/mL Propofol) = 12, n(60 µg/mL Propofol) = 15

Der Zeitpunkt der halbmaximalen MPO-Produktion wurde durch 60 µg/mL Propofol im Mittel um 41 min (17 %) im Vergleich zum Kontrollwert beschleunigt. Auch die Konzentration von 6 µg/mL Propofol beeinflusste die MPO-Freisetzung in ähnlichem Maße (Tabelle 26).

Tabelle 26: Mediane der ET50 von MPO (halbmaximaler Zeitpunkt der MPO Freisetzung) in Minuten in Abhängigkeit aller LPS- (0 – 40 – 400 pg/mL) und Propofol- (0 – 6 – 60 µg/mL) Konzentrationen.

		<b>Propofol</b>	<b>Propofol</b>	<b>Propofol</b>
		<b>0 µg/mL</b>	<b>6 µg/mL</b>	<b>60 µg/mL</b>
<b>ET50</b>	LPS 0 pg/mL	245	202	204
<b>MPO</b>	LPS 40 pg/mL	303	279	258
<b>[min]</b>	LPS 400 pg/mL	264	250	244

Die Messergebnisse in Kombination mit LPS (40 oder 400 pg/mL) ergaben keine signifikanten Unterschiede der ET50-Mediane für MPO in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration.

Unter 40 pg/mL LPS war ein Abfall der ET50-Mediane für MPO erkennbar. Mit 400 pg/mL LPS führte Propofol noch zu einer minimalen Beschleunigung der MPO-Freisetzung.

Ein signifikanter Einfluss auf die ET50 der MPO durch LPS konnte nur mit 60 µg/mL Propofol festgestellt werden. Die ET50 MPO der 40 pg/mL und 400 pg/mL LPS-Konzentrationen unterschieden sich mit  $p = 0,022$  und mit  $p = 0,045$  vom Kontrollwert. Der LPS-Einfluss führte zu einer Verlangsamung der ET50 der MPO (Abbildung 34).

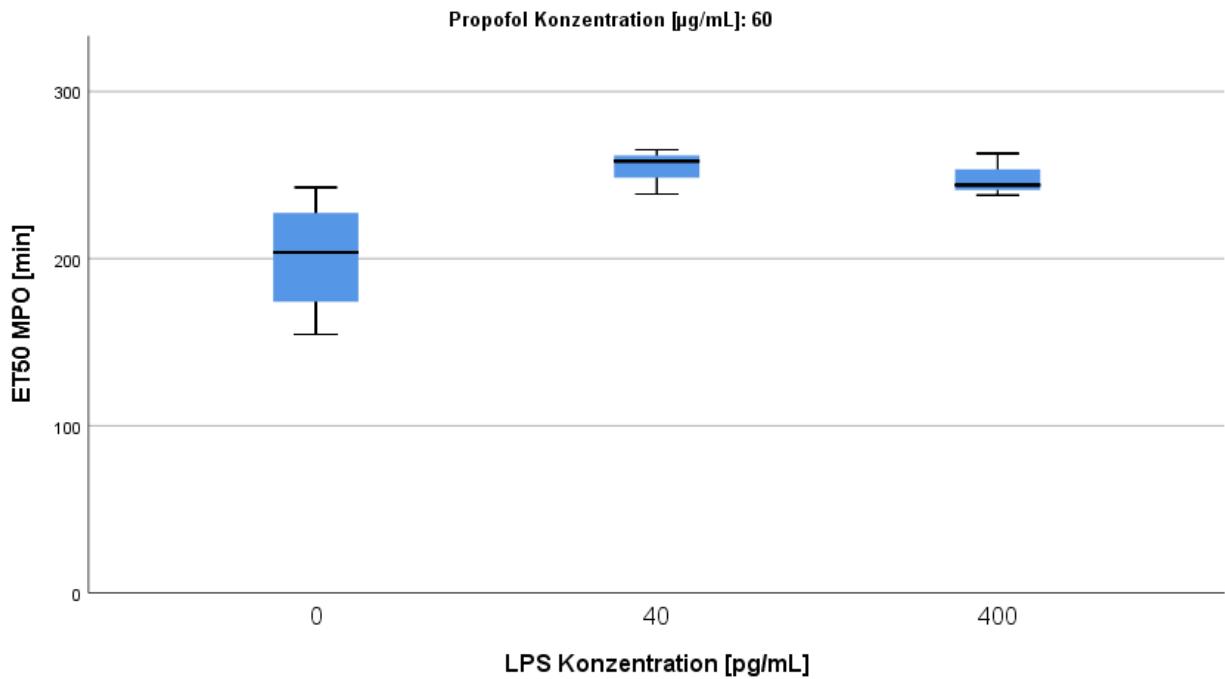


Abbildung 34: ET50 von MPO (halbmaximaler Zeitpunkt der MPO Freisetzung) in Minuten in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration (0 – 40 – 400 pg/mL) mit einer Propofol-Konzentration von 60 µg/mL. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte.  $n(0 \text{ pg/mL LPS}) = 15$ ,  $n(40 \text{ pg/mL LPS}) = 3$ ,  $n(400 \text{ pg/mL LPS}) = 3$

#### 4.2.4 Einfluss von fMLP auf die Fluoreszenz Propofol-exponierter PMNs

Es wurden drei auswertbare Versuche mit einer fMLP-Ausgangskonzentration im linken Reservoir von 10 nM durchgeführt.

Der Test auf Unterschiede der Messergebnisse der ET50 DAPI, Tmax ROS und ET50 MPO zwischen den beiden fMLP-Konzentrationen 10 nM und 10 µM, aufgeteilt nach den drei Propofol-Konzentrationen, führte zu keinen signifikanten Ergebnissen. Bei separater Betrachtung der Daten, die mit 10 nM fMLP erzielt wurden, zeigte sich bei den ET50 MPO- und DAPI-Medianen kein signifikanter Unterschied zwischen den Propofol-Konzentrationen

und dem Kontrollwert. Eine Verkürzung der ET50 beider Parameter durch 60 µg/mL Propofol war parallel zur fMLP = 10 µM Konzentration im Boxplot zu beobachten (Abbildung 35).

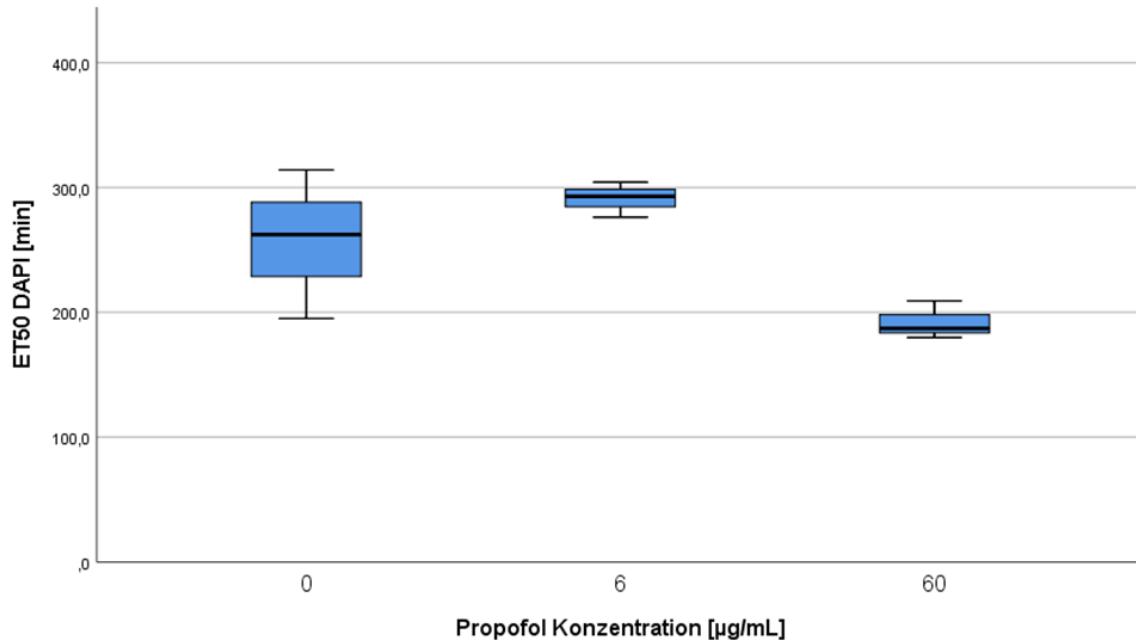


Abbildung 35: ET50 von DAPI (halbmaximaler Zeitpunkt der DAPI Freisetzung) in Minuten in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60 µg/mL) mit einer LPS-Konzentration von 0 pg/mL und mit 10 nM fMLP. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte.  $n(10 \text{ nM fMLP}) = 3$ .  $n(10 \mu\text{M fMLP}) = 18$ ,  $n(0 \mu\text{g/mL Propofol}) = 12$ ,  $n(6 \mu\text{g/mL Propofol}) = 12$ ,  $n(60 \mu\text{g/mL Propofol}) = 15$

Die Tmax ROS-Mediane des Kontrollwertes und der Werte für 60 µg/mL Propofol unterschieden sich signifikant mit  $p = 0,019$  (Abbildung 36).

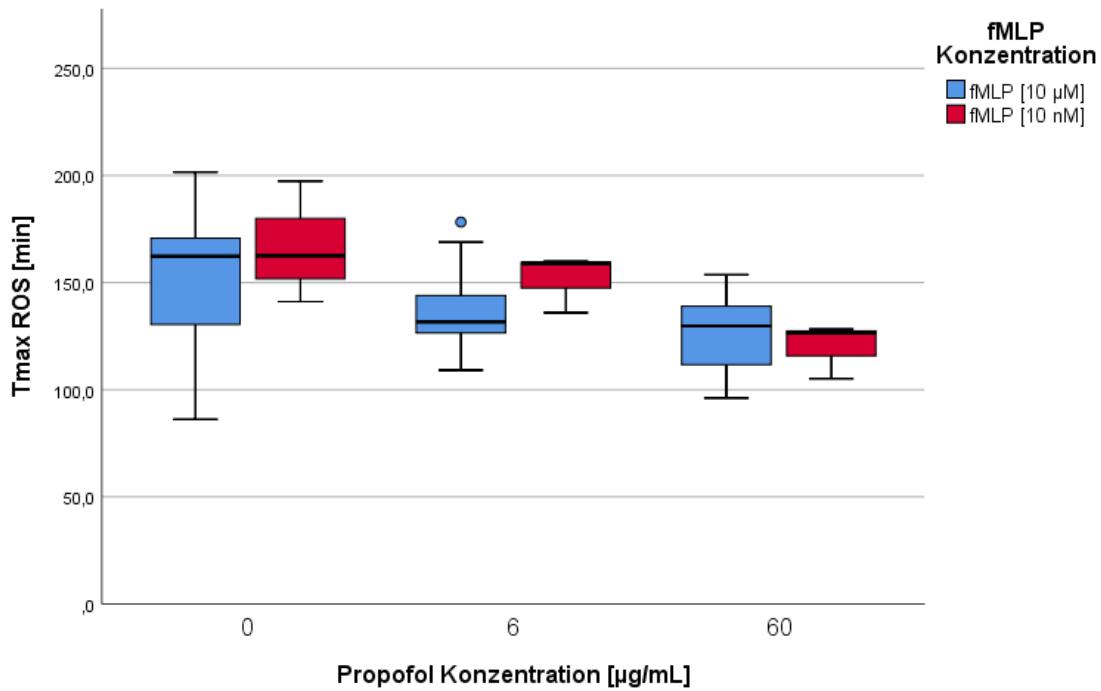


Abbildung 36: Tmax ROS (Zeitpunkt der maximalen ROS Produktion) in Minuten in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); Vergleich der fMLP-Ausgangskonzentrationen im linken Reservoir von 10 nM und 10  $\mu\text{M}$ . Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte.  $n(10 \text{ nM fMLP}) = 3$ .  $n(10 \mu\text{M fMLP})$  je  $n(0 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Propofol}) = 18$ ,  $n(6 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Propofol}) = 12$ ,  $n(60 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL} \text{ Propofol}) = 15$

### 4.3 Einfluss von Propofol auf den oxidativen Burst und die Expression von Oberflächenproteinen

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Daten wurden im Folgenden beschrieben.

#### 4.3.1 Einfluss von Propofol auf den oxidativen Burst der PMNs im Durchflusszytometer anhand der medianen Fluoreszenzintensität (MFI)

Für die Messung des oxidativen Bursts wurden insgesamt 15 Versuche durchgeführt. Davon waren alle auswertbar, lediglich 6 Einzelmessungen mussten aufgrund von Pipettierfehlern ausgeschlossen werden, woraus 114 (je Versuch 9) verwertbare Messergebnisse resultierten. Das entsprach 56 Messergebnissen unter fMLP-Stimulation und 58 Messergebnissen unter PMA-Stimulation.

Eine Aktivierung mit 100 nM fMLP erbrachte signifikante Unterschiede zwischen den Werten der MFI der PMNs bei Inkubation mit 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Propofol und dem Kontrollwert sowohl mit

0,39 % DMSO ( $p < 0,001$ ) als auch ohne DMSO ( $p = 0,015$ ). Auch mit 6 µg/mL Propofol unterschieden sich die MFI-Werte mit  $p = 0,043$  vom DMSO-Kontrollwert. Eine Inkubation mit 0,39 % DMSO erhöhte die MFI. Eine Zugabe von Propofol führte in Kombination mit 0,39 % DMSO wieder zu einer Absenkung der MFI mit signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Propofol-Gruppen und dem DMSO-Kontrollwert (Abbildung 37).

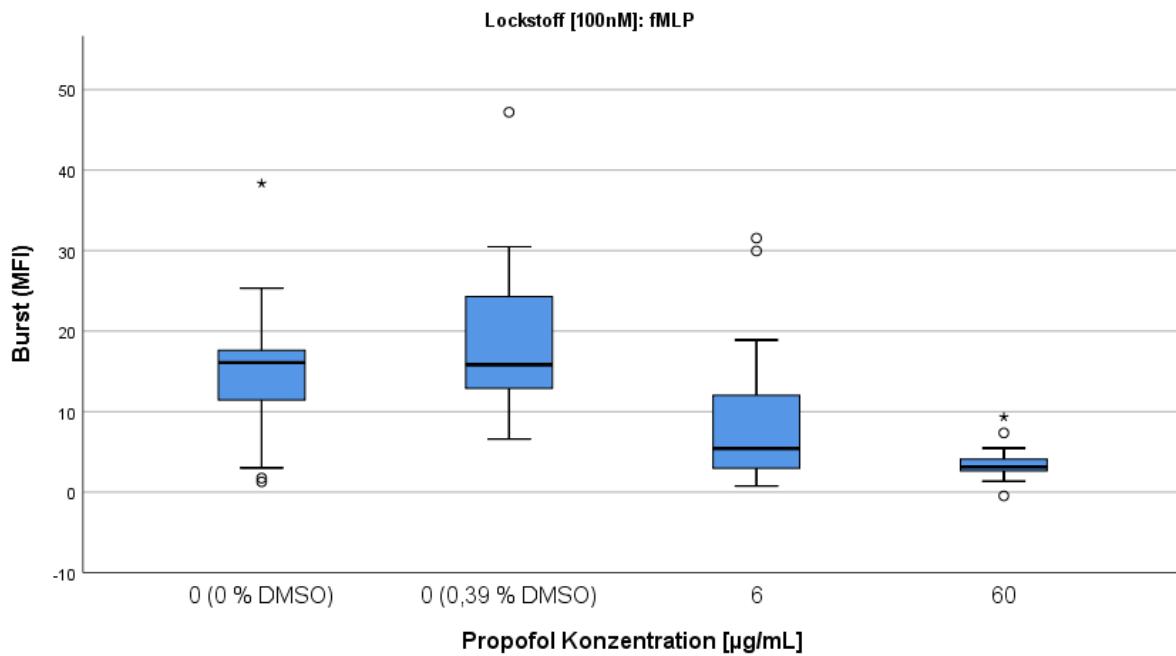


Abbildung 37: Graphische Darstellung der oxidativen Burst-Aktivität ausgedrückt durch mediane Fluoreszenzintensität (MFI) nach Stimulation mit fMLP und TNF $\alpha$  in Abhängigkeit von DMSO (Dimethylsulfoxid) und Propofol [6 oder 60 µg/mL]. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte. n= 15, daraus resultierten 56 Einzelwerte

Dabei sank die mediane Fluoreszenzintensität durch Zugabe von 6 µg/mL Propofol unter fMLP-Aktivierung um 69 % im Vergleich zum DMSO-Kontrollwert ab. Eine Erhöhung der Propofol-Konzentration auf 60 µg/mL steigerte die Abnahme der MFI auf 81% (Tabelle 27).

Tabelle 27: Oxidative Burst Aktivität, ausgedrückt durch mediane Fluoreszenzintensität (MFI) nach Stimulation mit fMLP und TNF $\alpha$ .

	<b>Propofol</b> <b>(0 % DMSO)</b> <b>0 <math>\mu</math>g/mL</b>	<b>Propofol</b> <b>(0,39 % DMSO)</b> <b>0 <math>\mu</math>g/mL</b>	<b>Propofol</b> <b>6 <math>\mu</math>g/mL</b>	<b>Propofol</b> <b>60 <math>\mu</math>g/mL</b>
<b>MFI</b>	fMLP 100 nM      16	16	5	3
	PMA 100 nM      626	902	636	494

Nach Aktivierung durch PMA führte Propofol ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der MFI-Werte (Abbildung 38).

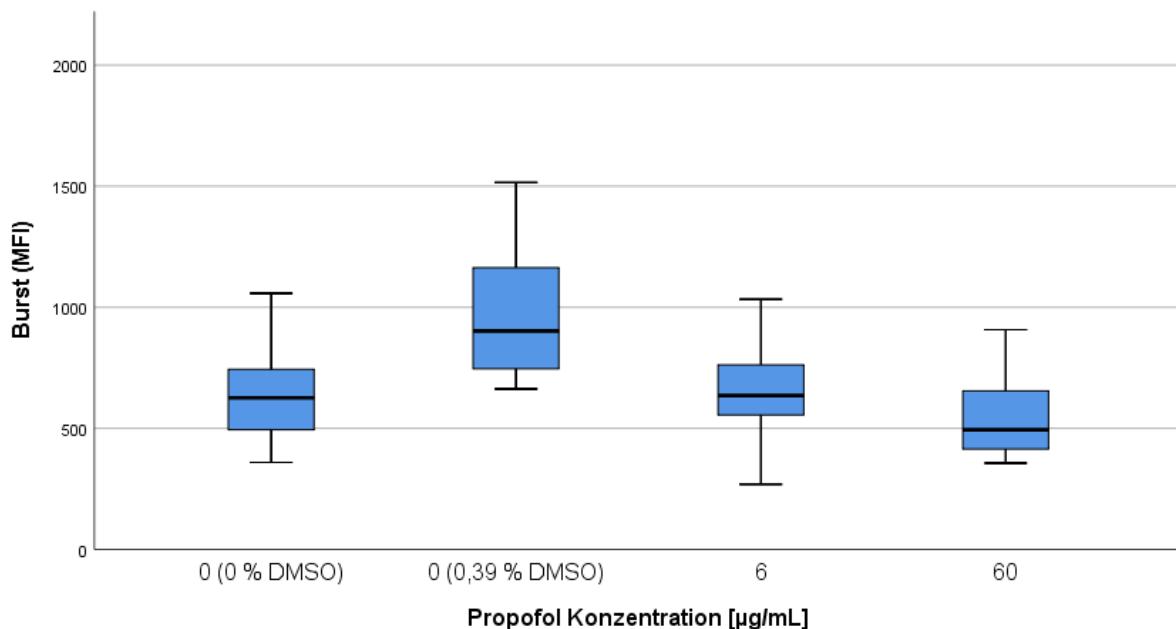


Abbildung 38: Graphische Darstellung der oxidativen Burst Aktivität, ausgedrückt durch mediane Fluoreszenzintensität (MFI) nach Stimulation mit PMA in Abhängigkeit von DMSO (Dimethylsulfoxid) und Propofol [6 oder 60  $\mu$ g/mL]. Die Graphik zeigt Boxplots jeweils als Box (mittlere 50% der Daten) mit Median sowie 25. Perzentil (untere Begrenzung) und 75. Perzentil (obere Begrenzung). Die „T-Balken“ (Whisker) entsprechen dem 1,5-fachen IQR (Interquartilsabstand), die innerhalb des 1,5- und 3-fachen IQR liegenden Punkte entsprechen Ausreißern, und alle Werte außerhalb dieses Bereiches sind mit Sternen gekennzeichnete Extremwerte.  $n = 15$ , daraus resultierten 58 Einzelwerte

Die Inkubation mit 0,39 % DMSO steigerte die mediane oxidative Burst-Aktivität signifikant ( $p = 0,007$ ) um 31 % im Vergleich zum Kontrollwert ohne DMSO. In Bezug auf diesen DMSO-Kontrollwert sank die MFI durch 6  $\mu$ g/mL Propofol signifikant ( $p = 0,035$ ) um 29 %. 60  $\mu$ g/mL Propofol führten zu einer Reduktion der MFI um 45 % ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zum DMSO-

Kontrollwert. Die Mediane der MFI der mit 6 oder 60 µg/mL inkubierten PMNs unterschieden sich nicht signifikant.

Insgesamt konnte eine Abnahme der ROS-Produktion (MFI) unter dem Einfluss von Propofol sowohl unter fMLP- als auch PMA-Aktivierung beobachtet werden.

#### 4.3.2 Einfluss von Propofol auf die Expression von Oberflächenproteinen der PMNs

Bei einer Stichproben Größe von fünf Probanden, jeweils im Doppelansatz gemessen, waren bei keiner der Bestimmungen der Expression von Oberflächenproteinen signifikante Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten feststellbar. Auch die graphische Betrachtung zeigte bei keinem der betrachteten Antikörper einen Unterschied in der Expression der Antigene durch Propofol-Zugabe.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methoden

Es wurden zur Untersuchung der PMNs-Funktionalität zwei verschiedene Methoden angewendet. Einerseits ermöglichte die durchflusszytometrische Betrachtung der PMNs eine Beurteilung des quantitativen Einflusses von Propofol auf den oxidativen Burst. Zusätzlich ermöglichte die fortlaufende zeitliche Betrachtung der PMNs-Aktivität durch das verwendete Leica Inversionsmikroskop (life cell imaging) eine optimale Erfassung des Einflusses von Propofol auf die PMNs im zeitlichen Kontext.

In vorrangegangenen Studien der Klinik für Anästhesiologie am UKR zeigte sich, dass die interindividuellen Unterschiede der PMNs-Funktionalität oftmals stark variieren. Durch den Aufbau der Ibidi  $\mu$ -Slides konnten pro Probanden je drei verschiedene Ausgangsbedingungen parallel getestet werden. So konnte die Vergleichbarkeit der beobachteten Effekte von Propofol oder LPS auf die PMNs erhöht werden.

Der Einsatz einer Kollagen Matrix mit dem Hauptbestandteil Kollagen 1 und einer Klimakammer, ermöglichen die Simulation der physiologischen *in vivo* vorhandenen Bedingungen der extrazellulären PMNs-Migration. Allerdings handelte es sie hierbei nicht um humanes, sondern um bovines Kollagen. Es wurden alle Lagerungszeiten so kurz wie möglich gehalten und die Proben wurden dabei stets mit großer Vorsicht gehandhabt. Die Betrachtung vitaler humaner PMNs ermöglichte eine gute Vergleichbarkeit zu den *in vivo* ablaufenden Prozessen. Zwar wurden in allen Experimenten isolierte PMNs untersucht, jedoch sind auch die *in vivo* agierenden PMNs aufgrund von Migration in das Interstitium nicht mehr mit Vollblut in Kontakt. Wie früher an der Klinik für Anästhesiologie am UKR beobachtet, unterlagen diese durch den in dieser Studie verwendeten Isolierungsvorgang aus dem Vollblut einer Voraktivierung (57). Eine verlängerte Track Length war die Folge der Dichtegradientenzentrifugation im Vergleich zu anderen Isolierungsmethoden. Auch die andere Zusammensetzung des Gelansatzes im Vergleich zu humanem Serum sowie der Zusatz von potenziellen Aktivatoren der PMNs-Aktivität in diesem müssen als eine Störvariable in Betracht gezogen werden.

Die 30-minütige Inkubationszeit der PMNs mit Propofol wurde parallel zu einer anderen publizierten Studie verwendet (27). Auch im klinischen Alltag wird häufig zu Beginn einer Sedierung Propofol als gerichtete Infusion und Monotherapie gestartet, bevor weitere

Medikamente hinzu infundiert werden. Zudem entsprach dieser der in der Klinik für Anästhesiologie am UKR etablierten Methodik und ermöglichte eine gute Vergleichbarkeit zu vorrangingen Studien. Da die PMNs in den nachfolgenden 7 h während der Analyse mit dem Inversionsmikroskop weiterhin derselben Propofol-Konzentration ohne Gradienten ausgesetzt waren, simulierte dieser Aufbau bestmöglich den *in vivo*-Zustand einer mit Propofol durchgeführten Anästhesie.

Um die Funktionalität der PMNs im Sepsismodell zu simulieren, wurden diese aus gesunden Probanden isolierten PMNs anschließend mit LPS stimuliert. Die LPS-Konzentration von 40 pg/mL basierte auf einer früheren Studie (58). Diese beschrieb bei Atherosklerose, Raucherbronchitis und anderen „leichten“ Infektionserkrankungen LPS-Konzentrationen in diesen Bereich. Andere Autoren hingegen konnten zeigen, dass die LPS-Konzentration im Blut von Sepsis Patienten im Schnitt bei etwa 300 – 500 pg/mL lag (33). Da das auf der ICU unter Propofol-Anästhesie behandelte Patientenkollektiv sowohl Patienten mit Sepsis als auch Patienten mit einem geringeren Spiegel von LPS enthält, dienten 40 und 400 pg/mL LPS als gute Vergleichswerte. LPS kam erst nach den 30 min Inkubation der PMNs mit Propofol in Kontakt mit den Zellen und war dabei nur in den Reservoiren enthalten. LPS hatte daher weniger Zeit, die PMNs-Aktivität zu beeinflussen als das Anästhetikum selbst. Dies unterscheidet sich von den *in vivo* gegebenen Ausgangsbedingungen, könnte demnach zu einer Diskrepanz der Ergebnisse beigetragen haben und wird daher genauer unter 5.2 diskutiert.

Als Aktivator der PMNs fungierte der in zahlreichen Studien (59–62) etablierte Lockstoff fMLP. Dieser bindet an die Formyl-Peptid-Rezeptoren 1,2 (FPR1/2) auf der PMN-Oberfläche und setzt eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden in Gang. Der genaue Ablauf sowie die Notwendigkeit von zusätzlichen Mediatoren sind noch nicht vollends geklärt. Es wird ein enger Zusammenhang der Produktion von ROS und der NETose-Aktivierung vermutet (3).

Die etablierte Konzentrationsspanne von fMLP in Versuchen mit PMNs reicht von 10 µM (59, 61) bis zu 10 nM (63, 64). Es wurde früher gezeigt (64, 63), dass 0,1 µM fMLP zu einem Maximum an gerichteter Migration auf den Lockstoff hin führte. Eine Erhöhung bis zu 10 µM führte jedoch zu keiner weiteren Steigerung der Granulozyten-Funktionalität (63). Eine fMLP-Konzentration von 1 µM stimulierte in der PMNs-Bewegung häufigere Richtungswechsel (63). Allerdings wurde auch beobachtet (65), dass die Aktivierung durch höhere Mengen an fMLP den Transmitter ERK in ebenso hohem Maße aktivierte und damit zu einer grundsätzlich gleich

hohen Aktivierung der PMNs führte. Die herabgesetzte chemotaktische Bewegung wird aufgrund einer zu hohen Belegung der Rezeptoren der PMNs vermutet, welche eine Differenzierung der Position des Lockstoffes verhinderte (64). Dies lässt vermuten, dass die in dieser Studie verwendete fMLP-Konzentration von 10  $\mu$ M die Auswertung der Track Displacement X nicht zulässt, jedoch keinen Effekt auf alle anderen erhobenen Parameter haben sollte. Zur Kontrolle dieser Vermutung wurden drei Kontrollversuche mit einer fMLP-Konzentration 10 nM durchgeführt. Der Einfluss von Propofol auf die PMNs-Funktionalität in beiden fMLP-Konzentrations-Gruppen (10  $\mu$ M/ 10 nM) zeigte vergleichbare Ergebnisse für alle betrachteten Parameter. Lediglich die TDX wies geringe Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen auf, wobei sich diese jedoch auf den 0 – 30 min Zeit-Frame beschränkten. Durch die Stimulation der PMNs mit dieser hohen fMLP-Ausgangskonzentration sollte ein direkter Kontakt der PMNs mit Pathogenen simuliert werden und so zu einem hohen Grad an Aktivierung dieser führen.

Es wurde also in der vorliegenden Arbeit versucht, die komplizierten in vivo ablaufenden Prozesse bestmöglich zu reproduzieren. Eine Kombination aus den verschiedenen Methoden ermöglichte dabei eine umfassende quantitative sowie zeitliche Betrachtung der PMNs-Funktionalität. Dennoch bleibt eine in vitro-Simulation granulozytärer Mechanismen stets kritisch zu hinterfragen.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse und mögliche molekulare Mechanismen des Einflusses von Propofol und LPS

Es konnte in dieser Studie eine konzentrationsabhängige Reduktion der Track Length, der Track Displacement Length und des Track Speed Mean durch Propofol gezeigt werden. Ähnliche Resultate wurden früher berichtet (34). Es wurden in fMLP-stimulierten PMNs eine durch Propofol herabgesetzte Migrationsfähigkeit beobachtet. Als Einflussort von Propofol wurde eine Modulation der p44/42-mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) vermutet, welche ein Bestandteil der intrazellulären Signalkaskade zur Aktivierung der PMNs sind. Diese wurden auch von anderen Autoren diskutiert (66). Im Gegensatz dazu wurde auch berichtet, dass in fMLP-aktivierten PMNs eine Inhibition der p44/42 MAPK keinen Einfluss auf das chemotaktische Verhalten der Granulozyten hatte (67). Ein deutlich herabgesetztes Migrationsverhalten wurde jedoch durch Hemmen der p38 MAPK-Aktivität nach der Stimulation mit fMLP beobachtet. Dies wurde durch die Ergebnisse anderer Autoren unterstützt,

welche eine Beteiligung der p44/42 MAPK an der Chemotaxis von PMNs nach fMLP-Stimulierung nicht nachweisen konnten (68). In einer weiteren Studie sollte die p42 MAPK parallel zu verschiedenen Signalkaskaden maßgeblich an der Regulation der granulozytären Migration beteiligt sein (69). Dementsprechend konnte ein zusätzlicher Einfluss von p38 MAPK gezeigt werden. In einer anderen Studie wurde auch mit fMLF-stimulierten PMNs ebenfalls eine Reduktion der Migration durch Propofol nachgewiesen (70). Das fMLF (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin) wirkt wie fMLP über den FPR1-Rezeptor. Es konnte gezeigt werden, dass Propofol kompetitiv an FPR1 bindet und auf diesem Wege die Migration der mit fMLP/F aktivierten PMNs unterdrücken konnte.

Ein Einfluss von Propofol auf die gerichtete Chemotaxis auf den Lockstoff fMLP hin konnte bei einer Ausgangskonzentration von 10 µM fMLP nicht verifiziert werden. Dies scheint aber der fMLP-Konzentration von 10 µM geschuldet zu sein. Die zum Vergleich durchgeföhrten Experimente mit 10 nM fMLP zeigten konzentrationsabhängig eine leichte Reduktion der TDX unter Propofol.

LPS wird in der Literatur häufig als Stimulator der PMNs-Aktivität genannt und als Aktivator des oxidativen Bursts und der NETose verwendet (9, 33, 71). In vivo ist das Endotoxin nachweislich ein Vermittler von bakteriellen Entzündungsreaktionen (25, 30). Allerdings ist der Effekt von LPS auf die granulozytäre Chemotaxis bislang umstritten. So wurde berichtet, dass LPS in Konzentrationen bis 0,1 µg/mL keinen Effekt auf die durch fMLP-aktivierte Chemotaxis hatte (32). In höheren Mengen steigerte LPS die Dichte des FPR1-Rezeptors und senkte die Dichte anderer Rezeptoren für Chemoattraktants. Dadurch wurde die sogenannte „hierarchische“ Chemotaxis unterstützt, welche eine gezieltere Bewegung auf den Infektort ermöglichte. Diese Einflüsse wurden über die p38 MAPK-Aktivierung vermittelt. Andererseits sollte LPS die Migration stoppen und anschließend oxidative Bursts und die NETose initiieren (72). Als ein zu Grunde liegender Mechanismus wurde ein über LPS aktiverter P2X1-Rezeptor diskutiert, welcher über Ca<sup>2+</sup>-Influx in die Zelle zur p38 MAPK-Aktivierung führte. Diese These stützen die Ergebnisse anderer Autoren, welche eine Reduktion der Chemotaxis durch LPS beobachteten (73). Vermutlich dient LPS in vivo als Signal für die Ankunft am Infektionsort und den Start der Erregerabwehr mittels ROS-Produktion und NETose. In der vorliegenden Studie konnte eine tendenzielle Steigerung der PMN-Laufweite (TL) durch den Einfluss von LPS beobachtet werden. Diese war jedoch nur teilweise statistisch signifikant und

beschränkte sich auf die ersten 60 min des Beobachtungszeitraums. Auffällig war, dass eine Erhöhung der LPS-Konzentration von 40 auf 400 pg/mL zu keiner weiteren Steigerung der Track Length führte. Dies könnte einem „Ankommen“ am Infektionsort zugrunde liegen, welches durch die hohe LPS-Konzentration suggeriert werden könnte und dementsprechend keine weitere Migration erforderlich macht. Zudem schien die Track Speed Mean durch das Endotoxin beeinflusst zu sein. Es konnte eine LPS-konzentrationsabhängige Steigerung der Migrations-Geschwindigkeit beobachtet werden.

Grund für den ansonsten geringen Effekt von LPS in der vorliegenden Studie könnte die durch fMLP vermittelte Aktivierung sein. Die verwendeten LPS-Konzentrationen von 40 und 400 pg/mL lagen weit unter dem Schwellenwert von 0,1 µg/mL LPS, ab dem in anderen Arbeiten Effekte auf die fMLP-stimulierte Chemotaxis festgestellt wurden (32). Zudem führte die verwendete Methodik zu einer geringen Inkubationszeit von LPS, während Propofol schon 30 min zuvor mit den PMNs in Kontakt kam. Wie bereits erläutert, konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass auch Propofol über die p38 MAPK Einfluss auf das chemotaktische Verhalten der PMNs nehmen konnte (67–69). Somit wäre es denkbar, dass Propofol die Wirkung von LPS auf diesem Wege inhibierte.

Auffällig war jedoch ein durch die Kombination aus den verwendeten LPS- und Propofol-Konzentrationen verursachter deutlicher Einbruch der TL der PMNs nach den ersten 30 min des Beobachtungszeitraum innerhalb eines Versuches. Beide Substanzen zusammen schienen die Migrationsfähigkeit der PMNs schneller zu beenden. Dies stimmt mit den Beobachtungen in anderen Studien überein, welche nach 30-minütiger Inkubation der PMNs mit LPS eine deutlich erhöhte p38 MAPK-Aktivität feststellten (32). Die Aktivierung der Kinase führte zum Migrationsstopp (72).

Das Zusammenspiel unterschiedlicher Signalkaskaden in Bezug auf die granulozytäre Migration scheint plausibel. Der genaue Wirkort von Propofol und LPS in diesen komplexen Mechanismus ist in der aktuellen Datenlage bislang kontrovers.

Ein Einfluss der Propofol-Konzentration auf das zeitliche Maximum des oxidativen Bursts der PMNs konnte in dieser Studie bestätigt werden. Sowohl die klinisch relevante Konzentration von 6 µg/mL als auch eine zehnfach erhöhte Menge von 60 µg/mL Propofol führten zu einer Beschleunigung der Tmax-ROS um durchschnittlich je 30 min. Parallel dazu konnte im Durchflusszytometer eine ebenfalls konzentrationsabhängige Reduktion der ROS-Menge durch Propofol nachgewiesen werden. Nach Stimulation durch fMLP/TNF $\alpha$  wiesen die zuvor mit

Propofol inkubierten PMNs eine um 70 – 80 % reduzierte ROS-Produktion im Vergleich zum Kontrollwert auf. PMA-Stimulierung führte hingegen zu einem etwas geringeren Effekt mit einer Reduktion von 30 – 40 % durch Propofol im Vergleich zur Kontrolle.

Die derzeitige Datenlage stützt dieses Ergebnis. Der exakte Ablauf der intrazellulären Prozesse, welche zur ROS-Produktion führen und auf welchen Weg Propofol Einfluss darauf nimmt, bleiben jedoch kontrovers diskutiert.

Am naheliegendsten scheint die Wirkung von Propofol über den GABAa-Rezeptor. Dieser gilt als Hauptwirkort des Anästhetikums im ZNS (74, 13, 19). Es wird vermutet, dass PMNs GABAa nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren. Jedoch wurden in einigen Studien Ergebnisse erzielt, welche auf das Gegenteil schließen lassen (76, 70, 19, 13). Es wurde auch eine reduzierte Immunantwort bei Mäusen durch die Vorbehandlung mit Diazepam berichtet (75). Diese Beobachtung konnte durch eine gleichzeitige GABAa-Blockade verhindert werden. Allerdings beschränkte sich dieser Effekt nur auf Makrophagen und Monozyten, nicht jedoch PMNs. Widersprüchlich dazu wurde zwar der Effekt von Propofol auf die Produktion von ROS in PMNs berichtet, jedoch wurde GABAa nicht als Angriffspunkt des Anästhetikums diskutiert (70). Demnach wirkte Propofol nur auf über FPR1 aktivierte PMNs hemmend, und Propofol hatte mit und ohne vorangehende GABAa-Blockade denselben Effekt auf den oxidativen Burst der PMNs. In einer anderen Studie wurden vergleichbare Ergebnissen erzielt (77). Zudem wurde vermutet, dass eine PMA-Aktivierung nicht über FPR1, sondern über die PKC vermittelt würde und damit nicht durch Propofol beeinflussbar wäre (70). Die Reduktion der ROS-Produktion unter PMA-Aktivierung durch Propofol in den durchflusszytometrischen Daten der vorliegenden Studie war zwar geringer als unter einer TNFa/ fMLP-Aktivierung, es konnte aber durchaus ein Effekt beobachtet werden. Parallel dazu wurde eine Reduktion der ROS-Produktion in PMA-stimulierten PMNs durch 6 µg/mL Propofol um 34 % beobachtet (47). Es konnte zudem bestätigt werden, dass auch eine FPR1-abhängige PKC-Aktivierung möglich ist (78, 79). Propofol inhibierte den FPR1- Rezeptor kompetitiv und damit verbundene Signalkaskaden. Diese wiederum führten zu einer Reduktion des oxidativen Bursts. Wichtiger Bestandteil dieser intrazellulären Signalkaskaden sind die bereits in Bezug auf die Migration erwähnten mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Dazu zählen unter anderem die p38 MAPK oder die „extracellular signal related kinase“ ERK1/2 oder p44/42 MAPK (7, 80–82). Die Bedeutung der MAPK bei der Aktivierung des oxidativen Bursts wurde mehrfach nachgewiesen, jedoch ist der genaue Ablauf bislang umstritten (80, 7, 81, 82). So hatte Propofol

direkten Einfluss auf die Aktivität der p44/42 MAPK nach der Stimulierung mit PMA und inhibierte auf diesem Weg die NETose der PMNs (47). Ein Einfluss von Propofol auf den oxidativen Burst wird hier einem HOCL-„Scavenging“-Effekt zugesprochen, während p44/42 MAPK „downstream“ der ROS-Produktion vermutet wird. Widersprüchlich dazu wurde die Aktivierung der NADPH Oxidase „downstream“ der p44/42 MAPK vermutet (80). Auch die p38 MAPK wurde bereits als Angriffspunkt von Propofol in Bezug auf die Reduktion des oxidativen Bursts genannt (83). Die Vielzahl an verschiedenen Ergebnissen auf diesem Gebiet lässt einen parallelen Ablauf unterschiedlicher Mechanismen vermuten.

Ein in Bezug auf die PMN-Aktivierung ebenfalls interessanter Rezeptor ist das sogenannte „mitochondrial translocator protein“ (TSPO) (84). Neben dem diagnostischen Nutzen von TSPO in Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen, werden dem Rezeptor die Beeinflussung einer Vielzahl von Mechanismen wie Apoptose und Zellproliferation zugeschrieben. Neben endogenen Liganden gelten hauptsächlich Benzodiazepine als Mediatoren an TSPO (52). Bislang gibt es allerdings keine Studien, welche einen direkten Effekt von Propofol an TSPO untersuchen. Gezeigt wurde jedoch eine Reduktion der Bindung von TSPO-Liganden an den Rezeptor von 26 % unter Propofol-Anästhesie (85). Als Vermittler dieses Effektes wurde ein Einfluss von Propofol auf MAPK und Ionenkanäle diskutiert, jedoch wäre es von Interesse, die Beziehung von Propofol und TSPO weiter zu erforschen. Auch der Einfluss der TSPO-Aktivierung auf den oxidativen Burst wurde nachgewiesen (86). Neuronale Zelllinien mit reduzierter Expression von TSPO zeigten im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine signifikant geringere ROS-Produktion. Dieser Effekt wird dem Einfluss von TSPO-Aktivierung auf die NADPH-Oxidase über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege zugeschrieben. Die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird durch eine Hemmung der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmekapazität gesteigert. Dies wird über die TSPO-abhängige Aktivierung der PKA vermittelt, welche anschließend die Menge an mitochondrialen Anionenkanälen reguliert. Nachgewiesen wurde zudem eine gesteigerte TSPO-Expression in Mikrogliazellen bei Entzündungsreaktionen (87). Auch eine fMLP-Stimulation von PMNs führte zu einer erhöhten TSPO-Expression (52). Die Hemmung der TSPO nach fMLP-Stimulation von PMNs führte zu einer reduzierten Expression der Oberflächenmoleküle L-Selectin und PCAM-1 und schließlich zu einer verminderten Interaktion von PMNs und Endothel (52). Zusätzlich konnte auch hier ein Effekt auf die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch TSPO-Hemmung beobachtet werden. Dies wird einer Modulation des G-Protein-gekoppelten FPR1-fMLP-Rezeptors zugeschrieben. Der Einsatz unterschiedlicher TSPO-Liganden führte jedoch zu teilweise uneinheitlichen Ergebnissen.

Daher sollte der Einfluss von TSPO und die zugehörigen Signalwege auf die Immunreaktion von PMNs weiter erforscht werden.

Einen weiteren Hinweis auf eine Interaktion von Propofol mit mitochondrialen Mechanismen gibt die Forschung zum Propofol-Infusions-Syndrom. Dabei handelt es sich um eine schwerwiegende Komplikation im Rahmen einer Propofol-Anästhesie mit einer Bradykardie bis hin zur Asystolie sowie Rhabdomyolyse, metabolische Azidose oder Hyperlipidämie (88). Obwohl der genaue Pathomechanismus bislang umstritten bleibt, liegt das Hauptaugenmerk auf einer Entkopplung der Atmungskette an der mitochondrialen Membran (89). Demnach scheint es wahrscheinlich, dass Propofol intrazellulär und an den Mitochondrien eingreift. Künftige Analysen sollten erkennen lassen, welcher der bereits diskutierten Rezeptoren und Signalkaskaden dabei in Bezug auf die PMNs-Funktionalität am bedeutendsten ist.

Die Vielzahl der ablaufenden intrazellulären Signalkaskaden nach Stimulation der PMNs scheint auch von der stimulierenden Substanz abhängig zu sein (90, 10). Dementsprechend wird bei durch PMA stimulierten PMNs des Öfteren eine PKC abhängige zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Steigerung als ein Mechanismus diskutiert, der die Produktion von ROS auslöst. So wurde ein Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  nach PMA-Aktivierung der PMNs gemessen (9). Ein Erklärungsansatz ist, dass die steigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol als „Second Messenger“ zur Aktivierung der ROS-Produktion dienen könnte. Andere Autoren vermuten eine Schädigung der ER-Membran durch ROS als Grund für den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg (10).

Neben dem Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf den oxidativen Burst gilt der intrazelluläre Anstieg als NETose-stimulierend. Dieser aktiviert das Enzym „peptidylarginine deiminase“ (PAD4), welches im Zellkern zu einer Citrullinierung von DNS-assoziierten Histon H3 führt und dadurch zur Chromatindekondensation beiträgt (10, 9, 91). So konnte Propofol einen PKC-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in PMNs reduzieren (92). In einigen Studien konnte eine  $\text{Ca}^{2+}$ -senkende Wirkung von Propofol in Neuronen oder Zellen der glatten Muskulatur beobachtet werden (93–96). Eine Beeinflussung der NETose durch Propofol auf diesem Wege scheint also plausibel.

Der direkte Einfluss der reaktiven Sauerstoffspezies auf die Aktivierung der NETose konnte mehrfach bestätigt werden (11, 14). Ein Defekt der NADPH-Oxidase bei Patienten mit chronischer Granulomatose führt beispielsweise zu einer Unfähigkeit der PMNs NETose zu

vollziehen (11). Eine Reduktion der NETose durch Propofol wäre also auch durch die bereits diskutierte Beeinträchtigung des oxidativen Bursts zu erklären. Kongruent damit wurde bereits eine reduzierte NETose durch Präinkubation der PMNs mit Propofol beschrieben (47, 27). Es wurde angenommen, dass Propofol nur auf die ROS-abhängige NETose Einfluss habe, nicht jedoch auf eine ROS-unabhängig ausgelöste NETose (27). Auch andere Arbeiten beschreiben eine Reduktion von HOCl durch Propofol als Grund für die reduzierte NETose der PMNs. Parallel dazu soll jedoch auch eine Inhibition des p44/42 ERK-Signalwegs durch Propofol eine Rolle spielen (47).

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt von Propofol auf die NETose hingegen nicht quantitativ betrachtet, sondern in einen zeitlichen Kontext gesetzt.

Im Konsens mit dem früheren Ablauf des oxidativen Bursts durch Propofol, führten beide Propofol-Konzentrationen (6 oder 60 µg/mL) zu einer beschleunigten DAPI-Freisetzung von 60 – 70 min. Auch die MPO ET50-Messergebnisse waren um im Schnitt 40 min beschleunigt. Diese Ergebnisse spiegeln den bereits bestätigten Ablauf der NETose wider. Nach der Produktion von ROS und der Freisetzung von MPO kommt es zur Freisetzung der NETs in den Extrazellulärraum. Inwieweit Propofol auf die Geschwindigkeit dieses Ablaufs Einfluss nimmt, ist in der derzeitigen Datenlage bislang nicht untersucht. Aus der vorliegenden Studie wird jedoch ersichtlich, dass das Anästhetikum einen deutlichen Effekt auf diese hat. Weitere Forschung zu diesem Thema wäre dementsprechend von großem Interesse.

LPS schwächte den beobachteten Propofol Effekt auf den zeitlichen Verlauf des oxidativen Bursts und der NETose in dieser Studie tendenziell ab. Eine isolierte Betrachtung des Einflusses von 40 oder 400 pg/mL LPS auf diese Parameter führte zu keinen relevanten Unterschieden. Die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen und den in anderen Studien bestätigten Effekten von LPS auf die PMNs-Funktionalität könnte der Interaktion von Propofol und LPS innerhalb desselben Signalweges geschuldet sein. Diese wurden bereits in Bezug auf die PMNs-Migration diskutiert.

## 6 Zusammenfassung

Es konnte also letztlich bestätigt werden, dass das Anästhetikum Propofol einen erheblichen Einfluss auf die Immunantwort der neutrophilen Granulozyten hat. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der aktuellen Forschungslage zu dieser Thematik, wenn auch der genaue Mechanismus weiterhin unbekannt bleibt. Durch diese Arbeit konnte zusätzlich der zeitliche Effekt genauer beleuchtet werden. Die Vielzahl der oben diskutierten möglich Einflussorte von Propofol auf die PMNs zeigt, dass weitere Studien zu dieser Thematik erforderlich sind. Die enorme Relevanz einer Überreaktion der PMNs an schwerwiegenden klinischen Krankheitsbildern, wie der Sepsis und einer damit einhergehenden Erhöhung der Mortalität stützt die Dringlichkeit weiterer Forschung auf diesem Gebiet (27, 28). Gerade zugunsten der Eindämmung kritischer Krankheitsverläufe im Rahmen der Covid-19-Pandemie wäre eine Fortsetzung der Forschung zu dieser Thematik wünschenswert und von großem therapeutischem Interesse.

## 7 Anhang

Tabelle 28: Mediane der Track Displacement Y [ $\mu\text{m}$ ], erste drei Zeit Frames [min], in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g/mL}$ ] und 10 nM fMLP Alle TDY-Mediane unterscheiden sich signifikant innerhalb der Tabelle mit  $p < 0,001$ , Ausnahme im Zeit-Frame 31 – 60 min zwischen den Propofol Gruppen 0 und 6  $\mu\text{g/mL}$   $p = 0,002$ ; keine signifikanten Unterschiede gab es zwischen den Propofol-Gruppen 0 und 6  $\mu\text{g/mL}$  Zeit Frame 0 – 30 min und 0 und 60  $\mu\text{g/mL}$  im Zeit Frame 31 - 60 min.

		<b>Propofol</b> <b>0 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Propofol</b> <b>6 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Propofol</b> <b>60 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>
<b>TDY (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	0 – 30 min	0,13	-1,5	0,16
	31 – 60 min	0,01	0,41	0,06
	61 – 90 min	0,48	0,75	-0,08

Tabelle 29: Mediane der Track Displacement Length [ $\mu\text{m}$ ], erste drei Zeit Frames [min], in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g/mL}$ ] und 10 nM fMLP Alle TDL Mediane unterscheiden sich signifikant innerhalb der Tabelle mit  $p < 0,001$ , Ausnahme im Zeit Frame 31 – 60 min zwischen den Propofol Gruppen 6 und 60  $\mu\text{g/mL}$   $p = 0,002$

		<b>Propofol</b> <b>0 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Propofol</b> <b>6 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Propofol</b> <b>60 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>
<b>TDL (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	0 – 30 min	8,31	4,48	6,30
	31 – 60 min	2,98	0,73	0,68
	61 – 90 min	5,55	0,91	0,43

Tabelle 30: Mediane der Track Speed Mean [ $\mu\text{m/s}$ ], erste drei Zeit Frames [min], in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60  $\mu\text{g/mL}$ ] und 10 nM fMLP. Alle TSM Mediane unterscheiden sich signifikant innerhalb der Tabelle mit  $p < 0,001$

		<b>Propofol</b> <b>0 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Propofol</b> <b>6 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Propofol</b> <b>60 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>
<b>TSM (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	0 – 30 min	0,031	0,016	0,022
	31 – 60 min	0,038	0,014	0,018
	61 – 90 min	0,041	0,015	0,025

## Materialliste

Allgemeine Geräte und Materialien	
CO <sub>2</sub> -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
Lab Dancer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
MS2 Minishaker IKA JK	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Inkubator Lab-Therm LT-W	Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz
PIPETMAN® Classic P10 – 1000 µL 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
Cellstar® Tubes, 15mL, PP	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Rotilabo®-Reaktionsgefäße PP, farblos, 1,5 mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elektrische Analysewaage (ANLNR:1404927)	Spartorius AG Göttingen, Deutschland

Granulozyten-Isolierung	
Safety-Multifly-Kanüle 0,9 x 19 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Monovette Lithium-Heparin 5,5 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 7,5 mL LH	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pur-Zellin Zellstofftupfer	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Venenstauschlauch	Kimetec GmbH, Ditzingen, Deutschland
Softasept N	Braun, Melsungen, Deutschland
Cutioplast steril 7,2 x 5 cm	Smith & Nephew GmbH, Hamburg, Deutschland

Leuko Spin Medium, pluriSpin	pluriSelect Life Science – Worldwide, Leipzig, Deutschland
PBMC Spin Medium (Lympho Spin Medium), pluriSpin	pluriSelect Life Science – Worldwide, Leipzig, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (D8537-500ML)	Sigma Aldrich Co, Steinheim, Deutschland, Product of United Kingdom

Mikroskopie (Migration/NETose/ROS-Produktion/MPO-Freisetzung)	
Zählkammer Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser (Menzel-Gläser)	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (D8537-500ML)	Sigma Aldrich Co, Steinheim, Deutschland, Product of United Kingdom
RPMI 1640 without l-glutamine, phenolred, with sodium bicarbonate	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anti-MPO-APC, human 1mL (im folgenden "anti-MPO")	Miltenyl Biotec, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (im folgenden "DAPI")	Sigma Aldrich Co, Steinheim, Deutschland, Product of Israel
Dihydrorhodamine 123 (im folgenden "DHR")	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 Co, Steinheim, Deutschland, Product of United Kingdom
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	VWR International GmbH (Radnor, Pennsylvania, USA)
RPMI 1640, w/o: L-Glutamine, w/o: Phenol red, w: 2.0 g/L NaHCO <sub>3</sub>	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")	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 <sub>2</sub>	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	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Softwareplattform Leica Application Suite X	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinant Human ADAM9S	Alfa Aesar GmbH & Co KG. Karlsruhe, Deutschland
2,6-Diisopropylphenol, 97 % C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O (Propofol)	Sigma Aldrich Co, Steinheim, Deutschland, Product of France
Dimethyl sulfoxide, >99,5 % C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS (DMSO)	Acros organics (L2880) © 2020 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

FACS (Burst/Antikörper)	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with MgCl <sub>2</sub> and CaCl <sub>2</sub> , liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (D8662-500ML)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, Product of United Kingdom
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (D8537-500ML)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, Product of United Kingdom
Dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
N-Formyl-Met-Leu-Phe	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dihydrorhodamin 123	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Acetoxymethyl ester, Acetate (SNARF)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Propidiumiodid P1304MP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Human TNF Perotech 1 µg/mL	PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
Röhre 5mL PP (FACS-Röhrchen)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
FITC anti-human CD62L Clone: DREG-56	BioLegend, San Diego, USA
PE anti-human CD11b Clone: ICRF44 150µg/mL	BioLegend, San Diego, USA
APC anti-human CD66b Clone: G10F5 200 µg/mL	BioLegend, San Diego, USA
PE Anti-human CD16b	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
CellQuest Pro	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
FACSClean Solution	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FACSRinse Solution	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FACSF <sup>TM</sup> Flow	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Aqua Dest	Laborintern destilliert

Software	
Imaris x64 9.0.2	Bitplane, Zürich, Schweiz
FlowJo Version vX.0.7	FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA
SkanIt Re for Varioskan Flash 2.4.5.	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MS EXCEL Version 2010 & 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Phoenix 64 Version 8.0.0	Certara, New York, USA
SPSS Statistics 25	IBM, Armonk, New York, USA
MS WORD Version 2010 & 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersichtsschema zu den Experimenten mit dem Leica Innversionsmikroskop als Detektionssystem. Der genaue Versuchsaufbau ist in den Abbildung 5 und 6 präsentiert.	15
Abbildung 2: Messmethodik und untersuchte Parameter der PMNs-Funktionalität .....	15
Abbildung 3: Fließdiagramm zur Darstellung der Arbeitsschritte des Experimentes mit dem zum Leica-Inversionsmikroskop als Detektionssystem .....	16
Abbildung 4: Basisschema der Ibidi-Slide-Befüllung. Dargestellt ist ein Ibidi-Slide mit drei Kanälen und jeweils links und rechts verbundenen Reservoiren. Zusätzlich ist eine exemplarische Vergrößerung eines Kanales mit Reservoiren sowie deren Inhalt gezeigt.....	18
Abbildung 5: Übersicht der Kanal- und Reservoir-Befüllung in der Propofol-Versuchsreihe. Dargestellt sind die drei Kanäle mit jeweiliger Propofol-Konzentration, sowie die zugehörigen Reservoir und deren Befüllung. In der Graphik sind nicht alle Substanzen des Inhalts der Kanäle und Reservoir aufgelistet (vergleiche dazu den Fließtext).....	20
Abbildung 6: Übersicht der Kanal- und Reservoir-Befüllung in der LPS-Versuchsreihe. Dargestellt sind die drei Kanäle mit jeweiliger Propofol- und LPS-Konzentration sowie die zugehörigen Reservoir und deren Befüllung. In der Graphik sind nicht alle Substanzen des Inhalts der Kanäle und Reservoir aufgelistet (vergleiche dazu den Fließtext).....	21
Abbildung 7: Versuchszahlen je LPS- und Propofol-Konzentration in der LPS-Versuchsreihe .....	21
Abbildung 8: Schema zum Arbeitsablauf der durchflusszytometrischen Messungen. DPBS =Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, SNARF = Acetoxymethyl Ester, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, fMLP = N-Formyl-Met-Leu-Phe, PI = Propidium Iodide .....	25
Abbildung 9: Überblick über verwendete Softwares zur Datenanalyse der mit dem Leica Mikroskop und mit FACS erfassten Messergebnisse. ....	27
Abbildung 10: Exemplarische Laufstrecke eines Granulozyten unter dem Leica Lichtmikroskop innerhalb eines Zeit-Frames. Track Length (TL) entspricht der Gesamt-Laufstrecke, Track Displacement Length (TDL) entspricht der euklidischen Distanz, Track Displacement X entspricht der entlang der X- Achse zurückgelegten Laufstrecke, Track Displacement Y entspricht der entlang der Y-Achse zurückgelegten Laufstrecke.....	29

Abbildung 11: Beispielhafte Auswertung der Burst-Daten, 1. Gate: Markierung der Granulozyten-Wolke, 2. Gate: Markierung der vitalen Zellen, 3. Gate: Werte der Rhodamin 123-Fluoreszenz .....	31
Abbildung 12: Beispielhafte Auswertung der drei verschiedenen Antikörper. 1. Gate: Markierung der Granulozyten Wolke, 2. Gate: Markierung der an den CD11b Antikörper gekoppelten Farbstoff PE, 3. Gate: Markierung der an den CD66b Antikörper gekoppelten Farbstoff APC, 4. Gate: Markierung der an den CD62L Antikörper gekoppelten Farbstoff FITC .....	32
Abbildung 13: Track Length [ $\mu\text{m}$ ] abhängig von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] je Zeit Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Zeit Frames. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.....	36
Abbildung 14: Track Displacement in X- Richtung [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit Frames [min]. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.....	37
Abbildung 15: Track Displacement in Y- Richtung [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit Frames [min]. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.....	38
Abbildung 16: Track Displacement Length [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit Frames [min]. Extremwerte und Ausreiser teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots. ....	39
Abbildung 17: Track Length ( $\mu\text{m}$ ) in Abhängigkeit von der Propofol Konzentration (0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), aufgeteilt nach fMLP (10 $\mu\text{M}$ und 10 nM), innerhalb des Frames 31 – 60 min ...	41
Abbildung 18: Track Displacement in X- Richtung [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol Konzentration [0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit Frames [min]. fMLP Konzentration = 10 nM. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots. ....	42
Abbildung 19: Track Displacement in X- Richtung [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol Konzentration [0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] innerhalb des 0 – 30 min Zeit Frames. Vergleich der fMLP-Konzentrationen 10 $\mu\text{M}$ und 10 nM; Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.....	43
Abbildung 20: Track Length [ $\mu\text{m}$ ] abhängig von der LPS Konzentration [0 – 40 – 400 pg/mL] je Zeit Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Frames mit einer	

Propofol-Konzentration von 0 µg/mL. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.....	44
Abbildung 21: Track Length [µm] abhängig von der LPS Konzentration [0 – 40 – 400 pg/mL] je Zeit Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Frames mit einer Propofol-Konzentration von 6 µg/mL. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots .....	45
Abbildung 22: Track Length [µm] abhängig von der LPS-Konzentration [0 – 40 – 400 pg/mL] je Zeit Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Frames mit einer Propofol-Konzentration von 60 µg/mL. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots .....	46
Abbildung 23: Track Length [µm] abhängig von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60 µg/mL] je Zeit Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Frames mit einer LPS Konzentration von 0 pg/mL. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots .....	48
Abbildung 24: Track Length [µm] abhängig von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60 µg/mL] je Zeit Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Frames mit einer LPS Konzentration von 40 pg/mL. ....	49
Abbildung 25: Track Length [µm] abhängig von der Propofol Konzentration [0 – 6 – 60 µg/mL] je Zeit Frame [min]. Betrachtet wurden die ersten drei 30 Minuten Frames mit einer LPS Konzentration von 400 pg/mL. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.....	50
Abbildung 26: Track Displacement in X- Richtung [µm] in Abhängigkeit von LPS-Konzentrationen [0 – 40 – 400 pg/mL] innerhalb der ersten drei 30 Minuten mit 60 µg/mL Propofol. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots .....	52
Abbildung 27: Track Displacement in Y- Richtung [µm] in Abhängigkeit von LPS Konzentrationen [0 – 40 – 400 pg/mL] innerhalb der ersten drei 30 Minuten mit 60 µg/mL Propofol. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.	53
Abbildung 28: Track Displacement Length [µm] in Abhängigkeit von LPS-Konzentrationen [0 – 40 – 400 pg/mL] innerhalb der ersten drei Zeit-Frames [min] mit 6 µg/mL Propofol. Extremwerte und Ausreiser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots.....	54

Abbildung 29: Track Speed Mean [ $\mu\text{m}/\text{s}$ ] in Abhängigkeit von der LPS Konzentration [0 – 40 – 400 pg/mL] innerhalb der ersten drei Zeit Frames [min] mit 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Propofol.	56
Extremwerte und Ausreisser liegen teilweise außerhalb des hier gezeigten Boxplots .....	56
Abbildung 30: ET50 von DAPI (halbmaximaler Zeitpunkt der DAPI-Freisetzung) in Minuten in Abhängigkeit von Propofol ( 0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mit einer LPS-Konzentration von 0 pg/mL .....	57
Abbildung 31: Tmax-ROS (Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion) in Minuten in Abhängigkeit von der Propofol Konzentration (0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mit einer LPS-Konzentration von 0 pg/mL .....	59
Abbildung 32: Tmax ROS (Zeitpunkt der maximalen ROS Produktion) in Minuten in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mit einer LPS-Konzentration von 40 pg/mL .....	60
Abbildung 33: ET50 von MPO (halbmaximaler Zeitpunkt der MPO Freisetzung) in Minuten in Abhängigkeit von der Propofol- Konzentration ( 0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mit einer LPS-Konzentration von 0 pg/mL .....	62
Abbildung 34: ET50 von MPO (halbmaximaler Zeitpunkt der MPO Freisetzung) in Minuten in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration ( 0 – 40 – 400 pg/mL) mit einer Propofol Konzentration von 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .....	63
Abbildung 35: ET50 von DAPI (halbmaximaler Zeitpunkt der DAPI Freisetzung) in Minuten in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration ( 0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mit einer LPS-Konzentration von 0 pg/mL und mit 10 nM fMLP .....	64
Abbildung 36: Tmax ROS (Zeitpunkt der maximalen ROS Produktion) in Minuten in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); Vergleich der fMLP-Ausgangskonzentrationen im linken Reservoir von 10 nM und 10 $\mu\text{M}$ .....	65
Abbildung 37: Graphische Darstellung der oxidativen Burst-Aktivität ausgedrückt durch mediane Fluoreszenzintensität (MFI) nach Stimulation mit fMLP und TNF $\alpha$ in Abhängigkeit von DMSO (Dimethylsulfoxid) und Propofol [6 oder 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].....	66
Abbildung 38: Graphische Darstellung der oxidativen Burst Aktivität, ausgedrückt durch mediane Fluoreszenzintensität (MFI) nach Stimulation mit PMA in Abhängigkeit von DMSO (Dimethylsulfoxid) und Propofol [6 oder 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] .....	67

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema für Reservoir der LPS-Versuchsreihe. DMSO aus vorbereitetem Leerwert, LPS je nach Konzentration vorbereitete Vorverdünnungen, Propofol aus vorbereiteten Vorverdünnungen.....	22
Tabelle 2: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe DAPI, Rhodamin123, MPO- APC und deren Extinktions- und Emissionsmaxima, verwendete Belichtungswellenlängen und Filterwürfel sowie Filtereigenschaften. Alle Angaben in nm. Das Extinktionsmaximum entspricht der optimalen Extinktions-Längenwelle des jweiligen Farbstoffes, die LED-Belichtung der verwendeten Längenwelle und das Emissionsmaximum der emittierten Längenwelle.....	24
Tabelle 3: Arbeitsschritte der Burst-Messung. Alle Mengenangaben in $\mu\text{L}$ , drei angesetzte „Röhrchen“ im Doppelansatz, die Arbeitsschritte wurden von links nach rechts durchgeführt, DHR= Dihydrorhodamine 123, DPBS =Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline, SNARF = Acetoxymethyl Ester, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, fMLP = N-Formyl-Met-Leu-Phe, TNF $\alpha$ =Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , PI = Propidium Iodide .....	26
Tabelle 4: Arbeitsschritte zur Oberflächenprotein-Messung. Alle Mengenangaben in $\mu\text{L}$ , zwei angesetzte „Röhrchen“ im Doppelansatz, Arbeitsschritte wurden von links nach rechts durchgeführt, ZF = Zentrifuge, DPBS =Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline, CD11b (Integrin $\alpha$ -M), CD62L (L-Selektin) und CD66b (CEACAM8).....	27
Tabelle 5: Längenwellenbereiche der Anregung mithilfe eines Lasers (abs.) plus Filter (em.) der Antikörper-gekoppelten Farbstoffe Phycoerythrin, Allophycocyanin, Fluoresceinisothiocyanat.....	32
Tabelle 6: Eigenschaften der Probanden. Die Werte für Alter, Größe, Gewicht und BMI sind Mittelwerte, die Werte in Klammern entsprechen dem jeweiligen Minimal- bzw. Maximalwert. ....	34
Tabelle 7: Mittlere Zellzahlen pro Zeit Frame in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60 mg/mL). Für Propofol = 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konnten zwischen 26- 25 Versuche pro Zeit Frame herangezogen werden, für Propofol = 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zwischen 15-14 Versuche pro Zeit Frame und für Propofol = 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 14 Versuche pro Zeit Frame.....	35
Tabelle 8: Mediane der Track Length [ $\mu\text{m}$ ], erste drei Zeit Frames [min], in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]. .....	36
Tabelle 9: Mediane der Track Displacement Length [ $\mu\text{m}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol Konzentration [0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit Frames [min].....	38

Tabelle 10: Mediane der Track Speed Mean [ $\mu\text{m}/30\text{min}$ ] in Abhängigkeit von der Propofol Konzentration [0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ], innerhalb der ersten drei Zeit Frames. ....	40
Tabelle 11: Mediane der Track Length [ $\mu\text{m}$ ], erste drei Zeit Frames [min], in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ], fMLP-Konzentration = 10 nM .....	41
Tabelle 12: Anzahl der pro Kombination aus Propofol [0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] und LPS [0 – 40 – 400 pg/mL] durchgeführten Versuche. ....	43
Tabelle 13: Mediane der Track Length [ $\mu\text{m}$ ] unter LPS-Einfluss und ohne Propofol aufgeteilt nach drei 30-minutigen Frames.....	45
Tabelle 14: Mediane der Track Length ( $\mu\text{m}$ ) mit 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Propofol in Abhängigkeit von der LPS-Konzentraion (0 – 40 – 400 pg/mL) innerhalb der ersten eineinhalb Stunden .....	46
Tabelle 15: Mediane der Track Length ( $\mu\text{m}$ ) mit 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Propofol in Abhängigkeit von der LPS-Konzentraion (0 – 40 – 400 pg/mL) innerhalb der ersten eineinhalb Stunden .....	47
Tabelle 16: Mediane der Track Length ( $\mu\text{m}$ ) in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) innerhalb der ersten drei Frames mit 40 pg/mL LPS.....	49
Tabelle 17: Mediane der Track Length ( $\mu\text{m}$ ) in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration (0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) innerhalb der ersten drei Frames unter LPS = 400 pg/mL.....	50
Tabelle 18: Mediane der TDX ( $\mu\text{m}$ ), im 0 – 30 min Zeit Frame. In Abhängigkeit von der Propofol- (0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und LPS- (0 – 40 – 400 pg/mL) Konzentrationen.....	51
Tabelle 19: Mediane der Track Speed Mean [ $\mu\text{m}/30\text{min}$ ] in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration [0 – 40 – 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit Frames mit 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Propofol.....	55
Tabelle 20: Mediane der Track Speed Mean [ $\mu\text{m}/30\text{min}$ ] in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration [0 – 40 – 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] innerhalb der ersten drei Zeit Frames mit 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Propofol.....	55
Tabelle 21: Fallzahlen der auswertbaren DAPI-Versuche mit LPS (0 – 40 – 400 pg/mL) und Propofol (0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) .....	57
Tabelle 22: Mediane der ET50 von DAPI (halbmaximaler Zeitpunkt der DAPI-Freisetzung) in Minuten in Abhängigkeit von Propofol (0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und LPS (0 – 40 – 400 pg/mL). ....	58
Tabelle 23: Fallzahlen der auswertbaren Versuche zur Bestimmung der Tmax ROS für alle LPS- (0 – 40 – 400 pg/mL) und Propofol- (0 – 6 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Konzentrationen.....	58

Tabelle 24. Mediane der Tmax ROS (Zeitpunkt der maximalen ROS Produktion) in Minuten in Abhängigkeit aller Propofol- Konzentration (0 – 6 – 60 µg/mL) und LPS (0 – 40 – 400 pg/mL).....	60
Tabelle 25: Fallzahl der auswertbaren ET50 MPO Versuche für alle LPS (0 – 40 – 400 pg/mL) und Propofol (0 – 6 – 60 µg/mL) Konzentrationen.....	61
Tabelle 26: Mediane der ET50 von MPO (halbmaximaler Zeitpunkt der MPO Freisetzung) in Minuten in Abhängigkeit aller LPS- (0 – 40 – 400 pg/mL) und Propofol- ( 0 – 6 – 60 µg/mL) Konzentrationen. ....	62
Tabelle 27: Respiratory Burst Aktivität, ausgedrückt durch mediane Fluoreszenzintensität (MFI) nach Stimulation mit fMLP und TNF $\alpha$ . .....	67
Tabelle 28: Mediane der Track Displacement Y [µm], erste drei Zeit Frames [min], in Abhängigkeit von der Propofol- Konzentration [0 – 6 – 60 µg/mL] und 10 nM fMLP Alle TDY-Mediane unterscheiden sich signifikant innerhalb der Tabelle mit p <0,001, Ausnahme im Zeit-Frame 31 – 60 min zwischen den Propofol Gruppen 0 und 6 µg/mL p = 0,002; keine signifikanten Unterschiede gab es zwischen den Propofol-Gruppen 0 und 6 µg/mL Zeit Frame 0 – 30 min und 0 und 60 µg/mL im Zeit Frame 31 - 60 min. ....	79
Tabelle 29: Mediane der Track Displacement Length [µm], erste drei Zeit Frames [min], in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60 µg/mL] und 10 nM,fMLP Alle TDL Mediane unterscheiden sich signifikant innerhalb der Tabelle mit p <0,001, Ausnahme im Zeit Frame 31 – 60 min zwischen den Propofol Gruppen 6 und 60 µg/mL p = 0,002 .....	79
Tabelle 30: Mediane der Track Speed Mean [µm/s], erste drei Zeit Frames [min], in Abhängigkeit von der Propofol-Konzentration [0 – 6 – 60 µg/mL] und 10 nM fMLP. Alle TSM Mediane unterscheiden sich signifikant innerhalb der Tabelle mit p <0,001 .....	79

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Definition
PMNs	Polymorphkernige Leukozyten
MPO	Myeloperoxidase
IL8	Interleukin 8
GRO- $\alpha$	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1
fMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin
LPS	Lipopolysaccharide
ROS	Reactive Oxygen Species
NADPH-Oxidase	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
PAD4	Peptidylarginine Deiminase 4
NE	Neutrophile Elastase
PONV	Postoperative Übelkeit Und Erbrechen
WHO	World Health Organization
GABAa	Gamma-Aminobutyric Acid
COVID- 19	Coronavirus Disease 2019
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
DMSO	Dimethylsulfoxid
ICU	Intensive Care Unit
FACS	Durchflusszytometer
CD11b	Integrin A-M
CD62L	L-Selektin
CD66b /CEACAM8	Cea Cell Adhesion Molecule 8
RPMI	Roswell Park Memorial Institute -Medium
FKS	Fetales Kälberserum
MEM	Minimum essential Medium
DHR	Dihydrorhodamin 123

DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
APC	Allophycocyanin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
LED	Light-Emitting Diode
MFI	Medianen Fluoreszenzintensität
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
SNARF	Acetoxymethyl Ester
PI	Propidium Iodide
ZF	Zentrifuge
TDX	Track Displacement X
TL	Track Length
TDY	Track Displacement Y
TDL	Track Displacement Length
TSM	Track Speed Mean
ET50	Halbmaximales Wachstum der maximalen Flächensummen
E0	Initiale Effekthöhe
Emax	Maximale Effekthöhe
abs.	Absorption
em.	Emission
PE	Phycoerythrin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IQR	Interquartilbereich
BMI	Body Mass Index
FPR1/2	Formyl-Peptid-Rezeptor 1,2
ERK1/2	Extracellular Signal Related Kinase
ER	Endoplasmatisches Retikulum

PAD4	Peptidylarginine Deiminase
TSPO	Mitochondrial Translocator Protein
ZNS	Zentralnervensystem
PKC	Protein Kinase C
MAPK	Mitogenaktivierten Proteinkinasen
fMLF	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin
ca.	circa
u. a	unter anderem
z. B.	zum Beispiel

## 8.4 Literaturverzeichnis

### Literature Cited

1. Zonneveld R, Molema G, Plötz FB. Measurement of functional and morphodynamic neutrophil phenotypes in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care* 2016; 20:235.
2. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010; 33(5):657–70.
3. Teng T-S, Ji A-L, Ji X-Y, Li Y-Z. Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *J Immunol Res* 2017; 2017:9671604.
4. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:197–223.
5. Lam L, Mumford J, Keber B, Flanagan B. Hematologic Conditions: Leukopenia. *FP Essent* 2019; 485:11–6.
6. Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJD, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* 2005; 78(5):1025–42.
7. Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem* 2013; 114(3):532–40.
8. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303(5663):1532–5.
9. Bont CM de, Koopman WJH, Boelens WC, Pruijn GJM. Stimulus-dependent chromatin dynamics, citrullination, calcium signalling and ROS production during NET formation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018; 1865(11 Pt A):1621–9.
10. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ* 2011; 18(4):581–8.
11. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176(2):231–41.

12. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2010; 191(3):677–91.
13. Yip GMS, Chen Z-W, Edge CJ, Smith EH, Dickinson R, Hohenester E et al. A propofol binding site on mammalian GABAA receptors identified by photolabeling. *Nat Chem Biol* 2013; 9(11):715–20.
14. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 2009; 16(11):1438–44.
15. Wang H, Zheng S, Liu M, Jia C, Wang S, Wang X et al. The Effect of Propofol on Mitochondrial Fission during Oxygen-Glucose Deprivation and Reperfusion Injury in Rat Hippocampal Neurons. *PLoS ONE* 2016; 11(10).
16. Sahinovic MM, Struys MMRF, Absalom AR. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Propofol. *Clin Pharmacokinet* 2018; 57(12):1539–58.
17. Bryson HM, Fulton BR, Faulds D. Propofol. *Drugs* 1995; 50(3):513–59.
18. World Health Organization. Executive Summary The Selection and Use of Essential Medicines Report of the 22nd WHO Executive Summary: Selection and Use of Essential Medicines: WHO; 2019 2019. Available from: URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325773/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.05-eng.pdf?ua=1> [cited 2020 Nov 2].
19. Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F et al. General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB J* 2003; 17(2):250–2.
20. Ito H, Watanabe Y, Isshiki A, Uchino H. Neuroprotective properties of propofol and midazolam, but not pentobarbital, on neuronal damage induced by forebrain ischemia, based on the GABAA receptors. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43(2):153–62.
21. Hannon JD, Cody MJ. Effects of volatile anesthetics on sarcolemmal calcium transport and sarcoplasmic reticulum calcium content in isolated myocytes. *Anesthesiology* 2002; 96(6):1457–64.

22. Hsu BG, Yang FL, Lee RP, Peng TC, Chen HI. Effects of post-treatment with low-dose propofol on inflammatory responses to lipopolysaccharide-induced shock in conscious rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32(1-2):24–9.
23. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8):801–10.
24. Fleischmann et al, *Dtsch Arztebl Int* 2016, 113(10):159-66, DOI: 10.3238/arztebl.2016.0159. Sepsis in Deutschland.
25. Liu L, Sun B. Neutrophil pyroptosis: new perspectives on sepsis. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76(11):2031–42.
26. Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *J Clin Invest* 2016; 126(5):1612–20.
27. Meier A, Chien J, Hobohm L, Patras KA, Nizet V, Corriden R. Inhibition of Human Neutrophil Extracellular Trap (NET) Production by Propofol and Lipid Emulsion. *Front Pharmacol* 2019; 10:323.
28. Zhu L, Liu L, Zhang Y, Pu L, Liu J, Li X et al. High Level of Neutrophil Extracellular Traps Correlates With Poor Prognosis of Severe Influenza A Infection. *J Infect Dis* 2018; 217(3):428–37.
29. Santos SS, Brunialti MKC, Rigato O, Machado FR, Silva E, Salomao R. Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock* 2012; 38(1):18–23. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22575991/>.
30. Rosenfeld Y, Shai Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758(9):1513–22.
31. Skirecki T, Cavaillon J-M. Inner sensors of endotoxin - implications for sepsis research and therapy. *FEMS Microbiol Rev* 2019; 43(3):239–56.
32. Wang X, Qin W, Zhang Y, Zhang H, Sun B. Endotoxin promotes neutrophil hierarchical chemotaxis via the p38-membrane receptor pathway. *Oncotarget* 2016; 7(45):74247–58.

33. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE et al. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999; 180(5):1584–9.
34. Nagata T, Kansha M, Irita K, Takahashi S. Propofol inhibits FMLP-stimulated phosphorylation of p42 mitogen-activated protein kinase and chemotaxis in human neutrophils. *Br J Anaesth* 2001; 86(6):853–8.
35. Partrick DA, Moore FA, Moore EE, Barnett CC, Silliman CC. Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *New Horiz* 1996; 4(2):194–210.
36. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 2009; 15(11):1318–21.
37. Didangelos A. COVID-19 Hyperinflammation: What about Neutrophils? *mSphere* 2020; 5(3).
38. Bonow RO, Fonarow GC, O'Gara PT, Yancy CW. Association of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) With Myocardial Injury and Mortality. *JAMA Cardiol* 2020.
39. Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk A, Cools-Lartigue J, Crawford JM et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 2020; 217(6).
40. Nathan C. Neutrophils and COVID-19: Nots, NETs, and knots. *J Exp Med* 2020; 217(9).
41. Tomar B, Anders H-J, Desai J, Mulay SR. Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in COVID-19. *Cells* 2020; 9(6).
42. Helmy SA, Al-Attiyah RJ. The immunomodulatory effects of prolonged intravenous infusion of propofol versus midazolam in critically ill surgical patients. *Anaesthesia* 2001; 56(1):4–8.
43. Stevenson GW, Hall SC, Rudnick S, Seleny FL, Stevenson HC. The effect of anesthetic agents on the human immune response. *Anesthesiology* 1990; 72(3):542–52.
44. Marik PE. Propofol: an immunomodulating agent. *Pharmacotherapy* 2005; 25(5 Pt 2):28S-33S.

45. Senthilkumaran S, Koushik M, Sanjay P, Thirumalaikolundusubramanian P. Propofol in COVID 19 — From basic science to clinical impact. *The American Journal of Emergency Medicine* 2020.
46. Soh M, Hifumi T, Isokawa S, Shimizu M, Otani N, Ishimatsu S. The authors' response: Propofol in COVID 19: From basic science to clinical impact. *The American Journal of Emergency Medicine* 2020.
47. Chen M-S, Lin W-C, Yeh H-T, Hu C-L, Sheu S-M. Propofol specifically reduces PMA-induced neutrophil extracellular trap formation through inhibition of p-ERK and HOCl. *Life Sci* 2019; 221:178–86.
48. Chen Y, Junger WG. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol* 2012; 844:115–24.
49. Dihydrorhodamine 123 [cited 2019 Dec 17]. Available from: URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D23806#/D23806>.
50. DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) [cited 2019 Dec 17]. Available from: URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D1306#/D1306>.
51. Allophycocyanin (APC) | Thermo Fisher Scientific - TH [cited 2019 Dec 17]. Available from: URL: <https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/allophycocyanin.html>.
52. Lima CB de, Tamura EK, Montero-Melendez T, Palermo-Neto J, Perretti M, Markus RP et al. Actions of translocator protein ligands on neutrophil adhesion and motility induced by G-protein coupled receptor signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 417(2):918–23.
53. Marino F, Cattaneo S, Cosentino M, Rasini E, Di Grazia L, Fietta AM et al. Diazepam stimulates migration and phagocytosis of human neutrophils: possible contribution of peripheral-type benzodiazepine receptors and intracellular calcium. *Pharmacology* 2001; 63(1):42–9.
54. 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(6):2121–30.

55. 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.
56. Pai D, Gruber M, Pfaehler S-M, Bredthauer A, Lehle K, Trabold B. Polymorphonuclear Cell Chemotaxis and Suicidal NETosis: Simultaneous Observation Using fMLP, PMA, H7, and Live Cell Imaging. *J Immunol Res* 2020; 2020.
57. Sarah Willnecker. Modulation der Granulozytenfunktionalität durch Priming: Aus der Klinik für Anästhesiologie Prof. Dr. Bernhard M. Graf, Msc. der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg.
58. Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, Schratzberger P, Egger G, Oberholzer F et al. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology* 1999; 34(7):1975–81.
59. Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect Immun* 1994; 62(6):2195–201.
60. Suzuki K, Hino M, Kutsuna H, Hato F, Sakamoto C, Takahashi T et al. Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1 $\beta$ . *J Immunol* 2001; 167(10):5940–7.
61. Elbim C, Guichard C, Dang PMC, Fay M, Pedruzzi E, Demur H et al. Interleukin-18 Primes the Oxidative Burst of Neutrophils in Response to Formyl-Peptides: Role of Cytochrome b558 Translocation and N-Formyl Peptide Receptor Endocytosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12(3):436–46.
62. Dularay B, Elson CJ, Clements-Jewery S, Damais C, Lando D. Recombinant human interleukin-1 beta primes human polymorphonuclear leukocytes for stimulus-induced myeloperoxidase release. *J Leukoc Biol* 1990; 47(2):158–63.
63. James M. Shields\* And Wendy S. Haston. Behaviour of Neutrophil Leucocytes in Uniform Concentrations of Chemotactic Factors: Contraction Waves, Cell Polarity and Persistence *J. Cell Sd.* 74, 75-93 (1985).
64. Sally H. Zigmond. Ability of Polymorphonuclear Leukocytes to Orient in Gradients of Chemotactic Factors.

65. Zhang ER, Liu S, Wu LF, Altschuler SJ, Cobb MH. Chemoattractant concentration-dependent tuning of ERK signaling dynamics in migrating neutrophils. *Sci Signal* 2016; 9(458):ra122.
66. Kuroki M, O'Flaherty JT. Differential effects of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor on human neutrophil responses to chemotactic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232(2):474–7.
67. Zu YL, Qi J, Gilchrist A, Fernandez GA, Vazquez-Abad D, Kreutzer DL et al. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation. *J Immunol* 1998; 160(4):1982–9.
68. Coffer PJ, Geijssen N, M'rabet L, Schweizer RC, Maikoe T, Raaijmakers JA et al. Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function. *Biochem J* 1998; 329 (Pt 1):121–30.
69. Hii CST, Stacey K, Moghaddami N, Murray AW, Ferrante A. Role of the Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Cascade in Human Neutrophil Killing of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and in Migration. *Infect Immun* 1999; 67(3):1297–302.
70. Yang S-C, Chung P-J, Ho C-M, Kuo C-Y, Hung M-F, Huang Y-T et al. Propofol inhibits superoxide production, elastase release, and chemotaxis in formyl peptide-activated human neutrophils by blocking formyl peptide receptor 1. *J Immunol* 2013; 190(12):6511–9.
71. Hsing C-H, Lin M-C, Choi P-C, Huang W-C, Kai J-I, Tsai C-C et al. Anesthetic propofol reduces endotoxic inflammation by inhibiting reactive oxygen species-regulated Akt/IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B signaling. *PLoS ONE* 2011; 6(3):e17598.
72. Wang X, Qin W, Xu X, Xiong Y, Zhang Y, Zhang H et al. Endotoxin-induced autocrine ATP signaling inhibits neutrophil chemotaxis through enhancing myosin light chain phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114(17):4483–8.
73. Khan AI, Heit B, Andonegui G, Colarusso P, Kubes P. Lipopolysaccharide: a p38 MAPK-dependent disrupter of neutrophil chemotaxis. *Microcirculation* 2005; 12(5):421–32.

74. Eckle V-S, Hucklenbruch C, Todorovic SM. Was wissen wir über Narkosemechanismen? : Bewusstlosigkeit, Bewegungslosigkeit und Amnesie. *Anaesthetist* 2009; 58(11):1144–9.
75. Sanders RD, Godlee A, Fujimori T, Goulding J, Xin G, Salek-Ardakani S et al. Benzodiazepine augmented  $\gamma$ -amino-butyric acid signaling increases mortality from pneumonia in mice. *Crit Care Med* 2013; 41(7):1627–36.
76. Nigam R, El-Nour H, Amatya B, Nordlind K. GABA and GABA(A) receptor expression on immune cells in psoriasis: a pathophysiological role. *Arch Dermatol Res* 2010; 302(7):507–15.
77. Chen C-Y, Tsai Y-F, Huang W-J, Chang S-H, Hwang T-L. Propofol inhibits endogenous formyl peptide-induced neutrophil activation and alleviates lung injury. *Free Radic Biol Med* 2018; 129:372–82.
78. Dorward DA, Lucas CD, Chapman GB, Haslett C, Dhaliwal K, Rossi AG. The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. *Am J Pathol* 2015; 185(5):1172–84.
79. O'Flaherty JT, Jacobson DP, Redman JF, Rossi AG. Translocation of protein kinase C in human polymorphonuclear neutrophils. Regulation by cytosolic Ca<sup>2+</sup>(+)-independent and Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 1990; 265(16):9146–52.
80. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol* 2010; 7:75 EP -. Available from: URL: <https://doi.org/10.1038/nchembio.496>.
81. El Benna J, Han J, Park JW, Schmid E, Ulevitch RJ, Babior BM. Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch Biochem Biophys* 1996; 334(2):395–400.
82. Hidalgo MA, Carretta MD, Teuber SE, Zárate C, Cárcamo L, Concha II et al. fMLP-Induced IL-8 Release Is Dependent on NADPH Oxidase in Human Neutrophils. *J Immunol Res* 2015; 2015:120348.
83. Ren X, Lv F, Fang B, Liu S, Lv H, He G et al. Anesthetic agent propofol inhibits myeloid differentiation factor 88-dependent and independent signaling and mitigates

- lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species production in human neutrophils in vitro. *Eur J Pharmacol* 2014; 744:164–72.
84. Denora N, Natile G. An Updated View of Translocator Protein (TSPO). *Int J Mol Sci* 2017; 18(12).
85. Hines CS, Fujita M, Zoghbi SS, Kim JS, Quezado Z, Herscovitch P et al. Propofol Decreases In Vivo Binding of <sup>11</sup>C-PBR28 to Translocator Protein (18 kDa) in the Human Brain. *J Nucl Med* 2012; 54(1):64–9.
86. Gatliff J, East DA, Singh A, Alvarez MS, Frison M, Matic I et al. A role for TSPO in mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis and redox stress signaling. *Cell Death Dis* 2017; 8(6):e2896.
87. Bader S, Wolf L, Milenkovic VM, Gruber M, Nothdurfter C, Rupprecht R et al. Differential effects of TSPO ligands on mitochondrial function in mouse microglia cells. *Psychoneuroendocrinology* 2019; 106:65–76.
88. Kam PC, Cardone D. Propofol infusion syndrome. *Anaesthesia* 2007; 62(7). Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17567345/>.
89. Hemphill S, McMenamin L, Bellamy MC, Hopkins PM. Propofol infusion syndrome: a structured literature review and analysis of published case reports. *Br J Anaesth* 2019; 122(4). Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30857601/>.
90. 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.
91. Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol* 2008; 180(3):1895–902.
92. Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H et al. Propofol inhibits human neutrophil functions. *Anesth Analg* 1998; 87(3):695–700.
93. Sun B, Ou H, Ren F, Huan Y, Zhong T, Gao M et al. Propofol inhibited autophagy through Ca<sup>2+</sup>/CaMKKβ/AMPK/mTOR pathway in OGD/R-induced neuron injury. *Mol Med* 2018; 24(1):58.
94. Wu Q, Zhao Y, Chen X, Zhu M, Miao C. Propofol attenuates BV2 microglia inflammation via NMDA receptor inhibition. *Can J Physiol Pharmacol* 2018; 96(3):241–8.

95. Xuan YT, Glass PS. Propofol regulation of calcium entry pathways in cultured A10 and rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1996; 117(1):5–12.
96. Zhong H, Song R, Pang Q, Liu Y, Zhuang J, Chen Y et al. Propofol inhibits parthanatos via ROS-ER-calcium-mitochondria signal pathway in vivo and vitro. *Cell Death Dis* 2018; 9(10):932.