

Aus dem Lehrstuhl für Anästhesiologie
Prof. Dr. med. Bernhard M. Graf, MSc.
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Direktwirkung von Antibiotika auf die
Granulozytenfunktionalität**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Demian Nebosis

2024

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

PD Dr. Martin Kees

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Helmut Schweikl

Datum der mündlichen Prüfung:

14.03.2024

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Covid-19 als drängendes Problem der Gesellschaft sowie für das menschliche Immunsystem	7
1.2 Zentrale Bedeutung der Neutrophilen Granulozyten	7
1.2.1 Neutrophile Granulozyten als erste Instanz der angeborenen, unspezifischen Immunantwort	7
1.2.2 Herkunft und Definition des Terminus „Neutrophile Granulozyten“	9
1.2.3 Funktionsweise der neutrophilen Granulozyten	9
1.2.4 Mechanismen der Generierung und Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS) und deren ambivalente Wirkung	10
1.2.5 Funktion der Myeloperoxidase innerhalb des Abwehrsystems der neutrophilen Granulozyten.....	12
1.2.6 NET-Mechanismen	12
1.2.6.1 Entstehung und Funktionsweise der extrazellulären Netze	13
1.2.6.2 Verschiedene Formen des Zelltodes und der NETose	13
1.2.7 Extravasation und Migration der Neutrophilen durch das Gewebe entlang eines Konzentrationsgradienten.....	14
1.3 Wirkweise differierender Antibiotikaklassen und Gefahr der Antibiotikaresistenz	15
1.4 Ambivalenz des Wirkspektrums auf die körpereigene Immunabwehr durch Antibiotika	16
1.4.1 Förderung aber auch Abschwächung der Leukozytenaktivität durch Antibiotika	16
1.4.1.1 Meropenem.....	16
1.4.1.2 Cefuroxim	17
1.4.1.3 Moxifloxacin	18
1.4.1.4 Clarithromycin.....	19

1.4.2 Die besondere Rolle des Glukokortikoids Prednisolon	20
1.5 Untersuchungsgegenstand und Zielsetzung dieser experimentellen Doktorarbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Kurzer Abriss über den Versuchsablauf	23
2.2 Einverständniserklärung der Probanden und periphere Blutentnahme	23
2.3 Detailgetreuer Aufbau eines ibidi-3D-μ-slides	24
2.4 Gelherstellung und Vorbereitung der Antibiotikumkonzentrationen für die spätere Kanal- und Reservoirbefüllung anhand von Meropenem	26
2.5 Granulozytenisolation durch Dichtegradientenzentrifugation und Einstellung der Zellkonzentration mithilfe der Neubauer-Zählkammer	27
2.6 Herstellung von Lösungen (DHR, DAPI, MPO-APC) sowie deren Vermischung mit Zellen, Gel und entsprechender Antibiotikumkonzentration	29
2.7 Inkubation des ibidi-3D-μ-slides, Herstellung der Reservoir-Inhaltsstoffe und anschließende Befüllung	30
2.8 Konfiguration der Einstellungen des Mikroskops und Untersuchung der Granulozytenparameter	30
2.9 Beschreibung der Variationen im Versuchsablauf bei Testung von Cefuroxim, Moxifloxacin, Clarithromycin und Prednisolon	31
2.10 Darstellung der zentralen Schritte der Parameteranalyse	33
3 Ergebnisse.....	37
3.1 Ergebnisse Meropenem	37
3.1.1 Migrationslänge.....	37
3.1.2 Migrationsgeschwindigkeit	39
3.1.3 NETose und Freisetzung von Myeloperoxidase.....	40
3.1.4 Zeitverlauf und Intensität der ROS-Produktion.....	41
3.2 Ergebnisse Cefuroxim	43
3.2.1 Migrationslänge.....	44

3.2.2 Migrationsgeschwindigkeit	44
3.2.3 NETose und Freisetzung von Myeloperoxidase.....	44
3.2.4 Zeitverlauf und Intensität der ROS-Produktion.....	45
3.3 Ergebnisse Moxifloxacin.....	45
3.3.1 Migrationslänge.....	45
3.3.2 Migrationsgeschwindigkeit	45
3.3.3 NETose und Freisetzung von Myeloperoxidase.....	46
3.3.4 Zeitverlauf und Intensität der ROS-Produktion.....	46
3.4 Ergebnisse Clarithromycin	47
3.4.1 Migrationslänge.....	47
3.4.2 Migrationsgeschwindigkeit	47
3.4.3 NETose und Freisetzung von Myeloperoxidase.....	48
3.4.4 Zeitverlauf und Intensität der ROS-Produktion.....	48
3.5 Ergebnisse Prednisolon	49
3.5.1 Migrationslänge.....	49
3.5.2 Migrationsgeschwindigkeit	49
3.5.3 NETose und Freisetzung von Myeloperoxidase.....	50
3.5.4 Zeitverlauf und Intensität der ROS-Produktion.....	50
4 Diskussion.....	51
4.1 Beeinflussung von Migrationslänge und -geschwindigkeit durch die untersuchten Substanzen	51
4.2 Beeinflussung von NETose und Myeloperoxidase-Freisetzung durch die untersuchten Substanzen	55
4.3 Beeinflussung von ROS-Produktion und ROS-Intensität durch die untersuchten Substanzen	60
5 Zusammenfassung	65
6 Anhang zu Material und Methoden	67

6.1 Reagenzien	67
6.2 Laborbedarf	68
6.3 Geräte	69
6.4 Software	69
7 Abbildungen und Tabellen	70
7.1 Abbildungen	70
7.2 Tabellen	71
8 Literaturverzeichnis	72
9 Lebenslauf	82

1 Einleitung

1.1 Covid-19 als drängendes Problem der Gesellschaft sowie für das menschliche Immunsystem

„Wie kann ich mich vor einer Infektion schützen?“ – diese Frage stand in den letzten Jahren, in denen die Corona-Pandemie große Teile des öffentlichen Lebens lahmlegte, allgegenwärtig im Raum: Leere Regale in Supermärkten, menschenverlassene Straßen in Innenstädten, geschlossene Läden, Gaststätten und Kinos sowie überfüllte Intensivstationen in Kliniken, in denen Ärzte nach Aufrüstung der Kapazitäten für Beatmungsgeräte um das Leben von Patienten mit schweren Verläufen einer Coronainfektion kämpften. Bei Eintreten von Atemversagen führte dies zur Notwendigkeit des Einsatzes einer mechanischen Ventilation sowie kreislaufunterstützender, intensivmedizinischer Verfahren. Lange Zeit war das neuartige Coronavirus (SARS-CoV-2) das einzige Thema, das die ganze Gesellschaft dominierte. Neben der Impfung als Prävention stellen sich immunmodulatorische Ansätze, wie z.B. die Dexamethasongabe zur Milderung der Erkrankungsschwere als am ehesten vielversprechend heraus [1]. Außer dem Impfstoff und spezifisch wirksamen Medikamenten liegt die einzige Möglichkeit das Virus zu überwinden in der angeborenen und adaptiven Immunantwort des Menschen.

1.2 Zentrale Bedeutung der Neutrophilen Granulozyten

Die wichtigste Aufgabe des menschlichen Immunsystems besteht darin, potentiell schädliche körperfremde Strukturen zu detektieren und zu eliminieren. Zusätzlich ist es in die Reparatur eines möglicherweise entstandenen Schadens an körpereigenen Geweben und Strukturen involviert [2].

1.2.1 Neutrophile Granulozyten als erste Instanz der angeborenen, unspezifischen Immunantwort

Neben der Einteilung des Immunsystems in einen angeborenen, unspezifischen Teil und einen erworbenen, spezifischen Teil lässt sich das Immunsystem auch in eine

humorale Komponente, z.B. im Blutplasma gelöste Antikörper, das Komplementsystem, Interferone, etc. und in eine zelluläre Komponente, bestehend aus B- und T-Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), etc. aufteilen (siehe Abbildung 1). Hierbei ist es von enormer Relevanz, dass die unterschiedlichen Komponenten des Immunsystems in ihrer Abwehrfunktion wie Zahnräder ineinandergreifen und zusammenarbeiten [3].

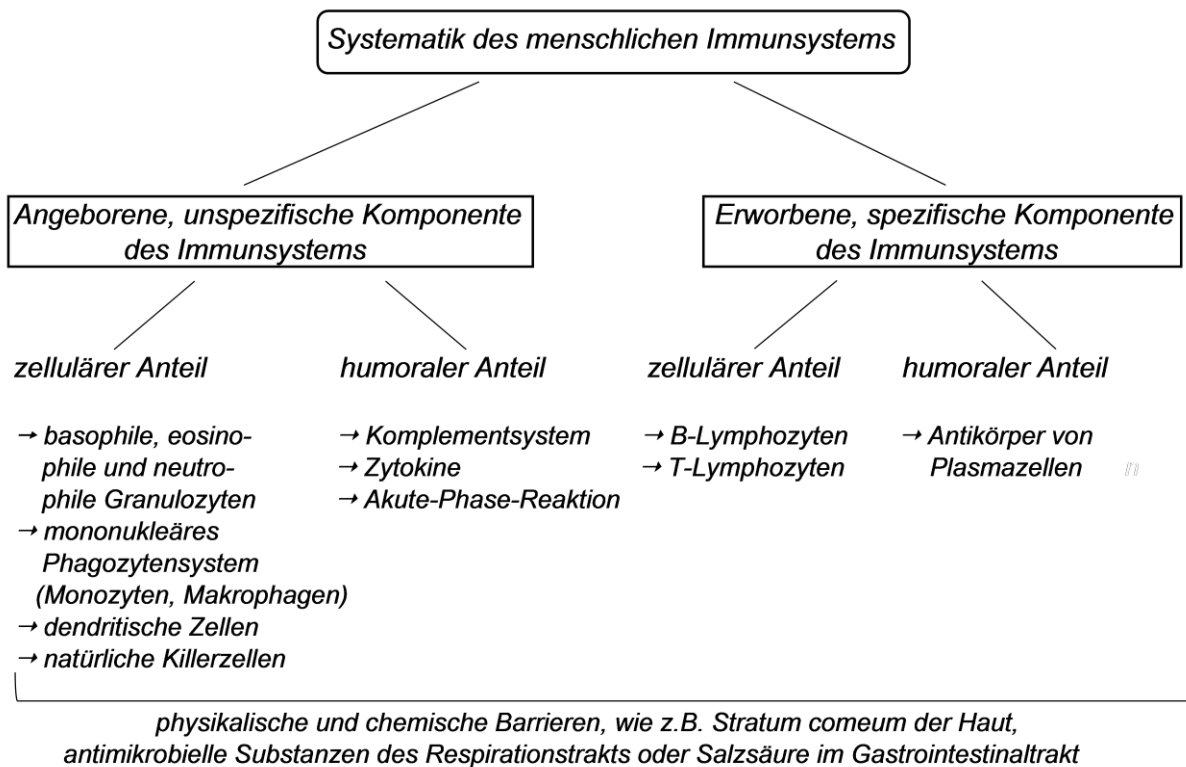


Abbildung 1: Gängige Aufteilung der vielfältigen Komponenten des menschlichen Immunsystems. Man kann einen angeborenen Teil von einem erworbenen, adaptiven Teil unterscheiden und diese beiden Bestandteile noch einmal in zelluläre und in humorale, d.h. im Blutplasma gelöste Proteine, Anteile aufgliedern. Bevor diese Instanzen des Immunsystems zum Tragen kommen, entfalten vorher schon physikalische und chemische Barrieren des menschlichen Körpers ihre Wirkung, um im Idealfall bereits das Eindringen von Pathogenen zu verhindern.

Bevor es jedoch zu einem direkt gegen den Krankheitserreger gerichteten Abwehrmechanismus in Form des spezifischen Immunsystems kommt, spielt primär das unspezifische Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung und Beseitigung von Bakterien, Pilzen, Parasiten oder Viren. Hierbei stehen dem angeborenen Immunsystem zahlreiche sowohl humorale als auch zelluläre Komponenten zur Verfügung, wobei neben dem bereits erwähnten in Kaskaden ablaufenden Komplementsystem sowie den NK-Zellen Phagozytoseprozesse in der direkten Abwehr von pathogenen Orga-

nismen ihre Wirkung entfalten. Bei der Phagozytose werden als körperfremd detektierte Stoffe durch Auflösung unschädlich gemacht, wozu vor allem Makrophagen, eosinophile und neutrophile Granulozyten mithilfe lysosomaler Enzyme befähigt sind [4]. Vor allem die neutrophilen Granulozyten zeichnen sich nicht nur dadurch aus, dass sie bei einer Infektion als erste Instanz zum Entzündungsherd rekrutiert werden, sondern auch noch in zahlreiche Abläufe der adaptiven Immunantwort involviert sind. Durch ihre Fähigkeit zur Migration und Extravasation, ihre Phagozytoseaktivität mit Abtötung von Bakterien, Viren und weiteren Mikroorganismen mithilfe der Produktion von Sauerstoffradikalen, Speicherung antimikrobieller Peptide in ihren Granula und Bildung neutrophiler, extrazellulärer Fallen (NETs) wird ersichtlich, weshalb sie unter anderem als erste Zellen der Abwehr eine unabdingbare Instanz in der zellulären Komponente der Immunabwehr darstellen [5].

1.2.2 Herkunft und Definition des Terminus „Neutrophile Granulozyten“

Unter neutrophilen Granulozyten versteht man eine Untergruppe der leukozytären Blutzellreihe, welche mit 55% - 65% den größten Anteil der weißen Blutkörperchen bildet [6]. Ihren Namen erhielten die Granulozyten infolge ihrer deutlich anfärbbaren Granula, die sich im Cytoplasma befinden. Der in seiner Form variierende Zellkern führte auch zu der Bezeichnung „polymorphkernige Leukozyten“ [7]. Alle Granulozyten sind mit einer Lebensdauer von maximal wenigen Tagen im Vergleich zu anderen menschlichen Zellen relativ kurzlebig. Sie entstehen aus gemeinsamen myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark, aus welchen auch weitere Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen hervorgehen. Auch basophile und eosinophile Granulozyten, die sich von den Neutrophilen durch die Anfärbungseigenschaften ihrer Granula differenzieren, entwickeln sich aus den genannten Stammzellen. Während des Auftretens eines inflammatorischen Herdes bzw. des Eindringens eines pathogenen Mikroorganismus wird ihre Produktionsrate gesteigert.

1.2.3 Funktionsweise der neutrophilen Granulozyten

Im Rahmen ihrer Aktivität als „Fresszellen“ nehmen neutrophile Granulozyten endozytotisch Bestandteile verschiedener Erreger bzw. körperfremde Mikroorganismen auf und sorgen für eine effektive Auflösung bzw. Abtötung derselben in intragranulozytären Vesikeln (Phagozytose) [8]. Um dafür an den genauen Ort des Entzündungsge-

schehens zu gelangen, werden die Neutrophilen durch unterschiedliche proinflammatorische Botenstoffe, sogenannte Zytokine, angelockt, womit die Entzündungsreaktion initiiert wird. Zusätzlich erzeugen die Makrophagen auch Chemokine, eine Untergruppe der Zytokine, wodurch ein chemotaktischer Gradient den neutrophilen Granulozyten und weiteren Immunzellen den Weg zum Infektionsherd signalisiert [9]. Ab dieser Stufe in der Signalkaskade der Wirkungsweise neutrophiler Granulozyten, könnte man ihre Strategie mit dem berühmten Zitat des römischen Feldherrn Julius Caesar vergleichen: „Veni, vidi, vici.“ „Ich kam, sah und siegte.“ Erst einmal am Ort des inflammatorischen Geschehens angelangt („veni“), detektieren sie den Erreger bzw. pathogene Bestandteile („vidi“) und beginnen mithilfe der großen Anzahl an Verteidigungsmechanismen, die ihnen zur Verfügung stehen, die eingedrungenen Mikroorganismen zu bekämpfen und abzutöten („vici“). In diesem Schritt könnte man die neutrophilen Granulozyten auch aufgrund ihrer ausgefeilten, dezidierten Immunstrategien als die „Caesaren des Immunsystems“ bezeichnen: Nach dem Aufspüren und Aufnehmen von körperfeindlichen Organismen durch die Neutrophilen werden diese durch Produktion von Sauerstoffradikalen und Sezernierung von bakteriziden Granula, in welchen abbauende Enzyme wie Neutrophilen-Elastase und Myeloperoxidase (MPO) sowie weitere antimikrobielle Moleküle enthalten sind, abgetötet. Außerdem können neutrophile Granulozyten durch eine bestimmte Art des Zelltodes, die sogenannte „NETose“, „klebrige“ DNA-Netze bilden, um Krankheitserreger einzufangen [2]. So weisen die „Caesaren des Immunsystems“ im metaphorischen Sinne tatsächlich die Kerncharaktereigenschaften des weltbekannten römischen Feldherrn auf: „radikal“ in der Bekämpfung der Feinde auf ihren „Feldzügen“ durch den menschlichen Körper, „sensibel“ im Hinblick auf die Erkennung einer Invasion u.a. über einen chemotaktischen Gradienten sowie über Zytokine und „durchstrukturiert“ durch die genaue Abfolge von Verteidigungsmechanismen und die Zusammenarbeit mit weiteren Immunzellen sowie der adaptiven Komponente des Immunsystems.

1.2.4 Mechanismen der Generierung und Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS) und deren ambivalente Wirkung

Ein wichtiger Abwehrmechanismus der neutrophilen Granulozyten besteht in der Produktion von sogenannten „Reactive Oxygen Species“ (ROS), welche direkt gegen den auslösenden pathogenen Fremdkörper gerichtet sind. Bei den ROS handelt es sich um eine Gruppe Sauerstoff enthaltender, sehr reaktiver chemischer Verbindungen, wie

Singulett-Sauerstoff, Superoxidanion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hypochlorit (OCl^-) sowie weitere organische Peroxide [9]. Diese werden mithilfe eines membran-gebundenen Enzyms, der NADPH-Oxidase (Phagozytenoxidase), welche aus verschiedenen Untereinheiten besteht, generiert. Ohne inflammatorische Stimulation bleibt das Enzym in einem inaktiven Zustand, wobei die Untereinheiten auch nicht vollständig zusammengebaut sind. Der Cytochrom-b₅₅₈-Komplex stellt eine dieser Untereinheiten dar, er befindet sich in der Plasmamembran neutrophiler Zellen. Weitere Komponenten des Enzyms, wie p40phox, p47phox und p67phox sind im Cytosol der Zellen lokalisiert und müssen sich z.B. bei Stimulation der Granulozyten durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder einer Aktivierung im Falle eines anderweitigen entzündlichen Prozesses zu den membranären Bestandteilen bewegen, was durch die Unterstützung der GTPase Rac gefördert wird. Angelangt an der Membran werden die Untereinheiten der NADPH-Oxidase zum aktiven Enzym zusammengesetzt [8]. Für diesen Vorgang sind auch mehrere Kinasen, welche die regulatorische Untereinheit p47phox phosphorylieren, verantwortlich. Bei der durch die NADPH-Oxidase generierten Reaktion kommt es als Folge zu einem temporären Anstieg des Sauerstoffverbrauchs der Neutrophilen, dem sogenannten „respiratorischen Burst“, wobei aus Sauerstoffmolekülen Superoxidanionenradikale ($O_2^{\cdot-}$) entstehen. Im weiteren Verlauf werden diese entweder spontan oder mittels eines Enzyms, der Superoxid-Dismutase (SOD), zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt. Über spontanen Zerfall, weitere chemische Reaktionen, wie der Fenton-Reaktion oder über enzymatische Reaktionen, bei denen Wasserstoffperoxid z.B. als Substrat für die Myeloperoxidase dient, wird aus H_2O_2 eine große Anzahl toxischer Radikale produziert, beispielsweise hypohalogene Säuren, die z.B. zu Hypochlorit (OCl^-) und Hypobromit (OBr^-) deprotonieren, oder das Hydroxylradikal ($\cdot OH$). Diese Reaktionskaskade zeigt einen grundlegenden Mechanismus von enormer Relevanz zur intragranulozytären Eliminierung der Erreger auf, der nach der direkten Erkennung von bakteriellen Polypeptiden bzw. der Detektion anderer Pathogene in Gang gesetzt wird [7, 8]. Werden die bei den beschriebenen Reaktionen entstandenen Sauerstoffradikale intrazellulär freigesetzt, entstehen Phagolysosomen, jedoch werden ROS auch in extrazelluläre Kompartimente entlassen. Hierbei muss auch die Ambivalenz der reaktiven Sauerstoffspezies berücksichtigt werden, da sie neben den physiologischen, antimikrobiellen Prozessen bei der Immunabwehr im Falle einer überschießenden, länger andauernden Reaktion auch zu einer Schädigung

des umliegenden, humanen Gewebes führen können und somit zytotoxisch auf den eigenen Organismus wirken [6].

1.2.5 Funktion der Myeloperoxidase innerhalb des Abwehrsystems der neutrophilen Granulozyten

Eines der wichtigsten, in seiner gemeinsamen Reaktion mit Wasserstoffperoxid im vorangehenden Abschnitt bereits angeführten lysosomalen Enzyme stellt die Myeloperoxidase dar, welche in den azurophilen Granula der Neutrophilen gespeichert wird und zu den Isoformen der NADPH-Oxidase zählt [9]. Neben der Umwandlung von H_2O_2 in hochreaktive, hypohalogene Säuren durch Oxidation von Chloridionen erweist sich MPO auch als einer der zentralen Regulatoren bei inflammatorischen Prozessen und macht ca. 1-5% der gesamten Zellproteinmenge in neutrophilen Granulozyten aus. Bei Aufnahme der phagozytotischen Aktivität ist die Myeloperoxidase zentraler Bestandteil des entstandenen Phagolysosoms, wo sie neben weiteren Granulainhaltsstoffen, wie antimikrobiellen Peptiden, z.B. Defensinen, sauren Hydrolasen, Lysozymen und Serinproteasen u.a. durch das Katalysieren der Entstehung hypochloriger Säure gegen pathogene Mikroorganismen wirkt [10, 11]. Trotz ihrer Involvierung in zahlreiche Abwehrprozesse und der tragenden Rolle in der ROS-Produktion scheint die Myeloperoxidase keine wie anfänglich angenommene universale Wirkweise gegen mikrobielle Pathogene aufzuweisen, was sich auch darin widerspiegelt, dass Patienten mit einem MPO-Defizit keine massiv gesteigerte Anfälligkeit für Infektionen zeigen [5]. Diese Tatsache erscheint gerade angesichts der wesentlichen Beteiligung der Myeloperoxidase an der Entstehung von sogenannten „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs), welche im folgenden Abschnitt genauer beschrieben werden, erstaunlich. Vermutlich ist dieses Phänomen darauf zurückzuführen, dass Sauerstoffradikale beispielsweise über die Fenton-Reaktion auch bei Mangel an MPO produziert werden können und die Myeloperoxidase auch ohne enzymatische Tätigkeit gemeinsam mit der Neutrophilen-Elastase eine Dekondensation des Chromatins, welche für die NET-Ausbildung von zentraler Relevanz ist, auslösen kann [5].

1.2.6 NET-Mechanismen

Neben der Phagozytose, dem oxidativen Burst und der Degranulierung antimikrobieller Peptide und Enzyme profilierte sich die Freisetzung von „klebrigen“ Netzen aus der eigenen DNA („neutrophil extracellular traps“, NETs) durch die neutrophilen Granulozyten als eine ihrer weiteren Hauptstrategien in der Abwehr pathogener Erreger.

1.2.6.1 Entstehung und Funktionsweise der extrazellulären Netze

Diese „neutrophilen extrazellulären Fallen“ dienen neben dem Einfangen und Immobilisieren mikrobieller Strukturen auch dazu, eine direkte mikrobizide Wirkung als Verteidigungsmechanismus auszulösen [12]. Mithilfe einer Bedeckung der Netze mit neutrophilen Proteinen aus dem Cytoplasma, den Granula und dem Zellkern, wird dieser gegen Mikroorganismen gerichtete Effekt verstärkt, wobei der genaue Vorgang der Ausbildung von NETs auch als „NETose“ bezeichnet wird. Im Rahmen der NETose wird die Wand des Zellkerns desintegriert, was in einer Auflösung der nukleären und desweiteren auch der granulären Membranen mündet und anschließend zu einer Vermischung des dekondensierten Chromatins mit den Proteinen der neutrophilen Granula und des Cytoplasmas bei noch intakter Zellmembran führt. Das Gemisch aus antimikrobiellen Peptiden, weiteren Granulaenzymen, Histonen und nukleärer DNA wird in einem letzten Schritt nach Ruptur der Zellmembran des Granulozyten als netzartiges Geflecht in den Extrazellulärraum freigesetzt [13]. Für die Ausbildung der beschriebenen Netzstrukturen stellt die unter Punkt 1.2.4 ausgeführte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) einen wichtigen Baustein in ihrer Generierung dar. In der entstandenen fibrillären Matrix können nun beispielsweise Bakterien, Pilze oder andere pathogene Mikroorganismen adhärirt und immobilisiert werden, sodass weitere vitale neutrophile Granulozyten oder Makrophagen, die sich in der Umgebung befinden, diese aufnehmen und z.B. mittels Phagozytose abtöten können [8].

1.2.6.2 Verschiedene Formen des Zelltodes und der NETose

Der beschriebene Mechanismus der NETose bildet neben den herkömmlichen Arten des Zelltodes, zu denen Apoptose und Nekrose zählen, eine weitere Variante. So wird z.B. bei der Apoptose das Chromatin des Zellkerns klassischerweise abgebaut und nicht wie bei der NETose in den Extrazellulärraum abgegeben. Inzwischen wurde die Formation der NET-Strukturen sogar ohne einen obligat folgenden, unmittelbaren Zelltod der neutrophilen Granulozyten beobachtet. So setzten beispielsweise vitale neutrophile Granulozyten, die mit grampositiven Bakterien in Kontakt gebracht wurden, innerhalb der ersten Stunde nukleäre DNA kombiniert mit granulären Proteinen frei [14, 15]. Die vitale NETose erfordert hierbei einen vesikulären Transport der DNA aus dem Inneren des Zellkerns in den extrazellulären Bereich. Mithilfe eines Elektronenmikroskops demonstrierten Yipp et al., dass gebündelte DNA-Vesikel aus dem Nukleus das Zytoplasma passierten, mit der Plasmamembran verschmolzen und NETs aus der

Zelle transportierten ohne eine zwingende Perforation der Membran [15]. Ebenso wurde nachgewiesen, dass mit Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und mit Lipopolysacchariden (LPS) stimulierte lebende Neutrophile schon nach einer guten halben Stunde mitochondriale DNA gemeinsam mit Granulaproteinen in den Extrazellulärraum abgaben [16]. Diese Erkenntnisse verdeutlichen noch einmal die Komplexität des NETose-Prozesses, ebenso wie der Gesichtspunkt, dass eine Abschwächung der Fähigkeit zur NETose bei älteren Patienten auftritt [17].

1.2.7 Extravasation und Migration der Neutrophilen durch das Gewebe entlang eines Konzentrationsgradienten

Eine weitere wichtige Eigenschaft der neutrophilen Granulozyten, die es den Neutrophilen überhaupt erst ermöglicht an einen im Körpergewebe lokalisierten Entzündungsherd zu gelangen, beruht auf der Durchquerung der Blutgefäßwand und dem Vordringen in die inflammatorische Zone, der sogenannten „Leukodiapedese“. Ab dem Beginn der Wechselwirkung zwischen Neutrophilem und Endothelzelle durch veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen sowohl auf Seite des Granulozyten als auch auf Seite des Gefäßendothels lassen sich grundlegend vier Phasen der Migration aus dem Blutgefäß (Extravasation) unterscheiden: Selektinvermitteltes, adhäsives „Rollen“, Eingehen einer festen Bindung zwischen Granulozyt und Endothelzelle, eigentlicher Gefäßdurchtritt – Diapedese – und schließlich Migration, d.h. Wanderung durch das Gewebe [18]. Von diesen vier Phasen zeigt besonders die letzte hohe Relevanz im Hinblick auf die im Rahmen dieser Studie untersuchten Parameter der Migration und der Migrationsgeschwindigkeit. Während die Wanderung der Granulozyten in der in vitro durchgeführten Studie durch einen speziellen Lockstoff initiiert wurde, wird die Migration in vivo gezielt durch Chemokine gesteuert, um die neutrophilen Granulozyten in Richtung des inflammatorischen Geschehens zu lenken. Diese Chemokine stellen chemische Signalmoleküle dar, zu deren wichtigsten Vertretern CXCL8 und CCL2 zählen. Sie bestehen aus einer Gruppe verschiedener Entzündungsmediatoren, die in infizierten Geweben produziert werden und an die Oberflächen von Endothelien sowie an Proteoglykane gebunden und anschließend präsentiert werden. Dieser Vorgang ermöglicht es den migrierenden Leukozyten sich entlang eines Konzentrationsgradienten zu bewegen und gerichtet zum Inflammationsherd zu gelangen. Dort werden die Granulozyten durch Migration Inhibitory Factors (MIF) davon abgehalten sich wieder zu entfernen [19]. Sezerniert werden Chemokine beispielsweise von

Makrophagen, die einen pathogenen Mikroorganismus detektiert haben, um möglichst schnell eine große Anzahl neutrophiler Granulozyten in die entsprechende Region zu locken. Dringen so z.B. Bakterien in menschliches Gewebe ein, können die Neutrophilen über Komplement- und Mustererkennungsrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche im Rahmen der angeborenen Immunität den Erreger aufspüren und diesen mithilfe ihrer phagozytotischen Aktivität oder mittels anderer Abwehrmechanismen unschädlich machen [8].

1.3 Wirkweise differierender Antibiotikaklassen und Gefahr der Antibiotikaresistenz

Trotz aller Raffinessen wird das Immunsystem selbstverständlich nicht zuverlässig mit jedem Erreger fertig. Deswegen ist ein Grundpfeiler der Therapie schwerer Infektionen die Verabreichung direkt antimikrobiell wirksamer Substanzen. Zu den bedeutendsten Antibiotikaklassen zählen neben Penicillinen u.a. Aminoglykoside, Carbapeneme, Cephalosporine, Fluorchinolone, Makrolide, Rifamycine und Tetrazykline [20]. Vertreter von vier der genannten Klassen wurden auch im Rahmen der Versuchsreihen für diese Doktorarbeit untersucht. Bezüglich ihrer Wirkungsweise verhindern beispielsweise Carbapeneme und Cephalosporine die Synthese der bakteriellen Zellwand. Im Gegensatz dazu stören Fluorchinolone den Stoffwechsel der Bakterien, indem sie als sogenannte „Gyrasehemmer“ deren Erbsubstanz schädigen, während der Angriffspunkt der Makrolide in der bakteriellen Proteinsynthese liegt.

Die oben aufgeführten vielfältigen Wirkmechanismen der unterschiedlichen Arten von Antibiotika stellen eine zentrale Rolle in der Unterstützung der menschlichen, körpereigenen Immunabwehr dar. Problematisch wird es jedoch, wenn aufgrund des zunehmenden Selektionsdrucks auf Bakterien durch übermäßige Antibiotikatherapie vermehrt Resistenzen auftreten. Diese entstehen durch eine Veränderung des bakteriellen Erbguts, welche zu neu gewonnenen Fähigkeiten, wie beispielsweise der Bildung des Enzyms β -Lactamase führen können und somit den Bakterien die Hydrolyse des β -Lactam-Rings und damit die Inaktivierung von β -Lactam-Antibiotika ermöglichen. So verlieren Antibiotika ihre Wirksamkeit gegen den Bakterienstamm und die Resistenzmechanismen können auch über Plasmide von einer Bakterienart auf die andere übertragen werden [21].

1.4 Ambivalenz des Wirkspektrums auf die körpereigene Immunabwehr durch Antibiotika

Während die Problematik der Antibiotikaresistenzmechanismen aufgrund der hohen klinischen Relevanz Gegenstand intensiver Forschung ist, wurde bisher kaum berücksichtigt, ob bestimmte Antibiotikaklassen bedeutende Instanzen der zellulären Immunität unterstützen oder sie abschwächen. Durch die Verwandtschaft von Mitochondrien mit Bakterien könnte ein gegen bakterielle Strukturen gerichteter Mechanismus ebenso in die Funktionsweise neutrophiler Granulozyten eingreifen, da diese ebenfalls Mitochondrien aufweisen. Die Grundlage für diese Hypothese bildet die Endosymbiontentheorie, welche die Entstehung bestimmter Zellorganellen wie Mitochondrien in eukaryotischen Zellen, z.B. tierischen Zellen, erklärt. Dieser Theorie nach sind Eukaryoten mit ihren Zellorganellen durch Endosymbiose mit prokaryotischen Vorläuferorganismen wie Bakterien entstanden [22]. Einen Hinweis auf diese Hypothese liefert unter anderem das Vorhandensein von eigenen, den der Bakterien ähnlichen Ribosomen in Mitochondrien. Zudem weisen Mitochondrien eukaryotischer Zellen auch eine eigenständige ringförmige DNA und eine Doppelmembran auf [22]. So stellte die Endosymbiontentheorie einen Anlass dafür dar, weitere nicht nur antibakteriell gerichtete Effekte von Antibiotika, sondern auch deren Auswirkung auf neutrophile Granulozyten zu untersuchen.

1.4.1 Förderung aber auch Abschwächung der Leukozytenaktivität durch Antibiotika

Im Folgenden wird der in bisherigen Studien festgestellte Einfluss auf die Leukozytenaktivität der vier in dieser Arbeit untersuchten Antibiotika genauer betrachtet.

1.4.1.1 Meropenem

Die vielfältigen Interaktionen von β -Lactam-Antibiotika mit menschlichen Zellen zeigt sich schon darin, dass β -Lactame GABA-Rezeptoren in pyramidalen Neuronen konzentrationsabhängig inhibieren und somit die Wirkung des Neurotransmitters abschwächen [23]. Es wurden aber auch Wechselwirkungen zwischen β -Lactamen und den in dieser Arbeit im Fokus stehenden Leukozyten beschrieben. So beobachteten Novelli et al. eine Verbesserung der Leukozytenaktivität hinsichtlich ihrer Abwehr von grampositiven und gramnegativen Bakterienstämmen nach Verabreichung des β -

Lactam-Antibiotikums Meropenem [24]. Bei Meropenem handelt es sich um ein Carbapenem, welches ein breites Aktivitätsspektrum sowohl gegen aerobe als auch gegen anaerobe Bakterien aufweist. Dieses Antibiotikum bewirkt in vitro eine statistisch signifikante „postantibiotische Leukozytenverbesserung“ („PALE“: postantibiotic leukocyte enhancement). Das Auftreten dieses „PALE“-Effekts wurde bei Einsatz von Meropenem gegen grampositive und gramnegative Bakterien im Vergleich zur Verwendung von Imipenem erforscht, welches unter klinischen Gesichtspunkten als weitgehend äquivalentes Carbapenem angesehen wird. Die zweistündige Vorinkubation mit Carbapenemen in einem Konzentrationsbereich zwischen 15 und 3250 ng/mL, orientiert an der vierfachen minimalen Hemmkonzentration unterschiedlicher Bakterienstämme wie *Escherichia coli* oder *Pseudomonas aeruginosa*, führte zu einer verstärkten Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten bei Meropenem, während dieser Effekt bei Imipenem signifikant geringer ausgeprägt war [24].

Neben einer größer ausfallenden postantibiotischen Leukozytenverbesserung finden sich auch Studien, die bei Applikation von Antibiotika in klinisch relevanten Dosierungen eine Überproduktion an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), eine verringerte Generierung von ATP und eine in vitro-Schädigung von Säugetierzellen beschreiben [25–27]. Zudem führte die Exposition gegenüber Antibiotika zu einer mitochondrialen Dysfunktion [28], was auf die im vorangegangenen Kapitel aufgeführte Verwandtschaft von Mitochondrien mit Bakterien hindeutet. β -Lactame weisen Strukturähnlichkeiten mit Trägern für die mitochondriale Substrataufnahme auf, was eine reversible Hemmung bewirkt [29]. Bei einer dauerhaften Exposition gegenüber β -Lactam-Antibiotika tritt durch Acylierung der Transporter eine irreversible Hemmung auf [29]. Auch eine Erhöhung der Antibiotikadosierung greift in die mitochondrialen Funktionsweisen ein, indem die Mitochondrien durch oxidative Phosphorylierung gehemmt werden [30]. Daraus resultierende mitochondriale Beeinträchtigungen wie beispielsweise eine verminderte ATP-Produktion können bei intensivpflichtigen Patienten mit Sepsis Organfunktionsstörungen begünstigen [26].

1.4.1.2 Cefuroxim

Desweiteren wurden bei einer Therapie mit Cefuroxim, einem Cephalosporin der 2. Generation, auch Wirkungen auf die Hämatopoese in Form einer antibiotikainduzierten Neutropenie beobachtet. Im Rahmen einer Studie an 123 Kindern, die aufgrund eines

bakteriellen Infekts intravenös mit Cefuroxim oder Cefotaxim behandelt wurden, entwickelten 21 aller untersuchten Kinder im Therapieverlauf eine Neutropenie. Interessanterweise stellte sich heraus, dass diese Nebenwirkung insbesondere in sehr jungen Jahren (umso jünger desto häufiger, vor allem Patienten im Alter von < 6 Jahren) auftrat und auch der Schweregrad der cephalosporininduzierten Neutropenie mit dem Alter des Patienten (umso jünger desto schwerwiegender) korrelierte [31]. Demgegenüber kann angeführt werden, dass sich die in dieser Studie verwendeten β -Lactame Meropenem und Cefuroxim nicht intrazellulär anreichern und damit eher keine pleiotropen Effekte zu erwarten sind [32, 33]. Dadurch, dass diese beiden Antibiotika extrazellulär bleiben, dürften sie gerade hinsichtlich der Direktwirkung auf neutrophile Granulozyten geringe Auswirkungen haben [33–35].

1.4.1.3 Moxifloxacin

Dahingegen wiesen Potjo et al. eine Beeinflussung der Neutrophilenfunktionen durch Antibiotika nach, indem sie in vitro die Wirkung des Fluorchinolons Moxifloxacin, einem Gyrasehemmer der 4. Generation, auf ausgewählte Parameter neutrophiler Granulozyten untersuchten [36]. Moxifloxacin kommt im klinischen Alltag vor allem in der Behandlung von ambulant erworbenen Pneumonien zum Einsatz und erweist sich auch in der Tuberkulosetherapie als vielversprechend. Bei den von Potjo et al. in den Fokus gerückten Granulozytenfunktionen handelte es sich unter anderem um die Generierung von antimikrobiellen reaktiven Sauerstoffspezies und um die Freisetzung der primären Granulozytenprotease und -elastase, die beide nach Zugabe von Moxifloxacin zu den extrahierten neutrophilen Granulozyten genauer betrachtet wurden. Der Antibiotikaeinsatz erfolgte sowohl in therapeutischen als auch in höheren Konzentrationen, während die Neutrophilen durch den Lockstoff fMLP (1 μ M) stimuliert wurden. Die Untersuchungsergebnisse ließen vermuten, dass die Behandlung der Zellen mit Moxifloxacin die neutrophilenvermittelte antimikrobielle Aktivität durch Vergrößerung der Elastase-Freisetzung verstärkt [36]. Andererseits finden sich jedoch auch Hinweise auf eine mitochondriale Toxizität durch Fluorchinolone. So kann die mitochondriale Topoisomerase II, welche für die Replikation und Transkription von mitochondrialer DNA erforderlich ist, durch Fluorchinolone direkt gehemmt werden [28]. Dieser Pathomechanismus führt zu einem Verlust der mitochondrialen DNA und kann beispielsweise Organfunktionsstörungen oder auch Sehnenschäden, die sich in Form von Entzündungen und Rupturen manifestieren, hervorrufen [37]. Eine weitere Nebenwirkung

der Fluorchinolone stellt das Ansetzen dieser Antibiotikaklasse an der Gyrase dar, die auch beim Menschen vorkommt. Auch wenn die Affinität der Gyrasehemmer zur bakteriellen Gyrase höher ist als die zu menschlichen Topoisomerasen, weisen Gyrasehemmer auch für den Menschen zytostatische Eigenschaften auf, da Fluorchinolone nicht zu 100% selektiv wirken [38].

1.4.1.4 Clarithromycin

Eine ähnliche Problematik tritt beim Einsatz von Makrolidantibiotika auf, die an der 50S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen ansetzen und dadurch zu einer Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese führen [39]. Menschen besitzen ebenfalls Ribosomen, wobei diese aus anderen Untereinheiten aufgebaut sind als die der Bakterien, weshalb man von einer hohen Selektivität ausgehen kann [39]. Mit der immunmodulatorischen Rolle der Makrolidantibiotika bei bakteriellen Infektionen beschäftigten sich Konstantinidis et al., indem sie den Einfluss von Clarithromycin auf die NETose der neutrophilen Granulozyten in den Fokus stellten. Es wurde herausgefunden, dass Clarithromycin sowohl in vivo als auch in vitro die NET-Bildung induzieren kann, indem es in die Autophagozytose der Neutrophilen eingreift [12].

Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangten Arampatzioglou et al., die eine verbesserte antibakterielle Aktivität und Wundheilungskapazität bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II unter Einfluss von Clarithromycin im Vergleich zu Typ II-Diabetikern ohne Antibiotikaeinnahme feststellten [40]. Das Makrolidantibiotikum führte zu einer Hochregulierung des antimikrobiellen Peptids LL-37, welches auf NET-Strukturen exprimiert wird. Es zeigte sich auch, dass Clarithromycin die Freisetzung der NETs an sich auslöst. Im Rahmen dieser Studie wurden Blutproben von unbehandelten, hyperglykämischen Typ II-Diabetikern, von normoglykämischen Typ II-Diabetes-Patienten unter antidiabetischer Behandlung und von gesunden Probanden entnommen. Dabei wurden die NET-Bildung sowie die antibakteriellen und fibrotischen Eigenschaften der NETs nach Zugabe von Clarithromycin beobachtet, wobei die Granulozyten aller Probanden aus dem Typ II-Diabetes-Kollektiv zwar LL-37-tragende NETs ausbildeten, diese aber keine antibakterielle Aktivität zeigten. Demgegenüber wurde nach Zugabe von Clarithromycin die Expression von LL-37 auf den neutrophilen Granulozyten normoglykämischer Typ II-Diabetiker vergrößert. Dieser Effekt führte zu einer Wiederherstellung der antibakteriellen Kapazität der NET-Strukturen und förderte durch Aktivierung und Differenzierung von Fibroblasten den Wundheilungsprozess [40].

1.4.2 Die besondere Rolle des Glukokortikoids Prednisolon

Neben ihrer zentralen Rolle bei der physiologischen Immunantwort des Körpers sind die neutrophilen Granulozyten auch an der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten beteiligt. Gerade die für Neutrophile spezifische Formation von NETs scheint in die Pathophysiologie des „Systemischen Lupus Erythematoses“ (SLE) involviert zu sein. Dadurch, dass sich NETs nach ihrer Freisetzung aus den Granulozyten im Extrazellulärraum befinden, sie aber, wie in Kapitel 1.2.6 ausgeführt, aus DNA und weiteren intrazellulären Molekülen aufgebaut sind, laufen die Netzstrukturen Gefahr, einen potentiellen Ursprung für Autoantigene darzustellen. Werden NETs verstärkt ausgebildet oder unzureichend abgebaut und erhöht sich damit die Zahl der extrazellulär liegenden „DNA-Netze“, steigt auch das Risiko einer Autoantikörperbildung [41]. So wurden auch im Blut von Patienten, die an SLE leiden, Antikörper gegen nukleäre DNA und gegen weitere Bestandteile der NETs, wie z.B. Histone und antimikrobielle Peptide nachgewiesen. Zudem zeigen serologische Tests oft hohe Plasmaspiegel antinukleärer Antikörper. Weitere detektierte Antikörper sind gegen doppelsträngige DNA gerichtet. Ähnlich wie bei den ANCA-assoziierten Erkrankungen ist noch nicht genau erwiesen, wie die angeführten Antikörperarten gebildet werden und ob sie den Krankheitsauslöser darstellen. Trotzdem erscheint die Hypothese, dass zirkulierende NETs Autoimmunkrankheiten verursachen können, angesichts der bisherigen Forschungsergebnisse schlüssig und in sich logisch [15]. Auch Untersuchungen, die ergaben, dass besonders bei aktiven Krankheitsschüben der NET-Abbau bei SLE-Patienten vermindert ist, stützen diese Annahme. So steht eine Verringerung des NET-Abbaus auch in Zusammenhang mit einer schädigenden Wirkung auf das körpereigene Endothel und einer Ablagerung von Immunkomplexen in Organsystemen, wodurch die für SLE spezifischen Schäden verursacht werden. Dadurch können auch gravierende und gefürchtete Komplikationen in Erscheinung treten, wie beispielsweise die Lupus-Nephritis, die sich klinisch in Form von Proteinurie, Mikrohämaturie, Hypertonie und im schlimmsten Fall einer Niereninsuffizienz manifestiert [9]. Solche schwerwiegenden Krankheitsverläufe erfordern teilweise eine intensivmedizinische Therapie mit hochdosierten Immunsuppressiva, wie z.B. Glukokortikoiden. Zu deren relevantesten Vertretern zählen neben den natürlich vorkommenden Substanzen Cortison und Hydrocortison (Cortisol) auch die synthetischen Glukokortikoide, wie z.B. Prednisolon, welches immunsuppressive und antiinflammatorische Eigenschaften besitzt und dieselbe Wirkung wie Cortisol aufweist. Prednisolon entfaltet seine Wirkung über einen nukleären Rezeptor, welcher

sich in seiner inaktiven Form gebunden an das Hitzeschockprotein 90 (HSP 90) im Cytosol befindet [42]. Die Bindung des Glukokortikoids überführt den Rezeptor durch Abspaltung des Hitzeschockproteins und infolgedessen Homodimerisierung des Rezeptors in seinen aktiven Zustand [43]. Nach anschließender Translokation des Rezeptor-Liganden-Komplexes in den Zellkern fungiert der Komplex dort als Transkriptionsfaktor und bindet an eine palindromische Sequenz, das Glukokortikoid-responsive-Element (GRE) [42, 43]. Dieser Vorgang führt zu einer Modifikation in der Genexpression und somit zu einer Veränderung in der Zellfunktion. Je größer die Anzahl der vorhandenen Glukokortikoid-responsiven-Elemente ist und je näher diese an der Transkriptionsstartposition (TATA-Box) lokalisiert sind, umso stärker fällt die Prednisolonwirkung aus [44]. Es verhindert die Einwanderung von Immunzellen, wie z.B. Granulozyten, in inflammatorische Gewebereiche und die Freisetzung immunmodulatorischer Stoffe, welche sich in den Vesikeln der Immunzellen befinden. Verabreicht wird Prednisolon neben dem Lupus erythematodes auch noch u.a. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa), COPD, dem Antiphospholipid-Syndrom, Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis und bei Organtransplantationen [45]. Gerade aufgrund dieser vielfältigen Einsatzgebiete und dem oben erwähnten Einfluss des Prednisolons auf Entzündungszellen wurde dieses Medikament im Zuge dieser experimentellen Doktorarbeit im Hinblick auf seine Direktwirkung auf die Funktionalität neutrophiler Granulozyten untersucht.

1.5 Untersuchungsgegenstand und Zielsetzung dieser experimentellen Doktorarbeit

Die Zielsetzung dieser Promotionsarbeit lag in der dezidierten In-Vitro-Erforschung der Direktwirkung jeder der fünf ausgewählten Substanzen (Meropenem, Cefuroxim, Moxifloxacin, Clarithromycin und Prednisolon) auf das Zusammenspiel der Abwehrmechanismen bzw. auf die Parameter neutrophiler Granulozyten. Die im Verlauf der Einleitung aufgeführten Studien zeigten ein zum Teil widersprüchliches, ambivalentes Wirkspektrum der zu untersuchenden Medikamente auf die körpereigene Immunabwehr, zum einen scheinbar eine Förderung sowie Verbesserung der Granulozytenaktivität [24], zum anderen aber auch einen Abfall der Neutrophilenzahl (Neutropenie) [46]. So ergab sich für die hier durchgeführte Arbeit die explizite Forschungshypothese, ob neutrophile Granulozyten durch bestimmte Antibiotikaklassen bzw. das Glukokortikoid Prednisolon in ihrer Wirkweise in vitro inhibiert werden. Im Zuge dieser

Fragestellung wurden die Migrationslänge, die Migrationsgeschwindigkeit, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Freisetzung des Enzyms Myeloperoxidase und von nukleärer DNA in Form von NET-Bildung der neutrophilen Granulozyten betrachtet. Durch Vergleich der eben genannten Parameter einmal in der Kontrolle ohne Medikamentenzusatz, im Vergleich zu mindestens zwei eingesetzten unterschiedlichen Antibiotika- bzw. Prednisolon-Konzentrationen sollte die Hypothese bestätigt oder widerlegt werden (siehe Abbildung 2). Aus resultierenden Erkenntnissen könnten sich Hinweise auf neue Therapieansätze im klinischen Alltag ergeben, gerade im Hinblick auf Patienten mit Infektionen, denen Antibiotika verabreicht werden, sowie auf die Behandlung von immungeschwächten oder immunsupprimierten Patienten oder von Menschen mit Autoimmunerkrankungen.

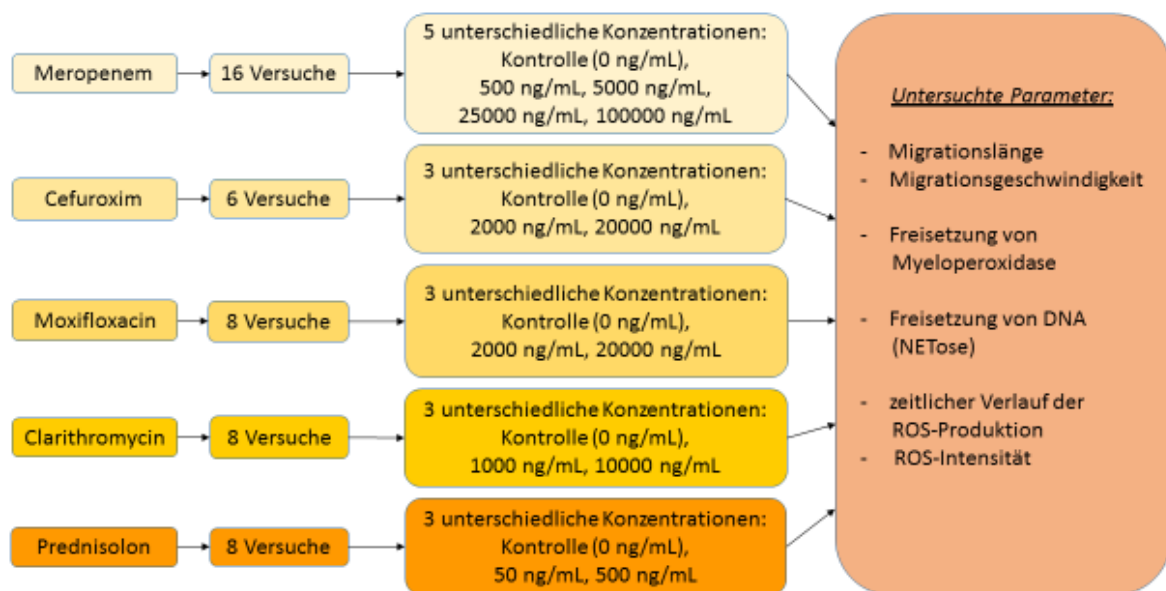


Abbildung 2: Übersicht über alle im Rahmen der Studie absolvierten Versuche in Bezug auf die getesteten Medikamente, die jeweilige Versuchsanzahl, die unterschiedlichen gewählten Konzentrationen sowie die zentralen untersuchten Parameter

2 Material und Methoden

Um unabhängig von bestimmten Krankheitsbildern die Direktwirkung von Antibiotika bzw. Prednisolon an sich auf die Granulozytenfunktionalität zu beurteilen, wurden gesunde Probanden in die Studie involviert und die neutrophilen Granulozyten mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblutproben extrahiert.

2.1 Kurzer Abriss über den Versuchsablauf

Nach Hochrechnung und Verdünnung auf eine bestimmte Zellzahl pro mL anhand einer Neubauer-Zählkammer wurden die so gewonnenen Neutrophilen mit Gel und einer bestimmten Konzentration des zu untersuchenden Medikaments vermischt sowie DHR, DAPI und MPO zugegeben, die in einem späteren Schritt eine Detektion von Sauerstoffradikalen, freigesetzter DNA und des Enzyms Myeloperoxidase bei der Fluoreszenzmikroskopie ermöglichten. Dieses Substanzgemisch wurde bei jedem durchgeführten Versuch in ein ibidi-3D- μ -slide pipettiert, wobei von den drei Kanälen im linken Kanal kein Antibiotikum bzw. kein Prednisolon hinzugefügt wurden, im mittleren Kanal eine niedrige Konzentration und im rechten Kanal eine höhere Konzentration. So wurde pro Versuch bzw. Versuchsbedingung ein Kontrollkanal zum direkten Effektvergleich herangezogen. Die links und rechts eines jeden Kanals befindlichen Reservoirs wurden mit Zellnährmedium (RPMI/FKS) und der entsprechenden Medikamentendosierung befüllt, nachdem das in die Kanäle pipettierte Gel mitsamt den vorher angeführten Substanzen eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert worden war, wobei jeweils im linken Reservoir eine definierte Konzentration des Lockstoffs fMLP zugesetzt wurde. Nach dem Befüllen der Reservoirs wurden die Kanäle des ibidi-3D- μ -slides unter dem Mikroskop für ca. sieben Stunden Laufzeit untersucht. Dies geschah hinsichtlich der ROS-Produktion, der DNA-Freisetzung in Form von NETs, der Myeloperoxidase-Sezernierung und dem Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten. Nach Beendigung der Mikroskop-Laufzeit konnten diese Parameter im Rahmen der Auswertung mithilfe der Software Imaris analysiert werden. Mithilfe weiterer Programme wie Microsoft Excel, Phoenix und SPSS erfolgten die genaue Interpretation und die statistische Darstellung der Resultate. Der Abriss über die wichtigsten Schritte im Zuge der Versuchsdurchführung wird in den folgenden Abschnitten chronologisch wiedergegeben. Die genauen Bezeichnungen aller verwendeten Materialien sowie die Namen der Hersteller finden sich am Ende der Arbeit in Kapitel 6.

2.2 Einverständniserklärung der Probanden und periphere

Blutentnahme

Für diese Studie wurden ausschließlich gesunde, sowohl männliche als auch weibliche Probanden/innen, die sich freiwillig für eine Blutabnahme zur Verfügung stellten, re-

krutiert. Diese wurden hinsichtlich Inhalt und Ziel der Studie sowie etwaiger Nebenwirkungen, wie möglicherweise auftretender Kreislaufprobleme, Hämatome oder Phlebitiden sachgemäß aufgeklärt. Jeder Teilnehmer gab schriftlich eine Einverständniserklärung ab und beantwortete einen ausführlichen Fragebogen. So wurden u.a. früher aufgetretene Infektionskrankheiten, Blutungsanomalien sowie chronische oder anderweitige Erkrankungen des Immunsystems ausgeschlossen. Ebenso wurden persönliche Daten wie Alter, Geschlecht, Körpergröße und Gewicht einbezogen. Desweiteren wurden Fragen zum Gesundheitszustand der Probanden gestellt, wie beispielsweise nach aktuellem Wohlbefinden, intensiver körperlicher Betätigung, Raucheranamnese, Medikamenteneinnahme, bekannten Allergien, etc. Die erhobenen Daten standen im Falle auffälliger Ergebnisse zur Verfügung. Sie wurden nach Datenschutz-Grundverordnung gesichert gelagert und werden nach Ablauf der gesetzlichen Aufbewahrungspflicht von 15 Jahren entsorgt. Nach Aufklärung und Einwilligung wurde beim jeweiligen Studienteilnehmer aus einer peripheren Vene im Bereich der Ellenbeuge, in der Regel der Vena mediana cubiti, in eine Li-Heparin-Monovette ca. 7,5 mL Blut abgenommen. Die Blutabnahme fand im Labor statt und ging fließend über in die Weiterverarbeitung der Probe, um einen zügigen, plangemäßen Mikroskopstart zu realisieren. Die adäquate Beurteilung der Granulozytenparameter setzte ein genaues Zeitmanagement voraus, da neutrophile Granulozyten im Mittel nur wenige Stunden nach Entnahme vital bleiben und so zeitnah mithilfe eines ibidi-3D- μ -slides untersucht werden mussten.

2.3 Detailgetreuer Aufbau eines ibidi-3D- μ -slides

Ein ibidi-3D- μ -slide besteht aus drei Kanälen im linken, mittleren und rechten Bereich, wobei jeder Kanal jeweils auf der linken und rechten Seite von einem Reservoir umgeben ist (siehe Abbildung 3).

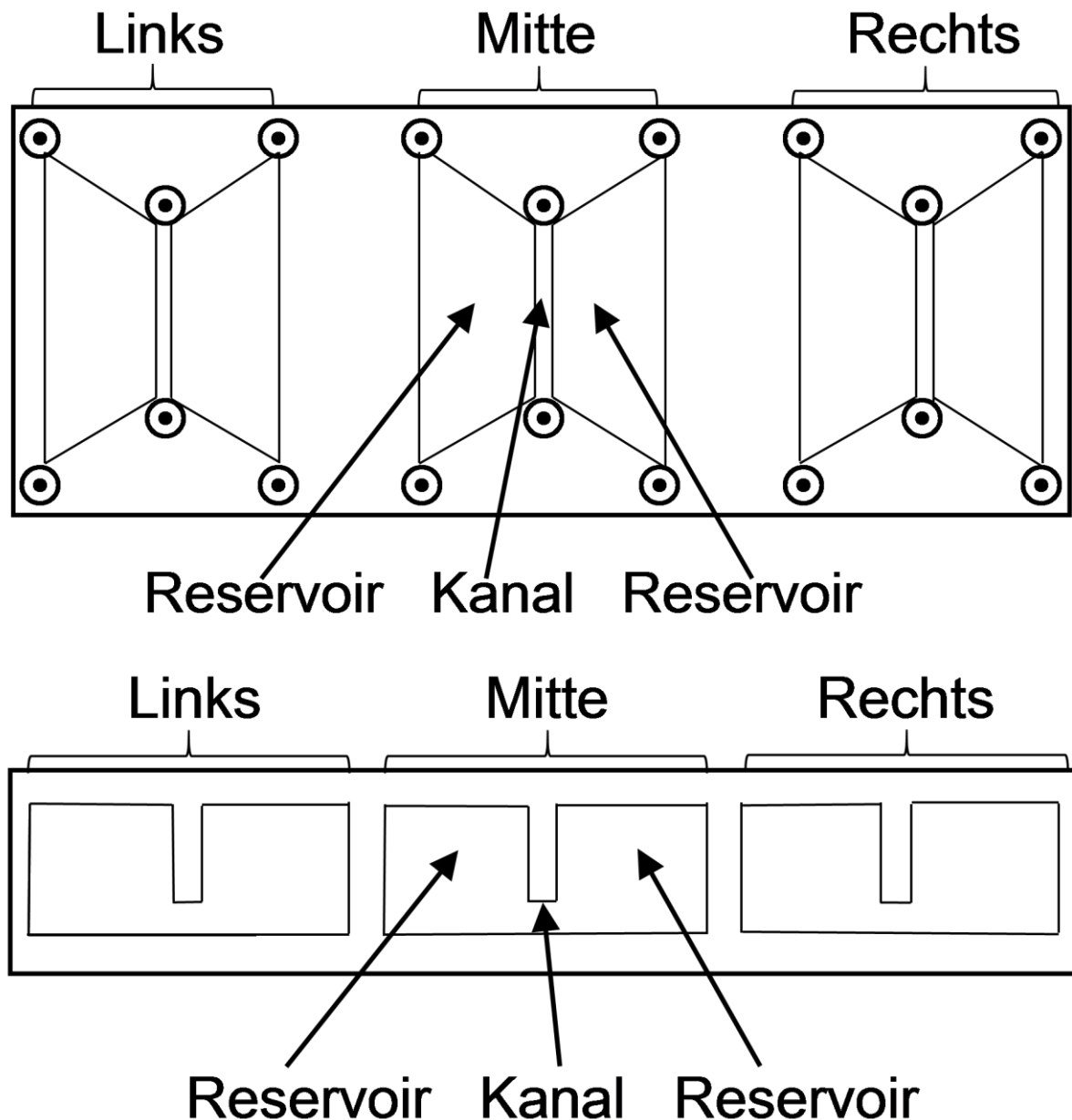


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines ibidi-3D- μ -slides als Draufsicht (obere Skizze) und als Querschnitt (untere Skizze) mit einer linken, mittleren und rechten Komponente, welche wiederum jeweils aus den drei Bestandteilen Reservoir-Kanal-Reservoir aufgebaut ist. Kanal und umgebende Reservoirs einer Komponente sind jeweils offen miteinander verbunden, während die linke, mittlere und rechte Komponente voneinander abgetrennt sind. Die schwarz umrundeten Punkte (obere Skizze) stellen die Öffnungen des Kanals bzw. des Reservoirs dar, in welche die speziellen Pipettenspitzen exakt hineinpassen.

Sowohl die Kanäle als auch die Reservoirs besitzen jeweils an ihrem oberen und an ihrem unteren Ende eine Öffnung, über welche sie mit speziellen Pipettenspitzen befüllt werden können. Die Öffnungen können nach der Befüllung mit extra angepassten Stöpseln verschlossen werden, um ein Austreten des hineinpipettierten Substanzgemisches zu verhindern, wobei die Kanäle ein Volumen von ca. 6 μ L fassen, während die Reservoirs mit ca. 65 μ L Flüssigkeit befüllt werden können. Ein Kanal ist offen

verbunden mit den beiden ihn umgebenden Reservoirien. Diese Komponente ist dreimal auf einem ibidi-3D- μ -slide vorhanden und eignete sich für die Testung einer niedrigen und einer höheren Antibiotikum- bzw. Prednisolon-Konzentration gegen eine Kontrolle ohne Medikamentenzusatz.

2.4 Gelherstellung und Vorbereitung der Antibiotikumkonzentrationen für die spätere Kanal- und Reservoirbefüllung anhand von Meropenem

In einem ersten Schritt wurde das Gel, welches später mit den extrahierten Granulozyten, den Farbstoffen und der entsprechenden Dosis an Meropenem vermischt und in den jeweiligen Kanal pipettiert wurde, hergestellt. Dazu wurden an einem sterilen Arbeitsplatz 20 μ L 10x MEM (Minimum Essential Medium), 20 μ L destilliertes H₂O, 10 μ L NaHCO₃ (7,5%ig Sigma) und 50 μ L 1x RPMI 1640 ohne FKS in ein Reaktionsgefäß pipettiert, gut durchmischt und bis zu seinem Einsatz im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Auch das später verwendete ibidi-3D- μ -slide wurde im Brutschrank vorgewärmt. In mehreren Verdünnungsschritten wurden die verschiedenen Meropenem-Konzentrationen, deren Einfluss auf die Granulozytenfunktionalität untersucht werden sollte, hergestellt. Bei der Auswahl der eingesetzten Antibiotikumkonzentrationen spielten sowohl die vier- und vierzigfache minimale Hemmkonzentration gegenüber *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* als auch die bei der klinischen Verabreichung erreichten mittleren Spitzenplasmaspiegel von ca. 23000-115000 ng/mL eine wichtige Rolle. 10 mg des Meropenempulvers wurde in 1 mL RPMI/10% FKS aufgelöst. Um in den Kanälen die gewollten Konzentrationen von 500 ng/mL und 5000 ng/mL zu erhalten, wurde die Stammlösung mit RPMI/10% FKS 1:100 verdünnt. 5 μ L dieser Verdünnung (1:100) entsprachen der höheren, im rechten Kanal eingesetzten Meropenem-Konzentration von 5000 ng/mL. Um die für den mittleren Kanal benötigte niedrigere Konzentration zu erhalten, wurde noch einmal 1:10 verdünnt. 5 μ L der nun gewonnenen Verdünnung entsprachen schließlich der im mittleren Kanal eingesetzten Konzentration von 500 ng/mL. Der linke Kanal hingegen fungierte als Kontrollkanal ohne Antibiotikumzusatz. Für die Reservoirie des mittleren und rechten Kanals wurden ebenfalls die dementsprechenden Konzentrationen eingesetzt.

Diese Verdünnungsreihen wurden für die ersten acht Versuche mit Meropenem immer diesem Schema folgend hergestellt, während in einer weiteren Experimentreihe mit

diesem Antibiotikum noch zwei zusätzliche Konzentrationen (25000 ng/mL und 100000 ng/mL) getestet wurden.

2.5 Granulozytenisolation durch Dichtegradientenzentrifugation und Einstellung der Zellkonzentration mithilfe der Neubauer-Zählkammer

Gleich im Anschluss an die Blutentnahme wurden die Granulozyten aus der Vollblutprobe extrahiert. Dabei wurde das Verfahren der Dichtegradientenzentrifugation angewendet. Hierzu wurden jeweils 3 mL Leuko Spin Medium in zwei Zentrifugenröhrchen vorgelegt und anschließend mit 3 mL Lympho Spin Medium sowie mit 3 mL Blutprobenmaterial überschichtet. Die aufbereiteten Proben wurden bei 756 g für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Die so erhaltene Dichteauftrennung ergab mehrere Phasen im Röhrchen (siehe Abbildung 4).

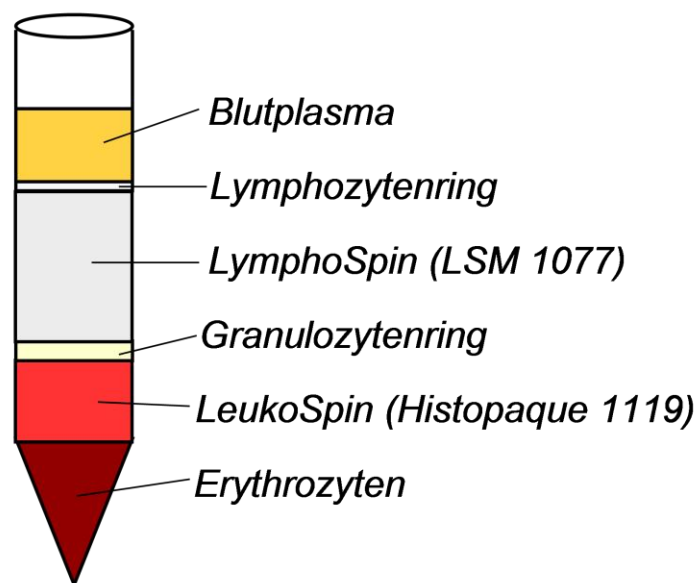


Abbildung 4: Phasenauftrennung im Röhrchen nach Zentrifugation

Das goldgelbe Blutplasma und ein direkt darunter liegender, schmaler, heller Lymphozytenring befanden sich in einer oberen Phase, während unter dem Lymphozytenring eine durchsichtige Phase aus den Trennmedien folgte. Zwischen diesem Bereich und der sich zuunterst im Röhrchen abgesetzten dunkelroten Erythrozytenkomponente war deutlich sichtbar ein milchig weiß gefärbter, trüber Granulozytenring ausgebildet.

Nach Absaugen des Blutplasmas und des Lymphozytenrings mithilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde aus dem Granulozytenring jeweils 150 μL Zellschubstanz abgehoben und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die 300 μL (2x150 μL) Zellsuspension wurden mit 700 μL RPMI/10%FKS vermischet. 10 μL des erhaltenen Substanzgemisches wurden abgehoben und mit Zuhilfenahme einer Neubauer-Kammer die Zellzahl ermittelt. Die Zellsuspension wurde bei 139 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert.

Die unter dem Lichtmikroskop gezählte Anzahl der in vier Kästchen befindlichen Zellen wurde zuerst mit vier und das Ergebnis anschließend noch mit 10000 multipliziert. Ausgehend vom resultierenden Zwischenergebnis wurde per Dreisatz das Volumen an RPMI/10%FKS berechnet, welches zu dem nach Zentrifugation erhaltenen Zellpellet dazugegeben werden musste, um bei jedem Versuch eine Zellkonzentration von 18 Mio/mL zu erhalten (siehe Abbildung 5).

Anzahl der Zellen in vier Kästchen x 4 x 10000 = ...

Dreisatz: 18 Mio. $\triangleq$ 1000 μL

... Mio. $\triangleq$ x μL

(1000 μL : 18) · ... $\approx$ x μL

Abbildung 5: Berechnung der benötigten Menge an RPMI/10%FKS (x μL) für eine konstante Zellkonzentration im Kanal

Der Überstand wurde komplett abgehoben und das Zellpellet mit dem berechneten Volumen an RPMI/10%FKS (x μL) aufgefüllt und resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension beinhaltete somit bei jedem Versuch eine konstante Granulozytenkonzentration, die unabhängig von der differierenden Anzahl neutrophiler Granulozyten im Blut des jeweiligen Probanden hergestellt wurde.

2.6 Herstellung von Lösungen (DHR, DAPI, MPO-APC) sowie deren Vermischung mit Zellen, Gel und entsprechender Antibiotikumkanzenkonzentration

Bevor mit der Befüllung der Kanäle begonnen werden konnte, wurden noch der Farbstoff DHR, nach Interkalation in die DNA leuchtendes DAPI und der mit dem Farbstoff APC gekoppelte Antikörper MPO vorbereitet. Dafür wurden zu 100 μL reinem DHR (Dihydrorhodamin) 900 μL RPMI/10%FKS pipettiert und zu 10 μL DAPI (4', 6-Diamidin-2-phenylindol) 990 μL RPMI/10%FKS gegeben, während MPO (Anti-MPO, polyclonaler Antikörper zur Detektion des Enzyms Myeloperoxidase) nicht mehr verdünnt werden musste. Im Anschluss daran konnte mit der unmittelbaren Aufbereitung des Substanzgemisches für die Kanalfüllung angefangen werden. Hierfür wurden das hergestellte Gel und das ibidi-3D- μ -slide aus dem Brutschrank und das ebenfalls benötigte Collagen aus dem Kühlschrank geholt. Zu 100 μL des Puffergemisches wurden 3 μL DHR, 5 μL DAPI und 10 μL MPO sowie 50 μL der in Kapitel 2.5 aufgeführten Zellsuspension zugegeben und sorgfältig vermischt. Anschließend wurde das Gemisch aus Medium-Puffergemisch, Farbstoffen und Zellsuspension (ca. 168 μL) auf drei Reaktionsgefäße à 50 μL aufgeteilt. Dem Cup für den linken Kanal wurde kein Antibiotikum mehr hinzugefügt (Kontrollkanal), während für den mittleren und den rechten Kanal jeweils noch 5 μL der entsprechenden Meropenem-Lösung zugegeben wurden. In einem letzten Schritt vor der Kanalfüllung wurden noch jeweils 50 μL Collagen in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und mit den restlichen Substanzen (Medium-Puffergemisch, Farbstoffen, Zellsuspension und entsprechender Antibiotikumkanzenkonzentration) durchmischt. Bereitgestelltes Collagen wurde erst direkt vor dem Befüllen der Kanäle hinzugefügt, um ein zu frühes Aushärten des Substanzgemisches noch außerhalb des Kanals zu vermeiden. Die Reservoirs wurden zuvor verschlossen. Jeder der drei Kanäle des ibidi-3D- μ -slides wurde unter Verwendung spezieller Pipettenspitzen mit 6 μL des entsprechenden Substanzgemisches befüllt. Im Anschluss wurden die Kanalöffnungen mit Stöpseln verschlossen und die Reservoirs wieder geöffnet. Das ibidi-3D- μ -slide wurde in eine Petri-Schale mit einem feuchten Tuch gelegt, um die Collagengemische eine halbe Stunde bei 37°C im Brutschrank aushärten zu lassen.

2.7 Inkubation des ibidi-3D- μ -slides, Herstellung der Reservoir-Inhaltsstoffe und anschließende Befüllung

Während der 30-minütigen Inkubation des ibidi-3D- μ -slides im Brutschrank wurden sechs verschiedene Substanzgemische für die nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgende Reservoirbefüllung vorbereitet. Hierzu wurde die entsprechende Konzentration des Granulozytenlockstoffs fMLP (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) hergestellt (10 nM fMLP). Als nächstes wurden die sechs Eppendorf-Cups nach dem folgenden Schema (siehe Tabelle 1) befüllt:

<i>Reservoir li li</i> 100 μ L RPMI + fMLP (kein Antibiotikum)	<i>Reservoir li re</i> 100 μ L RPMI/10%FKS (kein Antibiotikum)	<i>Reservoir Mi li</i> 100 μ L RPMI + fMLP + niedrige Antibiotikumkonzentration	<i>Reservoir Mi re</i> 100 μ L RPMI/10%FKS + niedrige Antibiotikumkonzentration	<i>Reservoir re li</i> 100 μ L RPMI + fMLP + hohe Antibiotikumkonzentration	<i>Reservoir re re</i> 100 μ L RPMI/10%FKS + hohe Antibiotikumkonzentration
---	---	--	--	--	--

Tabelle 1: Vorbereitung der Reservoirbefüllung mit Zellnährmedium, Lockstoff (fMLP) und Antibiotikumkonzentration entsprechend dem jeweiligen Kanal

Hierfür wurde die Petri-Schale aus dem Brutschrank geholt und das darin befindliche ibidi-3D- μ -slide herausgenommen, um jeweils 65 μ L aus dem Eppendorf-Cup in das jeweilige Reservoir zu füllen. Bei diesem Versuchsschritt wurden sämtliche Reservoiröffnungen außer die des einen Reservoirs, welches gerade befüllt wurde, mit Stöpseln verschlossen, sodass am Ende alle Öffnungen verschlossen waren. So konnte das vollständig aufbereitete ibidi-3D- μ -slide unter das Mikroskop gebracht werden, mithilfe dessen die im nächsten Abschnitt erläuterten Parameter näher untersucht wurden.

2.8 Konfiguration der Einstellungen des Mikroskops und Untersuchung der Granulozytenparameter

Nach Einspannen des ibidi-3D- μ -slides auf dem Objektträger des Mikroskops konnte jede der drei Positionen, von denen im Verlauf der folgenden sieben Stunden Aufnahmen angefertigt wurden, noch einmal kontrolliert und bei Bedarf justiert werden. Dabei wurde vor allem darauf geachtet, dass eine dicht mit neutrophilen Granulozyten gefüllte, luftblasenfreie Stelle des jeweiligen Kanals in den Fokus gerückt und das Objektiv scharf gestellt wurde. Nachdem alles fertig konfiguriert worden war, konnte das Mikroskop im abgedunkelten Raum für eine Laufzeit von ca. sieben Stunden gestartet werden, wobei ca. alle 30 Sekunden ein Bild von der jeweiligen Position angefertigt

wurde. Während der Verweildauer des Objektivs auf einem Kanal wurden jeweils vier verschiedene Farbkanäle des Mikroskops über die aufzunehmenden Zellen gelegt. Mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie, welche die untersuchten Zellen grau erscheinen ließ, wurde das Migrationsverhalten (Länge in μm und Geschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$) untersucht. Anhand der Fluoreszenzmikroskopie konnten die Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS) – rot dargestellt (Rhodamin 123) – die Freisetzung der DNA (NETs) – blau sichtbar gemacht (DAPI) – und die Freisetzung des Enzyms Myeloperoxidase (MPO-APC) – grün dargestellt (Anti-MPO) – über sieben Stunden beobachtet werden. Im folgenden Abschnitt werden noch Variationen in der Experimentdurchführung mit den in weiteren Versuchen eingesetzten Medikamenten (Cefuroxim, Moxifloxacin, Clarithromycin und Prednisolon) behandelt.

2.9 Beschreibung der Variationen im Versuchsablauf bei Testung von Cefuroxim, Moxifloxacin, Clarithromycin und Prednisolon

Zur Testung des Cephalosporins Cefuroxim wurden sechs Versuche durchgeführt, wobei wiederum wie bei Meropenem 10 mg des Antibiotikumpulvers in 1 mL RPMI/10%FKS aufgelöst wurden. Es wurden auch wieder drei Verdünnungsschritte ausgehend von der hergestellten Stammlösung ausgeführt, um entsprechende Konzentrationen – orientiert an der vier- und vierzigfachen minimalen Hemmkonzentration gegenüber *Streptococcus pneumoniae* – zu bekommen. Die ausgewählten Konzentrationen, die zum Einsatz kamen, lagen im Fall von Cefuroxim bei 2000 ng/mL im mittleren Kanal und bei 20000 ng/mL im rechten Kanal. Die hierfür notwendigen Verdünnungsreihen waren für die Vorbereitung der Kanal- sowie der Reservoirbefüllung identisch. Für den Kanalinhalt wurden 5 μL und für den Reservoirinhalt 10 μL aus der jeweiligen Verdünnung eingesetzt. Die Antibiotikumverdünnungen liefen nach dem in der Tabelle (siehe Tabelle 2) abgebildeten Schema ab:

Cefuroxim: MIC = 0,5 $\mu\text{g/mL}$ = 500 ng/mL

vierfache MIC: 2000 ng/mL vierzigfache MIC: 20000 ng/mL

Verd.1 Stammlösung 1:5 verdünnen	200 μL + 800 μL RPMI	$\cong$ 2000 $\mu\text{g/mL}$	dann sind in	5 μL (Kanal) / 10 μL (Reservoir) der 1:5 Verdünnung	10000 ng/ 20000 ng
Verd.2 Verdünnung 1 1:5 verdünnen	200 μL + 800 μL RPMI	$\cong$ 400 $\mu\text{g/mL}$	dann sind in	5 μL (Kanal) / 10 μL (Reservoir) der 1:5 Verdünnung	2000 ng/ 4000 ng
Verd.3 Verdünnung 2 1:10 verdünnen	100 μL + 900 μL RPMI	$\cong$ 40 $\mu\text{g/mL}$	dann sind in	5 μL (Kanal) / 10 μL (Reservoir) der 1:10 Verdünnung	200 ng/ 400 ng

Tabelle 2: Durchgeführte Verdünnungsreihen für die Testung des Cephalosporins Cefuroxim

Für die Testung des Fluorchinolons Moxifloxacin (acht Experimente), welches bereits als Infusionslösung in einer Konzentration von 1,6 mg/mL vorlag, wurde jeweils 1 mL davon als Stammlösung verwendet. Um die gewünschten Konzentrationen von 2000 ng/mL (mittlerer Kanal) und 20000 ng/mL (rechter Kanal) zu bekommen, wurden bei diesem Antibiotikum ausgehend von der Stammlösung nur zwei Verdünnungsschritte durchgeführt. Hierbei wurden bei den Kanälen 5 µL und bei den Reservoiren 10 µL der entsprechenden Verdünnung eingesetzt, sodass wie auch schon bei Cefuroxim das größere Volumen der Reservoire dadurch ausgeglichen wurde und in Kanälen und Reservoiren äquivalente Dosierungen vorlagen, wie in der folgenden Tabelle (siehe Tabelle 3) gezeigt wird:

Moxifloxacin: MIC = 0,5 µg/mL = 500 ng/mL

vierfache MIC: 2000 ng/mL vierzigfache MIC: 20000 ng/mL

Verd.1 Stammlösung 1:4 verdünnen	200 µL + 600 µL RPMI	≅ 400 µg/mL	dann sind in	5 µL (Kanal) / 10 µL (Reservoir) der 1:4 Verdünnung	2000 ng/ 4000 ng
Verd.2 Verdünnung 1 1:10 verdünnen	100 µL + 900 µL RPMI	≅ 40 µg/mL	dann sind in	5 µL (Kanal) / 10 µL (Reservoir) der 1:10 Verdünnung	200 ng/ 400 ng

Tabelle 3: Durchgeführte Verdünnungsreihen für die Testung des Fluorchinolons Moxifloxacin

Um verschiedene Konzentrationen des Makrolids Clarithromycin in weiteren acht Versuchen zu testen, wurden wiederum drei Verdünnungsreihen ausgehend von der Stammlösung angesetzt, für welche 10 mg Clarithromycinpulver in 1 mL RPMI/10%FKS gelöst wurden. Die gewünschten Konzentrationen lagen hierbei im Bereich von 1000 ng/mL für den mittleren Kanal und bei 10000 ng/mL für den rechten Kanal (siehe Tabelle 4).

Clarithromycin: MIC = 0,25 µg/mL = 250 ng/mL

vierfache MIC: 1000 ng/mL vierzigfache MIC: 10000 ng/mL

Verd.1 Stammlösung 1:5 verdünnen	200 µL + 800 µL RPMI	≅ 2000 µg/mL	dann sind in	5 µL (Kanal) / 10 µL (Reservoir) der 1:5 Verdünnung	10000 ng/ 20000 ng
Verd.2 Verdünnung 1 1:10 verdünnen	100 µL + 900 µL RPMI	≅ 200 µg/mL	dann sind in	5 µL (Kanal) / 10 µL (Reservoir) der 1:10 Verdünnung	1000 ng/ 2000 ng
Verd.3 Verdünnung 2 1:10 verdünnen	100 µL + 900 µL RPMI	≅ 20 µg/mL	dann sind in	5 µL (Kanal) / 10 µL (Reservoir) der 1:10 Verdünnung	100 ng/ 200 ng

Tabelle 4: Durchgeführte Verdünnungsreihen für die Testung des Makrolids Clarithromycin

Als letzte Versuchsreihe mit ebenfalls acht Experimenten wurde das synthetische Glukokortikoid Prednisolon getestet, von welchem wiederum 10 mg in einem mL RPMI/10%FKS gelöst wurden. Von dieser hergestellten Stammlösung ausgehend wurden dieses Mal vier Verdünnungsschritte ausgeführt, um Konzentrationen im Bereich von 50 ng/mL (mittlerer Kanal) und 500 ng/mL (rechter Kanal) zu erreichen. Erneut wurden 5 µL der entsprechenden Verdünnung für die Kanäle und 10 µL derselben entsprechenden Verdünnung für die Reservoirs eingesetzt. Die benötigten Verdünnungsschritte werden mittels folgender Tabelle (siehe Tabelle 5) dargestellt:

Zu untersuchende Konzentrationen des Prednisolons: 50 ng/mL und 500 ng/mL

Verd.1 Stammlösung 1:10 verdünnen	100 µL + 900 µL RPMI	$\cong$ 1000 µg/mL	dann sind in	5 µL (Kanal) / 10 µL (Reservoir) der 1:10 Verdünnung	5000 ng/ 10000 ng
Verd.2 Verdünnung 1 1:10 verdünnen	100 µL + 900 µL RPMI	$\cong$ 100 µg/mL	dann sind in	5 µL (Kanal) / 10 µL (Reservoir) der 1:10 Verdünnung	500 ng/ 1000 ng
Verd.3 Verdünnung 2 1:10 verdünnen	100 µL + 900 µL RPMI	$\cong$ 10 µg/mL	dann sind in	5 µL (Kanal) / 10 µL (Reservoir) der 1:10 Verdünnung	50 ng/ 100 ng
Verd.4 Verdünnung 3 1:10 verdünnen	100 µL + 900 µL RPMI	$\cong$ 1 µg/mL	dann sind in	5 µL (Kanal) / 10 µL (Reservoir) der 1:10 Verdünnung	5 ng/ 10 ng

Tabelle 5: Durchgeführte Verdünnungsreihen für die Testung des Glukokortikoids Prednisolon

2.10 Darstellung der zentralen Schritte der Parameteranalyse

Im Rahmen der Versuchsauswertung wurden als erstes die Bilddateien in die Software Imaris importiert, um die Auswertung in die Parameter Migration (Länge und Geschwindigkeit), NET-Bildung (DAPI), Myeloperoxidase-Freisetzung (MPO) sowie Zeitverlauf und Intensität der ROS-Produktion (DHR-Zeitverlauf und DHR-Intensität) zu unterteilen und zu analysieren. Anschließend wurden jeweils die ausgewerteten Daten einer gemeinsamen Versuchsreihe mit Testung des gleichen Medikaments in einer Collection gesammelt und als Excel-Datei exportiert. Die Migrationsdaten konnten nach weiterer Bearbeitung der Excel-Tabelle in das Statistikprogramm SPSS zur Diagrammerstellung und zur statistischen Analyse importiert werden, während die Auswertung der DNA- und Myeloperoxidase-Freisetzung (DAPI und MPO) noch in einem Zwischenschritt von der erstellten Excel-Tabelle in das Pharmakokinetikprogramm Phoenix importiert wurde, um die Berechnung der Zeitpunkte des halbmaximalen Effekts mittels angenäherter Graphen durchzuführen. Die dadurch erhaltenen Werte

konnten in eine Excel-Nomenklatur-Tabelle übertragen und anschließend wiederum zur statistischen Auswertung in SPSS importiert werden. Der zeitliche Verlauf der Produktion von Sauerstoffradikalen (DHR-Zeitverlauf) hingegen wurde nach Export aus Imaris in Microsoft Excel weiterbearbeitet. Mithilfe von Excel wurde ein Polynom 3. Ordnung erstellt und anhand der ersten Ableitung der Funktionsgleichung unter Verwendung eines Ableitungsrechners [47] der Hochpunkt des aus den Werten resultierenden Graphen berechnet. Dieser zeigte den Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion ($t_{\max\text{-ROS}}$). Im nächsten Schritt wurden die erhaltenen Zeitpunkte in SPSS zur statistischen Auswertung importiert. In der folgenden Übersicht (siehe Abbildung 6) sind die wichtigsten Stufen der Versuchsauswertung ab Aufnahmebeginn noch einmal in ihrer zeitlichen Abfolge dargestellt:

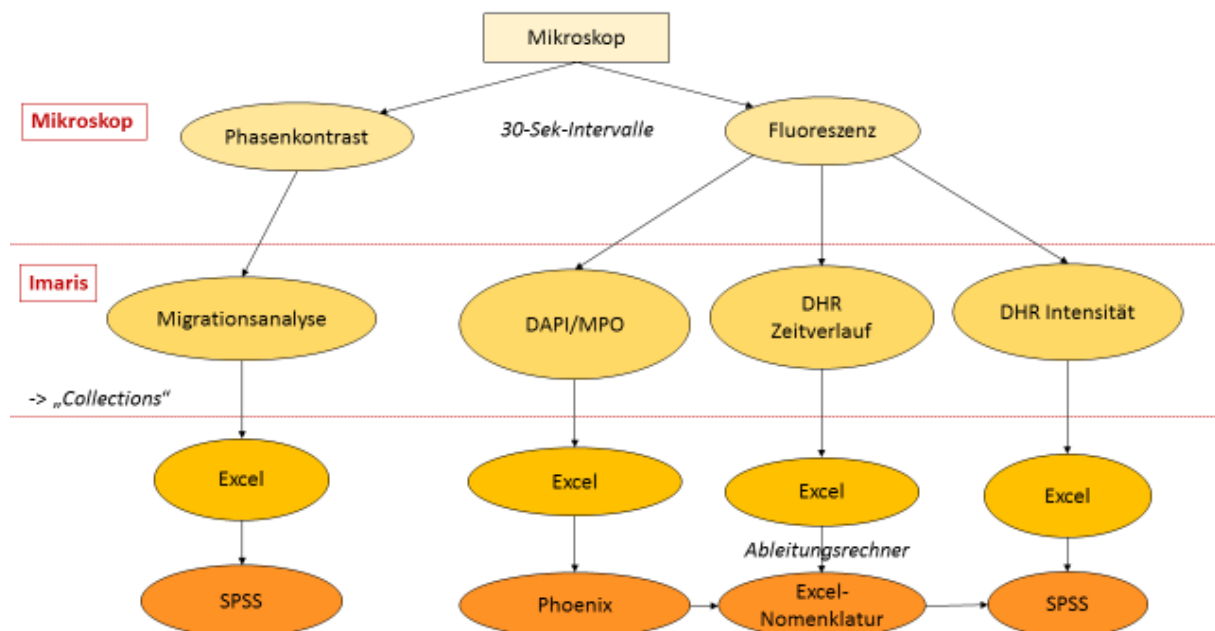


Abbildung 6: Überblick über die relevanten Schritte in der Analyse der auszuwertenden Granulozytenparameter und die hierfür herangezogenen Computerprogramme

Über die Michaelis-Menten-Gleichung, die eigentlich die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) beschreibt, wurden die ET_{50} -Werte (Zeitpunkte des halbmaximalen Effekts) der NETose und der Freisetzung von Myeloperoxidase bestimmt (siehe Abbildung 7).

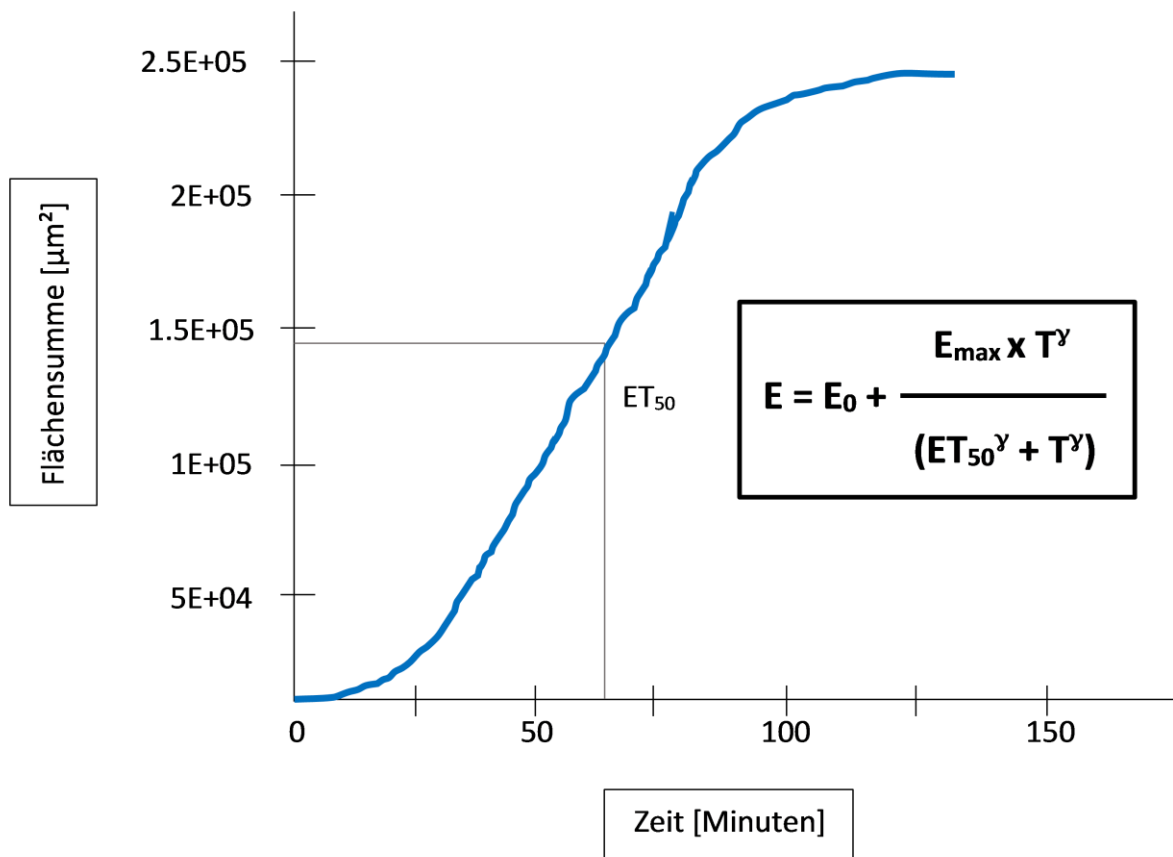


Abbildung 7: Schematischer Kurvenverlauf für die Freisetzung von DNA und Myeloperoxidase

Für die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der ROS-Produktion wurden die einzelnen, von Imaris erkannten Rhodaminflächen je Zeitpunkt aufsummiert. Diese Flächen-summen wurden gegen die Zeit aufgetragen (siehe Abbildung 8) und das Maximum der gebildeten Verlaufskurve wurde via Ableitung eines angepassten Polynoms 3. Ordnung identifiziert.

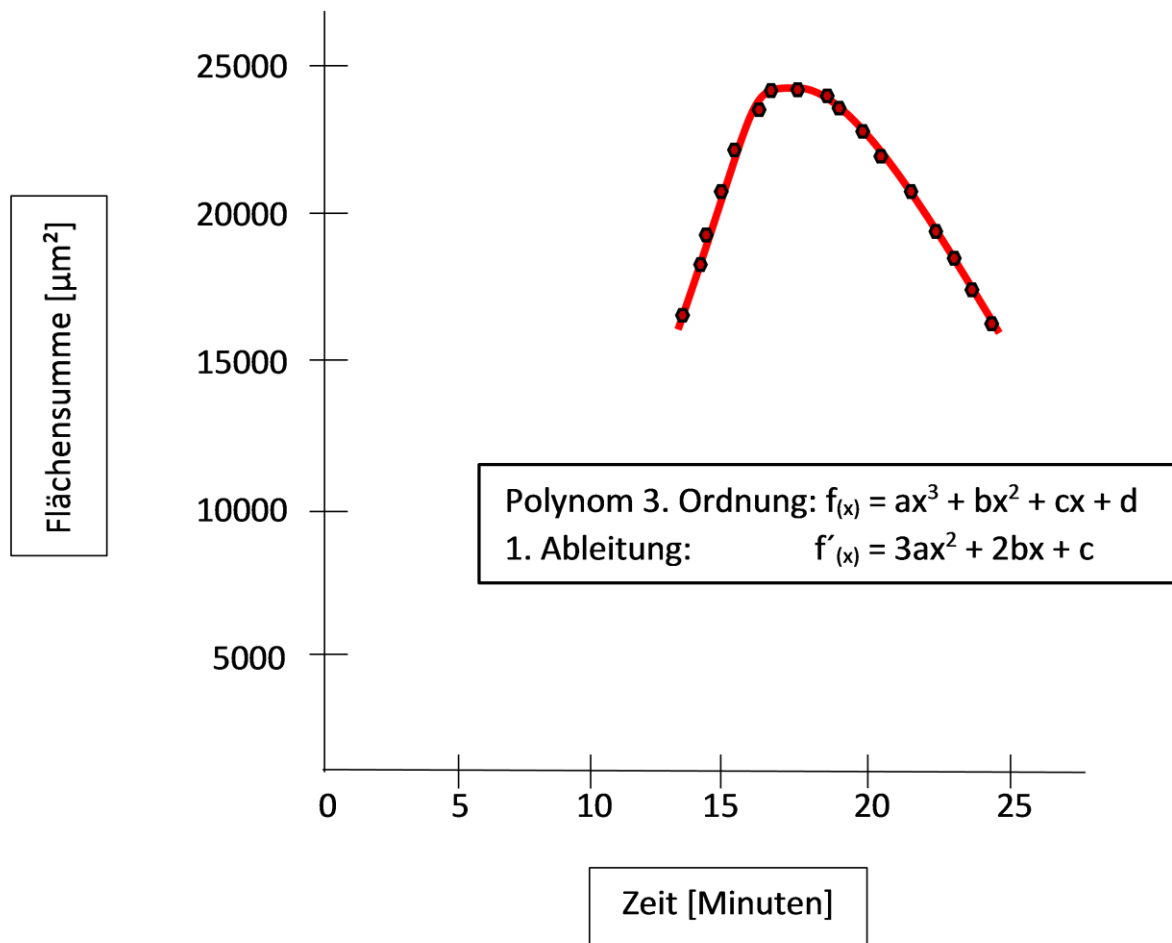


Abbildung 8: Schematischer Kurvenverlauf für die Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS)

Nachdem die Auswertung mittels Imaris, Microsoft Excel und Phoenix fertiggestellt worden war, wurden mit SPSS Diagramme für alle untersuchten Parameter einer jeden Versuchsreihe erstellt und im Anschluss wurden alle relevanten statistischen Tests durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde mithilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests die Normalverteilung geprüft. Falls eine Normalverteilung vorlag, wurde daraufhin die Einfaktorielle ANOVA angewendet, um zu überprüfen, ob sich die zuvor ausgewählten Gruppen statistisch signifikant voneinander unterschieden. Lag hingegen keine Normalverteilung vor, wurde bei mehr als zwei Gruppen der nichtparametrische Test nach Kruskal-Wallis als Untersuchungsmethode verwendet.

Im nächsten Kapitel dieser Doktorarbeit werden die Ergebnisse aller absolvierten Versuchsreihen erörtert.

3 Ergebnisse

Beginnend mit der Versuchsreihe zu Meropenem werden die Resultate aller fünf Medikamente hinsichtlich ihres Einflusses auf die Granulozytenfunktionalität beschrieben. Hierbei werden alle untersuchten Parameter – Migrationslänge, Migrationsgeschwindigkeit, Freisetzung von Myeloperoxidase und von DNA (MPO und DAPI), zeitlicher Verlauf der ROS-Produktion (DHR) sowie DHR-Intensität berücksichtigt.

3.1 Ergebnisse Meropenem

Mit Meropenem wurden 16 Versuche durchgeführt, wobei nur 14 der 16 Kontrollkanäle auswertbar waren, weil bei zwei Versuchen eine Luftblase im Kanal keine aussagekräftige Interpretation ermöglichte. Die Konzentrationen 500 ng/mL und 5000 ng/mL wurden in je zwölf der 16 Experimente eingesetzt, während die Konzentrationen von 25000 ng/mL und 100000 ng/mL in jeweils vier der 16 Versuche genauer betrachtet wurden. Die in den folgenden Abbildungen 9-12 dargestellten Diagramme enthalten Boxplots, welche jeweils aus einem Rechteck und zwei „Antennen“, den sogenannten Whiskers, bestehen, anhand derer Minimum und Maximum abgelesen werden können. Zusätzlich kennzeichnen die Boxplots das 1. Quartil, den Median und das 3. Quartil. Kreise markieren Ausreißer, Sterne stellen Extremwerte dar.

3.1.1 Migrationslänge

Auf dem nachfolgend abgebildeten Diagramm (siehe Abbildung 9) sind auf der y-Achse die Länge der zurückgelegten Strecke in μm und auf der x-Achse die Antibiotikumkonzentrationen in ng/mL abgebildet:

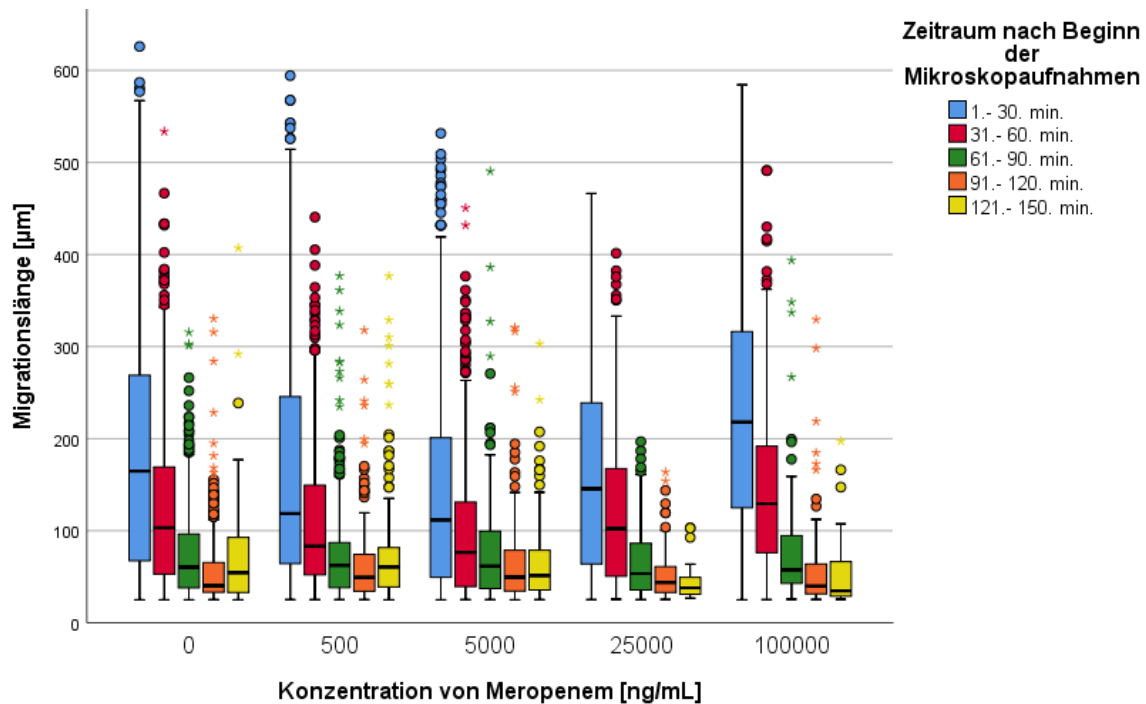


Abbildung 9: Länge der Migrationsstrecke der Granulozyten bei Meropenem

Der erste Boxplot gibt die erste halbe Stunde ab Aufnahmebeginn wieder, der zweite die darauffolgende halbe Stunde usw. und dies für jede der analysierten Konzentrationen. Im Median wanderten die neutrophilen Granulozyten in den ersten 30 Minuten ca. 170 µm und in der folgenden halben Stunde ca. 100 µm für den Fall, dass sich kein Antibiotikum im Kanal und in den Reservoirren befand. Bei Zugabe von Meropenem sank die zurückgelegte Strecke im Median in der ersten halben Stunde auf ca. 120 µm (500 ng/mL) bzw. auf ca. 115 µm (5000 ng/mL) ab, während sie dagegen ab einer Meropenem-Konzentration von 25000 ng/mL wieder auf 150 µm stieg und sich dann bei einer Konzentration von 100000 ng/mL auf ca. 220 µm erhöhte. Für die zweite halbe Stunde zeigte sich ein ähnlicher Verlauf, wobei die Granulozyten im Median bei 500 ng/mL ca. 80 µm zurücklegten, bei 5000 ng/mL ca. 70 µm und dann ab 25000 ng/mL im Median ca. 100 µm weiter wanderten. Ab der dritten halben Stunde ging die Länge der zurückgelegten Strecke zurück und lag im Median für alle Konzentrationen bei oder unter 50 µm. Insgesamt betrachtet unterschieden sich die Längen der Migrationsstrecken für die getesteten Konzentrationen sowohl im Vergleich zum Kontrollka-

nal als auch im Verhältnis niedrige gegenüber hohe Konzentration nicht statistisch signifikant voneinander. Für die Boxploterstellung wurden Strecken unter 25 μm ausgeschlossen, da es sich hierbei um keine neutrophilen Granulozyten handeln konnte, die zumindest in den ersten Zeitintervallen deutlich mehr Streckenlänge zurücklegten. Durch Festlegung der „Track Duration“ auf Werte oberhalb von 900 Sekunden wurden auch Zellen, die zwischenzeitlich im Gel abtauchten, ausgeschlossen. So konnten potentielle Störfaktoren, die die Untersuchungsergebnisse in falsche Richtungen beeinflussen könnten, exkludiert werden.

3.1.2 Migrationsgeschwindigkeit

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Auswertung der Migrationsgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten, wofür auf der y-Achse die mittlere Geschwindigkeit der Zellen in $\mu\text{m/s}$ und auf der x-Achse erneut die Antibiotikumkonzentrationen in ng/mL aufgetragen wurden (siehe Abbildung 10):

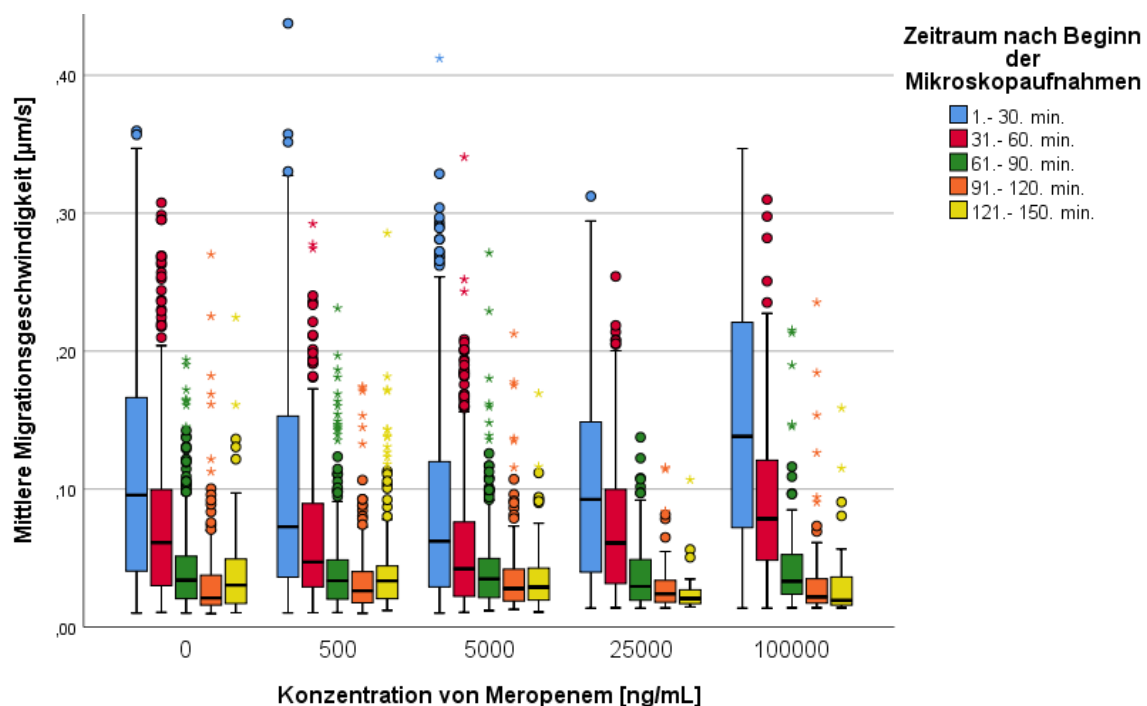


Abbildung 10: Migrationsgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten bei Zugabe differierender Meropenem-Konzentrationen

Der erste Boxplot entspricht wiederum der ersten untersuchten halben Stunde für die jeweilige Antibiotikumkonzentration, der zweite der nächsten halben Stunde usw. Für

die ersten 30 Minuten lag die mittlere Geschwindigkeit im Median bei ca. 0,095 $\mu\text{m/s}$ in der Kontrolle, sank dann bis zu einer Meropenem-Konzentration von 5000 ng/mL ab (Median bei ca. 0,06 $\mu\text{m/s}$), um dann bis zur höchsten verwendeten Konzentration von 100000 ng/mL wieder anzusteigen (Median bei ca. 0,13 $\mu\text{m/s}$). Auch die zweite halbe Stunde ergab einen diesem Schema folgenden Verlauf, wobei der Median der Migrationsgeschwindigkeit bei ca. 0,06 $\mu\text{m/s}$ im Kontrollkanal, bei ca. 0,03 $\mu\text{m/s}$ für eine Meropenem-Konzentration von 5000 ng/mL und bei ca. 0,08 $\mu\text{m/s}$ für eine Konzentration von 100000 ng/mL lag. Die folgenden halben Stunden befanden sich für alle eingesetzten Antibiotikumkonzentrationen bei ca. 0,025 $\mu\text{m/s}$ und noch weiter fallend. Auch bei der Migrationsgeschwindigkeit ergaben sich im Vergleich zwischen Kontrollkanal und den Kanälen mit differierenden Meropenem-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede.

3.1.3 NETose und Freisetzung von Myeloperoxidase

Desweiteren wurden anhand von DAPI die Zeitpunkte ermittelt, an welchen die Hälfte der Granulozyten die NETose durchlaufen hatten, parallel dazu wurden die Zeitpunkte der Myeloperoxidase-Freisetzung betrachtet. Hierzu wurden auf der y-Achse die medianen ET_{50} -Werte in Minuten und auf der x-Achse die Antibiotikumkonzentrationen in ng/mL aufgetragen (siehe Abbildung 11):

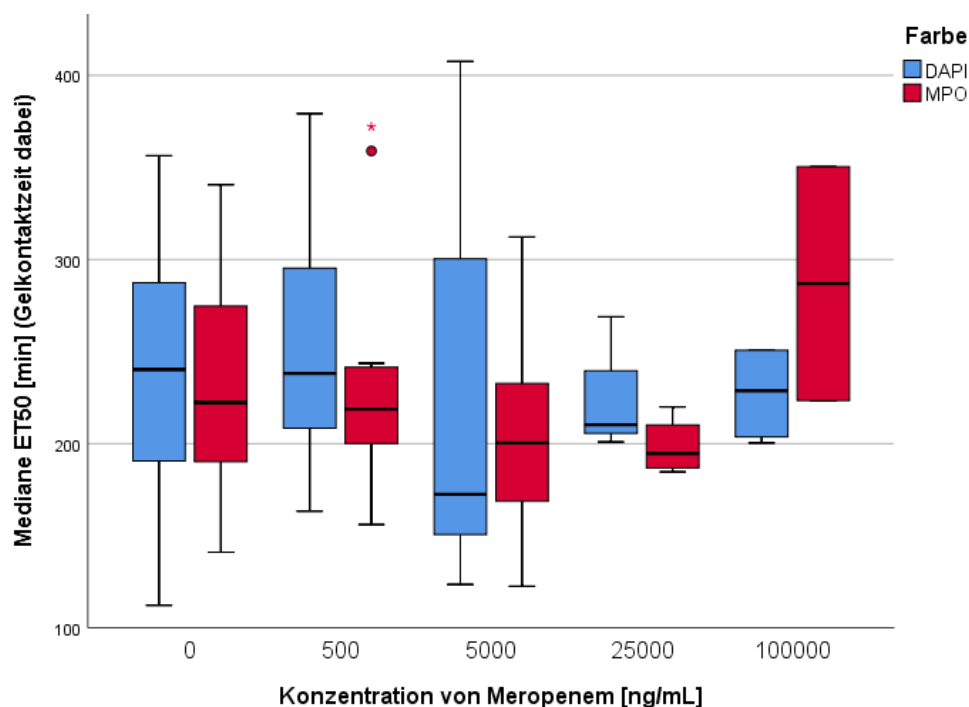


Abbildung 11: Zeitpunkte, an denen die Hälfte der Granulozyten die NETose durchliefen

Für den Kontrollkanal und die niedrigste Meropenem-Konzentration von 500 ng/mL lagen die Mediane für die NETose (nach jeweils ca. 240 Minuten) und die MPO-Freisetzung (nach jeweils ca. 220 Minuten) in einem ähnlichen Bereich. Bei 5000 ng/mL befand sich der Median für die NETose bei ca. 175 Minuten und der für die MPO-Freisetzung bei ca. 200 Minuten. Für die Meropenem-Konzentration von 25000 ng/mL trat die NETose im Median nach 210 Minuten ein und das Enzym Myeloperoxidase wurde im Median nach 195 Minuten sezerniert, während die Werte bei der höchsten eingesetzten Antibiotikumkonzentration von 100000 ng/mL im Median bei ca. 230 Minuten (NETose) und bei ca. 285 Minuten (MPO) lagen. Während sich der mediane Zeitpunkt der NETose im Kontrollkanal statistisch signifikant von dem des Kanals mit der Meropenem-Konzentration von 5000 ng/mL unterschied, war dies beim Vergleich der restlichen Werte sowohl bei DAPI als auch bei MPO nicht der Fall. Um vom Mikroskop nach Beendigung der Laufzeit nicht mehr erfasste, mittels Phoenix potentiell falsch geschätzte ET_{50} -Werte auszuschließen (Zeitpunkte > 7 h Mikroskoplaufzeit), wurden nur ET_{50} -Werte, die unter 420 Minuten lagen, für die Analyse berücksichtigt.

3.1.4 Zeitverlauf und Intensität der ROS-Produktion

Einen weiteren untersuchten Parameter stellte der Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion dar, welcher mithilfe von DHR ermittelt wurde. Hierfür wurden auf der y-Achse die T_{max} ROS in Minuten und auf der x-Achse erneut die Antibiotikumkonzentrationen in ng/mL aufgetragen (siehe Abbildung 12):

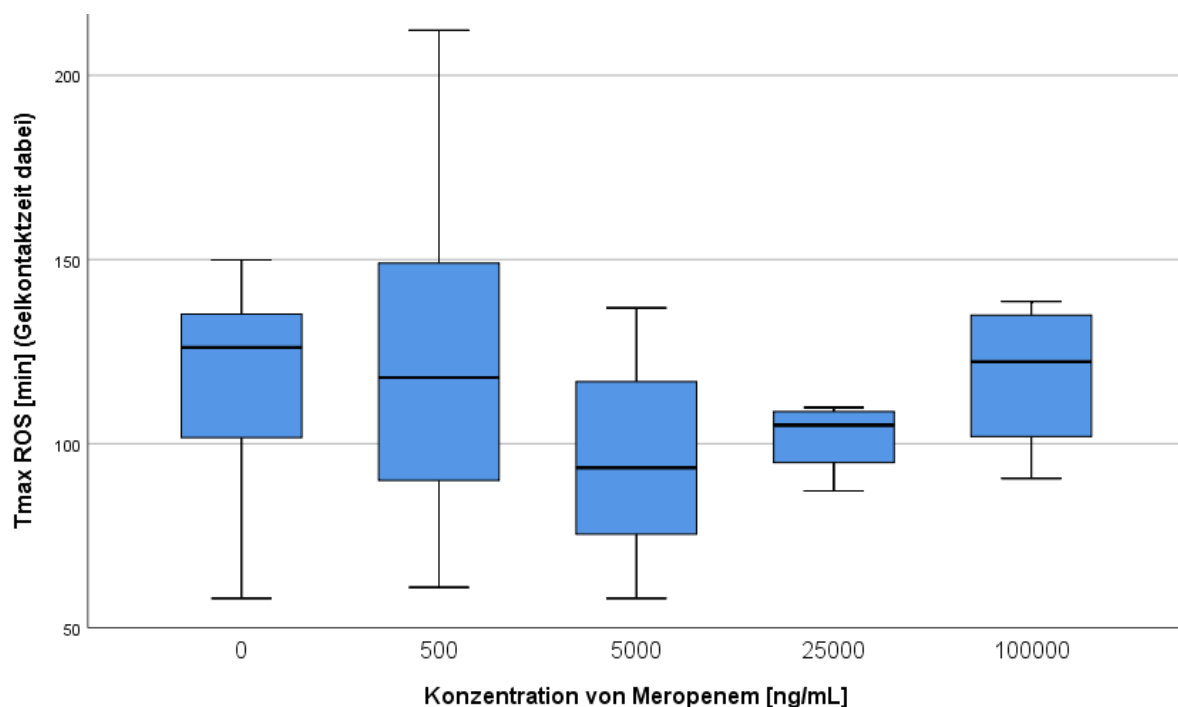


Abbildung 12: Zeitpunkte, an denen die Granulozyten im Median maximale ROS-Produktion aufwiesen

Der Median für den Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion lag im Kontrollkanal bei ca. 125 Minuten und bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration von 500 ng/mL bei ca. 120 Minuten. Für eine Meropenem-Konzentration von 5000 ng/mL zeichnete sich die mediane $T_{\max}$ ROS bei ca. 95 Minuten ab, während sie für die beiden noch höheren Konzentrationen wiederum im Median erst später eintrat (nach ca. 105 Minuten bei 25000 ng/mL und nach ca. 120 Minuten bei 100000 ng/mL). Die Zeitpunkte der maximalen ROS-Produktion in den einzelnen Kanälen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

Als letzter Parameter wurde die Intensität der ROS-Produktion betrachtet. Dabei wurde der Median der Voxelintensitäten je berechneter ROS-Fläche (also je Zelle) mittels Imaris identifiziert und dann der Mittelwert dieser medianen Intensitäten je Zeitpunkt über alle Zellen berechnet. Dieser Mittelwert wurde auf der y-Achse aufgetragen, während auf der x-Achse die gerundeten Zeitpunkte ab Untersuchungsbeginn festgehalten wurden (siehe Abbildung 13). Die unterschiedlichen, getesteten Meropenem-Konzentrationen wurden durch verschiedene Farben der Fehlerbalken im Diagramm ersichtlich gemacht.

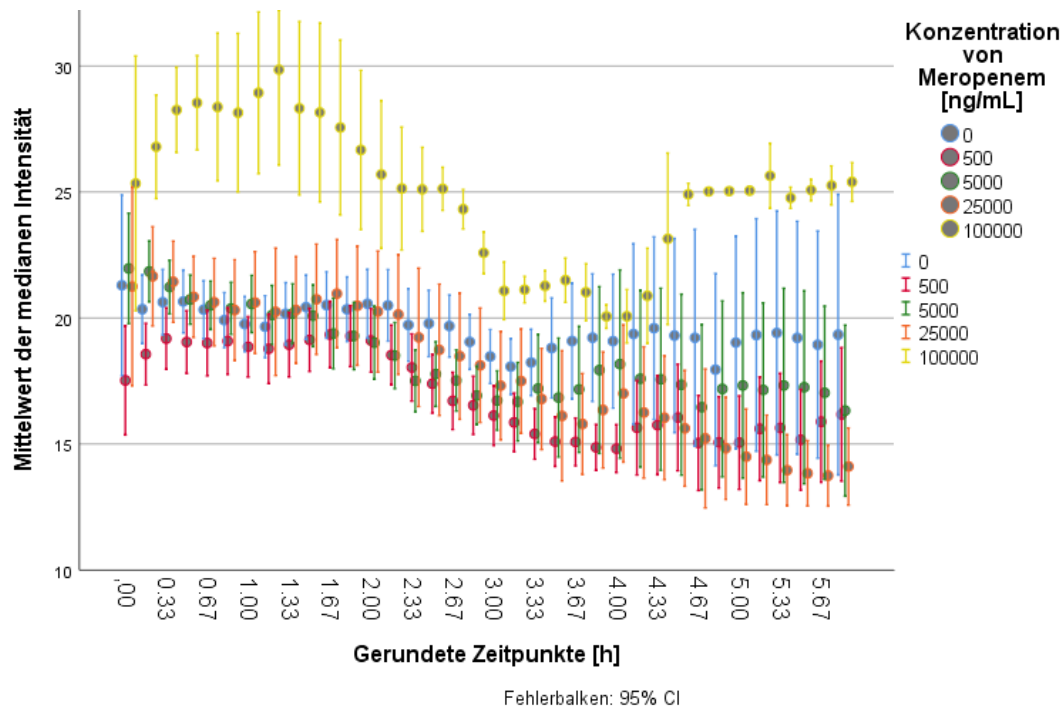


Abbildung 13: Mediane Intensität der ROS-Produktion bei Einsatz unterschiedlicher Meropenem-Konzentrationen

Für alle eingesetzten Konzentrationen zeigte sich tendenziell ein ähnlicher Verlauf: Die ROS-Intensität stieg anfänglich und lag für die ersten beiden Stunden auf einem annähernd konstanten Niveau, fiel anschließend im Verlauf der dritten Stunde etwas ab, um während der vierten Stunde erneut anzusteigen und für die restliche Untersuchungszeit wieder auf einem etwas höheren, relativ beständigen Niveau zu bleiben. Einzig die gemessenen Werte für die Meropenem-Konzentration von 100000 ng/mL lagen deutlich oberhalb der Mittelwerte der restlichen medianen Intensitäten. Diese basierten auf drei der vier zu dieser Konzentration durchgeführten Versuche. Abgesehen von diesen Werten lagen beinahe alle erhobenen Mittelwerte der medianen ROS-Intensität bei Zusatz von Meropenem (unabhängig von der Konzentration) unterhalb derer des Kontrollkanals ohne Antibiotikumzugabe.

3.2 Ergebnisse Cefuroxim

Zu dem Cephalosporin der 2. Generation Cefuroxim wurden insgesamt sechs Versuche durchgeführt. Der linke Kanal fungierte als Kontrolle ohne Antibiotikumzusatz,

während im mittleren Kanal eine Cefuroxim-Konzentration von 2000 ng/mL und im rechten Kanal eine Konzentration von 20000 ng/mL vorherrschte.

3.2.1 Migrationslänge

Für die erste halbe Stunde nach Aufnahmebeginn lag die zurückgelegte Strecke der neutrophilen Granulozyten in der Kontrolle im Median bei ca. 170 μm , im mittleren Kanal bei ca. 115 μm und im rechten Kanal bei ca. 100 μm . Im Vergleich dazu befand sich die Migrationslänge im Verlauf der zweiten beobachteten halben Stunde im Median bei ca. 105 μm im Kontrollkanal, bei ca. 90 μm für die Antibiotikumkonzentration von 2000 ng/mL und bei ca. 70 μm für die Cefuroxim-Konzentration von 20000 ng/mL. Ab der dritten untersuchten halben Stunde lagen die gemessenen Werte für alle drei Kanäle im Median bei ca. 50 μm und für die folgenden halbstündigen Zeitintervalle noch weiter darunter. Alle Messwerte der drei untersuchten Cefuroxim-Konzentrationen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

3.2.2 Migrationsgeschwindigkeit

Im Hinblick auf die mittlere Geschwindigkeit der Granulozytenmigration ergaben sich wieder ähnliche Tendenzen wie bei der Migrationslänge. Im linken Kanal (Kontrolle) lag die mittlere Migrationsgeschwindigkeit in der ersten halben Stunde im Median bei ca. 0,115 $\mu\text{m/s}$, während sie sich dagegen für die Konzentration von 2000 ng/mL bei ca. 0,075 $\mu\text{m/s}$ und für die Konzentration von 20000 ng/mL bei ca. 0,06 $\mu\text{m/s}$ befand. Im Verlauf der zweiten halben Stunde betrugen die Werte für die mittlere Migrationsgeschwindigkeit im Median ca. 0,065 $\mu\text{m/s}$ (Kontrolle), ca. 0,055 $\mu\text{m/s}$ und ca. 0,035 $\mu\text{m/s}$. Ab der dritten untersuchten halben Stunde lagen die Werte für die mittlere Geschwindigkeit der Granulozyten für alle drei Testbedingungen im Median im Bereich von ca. 0,03 $\mu\text{m/s}$ und darunter. Die resultierenden Migrationsgeschwindigkeiten der drei getesteten Cefuroxim-Konzentrationen wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf.

3.2.3 NETose und Freisetzung von Myeloperoxidase

Hinsichtlich der Freisetzung der DNA lagen die medianen ET_{50} -Werte für die Kontrolle bei ca. 195 Minuten, während die NETose für den mittleren und den rechten Kanal im Median erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte. Im Hinblick auf die MPO-Freisetzung befanden sich die erhobenen Werte in einem ähnlichen Bereich wie für die NETose, so lag die mediane ET_{50} bei ca. 205 Minuten im Kontrollkanal und bei ca. 230

Minuten im mittleren Kanal. Lediglich im rechten Kanal mit der hohen Konzentration an Cefuroxim erfolgte die Freisetzung des Enzyms Myeloperoxidase im Median deutlich vor der des NETose-Eintritts, hier lag die mediane ET_{50} bei ca. 210 Minuten. Die Durchführung statistischer Tests ergab weder für die medianen Zeitpunkte der NETose noch für die der Myeloperoxidase-Sezernierung statistische Signifikanz.

3.2.4 Zeitverlauf und Intensität der ROS-Produktion

Die Zeitpunkte, an denen die Granulozyten im Median die maximale ROS-Produktion aufwiesen, befanden sich für alle drei getesteten Konzentrationen relativ nah beieinander. So lag die T_{max} ROS für die Kontrolle im Median bei ca. 128 Minuten, für die Cefuroxim-Konzentration von 2000 ng/mL bei ca. 132 Minuten und für die Cefuroxim-Konzentration von 20000 ng/mL bei ca. 134 Minuten. Die erhaltenen Ergebnisse unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

3.3 Ergebnisse Moxifloxacin

Zu dem Fluorchinolon Moxifloxacin wurden acht Versuche durchgeführt. Der linke Kanal fungierte als Kontrolle ohne Antibiotikumzugabe, während im mittleren Kanal eine Moxifloxacin-Konzentration von 2000 ng/mL und im rechten Kanal eine Konzentration von 20000 ng/mL eingesetzt wurde.

3.3.1 Migrationslänge

In der ersten halben Stunde nach Start der Mikroskopaufnahmen lag der Median der zurückgelegten Granulozytenmigrationsstrecke in der Kontrolle bei ca. 125 μm . Im mittleren und rechten Kanal lagen die Werte für beide Moxifloxacin-Konzentrationen sehr nahe beieinander (103 bzw. 98 μm). Während der zweiten halben Stunde nach Aufnahmebeginn ergaben die Werte für den Kontrollkanal im Median ca. 65 μm , für die niedrigere Konzentration leicht darüber bei ca. 75 μm und für die höhere Konzentration nur noch bei ca. 45 μm . In der dritten halben Stunde betrug der Median für alle drei Kanäle ca. 45 μm und stieg im Verlauf der vierten halben Stunde noch einmal für alle drei Moxifloxacin-Konzentrationen minimal um wenige μm an, um in der fünften halben Stunde nach Aufnahmestart wieder leicht abzufallen (linker und rechter Kanal) bzw. auf einem ähnlichen Niveau zu bleiben (Mitte). Die erhobenen Unterschiede zwischen den eingesetzten Konzentrationen erwiesen sich nicht als statistisch signifikant.

3.3.2 Migrationsgeschwindigkeit

Die Betrachtung der mittleren Granulozytenmigrationsgeschwindigkeit ergab ein ähnliches Bild wie die im Rahmen der Migration zurückgelegte Streckenlänge. Die mittlere Geschwindigkeit der Neutrophilen lag in der ersten halben Stunde im Median bei ca. 0,075 $\mu\text{m/s}$ in der Kontrolle, bei ca. 0,065 $\mu\text{m/s}$ im mittleren Kanal und bei ca. 0,06 $\mu\text{m/s}$ im rechten Kanal. Im Verlauf der zweiten untersuchten halben Stunde befanden sich die Mediane der mittleren Migrationsgeschwindigkeit weit unter denen des ersten Zeitintervalls, so betrugen die Mediane ca. 0,035 $\mu\text{m/s}$, ca. 0,04 $\mu\text{m/s}$ bzw. ca. 0,025 $\mu\text{m/s}$. In der dritten halben Stunde nach Untersuchungsbeginn bewegten sich die Mediane für alle drei Kanäle in einem Bereich zwischen 0,023 $\mu\text{m/s}$ - 0,027 $\mu\text{m/s}$ und stiegen während der vierten halben Stunde noch einmal bei allen drei Moxifloxacin-Konzentrationen um wenige $\mu\text{m/s}$ an, um anschließend im fünften Zeitintervall wieder um ein paar $\mu\text{m/s}$ abzusinken (linker und rechter Kanal) bzw. zu stagnieren (Mitte). Zwischen den nachgewiesenen Unterschieden in der Migrationsgeschwindigkeit ließ sich keine statistische Signifikanz feststellen.

3.3.3 NETose und Freisetzung von Myeloperoxidase

Im Hinblick auf Zeitpunkte, zu denen die Hälfte der Granulozyten in die NETose gingen bzw. das Enzym Myeloperoxidase freisetzten, zeigten sich für alle drei untersuchten Moxifloxacin-Konzentrationen ähnliche Tendenzen. Der Median für die NETose lag im Kontrollkanal bei ca. 170 Minuten, bei der Antibiotikumkonzentration von 2000 ng/mL im Bereich von ca. 190 Minuten und bei der hohen Konzentration von 20000 ng/mL im Bereich von ca. 180 Minuten. Die medianen ET_{50} -Werte für die MPO-Sezernierung befanden sich dagegen stets zeitlich vor denen der DNA-Freisetzung, so bewegten sich die Mediane im Bereich zwischen 145-165 Minuten. Weder die Werte für die NETose noch die für die MPO-Freisetzung der drei unterschiedlichen Untersuchungsbedingungen erwiesen sich als statistisch signifikant.

3.3.4 Zeitverlauf und Intensität der ROS-Produktion

Angeichts der Analyse der Zeitpunkte, an denen die neutrophilen Granulozyten im Median maximal viele Sauerstoffradikale produzierten, ergab sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den beiden anderen Kanälen. So befand sich der Median der T_{max} ROS im Kontrollkanal bei ca. 102 Minuten, im mittleren Kanal bei ca. 88 Minuten und im rechten Kanal bei ca. 95 Minuten.

Die Auswertung der medianen DHR-Intensität zeigte, dass sich die Mittelwerte für alle drei Konzentrationen im Verlauf der ersten viereinhalb Stunden nach Mikroskopstart

in einem ähnlichen Bereich bewegten. Die Mittelwerte der medianen ROS-Intensität lagen in der ersten Stunde zwischen 25 und 30, sanken gegen Ende dieses Intervalls, stiegen im Verlauf der zweiten untersuchten Stunde noch einmal leicht an und fielen bis kurz vor Beginn der dritten beobachteten Stunde wieder etwas ab. Nach Ablauf von ca. viereinhalb Stunden blieben die Mittelwerte der medianen DHR-Intensität für den Kontrollkanal und die für den rechten Kanal relativ beständig zwischen 22 und 24, während die Mittelwerte der medianen DHR-Intensität für die Antibiotikumkonzentration von 2000 ng/mL deutlich darüber lagen und sich in einem Bereich zwischen 26 und 31 bewegten.

3.4 Ergebnisse Clarithromycin

Zu dem Makrolid Clarithromycin wurden insgesamt acht Versuche durchgeführt. Bei einem Experiment konnte der mittlere Kanal nicht ausgewertet werden, da die geringe Anzahl von Zellen kein aussagekräftiges Ergebnis zuließ. Der linke Kanal diente als Kontrolle, während im mittleren Kanal 1000 ng/mL und im rechten Kanal 10000 ng/mL des Antibiotikums verwendet wurden.

3.4.1 Migrationslänge

Für die Kontrolle lag der Median der zurückgelegten Migrationsstrecke in der ersten untersuchten halben Stunde bei ca. 125 μm und in der darauffolgenden bei ca. 105 μm . Im mittleren Kanal befand sich der Median im ersten Zeitintervall bei ca. 85 μm und im darauffolgenden nur ganz knapp darunter bei ca. 80 μm . Auch im rechten Kanal bewegten sich die erhobenen Werte beinahe im identischen Bereich wie in der Mitte, so lagen die Mediane für die ersten beiden halben Stunden nach Aufnahmebeginn jeweils bei ca. 80 μm . Im Verlauf der dritten beobachteten halben Stunde befanden sich die Mediane der Streckenlänge für alle drei getesteten Konzentrationen noch bei ca. 65 μm und sanken für die noch folgenden Zeitintervalle auf Werte unterhalb von 50 μm ab. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz ergab keine klinisch relevanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsbedingungen.

3.4.2 Migrationsgeschwindigkeit

Hinsichtlich der mittleren Granulozytenmigrationsgeschwindigkeit resultierte ein ähnlicher Verlauf der Mediane wie bei der Auswertung der Migrationslänge. So lag die mittlere Geschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten im Kontrollkanal bei ca. 0,08 $\mu\text{m/s}$ für die erste halbe Stunde und sank auf ca. 0,06 $\mu\text{m/s}$ im Verlauf der darauffolgenden

halben Stunde. Im mittleren Kanal befand sich der Median im ersten untersuchten Zeitintervall bei ca. 0,045 $\mu\text{m/s}$ und in der nächsten halben Stunde knapp darunter bei ca. 0,04 $\mu\text{m/s}$, während die Mediane im rechten Kanal mit 10000 ng/mL Clarithromycin in der ersten halben Stunde ebenso wie in der Mitte bei ca. 0,045 $\mu\text{m/s}$ und bei ca. 0,038 $\mu\text{m/s}$ für das folgende Zeitintervall lagen. Für alle drei Kanäle betrug der Median in der dritten halben Stunde ca. 0,03 $\mu\text{m/s}$ und in den restlichen Untersuchungsintervallen sanken die Mediane auf Werte unterhalb der 0,03 $\mu\text{m/s}$. Auch bei diesem erhobenen Parameter zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Direktwirkung der unterschiedlichen Clarithromycin-Konzentrationen auf die Granulozyten.

3.4.3 NETose und Freisetzung von Myeloperoxidase

In Anbetracht der Zeitpunkte, an denen die Hälfte der Neutrophilen in die NETose übergangen bzw. damit begannen Myeloperoxidase freizusetzen, bewegte sich der mediane ET_{50} -Wert für die Kontrolle bei ca. 270 Minuten (NETose) bzw. bei ca. 215 Minuten (MPO-Freisetzung). Im mittleren Kanal befand sich der Median für die Ausbildung der DNA-Netze bei ca. 310 Minuten und für die MPO-Sezernierung bei ca. 290 Minuten. Für die hohe Clarithromycin-Konzentration lag der Median bei ca. 265 Minuten für den NETose-Eintritt und bei ca. 235 Minuten für die Freisetzung des Enzyms Myeloperoxidase. Die Durchführung statistischer Tests ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die verschiedenen Testbedingungen der drei untersuchten Kanäle.

3.4.4 Zeitverlauf und Intensität der ROS-Produktion

Auch die Ergebnisse der Analyse der Zeitpunkte, an denen die neutrophilen Granulozyten im Median maximale ROS-Produktion zeigten, wiesen bei Vergleich der unterschiedlich eingesetzten Clarithromycin-Konzentrationen keine statistische Signifikanz auf. So waren die Mediane für die T_{max} ROS für alle drei Versuchsbedingungen in einem eng begrenzten Bereich anzutreffen: bei ca. 155 Minuten für den Kontrollkanal, bei ca. 160 Minuten für die niedrige Antibiotikumkonzentration und bei ca. 152 Minuten für die hohe Konzentration. Im Rahmen der Auswertung der medianen Intensität der ROS-Produktion lagen die erhobenen Mittelwerte für die Kontrolle und die Konzentration von 1000 ng/mL weitestgehend während des Verlaufs der gesamten siebenstündigen Mikroskopaufnahmen im Bereich von ca. 20. Lediglich zu Beginn der

ersten halben Stunde, zwischen eineinhalb und zweieinhalb Stunden nach Aufnahmebeginn und gegen Ende der Laufzeit zeigte die Analyse Mittelwerte für die mediane DHR-Intensität der niedrigen Konzentration auf, die sich weit über den restlichen Werten befanden. Bei der Betrachtung der Mittelwerte der medianen Intensität für die hohe Konzentration fiel hingegen auf, dass die Werte im Verlauf der ersten drei Stunden bei ca. 30 und somit über denen der anderen beiden Antibiotikumkonzentrationen lagen. Demgegenüber bewegten sie sich während der vierten und fünften untersuchten Stunde auf dem gleichen Niveau wie bei der Kontrolle und beim mittleren Kanal (bei ca. 20) und stiegen gegen Ende der Mikroskoplaufzeit noch einmal etwas an auf ca. 30. Die erhaltenen Ergebnisse für die drei Testbedingungen unterschieden sich jedoch nicht statistisch signifikant voneinander.

3.5 Ergebnisse Prednisolon

Als fünftes und letztes Medikament wurde das synthetische Glukokortikoid Prednisolon untersucht, zu dem noch einmal acht Versuche durchgeführt wurden. Der linke Kanal diente als Kontrolle, währenddessen in den mittleren Kanal eine Konzentration von 50 ng/mL und in den rechten Kanal 500 ng/mL eingesetzt wurden.

3.5.1 Migrationslänge

Im Rahmen der Analyse der Migrationsstreckenlänge befand sich der Median in der Kontrolle im Verlauf der ersten halben Stunde bei ca. 220 μm , im darauffolgenden Zeitintervall bei ca. 185 μm und innerhalb der dritten untersuchten halben Stunde noch bei ca. 110 μm . Ähnliche mediane Werte zeigten auch die Resultate im mittleren und rechten Kanal, welche keine statistisch signifikante Unterscheidung zum Kontrollkanal und untereinander aufwiesen. So lagen die Mediane der gemessenen Streckenlängen im mittleren Kanal vom ersten bis zum dritten Zeitintervall bei ca. 202 μm , ca. 150 μm bzw. ca. 100 μm . Im rechten Kanal bewegten sich die Mediane mit der ersten halben Stunde beginnend bei ca. 175 μm , anschließend bei ca. 160 μm und im dritten Zeitintervall bei ca. 90 μm . Für die restliche Untersuchungszeit befanden sich die Mediane in allen drei Kanälen bei Werten um die 50 μm und weiter absinkend.

3.5.2 Migrationsgeschwindigkeit

Auch die Betrachtung der mittleren Migrationsgeschwindigkeiten der neutrophilen Granulozyten lieferte bei Prednisolonzusatz ein ähnliches Bild wie die zurückgelegte Stre-

ckenlänge. Die Mediane waren im Kontrollkanal in den ersten drei beobachteten halben Stunden bei ca. 0,15 $\mu\text{m/s}$, ca. 0,122 $\mu\text{m/s}$ und ca. 0,07 $\mu\text{m/s}$ gegenüber Werten von ca. 0,14 $\mu\text{m/s}$, ca. 0,095 $\mu\text{m/s}$ und ca. 0,065 $\mu\text{m/s}$ für den mittleren Kanal. Im Kanal mit der hohen Konzentration an Glukokortikoid lag der Median der ersten halben Stunde bei ca. 0,115 $\mu\text{m/s}$, im zweiten Zeitintervall bei ca. 0,095 $\mu\text{m/s}$ und in der dritten untersuchten halben Stunde bei ca. 0,06 $\mu\text{m/s}$. Für den restlichen untersuchten Zeitrahmen ergaben sich nur noch Mediane bei ca. 0,03 $\mu\text{m/s}$ und weiter darunter liegend. Die resultierenden Werte unterschieden sich im Hinblick auf die differierenden Prednisolonmengen nicht statistisch signifikant voneinander.

3.5.3 NETose und Freisetzung von Myeloperoxidase

Bei der Auswertung der Zeitpunkte, an denen die Hälfte der Granulozyten die NETose durchliefen bzw. Myeloperoxidase freisetzten, befanden sich die medianen ET_{50} -Werte für die NETose bei ca. 225 Minuten in der Kontrolle, bei ca. 280 Minuten im mittleren Kanal und bei ca. 290 Minuten im rechten Kanal. Die Mediane für die Zeitpunkte der MPO-Sezernierung lagen immer vor denen der NETose und waren für den Kontrollkanal und die niedrige Prednisolon-Konzentration relativ nah beieinander, bei ca. 212 Minuten (Kontrolle) bzw. bei ca. 198 Minuten (50 ng/mL Prednisolon). Im rechten Kanal bewegte sich die mediane ET_{50} für die Myeloperoxidase-Freisetzung hingegen bei ca. 270 Minuten. Die Ergebnisse beider Parameter unterschieden sich angesichts der drei verschiedenen Testbedingungen jeweils nicht statistisch signifikant voneinander.

3.5.4 Zeitverlauf und Intensität der ROS-Produktion

Zudem ergab auch die Prüfung der Werte für die Zeitpunkte, an denen die Granulozyten im Median maximal viele radikale Sauerstoffspezies produzierten, keine statistische Signifikanz zwischen den drei verwendeten Konzentrationen. Die Mediane für die T_{max} ROS waren im linken Kanal bei ca. 156 Minuten, im Falle der niedrigen Prednisolon-Konzentration bei ca. 152 Minuten und im rechten Kanal bei ca. 165 Minuten anzutreffen.

Im Hinblick auf die Analyse der Mittelwerte der medianen ROS-Intensitäten waren für die drei unterschiedlichen Prednisolon-Konzentrationen variierende Kurvenverläufe nachweisbar. Für den Kontrollkanal stiegen die Mittelwerte für die mediane Intensität im Verlauf der ersten halben Stunde von 12 auf 14 an, sanken innerhalb der nächsten 30 Minuten wieder auf Werte knapp oberhalb von 12 ab und bewegten sich für die

restlichen sechs Stunden der Mikroskoplaufzeit im Bereich von 12. Bezüglich der niedrigen Glukokortikoidkonzentration lagen die Mittelwerte während der ersten beiden Stunden um 14, um sich ab dreieinhalb Stunden Mikroskoplaufzeit im Bereich um 12 einzupendeln. Das Maximum der Mittelwerte der medianen Intensität im Kanal mit der hohen Prednisolon-Konzentration befand sich nach einer Laufzeit von ca. 0,67 h etwas oberhalb von 16. Von diesem Zeitpunkt an fielen die Mittelwerte der medianen Intensität für die folgenden eineinhalb Stunden ab und stiegen zwischenzeitlich bei 4,00 h bis ca. 4,33 h noch einmal kurz auf einen Wert von 13 bei 4,33 h an, um für das restliche Untersuchungsintervall bis auf Werte unter 12 zu sinken.

4 Diskussion

Nach ausführlicher Darlegung der Ergebnisse aller fünf durchgeführten Versuchsreihen erfolgt im nächsten Kapitel eine dezidierte Einordnung und Interpretation der Ergebnisse und die Gegenüberstellung der erhaltenen Resultate mit denen anderer, ähnlich angelegter Studien mit einem vergleichbaren Forschungsziel.

4.1 Beeinflussung von Migrationslänge und -geschwindigkeit durch die untersuchten Substanzen

Bei den durchgeführten Versuchsreihen ergab die detaillierte Betrachtung der Direktwirkung aller vier untersuchten Antibiotika (Meropenem, Cefuroxim, Moxifloxacin, Clarithromycin) auf die neutrophilen Granulozyten im Hinblick auf ihre Migrationsstrecke und ihre Migrationsgeschwindigkeit zum Teil schwache Änderungen. Dies galt für alle Konzentrationen, sowohl für die niedrigen als auch die höheren Dosierungen jeweils im Vergleich zur Kontrolle. Dass die Änderungen nur relativ schwach ausfielen, könnte allerdings u.a. daran liegen, dass als Standardverfahren zur Isolierung von Neutrophilen die Dichtegradiententrennung mittels Zentrifugation erfolgte. Hierbei sind die Zellen während des Isolationsprozesses g-Kräften ausgesetzt, welche zu einer paralytischen Hemmung der PMN-Funktionen über eine bestimmte g-Zeit hinaus führten, wie Rimboeck et al. nachwiesen [48].

So zeigte sich nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Meropenem im Vergleich zur Kontrolle nur ein leichter Rückgang in der Länge der zurückgelegten Strecke bei einer Konzentration von 500 bzw. 5000 ng/mL, während bei noch höheren Dosierungen die Migrationsstrecke wieder anstieg, was auf eine Tendenz der Steigerung

der Neutrophilenmigration bei sehr hohen Meropenem-Konzentrationen hindeuten könnte. Die eingesetzten Cefuroxim-Dosierungen zeigten mit zunehmender Konzentration im Vergleich zur Kontrolle eine geringfügige Abnahme sowohl bei der Länge der zurückgelegten Migrationsstrecke als auch bei der Migrationsgeschwindigkeit, welche sich jedoch nicht als statistisch signifikant erwies und deshalb ebenso auf keinen Einfluss von Cefuroxim auf die Granulozytenmigration hindeutet. Auch bei Einsatz des Gyrasehemmers Moxifloxacin ergab sich weder bei der niedrigen noch bei der hohen Konzentration eine signifikante Beeinflussung des Migrationsverhaltens. Das als viertes Antibiotikum getestete Makrolid Clarithromycin wies im Vergleich zur Kontrolle bei 1000 ng/mL ebenso wie bei 10000 ng/mL eine leichte, jedoch nicht signifikante Abnahme im Bereich der Granulozytenmigrationsstrecke und -geschwindigkeit auf.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit konnten Morán et al. bei in vitro-Untersuchung des Einflusses von Cefuroxim auf neutrophile Granulozyten ebenfalls keine signifikante Änderung im Migrationsverhalten nachweisen [49]. Lotz et al. kombinierten in ihrer Studie Bakterien des Stammes *Staphylococcus aureus* mit mehreren Antibiotikaklassen, u.a. einem β -Lactam und einem Gyrasehemmer und prüften die Überstände der mit Antibiotika behandelten Bakterien auf ihren Gehalt an Lipoteichoinsäure (LTA) und deren Effekt auf die Neutrophilenfunktion [50]. Ähnlich der im Rahmen dieser Doktorarbeit absolvierten Studie konnten Lotz et al. bei den beiden β -Lactamen Meropenem und Cefuroxim keinen Einfluss nachweisen, was auch an der fehlenden intrazellulären Anreicherung von β -Lactamen liegen könnte [51, 52]. Im Gegensatz hierzu berichteten Lotz et al., dass die Aussetzung von *Staphylococcus aureus* gegenüber Flucloxacillin und gegenüber Ciprofloxacin zu einer Freisetzung von LTA führte und die Co-Inkubation neutrophiler Granulozyten mit LTA-enthaltenden Überständen eine Aktivierung der Neutrophilen nach sich zog. Dies wurde u.a. anhand einer gesteigerten Granulozytenmigration sowie einer verbesserten Phagozytoseaktivität ersichtlich. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die antibiotikainduzierte LTA-Freisetzung von *Staphylococcus aureus* zu einer verbesserten antimikrobiellen Aktivität durch neutrophile Granulozyten führt [50].

Die zu dieser Studie widersprüchlichen Ergebnisse könnten daran liegen, dass in dem hier verwendeten Versuchsansatz mit Moxifloxacin ein anderes Antibiotikum verwendet wurde, auch wenn es sich ebenfalls um einen Gyrasehemmer handelt, beide Antibiotika also strukturell miteinander verwandt sind und zur selben Antibiotikaklasse der Fluorchinolone zählen. Darüber hinaus spielt offensichtlich nicht nur die intrazelluläre

Anreicherung, wie sie für Fluorchinolone als auch für Makrolide in der Literatur beschrieben wurde [50, 51, 53–55], eine wesentliche Rolle in der Beeinflussung der Neutrophilenfunktionen. Es können auch Oberflächenproteine, Chemokine und Zytokine der Signalkaskade sowie im Falle einer Infektion im Blut und im Gewebe befindliche Bakterien die Granulozyten ebenfalls mitbeeinflussen [50].

Trotz des fehlenden Einflusses der Antibiotika auf das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten in dieser Studie finden sich in der Literatur auch Hinweise dafür, dass Neutrophile mit Antibiotika in Wechselwirkung treten und synergistisch in der Infektionsbekämpfung interagieren. In diesem Zusammenhang untersuchten Mandell et al. beispielsweise die intrazelluläre Aufnahme und den Transport von Antibiotika durch Neutrophile, wobei sie bei mehreren Chinolonen und einem Ketolid eine Anreicherung in den Granulozyten, eine von einem chemotaktischen Gradienten abhängige Beförderung dieser Substanzen zum Infektionsherd und die dortige Wiederfreisetzung detektieren konnten [51]. Auch Frank et al. gehen davon aus, dass neutrophile Granulozyten als eine Art „Antibiotika-Lieferservice“ agieren, um diese nach intrazellulärer Anreicherung zum Infektionsherd zu transportieren und dann durch synergistische Bakterienabtötung den Inflammationsbereich zu begrenzen und die Erreger zu eliminieren [53]. So wurde auch beschrieben, dass Antibiotika Bakterien empfänglicher für eine Abtötung durch Neutrophile machen, wobei dieser Effekt bereits unterhalb der minimalen Hemmkonzentration nachweisbar ist [56–58]. Deshalb könnten weitere Versuche, in denen zusätzliche Einflussfaktoren wie Bakterien miteinbezogen werden, noch mehr Aufschluss über die Direktwirkung von Antibiotika auf neutrophile Granulozyten geben.

Auch bei dem neben den vier Antibiotika untersuchten Glukokortikoid Prednisolon wurde besonderer Wert auf die Direktwirkung der Substanz auf die Granulozytenfunktionen gelegt, wobei im Hinblick auf die Migration nachgewiesen werden konnte, dass im Vergleich zur Kontrolle auch zunehmende Konzentrationen an Prednisolon (50 bzw. 500 ng/mL) keinen signifikanten Einfluss auf die zurückgelegte Strecke und die Migrationsgeschwindigkeit der Neutrophilen ausübten. Gestützt wird dieses Forschungsergebnis durch eine Studie von Fujita et al., welche eine seltene Form einer adulten Autoimmun-Neutropenie erfolgreich mit Prednisolon behandelten [59]. Im Rahmen ihrer Studie führten Fujita et al. einen Granulozyten-Immunfluoreszenz-Test durch und konnten im Serum einer an Autoimmun-Neutropenie erkrankten Patientin Autoantikörper gegen humane Neutrophilenantigene detektieren. Während die Verabreichung von

Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) keine Symptomlinderung erbrachte, bewirkte die Gabe von Prednisolon eine Normalisierung und Stabilisierung der Neutrophilenanzahl im Blut der Patientin [59]. Somit bestätigt diese Studie das Ergebnis dieser Versuchsreihe, bei der keine inhibierende Wirkung von Prednisolon auf die Granulozytenmigration beobachtet wurde. Im Gegensatz zu dieser Studie stellten Fujita et al. jedoch zusätzlich einen fördernden Effekt des Glukokortikoids auf die Neutrophilen fest [59]. Demgegenüber gelangten Heimbürger et al. zu differierenden Erkenntnissen, da sie eine Hemmung der Zytokin-induzierten Adhäsion zwischen neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen nach Prednisolonzusatz in vitro detektierten [60]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten daran liegen, dass in dieser Versuchsreihe lediglich gesunde Probanden mit einer Granulozytenanzahl im Normbereich teilnahmen, während bei Fujita et al. ausschließlich Patienten mit Autoimmun-Neutropenie in die Studie involviert waren. Zudem wurde Prednisolon in den Versuchen zu dieser Arbeit erst in vitro zu den aus Vollblut extrahierten neutrophilen Granulozyten gegeben, wohingegen das Medikament bei Fujita et al. den inkludierten Patienten verabreicht wurde und somit der Einfluss auf die Granulozytenanzahl bzw. -funktion in vivo untersucht wurde [59]. Der Versuchsansatz von Heimbürger et al. beinhaltete auch Endothelzellen, die aus menschlichen Umbilikalvenen gewonnen wurden, währenddessen in dieser Studie die Interaktion der Granulozyten mit der Gefäßwand nicht genauer betrachtet wurde, sondern das Hauptaugenmerk auf der Granulozytenfortbewegung an sich lag und nicht auf der Diapedese. Bei Heimbürger et al. führte eine Vorbehandlung des Endothels mit Interleukin-1 β oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) zu einer übermäßigen endothelialen E-Selektin-Expression und einer Hyperadhäsion der Neutrophilen. Dieser Vorgang wurde bei Prednisolonzugabe dosisabhängig reduziert [60].

Trotz der negativen Ergebnisse dieser Studie, die in einer Ablehnung der Forschungshypothese in Bezug auf eine Inhibierung der Granulozytenmigration durch Antibiotika und Prednisolon mündeten, lassen die angeführten Literaturdaten Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Medikamenten und neutrophilen Granulozyten vermuten, die durch Grenzen unseres Versuchsmodells nicht ersichtlich wurden. Diese Fehler im Versuchsmodell könnten die Ergebnisse irrtümlicherweise beeinträchtigen. So kann das Granulozytenextraktionsverfahren dazu führen, dass neutrophile Granulozyten vorzeitig die NETose durchlaufen. Hundhammer et al. gehen z.B. davon aus, dass g-Kräfte in Kombination mit der Dauer der Zentrifugation die wichtigsten Funktionen

der Neutrophilen erheblich beeinträchtigen, wobei für die Herabsetzung der Neutrophilenmigration das Produkt der beiden Faktoren g-Kraft sowie Zentrifugationsdauer, das als g-Zeit definiert wird, verantwortlich zeichnet [61]. Außerdem stellen auch die Bedingungen in den Kanälen des ibidi-3D- μ -slides für die Neutrophilen nur eine Annäherung an die physiologischen Verhältnisse innerhalb des menschlichen Körpers dar. Nährmedium (fMLP) und Gelmatrix generieren in vitro nicht dieselben Voraussetzungen wie das Zusammenspiel zwischen Blutfluss, Endotheloberflächen sowie Signalmolekülen in vivo. Deshalb könnten auch die Grenzen des Versuchsansatzes bzw. des Modells eine potentielle Direktwirkung der untersuchten Substanzen auf neutrophile Granulozyten ausschalten. So könnte man in diesem Zusammenhang weitere Versuche zur Verifizierung durchführen, in denen beispielsweise noch einmal explizit Migrationsschritte wie Adhäsion und Leukodiapedese in den Fokus gestellt werden [62].

4.2 Beeinflussung von NETose und Myeloperoxidase-Freisetzung durch die untersuchten Substanzen

In Anbetracht des Zeitpunktes der NETose fiel bei der Untersuchung des β -Lactam-Antibiotikums Meropenem auf, dass eine geringe Antibiotikumkonzentration von 500 ng/mL keine wesentliche Veränderung bewirkte, während die NETose bei 5000 ng/mL Meropenem im Vergleich zur Kontrolle zu einem früheren Zeitpunkt eintrat. Diese Tendenz setzte sich aber bei den ebenfalls getesteten, noch höheren Dosierungen nicht fort, die NETose erfolgte hier zu einem späteren Zeitpunkt bei ca. 210 Minuten (25000 ng/mL) bzw. bei ca. 230 Minuten (100000 ng/mL). Dieser Zusammenhang ließ trotz der statistischen Signifikanz der früher eintretenden NETose bei einer Meropenem-Konzentration von 5000 ng/mL die Schlussfolgerung zu, dass Meropenem den NETose-Zeitpunkt der neutrophilen Granulozyten nicht beeinflusst. In der Literatur hingegen finden sich auch Hinweise, dass β -Lactame die NET-Ausbildung induzieren [63]. So erforschten Bystrzycka et al. den Effekt von Clindamycin und dem ebenfalls zur Gruppe der β -Lactame zählenden Amoxicillin auf die Freisetzung neutrophiler extrazellulärer Fallen (NETs). Hierzu wurden neutrophile Granulozyten gesunder Probanden über Dichtegradientenzentrifugation extrahiert und anschließend wurden die Zellen für zwei Stunden mit Clindamycin bzw. mit Amoxicillin inkubiert und die NET-Freisetzung mit PMA stimuliert, während in dieser Studie fMLP (10 nM) als Stimulus fungierte. Mithilfe eines Fluorometers wurden die NETs als Parameter für die Menge

an extrazellulärer DNA quantifiziert und mit einem Immunfluoreszenzmikroskop aufgezeichnet [63, 64]. Es stellte sich heraus, dass Amoxicillin die NET-Ausbildung induzierte, Clindamycin hingegen keinen Einfluss auf die NET-Freisetzung aufwies [63]. Auch bei dem als zweite Substanz getesteten Cefuroxim zeigte sich ein ähnlicher Trend wie bei Meropenem und dem von Bystrzycka et al. geprüften Clindamycin, es war lediglich eine nicht signifikante Verspätung des NETose-Zeitpunktes um ca. 30 Minuten im Vergleich zur Kontrolle feststellbar. Amoxicillin, welches ebenso wie Meropenem und Cefuroxim zu den β -Lactamen zählt, löste bei Bystrzycka et al. im Gegensatz zu dieser Studie eine NETose aus [63]. Dies lässt darauf schließen, dass die Fähigkeit von Antibiotika die NET-Freisetzung zu verändern nicht nur von der gewählten Antibiotikaklasse abhängt, sondern auch von dem eingesetzten Antibiotikum selbst. Betrachtet man parallel dazu die Verschiebung der Zeitpunkte der Myeloperoxidase-Freisetzung zeichnete sich bei beiden untersuchten β -Lactamen ein ähnliches Bild wie bei den NETose-Zeitpunkten ab. Weder Meropenem noch Cefuroxim erzielten in den untersuchten Konzentrationen eine signifikante Abänderung des zeitlichen Verlaufs der MPO-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle. Auffällig erschien bei den Ergebnissen lediglich, dass bei Meropenem-Dosierungen von 5000 und 100000 ng/mL die MPO-Freisetzung im Median erst ca. 30 Minuten (5000 ng/mL) bzw. ca. 50 Minuten (100000 ng/mL) nach denen des NETose-Eintritts erfolgte, was aber durch die große Streuung der einzelnen Messwerte aller Versuche und der damit einhergehenden fehlenden statistischen Signifikanz erklärt werden kann. Einen weiteren Anhaltspunkt lieferte auch die Tatsache, dass die Zeitpunkte der MPO-Freisetzung nicht zwingend vor denen des NETose-Eintritts liegen müssen, sondern auch parallel erfolgen können, falls sich mit Myeloperoxidase gefüllte Granula außen auf der Kernmembran befinden [5, 65]. Nach dem Auflösen der Kernmembran werden die darauf befindlichen MPO-Granula mit den DNA-Fragmenten aus dem Nukleus gemeinsam ausgeworfen und können auch auf den gebildeten NET-Strukturen lokalisiert sein, was die Bakterienabtötung optimiert [5, 65].

Im Vergleich zu diesen beiden auffälligen MPO-Freisetzungszeitpunkten bei Meropenem lagen die Werte bei dem dritten getesteten Antibiotikum, dem Fluorchinolon Moxifloxacin, für beide eingesetzten Konzentrationen vor denen des NETose-Eintritts bei ca. 150 Minuten und unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle. Der NETose-Eintritt erfolgte in allen drei Kanälen nach der MPO-Sezernierung, im Median zwischen ca. 170 und 190 Minuten und wies auch keine Signifikanz auf, was einen

fehlenden Einfluss von Moxifloxacin auf NETose und MPO-Freisetzung nahelegt. Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangten auch Potjo et al., welche in ihrer Studie die Effekte von Moxifloxacin auf menschliche Neutrophilenfunktionen prüften [36]. Hierzu setzten sie Moxifloxacin in therapeutischen und darüberliegenden Konzentrationen im Bereich von 1000 bis 20000 ng/mL ein, was auch den hier verwendeten Dosierungen von 2000 bzw. 20000 ng/mL entspricht [36, 66]. Potjo et al. untersuchten dabei neben anderen Granulozytenparametern die Generierung von antimikrobiellen reaktiven Sauerstoffspezies, die Freisetzung der primären Granulozytenprotease und -elastase sowie des Enzyms Myeloperoxidase. Dabei erfolgte die Aktivierung der Zellen ebenso wie in dieser Studie durch den Lockstoff fMLP (10 nM). Abgesehen von einem signifikanten Anstieg der Elastase-Freisetzung wurde keiner der anderen betrachteten Granulozytenparameter durch das Fluorchinolon signifikant verändert [36], was genauso wie die hier vorliegenden Ergebnisse zu dem Resultat führt, dass die Neutrophilenfunktionen im Wesentlichen nicht durch Moxifloxacin beeinflusst werden.

Auch die Untersuchung der vierten ausgewählten Substanz, des Makrolidantibiotikums Clarithromycin, ergab keine signifikante zeitliche Verschiebung des NETose-Eintritts bzw. des Beginns der MPO-Sezernierung im Vergleich zur Kontrolle. Während jedoch bei einer Konzentration von 10000 ng/mL der mediane Zeitpunkt zwischen ca. 260 und 270 Minuten nach Aufnahmebeginn lag und sich damit in etwa im gleichen Bereich wie in der Kontrolle befand, trat die NETose im Kanal mit der Dosierung von 1000 ng/mL erst bei ca. 310 Minuten ein. Der gleiche Trend setzte sich in allen drei Kanälen für die MPO-Freisetzung fort mit dem Unterschied, dass diese im Median immer zwischen ca. 30 und 60 Minuten vor dem Beginn der NETose erfolgte. Zu gegensätzlichen Erkenntnissen gelangten Konstantinidis et al., die die immunmodulatorische Rolle von Clarithromycin mit *Acinetobacter Baumannii* durch Beeinflussung der NET-Formierung erforschten [12]. Sie konnten in ihrer Studie zeigen, dass Clarithromycin die NET-Bildung in vitro induzieren kann. Hierbei greift Clarithromycin in Autophagozytoseprozesse ein, um NET-Strukturen auszubilden, welche das antimikrobielle Peptid LL-37 auf ihrer Oberfläche tragen. Zwar kam bei Konstantinidis et al. mit Clarithromycin dasselbe Antibiotikum zum Einsatz wie in dieser Studie, aber zu den Blutproben gesunder Probanden wurden Bakterien des Stammes *Acinetobacter Baumannii* hinzugefügt. So konnte im Rahmen ihrer Versuche eine LL-37 vermittelte Hemmung des Bakterienwachstums und der Biofilmbildung nachgewiesen werden [12]. Diese LL-37 abhängige antimikrobielle Funktion hängt stark von der Integrität und Stabilität des

NET-Gerüsts ab, wobei das Makrolid Clarithromycin die NET-Ausbildung begünstigte und die entstandenen NETs anschließend Pathogene wie *Acinetobacter Baumannii* beeinflussten, welche normalerweise nicht fähig sind, den NETose-Mechanismus in neutrophilen Granulozyten auszulösen [12, 67]. Auch wenn dieser Bakterienstamm nicht in der Lage ist, den NET-Bildungsprozess selbst zu fördern und Konstantinidis et al. den beobachteten Effekt deshalb auf das Makrolidantibiotikum zurückführten, stellt die Zugabe eines pathogenen Erregers zu den aus Vollblutproben gewonnenen neutrophilen Granulozyten doch einen wesentlichen Unterschied im Vergleich zu dem hier vorliegenden Experimentablauf dar. Auch die differierende Methodik der NET-Isolierung sowie die unterschiedliche Vorgehensweise bei der Untersuchung der NET-Formation (Fluoreszenzmikroskopie vs. Western-Blot) [12] könnten einen Erklärungsansatz für die verschiedenen Ergebnisse liefern.

Es finden sich in der Literatur jedoch auch Studien, die die ursprüngliche Forschungshypothese dieser Arbeit bestätigen und eine Verringerung der Freisetzung neutrophiler extrazellulärer Fallen nach Zugabe des Makrolids Azithromycin nahelegen [68]. Im Bereich der Methodik wurden die neutrophilen Granulozyten bei der von Bystrzycka et al. publizierten Studie wie in diesem Versuchsablauf aus Vollblutproben gesunder Donoren durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und mit mehreren variierenden Antibiotikumkanzentrationen inkubiert. In einem weiteren Schritt initiierten sie über Zugabe von PMA die NET-Bildung und bestimmten die Menge der freigesetzten DNA quantitativ mithilfe eines Fluorometers, während in dieser Arbeit die Zellen nach Clarithromycinzusatz über fMLP (10 nM) stimuliert wurden. Die Sichtbarmachung der NETs erfolgte wie in diesem Experiment mit einem Immunfluoreszenzmikroskop [68]. Hierbei fanden Bystrzycka et al. heraus, dass die Vorbehandlung mit Azithromycin die Freisetzung von NETs signifikant herabsetzte [68], während Konstantinidis et al. eine Induzierung der NETose durch Makrolidantibiotika deklarierten [12] und diese Studie keine signifikante Beeinflussung der NET-Bildung und des Zeitpunktes der MPO-Freisetzung ergab. Als Erklärungsansatz dieser differierenden Ergebnisse könnte die Verwendung unterschiedlicher Lockstoffe (fMLP vs. PMA), der Einsatz von Bakterien (kein Bakterienstamm vs. *Acinetobacter Baumannii*) oder auch die beiden verwendeten Makrolide (Clarithromycin vs. Azithromycin) fungieren.

Mit dem neben den vier Antibiotika als fünfter Substanz getesteten Glukokortikoid Prednisolon konnte bei beiden eingesetzten Konzentrationen im Median eine Ver-

spätung des NETose-Eintritts um ca. 40 Minuten im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Der gleiche Trend konnte für den medianen Zeitpunkt der MPO-Freisetzung bei der hohen Prednisolon-Dosierung festgestellt werden, während dieser Wert für die niedrige Dosierung im Vergleich zur Kontrolle nahezu unverändert blieb. Insgesamt betrachtet erwiesen sich die detektierten Unterschiede nicht als signifikant, weshalb eine fehlende Direktwirkung von Prednisolon auf die Zeitpunkte des NETose-Eintritts und der MPO-Sezernierung deklariert wurde. Konträr finden sich in der Literatur einige Studien, die eine Reduzierung neutrophiler extrazellulärer Fallen nach Inhalation von Kortikosteroiden bei Patienten mit chronisch inflammatorischen Lungenerkrankungen nahelegen. So entwickelten Gál et al. eine auf Durchflusszytometrie beruhende Methode, um in vivo zirkulierende NETs im Plasma zu quantifizieren und die NET-Plasmaspiegel bei Patienten mit Lungenerkrankungen wie Asthma und COPD zu messen [69]. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Medikamentenapplikation fiel auf, dass Patienten, die täglich inhalativ Kortikosteroide verabreicht bekamen, signifikant niedrigere NET-Plasmaspiegel aufwiesen [69]. Die differierenden Studienergebnisse könnte man dadurch erklären, dass die im Rahmen dieser Arbeit absolvierten Experimente rein in vitro mit den Blutproben gesunder Probanden durchgeführt wurden und das zugegebene Prednisolonpräparat als Infusionslösung eingesetzt wird, während Gál et al. mit an chronischen Lungenerkrankungen leidenden Patienten in vivo ein inhalatives Kortikosteroid verabreichten. Zudem wurde der Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit auf die durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmte, zeitliche Entwicklung des NETose-Eintritts gelegt, wohingegen Gál et al. mithilfe eines durchflusszytometrischen Verfahrens vor allem auf die quantitative Bildung von NET-Strukturen Wert legten [69]. Eine weitere Studie, die eine Herabsetzung neutrophiler extrazellulärer Fallen durch Glukokortikosteroide nachwies, publizierten Vargas et al., die an schwerem Asthma erkrankten Pferden inhalativ Dexamethason applizierten und anhand aus deren Atemwegen gewonnenen Neutrophilen eine signifikante Reduktion der NET-Ausbildung im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellten [70]. Die Abweichungen dieser Ergebnisse von denen dieser Versuchsreihe müssen jedoch kritisch hinterfragt werden und könnten darauf basieren, dass Vargas et al. ihre Studie nicht an menschlichen Individuen durchführten und statt der Prednisolonlösung inhalatives Dexamethason verabreichten [70]. Bestätigt wird die nur bedingt mögliche Vergleichbarkeit der von Vargas et al. beschriebenen NET-Reduzierung durch Glukokortikosteroide auch durch die Tatsache, dass nur die aus den Atemwegen der Pferde gewonnenen Neutrophilen einen

Rückgang der NET-Ausbildung erfahren, diese Reduktion jedoch nicht für die ebenfalls untersuchten, aber aus dem Blut der Pferde extrahierten neutrophilen Granulozyten zutraf [70]. So ergab sich bei den nach Dexamethason-Inhalation aus Pferdevollblut gewonnenen Neutrophilen sogar eine ähnliche Tendenz wie bei den hier erzielten Resultaten, die auf einen fehlenden Einfluss hindeuteten [70]. Die oben aufgeführten Argumente verdeutlichen noch einmal, dass bei Prednisolon ähnlich wie bei den ebenso untersuchten Antibiotika Meropenem, Cefuroxim, Moxifloxacin und Clarithromycin keine eindeutige abschließende These aufgestellt werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse sowie weitere Beispiele aus der Literatur lassen aber eine fehlende Direktwirkung der fünf eingesetzten Substanzen auf den Zeitpunkt des NETose-Eintritts und der MPO-Freisetzung vermuten.

4.3 Beeinflussung von ROS-Produktion und ROS-Intensität durch die untersuchten Substanzen

Bei dem in der ersten Versuchsreihe getesteten β -Lactam Meropenem lagen die Mediane für die Kontrolle und die Konzentrationen von 500, 25000 und 100000 ng/mL im Bereich von ca. 105-130 Minuten nach Aufnahmebeginn. Lediglich bei der Dosierung von 5000 ng/mL war die mediane maximale ROS-Produktion mit einem Wert von ca. 90 Minuten im Vergleich zur Kontrolle (ca. 130 Minuten) etwas tiefer angesiedelt, unterschied sich aber ebenfalls nicht statistisch signifikant von der Kontrolle und den restlichen eingesetzten Meropenem-Konzentrationen. Die zur Erhöhung der Aussagekraft zusätzlich erfolgte Überprüfung der ROS-Intensität untermauerte ebenfalls das Resultat einer fehlenden Direktwirkung und wies für alle Dosierungen im Einklang mit den Ergebnissen der Zeitpunkte der maximalen ROS-Produktion die höchsten Mittelwerte der medianen Intensität für einen Zeitraum zwischen ca. 100 und 120 Minuten auf. Zu ähnlich gelagerten Erkenntnissen gelangten Matera et al., welche ebenfalls in vitro die Effekte des Carbapenems Meropenem auf die Funktionsweise von neutrophilen Granulozyten gesunder Probanden untersuchten [71]. Nur die höchste von ihnen verwendete Meropenem-Dosierung, die mit 200000 ng/mL deutlich über der in dieser Arbeit eingesetzten höchsten Konzentration von 100000 ng/mL liegt, reduzierte statistisch signifikant die phagozytotische Aktivität und die nicht durch einen Stimulus beeinflusste Sauerstoffradikalfreisetzung nach einer Stunde Inkubationszeit [71]. Demgegenüber erwies sich die durch Meropenem induzierte Reduktion der mit PMA-stimulierten Sauerstoffradikalbildung nach einer Stunde Inkubationszeit nicht als signifikant

[71]. Auch die bei Matera et al. in einem ähnlichen Konzentrationsbereich liegenden Dosierungen von 5000 bis 100000 ng/mL veränderten weder die Menge an freigesetzten Sauerstoffradikalen noch die Lebensfähigkeit der neutrophilen Granulozyten und deuten wie die Ergebnisse dieser Studie ebenfalls darauf hin, dass therapeutisch relevante Meropenem-Konzentrationen die ROS-Produktion nicht grundlegend verändern [71]. Es finden sich in der Literatur jedoch auch Hinweise, dass Meropenem nach Verabreichung im Zusammenhang mit grampositiven und gramnegativen Bakterienstämmen zu einer Verbesserung der Leukozytenabwehrfunktion führt [24]. So betrachteten Novelli et al. in vitro die Wirkung von Meropenem in einem Konzentrationsbereich zwischen 15 und 1250 ng/mL auf neutrophile Granulozyten, zu denen in jedem Versuch unterschiedliche grampositive und gramnegative Bakterienstämme gegeben wurden. Hierbei bewirkte die Vorinkubation mit dem Carbapenem eine vergrößerte Phagozytoseaktivität und damit einhergehend eine vermehrte Sauerstoffradikalbildung der Neutrophilen [24]. Eine mögliche Erklärung für den bei Novelli et al. detektierten optimierten Phagozytoseprozess könnte darauf basieren, dass sich im Gegensatz zu dieser Versuchsreihe in der beschriebenen Studie eine Modifizierung der bakteriellen Zelloberfläche ereignet haben könnte, welche die Mikroorganismen empfänglicher für die Phagozytose und die Abtötung durch Sauerstoffradikale macht [24, 72]. So kann die Wechselwirkung zwischen Antibiotikum und Bakterium indirekt die Funktionsweise neutrophiler Granulozyten beeinflussen.

Auch das zur weiteren Verifizierung der Ergebnisse als zweite Substanz getestete Cefuroxim bestätigte den schon bei Meropenem festgestellten fehlenden Einfluss auf die medianen Zeitpunkte der maximalen ROS-Produktion. So unterschieden sich die $T_{\max}$ ROS-Werte im Median bei Cefuroxim-Konzentrationen von 2000 und 20000 ng/mL lediglich um wenige Minuten vom Wert der Kontrolle, der bei ca. 127 Minuten lag. Zu anderen Ergebnissen kamen Behra-Miellet et al., welche im Gegensatz zu dem hier vorliegenden Versuchsablauf in vitro den Einfluss des β -Lactams Amoxicillin in Kombination mit dem β -Lactamase-Inhibitor Clavulansäure auf den oxidativen Metabolismus polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten untersuchten [73]. Hierbei erhielten sie bei gleichzeitiger Testung beider Substanzen das Resultat, dass sich die Sauerstoffradikalproduktion unter diesen Versuchsbedingungen signifikant vergrößerte [73]. Zu Erkenntnissen, welche eher den Feststellungen dieser Studie entsprechen, gelangten Carreer et al., die mehrere β -Lactame, darunter auch Cefuroxim, im

Hinblick auf ihre Beeinflussung des oxidativen Metabolismus von Neutrophilen im Zusammenhang mit der Einwirkung der generierten Sauerstoffradikale auf das Wirtsgewebe genauer betrachteten [74]. Sie fanden keine Hinweise dafür, dass eines der eingesetzten β -Lactam-Antibiotika einen Effekt auf die Superoxid- oder H_2O_2 -Generierung der neutrophilen Granulozyten aufwies und konnten einen möglichen therapeutischen Rückschluss ziehen, da sie eine Schutzfunktion auf das Wirtsgewebe vor HOCl-induziertem oxidativen Schaden durch β -Lactame aufzeigten [74]. Diese Resultate stützen zum einen die Annahme dieser Dissertation, dass β -Lactam-Antibiotika keine Direktwirkung auf die Sauerstoffradikalproduktion Neutrophiler ausüben und lassen darüber hinaus sogar einen schonenden Einfluss auf körpereigene Strukturen durch Herabregulierung der HOCl-Generierung nach β -Lactam-Applikation vermuten [74]. Ähnlich gelagerte Ergebnisse wie bei den β -Lactam-Antibiotika Meropenem und Cefuroxim lieferte auch die Untersuchung des Fluorchinolons Moxifloxacin im Hinblick auf die zeitliche Entwicklung der ROS-Produktion und die ROS-Intensität. So fanden sich die medianen Zeitpunkte der maximalen ROS-Produktion für die verwendeten Moxifloxacin-Konzentrationen zeitlich mit ca. 88 Minuten (2000 ng/mL) und ca. 95 Minuten (20000 ng/mL) nur knapp vor denen der Kontrolle mit ca. 102 Minuten. Auch die Mittelwerte der medianen ROS-Intensität mit einem Maximum im Bereich zwischen ca. 80 und 100 Minuten für alle Dosierungen bestätigen die im Rahmen der Analyse der ROS-Produktion ermittelten Daten und lassen auf eine fehlende Direktwirkung von Moxifloxacin auf diesen Granulozytenparameter schließen. Die gleiche Erkenntnis spiegelt sich auch in einer Studie von Fischer und Adam wider, welche die Effekte von Moxifloxacin auf die Phagozytose und Sauerstoffradikalgenerierung neutrophiler Granulozyten erforschten [66]. Im Gegensatz zu dieser Experimentreihe kam hier ein Durchflusszytometer zum Einsatz und es befanden sich pathogene Erreger in Form von *Candida albicans* und *Staphylococcus aureus* in ihrem Versuchsansatz. Diese wurden zu den Blutproben gesunder Probanden gegeben genauso wie ausgewählte Moxifloxacin-Konzentrationen (1000, 10000 und 100000 ng/mL) nachträglich hinzugefügt wurden [66]. Somit decken auch die eingesetzten Dosierungen dieser Studie das Spektrum der hier verwendeten Konzentrationen ab, der Versuchsaufbau unterscheidet sich von dieser Arbeit durch die potentiellen Störfaktoren (Pilz/Bakterium). Auch ihre Forschungsergebnisse zeichnen ein ähnliches Bild wie diese Studie, bei Zugabe des antibiotikaresistenten Pathogens *Candida albicans* zeigte sich bei keiner der eingesetzten Moxifloxacin-Konzentrationen ein signifikanter Einfluss auf die untersuchten

Neutrophilenfunktionen, auch nicht bei einer Dosierung von 100000 ng/mL [66], was die These des fehlenden Einflusses untermauert. Lediglich bei Zusatz des moxifloxacin-sensiblen *Staphylococcus aureus* war ein mildes, dosisabhängiges Absinken in der Phagozytosefähigkeit nachweisbar, wohingegen die ROS-Produktion unter diesen Bedingungen unbeeinflusst blieb [66, 75]. Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, dass die von Fischer und Adam detektierte abgesunkene Phagozytoserate der spezifischen Interaktion zwischen Antibiotikum und Bakterien zuzuschreiben ist und nicht dem direkten Einfluss von Moxifloxacin auf neutrophile Granulozyten.

Ähnliche Schlussfolgerungen wie bei Moxifloxacin konnten auch bei der Analyse der medianen Zeitpunkte der maximalen ROS-Produktion beim vierten getesteten Antibiotikum, dem Makrolid Clarithromycin, gezogen werden. Hierbei befanden sich bei beiden eingesetzten Clarithromycin-Konzentrationen die Mediane der $T_{\max}$ ROS-Werte zwischen ca. 150 und 160 Minuten wie es auch bei der Kontrolle der Fall war, was wiederum zur Widerlegung der Forschungshypothese eines inhibierenden Einflusses des Makrolids auf die Sauerstoffradikalproduktion führte. Diese Annahme wurde durch die Auswertung der medianen ROS-Intensitäten gestützt, bei welchen im Bereich zwischen 120 und 180 Minuten ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg der Mittelwerte für die Clarithromycin-Dosierungen von 1000 und 10000 ng/mL festzustellen war.

Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen erzielten Levert et al. in ihrer Studie über die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses von Dirithromycin auf die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ambivalente Ergebnisse [76]. Nach Extraktion von neutrophilen Granulozyten aus Vollblutproben gesunder Donoren wurden die gewonnenen Neutrophilen entweder wie in dieser Versuchsreihe mit fMLP als Stimulus oder durch Zugabe von *Staphylococcus aureus* in vitro aktiviert und zur Generierung von Sauerstoffradikalen angeregt. Anschließend wurden die Zellen über unterschiedliche Zeiträume hinweg mit differierenden Konzentrationen an Dirithromycin inkubiert, um Auswirkungen auf die ROS-Produktion zu detektieren [76]. Hierbei wurde nach einer Stunde Inkubationszeit für niedrige Dosierungen zwischen 100 und 1000 ng/mL ein prooxidativer Effekt erreicht, wohingegen die höchsten eingesetzten Dirithromycin-Konzentrationen im Bereich von 100000 ng/mL einen antioxidativen Effekt förderten [76]. Wurde die Inkubationszeit verlängert, konnte für alle getesteten Dosierungen nur noch ein antioxidativer Effekt beobachtet werden, auch für die niedrigen Antibiotika-

konzentrationen [76]. Die unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zu der hier vorliegenden Studie lassen sich neben der Tatsache, dass unterschiedliche Makrolidantibiotika eingesetzt wurden, auch noch auf die verschiedenen Konzentrationsbereiche zurückführen, die mit <1000 ng/mL und >100000 ng/mL außerhalb des geprüften, genau dazwischen befindlichen Intervalls, liegen. Zudem bewegten sich die im Rahmen dieser Studie erhobenen Werte mit einer halben Stunde Inkubationszeit deutlich unter den Werten von Levert et al. Auch der Aspekt, dass die Experimente zu dieser Arbeit unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurden, während bei Levert et al. die bakterielle Suspension mit *Staphylococcus aureus* als in vitro-Modell zur Nachstellung einer bakteriellen Infektion diente [76], liefert einen Erklärungsansatz für die variierenden Resultate.

In der Literatur finden sich auch Publikationen, welche das Studienergebnis der fehlenden Abänderung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch Clarithromycin stützen. Wenisch et al. erforschten den Effekt von Clarithromycin auf die Neutrophilenfunktion, indem sie gesunden Probanden das Makrolid oral verabreichten und ihnen nach einem definierten Zeitintervall von drei Stunden Blut abnahmen, um die Freisetzung von Sauerstoffradikalen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Antibiotikaapplikation zu untersuchen [77]. Die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies wurde durch die Oxygenierung von Dihydrorhodamin zu Rhodamin und quantitativ mithilfe der Durchflusssyztometrie bestimmt. Clarithromycin mündete in der Studie von Wenisch et al. in einer leicht reduzierten Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten, die Sauerstoffradikalgenerierung wurde aber, wie es die Versuchsergebnisse dieser Arbeit ebenfalls nahelegen, nicht signifikant verändert [77].

Zu diesem Resultat führte auch die Analyse des getesteten Glukokortikoids Prednisolon. Die medianen Zeitpunkte der maximalen ROS-Produktion lagen sowohl für die eingesetzten Prednisolon-Dosierungen von 50 und 500 ng/mL als auch für die Kontrolle in einem eng umgrenzten Zeitintervall zwischen ca. 150 und 170 Minuten sehr nahe beieinander und unterschieden sich so nicht signifikant voneinander. Bei der Auswertung der medianen ROS-Intensität hingegen bildeten die Mittelwerte für die niedrige und die hohe verwendete Prednisolon-Konzentration einmal im Verlauf der ersten Stunde nach Aufnahmebeginn und dann erneut im Bereich zwischen 120 und 180 Minuten ein Maximum und befanden sich deutlich über den Mittelwerten für die mediane ROS-Intensität des Kontrollkanals. Jedoch erwiesen sich diese Tendenzen nicht als statistisch signifikant und stützten somit ebenso wie die medianen Zeitpunkte

der maximalen ROS-Produktion das Ergebnis einer fehlenden Direktwirkung von Prednisolon auf diesen Granulozytenparameter, was zur Ablehnung der Forschungshypothese führte.

Im Rahmen einer etwas anders gelagerten Studie konnten Trottier et al. eine Induktion des Anstiegs aller Entwicklungsstufen von Granulozyten im Knochenmark durch Glukokortikoide nachweisen [78]. Hierbei wurde Mäusen eine Corticosteron-Tablette implantiert, die die natürlich vorkommenden Glukokortikoide im Serum erhöhte und eine Thymusatrophie verursachte [78, 79]. Dadurch wurden die Neutrophilenzahlen im Blut im Vergleich zur Kontrollgruppe in Bezug auf den Ausgangswert um das 4,8-fache erhöht. Außerdem konnte wie bei den im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Versuchen kaum ein Effekt auf die Fähigkeit der Sauerstoffradikalproduktion Neutrophiler festgestellt werden [78]. Eine Gegenüberstellung mit den Ergebnissen dieser Studie muss dennoch mit Vorsicht erfolgen, da hier die Direktwirkung eines synthetischen Glukokortikoids in vitro an neutrophilen Granulozyten menschlicher Individuen erforscht wurde, während Trottier et al. Tierversuche mit Mäusen in vivo durchführten und ihren Schwerpunkt vor allem auf die Induktion der Zellbildung und Granulozytenentwicklung im Knochenmark legten [78]. Anhand der aufgeführten komplexen Wechselwirkungen und zahlreichen physiologischen und pathologischen Einflussfaktoren, die in natura zusätzlich eine Variation der Neutrophilenfunktionen bewirken können, wird ersichtlich, dass eine endgültige Aussage bezüglich der Direktwirkung von Glukokortikoiden auf die Granulozytenfunktionsweise nur schwer getroffen werden kann. Nichtsdestotrotz liefern der von Trottier et al. detektierte, nur äußerst gering ausgeprägte Effekt natürlich vorkommender Glukokortikoide auf die Sauerstoffradikalgenerierung [78] sowie der in dieser Studie deklarierte fehlende Einfluss des Prednisolons auf die ROS-Produktion neutrophiler Granulozyten wichtige Anhaltspunkte in der Erforschung dieses diffizilen Zusammenspiels zwischen Glukokortikoiden und Immunzellen.

5 Zusammenfassung

Insgesamt betrachtet konnte festgestellt werden, dass sowohl die vier getesteten Antibiotika als auch das synthetische Glukokortikoid Prednisolon neutrophile Granulozyten in ihrer Funktion bezüglich Migration, NETose, ROS-Produktion, ROS-Intensität und Myeloperoxidase-Freisetzung nicht inhibieren, somit wurde durch diese Resultate

die Forschungshypothese widerlegt. Damit wurde die Erkenntnis eines fehlenden Einflusses aller untersuchten Substanzen auf die neutrophilen Granulozyten gewonnen unter den Bedingungen, dass alle Versuche in vitro mit dem Blut gesunder Probanden erfolgten und sämtliche Störfaktoren, welche die Granulozytenfunktionsweise ebenfalls beeinflussen hätten können, ausgeschlossen wurden. Zur erneuten Hinterfragung oder Verifizierung und Präzision der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe mit Meroopenem wurden im Anschluss weitere Experimente sowohl mit einem Antibiotikum derselben Klasse wie Meropenem, dem β -Lactam Cefuroxim, als auch mit anderen Antibiotikaklassen, dem Fluorchinolon Moxifloxacin und dem Makrolid Clarithromycin, durchgeführt. Gerade auch im Hinblick auf Fluorchinolone und Makrolide fanden sich in der Literatur Hinweise auf eine Inhibierung der Granulozytenmigration [80] bzw. der Herabsetzung der Überlebensrate Neutrophiler [81, 82], was dazu führte, auch die Aussagen bezüglich dieser beiden Antibiotikaklassen kritisch zu hinterfragen. Bei jedem der verwendeten Antibiotika wurde für alle betrachteten Parameter geschlossen festgestellt, dass keine signifikante Direktwirkung auf die Neutrophilen stattfand. Auch die Testung der fünften Substanz, des Glukokortikoids Prednisolon, ließ denselben Schluss zu. Hierzu wies die Literatur auf teilweise widersprüchliche Ergebnisse hin, die die komplexe Beeinflussung der Neutrophilen durch Glukokortikoide bereits beginnend bei der Transmigration durch die Gefäßwand verdeutlichen. So konnten in der Vergangenheit sowohl supprimierende Effekte auf die Immunzellen [83] als auch eine glukokortikoidinduzierte Vergrößerung der Lebensspanne neutrophiler Granulozyten detektiert werden [84].

Die in dieser Arbeit deklarierte Abwesenheit eines signifikanten Effektes für die untersuchten Antibiotika sowie für Prednisolon liefern somit einen weiteren relevanten Anhaltspunkt in der Erforschung der vielschichtigen Interaktionen zwischen den untersuchten Medikamenten und den multidimensionalen Funktionsweisen neutrophiler Granulozyten. Dadurch wird noch einmal verdeutlicht, in wie viele physiologische und pathologische Prozesse der angeborenen Immunität die Neutrophilen involviert sind, auch wenn sie vielleicht eher als „Legionäre“ oder „Hilfstruppen“ und nicht als „Caesaren des Immunsystems“ bezeichnet werden sollten, da auch weitere zelluläre und humorale Komponenten eine zentrale Rolle in der Immunabwehr des Menschen spielen. Trotzdem können sicher auch in Zukunft noch viele neue Forschungserkenntnisse zu den komplexen Funktionsweisen neutrophiler Granulozyten und ihrer Rolle innerhalb des menschlichen Immunsystems erwartet werden.

6 Anhang zu Material und Methoden

6.1 Reagenzien

	Reagenzien	Name des Herstellers
01	Meropenem Kabi 1 g Pulver zur Herstellung einer Injektions-/Infusionslösung (Parenterale Anwendung)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
02	Cefuroxim Hikma 1500 mg Pulver zur Herstellung einer Injektions-/Infusionslösung (Parenterale Anwendung)	Hikma Pharma GmbH (Martinsried, Deutschland)
03	Moxifloxacin Kabi Infusionslösung 400 mg/250 mL	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
04	Clarithromycin Hikma 500 mg Pulver zur Herstellung eines Infusionslösungskonzentrats (Parenterale Anwendung)	Hikma Pharma GmbH (Martinsried, Deutschland)
05	Prednisolut® 100 mg Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung, Prednisolon-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz	mibe GmbH (Brehna, Deutschland)
06	Minimum Essential Medium (MEM)	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
07	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	VWR International GmbH (Radnor, Pennsylvania, USA)
08	Aqua dest.	hausintern
09	RPMI 1640 <i>without l-glutamine, phenolred, with sodium bicarbonate</i>	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
10	Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
11	PureCol Type I Bovine Collagen Solution (3 mg/mL) (Kollagen)	Advanced BioMatrix (Carlsbad, USA)
12	N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

13	Leuko Spin Medium, pluriSpin	pluriSelect Life Science – Worldwide (Leipzig, Deutschland)
14	Lympho Spin Medium (PBMC Spin Medium), pluriSpin	pluriSelect Life Science – Worldwide (Leipzig, Deutschland)
15	DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), 5 mg	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
16	Dihydrorhodamin-123 (DHR)	Molecular Probes, Inc. (Eugene, USA)
17	Dihydrorhodamin-123 Invitrogen D632 1 mM in DMF (10 mg/26,2 mL DMF)	Life technologies (Eugene, USA)
18	APC anti-human CD66b Clone: G10F5 200 µg/mL	BioLegend (San Diego, Kalifornien, USA)
19	NaCl	Merck (Darmstadt, Deutschland)

6.2 Laborbedarf

	Verbrauchsmaterialien	Name des Herstellers
01	Safety-Multifly-Kanüle 0,9 x 19 mm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
02	S-Monovette® 7,5 mL LH	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
03	Monovette Lithium-Heparin 5,5 mL	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
04	Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen 50 mL PP	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
05	Reaktionsgefäße PP (Eppendorf Cups)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Braunschweig, Deutschland)
06	Zählkammer Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
07	Deckgläser Thermo Scientific	Menzel GmbH & Co. KG (Braunschweig, Deutschland)
08	µ-slide Chemotaxis ibiTreat	ibidi GmbH (Gräfelfing, Deutschland)
09	Lids for µ-slide Chemotaxis	ibidi GmbH (Gräfelfing, Deutschland)

10	Druckluftversorgung 5 bar	hausintern
11	Kohlendioxidversorgung 1 bar	hausintern

6.3 Geräte

	Geräte	Name des Herstellers
01	Heraeus™, Megafuge 1.0 R Zentrifuge	ThermoFisher Scientific (Langenselbold, Deutschland)
02	Heraeus™, Biofuge stratos	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
03	Inkubator	hausintern
04	Leica Mikroskop DMI8	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, Deutschland)
05	Leica sCMOS Mikroskop-Kamera DFC9000, Leica DFC9000 GT Kamera	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, Deutschland)
06	Lichtquelle CoolLED pE-4000	CoolLED Ltd (Andover, Großbritannien)
07	Filterwürfel	Chroma Technology Corp. (Vermont, USA)
08	ibidi Gas Mixer	ibidi GmbH (Gräfelfing, Deutschland)
09	ibidi Gas Incubation System for CO ₂	ibidi GmbH (Gräfelfing, Deutschland)
10	ibidi Temperature Controller	ibidi GmbH (Gräfelfing, Deutschland)
11	ibidi Heating System, Universal Fit, for 1 Chamber	ibidi GmbH (Gräfelfing, Deutschland)

6.4 Software

	Software	Name des Entwicklers
01	Leica Application Suite 3.4.2.18368 Softwareplattform Leica Application Suite X	LAS X 3,0,4,16529, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, Deutschland)

02	Cellquest Pro	BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
03	FlowJo Version vX.0.7	FlowJo LLC (Ashland, Oregon, USA)
04	Imaris 9.0.2	Bitplane (Zürich, Schweiz)
05	Phoenix 64 Version 8.0.0	Certara (New York, USA)
06	Microsoft Excel 2013	Microsoft (Redmond, Washington, USA)
07	Microsoft Word 2013	Microsoft (Redmond, Washington, USA)
08	Citavi 6.4 für Windows 8.1 und 10	Swiss Academic Software (Wädenswil, Zürich, Schweiz)
09	SPSS	IBM Corp. (New York, USA)

7 Abbildungen und Tabellen

7.1 Abbildungen

Abbildung 1: Gängige Aufteilung der vielfältigen Komponenten des menschlichen Immunsystems. Man kann einen angeborenen Teil von einem erworbenen, adaptiven Teil unterscheiden und diese beiden Bestandteile noch einmal in zelluläre und in humorale, d.h. im Blutplasma gelöste Proteine, Anteile aufgliedern. Bevor diese Instanzen des Immunsystems zum Tragen kommen, entfalten vorher schon physikalische und chemische Barrieren des menschlichen Körpers ihre Wirkung, um im Idealfall bereits das Eindringen von Pathogenen zu verhindern. 8

Abbildung 2: Übersicht über alle im Rahmen der Studie absolvierten Versuche in Bezug auf die getesteten Medikamente, die jeweilige Versuchsanzahl, die unterschiedlichen gewählten Konzentrationen sowie die zentralen untersuchten Parameter..... 22

Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines ibidi-3D- μ -slides als Draufsicht (obere Skizze) und als Querschnitt (untere Skizze) mit einer linken, mittleren und rechten Komponente, welche wiederum jeweils aus den drei Bestandteilen Reservoir-Kanal-Reservoir aufgebaut ist. Kanal und umgebende Reservoir

einer Komponente sind jeweils offen miteinander verbunden, während die linke, mittlere und rechte Komponente voneinander abgetrennt sind. Die schwarz umrundeten Punkte (obere Skizze) stellen die Öffnungen des Kanals bzw. des Reservoirs dar, in welche die speziellen Pipettenspitzen exakt hineinpassen.....	25
Abbildung 4: Phasenauftrennung im Röhrchen nach Zentrifugation.....	27
Abbildung 5: Berechnung der benötigten Menge an RPMI/10%FKS (x µL) für eine konstante Zellkonzentration im Kanal	28
Abbildung 6: Überblick über die relevanten Schritte in der Analyse der auszuwertenden Granulozytenparameter und die hierfür herangezogenen Computerprogramme	34
Abbildung 7: Schematischer Kurvenverlauf für die Freisetzung von DNA und Myeloperoxidase	35
Abbildung 8: Schematischer Kurvenverlauf für die Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS).....	36
Abbildung 9: Länge der Migrationsstrecke der Granulozyten bei Meropenem	38
Abbildung 10: Migrationsgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten bei Zugabe differierender Meropenem-Konzentrationen	39
Abbildung 11: Zeitpunkte, an denen die Hälfte der Granulozyten die NETose durchliefen	41
Abbildung 12: Zeitpunkte, an denen die Granulozyten im Median maximale ROS-Produktion aufwiesen	42
Abbildung 13: Mediane Intensität der ROS-Produktion bei Einsatz unterschiedlicher Meropenem-Konzentrationen.....	43

7.2 Tabellen

Tabelle 1: Vorbereitung der Reservoirbefüllung mit Zellnährmedium, Lockstoff (fMLP) und Antibiotikumkonzentration entsprechend dem jeweiligen Kanal	30
Tabelle 2: Durchgeführte Verdünnungsreihen für die Testung des Cephalosporins Cefuroxim	31
Tabelle 3: Durchgeführte Verdünnungsreihen für die Testung des Fluorchinolons Moxifloxacin.....	32
Tabelle 4: Durchgeführte Verdünnungsreihen für die Testung des Makrolids Clarithromycin	32

Tabelle 5: Durchgeführte Verdünnungsreihen für die Testung des Glukokortikoids Prednisolon.....	33
--	----

8 Literaturverzeichnis

1. Geissel W, Nößler D. Dexamethason: Durchbruch bei schwerer COVID-19. springermedizin.de. 17.6.2020. <https://www.springermedizin.de/covid-19/internistische-arzneimitteltherapie/dexamethason--durchbruch-bei-schwerer-covid-19/18091270>. Accessed 20 Mar 2021.
2. Messerer D. Veränderungen des Membranpotentials von neutrophilen Granulozyten durch das Komplementaktivierungsprodukt C5a; 2018. https://oparu.uni-ulm.de/xmlui/bitstream/handle/123456789/12287/Promotion_DM.pdf?sequence=5&isAllowed=y. Accessed 20 Mar 2021.
3. Elvington M, Liszewski MK, Atkinson JP. Evolution of the complement system: from defense of the single cell to guardian of the intravascular space. Immunol Rev. 2016;274:9–15. doi:10.1111/imr.12474. https://www.researchgate.net/profile/Kathy_Liszewski/publication/309769241_Evolution_of_the_complement_system_from_defense_of_the_single_cell_to_guardian_of_the_intravascular_space/links/5ad0e10aaca272fdaf7660e2/Evolution-of-the-complement-system-from-defense-of-the-single-cell-to-guardian-of-the-intravascular-space.pdf?origin=publication_detail. Accessed 20 Mar 2021.
4. Birkmann S. Der Einfluss einer einmaligen, oralen Gabe von Dexamethason auf Leukozyten, die Plasmaspiegel inflammatorischer Zytokine und lösliche Zytokinrezeptoren; 2005. https://edoc.ub.uni-muenchen.de/3967/1/Birkmann_Steffen.pdf. Accessed 20 Mar 2021.
5. Beck VB. Einfluss der Isolierung und Lagerung der neutrophilen Granulozyten auf ihre Funktion: Universität Tübingen; 2015. <https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/handle/10900/59923>. Accessed 20 Mar 2021.
6. Paech C. Cholinerge Immunmodulation humaner neutrophiler Granulozyten; 2015. https://epub.uni-regensburg.de/32969/2/Dissertation_gesamt_epub.pdf. Accessed 20 Mar 2021.

7. Hellberg L. Interaktionen zwischen vitalen und apoptotischen neutrophilen Granulozyten und Modulation der Aktivität neutrophiler Granulozyten durch Methylprednisolon; 2012. <https://www.zhb.uni-luebeck.de/epubs/ediss1154.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.
8. Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie. 9th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
9. Stoof J. NETs (Neutrophil Extracellular Traps) bei Systemischem Lupus Erythematoses; 2019. <https://opus4.kobv.de/opus4-fau/files/10421/DissertationJuli-aStoof.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.
10. Klink A. Bedeutung der Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten; 2009. <https://d-nb.info/994786190/34>. Accessed 20 Mar 2021.
11. Ravekes T. Bedeutung der Myeloperoxidase für die Herzinsuffizienz in der MLP defizienten Maus als Modell für eine dilatative Kardiomyopathie; 2014. <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2014/7028/pdf/Dissertation.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.
12. Konstantinidis T, Kambas K, Mitsios A, Panopoulou M, Tsironidou V, Dellaporta E, et al. Immunomodulatory Role of Clarithromycin in *Acinetobacter baumannii* Infection via Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:1040–8. doi:10.1128/AAC.02063-15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4750671/>. Accessed 20 Mar 2021.
13. 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;176:231–41. doi:10.1083/jcb.200606027. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2063942/>. Accessed 20 Mar 2021.
14. Pilsczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology*. 2010;185:7413–25. doi:10.4049/jimmunol.1000675. <https://www.jimmunol.org/content/185/12/7413.long>. Accessed 20 Mar 2021.
15. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013;122:2784–94. doi:10.1182/blood-2013-04-457671. <https://ashpublications.org/blood/article-lookup/doi/10.1182/blood-2013-04-457671>. Accessed 20 Mar 2021.
16. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*.

- 2009;16:1438–44. doi:10.1038/cdd.2009.96. <https://www.nature.com/articles/cdd200996>. Accessed 20 Mar 2021.
17. Hazeldine J, Harris P, Chapple IL, Grant M, Greenwood H, Livesey A, et al. Impaired neutrophil extracellular trap formation: a novel defect in the innate immune system of aged individuals. *Aging Cell*. 2014;13:690–8. doi:10.1111/ace.12222. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4326942/>. Accessed 20 Mar 2021.
 18. Schulte D, Broermann A, Nottebaum A, Kiefer F, Butz S, Vestweber D. Wie Leukozyten die Wand der Blutgefäße durchdringen. 2011. https://www.mpg.de/5194501/Molekulare_Biomedizin. Accessed 20 Mar 2021.
 19. Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2000;20:751–62. doi:10.1089/107999000050151012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11032394/>. Accessed 20 Mar 2021.
 20. Spachmann PJ. Retrospektive Untersuchung der lokalen Antibiotika-Resistenzsituation von stationär behandelten Prostatitiden, Epididymitiden und Pyelonephritiden: Keimnachweis- und Resistenzraten und deren klinische Konsequenz; 2015. <https://epub.uni-regensburg.de/33946/2/Doktorarbeit%20Endversion.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.
 21. Holstiege J. Die ambulante Antibiotikatherapie - Methoden der Anwendungsforschung und Strategien der Förderung rationaler Verordnungsmuster; 2017. <https://elib.suub.uni-bremen.de/edocs/00106202-1.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.
 22. Cavalier-Smith T. Membrane heredity and early chloroplast evolution. *trends in plant science*. 2000;5:174–82. <https://www.biologie-seite.de/Biologie/Endosymbiont>. Accessed 20 Mar 2021.
 23. Fujimoto M, Munakata M, Akaike N. Dual mechanisms of GABAA response inhibition by beta-lactam antibiotics in the pyramidal neurones of the rat cerebral cortex. *British journal of pharmacology*. 1995;116:3014–20. doi:10.1111/j.1476-5381.1995.tb15957.x. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8680737/>. Accessed 20 Mar 2021.
 24. Novelli A, Fallani S, Cassetta MI, Conti S, Mazzei T. Postantibiotic leukocyte enhancement of meropenem against gram-positive and gram-negative strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:3174–6. doi:10.1128/aac.44.11.3174-

- 3176.2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC101625/>. Accessed 20 Mar 2021.
25. Kalghatgi S, Spina CS, Costello JC, Liesa M, Morones-Ramirez JR, Slomovic S, et al. Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Mammalian cells. *Science translational medicine*. 2013;5:192ra85. doi:10.1126/scitranslmed.3006055. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23825301/>. Accessed 20 Mar 2021.
26. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet (London, England)*. 2002;360:219–23. doi:10.1016/S0140-6736(02)09459-X. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12133657/>. Accessed 20 Mar 2021.
27. Carré JE, Orban J-C, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, et al. Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:745–51. doi:10.1164/rccm.201003-0326OC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949402/>. Accessed 20 Mar 2021.
28. Arulkumaran N, Routledge M, Schlebusch S, Lipman J, Conway Morris A. Antimicrobial-associated harm in critical care: a narrative review. *Intensive Care Med*. 2020;46:225–35. doi:10.1007/s00134-020-05929-3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7046486/>. Accessed 20 Mar 2021.
29. Tune BM, Hsu CY. The renal mitochondrial toxicity of beta-lactam antibiotics: in vitro effects of cephaloglycin and imipenem. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1990;1:815–21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2133431/>. Accessed 20 Mar 2021.
30. Duewelhenke N, Krut O, Eysel P. Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:54–63. doi:10.1128/AAC.00729-05. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17088489/>. Accessed 20 Mar 2021.
31. Hundemer H. Cefuroxim und Cefotaxim induzierte Neutropenien bei Kindern. 2009. http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/10808/1/diss10_056.pdf. Accessed 20 Mar 2021.

32. Tulkens PM. Intracellular distribution and activity of antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1991;10:100–6. doi:10.1007/BF01964420. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1864271/>. Accessed 20 Mar 2021.
33. Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM, van Bambeke F. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:841–51. doi:10.1128/AAC.50.3.841-851.2006. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16495241/>. Accessed 20 Mar 2021.
34. Abed N, Saïd-Hassane F, Zouhiri F, Mougin J, Nicolas V, Desmaële D, et al. An efficient system for intracellular delivery of beta-lactam antibiotics to overcome bacterial resistance. *Sci Rep*. 2015;5:13500. doi:10.1038/srep13500. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26311631/>. Accessed 20 Mar 2021.
35. Bongers S, Hellebrekers P, Leenen LPH, Koenderman L, Hietbrink F. Intracellular Penetration and Effects of Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Inside Human Neutrophils: A Comprehensive Review. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6628357/>. Accessed 20 Mar 2021.
36. Potjo M, Cockeran R, Theron AJ, Feldman C, Anderson R. Effects of Moxifloxacin on Human Neutrophil and T-Lymphocyte Functions in Vitro. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010;3:3570–80. doi:10.3390/ph3123570. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4034066/>. Accessed 20 Mar 2021.
37. Gumpert N. Achillessehnenentzündung durch Antibiotika - Diese Maßnahmen sollten Sie ergreifen. *Dr-Gumpert.de*. 2.11.2018. https://www.dr-gumpert.de/html/achillessehnenentzuendung_durch_antibiotika.html. Accessed 20 Mar 2021.
38. Mende A. Mitochondrien: Massive DNA-Schäden durch Ciprofloxacin. *Pharmazeutische Zeitung online*. 2.10.2018. <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/massive-dna-schaeden-durch-ciprofloxacin/>. Accessed 20 Mar 2021.
39. Harms JM, Schlünzen F, Fucini P, Bartels H, Yonath A. Alterations at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dalfopristin and quinupristin. *BMC Biol*. 2004;2:4. doi:10.1186/1741-7007-2-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC400760/>. Accessed 20 Mar 2021.
40. Arampatzioglou A, Papazoglou D, Konstantinidis T, Chrysanthopoulou A, Mitsios A, Angelidou I, et al. Clarithromycin Enhances the Antibacterial Activity and

- Wound Healing Capacity in Type 2 Diabetes Mellitus by Increasing LL-37 Load on Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol.* 2018;9:2064. doi:10.3389/fimmu.2018.02064. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6139320/>. Accessed 20 Mar 2021.
41. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:9813–8. doi:10.1073/pnas.0909927107. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2906830/>. Accessed 20 Mar 2021.
 42. Hatz HJ, Kaiser H. Glucocorticoide: Immunologische Grundlagen, Pharmakologie und Therapierichtlinien. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; 1998.
 43. Brauer KG, Ditzel P, Wessinger B. Aufgaben der Glucocorticoide. 2012. <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2012/daz-44-2012/aufgaben-der-glucocorticoide>. Accessed 20 Mar 2021.
 44. Fenske D, Husmann M. Auf der Suche nach dissoziativen Steroiden. 2004. <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/inhalt-15-2004/titel-15-2004/>. Accessed 20 Mar 2021.
 45. Pottel T. Quantitative Evaluation der Dermisatrophie mit hochauflösendem Ultraschall, vergleichend zwischen Patienten unter Langzeitbehandlung mit Prednisolon oder Methylprednisolon; 2017. <https://opendata.uni-halle.de/bitstream/1981185920/8752/1/Tim%20Pottel%20-%2029.10.1988%20-%20Dissertation%20f%C3%BCr%20Hochschulschriftenstelle.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.
 46. van Tuyl JS, Jones AN, Johnson PN. Meropenem-Induced Neutropenia in a Neonate. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2016;21:353–7. doi:10.5863/1551-6776-21.4.353. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5040180/>. Accessed 20 Mar 2021.
 47. Scherfgen D. Ableitungsrechner • Mit Rechenweg!: Ableitungen online berechnen - mit Rechenweg und Graphen! 09.11.2021. <https://www.ableitungsrechner.net/>. Accessed 9 Nov 2021.
 48. Rimboeck J, Gruber M, Wittmann S. Is the In Vitro Observed NETosis the Favored Physiological Death of Neutrophils or Mainly Induced by an Isolation Bias? *Int J Mol Sci.* 2023;24. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/8/7368>. Accessed 15 Aug 2023.

49. Morán FJ, Puente LF, Pérez-Giraldo C, Hurtado C, Blanco MT, Gómez-García AC. Effects of cefpirome in comparison with cefuroxime against human polymorphonuclear leucocytes in vitro. *J Antimicrob Chemother.* 1994;33:57–62. doi:10.1093/jac/33.1.57. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8157574/>. Accessed 20 Mar 2021.
50. Lotz S, Starke A, Ziemann C, Morath S, Hartung T, Solbach W, Laskay T. Beta-lactam antibiotic-induced release of lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* leads to activation of neutrophil granulocytes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006;5:15. doi:10.1186/1476-0711-5-15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1550251/>. Accessed 20 Mar 2021.
51. Mandell Gerald L., Coleman Elizabeth. Uptake, transport, and delivery of antimicrobial agents by human polymorphonuclear neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1794–8. doi:10.1128/AAC.45.6.1794-1798.2001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90547/>. Accessed 20 Mar 2021.
52. Prokesch Richard C., Hand W. Lee. Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. 1982:373–80. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC181898/pdf/aac00015-0017.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.
53. Frank Michael O., Sullivan Gail W., Carper Holliday T., Mandell Gerald L. In vitro demonstration of transport and delivery of antibiotics by polymorphonuclear leukocytes. 1992:2584–8. <https://aac.asm.org/content/aac/36/12/2584.full.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.
54. Bosnar M, Kelnerić Z, Munić V, Eraković V, Parnham MJ. Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, and cethromycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2372–7. doi:10.1128/AAC.49.6.2372-2377.2005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1140530/>. Accessed 20 Mar 2021.
55. Pascual A, García I, Ballesta S, Perea EJ. Uptake and intracellular activity of moxifloxacin in human neutrophils and tissue-cultured epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:12–5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89012/>. Accessed 20 Mar 2021.
56. Adinolfi LE, Bonventre PF. Enhanced phagocytosis, killing, and serum sensitivity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* treated with sub-MICs of imipenem. 1988:1012–8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172335/pdf/aac00086-0076.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.

57. Lam Charles, Georgopoulos Apostolous, Laber Georg, Schütze Eberhard. Therapeutic relevance of penicillin-induced hypersensitivity of *Staphylococcus aureus* to killing by polymorphonuclear leukocytes;1984:149–54.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC284109/pdf/aac00380-0031.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.
58. Root Richard K., Isturiz Raul, Molavi Abdolghader, Metcalf Julia A., Malech Harry L. Interactions between antibiotics and human neutrophils in the killing of staphylococci. 1981:247–59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC371594/pdf/jcinvest00697-0258.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.
59. Fujita M, Kawabata H, Oka T, Hishizawa M, Kitano T, Kondo T, et al. A Rare Case of Adult Autoimmune Neutropenia Successfully Treated with Prednisolone. *Intern Med*. 2017;56:1415–9. doi:10.2169/internalmedicine.56.7619.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5498209/>. Accessed 20 Mar 2021.
60. Heimbürger M, Lärfsars G, Bratt J. Prednisolone inhibits cytokine-induced adhesive and cytotoxic interactions between endothelial cells and neutrophils in vitro. *Clin Exp Immunol*. 2000;119:441–8. doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01165.x.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1905574/>. Accessed 20 Mar 2021.
61. Hundhammer T, Gruber M, Wittmann S. Paralytic Impact of Centrifugation on Human Neutrophils. *Biomedicines*. 2022;10. https://www.researchgate.net/publication/365396710_Paralytic_Impact_of_Centrifugation_on_Human_Neutrophils. Accessed 15 Aug 2023.
62. Carman CV, Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol*. 2004;167:377–88. doi:10.1083/jcb.200404129.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2172560/>. Accessed 20 Mar 2021.
63. Bystrzycka W, Moskalik A, Sieczkowska S, Manda-Handzlik A, Demkow U, Ciepiela O. The effect of clindamycin and amoxicillin on neutrophil extracellular trap (NET) release. *Cent Eur J Immunol*. 2016;41:1–5.
doi:10.5114/ceji.2016.58811. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4829816/>. Accessed 20 Mar 2021.
64. Manda A, Pruchniak MP, Arażna M, Demkow UA. Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology. *Cent Eur J Immunol*. 2014;39:116–21.
doi:10.5114/ceji.2014.42136. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4439979/>. Accessed 20 Mar 2021.

65. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191:677–91. doi:10.1083/jcb.201006052. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3003309/>. Accessed 20 Mar 2021.
66. Fischer S, Adam D. Effects of moxifloxacin on neutrophil phagocytosis, burst production, and killing as determined by a whole-blood cytofluorometric method. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2668–9. doi:10.1128/AAC.45.9.2668-2669.2001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90714/>. Accessed 20 Mar 2021.
67. Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:590–615. doi:10.1128/CMR.00078-09. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2901655/>. Accessed 20 Mar 2021.
68. Bystrzycka W, Manda-Handzlik A, Sieczkowska S, Moskalik A, Demkow U, Ciepiela O. Azithromycin and Chloramphenicol Diminish Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Release. *Int J Mol Sci.* 2017;18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5751268/>. Accessed 20 Mar 2021.
69. Gál Z, Gézsi A, Pállinger É, Visnovitz T, Nagy A, Kiss A, et al. Plasma neutrophil extracellular trap level is modified by disease severity and inhaled corticosteroids in chronic inflammatory lung diseases. *Sci Rep.* 2020;10:4320. doi:10.1038/s41598-020-61253-2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7062787/>. Accessed 20 Mar 2021.
70. Vargas A, Boivin R, Cano P, Murcia Y, Bazin I, Lavoie J-P. Neutrophil extracellular traps are downregulated by glucocorticosteroids in lungs in an equine model of asthma. *Respir Res.* 2017;18:207. doi:10.1186/s12931-017-0689-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5727947/>. Accessed 20 Mar 2021.
71. Matera G, Berlinghieri MC, Focà A. Meropenem: effects on human leukocyte functions and interleukin release. *Int J Antimicrob Agents.* 1995;5:129–33. doi:10.1016/0924-8579(94)00042-s. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18611660/>. Accessed 20 Mar 2021.
72. Gottfredsson M, Erlendsdóttir H, Gudmundsson A, Gudmundsson S. Different patterns of bacterial DNA synthesis during postantibiotic effect. 1995:1314–9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC162733/pdf/391314.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.

73. Behra-Miellet J, Darchy A, Gressier B, Dine T, Luyckx M, Brunet C, Dubreuil L. Evaluation in vitro de l'activité de deux bêtalactamines sur le métabolisme oxydatif de granulocytes neutrophiles. [Evaluation of the in vitro activity of two beta-lactams on the oxidative metabolism of polymorphonuclear neutrophils]. *Pathol Biol (Paris)*. 2007;55:390–7. doi:10.1016/j.patbio.2007.06.009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17916416/>. Accessed 20 Mar 2021.
74. Carreer R, Deby-Dupont G, Deby C, Jadoul L, Mathy M. Oxidant-scavenging activities of beta-lactam agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998;17:43–6. doi:10.1007/bf01584363. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9512182/>. Accessed 20 Mar 2021.
75. Labro MT. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clin Microbiol Rev*. 2000;13:615–50. doi:10.1128/cmr.13.4.615-650.2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88953/>. Accessed 20 Mar 2021.
76. Levert H, Gressier B, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Ballester L, et al. Time and concentration dependent influence of dirithromycin on neutrophils oxidative burst. *The Journal of Antibiotics*. 1998;1999:127–33. https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/52/2/52_2_127/_pdf/-char/en. Accessed 20 Mar 2021.
77. Wenisch C, Parschalk B, Zedtwitz-Liebenstein K, Weihs A, El Menyawi I, Granger W. Effect of single oral dose of Azithromycin, Clarithromycin and Roxithromycin on polymorphonuclear leukocyte function assessed ex vivo by flow cytometry. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;1996:2039–42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163469/pdf/402039.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.
78. Trottier MD, Newsted MM, King LE, Fraker PJ. Natural glucocorticoids induce expansion of all developmental stages of murine bone marrow granulocytes without inhibiting function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:2028–33. doi:10.1073/pnas.0712003105. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2538876/>. Accessed 20 Mar 2021.
79. Athens JW, Haab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, Wintrobe MM. Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest*. 1961;989–95. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC290816/pdf/jcinvest00305-0105.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.

80. Uriarte SM, Molestina RE, Miller RD, Bernabo J, Farinati A, Eiguchi K, et al. Effects of fluoroquinolones on the migration of human phagocytes through *Chlamydia pneumoniae*-infected and tumor necrosis factor alpha-stimulated endothelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2538–43.
doi:10.1128/AAC.48.7.2538-2543.2004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC434182/>. Accessed 20 Mar 2021.
81. Yamasawa H, Oshikawa K, Ohno S, Sugiyama Y. Macrolides inhibit epithelial cell-mediated neutrophil survival by modulating granulocyte macrophage colony-stimulating factor release. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30:569–75.
doi:10.1165/rcmb.2003-0105OC. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14551160/>. Accessed 20 Mar 2021.
82. Aoshiba K, Nagai A, Konno K. Erythromycin shortens neutrophil survival by accelerating apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995:872–7.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC162645/pdf/390872.pdf>. Accessed 20 Mar 2021.
83. Ronchetti S, Ricci E, Migliorati G, Gentili M, Riccardi C. How Glucocorticoids Affect the Neutrophil Life. *Int J Mol Sci*. 2018;19.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6321245/>. Accessed 20 Mar 2021.
84. Saffar AS, Ashdown H, Gounni AS. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Curr Drug Targets*. 2011;12:556–62.
doi:10.2174/138945011794751555. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267167/>. Accessed 20 Mar 2021.

9 Lebenslauf



11/11/2016

© 2006 The Authors

© 2006 The Authors

████████████████████

© 2006 The Authors

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein Dank den folgenden Personen, ohne deren Hilfe diese Dissertation niemals zustande gekommen wäre:

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Martin Kees für die Betreuung dieser Arbeit bedanken sowie für seine freundliche Hilfe und Unterstützung. Er war mir stets ein guter Ratgeber, der immer sofort zur Verfügung stand, wenn Fragen auftraten und mich mit regelmäßigen Gesprächen immer wieder ermutigte. Durch den konstruktiven Austausch mit ihm bereicherte er das gemeinsame Forschungsprojekt mit vielen einfallsreichen und sinnvollen Ideen, sowohl was die Planung und Durchführung der Versuche als auch die Ausgestaltung der Doktorarbeit betrifft. Sein fachlicher sowie sein persönlicher Einsatz waren mir wirklich eine sehr große Hilfe, dafür möchte ich ihm von Herzen danken.

Für ihren durchwegs aufmerksamen sowie fürsorglichen Beistand will ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir nicht nur mit der Ermöglichung meines Medizinstudiums einen Kindheitstraum erfüllten, sondern mir auch durch ihre vielseitige Unterstützung bei meiner Promotion stets zur Seite standen. Sowohl durch ihre persönliche Teilnahme an der Studie als auch durch ihren Einsatz bei der Erstellung der Dissertation, wobei sie u.a. als Lektoren fungierten, halfen sie mir stets weiter und sprachen mir ununterbrochen Mut zu, sodass ich stets neue Kraft daraus schöpfen konnte.

Außerdem geht mein Dank an alle meine Freunde*innen und Kommilitonen*innen, die mir bei der Durchführung meiner Versuche im Labor zur Seite standen und sich als Probanden zur Verfügung stellten, vor allem an Andreas Maier, der bereits seit der Grundschule über 20 Jahre lang mein bester Freund ist und der zahlreiche Male nach Regensburg kam, um Blut zu spenden und mich bei meinem Forschungsprojekt zu unterstützen.

Ich möchte mich auch noch bei allen Medizinisch-technischen Assistentinnen des anästhesiologischen Forschungslabors am Universitätsklinikum Regensburg bedanken, die mir bei der praktischen Durchführung meiner Versuche stets zur Hand gingen und

mir äußerst kompetent und mit viel Geduld grundlegende Kenntnisse der Laborarbeit vermittelten. Besonders herzlich möchte ich hierbei auch Regina Lindner danken, die mir bei der Einarbeitung im Labor eine große Stütze war und mir die nötigen praktischen Fertigkeiten für den Versuchsablauf mit ihrem fundierten chemischen Hintergrundwissen näherbrachte.

Mein ganz besonderer Dank gilt zuletzt Herrn Dr. rer. nat. Michael Gruber, der mir diese Doktorarbeit mit Aufnahme in sein Forschungsteam erst ermöglicht hat. Es gibt nur selten Wissenschaftler, die so viel Leidenschaft, Herzblut und Energie in Forschungsprojekte investieren und die Medizinforschung mit kreativen Ideen und aufwendigen Studien bereichern wie er. Der regelmäßige Austausch mit ihm hat mich sowohl auf fachlicher als auch auf mentaler Ebene äußerst positiv beeinflusst und mir stets Rückhalt gegeben, er hatte wirklich zu jeder Zeit ein offenes Ohr. Er war nicht nur bei der Planung und Auswertung der Versuchsreihen eine große Stütze, sondern auch beim Ausgestalten und Korrekturlesen der Dissertation ein unermüdlicher Mentor, wofür ich ihm zutiefst dankbar bin.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Demian Nebosis

Regensburg, März 2024