

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

Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Funktionalität von neutrophilen Granulozyten

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elena Maier

2024

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

Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Funktionalität von neutrophilen Granulozyten

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elena Maier

2024

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	PD Dr. Sigrid Wittmann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Helmut Schweikl
Tag der mündlichen Prüfung:	10.05.2024

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung.....	10
1.1. Neutrophile Granulozyten	10
1.1.1. Leukodiapedese	11
1.1.2. Oxidativer Burst	13
1.1.3. NETosis	15
1.2. Stickstoffmonoxid im menschlichen Organismus	17
1.2.1. Endotheliale NO-Synthase	18
1.2.2. Induzierbare NO-Synthase in Phagozyten.....	18
1.2.3. Stickstoffmonoxid als therapeutisch wirksames Molekül.....	19
1.3. Effekte von NO auf PMNs.....	20
1.4. Fragestellung	21
1.5. Studienplanung.....	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1. Allgemeine Geräte und Materialien	23
2.2. Material zur Granulozytenisolierung	24
2.3. Material zur Mikroskopie.....	25
2.4. Material zur Durchflusszytometrie	26
2.5. Überblick der Methodik	28
2.6. Blutentnahme und Granulozytenisolierung.....	30
2.7. Vorversuch mit DHR und NO.....	31
2.8. Versuche am Mikroskop	32
2.8.1. Versuchsvorbereitung.....	32
2.8.2. Mikroskopieren.....	33
2.8.3. Bearbeitung und Aufbereitung der Daten mit der Imaris Software.....	34
2.8.4. Datenkonvertierung und Statistische Auswertung der ROS-Produktion	36

2.8.5.	Datenkonvertierung und statistische Auswertung der NETosis	37
2.8.6.	Datenkonvertierung und statistische Auswertung der Migration	38
2.9.	Versuche am Durchflusszytometer (FACS)	39
2.9.1.	Versuchsvorbereitung der ROS-Messreihe	39
2.9.2.	Versuchsvorbereitung der Antigen-Messreihe	41
2.9.3.	Messung am FACS-Gerät	41
2.9.4.	Bearbeitung und Auswertung der FACS-Daten.....	41
3.	Ergebnisse	44
3.1.	Probanden	44
3.2.	Migration im Mikroskop	44
3.2.1.	Track Length	44
3.2.2.	Track Displacement X.....	46
3.2.3.	Track Displacement Y.....	46
3.2.4.	Track Straightness	46
3.3.	ROS-Produktion im Live Cell Imaging	46
3.4.	NETosis im Live Cell Imaging	47
3.5.	Myeloperoxidase- Expression.....	48
3.6.	FACS-Versuche	49
3.6.1.	Quantifizierung der Burst-Reaktion	49
3.6.2.	Antikörper- Expression.....	51
4.	Diskussion	53
4.1.	Limitationen der gewählten Methodik	53
4.2.	Effekte von NO auf neutrophile Granulozyten	56
5.	Zusammenfassung	61
6.	Ausblick	62
7.	Literaturverzeichnis	63
8.	Anhang	71

8.1.	Abbildungsverzeichnis	71
8.2.	Tabellenverzeichnis	72
9.	Danksagung	73
10.	Lebenslauf.....	74

Abkürzungsverzeichnis

CA	Chemoattractant
CI	Calcium ionophore A23187
CD62L	L-Selektin
D	Directness
DHR	Dihydrorhodamin 123
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FMI	Forward Migration Index
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward Scatter
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
HSC	Hematopoetic stem cell
ICAM	Intercellular adhesion molecule
JAM	Junctional adhesion molecule
LPS	Lipopolysaccharide
MEON	MEON Medical Solutions GmbH & CoKG
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
MW	Mittelwert
MPO	Myeloperoxidase
n	Stichprobenumfang
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NE	neutrophile Elastase
NETs	neutrophil extracellular Traps
NO	Stickstoffmonoxid
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
PAF	Platelet activating factor
PECAM	Platelet-endothelial-cell adhesion molecule
PI	Propidiumiodid
PMN	polymorphonuclear neutrophils
PBS	Phosphate buffered saline
PSGL-1	P-Selektin-Ligand

RIRR	ROS induced ROS release
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
RNS	Reaktive Stickstoffradikale
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxiddismutase
SNP	Sodium-Nitroprussid
SNAP	S-Nitroso-N-acetylpenicillamin
SSC	Side Scatter
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha

1. Einleitung

1.1. Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunabwehr dar und machen gleichzeitig etwa zwei Drittel der Leukozytenpopulation aus (50-70%). Als Fresszellen und Bekämpfer verschiedener Krankheitserreger sind sie maßgeblich an Entzündungsreaktionen beteiligt. Mittels Phagozytose und Exkretion mikrobizider Substanzen bekämpfen sie Erreger vor dem Einsetzen der angeborenen Immunabwehr. Um an den Ort des Entzündungsgeschehens zu gelangen verfügen Granulozyten über die Fähigkeit der Diapedese und der Migration (1). Ihre charakteristische Morphologie ist Ausdruck der enthaltenen Granula, welche verschiedene bakterizide Substanzen, sowie Chemokine und Enzyme enthalten. Die Substanzen in azurophilen Granula haben in erster Linie antimikrobielle Eigenschaften, wie beispielsweise das Enzym Myeloperoxidase, saure Hydrolasen und Defensine. Spezifische Granula und Gelatinase-Granula überschneiden sich in ihren Funktionen. Einerseits enthalten sie wichtige Bestandteile zur Zelladhäsion und Migration, andererseits sorgen bestimmte Proteine für ein erregerfeindliches Umfeld in betroffenem Gewebe. Eine weitere Gruppe der Granula, sekretorische Vesikel, erhöhen bei Exozytose die Dichte von Integrinen und chemotaktischen Rezeptoren. Somit wird die Leukodiapedese in entzündetes Gewebe angeregt (2).

Der segmentförmige Zellkern etablierte die Bezeichnung polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN).

Die Reifung der PMNs erfolgt aus multipotenten Stammzellen über die myeloide Zellreihe im Knochenmark. Während multipotente Stammzellen und myeloide Progenitorzellen noch teilungsfähig sind, ist der Myeloblast das erste Stadium, in dem keine Mitose mehr betrieben wird. Ab hier reift die Zelle über den Promyelozyten, den Myelozyten und den Metamyelozyten zum stabkernigen neutrophilen Granulozyten im Knochenmark aus und gelangt dann nach finaler Ausdifferenzierung zum segmentkernigen neutrophilen Granulozyt in den peripheren Blutkreislauf (Abbildung 1). Bedingt durch die enorm kurze Lebensdauer von 6-8 Stunden im Blutkreislauf (1), ist die Produktion mit $1-2 \times 10^{11}$ Zellen pro Tag sehr hoch (3). Den wichtigsten Wachstumsstimulator stellt dabei G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) dar. Dieser ist wiederum über diverse Zwischenschritte abhängig von der Apoptoserate der Granulozyten im Gewebe und kann somit auf den aktuellen Bedarf reagieren (4).

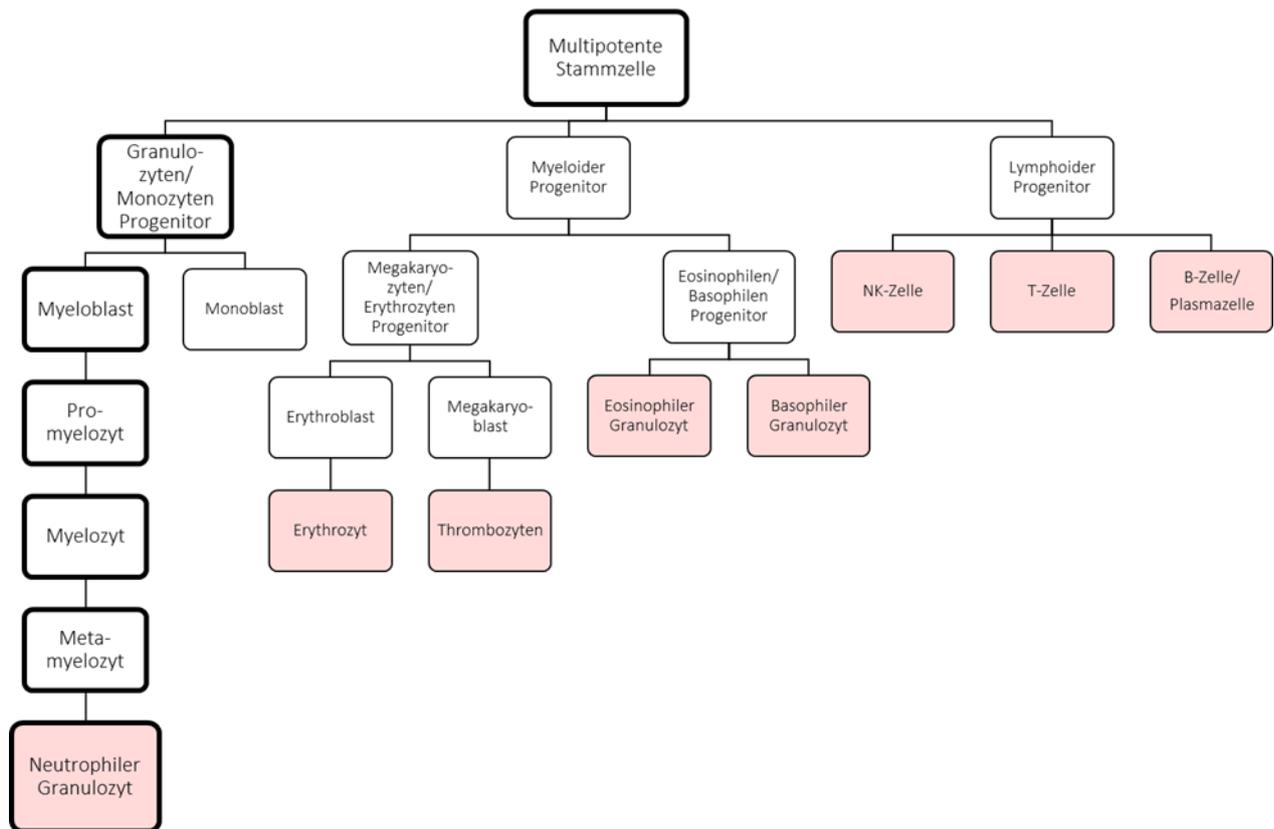


Abbildung 1: Hämatopoese mit detaillierterer Darstellung der neutrophilen Granulopoese (5). Die weißen Kästchen repräsentieren die Zellen/ Zell-Vorstufen um Knochenmark, die rosa hinterlegten Kästchen entsprechen den Zellen im Blutkreislauf. (Eigene Darstellung)

In diesem Projekt standen bestimmte Funktionen der PMNs im Fokus der Beobachtung. Neben dem Migrationsverhalten wurde die oxidative Burst-Reaktion inklusive Myeloperoxidase-Expression, sowie die NETosis untersucht. Diese sind im Folgenden kurz erläutert.

1.1.1. Leukodiapedese

Diapedese bezeichnet den Weg von Granulozyten aus dem Blutkreislauf zum Ort des Entzündungsgeschehens. Die Extravasation erfolgt meist an postkapillären Venolen über mehrere Schritte: Bindung, Rollen, langsames Rollen, Aktivierung, Adhäsion, intraluminales Kriechen und letztendlich parazelluläre oder transzelluläre Transmigration. (6)

Eine komplexe Kaskade molekularer Interaktionen zwischen Selektinen der PMNs und der Endothelzellen ermöglicht dabei die initiale Bindung der Granulozyten an die Gefäßwand, sowie das darauffolgende Rollen. Nach Stimulation durch Entzündungsmediatoren wie TNF-alpha und IL-17 werden auf der luminalen

Endothelzellmembran P-Selektine und E-Selektine exprimiert. Diese binden wiederum an PSGL-1 (P-Selektin-Ligand) und L-Selektin (CD62L), welche sich permanent auf den Mikrovilli der PMNs befinden. Durch wiederholtes Binden und Lösen der Selektine wird somit ein ‚Entlang-Rollen‘ der Leukozyten an der Gefäßwand ermöglicht. Einen wesentlichen Faktor der Selektinbindung stellen die Scherkräfte des physiologischen Blutflusses dar, denn ohne die kinetischen Verhältnisse lösen sich die Zellen von der Gefäßwand (7). Entzündungsmediatoren auf der Endothelmembran (Chemokine, Plättchen-aktivierender-Faktor) führen zur Aktivierung der PMNs (8). Im Zuge dessen exprimieren diese Integrine (LAF-1, Mac-1(CD11b-CD18)), welche wiederum vorwiegend an ICAM-1 und weiteren Liganden auf Endothelzellen binden. Der so entstandene Zellkontakt bewirkt die feste Adhäsion der PMNs (6). Die Transmigration läuft nun entweder auf parazellulärem oder transzellulärem Weg ab, wobei die parazelluläre Migration mit schätzungsweise 80% dominiert (9). Um einen geeigneten Weg durch das Endothel zu finden, erfolgt das intraluminale Kriechen, meist zu Interzellularkontakten der Endothelzellen. Die Interaktion von Mac-1 mit ICAM-1 spielt bei diesem Vorgang eine Schlüsselrolle (10). Voraussetzung für die Transmigration sind endotheliale, Mikrovilli-ähnliche Ausstülpungen mit erhöhter Dichte an ICAM-1 und VCAM-1. Sie dienen vor allem der Richtungsorientierung der Leukozyten zur Extravasation. Induziert werden diese endothelialen Protrusionen von aktivierten, adhärenenten Leukozyten (11).

Der parazelluläre Weg erfordert eine Lockerung der Zell-Zell-Verbindungen zwischen den Endothelzellen. Nach Rekrutierung verschiedener Adhäsionsproteine, wie PECAM (Platelet-endothelial-cell adhesion molecule) und JAM (Junctional adhesion molecule) können die Leukozyten mittels homophiler molekularer Adhäsion durch die endotheliale Barriere migrieren (12). Währenddessen interagiert LAF-1 mit ICAM-1 und ICAM-2(6). Die transzelluläre Extravasation findet hauptsächlich in Venolen mit dünner Endothelschicht statt, beispielsweise vermehrt in Gefäßen des Nervensystems. Prinzipiell kann der Vorgang mit der Phagozytose verglichen werden, wobei der Endothelzelle eine aktive Rolle zukommt (3). Fusionierte Caveolae der Endothelzelle, sogenannte vesikulo-vakuoläre Organelle, bilden eine kanalartige Struktur durch die der entsprechende Leukozyt von apikal nach basal gelangt (13).

Ist der Leukozyt auf der apikalen Seite der Endothelzelle angekommen, muss er die Basalmembran passieren. Hierfür ist der PMN mit diversen Enzymen ausgestattet, beispielsweise: Elastase (azurophile Granula) und verschiedene Matrix-

Metalloproteasen (Spezifische Granula und sekretorische Vesikel und Gelatinase-Granula) (14).

Im interstitiellen Gewebe folgt der PMN dem chemotaktischen Gradienten, welcher zum einen direkt durch chemoattraktive Substanzen der Erreger (fMLP), zum anderen durch Chemokine (IL-8) verschiedener Entzündungszellen (Makrophagen, andere PMNs) gebildet wird. Abbildung 2 skizziert anschaulich die zuvor beschriebenen Schritte der Leukodiapedese.

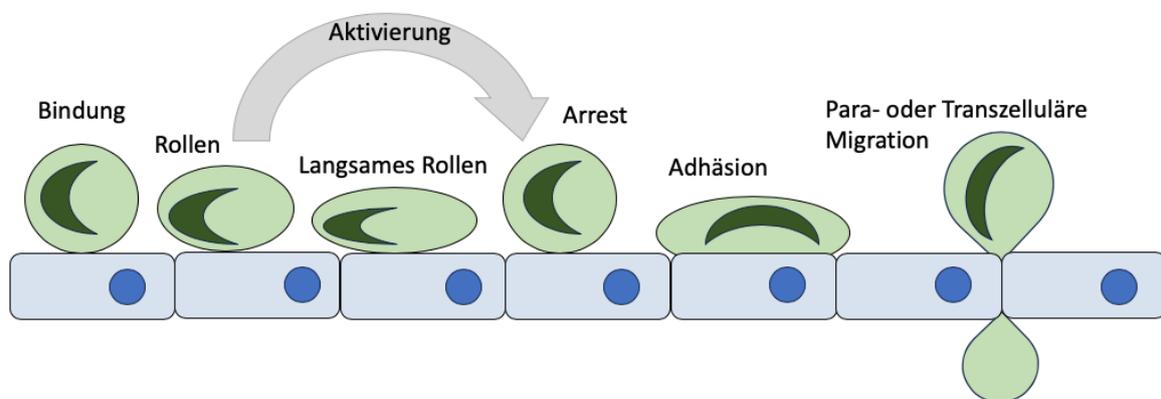


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Leukodiapedese modifiziert nach (6)

1.1.2. Oxidativer Burst

PMNs stellen einen wesentlichen Bestandteil bei der Bekämpfung bakterieller und mykotischer Erreger dar. Eine Schlüsselfunktion dieser Zellen ist dabei die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die essentielle Bedeutung der ROS-Produktion zeigt das Krankheitsbild der Chronischen Granulomatose, bei der es zum Funktionsverlust der NADPH-Oxidase kommt. Der oxidativen Burst-Reaktion geht in der Regel eine vielfältige und komplizierte Kaskade zur Aktivierung der Granulozyten voraus. Bei bakteriellen Infektionen kommt ein kontinuierlicher Prozess in Gang, der zu Phagozytose, Degranulation und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt. Involviert sind dabei unter anderem verschiedene Interleukine (IL-8, IL-6), bakterielle Lockstoffe (fMLP), opsonierte Erreger sowie toll-like-Rezeptoren der PMNs (1).

Die Produkte des oxidativen Burst werden als reaktive Sauerstoffderivate zusammengefasst und weisen unterschiedliche chemische Eigenschaften bezüglich Permeabilität, Reaktivität und Stabilität auf. Gemein ist ihnen jedoch die

charakteristische Funktion der molekularen Modifikation zur Zerstörung der Erreger. Zu den ROS gehören beispielsweise Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hyperoxid-Anion (O_2^-), Hypochlorige Säure (HOCl), Hydroxyl-Radikal (OH^\cdot) (15).

Eine essenzielle Position des oxidativen Bursts nimmt die NADPH-Oxidase ein. In der Plasmamembran oder phagosomaler Membran lokalisiert, leitet sie mittels Reduktion molekularen Sauerstoffs zu Superoxidanionen die ROS-Produktion ein. Der Enzymkomplex umfasst 5 Proteine (zwei befinden sich innerhalb der membranösen Lipidschicht, drei im Zytoplasma), welche sich nach Aktivierung zu einem effektiven Gefüge organisieren. Für die katalysierte Reduktion des Sauerstoffs wird das namensgebende Reduktionsmittel NADPH über den Pentosephosphatweg zur Verfügung gestellt (16). Das entstandene Superoxidanion reagiert nun entweder spontan oder katalysiert durch die Superoxiddismutase (SOD) weiter zu Wasserstoffperoxid. H_2O_2 kann wiederum über verschiedene Reaktionswege zu entsprechenden ROS oder auch reaktiven Stickoxiden konvertieren. Die Reaktionsprodukte werden dabei auf der extrazellulären beziehungsweise phagosomalen Seite der Membran freigesetzt, so dass die mikrobiziden Substrate entweder in das entzündete Interstitium oder direkt an die phagozytierten Erreger im Phagosom gelangen (17).

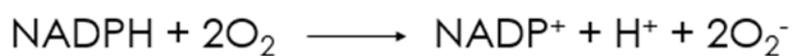


Abbildung 3: Reaktionsgleichung der durch NADPH-Oxidase katalysierten Redoxreaktion (17)

Eine herausragende Bedeutung unter den ROS hat die durch das Enzym Myeloperoxidase entstehende, stark mikrobizide hypochlorige Säure (18). Als Bestandteil der azurophilen Granula, wird die MPO bei Degranulation in das Interstitium beziehungsweise in das Phagolysosom ausgeschüttet. Dort konvertiert sie Chlorid mit Wasserstoffperoxid zu hypochloriger Säure (HOCl) (19).



Abbildung 4: Reaktionsgleichung der durch MPO katalysierten Redoxreaktion (19)

1.1.3. NETosis

Einen einmaligen Abwehrmechanismus der PMNs stellt die Bildung sogenannter neutrophil extracellular traps (NETs) dar. Dabei handelt es sich um netzartige, dreidimensionale Strukturen aus DNA und NET-Proteinen, die nach Aktivierung durch verschiedene Signalsubstrate (IL-8, LPS, fMLP, PMA) ausgeworfen werden. Das Chromatinnetz organisiert sich aus glatten DNA-Fasern und aggregierten globulären Domänen mit mikrobiziden Proteinen. Pathogene Keime verfangen sich im Chromatinnetz und werden so zunächst immobilisiert. Die enthaltenen NET-Proteine sorgen anschließend für ein Abtöten der Erreger (20). Sowohl Bakterien, Pilze, Parasiten und sogar Viren können durch NET-Mechanismus neutralisiert werden. Bei bakteriellen und fungalen Infektionen verhindern sie zudem die Ausbreitung der Pathogene (21).

Untersuchungen zeigten eine Beteiligung verschiedenster Proteine am Vorgang der NETosis. Einen Großteil nehmen dabei Histone, neutrophile Elastase, MPO und Calprotectin ein.

Neben nukleären Proteinen, wie den Histonen, sind sowohl granuläre, wie MPO und die neutrophile Elastase, als auch zytosolische Proteine mit den NETs assoziiert. Die vorwiegend kationisch geladenen Proteine in den Granula besitzen durch ihre positive Ladung eine besonders hohe Bindungsaffinität zur DNA. Als eines der zytosolischen Proteine nimmt Calprotectin eine Schlüsselposition zur Bekämpfung fungaler Erreger im Rahmen der NETosis ein (22). Bakterizide Bestandteile der NETs sind unter anderem Histone, Defensine, Lactoferrin und MPO.

Neben Apoptose und Nekrose ist die NETosis als ein weiterer Mechanismus des Zelltods zu betrachten. Eine essentielle Bedeutung kommt dabei der vorangehenden Burstreaktion zu: die NADPH-Oxidase und daraus resultierende ROS sind wichtige Initiatoren der NET-Bildung (23). Letztendlich unterliegt die NETosis jedoch einer Vielzahl unterschiedlicher Signalwege, die teilweise interagieren (24). Nach Aktivierung kommt es zunächst zur Depolarisation und zum Arrest der PMN: NE degradiert F-Aktin und stoppt so Aktin-abhängige Bewegung (25). Weiterhin kommt es zur Fragmentierung der Zellkernmembran, woraufhin nukleäre, granuläre sowie zytosolische Komponenten der NETs vermischen und sich gegenseitig modifizieren. NE sorgt hierbei vorwiegend mittels Degradierung der Histone für die Dekondensation des Chromatins, MPO wirkt synergistisch und verstärkt die Homogenisierung der DNA unabhängig von ihrer Enzymaktivität (26). Die Art des Signalweges und der genaue

molekulare Mechanismus bis hin zur letztendlichen Freisetzung der NETs kann dabei abhängig von der jeweiligen Stimulierung der PMNs variieren (24).

Nach Aufbrechen der Zellmembran verteilen sich die NETs ca. 3-8h nach Aktivierung der PMNs und verstärken das erregerfeindliche Milieu (21).

1.2. Stickstoffmonoxid im menschlichen Organismus

Als besonders reaktives Biomolekül hat Stickstoffmonoxid eine vielfältige Bedeutung im menschlichen Organismus, sowohl in physiologischen, in pathophysiologischen als auch in pathologischen Prozessen. Aufgrund der lipophilen Eigenschaft von NO kann es durch Membranen durchdiffundieren und wirkt so über Zellgrenzen hinaus. Im Gefäßsystem beeinflusst NO als Botenstoff den Gefäßtonus im Sinne einer lokal begrenzten Vasodilatation, zudem inhibiert es sowohl Thrombozytenadhäsion als auch Leukozytenadhäsion an Gefäßwänden. Weiterhin fungiert es - selbst ein freies Radikal - als Radikalfänger und kann als Ausgangssubstrat bei Redoxreaktionen zur Synthese reaktiver Stickstoffspezies (RNS) bzw. selbst als RNS im Rahmen des angeborenen Immunsystems dienen. Im Nervensystem wird NO von Neuronen synthetisiert, wo es als Neurotransmitter zelluläre Kommunikation und Signaltransduktion ermöglicht. Die Herstellung des NO übernehmen NO-Synthasen. Die kurze Halbwertszeit des NO von 5 Sekunden bedingt dabei eine unmittelbare Aktivierung der NO-Synthase bei Bedarf. Als Ausgangssubstrat dient die Aminosäure L-Arginin: mittels Oxidation wird L-Arginin zu L-Citrullin und NO konvertiert (Abbildung 5). Für eine funktionierende NO-Synthase ist das Coenzym Tetrahydrobiopterin (BH₄) dabei von zentraler Bedeutung (27). Je nach Zelltyp und Zielstruktur lassen sich drei Isoformen unterscheiden:

- endotheliale NO-Synthase in Endothelzellen (eNOS)
- induzierbare NO-Synthase in Makrophagen (iNOS)
- neuronale NO-Synthase in Neuronen (nNOS)

eNOS und nNOS produzieren vergleichsweise geringe Mengen an NO, während iNOS bei Aktivierung hohe Dosen NO freisetzt. Begründet ist dies in der divergierenden Art der Regulierung: eNOS und nNOS sind Ca²⁺-abhängig aktiv und setzen NO bei Stimulierung pulsatil frei, iNOS produzieren dagegen nach Aktivierung kontinuierlich unabhängig von der Ca²⁺-Konzentration (28).



Abbildung 5: Reaktionsgleichung der NO-Synthese (28)

1.2.1. Endotheliale NO-Synthase

Der eNOS kommt in der Regulation des Gefäßsystems und somit in der Blutdruckkontrolle eine zentrale Bedeutung zu. Der essenzielle Stellenwert des Enzyms lässt sich bei Fehlfunktion selbiger ermessen: es kommt zu Gefäßerkrankungen, wie Atherosklerose und ischämischen Ereignissen in verschiedensten Organsystemen (29).

Im vaskulären Kontext hat NO verschiedene Auswirkungen. Bei der Vasodilatation gelangt das in Endothelzellen synthetisierte NO mittels Diffusion zu den glatten Gefäßmuskelzellen. Hier wird die Signalfunktion von NO letztendlich durch Akkumulation von cGMP vermittelt, da NO als Stimulator der Guanylatzyklase fungiert. cGMP sorgt wiederum über Elektrolytveränderungen im Zytosol für einen verminderten Tonus der Gefäßmuskulatur (30). Im Rahmen des Gerinnungssystems wirkt NO über eine Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation an der Gefäßwand (31). Weiterhin verringert NO die Expression von Adhäsionsmolekülen für die Diapedese der Leukozyten (32).

Bei einem Mangel an Tetrahydrobiopterin (BH₄) kommt es zu einer sogenannten eNOS-Entkopplung. Dabei wird an Stelle von NO Superoxid (O₂⁻) gebildet. Dieses reagiert wiederum mit NO zu Peroxynitrit (ONOO⁻), welches BH₄ oxidiert und somit funktionsunfähig macht. Der so entstandene Circulus vitiosus führt letztendlich durch den oxidativen Stress zur vaskulären Dysfunktion und begünstigt Atherosklerose (27). Die Aktivierung der eNOS kann über verschiedenste Modifikationen des Enzyms erfolgen. Darunter am bedeutendsten ist die Phosphorylierung. Die Enzymmodifikationen sind wiederum abhängig von der Ca²⁺-Konzentration (33).

1.2.2. Induzierbare NO-Synthase in Phagozyten

Neben der Signaltransduktion hat NO eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Erregern. Ähnlich wie ROS wirkt es in hohen Dosen zytotoxisch und wird daher bei Infektionen mit Bakterien und anderen Erregern von Makrophagen sowie auch neutrophilen Granulozyten und einigen anderen Zelltypen (Mesangiumzellen, Astrozyten, Hepatozyten etc.) ausgeschüttet (34,35). Das zuständige Enzym, die iNOS, setzt dabei nach Aktivierung NO in hohen Mengen kontinuierlich frei. Als freies Radikal wirkt es selbst erregferndlich, teilweise wird es auch durch Reaktion mit Superoxid zu dem stark mikrobiziden Peroxynitrit umgesetzt (36). Bei dem zytotoxischen Mechanismus spricht man von nitrosativem Stress (37).

Zu den wichtigsten Induktoren der iNOS zählen verschiedene Chemokine, wie TNFalpha, Interferon-gamma und Interleukine. Weiterhin stimulieren Pathogene von verschiedenen Erregern, darunter LPS und HIV-Proteine, aber auch Hypoxie und Hyperthermie die iNOS (34).

1.2.3. Stickstoffmonoxid als therapeutisch wirksames Molekül

Die vaskuläre Beeinflussung durch NO, wird im klinischen Alltag vorwiegend bei kardiovaskulären Erkrankungen therapeutisch genutzt. Als Notfallmedikament wird Nitrospray zur Behandlung eines akuten Koronarsyndroms, einer akuten Linksherzinsuffizienz und bei katheterinduzierten Koronarspasmen eingesetzt (38). Molsidomin kommt dagegen prophylaktisch bei Angina pectoris Beschwerden zum Einsatz (39). Bei diesen Medikamenten entsteht das therapeutisch wirksame NO sekundär im Körper und wird nicht direkt zugeführt. Abgesehen von kardiovaskulären Indikationen kann die muskelrelaxierende Wirkung der Nitrate auch bei spastischen Schmerzzuständen wie der Gallenkolik und der Harnleiterkolik eingesetzt werden (40). Das am häufigsten eingesetzte Nitrat repräsentiert Nitroglycerin, weitere NO-freisetzende Pharmaka sind Isosorbidmononitrat und Isosorbiddinitrat, welche ebenfalls bei Angina pectoris eingesetzt werden können (41).

In der Intensivmedizin wird NO dem Patienten teilweise auch als gasförmiges Medikament appliziert. Eine Indikation besteht dabei beispielsweise bei Neugeborenen mit hypoxischer respiratorischer Insuffizienz sowie bei peri- und postoperativer pulmonaler Hypertonie. Als kleines, lipophiles Molekül gelangt es über die Lunge in den Blutkreislauf und kann so den vasodilatierenden Effekt im Gefäßsystem entfalten. Zusätzlich wirkt der dilatierende Effekt auch auf die glatte Muskulatur der Bronchien, sodass insgesamt ein verbessertes Ventilations-Perfusions-Verhältnis resultiert. Dabei werden Konzentrationen zwischen 5 und 40 ppm inhalativ verabreicht (42).

1.3. Effekte von NO auf PMNs

In dieser Studie wurde die direkte Auswirkung von gasförmigen Stickstoffmonoxid auf Migrationsfähigkeit, oxidativem Burst und NETosis der PMNs untersucht.

Eine Studie von Kubes et al. wies 1991 auf eine reduzierte Leukozytenadhäsion durch NO hin. Diesbezüglich konnte in Mesenterialvenolen von Katzen eine erhöhte Adhäsion von Leukozyten bei Hemmung der endogenen NO-Produktion (mittels L-Arginin-Analoga) nachgewiesen werden (32). Umgekehrt könnte dies eine mögliche Inhibierung der Adhäsion und Migrationsfähigkeit von PMNs bedeuten.

Patel untersuchte 2010 den Einfluss von NO-Donatoren auf die NETosis. Dabei induzierte NO eine verstärkte Bildung freier Radikale, welche wiederum die NETosis stimulierten (43).

Eine Studie von Manda-Handzlik et al. beschrieb einen direkteren Zusammenhang zwischen NETosis und RNS (Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit) (44). Dabei scheinen Peroxynitrit und NO unmittelbar einen induzierenden Effekt auf die NETosis zu haben. Als NO-Donor diente bei den Experimenten S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) (44). In beiden Studien waren NADPH-Oxidase und MPO essentiell für die NET-Aktivierung durch NO. Ob NO auch zu einem beschleunigten Eintritt der NETosis der PMNs führt, wurde in den Studien nicht untersucht.

Clancy et al konnten einen Effekt von NO auf den oxidativen Burst nachweisen. NO wirkte inhibierend auf die NADPH-Oxidase. Es resultierte eine verminderte Superoxidproduktion. Dabei wurde jedoch lediglich eine Beeinflussung des Enzyms bei Inkubation mit NO vor dessen Stimulierung mit fMLP oder PMA beschrieben, das heißt bevor membranständige und zytosolische Komponenten der NADPH-Oxidase aggregieren (45).

NO wird unter anderem bei inflammatorischen Prozessen der PMNs im Rahmen des nitrosativen Stress freigesetzt (46).

1.4. Fragestellung

Nach Durchsicht der aktuellen Studienlage wurde deutlich, dass NO Einfluss auf zelluläre Reaktionen der PMNs ausübt. Ein Aspekt der bisher unbeachtet blieb, war die zeitliche Komponente der verschiedenen Funktionen von PMNs. Die Experimente dieser Arbeit zielten auf einen Vergleich von zeitlichen Parametern bei der Burst-Reaktion, sowie bei der Bildung der NETs unter Beeinflussung mit NO ab.

Weiterhin wurde die zurückgelegte Strecke der PMNs untersucht, um einen möglichen Effekt von NO auf die Migrationsfähigkeit zu ermitteln.

Zusätzlich stellte sich die Frage, ob PMNs unter NO Einfluss quantitativ mehr oder weniger ROS produzieren, da Ergebnisse von Clancy et al. auf eine verminderte ROS-Produktion hindeuten (45), während andere Studien auf einen stimulierenden Effekt von NO hinweisen (47,48).

1.5. Studienplanung

Um einen Einfluss von NO auf Migration, ROS-Produktion und NETosis der neutrophilen Granulozyten zu quantifizieren, wurde Live Cell Imaging angewandt. Hierbei wurde vor allem der zeitliche Verlauf der verschiedenen Granulozytenfunktionen, sowie die Migrationsstrecke in den Fokus der Untersuchung gestellt. Geplant wurden dazu 30 Versuche mit jeweils drei Kanälen zur Granulozyten-Beobachtung. Davon wurden 20 Versuche mit NO-Begasung und 10 ohne NO als Kontrollversuche geplant. Ergänzend sollten nachfolgend Versuche am Durchflusszytometer durchgeführt werden, um neben dem zeitlichen Verlauf auch quantitative Aspekte der Granulozytenfunktionen in den Vergleich miteinfließen zu lassen. Abbildung 6 veranschaulicht skizzenhaft den Aufbau des Projektes.

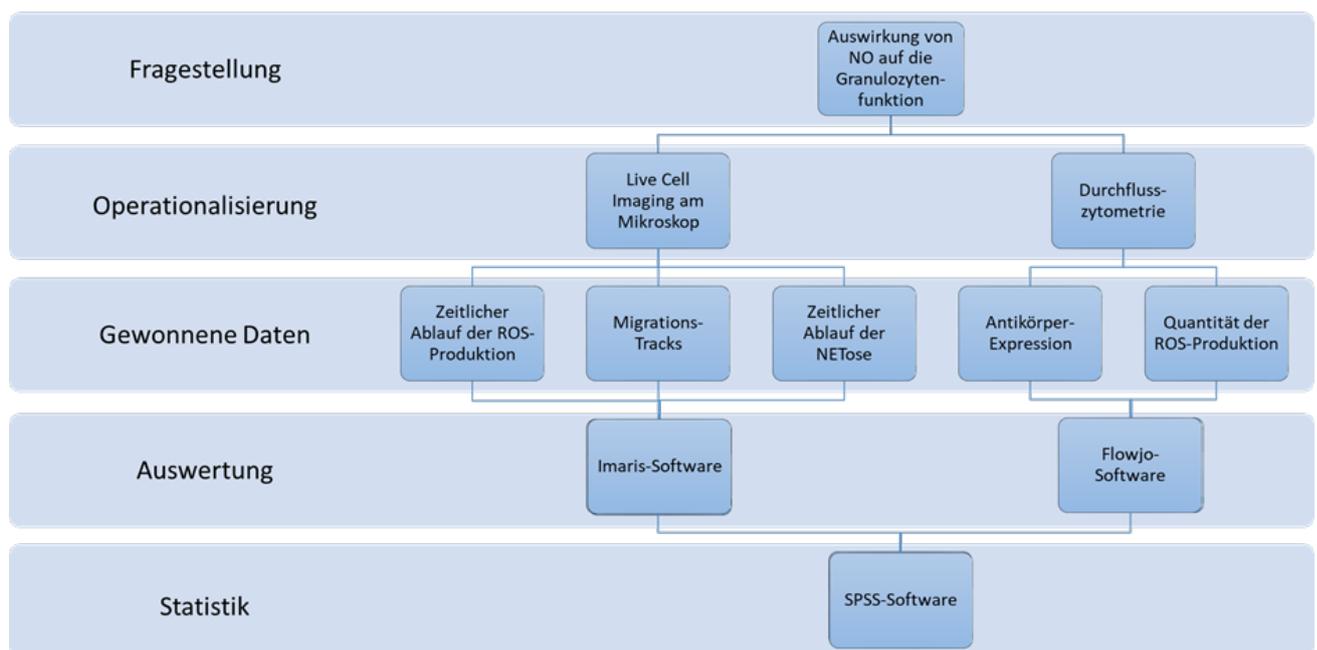


Abbildung 6: Flowchart des Projektplans

2. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Geräte und Materialien aufgelistet, sowie die Methodik der durchgeführten Versuche erläutert.

2.1. Allgemeine Geräte und Materialien

CO ₂ -Inkubator Heracell 150i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Wasserbad ohne integriertes Thermometer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad ThermoHaake SWB25	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Biofuge stratos	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Heraeus™, Megafuge 1.0 R Zentrifuge	ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Herasafe KS 18 biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II	ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
DM IRB Mikroskop	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Lab Dancer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
MS2 Minishaker IKA JK	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Rollenmischer SRT9D	Stuart, Staffordshire, England
Inkubator Lab-Therm LT-NEUTROPHIL	Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz
PIPETMAN® Classic P10, P20, P100, P200 Pipette, P1000	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Multipipette M4	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Combitips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

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

Tabelle 1: Allgemeine Geräte und Materialien

2.2. Material zur Granulozytenisolierung

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

Tabelle 2: Materialien zur Granulozytenisolierung

2.3. Material zur Mikroskopie

Zählkammer Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser (Menzel-Gläser)	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
RPMI 1640 without l-glutamine, phenolred, with sodium bicarbonate	PAN BIOTECH, Aidenbach, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anti-MPO-APC, human 1 mL (im folgenden "anti-MPO")	Miltenyl Biotec, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (im folgenden "DAPI"), verdünnt zu 0,5 µg/mL	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, Product of Israel
Dihydrorhodamine 123 (im folgenden "DHR"), 1 mM in DMF (10 mg/26,2 mL DMF)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Aqua Dest	Laborintern destilliert
Minimum Essential Medium Eagle 10x with Earle's salts, without l-glutamine and sodium bicarbonate	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, Product of United Kingdom
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	VWR International GmbH (Radnor, Pennsylvania, USA)
RPMI 1640, neutrophil/o: L-Glutamine, w/o: Phenol red, w: 2.0 g/L NaHCO ₃	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
PureCol Type I Bovine Collagen Solution (3 mg/mL) (Kollagen)	Advanced BioMatrix, Carlsbad, USA
µ-Slide Chemotaxis ibiTreat	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Lids for µ-Slide Chemotaxis	Ibidi, Martinsried, Deutschland
N-Formyl-Met-Leu-Phe ≥97% 50 mg (HPLC) (im folgenden "fMLP"), 1 mM verdünnt zu 10 nM	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Inversmikroskop DMI8	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Ibidi Gas Mixer	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Ibidi Temperature Controller	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Ibidi Heating System, Universal Fit, for 1 Chamber	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Ibidi Gas Incubation System for CO ₂	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Leica DFC9000 GT Kamera	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Objektiv HC, PL FL L20x/0,40 CORR PH1	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtquelle CoolLED pE-4000	CoolLED Ltd, Andover, Großbritannien
LED QUAD Filterwürfel	Chroma Technology Corp., Vermont, USA
DUAL Filterwürfel	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica Application Suite 3.4.2.18368 Softwareplattform Leica Application Suite X	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
200 ppm Stickstoffmonoxid Rest Stickstoff, 40 Liter, 150 bar	Linde Gas Therapeutics GmbH, Deutschland

Tabelle 3: Materialien zur Mikroskopie

2.4. Material zur Durchflusszytometrie

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with MgCl ₂ and CaCl ₂ , liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (D8662-500 mL)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, Product of United Kingdom
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (D8537-500 mL)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, Product of United Kingdom

Dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
N-Formyl-Met-Leu-Phe	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dihydrorhodamin 123	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SNARF	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Propidiumiodid P1304 MP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Human TNF Perotech 1 µg/mL	PeptoTech Germany, Hamburg, Deutschland
Röhre 5 mL PP (FACS-Röhrchen)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
FITC anti-human CD62L Clone: DREG-56	BioLegend, San Diego, USA
PE anti-human CD11b Clone: ICRF44 150 µg/mL	BioLegend, San Diego, USA
APC anti-human CD66b Clone: G10F5 200 µg/mL	BioLegend, San Diego, USA
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
CellQuest Pro	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
FACSClean Solution	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FACSRinse Solution	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FACSFlow™	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Aqua Dest	Laborintern destilliert
200 ppm Stickstoffmonoxid Rest Stickstoff, 40 Liter, 150 bar	Linde Gas Therapeutics GmbH, Deutschland

Tabelle 4: Materialien zur Durchflusszytometrie

2.5. Überblick der Methodik

Im Rahmen dieses Projektes standen ROS-Produktion, NETosis, sowie Migration von neutrophilen Granulozyten im Fokus der Experimente. Mit dem Mikroskop Leica DMI8 können diese Parameter aufgenommen und anschließend mithilfe der Imaris Software beobachtet und ausgewertet werden. Das Live-Cell-Imaging-System ermöglicht dabei eine automatisierte Langzeitbildgebung bei entsprechenden Umgebungsbedingungen (Gaszusammensetzung, Temperatur, Luftfeuchtigkeit) in einer Klimakammer. Mithilfe der Software Leica Application Suite X können Einstellungen, wie Wellenlänge und Belichtungszeit, festgelegt werden. Die Granulozyten werden zur Mikroskop-Beobachtung in μ -Slides Chemotaxis appliziert. Es handelte sich dabei um IBIDI-Platten mit jeweils 3 identischen Kammern. Der in der Mitte befindliche Kanal in einer Kammer stellt den Beobachtungsbereich dar und wird daher mit der Zellsuspension befüllt. Jeweils links vom Kanal befindet sich ein Reservoir für den Chemoattractant (hier fMLP), das rechts vom Kanal lokalisierte Reservoir wird mit einem Puffer oder Nährmedium (hier RPMI+FKS) gefüllt. In regelmäßigen Abständen (ca. alle 30 bis 35 s) wurden vier Aufnahmen gemacht, drei fluoreszenzmikroskopische und eine im Phasenkontrast, für die jeweilig zu beurteilende Granulozytenfunktion. Diese sind im Folgenden kurz erläutert:

Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) von Granulozyten kann durch Oxidation des nicht fluoreszierenden Dihydrorhodamin-123 (DHR) zum fluoreszierenden Rhodamin-123 sichtbar gemacht werden. Dabei fungiert das beim oxidativen Burst anfallende H_2O_2 als Oxidationsmittel, somit sind ROS-Produktion und gemessene Fluoreszenz des Rhodamin-123 annähernd proportional.

Der DNA Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) dient der Markierung von Chromatinfasern, welche sich nach erfolgter NETosis frei vorliegend anfärben lassen. So kann der Zeitpunkt, an dem ein Granulozyt in die NETosis übergeht, festgestellt werden. Auch hier wird das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie angewandt, da DAPI bei ultraviolettem Licht (Wellenlänge: 358 nm) angeregt wird und Lichtstrahlen (Wellenlänge: 461 nm) emittiert, welche wiederum detektiert werden können.

Ein anti-human-Myeloperoxidase Antikörper, welcher mit dem Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC) konjugiert ist, veranschaulicht die Expression des Enzyms Myeloperoxidase.

Bei allen drei fluoreszenzmikroskopischen Verfahren, können lediglich zeitliche Parameter ermittelt werden. Die Quantität der gemessenen Fluoreszenz bei den

verschiedenen Versuchen ist zu variabel, um aussagekräftige Ergebnisse bezüglich Intensität der verschiedenen Granulozytenfunktionen zu erzielen.

Zur Beobachtung der Migration werden zwei Aufnahmen pro Minute im Durchlichtkontrastverfahren erstellt. Mithilfe der Imaris-Software können den Bildern die relevanten Informationen entnommen werden. Hierbei ordnet das Programm den erkannten Zellen aus einer Aufnahme, die entsprechenden Zellen aus der vorherigen bzw. folgenden Aufnahme zu, somit kann ein Granulozyt über einen längeren Zeitraum ‚getrackt‘ werden.

Erst während des Mikroskopierens kam der eigentliche Stressor der Granulozyten zu tragen. Während bei Experimenten mit flüssigen Substanzen Kontrollversuch und experimenteller Versuch gleichzeitig in einem IBIDI-Slide ausgeführt werden können, mussten bei diesem Projekt Kontrollversuche und Versuche mit dem gasförmigen Stickstoffmonoxid separat an unterschiedlichen Versuchstagen durchgeführt werden. Um die am Mikroskop ermittelten zeitlichen Parameter mit Aussagen zur Intensität einer Zellfunktion zu ergänzen, wurden zusätzlich Versuche am Durchflusszytometer unternommen. Insbesondere wurde hierbei die ROS-Produktion quantifiziert. Die Durchflusszytometrie kann durch Größenanalyse und Messung der Granularität die einzelnen Zellen charakterisieren. Das vorwärts gestreute Licht (Forward Scatter) dient dabei der Größenbestimmung der jeweiligen Zelle. Das seitlich gestreute Licht (Side Scatter) identifiziert die Granularität. Durch fluoreszierende Farbstoffe oder Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper können weitere Parameter und Funktionen einer Zellpopulation bestimmt werden. Die Menge an emittierter Fluoreszenz korreliert dabei mit der Quantität der zu bestimmenden Variable.

Auch hier diente DHR zur Quantifizierung der Burst-Reaktion als Fluoreszenzfarbstoff. Weiterhin wurde die Expression folgender drei Oberflächenmoleküle untersucht: CD11b (Mac-1), CD62L (L-Selektin) und CD66b (CEACAM8). Alle drei Proteine haben ihren Wirkungsbereich in der Zelladhäsion im Rahmen der Leukodiapedese.

2.6. Blutentnahme und Granulozytenisolierung

Vor der Blutentnahme wurden in einem 15 mL- Zentrifugenröhrchen 3 mL Leukospin vorgelegt, welches anschließend mit 3 mL Lymphospin überschichtet wurde. So konnten die beiden Substanzen bereits auf Raumtemperatur äquilibrieren. Durch ihre spezifische Dichte dienten sie der Auftrennung der Blutbestandteile beim Zentrifugieren. Um krankheitsbedingte Einflussfaktoren der Probanden auf deren Granulozyten auszuschließen, wurden dazu anamnestische Angaben festgehalten. Tabelle 5 zeigt die Daten, die von den Testpersonen angegeben wurden.

Ausschlussfragen		
Sind bei Ihnen jemals Infektionskrankheiten wie HIV oder Hepatitis C festgestellt worden?	nein <input type="checkbox"/>	ja <input type="checkbox"/>
Bluten Sie nach einer Verletzung ungewöhnlich stark oder lange?	nein <input type="checkbox"/>	ja <input type="checkbox"/>
Ist bei Ihnen jemals eine Erkrankung des Immunsystems oder eine andere chronische Erkrankung die mit einer Veränderung des Immunsystems einhergeht festgestellt worden?	nein <input type="checkbox"/>	ja <input type="checkbox"/>
Fragen zur Person		
Alter: ____ Jahre Geschlecht: m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/> Körpergröße: ____ cm Gewicht: ____ kg		
Gesundheitsfragen:		
Fühlen Sie sich gesund? Wichtig: bitte teilen Sie uns nachträglich mit, falls Sie sich innerhalb der nächsten zwei Tage krank fühlen!	nein <input type="checkbox"/>	ja <input type="checkbox"/>
Haben Sie sich vor kurzem intensiv körperlich betätigt? (z.B. Sport, mit dem Fahrrad zur Klinik gefahren etc.)	nein <input type="checkbox"/>	ja <input type="checkbox"/>
Haben Sie in letzter Zeit Medikamente eingenommen? Falls ja, wann und welche? _____	nein <input type="checkbox"/>	ja <input type="checkbox"/>
Sind bei Ihnen Allergien bekannt? Falls ja, auf welche Stoffe? _____	nein <input type="checkbox"/>	ja <input type="checkbox"/>
Wurde Ihnen die Milz entnommen?	nein <input type="checkbox"/>	ja <input type="checkbox"/>
Nur für Frauen: Könnten Sie theoretisch schwanger sein?	nein <input type="checkbox"/>	ja <input type="checkbox"/>

Tabelle 5: Anamnestische Angaben der Probanden

Nach Aufklärung und Unterschreiben der Einverständniserklärung der Probanden erfolgte eine Blutabnahme in der Ellenbeuge gemäß dem positiv beschiedenen Ethikvotum (16-101-0322). 7,5 mL des venösen Vollbluts wurden in eine Lithium-/Heparin-Monovette entnommen. Davon wurden wiederum 3 mL vorsichtig in das vorbereitete Zentrifugenröhrchen mit den Spin-Medien pipettiert, möglichst ohne die 3 Schichten zu vermischen. Anschließend wurde das Röhrchen mit 836 g für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Beendigung der Dichtegradientenzentrifugation waren die verschiedenen Blutbestandteile sichtbar aufgetrennt (Abbildung 7). Um das Granulozytenkonzentrat möglichst frei von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), wie Lymphozyten und Monozyten, zu halten, wurden Plasma und Lymphozentrenring abgesaugt. Mit einer 200 µL Pipettenspitze wurden daraufhin 150 µL des Granulozytenrings abpipettiert.

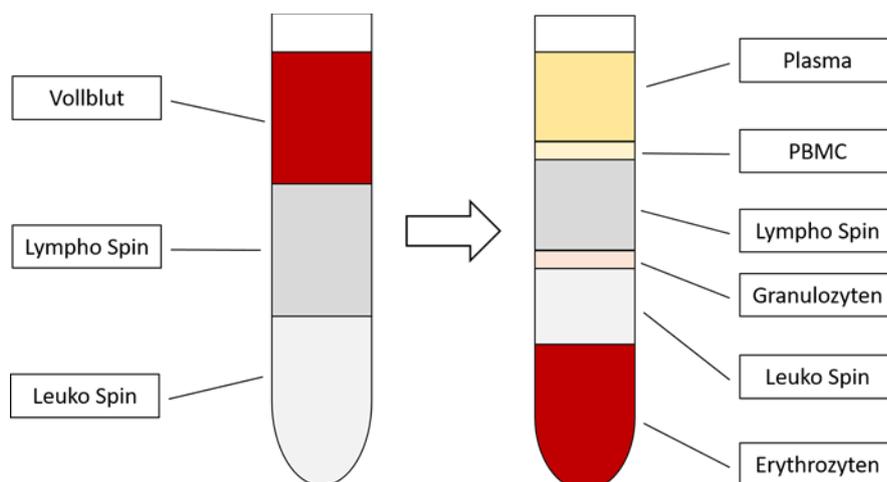


Abbildung 7: Blutprobe mit Lymphospin/Leukospin nach Zentrifugierung. PBMC: periphere mononukleäre Zellen (v.a. Lymphozyten und Leukozyten) modifiziert nach (49).

2.7. Vorversuch mit DHR und NO

Um auszuschließen, dass Stickstoffmonoxid als Radikal den Fluoreszenzfarbstoff DHR direkt oxidiert, wurde am Gerät varioSCAN von Scanlab ein Vorversuch durchgeführt. Dazu wurde die Rhodamin-Fluoreszenz von drei Proben mit NO-begastem PBS, sowie von drei Proben reinem PBS gemessen. Nachdem im SPSS-Programm kein signifikanter Unterschied mittels T-Test ($p=0,68$) festgestellt wurde, konnten die Versuche am Mikroskop und am FACS umgesetzt werden.

2.8. Versuche am Mikroskop

Im folgenden Absatz wird die Methodik des Live-Cell-Imaging am Mikroskop erläutert.

2.8.1. Versuchsvorbereitung

Für die Granulozytenbeobachtung wurde 10 bis 24 Stunden vor Beginn der Mikroskop-Aufnahmen ein Teil der Substanzen bereits gemischt und im Inkubator gelagert. Dazu wurden 20 μL MEM mit 20 μL destilliertem Wasser, 10 μL Natriumbicarbonat und 50 μL RPMI vermischt und bis zum Gebrauch in einem 37 °C warmen Brutschrank inkubiert.

Während die jeweilige Blutprobe am Versuchstag (wie in 2.2.1. beschrieben) 20 min zentrifugiert wurde, konnten bereits die benötigten Farbstoffe DHR (100 μL) und DAPI (10 μL), sowie das Lockmedium fMLP (10 μL) mit RPMI/FKS auf einen Milliliter gebrauchsfertig verdünnt werden. Sobald die 150 μL Granulozytenkonzentrat nach Dichtezentrifugierung zur Verfügung standen, wurde daraus eine Zellsuspension mit 18 Mio Zellen pro mL hergestellt, um eine annähernd einheitliche Zellzahl bei den verschiedenen Versuchen in den IBIDI-Kanälen zu erreichen. Dazu wurden 10 μL des Granulozytenkonzentrats in einer Neubauerkammer ausgezählt.

Durch nochmaliges Zentrifugieren (5 min, 836 g) entstand ein Zellpellet. Dieses wurde mit dem berechneten Volumen an RPMI+FKS resuspendiert. Die Substanz dient den Granulozyten als Nährmedium.

Erst kurz vor Befüllen der Ibidi-Slides wurde die Kollagengelmatrix mit den Zellen fertiggestellt, um eine verfrühte Aushärtung zu verhindern. In den fertigen Ansatz vom Vortag (MEM, Natriumbicarbonat, Dest. Wasser, RPMI) wurden die drei vorverdünnten Fluoreszenzfarbstoffe mit folgenden Volumina beigefügt:

- 10 μL anti-human-Myeloperoxidase Antikörper
- 5 μL DHR
- 3 μL DAPI

6 μL der Zellsuspension wurden nun mithilfe einer Pipette Luftblasen frei in die Kanäle des ibidi Slides appliziert. Dabei blieben die Reservoirs mit Verschlusskappen verdeckt, um ein Austreten in diese zu verhindern. Nach Beendigung des Füllvorgangs wurden die Verschlusskappen bei den Reservoirs entfernt und die Kanäle verschlossen. Das Slide wurde für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurden bereits die Voreinstellungen am Mikroskop getätigt. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationszeit wurden unverzüglich die insgesamt sechs

Reservoirs mit 65 μL der entsprechenden Substanzen befüllt. Der Lockstoff fMLP wurde in die drei linken Reservoirs appliziert. In die drei rechten Reservoirs kam als Nährmedium für die Granulozyten RPMI+FKS. Beim Befüllen der Reservoirs war eine vorsichtige Handhabung notwendig, um das Zellgel innerhalb eines Kanals homogen zu verteilen. Das schrittweise Vorgehen der Befüllung der IBIDI-Slides veranschaulicht Abbildung 8 (Darstellung der Firma IBIDI). Mit welchen Medien die Slides letztendlich befüllt waren, zeigt schematisch Abbildung 9.

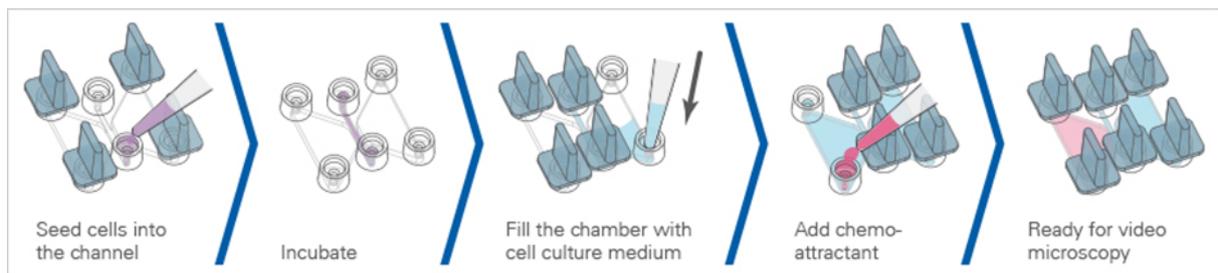


Abbildung 8: Befüllen der IBIDI-Slides (Genehmigung der ibidi GmbH zur Verwendung der Abbildung vorliegend)

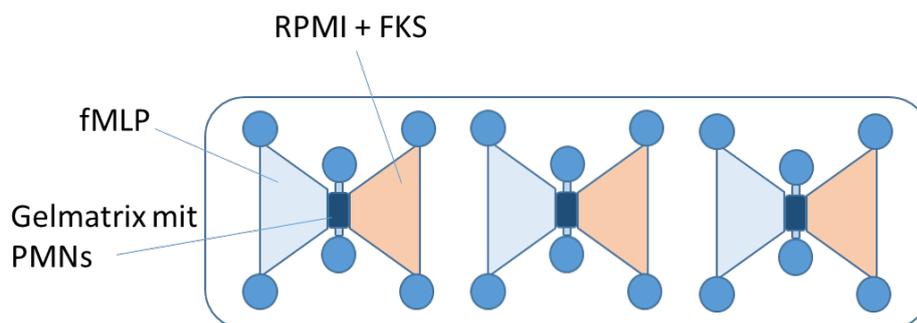


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Ibidi-Platte. Das linke Reservoir wurde mit dem CA fMLP befüllt. Im rechten Reservoir befand sich das Nährmedium, RPMI+FKS. In den mittleren Kanal wurde die Gelmatrix mit den PMNs appliziert. (Eigene Darstellung)

2.8.2. Mikroskopieren

Die Klimakammer wurde je nach NO- oder Kontrollversuch auf die entsprechenden Umgebungsbedingungen eingestellt. Um die Granulozyten mit Stickstoffmonoxid zu beeinflussen, wurde kontinuierlich NO in die Klimakammer des Mikroskops geleitet. Dazu wurde das NO in N_2 mithilfe eines Trajan mit 21 % Partialdruck Sauerstoff gemischt. Für die Kontrollversuche wurde die Klimakammer stattdessen mit Druckluft belüftet. Weiterhin herrschten in beiden Versuchsgruppen definierte Umgebungsbedingungen (Tabelle 6).

CO ₂	5 % Partialdruck
Temperatur	35 °C
Relative Luftfeuchtigkeit	50 %

Tabelle 6: Bedingungen Klimakammer

Innerhalb 6 h 30 min wurden je Ibidi-Kanal alle 30 bis 40 s vier Aufnahmen gemacht (eine im Phasenkontrast sowie drei Fluoreszenzbilder).

2.8.3. Bearbeitung und Aufbereitung der Daten mit der Imaris Software

Um die Aufnahmen des Leica-Mikroskops auswerten zu können müssen die Bilddateien zunächst in quantifizierbare Daten übersetzt werden. Mittels der Imaris® Software können verschiedene Parameter in den unterschiedlichen Aufnahme-Kanälen berechnet und somit vergleichbar gemacht werden.

Zum Bewerten der Migration erkennt ein Algorithmus eine einzelne Zelle und trackt diese über den gesamten aufgenommenen Zeitraum von Bild zu Bild. Abbildung 10 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der getrackten Migration. Da sich das Migrationsverhalten der Granulozyten im zeitlichen Verlauf vermindert, schien eine Unterteilung in 30-minütige Abschnitte sinnvoll. So konnte ein detaillierterer Vergleich erfolgen. Da die Migration nach 2,5 Stunden weitestgehend abgeschlossen war, sind lediglich die ersten 5 Abschnitte bei der Auswertung von Bedeutung. Um mögliche Störfaktoren zu dezimieren, wurden bestimmte Ausschlusskriterien in den Einstellungen festgelegt.

Bei den Fluoreszenz-Aufnahmen wurde mittels der Surface-Funktion die Summe der fluoreszierenden Flächen pro Frame ermittelt. So konnten zeitliche Parameter der jeweiligen Fluoreszenz-Emission innerhalb der gesamten Aufnahme bestimmt werden. Die verhältnismäßig geringen Veränderungen von Frame zu Frame ließen es zu nur jeden 5ten Frames zu berücksichtigen (ca. alle 150 s). In Abbildung 11 ist die mittels Imaris ausgewertete DHR Fluoreszenz abgebildet, Abbildung 12 stellt ein Beispiel der DAPI Fluoreszenz dar.

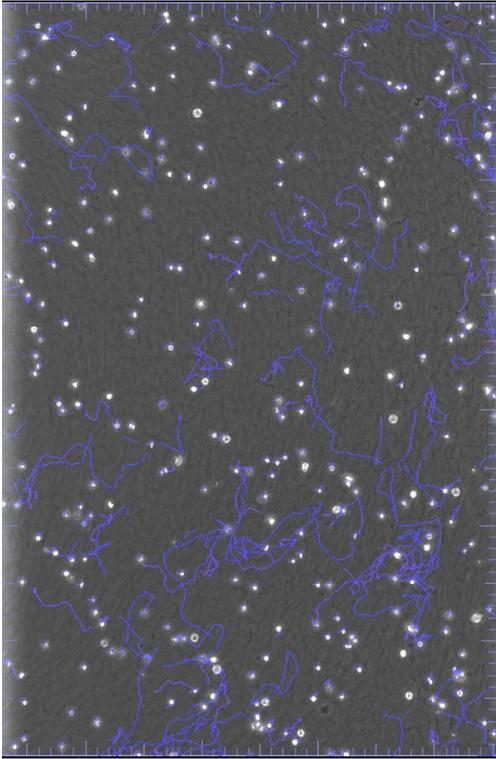


Abbildung 10: Migration mit farbig dargestellten Tracks mittels Imaris Software

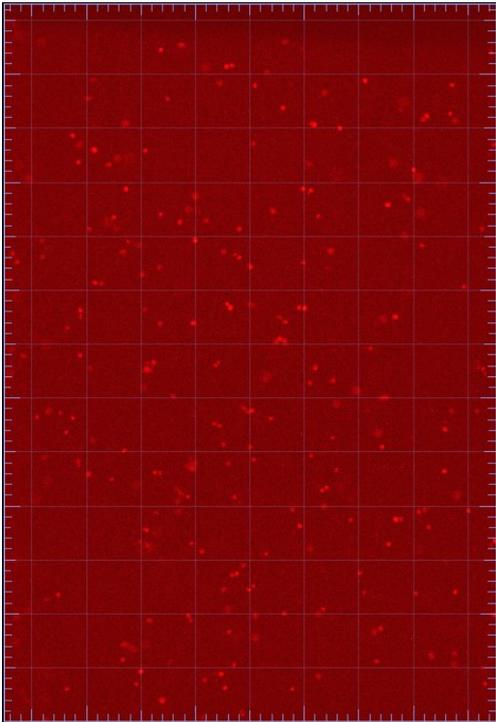


Abbildung 11: Darstellung der DHR Fluoreszenz mittels Imaris Software

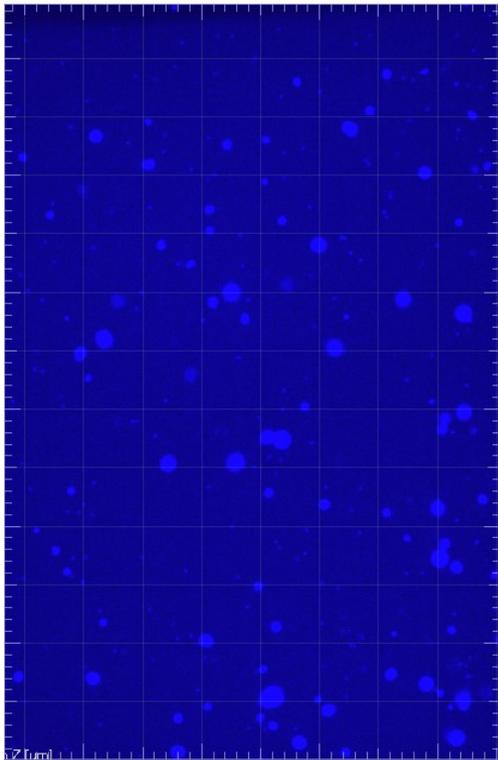


Abbildung 12: Darstellung der DAPI Fluoreszenz mittels Imaris Software

2.8.4. Datenkonvertierung und Statistische Auswertung der ROS-Produktion

Um statistische Unterschiede berechnen zu können musste die Imaris-Datei zunächst in eine Excel-Tabelle exportiert werden. Diese lieferte pro Frame (alle 150 s) eine Flächensumme der Fluoreszenz. Veranschaulicht in einem Graphen (Abbildung 13) ergab sich eine Funktion, deren Maximalwert als Nullstelle in der 1. Ableitung berechnet wurde. Der X-Wert der Nullstelle entsprach dabei dem Zeitpunkt der maximalen Summe an fluoreszierenden Flächen, also dem Zeitpunkt mit der maximalen ROS-Produktion.

Dieser Wert wurde für jeden Kanal jedes Versuches ermittelt. Die statistischen Auswertungen erfolgten im SPSS Programm. Nach Testung auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test folgte entsprechend ein T-Test mit unabhängigen Stichproben bei normalverteilter Variable bzw. der nichtparametrische Man-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilter Variable. Verglichen wurden dabei Granulozyten unter NO-Einfluss mit den Kontrollversuchen. Somit wurde eine dichotome Variable (mit NO vs. ohne NO) auf statistische Unterschiede untersucht, wodurch Mehrfachvergleiche oder Korrelationen hier keine Rolle spielten. Um Verfälschungen der Statistik durch unrealistische Werte zu vermeiden wurden extreme Ausreißer herausgefiltert (Erlaubter Bereich: 30 min > DHR_Tmax > 150 min).

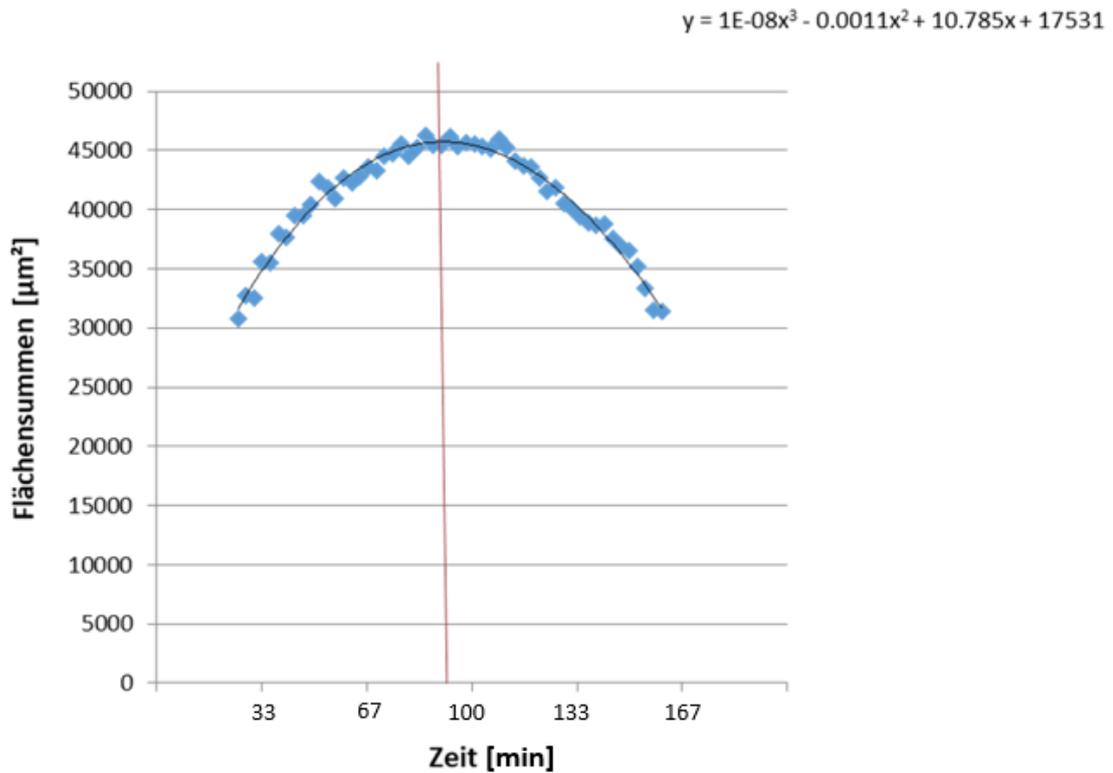


Abbildung 13:: Flächensumme der Rhodamin-Fluoreszenz. Die gemittelte Linie der einzelnen Flächensummen entspricht einer Funktion (siehe oben rechts im Diagramm), mithilfe dieser kann der Maximalwert der Flächensummen entsprechend der Rhodamin-Fluoreszenz gemessen werden.

2.8.5. Datenkonvertierung und statistische Auswertung der NETosis

Die mittel Imaris kreierte Daten wurden in die Software Phoenix übertragen. Diese zeichnete für jeden Kanal jedes Versuchs einen Graphen, bei dem die Summe der fluoreszierenden Fläche gegen die Zeit (ca. alle 150 s) aufgetragen wurde (Abbildung 14). Gleichzeitig lieferte Phoenix verschiedene Parameter, welche in eine Excel-Tabelle konvertiert wurden. Diese Excel-Datei konnte wiederum in SPSS importiert werden. Nachfolgend wurden statistische Berechnungen, wie bei den ROS-Werten beschrieben (2.8.4.), erstellt. Auch hier wurden bei den Berechnungen unrealistische Einzelzellflächen zur Vermeidung einer Ergebnisverfälschung herausgefiltert (erlaubter Bereich: $40 \mu\text{m}^2 \leq \text{ET}_{50}\text{NETosis} \leq 350 \mu\text{m}^2$).

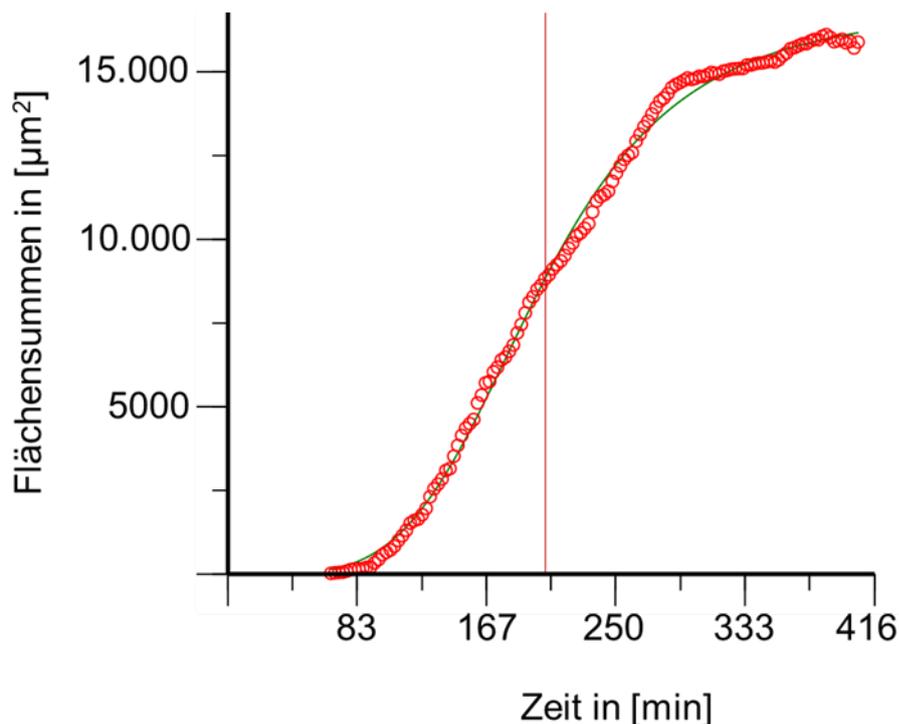


Abbildung 14: Beispielgraph der Phoenix Software zur Ermittlung des $ET_{50}NETosis$. In diesem Beispiel liegt der Zeitpunkt bei 198 min.

2.8.6. Datenkonvertierung und statistische Auswertung der Migration

Zur Auswertung der Migration wurden die von Imaris errechneten Werte wieder in eine Excel-Datei übersetzt. Zur Bewertung des Migrationsverhaltens wurde die Phasenkontrast-Aufnahme eines IBIDI-Kanals in 5 Abschnitte eingeteilt, entsprechend der ersten 5 halben Stunden. Für jede relevante Variable ergaben sich somit 5 zeitlich differenzierte Werte pro Kanal. Folgende Variablen wurden dabei detektiert:

Bei der Track Length handelt es sich um die letztendliche Strecke, die ein Granulozyt im Gel gewandert ist. Die Track Displacement X bzw. Y beschreibt die Entfernung, die der Granulozyt auf der X- bzw. Y- Achse zurückgelegt hat. Mithilfe der Track Straightness lässt sich ermitteln, in welchem Maße die Granulozyten zielgerichtet im Gel migrieren. Der Wert ergibt sich aus dem Quotient der zurückgelegten Entfernung (Track Displacement Length) durch die tatsächliche Wegstrecke der PMNs (Track Length). Die zu beobachtenden Variablen werden in Abbildung 15 veranschaulicht. Nach Import in das Programm SPSS konnten statistische Berechnungen erfolgen. Bei normalverteilter Variable wurde mit einem T-Test verglichen, bei nicht-normalverteilter Variable kam der Man-Whitney-U-Test zum Einsatz.

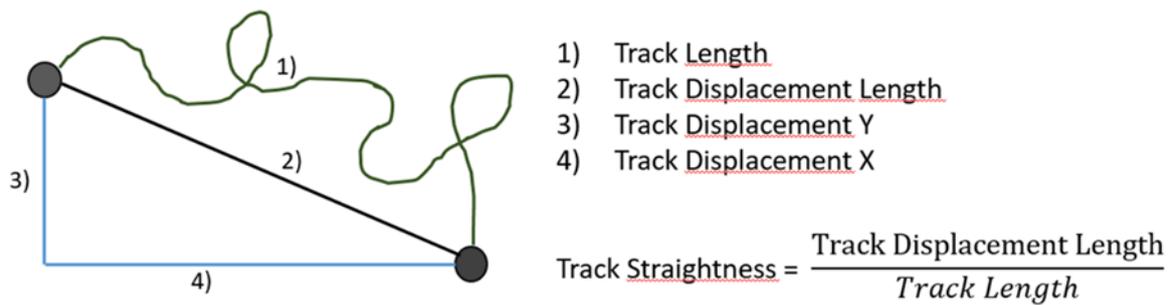


Abbildung 15: Grafische Darstellung der Migrationsvariablen

2.9. Versuche am Durchflusszytometer (FACS)

2.9.1. Versuchsvorbereitung der ROS-Messreihe

Zunächst wurden 5 verschiedenen Probanden, wie in 2.2.1. beschrieben, 7,5 mL Blut entnommen, um nach Zentrifugation isolierte Granulozyten zu erhalten. Bei der Messung der einzelnen FACS-Röhrchen (30-120 s) konnten die Granulozyten mehrerer Probanden an einem Versuchstag untersucht werden. Um hierfür die Granulozyten mit NO in Verbindung zu bringen, wurde eine Methode etabliert, bei der PBS (Phosphat buffered saline) mit NO mittels einer Gaswaschflasche gesättigt wurde. Dieser Puffer wurde im Laufe des Versuchs mit den Granulozyten gemischt. Für die Kontrollproben wurde unbehandeltes PBS verwendet. Insgesamt wurden die Proben für die Messung der ROS-Aktivität 30 min bei 37°C inkubiert. Die Granulozyten mit NO-Beeinflussung kamen dafür in eine Wärmekammer, welche kontinuierlich mit NO begast wurde. Dazu wurde eine Gasflasche mit 200 Vol ppm NO in N₂ verwendet. Um die tatsächliche Intensität der stimulierten ROS-Produktion zu erhalten, wurde die Rhodamin-Fluoreszenz der Granulozyten ohne Stimulus als Leerwert gemessen. So konnte später mit der Differenz gerechnet werden. Zur Positivkontrolle wurde PMA eingesetzt, ein Proteinkinase C Aktivator, welcher die Burstreaktion direkt stimuliert. Bei dem tatsächlich zu untersuchenden Ansatz wurden die Granulozyten mit dem bakteriellen Peptid fMLP stimuliert. Dieses wirkt rezeptorvermittelt als Chemoattractant auf die Granulozyten.

Für eine verbesserte statistische Aussagekraft wurden jeweils Doppelansätze gemessen. Pro Versuch lagen somit 12 FACS-Röhrchen vor, 6 Proben der Kontrollgruppe sowie 6 Proben mit NO als Einflussfaktor. Während der Zentrifugierung

des Vollbluts, wurden zunächst in alle Röhren jeweils 10 µL der beiden Farbstoffe DHR und SNARF vorgelegt. In die fMLP-Ansätze konnten außerdem 10 µL TNF α pipettiert werden. Während das PBS in den Kontrollproben ebenfalls bereits zugegeben werden konnte, wurde das NO-begaste PBS erst kurz vor Zugabe des Granulozytenkonzentrats in die Röhren gefüllt, um eine optimale Sättigung zu gewährleisten. Nachdem alle Röhren mit 1 mL des entsprechenden PBS befüllt waren, konnten 20 µL des Granulozytenkonzentrats der 5 verschiedenen Probanden in die zugeordneten Röhren gegeben werden. Alle Proben inkubierten daraufhin bei 37 °C in einem Wasserbad, die Kontrollgruppe bei Raumluft, die NO-Gruppe in einer kontinuierlich mit NO begasten Kammer. Nach der ersten Inkubation wurde in alle Positivkontrollen 10 µL PMA pipettiert, in die fMLP-Röhren 10 µL fMLP. Für weitere 20 min wurden die Proben nun wieder bei zuvor beschriebenen Bedingungen inkubiert. Um das Ausmaß der Burst-Reaktion bei möglichst gleichem Zeitpunkt zu ermitteln, kamen alle Röhren unmittelbar nach Beendigung der 20-minütigen Inkubation in einen Kühlschrank bei 4 °C für 5 min. Durch den abrupten Temperaturabfall wurde die ROS-Reaktion gestoppt und somit die Menge an fluoreszierendem Rhodamin-123 stagniert. Kurz vor der Messung wurde in jedes Röhren 10 µL Propidiumiodid zur Identifikation der toten Zellen pipettiert. Das Substrat markiert dabei freiliegende DNA. Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung der verschiedenen FACS-Probenansätze.

Doppel-ansatz	Vorge-wärmtes PBS	Zellsu-spension	DHR & SNARF	TNF α	37°C 10 min	fMLP oder PMA	37°C 20 min	PI auf Eis bis zur Messung
LW	1 mL	20 µL	Je 10 µL				x	10 µL
TNF α + fMLP	1 mL	20 µL	Je 10 µL	10 µL		10 µL fMLP	x	10 µL
PMA	1 mL	20 µL	Je 10 µL			10 µL PMA	x	10 µL

Tabelle 7: Burst Versuchsvorbereitung FACS

2.9.2. Versuchsvorbereitung der Antigen-Messreihe

Die Vorbereitung der Messröhrchen mit den 3 Antikörpern für die Oberflächenproteine (AK11b, AK62L, AK66b) verlief parallel zum Punkt 3.3.2. Dabei kamen auch die gleichen 5 Granulozytenkonzentrate in Gebrauch. Wie bei der ROS-Messreihe wurde jeweils mit einem Doppelansatz verfahren. In die Röhrchen zur Messung der Oberflächenproteinexpression kamen von den 3 verschiedenen Antikörpern jeweils 5 μL . Pro Versuchsperson lagen letztendlich 8 Röhrchen vor.

In Tabelle 8 kann die Zusammensetzung und Vorbehandlung der FACS-Röhrchen für die Messung der Antikörper-Expression nachvollzogen werden.

Doppelansatz	Granulozytenkonzentrat	Kaltes PBS (mit CaMg) zentrifugieren 4 °C 3 min 1500 rpm	abkippen, je 5 μL AK CD11b+ CD62L+ CD66b zugeben	15 min bei 4 °C inkubieren	mit PBS zentrifugieren bei 4 °C, 3 min 1500 rpm, abkippen	PBS
LW	20 μL	1 mL			2 mL	200 μL
AK CD11b + CD62L + CD66b	20 μL	1 mL	5 μL		2 mL	200 μL

Tabelle 8: Antikörper Versuchsvorbereitung FACS

2.9.3. Messung am FACS-Gerät

Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer FACSCalibur. Das zugehörige Programm CellQuestPro diente der Datenwiedergabe. Pro Röhrchen wurden 10.000 Zellen gezählt und die entsprechenden Werte erfasst.

2.9.4. Bearbeitung und Auswertung der FACS-Daten

Die mit CellQuestPro erfassten Daten wurden mit der Software FlowJo ausgewertet. In einem ersten Schritt mussten die Granulozyten von anderen Zellpopulationen (Monozyten, Lymphozyten) abgegrenzt werden. Dies geschah durch Differenzierung der Zellgröße (Front Scatter) und der Granularität (Side Scatter). Weiterhin wurden die

PI-markierten, toten Zellen bei der Burst-Messreihe aussortiert. Zur Ermittlung des Ausmaßes der Burst-Reaktion wurde die Intensität der emittierten Fluoreszenz von Rhodamin-123 ausgewertet.

Bei den Antikörper-Messungen wurde die Intensität der Fluoreszenz des jeweiligen Antikörpergekoppelten Farbstoffes detektiert. Abbildung 16 zeigt beispielhaft die graphische Bearbeitung der FACS-Daten mittels FlowJo-Software.

Darauffolgend errechnete das Programm sowohl Median als auch Mittelwert der entsprechenden Fluoreszenzen. Diese Werte wurden in eine Excel-Datei konvertiert und in SPSS importiert. Im Statistikprogramm konnte nun auf signifikante Unterschiede zwischen Proben unter NO-Einfluss und den Kontrollproben getestet werden. Dabei wurde mit T-Test (bei normalverteilten Gruppen) oder mit Man-Whitney-U-Test (bei nicht-normalverteilten Gruppen) analysiert.

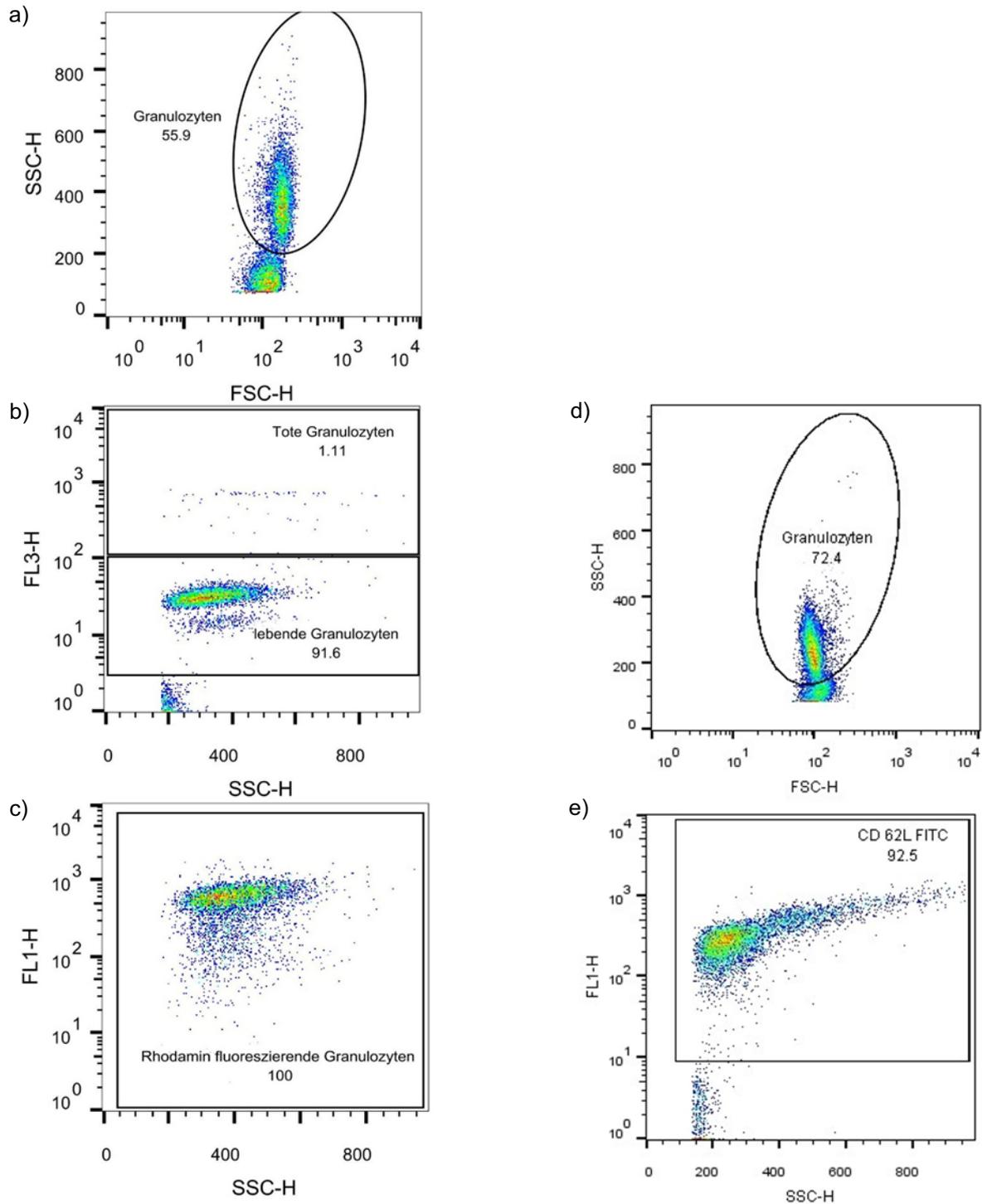


Abbildung 16: Beispiel-Graphen der FlowJo Software: Graph a-c stellt die Beobachtung der ROS produzierenden Granulozyten dar. Dabei wurden zuerst die Granulozyten nach Größe und Granularität von anderen Zellenpopulationen (Lymphozyten, Monozyten) isoliert, darauf folgend konnten die vitalen von den toten Zellen differenziert werden. Graph c zeigt die Quantität der Rhodamin-Fluoreszenz der vitalen Granulozyten. Graph d-e zeigt beispielhaft, wieder nach Isolierung der Granulozyten, die Fluoreszenz des an CD 62L gekoppelten AKs.

3. Ergebnisse

3.1. Probanden

Insgesamt wurden 34 Blutproben im Rahmen dieses Projekts entnommen. Von einigen Probanden wurden mehrmals Proben für verschiedene Versuche entnommen. Tabelle 9 fasst die wichtigsten Daten, welche mittels Fragebogen (Tabelle 5) erhoben wurden, zusammen.

Proben männlicher Probanden	13
Proben weiblicher Probanden	21
Altersspanne	22 – 54 Jahre
Gesund zum Zeitpunkt der Blutentnahme	34

Tabelle 9: Wichtigste Daten der Blutproben-Probanden

3.2. Migration im Mikroskop

Zur Beurteilung des Migrationsverhaltens wurden mehrerer Parameter erfasst und untersucht. Die stetige Abnahme der Migration legte eine zeitliche Unterteilung in 30-Minuten-Abschnitte nahe. Da sich die Migration nach 2,5 Stunden dem Stillstand annäherte, wurden lediglich die ersten 5 Abschnitte untersucht. Um möglichst repräsentative Ergebnisse zu erzielen, wurden in einer Vorauswahl Tracks mit fehlerhaften Werten von der Auswertung ausgeschlossen. Tracks Lengths unter 25 μm sowie Tracks unter 900s Dauer pro Bildserie entfielen unter dem Threshold. Letztendlich konnten so $n=14343$ Tracks der Kontrollgruppe und $n=23749$ Tracks der mit NO begasten Granulozyten in die statistischen Berechnungen miteinbezogen werden. Die Track Length spiegelt das Migrationsverhalten am besten wieder, daher werden diese Ergebnisse im Folgenden ausführlicher erläutert.

3.2.1. Track Length

In Abbildung 17 ist in beiden Gruppierungen eine stetige Abnahme der Track Length zwischen den verschiedenen Zeitfenstern zu erkennen. Dem Graph ist zu entnehmen, dass die Track Length sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der NO-Gruppe initial am längsten ist und im Laufe der Mikroskop-Aufnahme gegen Null geht.

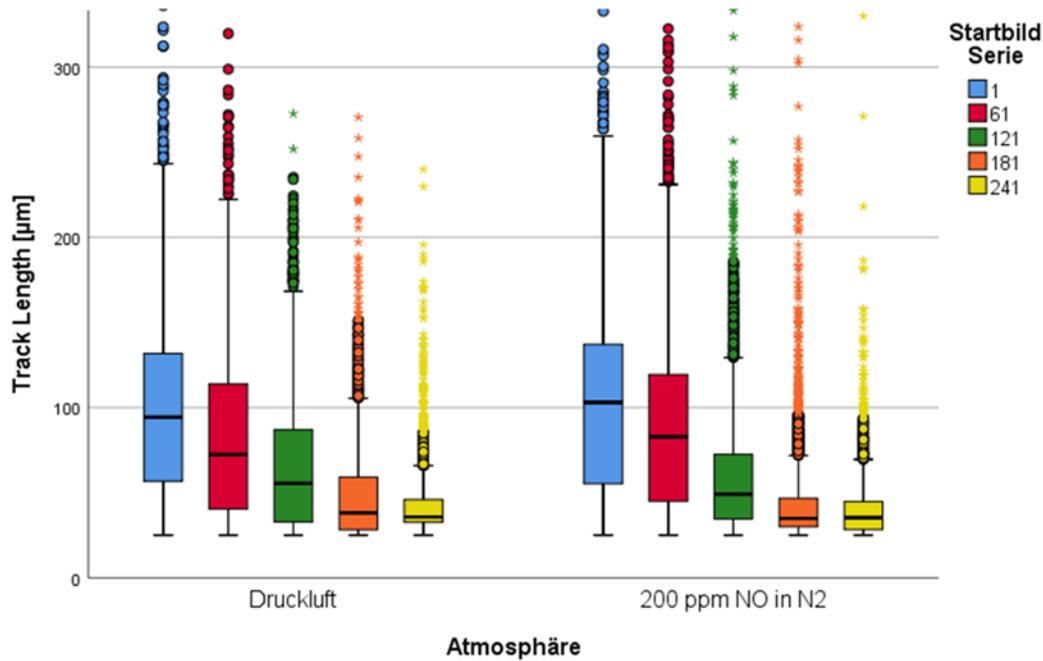


Abbildung 17: Track Length mit **signifikantem Unterschied** der beiden Gruppen, gestaffelt in Bildserien als gruppierter Boxplot. Extremwerte und Ausreißer werden in Form von Kringeln und Sternchen dargestellt. *p-Wert: < 0,001

Die mediane Track Length aller Zeitfenster lag in der Kontrollgruppe bei 53,6 µm, die NO-begasten Granulozyten zeigten einen Mittelwert ihrer Track Length von 56,7 µm. Die Differenz der Mediane beträgt folglich 3,1 µm.

Nach Testung auf Normalverteilung wurde im nicht parametrischen Man-Whitney-U-Test die Nullhypothese abgelehnt ($p < 0,001$), damit ergibt sich eine signifikante Steigerung der Track Length bei den NO-begasten Granulozyten.

In Abbildung 17 ist erkennbar, dass die Werte zwischen den beiden Versuchsgruppen in den ersten beiden Startbildserien 1 (ersten 30 min) und 61 (zweiten 30 min) am deutlichsten differieren. Demzufolge wurden die Track Lengths in diesen Zeitfenstern gesondert auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht, die Ergebnisse werden in Tabelle 10 aufgeführt.

		Druckluft	NO
Startbildserie 1	Anzahl Tracks	3319	5449
	Median [μm]	94,4	102,9
	Differenz der Mediane [μm]	8,5	
	Mann-Whitney-U Signifikanz	0,023	
Startbildserie 61	Anzahl Tracks	3052	6975
	Median [μm]	72,4	82,8
	Differenz der Mediane [μm]	10,4	
	Mann-Whitney-U-Signifikanz	<0,001	

Tabelle 10: Statistische Auswertung der Track Length der ersten beiden Startbildserien 1 und 61

3.2.2. Track Displacement X

Im Median ergab sich in der Kontrollgruppe eine Strecke von 0,088 μm in X-Richtung innerhalb 2,5 Stunden, in der NO-Gruppe waren es -0,010 μm . Bei nicht normalverteilter Variable wurde im Man-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied berechnet ($p < 0,001$).

3.2.3. Track Displacement Y

Der mediane Wert in der Kontrollgruppe lag hier bei 0,383 μm innerhalb 2,5 Stunden, in der NO-Gruppe waren es 0,214 μm . Mittels Man-Whitney-U-Test wurde bei nicht normalverteilter Variable ein Unterschied mit einer Signifikanz von $p < 0,001$ berechnet.

3.2.4. Track Straightness

Der Median in der Kontrollgruppe lag bei 0,077, in der NO-Gruppe bei 0,080. Beim statistischen Vergleich beider Versuchsgruppen mittels Man-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilter Variable ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ($p = 0,724$). Die PMNs unter NO-Einfluss wandern innerhalb des beobachteten Zeitfensters von 2,5 Stunden somit weder mehr, noch weniger zielgerichtet als in der Kontrollgruppe.

3.3. ROS-Produktion im Live Cell Imaging

Im Fehlerbalkendiagramm (Abbildung 18) ist der Vergleich beider Gruppen (Druckluft und NO) der normalverteilten Variable dargestellt. Die Stichprobengröße belief sich hier auf $n = 13$ in der Kontrollgruppe, sowie $n = 34$ in der NO-Gruppe. Der Mittelwert lag

in der Kontrollgruppe bei 86,2 min, in der NO-Gruppe bei 79,8 min. Der T-Test bei unabhängigen Stichproben mit gleichen Varianzen schließt einen statistisch signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von 0,39 aus. Stickstoffmonoxid beeinflusst den Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion der Granulozyten somit nicht signifikant.

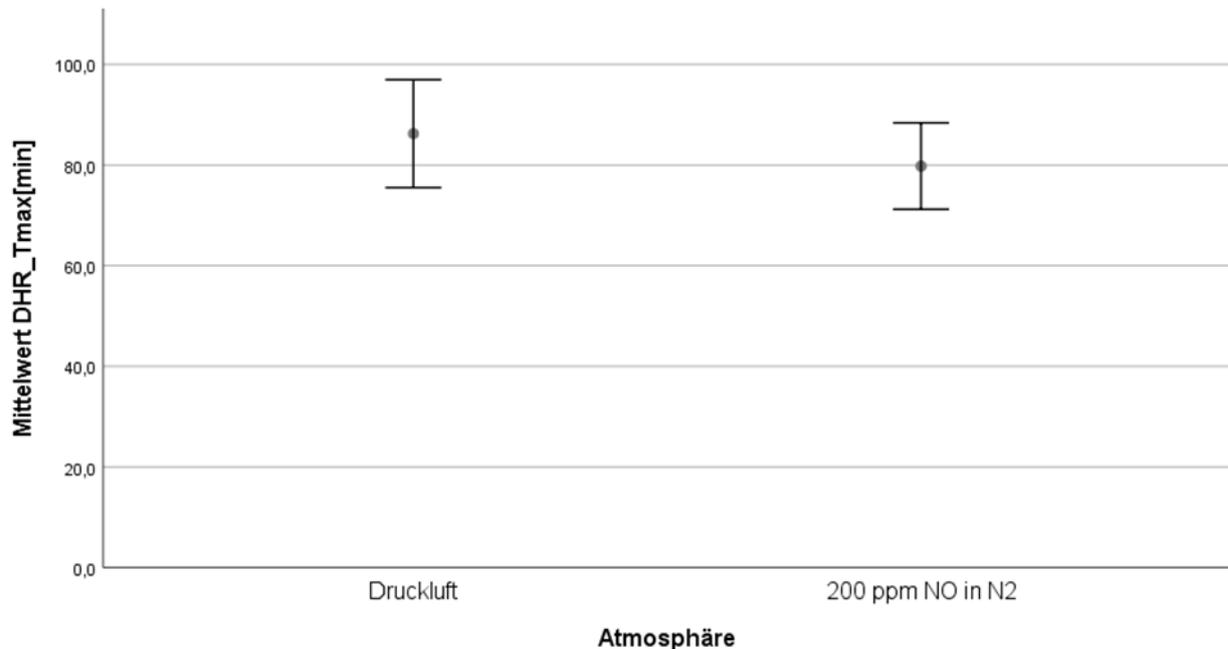


Abbildung 18: Zeitpunkt der maximalen DHR Fluoreszenz mit **nichtsignifikantem Unterschied** der beiden Gruppen

3.4. NETosis im Live Cell Imaging

Nachdem unrealistische Werte innerhalb der Variable $ET_{50}NETosis$ herausgefiltert wurden, blieben 17 Versuche mit Druckluft und 32 Versuche mit NO, deren NETosis-Aktivität verglichen werden konnte.

Der Mittelwert in der Kontrollgruppe (Druckluft) lag dabei bei 214,3 min, in der NO-Gruppe bei 235,6 min. Abbildung 19 zeigt die Gegenüberstellung der Fehlerbalken beider Gruppen.

Statistisch ließ sich im T-Test (beide Gruppen sind normalverteilt) bei gleichen Varianzen kein signifikanter Unterschied nachweisen ($p=0,226$). Somit wurde die NETosis hinsichtlich des Zeitpunktes nicht von NO beeinflusst.

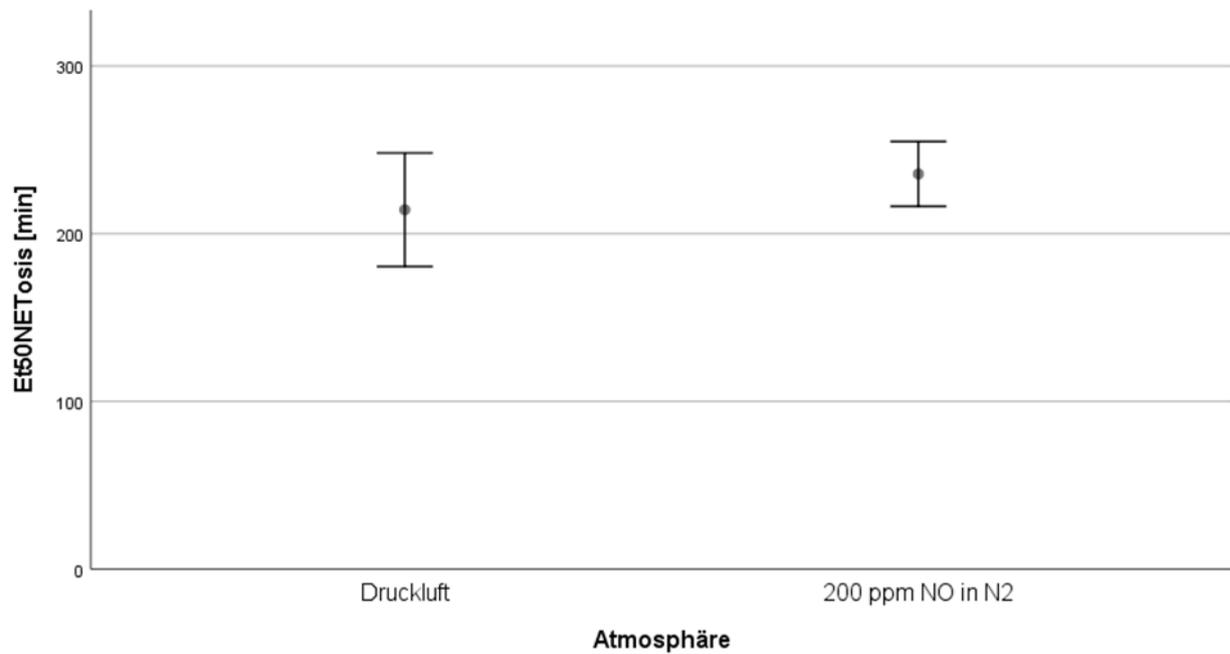


Abbildung 19: Zeitpunkt der maximalen Steigung in der NETosis-Tätigkeit mit **nichtsignifikantem Unterschied**

3.5. Myeloperoxidase- Expression

Eine Auswertung des ET₅₀ der MPO-AK-Fluoreszenz war aufgrund nicht plausiblen zeitlichen Verlaufs nicht sinnvoll.

3.6. FACS-Versuche

3.6.1. Quantifizierung der Burst-Reaktion

Um die Quantität der ROS-Produktion (Burst) mit und ohne NO-Einfluss zu ermitteln, wurde im FACS die Rhodamin-Fluoreszenz gemessen. Die folgenden Ergebnisse zeigen einerseits den Vergleich der Burst-Reaktion nach Stimulation mit fMLP und TNF α , darauffolgend wird der Vergleich der Positivkontrolle nach Stimulation mit PMA aufgeführt.

3.6.1.1. *Stimulierung mittels fMLP*

Bei der Auswertung der im Durchflusszytometer gemessenen Burst-Reaktion nach fMLP-Stimulation konnten insgesamt n=19 Proben mit und ohne NO-Begasung in die Statistik aufgenommen werden.

Nach Testung auf Normalverteilung konnten die Mittelwerte der Intensität der ROS-Produktion nach Stimulation mit fMLP verglichen werden. Dieser lag in der Kontrollgruppe bei 21,7 mfi, in der NO-Gruppe bei 42,7 mfi. Folglich errechnete sich eine Differenz der Mittelwerte von 21,0. Zunächst wurde ein T-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt. Dieser ergab ein statistisch hochsignifikantes Ergebnis von $p < 0,001$, welches in Abbildung 20 ersichtlich wird. Da in der FACS-Versuchsreihe die Zellen einer Versuchsperson sowohl in die Kontrollgruppe als auch in die NO-Gruppe einbezogen wurden, konnte hier zusätzlich ein T-Test mit gepaarten Stichproben durchgeführt werden. Auch hier errechnete sich ein hochsignifikanter p-Wert von $p < 0,001$.

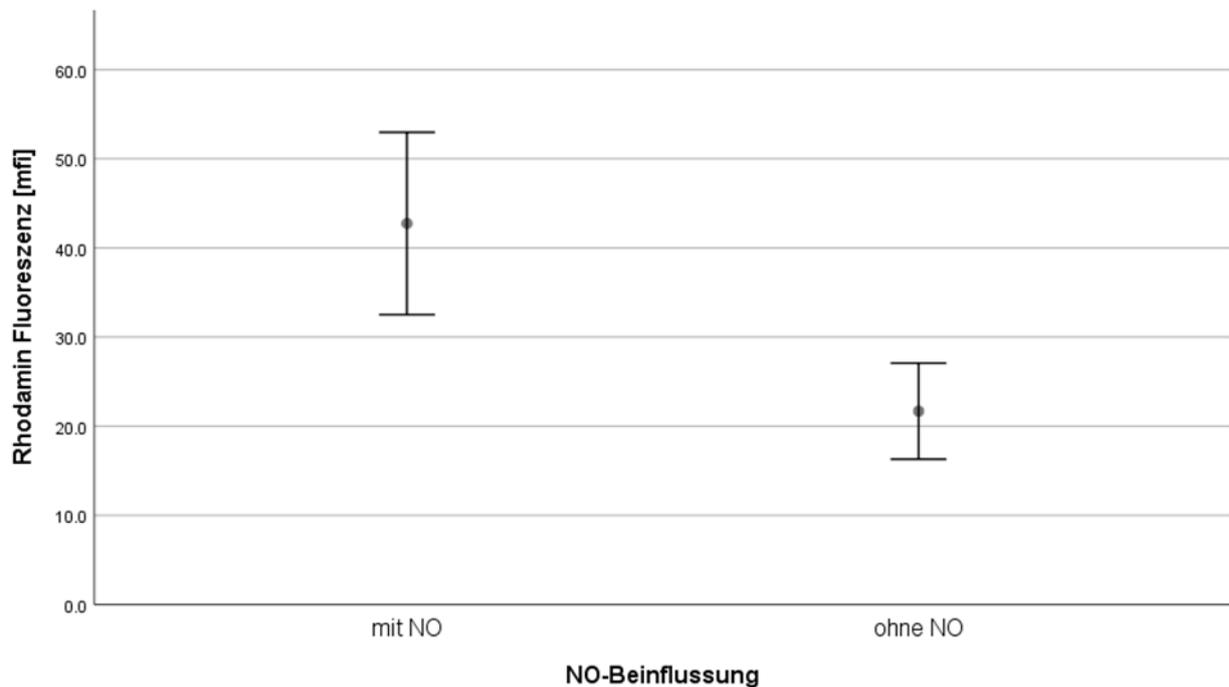


Abbildung 20: Quantität der Rhodamin-Fluoreszenz in mfi (mittlere Fluoreszenz Intensität) nach fMLP Stimulierung mit **signifikantem Unterschied (p-Wert: <0,001)** der beiden Gruppen

3.6.1.2. Stimulierung mittels PMA

Die Stichprobengröße der Röhrrchen ohne NO-Begasung lag bei den PMA-stimulierten Zellen bei n=8, die Anzahl der begasten Röhrrchen war n=9. In der Positivkontrolle mit PMA-Stimulation war die Variable (Intensität der ROS-Produktion) nicht normalverteilt, somit wurden hier die Mediane für den statistischen Vergleich herangezogen. In der Kontrollgruppe lag der mediane Wert bei 359,0 mfi, in den mit NO-begasten Granulozyten bei 319,8 mfi. Statistisch konnte mittels Man-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die Granulozyten nach PMA-Stimulation wurden demzufolge nicht signifikant hinsichtlich der Intensität der ROS-Produktion beeinflusst. Abbildung 21 veranschaulicht den statistischen Vergleich der Rhodamin-Fluoreszenz beider Gruppen.

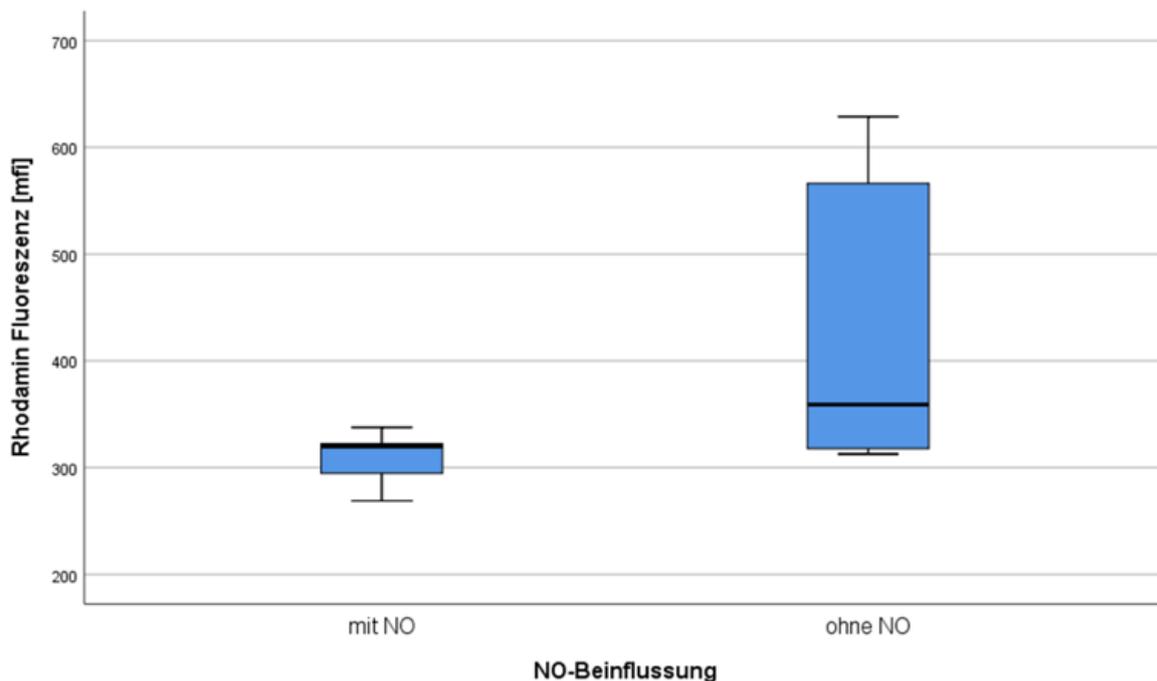


Abbildung 21: Quantifizierung der Rhodamin-Fluoreszenz in mfi (Mean Fluorescence Intensity) nach PMA Stimulierung mit **nichtsignifikantem Unterschied** beider Gruppen

3.6.2. Antikörper- Expression

Im Durchflusszytometer wurde die Expression von drei Antigenen auf der Granulozytenoberfläche gemessen. Dazu wurde die Fluoreszenz entsprechender Antikörper gemessen. Bei der statistischen Auswertung aller drei Oberflächenproteine konnten jeweils n=11 Proben mit und ohne NO-Begasung zum Vergleich herangezogen werden. Die Ergebnisse werden nachfolgend aufgeführt.

3.6.2.1. Antikörper CD11b

Nachdem die Normalverteilung in beiden Gruppen gegeben war, konnten mittels T-Test bei unabhängigen Stichproben die Mittelwerte auf statistischen Unterschied getestet werden. In der Gruppe ohne NO-Begasung wurde im Mittel eine Fluoreszenz von 322,0 mfi gemessen, in der Gruppe mit NO-begasteten Granulozyten ergab sich ein Mittelwert von 359,5 mfi. Nach statistischer Testung konnte sowohl beim T-Test mit unabhängigen Stichproben ($p=0,675$) als auch im verbundenen T-Test ($p=0,462$) kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

3.6.2.2. *Antikörper CD62L*

Die Expression von CD62L war bei den NO-begasten Granulozyten normalverteilt, somit wurden die Mittelwerte mithilfe des T-Tests verglichen. In den Proben ohne NO-Begasung lag der mittlere Wert bei 309,3 mfi, in den NO-begasten Proben bei 293,1 mfi. Ein signifikanter Unterschied konnte bei unabhängigen Stichproben und Annahme gleicher Varianzen mit $p=0,741$ ausgeschlossen werden. Auch der gepaarte T-Test ergab kein signifikantes Ergebnis ($p=0,41$).

3.6.2.3. *Antikörper CD66b*

Die gemessene Fluoreszenz des AK CD66b war in der Gruppe mit NO und in der Gruppe ohne NO normalverteilt. Demnach wurden die Mittelwerte verglichen. In der Gruppe ohne NO lag dieser bei 264,5 mfi, in der NO-Gruppe wurde im Mittel ein Wert von 293,4 mfi gemessen. Ein signifikanter Unterschied ließ sich dabei im T-Test mit unabhängigen Stichproben nicht nachweisen ($p=0,555$). Die Varianzen waren in beiden Gruppen gleich. Im gepaarten T-Test wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt ($p=0,12$).

4. Diskussion

4.1. Limitationen der gewählten Methodik

In vitro Laborversuche gehen grundsätzlich mit dem Nachteil einher, die physiologischen Bedingungen nicht exakt reproduzieren zu können.

In der Mikroskop-Klimakammer war von einer ungefähren Volumenkonzentration von 160 ppm NO auszugehen (200ppm in N₂, gemischt mit 21 Vol.% O₂). Aufgrund der geringen Größe des Moleküls NO und der guten Diffusionseigenschaften (50) konnte das Gas in die Gelmatrix mit den PMNs diffundieren. Im klinischen Kontext wird NO als Inhalationsgas bei pulmonaler Hypertonie in geringeren Mengen eingesetzt (20 bis 45 ppm) (42). Um die genaue NO-Konzentration zu messen, kommen in verschiedenen Studien meist Clark-type-NO-Elektroden zum Einsatz (51,52). Eine derartige Messung der NO-Konzentration in der Gelmatrix der Ibidi-Slides war in diesem Versuchsaufbau nicht möglich. Zudem war das Ziel dieser Arbeit, zu überprüfen, ob NO generell einen Einfluss auf genannte Granulozytenfunktionen hat, weshalb eine supratherapeutische NO-Konzentration bei den Versuchen angestrebt wurde. NO wurde als dichotome Variable untersucht, so wurde von einer Variierung der NO-Konzentration abgesehen.

Bei den FACS-Versuchen wurde der Puffer PMS in der NO-Gruppe mittels Gaswaschflasche mit NO gesättigt, was bei Raumtemperatur (20°C) einer Konzentration von etwa 50 g/L entspricht (53).

Im Rahmen der Granulozytenisolierung kam mehrmals eine Dichtegradientenzentrifugation zum Einsatz. Eine Studie von Willnecker et al. konnte in diesem Zusammenhang eine Voraktivierung der Granulozyten durch Zentrifugation nachweisen, welche im Vergleich zur Micro Bead Isolierung zu höheren Werten der Track Length führten (54). Dieser Sachverhalt sollte bei Vergleich der Granulozytenfunktionalität von Studien mit differierender Isolationsmethodik beachtet werden. Die Dichtegradientenzentrifugation stellt jedoch nach wie vor eine Standardmethode zur Isolierung von Granulozyten dar und wurde daher auch in dieser Studie zur Granulozytenisolierung angewandt (55–57).

Da die einzelnen Kanäle eines Ibidi Slides nicht getrennt begast werden konnten, konnte bei der Mikroskop-Versuchsreihe kein gepaarter statistischer Vergleich (im Sinne eines gepaarten t-Tests) innerhalb eines Versuchs stattfinden. Somit wurden die

Granulozyten einer Versuchsperson entweder als Kontrollversuch mit Druckluft umgeben oder mit NO begast. Da die interindividuellen Unterschiede der neutrophilen Granulozyten bereits variabel sind, ist dieser Sachverhalt zu beachten (58).

Im Gegensatz dazu konnten bei den durchflusszytometrischen Versuchen die Granulozyten einer Versuchsperson sowohl in der Kontrollgruppe, als auch mit NO beeinflusst parallel untersucht werden. Dies hatte den Vorteil, dass bei den statistischen Auswertungen gepaarte Vergleiche angewandt werden konnten. Auf diese Weise wurden interindividuell variierende Eigenschaften der Granulozyten eliminiert, da immer auf die eigene Kontrolle Bezug genommen wurde

fMLP führt bei in vitro Versuchen zu einer, mit früheren Arbeiten vergleichbaren Aktivierung der Granulozytenfunktionalität, inklusive Migration, oxidativem Burst und NETosis, und wurde daher bereits in vielen Studien als CA eingesetzt (59–63). Auch in dieser Arbeit wurde fMLP als CA verwendet. Die Aktivierung der PMNs bezüglich Migration, ROS-Produktion und NETosis durch fMLP konnte bestätigt werden. Dabei wurden Konzentrationen von 10 μM gewählt. Verschiedene Studien konnten ebenfalls eine Aktivierung bei identischer Konzentration nachweisen (64–66). Grundsätzlich reichten die verwendeten Konzentrationen in diversen Studien von 10 nm (67,68) bis zu 10 μM (64–66). Herrmann et al. beobachteten beispielsweise erst bei einer fMLP Konzentration von 10 μM die Freisetzung bakterizider Substanzen, welche bei Konzentrationen von 10 nM ausblieb (69). In einer Studie von Cundell et al. wurde ebenfalls eine Konzentration von 10 μM fMLP gewählt, um den oxidativen Burst mittels Chemilumineszenz zu untersuchen (70). Des Weiteren nutzten Neeli et al. bis zu 10 μM fMLP Konzentration, um die Citrullinierung granulozytärer Histone zu induzieren (61). Auch Itakura et al. stimulierten PMNs mit einer Konzentration von 10 μM fMLP zur NETosis (60). In unserer Arbeitsgruppe wurden sowohl Konzentrationen von 10 nm (63) als auch von 10 μM (71,72) eingesetzt. Abschließend lässt sich in Bezug auf die fMLP Konzentration zusammenfassen, dass Granulozyten von 10 μM fMLP aktiviert werden und so Migration, oxidativer Burst und NETosis beurteilt werden können.

Ursprünglich war für die Mikroskop-Versuche neben der Fluoreszenzmessung von DHR und DAPI auch die Untersuchung des ET_{50} -Wertes der Myeloperoxidase-Expression vorgesehen. In der Auswertung mittels Imaris- Software zeigte sich dabei

jedoch, dass die MPO-AK-Fluoreszenz keinen schlüssigen zeitlichen Verlauf ergab. Als Marker für die NETosis sollte die Expression der Myeloperoxidase kongruent zum zeitlichen Verlauf der NETosis ablaufen (73,74). Da der $ET_{50}MPO$ -Wert hier jedoch meist einen Zeitpunkt nach dem $ET_{50}NETosis$ -Wert angab, sind die Ergebnisse nicht plausibel und somit nicht zu verwerfen. Eine mögliche Erklärung für diese Befunde ist eine mutmaßliche Frequenzüberlagerung anderer Zelltypen, wie Lymphozyten und Monozyten, die auch durch Justierung der Thresholds nicht ausreichend herausgefiltert werden konnten.

4.2. Effekte von NO auf neutrophile Granulozyten

NO nimmt eine kontrovers diskutierte Rolle im menschlichen Organismus ein. Während einerseits inhibierende Effekte von NO auf neutrophile Granulozyten postuliert werden (32,45), gibt es andererseits stimulierende Auswirkungen auf die Zellen (43,44,48). Dabei ist eine Differenzierung in Bezug auf die NO-Konzentrationen wichtig. Unterschiedliche Konzentrationen variieren in ihrer physiologischen Wirkung im Gewebe. So haben bereits niedrige Konzentrationen ($\text{NO} < 1\text{-}30 \text{ nM}$) einen Effekt auf die Signaltransduktion, während bei der Pathogen- und auch bei der Tumor-Bekämpfung hohe NO-Konzentrationen ($\text{NO} > 1 \text{ microM}$) durch Aktivierung der iNOS von Makrophagen freigesetzt werden (75,76). PMNs, ebenfalls Teil der unspezifischen Immunantwort, sind somit in entzündetem Milieu von NO umgeben. In der vorliegenden Studie wurden die PMNs ebenfalls hohen NO-Konzentrationen ausgesetzt. In Anbetracht der angewandten Methode ist von Konzentrationen um 160 ppm (siehe 4.1) auszugehen.

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass NO einen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an mikrovaskulärem Endothel hat. So untersuchte eine Studie von Hickey et al. die Leukozytenrekutierung in iNOS-defizienten Mäusen und konnte dabei eine erhöhte Leukozytenadhärenz an den mikrovaskulären Gefäßen nachweisen (77). Kubes et al. beschrieben eine deutliche Zunahme der Leukozytenadhäsion an Katzenmesenterialvenen nach Inhibierung der eNOS (32). Auch Suematsu et al. untersuchte in vivo Mechanismen, die zur Suppression der Leukozytenaktivierung in Rattenmesenterialvenen nach Hemmung der endothelialen NO-Produktion führten. Dieser Effekt konnte jedoch unter anderem durch Vorbehandlung mit Antikörper gegen CD18 auf der PMN-Oberfläche unterdrückt werden (78). Eine ähnliche Studie von Akimitsu et al. beobachtete in Venolen von Ratten ebenfalls eine gesteigerte Leukozytenadhäsion nach Hemmung der NO-Synthase. Auch hier konnte die Wirkung der NOS-Inhibierung mithilfe von CD18-Antikörper aufgehoben werden (80). Dieser Sachverhalt legt wiederum nahe, dass eine verminderte NO-Konzentration über eine vermehrte Expressierung besagter Oberflächenproteine zur Zunahme der Leukozytenaktivierung führt. Im Umkehrschluss wäre eine verminderte Expressierung von CD18 durch erhöhte NO-Konzentrationen anzunehmen. Da CD18 und CD11b Bestandteil eines Integrins (Mac-1) darstellen (79), sollte diese Vermutung auch auf CD11b übertragbar sein, welches in dieser Arbeit

durchflusszytometrisch untersucht wurde. Eine Inhibierung der CD11b-Expression auf der PMN-Oberfläche konnte jedoch in dieser Studie nicht bestätigt werden. Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich der CD11b-AK-Fluoreszenz nach NO-Stimulierung nachgewiesen werden. Auch die beiden anderen, hier untersuchten Proteine CD62L und CD66b zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Expression. Dabei muss jedoch der relevante Unterschied des Studiendesigns beachtet werden. Während in den zitierten Studien die *in vivo* Leukodiapedese untersucht wurde (32,77,78,80), konnte in dieser Studie isoliert die Expression der verschiedenen Oberflächenproteine nach NO-Stimulierung *in vitro* beurteilt werden. Die Effekte der NOS-Inhibitoren auf die Leukozytenrekrutierung scheint mit Blick auf die vorliegende Arbeit auf einem komplexeren Zusammenhang zu basieren, als dem direkten Einfluss der NO-Konzentration auf die Expression der besagten Oberflächenproteine.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass hohe NO-Konzentrationen ($> 1 \mu\text{M}$) zu oxidativem Stress und nitrosativem Stress führen können (76,81,82). Andererseits wurden auch protektive Effekte von NO bei oxidativem und nitrosativem Stress beobachtet (83). Dass NO einen wichtigen Einfluss im menschlichen Organismus und hier vor allem auch in entzündetem Gewebe zu haben scheint, wurde bereits in mehreren Studien erforscht (84–86).

Clancy et al. untersuchten in einer Studie den Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies der PMNs. Dabei konnte er nachweisen, dass NO durch Hemmung der NADPH-Oxidase die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies hemmt. Die Messung der ROS-Freisetzung erfolgte zum einen an vitalen isolierten PMNs. Es zeigte sich dabei eine Abnahme der Superoxid-Freisetzung bei vorheriger Inkubation in NO-gesättigtem Puffer. Zur genaueren Untersuchung wurde zusätzlich die zellfreie NADPH-Oxidase mit NO beeinflusst und anschließend wiederum die Sauerstoffradikal-Konzentration gemessen (45).

Die FACS Versuche der vorliegenden Arbeit zeigen im Gegensatz zu Clancy et al. eine signifikante Steigerung der ROS-Produktion. Dabei sind jedoch die Unterschiede des Versuchsaufbaus zu beachten. Clancy et al. führte Versuche mit NO Beeinflussung vor und nach Stimulierung mit Arachidonsäure durch. In den Ergebnissen zeigte sich dabei, dass die NADPH-Oxidase bei 5-minütiger Inkubation mit NO vor der Aktivierung eine signifikante Inhibierung der ROS-Produktion hervorrief. In dieser Studie wurden die PMNs bereits vor NO-Beeinflussung mit fMLP stimuliert. Bei den Versuchen von

Clancy et al. mit gleichzeitiger Gabe von NO und Arachidonsäure zeigte sich jedoch kein Effekt. Dies deutet darauf hin, dass NO die NADPH-Oxidase nur dann hemmt, wenn membranständige und zytosolische Komponenten der NADPH-Oxidase noch getrennt in unstimuliertem Zustand vorliegen (45). Bei bereits aktivierten PMNs führt NO laut den Ergebnissen dieser Studie zu einer vermehrten ROS-Produktion.

Einige Forschungsgruppen und Autoren postulieren ebenfalls einen entzündungsfördernden Effekt von NO (47,84,87). Vor allem große Mengen NO können eine Inflammationsreaktion potenzieren. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die NO-Wirkung von diversen Faktoren abhängig ist. So sind vor allem der zelluläre Kontext, der Zeitpunkt des NO-Einflusses und vorhergehendes Priming der zu untersuchenden Zellen von Bedeutung (84). Von besonderer Relevanz scheint auch die NO-Konzentration zu sein, da mehrere Studien eine konzentrationsabhängige Inhibierung sowie Stimulierung des reaktiven Bursts an PMNs beobachteten (88–90). Dies erschwert eine Vergleichbarkeit von Studienergebnisse mit unterschiedlicher Methodik, unterschiedlichen Stimuli und Konzentrationen. Die Ergebnisse der FACS-Versuche der vorliegenden Arbeit unterstützen die These eines entzündungsfördernden Effekts von NO im Sinne einer vermehrten ROS-Produktion durch PMNs.

Verschiedene Studien konnten eine ROS induzierte ROS-Freisetzung (RIRR) belegen (48,91,92). Als Unterform der RNS ist NO hinsichtlich pathophysiologischer Prozesse eng mit ROS verbunden. Bei der Aktivierung von PMNs wird neben ROS durch Stimulierung der iNOS auch NO freigesetzt (35,46,93). Andersherum entstehen ROS auch nach Aktivierung der NOS (94). Beide Radikalgruppen wirken oxidierend. Im Sinne einer positiven Feedbackschleife stellt dies einen Erklärungsansatz für die vermehrte ROS-Freisetzung bei den hier durchgeführten FACS-Versuchen dar: NO könnte gleichermaßen wie bei RIRR zu vermehrter ROS und RNS Freisetzung durch PMNs führen. Ein solcher Zusammenhang zwischen NO und oxidativem Stress wird in einem Artikel von Kuklinski beschrieben (87).

Auch Wink et al. beschreiben NO als indirekten Mediator für nitrosativen und oxidativen Stress (95), welcher unter anderem durch die Stimulierung des reaktiven Bursts von PMNs erklärbar wäre.

Eine Studie von Manda-Handzlik et al. beobachtete kongruent zu den hier resultierenden Erkenntnissen eine Zunahme der Bildung von ROS unter NO-Einfluss (44).

Die Frage, ob NO nun stimulierende oder inhibierenden Effekte auf die ROS-Produktion von PMNs hat, scheint weiterhin nicht abschließend geklärt und lässt komplexe Mechanismen und weitere Einflussfaktoren wie beispielsweise Zeitpunkt des maximalen NO-Effektes bzw. vorheriges Priming (45,84) und NO-Konzentration (88–90), vermuten.

Nachdem eine Beeinflussung der Quantität der ROS-Produktion durch NO bereits untersucht wurde (45), sind weitere Variablen an dieser Stelle von Interesse. So konnte in dieser Studie mithilfe der Mikroskopversuchsreihe zusätzlich der zeitliche Aspekt des reaktiven Bursts beurteilt werden. Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Effekte von NO auf den Zeitverlauf der ROS-Produktion. Es ist also davon auszugehen, dass es im Rahmen der mikrobiellen Bekämpfung durch Sauerstoffradikale zu keiner Verzögerung oder Beschleunigung unter NO-Einfluss kommt. Dies ist unter anderem relevant, da es in entzündlichem Milieu auch zur Aktivierung der iNOS mit konsekutiver NO-Freisetzung kommt (35,46).

Auch im Hinblick auf therapeutisch eingesetzte NO-Inhalation beispielsweise bei Lungenversagen (96), spielt die Wirkung von NO auf inflammatorische Prozesse eine Rolle. Betroffene Patienten sind oft multimorbide und infektanfällig. Eine Hemmung der Erregerbekämpfung durch PMNs wäre hier von entscheidendem Nachteil und müsste in die Risikostratifikation bei NO-Inhalation einbezogen werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen jedoch weder eine zeitliche Verzögerung noch eine Hemmung bezüglich Quantität der ROS-Produktion von PMNs. Im Gegenteil deuten die Ergebnisse der FACS-Versuche auf eine verstärkte Bildung von ROS hin. Dies könnte im klinischen Kontext zu einer Zunahme des oxidativen Stresses bei NO-inhalierenden Patienten im Rahmen inflammatorischer Prozesse führen. Da unter anderem auch Herz-Thorax-chirurgische Patienten im Rahmen einer pulmonalen Hypertonie mit inhalativem NO behandelt werden und die Entzündungsaktivität postoperativ generell bereits erhöht ist, sollte der ROS-fördernde Effekt von NO hier beachtet werden und gegen den Nutzen einer solchen Behandlung abgewogen werden (42,97).

Zur Frage, ob NO die NETosis der PMNs beeinflusst, gibt es bisher nur wenige veröffentlichte Studien. Mithilfe der Mikroskop-Versuche dieser Arbeit konnte über Fluoreszenzmessung der Zeitpunkt ermittelt werden, an dem die NETosis Aktivität

maximal ansteigt. Die Ergebnisse zeigten hier keinen Unterschied betreffend zeitlicher Parameter der NETosis während NO-Einfluss bei vorheriger Aktivierung der PMNs. Vergleicht man diesen Sachverhalt mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie zur ROS-Produktion unter NO-Beeinflussung, so sind die Erkenntnisse hierzu kongruent. Weder ROS-Produktion, noch NETosis werden durch NO stimuliert oder inhibiert, was die zeitliche Komponente betrifft. Da die Bildung von NETs maßgeblich durch reaktive Sauerstoffspezies initiiert wird, ist dies nachvollziehbar (23). Da im Rahmen des reaktiven Bursts neben ROS auch RNS freigesetzt werden und die beiden Radikal-Gruppen physiologisch ähnlich wirken, wäre ein aktivierender Effekt von RNS, inklusive NO, theoretisch ebenfalls möglich. Auch Patel et al. untersuchten die Wirkung von NO auf die NETosis neutrophiler Granulozyten. Hier wurden PMNs mit den NO-Donoren Natrium-Nitroprussid (SNP) und S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) stimuliert, was indirekt zu einer Initiierung der NETosis führte. Der zugrundeliegende Mechanismus lag dabei in einer NO-vermittelten ROS-Produktion. Die reaktiven Sauerstoffradikale führten somit letztendlich zur Bildung der NETs (43). Ein wesentlicher Unterschied zur vorliegenden Arbeit lag dabei in der Absenz einer vorherigen Aktivierung der PMNs mit einem Chemoattractant wie fMLP. So kann davon ausgegangen werden, dass die NETosis in beiden Studien letztendlich durch ROS aktiviert wurde. Während Patel et al. die PMNs direkt mit NO zur ROS-Produktion anregte, wurde in dieser Arbeit fMLP als Aktivator der ROS-Produktion eingesetzt. In beiden Versuchsreihen führten die ROS vermutlich letztendlich zur NETosis. Patel et al. konnten somit die Einleitung der NETosis durch NO-Donoren nachweisen. Eine weitere Studie von Manda-Handzlik et al. untersuchten ebenfalls die Wirkung von RNS und NO auf die granulozytäre NETosis. Im Einklang mit den Ergebnissen von Patel et al. konnte hier ein stimulierender Effekt von NO auf die NETosis nachgewiesen werden. Besagter Effekt lag auch hier einer ROS-abhängigen Induktion der NETosis zugrunde (43). Zusätzlich konnten Manda-Handzlik et al. nicht nur einen stimulierenden, sondern auch einen potenzierenden Effekt bei bereits aktivierten PMNs zeigen. Die potenzierende Wirkung war hierbei jedoch abhängig vom verwendeten Stimulus. Getestet wurden unter anderem PMA, TNF-alpha, PAF, IL-8, CI. Nur bei PMA und CI konnte hierbei eine weitere Potenzierung durch NO erreicht werden. fMLP kam in dieser Studie nicht zum Einsatz (44). Der hier angewandte Versuchsaufbau zeigt unterdessen, dass NO bei fMLP-stimulierten PMNs zu keiner beschleunigten Freisetzung der NETs mehr führt.

5. Zusammenfassung

Die bisherige Studienlage macht bereits die kontrovers diskutierte Thematik des NO-Einflusses auf PMNs deutlich. In dieser Studie konnte der zeitliche Aspekt der Migration, ROS-Produktion und NETosis neutrophiler Granulozyten unter NO-Einfluss beleuchtet werden. Dabei wurde gezeigt, dass NO bei vorheriger Stimulierung der neutrophilen Granulozyten keinen Einfluss auf die zeitliche Komponente ihrer Funktionalität hat. Andererseits weisen die Versuche am Durchflusszytometer eine Zunahme der ROS-Produktion bei Vorbehandlung mit NO nach.

6. Ausblick

Die komplexe Einflussnahme von NO auf Granulozyten bleibt weiterhin ein zentrales Forschungsthema, da die genauen Mechanismen und weitere einflussnehmende Faktoren noch immer nicht abschließend geklärt sind. Von besonderem Interesse ist dabei eine Untersuchung weiterer Faktoren, die die Wirkung von NO möglicherweise modulieren. Zu denken wäre hier unter anderem an variierende NO-Konzentrationen, sowie NO-Einfluss vor und nach Aktivierung der PMNs. Auch die Wahl des Chemoattractants scheint die Wirkung von NO auf die Granulozyten zu beeinflussen und stellt somit ein mögliches zukünftiges Forschungsthema dar.

7. Literaturverzeichnis

1. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu Rev Immunol*. 26. März 2012;30(1):459–89.
2. Yin C, Heit B. Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules. *Cell Tissue Res*. 1. März 2018;371(3):455–71.
3. Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*. 24. November 2010;33(5):657–70.
4. Ley K, Smith E, Stark MA. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res*. 1. März 2006;34(3):229–42.
5. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1. Dezember 2012;4(12):a008250–a008250.
6. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. September 2007;7(9):678–89.
7. Marshall BT, Long M, Piper JW, Yago T, McEver RP, Zhu C. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature*. Mai 2003;423(6936):190–3.
8. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the Arrest of Lymphocytes Rolling Under Flow Conditions. *Science*. 16. Januar 1998;279(5349):381.
9. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol*. Januar 2010;17(1):9–17.
10. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*. 27. November 2006;203(12):2569–75.
11. Carman CV, Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol*. 25. Oktober 2004;167(2):377–88.
12. Muller WA. Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*. 1. Juni 2003;24(6):326–33.
13. Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, Fox P, Nagy JA, Dvorak HF. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *J Leukoc Biol*. Januar 1996;59(1):100–15.

14. Kang T, Yi J, Guo A, Wang X, Overall CM, Jiang W, u. a. Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J Biol Chem*. 15. Juni 2001;276(24):21960–8.
15. Brieger K, Schiavone S, Miller Jr, Krause K. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* [Internet]. 17. August 2012 [zitiert 3. August 2022]; Verfügbar unter: <http://doi.emh.ch/smw.2012.13659>
16. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The Neutrophil NADPH Oxidase. *Arch Biochem Biophys*. 15. Januar 2002;397(2):342–4.
17. Babior BM. The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J IMAJ*. November 2002;4(11):1023–4.
18. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. Modeling the Reactions of Superoxide and Myeloperoxidase in the Neutrophil Phagosome: *IMPLICATIONS FOR MICROBIAL KILLING*. *J Biol Chem*. 29. Dezember 2006;281(52):39860–9.
19. Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. *Antioxid Redox Signal*. 13. August 2012;18(6):642–60.
20. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 5. März 2004;303(5663):1532–5.
21. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. Februar 2018;18(2):134–47.
22. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, u. a. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. Levitz SM, Herausgeber. *PLoS Pathog*. wilnecker;
23. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, u. a. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 15. Januar 2007;176(2):231–41.
24. Boeltz S, Amini P, Anders HJ, Andrade F, Bilyy R, Chatfield S, u. a. To NET or not to NET:current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. März 2019;26(3):395.
25. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Rep*. 7. August 2014;8(3):883–96.
26. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell*

Biol. 1. November 2010;191(3):677–91.

27. Förstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal in: *Biological Chemistry Band 387 Heft 12* (2006). 2006.
28. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 1. August 2001;357(3):593–615.
29. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 1. Februar 2005;26(1):33–65.
30. Farah C, Michel LYM, Balligand JL. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol.* Mai 2018;15(5):292–316.
31. Riddell DR, Owen JS. Nitric Oxide and Platelet Aggregation. In: *Vitamins & Hormones.* Elsevier; 1997. S. 25–48.
32. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1. Juni 1991;88(11):4651–5.
33. Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 1. Februar 2007;42(2):271–9.
34. James SL. Nitric Oxide in Health and Disease. *Parasitol Today.* 1. Dezember 1998;14(12):504.
35. Tsukahara Y, Morisaki T, Kojima M, Uchiyama A, Tanaka M. iNOS expression by activated neutrophils from patients with sepsis: iNOS EXPRESSION BY PMN FROM SEPTIC PATIENTS. *ANZ J Surg.* Januar 2001;71(1):15–20.
36. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev.* Januar 2020;40(1):158–89.
37. Yoon S, Eom GH, Kang G. Nitrosative Stress and Human Disease: Therapeutic Potential of Denitrosylation. *Int J Mol Sci.* 10. September 2021;22(18):9794.
38. Fachinformation: Nitrolingual® Nitrospray, 0,41 mg/Sprühstoß, Lösung für einen Vernebler. Pohl Boskamp; 2015.
39. Fachinformation: Molsidomin STADA® 8mg Retardtabletten. STADApHarm GmbH; 2002.
40. Pott G, Mameghani A. Nitroglycerin als Spasmolytikum bei Gallenkoliken und als Prämedikation zur ERCP. In: Roskamm H, Herausgeber. *Nitroglycerin VI.* Berlin, Boston: De Gruyter; 1989. S. 119–26.
41. Thadani U. Role of nitrates in angina pectoris. *Am J Cardiol.* September

1992;70(8):B43–53.

42. Linde Gas Therapeutics GmbH. INOmax 800ppm mol/mol Inhalationsgas Fachinformation. Linde Gas Therapeutics GmbH; 2020.
43. Patel S, Kumar S, Jyoti A, Srinag BS, Keshari RS, Saluja R, u. a. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide*. 1. April 2010;22(3):226–34.
44. Manda-Handzlik A, Bystrzycka W, Cieloch A, Glodkowska-Mrowka E, Jankowska-Steifer E, Heropolitanska-Pliszka E, u. a. Nitric oxide and peroxytrite trigger and enhance release of neutrophil extracellular traps. *Cell Mol Life Sci*. 24. Oktober 2019;
45. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest*. September 1992;90(3):1116–21.
46. Manda-Handzlik A, Demkow U. Neutrophils: The Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Health and Disease. In: Pokorski M, Herausgeber. *Pulmonary Infection*. Springer International Publishing; 2015. S. 51–60. (Advances in Experimental Medicine and Biology; Bd. 857).
47. Lo Faro ML, Fox B, Whatmore JL, Winyard PG, Whiteman M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide*. September 2014;41:38–47.
48. Zandalinas SI, Mittler R. ROS-induced ROS release in plant and animal cells. *Free Radic Biol Med*. Juli 2018;122:21–7.
49. Pluriselect.com [Internet]. 2021. Lympho Spin Medium / PBMC Spin Medium. Verfügbar unter: https://www.pluriselect.com/de_de/lympho-spin-medium-pbmc-spin-medium.html#product.info.description
50. Chen X, Buerk DG, Barbee KA, Jaron D. A Model of NO/O₂ Transport in Capillary-perfused Tissue Containing an Arteriole and Venule Pair. *Ann Biomed Eng*. 16. März 2007;35(4):517–29.
51. Liu X, Yan Q, Baskerville KL, Zweier JL. Estimation of Nitric Oxide Concentration in Blood for Different Rates of Generation. *J Biol Chem*. März 2007;282(12):8831–6.
52. Liu X, Liu Q, Gupta E, Zorko N, Brownlee E, Zweier JL. Quantitative measurements of NO reaction kinetics with a Clark-type electrode. *Nitric Oxide*. August 2005;13(1):68–77.
53. Linde GmbH. SICHERHEITSDATENBLATT Stickstoffmonoxid. 2013.

54. Willnecker S, PD Dr. Sigrid Wittmann, Prof. Dr. Dirk Hellwig. Modulation der Granulozytenfunktionalität durch Priming. Klinik für Anästhesiologie Prof. Dr. Bernhard M. Graf, MSC. Der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg. 2021.
55. Kirchner T, Hermann E, Möller S, Klinger M, Solbach W, Laskay T, u. a. Flavonoids and 5-Aminosalicylic Acid Inhibit the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:1–14.
56. Najmeh S, Cools-Lartigue J, Giannias B, Spicer J, Ferri LE. Simplified Human Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Isolation and Handling. *J Vis Exp.* 16. April 2015;(98):52687.
57. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, u. a. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. *J Immunol.* 15. Juli 2002;169(2):898–905.
58. Wekell P, Björnsdóttir H, Björkman L, Sundqvist M, Christenson K, Osla V, u. a. Neutrophils from patients with SAPHO syndrome show no signs of aberrant NADPH oxidase-dependent production of intracellular reactive oxygen species. *Rheumatology.* August 2016;55(8):1489–98.
59. Pruchniak MP, Demkow U. Potent NETosis inducers do not show synergistic effects in vitro. *Cent Eur J Immunol.* 2019;44(1):51–8.
60. Itakura A, McCarty OJT. Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 1. August 2013;305(3):C348–54.
61. Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone Deimination As a Response to Inflammatory Stimuli in Neutrophils. *J Immunol.* 1. Februar 2008;180(3):1895–902.
62. Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner WD. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules.* 4. Mai 2015;5(2):702–23.
63. Doblinger N, Bredthauer A, Mohrez M, Hähnel V, Graf B, Gruber M, u. a. Impact of hydroxyethyl starch and modified fluid gelatin on granulocyte phenotype and function. *Transfusion (Paris).* April 2019;trf.15279.
64. Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect Immun.* Juni 1994;62(6):2195–201.
65. Elbim C, Guichard C, Dang PMC, Fay M, Pedruzzi E, Demur H, u. a. Interleukin-18 Primes the Oxidative Burst of Neutrophils in Response to Formyl-Peptides: Role of

Cytochrome b558 Translocation and N-Formyl Peptide Receptor Endocytosis. *Clin Vaccine Immunol.* März 2005;12(3):436–46.

66. Chen Y, Junger WG. Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils. In: Ashman RB, Herausgeber. *Leucocytes.* Totowa, NJ: Humana Press; 2012. S. 115–24.

67. Shields JM, Haston WS. Behaviour of neutrophil leucocytes in uniform concentrations of chemotactic factors: contraction waves, cell polarity and persistence. *J Cell Sci.* 1. März 1985;74(1):75–93.

68. Zigmond SH. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol.* 1. November 1977;75(2):606–16.

69. Herrmann JM, Bernardo J, Long HJ, Seetoo K, McMenamin ME, Batista EL, u. a. Sequential Chemotactic and Phagocytic Activation of Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Infect Immun.* August 2007;75(8):3989–98.

70. Cundell DR, Kanthakumar K, Taylor GW, Goldman WE, Flak T, Cole PJ, u. a. Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function in vitro. *Infect Immun.* Februar 1994;62(2):639–43.

71. Geiger A. Einfluss des Anästhetikums Propofol auf die Granulozytenfunktionalität im Sepsismodell. Universität Regensburg; noch nicht veröffentlicht.

72. Mannherz M. Veränderung der Granulozytenfunktionalität durch Behandlung mit 8-MethoxyPsoralen und UvA-Bestrahlung im Rahmen der Extrakorporalen Photopherese. noch nicht veröffentlicht.

73. Dąbrowska D, Jabłońska E, Garley M, Ratajczak-Wrona W, Iwaniuk A. New Aspects of the Biology of Neutrophil Extracellular Traps. *Scand J Immunol.* Dezember 2016;84(6):317–22.

74. Jamali E, Abbasi M, Tayer AH, Monfared AA, Tandel P, Tamaddon G, u. a. The significance of surface neutrophilic MPO expression level in NETosis and NETosis-associated coagulopathies in covid-19 infected patients. *Blood Cells Mol Dis.* September 2022;96:102676.

75. Thomas DD, Heinecke JL, Ridnour LA, Cheng RY, Kesarwala AH, Switzer CH, u. a. Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology. *Free Radic Biol Med.* Oktober 2015;87:204–25.

76. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, u. a. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med.* Juli 2008;45(1):18–31.

77. Hickey MJ, Sharkey KA, Sihota EG, Reinhardt PH, Macmicking JD, Nathan C, u. a. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J.* Oktober 1997;11(12):955–64.
78. Suematsu M, Tamatani T, Delano FA, Miyasaka M, Forrest M, Suzuki H, u. a. Microvascular oxidative stress preceding leukocyte activation elicited by in vivo nitric oxide suppression. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 1. Juni 1994;266(6):H2410–5.
79. Smith CW. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol.* 1. Januar 1993;71(1):76–87.
80. Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ. Leukocyte adhesion induced by inhibition of nitric oxide production in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1. Mai 1995;78(5):1725–32.
81. Kotamraju S, Tampo Y, Kalivendi SV, Joseph J, Chitambar CR, Kalyanaraman B. Nitric oxide mitigates peroxide-induced iron-signaling, oxidative damage, and apoptosis in endothelial cells: role of proteasomal function? *Arch Biochem Biophys.* März 2004;423(1):74–80.
82. Ridnour LA, Thomas DD, Donzelli S, Espey MG, Roberts DD, Wink DA, u. a. The Biphasic Nature of Nitric Oxide Responses in Tumor Biology. *Antioxid Redox Signal.* Juli 2006;8(7–8):1329–37.
83. Wink DA, Cook JA, Pacelli R, Liebmann J, Krishna MC, Mitchell JB. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Proc Int Congr Toxicol - VII.* 1. Dezember 1995;82–83:221–6.
84. Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T. NITRIC OXIDE AND SUPEROXIDE IN INFLAMMATION AND IMMUNE REGULATION. 2003;19.
85. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* Dezember 2001;15(5):831–45.
86. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* Dezember 2007;15(6):252–9.
87. Kuklinski B. Praxisrelevanz des nitrosativen Stresses. *OM Ernähr.* 2008;(124).
88. Sethi S, Singh MP, Dikshit M. Nitric Oxide–Mediated Augmentation of Polymorphonuclear Free Radical Generation After Hypoxia-Reoxygenation. *Blood.* 1. Januar 1999;93(1):333–40.
89. Lee C il, Miura K, Liu X, Zweier JL. Biphasic Regulation of Leukocyte Superoxide Generation by Nitric Oxide and Peroxynitrite. *J Biol Chem.* Dezember 2000;275(50):38965–72.
90. Pieper GM, Clarke GA, Gross GJ. Stimulatory and inhibitory action of nitric oxide

donor agents vs. nitrovasodilators on reactive oxygen production by isolated polymorphonuclear leukocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1. Mai 1994;269(2):451.

91. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive Oxygen Species (Ros-Induced) Ros Release. *J Exp Med.* 2. Oktober 2000;192(7):1001–14.

92. Zinkevich NS, Gutterman DD. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* September 2011;301(3):H647–53.

93. Shelton JL, Wang L, Cepinskas G, Sandig M, Scott JA, North ML, u. a. Inducible NO synthase (iNOS) in human neutrophils but not pulmonary microvascular endothelial cells (PMVEC) mediates septic protein leak in vitro. *Microvasc Res.* Juli 2007;74(1):23–31.

94. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension.* 1. April 2007;49(4):717–27.

95. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* September 1998;25(4–5):434–56.

96. Blaeser-Kiel G. Akutes Lungenversagen: Inhalation von Stickstoffmonoxid. *Dtsch Arztebl Int.* 16. Februar 1996;93(7):A-348.

97. Friedrich I, Hentschel T, Czeslick E, Sablotzki A. Hämodynamische Wirkung der inhalativen Applikation von Stickstoff-Monoxid und Iloprost bei Patienten mit geplanter Herztransplantation. *Z Für Herz- Thorax- Gefäßchirurgie.* 1. Februar 2003;17(1):1–8.

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hämatopoese mit detaillierterer Darstellung der neutrophilen Granulopoese modifiziert nach (5).....	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Leukodiapedese modifiziert nach (6) ...	13
Abbildung 3: Reaktionsgleichung der durch NADPH-Oxidase katalysierten Redoxreaktion (17).....	14
Abbildung 4: Reaktionsgleichung der durch MPO katalysierten Redoxreaktion (19).	14
Abbildung 5: Reaktionsgleichung der NO-Synthese (28).....	17
Abbildung 7: Flowchart des Projektplans	22
Abbildung 8: Blutprobe mit Lymphospin/Leukospin nach Zentrifugierung modifiziert nach (49).	31
Abbildung 9: Befüllen der IBIDI-Slides (Genehmigung der ibidi GmbH zur Verwendung der Abbildung vorliegend)	33
Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Ibidi-Platte (Eigene Darstellung).....	33
Abbildung 11: Migration mit farbigen dargestellten Tracks mittels Imaris Software	35
Abbildung 12: Darstellung der DHR Fluoreszenz mittels Imaris Software	35
Abbildung 13: Darstellung der DAPI Fluoreszenz mittels Imaris Software	36
Abbildung 14: Flächensumme der Rhodamin-Fluoreszenz	37
Abbildung 15: Beispielgraph der Phoenix Software zur Ermittlung des ET_{50} NETosis	38
Abbildung 16: Grafische Darstellung der Migrationsvariablen	39
Abbildung 17: Beispiel-Graphen der FlowJo Software.....	43
Abbildung 18: Track Length	45
Abbildung 19: Zeitpunkt der maximalen DHR Fluoreszenz	47
Abbildung 20: Zeitpunkt der maximalen Steigung in der NETosis-Tätigkeit	48
Abbildung 21: Quantität der Rhodamin-Fluoreszenz in mfi.....	50
Abbildung 22: Quantifizierung der Rhodamin-Fluoreszenz in mfi	51

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Geräte und Materialien	24
Tabelle 2: Materialien zur Granulozytenisolierung	24
Tabelle 3: Materialien zur Mikroskopie	26
Tabelle 4: Materialien zur Durchflusszytometrie	27
Tabelle 5: Anamnestische Angaben der Probanden	30
Tabelle 6: Bedingungen Klimakammer	34
Tabelle 7: Burst Versuchsvorbereitung FACS	40
Tabelle 8: Antikörper Versuchsvorbereitung FACS	41
Tabelle 9: Wichtigste Daten der Blutproben-Probanden	44
Tabelle 10: Statistische Auswertung der Track Lengths	46

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Besonders danken möchte ich meinem Betreuer Dr. Michael Gruber für die allzeit geduldige und enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit, sowie meiner Doktormutter PD Dr. Sigrid Wittmann für die ausgezeichnete Betreuung.

10. Lebenslauf

Name Maier Elena Julia
Geburtsdatum: 26.08.1995
Adresse: Landshuter Straße 35A
93053 Regensburg
E-Mail: elena.j.maier@gmail.com

Akademischer Werdegang

Mai 2014: Abitur am Annette-Kolb-Gymnasium in Traunstein
2015 - 2022: Medizinstudium an der Universität Regensburg
September 2017: Physikum
April 2021: 2. Staatsexamen
Mai 2022: 3. Staatsexamen

Klinischer Werdegang

Praktisches Jahr

Mai - Juli 2021 1. PJ-Tertial im Regionalspital Surselva in Ilanz, Schweiz
Abteilung: Allgemein Chirurgie und Unfallchirurgie
Juli - Sept. 2021 1. PJ-Tertial im Centre Hospital Universitaire in Montpellier,
Frankreich
Abteilung: Viszeralchirurgie und Transplantationschirurgie
Sept. - Dez. 2021 2. PJ-Tertial am Universitätsklinikum Regensburg
Abteilung: Augenheilkunde
Jan. - April 2022 3. PJ-Tertial im Immanuel Klinikum Bernau bei Berlin,
Brandenburg
Abteilung: Kardiologie und Allgemeine Innere

Berufserfahrung

Seit Juli 2022 Honorarärztin für den Blutspendedienst des Bayerischen Roten
Kreuzes
Seit Feb 2023 Assistenzärztin im Klinikum Dritter Orden, München
Abteilung: Innere Medizin I (Gastroenterologie und Onkologie)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig ohne Hilfe Dritter verfasst habe. Dabei habe ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und entsprechend im Text gekennzeichnet. Ich habe keine unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für diese Arbeit in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Maier Elena