

Aus dem Lehrstuhl
für Anästhesiologie
Direktor: Prof. Dr. Bernhard M. Graf, M.Sc.
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Beeinflussung von PMNs durch Lokalanästhetika im
septischen Geschehen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Thies Galla

2024

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatlerin:

PD Dr. Sigrid Wittmann

2. Berichterstatlerin:

PD Dr. Stephanie Arndt

Tag der mündlichen Prüfung:

30.07.2024

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	7
2.	Einleitung.....	10
2.1	PMNs als Bestandteil der Immunabwehr	10
2.1.1	Bildung, Lebensdauer und Abbau	10
2.1.2	Eigenschaften und Funktionen	10
2.1.3	Inflammation und PMNs	11
2.1.4	Biologische Bedeutung der NETose.....	13
2.1.5	Effekte der NETs	15
2.1.5.1	Abwehr von Pathogenen.....	15
2.1.5.2	Gewebeschäden durch NETs.....	15
2.1.5.3	NETs als Teil autoimmuner Erkrankungen	15
2.1.5.4	Thrombogene Effekte	16
2.1.5.5	NETs und das Komplementsystem.....	16
2.1.5.6	Gerinnung, Komplementfaktoren und die NETs.....	17
2.1.5.7	NETs und Tumoren	17
2.2	Intrazellulärer Kalziumhaushalt des PMNs	17
2.2.1	Kalziumspeicher von PMNs	18
2.2.2	Transportmechanismen des Kalziums	18
2.3	Lokalanästhetika.....	19
2.3.1	Klassifizierung.....	19
2.3.2	Metabolisierung der Lokalanästhetika.....	20
2.3.3	Wirkung an spannungsabhängigen Natriumkanälen	21
2.3.4	Nebenwirkungen durch Lokalanästhetika	22
2.3.5	Wirkung von Lokalanästhetika auf PMNs	22
3.	Fragestellung und Zielsetzung.....	23

4.	Projektplanung.....	24
5.	Material & Methoden	28
5.1	PMN-Isolation	28
5.1.1	Probengewinnung und Blutaufbereitung.....	28
5.1.2	Dichtegradientenzentrifugation	28
5.2	Fluoreszenzfarbstoff zur Darstellung von NETs und Kalzium	30
5.3	Chemotaxis im Modell	31
5.4	Kalziumelimination mit Kalziumchelator	31
5.5	Intrazelluläre Beeinflussung durch GPCR-Inhibition	32
5.6	Verwendete Lokalanästhetika.....	33
5.7	3D- μ -Slide-Chemotaxis-Kammer	33
5.7.1	Befüllung der Kanäle.....	34
5.7.2	Befüllung der Reservoirs	36
5.8	Life Cell Imaging.....	37
5.9	Erfassung der Daten.....	37
5.9.1	Datensätze der Migration.....	38
5.9.2	Datensätze der Fluoreszenzfarbstoffe.....	39
5.9.3	Erstellung der ET ₅₀ NET, ET ₅₀ MPO und IT ₅₀ Fluo-4 mit Phoenix®.....	39
5.10	Statistik	42
6.	Ergebnisse.....	43
6.1	Eigenschaften der Probanden	43
6.2	Einfluss von Lokalanästhetika auf die NETose.....	43
6.2.1	Bupivacain	43
6.2.2	Ropivacain	44
6.3	Einfluss auf die NETose und das Kalzium.....	46
6.3.1	Beeinflussung der NETose	46
6.3.2	Veränderungen des intrazellulären Kalziums	47

6.4	Einfluss der GPCR-Inhibitoren auf die NETose	48
6.4.1	GPCR-Inhibitoren.....	48
6.4.2	GPCR-Inhibitoren und Ropivacain	49
6.5	Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentration	51
6.5.1	GPCR-Inhibitoren.....	51
6.5.2	GPCR-Inhibitoren und Ropivacain	52
6.6	Einfluss auf die PMN-Migration	54
6.6.1	Bupivacain und Ropivacain.....	54
6.6.2	BAPTA AM.....	55
6.6.3	BAPTA AM und Ropivacain	56
6.6.4	GPCR-Inhibitoren und Ropivacain	57
7.	Diskussion	60
7.1	Vergleich der experimentellen Methoden und Substanzen	60
7.2	Chemoattraktoren und Fluoreszenzen	60
7.3	Effekte von Bupivacain	61
7.4	Effekte von Ropivacain	61
7.5	Stereoisomerie der Lokalanästhetika.....	62
7.6	Intrazelluläres Kalzium als Trigger der NETose	63
7.7	Chelatisierung des intrazellulären Kalziums	63
7.8	Oberflächenstrukturen der PMNs.....	64
7.9	GPCR-Inhibitoren und Lokalanästhetika	65
7.10	Effekte der Lokalanästhetika auf die Migration	65
7.11	Effekte von BAPTA AM auf die Migration	66
7.12	Inhibition der Migration durch GPCR-Inhibitoren.....	66
8.	Zusammenfassung	67
9.	Abbildungsverzeichnis	68
10.	Tabellenverzeichnis	69

11.	Anhang	70
12.	Literaturverzeichnis	73

1. Abkürzungsverzeichnis

Akt	Protein Kinase B
ANCA	Anti- neutrophil cytoplasmatic antibody
APC	Farbstoff „Allophycocyanin“
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATPase	Adenosintriphosphatase
BAPTA AM	Kalziumchelator
C3	Komplementfaktor
C3a und C5a	Aktivierte Komplementfaktoren, auch Anaphylatoxine
CD	Cluster of Differentiation, Unterscheidungsmerkmale
Cl ⁻	Chloridanion
CRP	C- reaktives Protein
CXCL	Chemokinliganden
CXCR	Chemokinrezeptoren
DA	Diacylglycerol
DAPI	Fluoreszenz für die NETose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	Puffersubstanz
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
ER	Endoplasmatische Retikulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ET ₅₀ MPO	Halbmaximaler Zeitpunkt der MPO Aktivität
ET ₅₀ NET	Halbmaximaler Zeitpunkt der NETose
Fluo-4	Fluoreszenz für das intrazelluläre Kalzium
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucil-Phenylalanin
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G α	Subeinheit des GPCR
G $\beta\gamma$	Subeinheit des GPCR
H	Wasserstoff
H3	Ein Histon
H ₂ CO ₃	Kohlensäure

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV-1	Humanes Immundefizienz- Virus Typ 1
HMBG1	High- Mobility Group Box 1
HOCL	Hypochlorige Säure
Ib- alpha	Glykoprotein
IL	Interleukin
InsP3	Inositoltriphosphatrezeptor
IP ₃	Inositoltriphosphat
LPA	Lysophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharide
IT ₅₀ Fluo-4	Halbmaximaler Zeitpunkt der intrazellulären Kalziumaktivität
m	männlich
MAPK	mitogen- activated proteinkinase
MEK	Protein als Teil einer MAPK
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MPO	Myeloperoxidase
ms	Millisekunden
mtROS	Mitochondriale ROS- Produktion
N	Stickstoff
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NE	Neutrophile Elastase
NETs	Extrazelluläre Netze
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NOX	NADPH-Oxidase
O ₂ ⁻	Sauerstoffanionen
OH ⁻	Hydroxidionen
p38	Ein Protein einer MAPK PKC – Proteinkinase
PAD4	Protein Arginin Deiminase 4
PI3K	Phosphatidyl3- Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol- 3,4,5- triphosphat
PLC	Phospholipase C

PMNs	Polymorphonukleare Zellen
PSGL-1	P- Selectin Glykoprotein Ligand
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma,
RAGE	Receptor for advanced glycation and products
RNS	Reaktive nitrogene Spezies
ROCE	Receptor-operated calcium entry
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Zellmedium
RYR	Ryanodinrezeptor
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SERCA	Sarkoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SIRS	Systemic inflammatory Response Syndrome
SK3	Small conductance calcium-activated potassium channel 3
SOCE	Store-operated calcium entry
SOD	Superoxiddismutase
STIM	Stromal interacting molecule
TAN	Tumor-assoziierte Neutrophile
TLR	Toll Like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRP	Transient receptor potential
U-73122	GPCR- Inhibitor
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer

2. Einleitung

Die NETose ist eine Funktion der PMNs, die die Immunabwehr zur Aufgabe hat. Aufgrund zahlreicher Vor- und Nachteile der NETose beschäftigen sich viele wissenschaftliche Arbeiten damit, wie diese Funktion medikamentös und therapeutisch im klinischen Setting beeinflusst werden könnte (1–4). Zahlreiche Substanzen, die dem humanen Organismus zugeführt werden, sind in der Lage, über verschiedenste Mechanismen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der PMNs zu nehmen (5). Darunter zum Beispiel die Beeinflussung des intrazellulären Kalziumspiegels oder der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (6). Die im klinischen Alltag häufig angewendeten Lokalanästhetika beeinflussen die Funktionalität von PMNs (7).

2.1 PMNs als Bestandteil der Immunabwehr

PMNs bilden mit 60 Prozent den größten Anteil der im Blut zirkulierenden Leukozyten (8–10). Sie sind ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems und somit der Immunkompetenz (11).

2.1.1 Bildung, Lebensdauer und Abbau

Die PMNs werden durch die Stimulation mit Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) im Knochenmark gebildet. Stimuliert wird die Bildung der PMNs durch Infektionen, Traumata oder Gewebeerletzungen aus hämatopoetischen Zellen. Ihre Halbwertszeit im Blut beträgt ca. 6 bis 8 Stunden. Danach gehen sie in die Apoptose und werden im Knochenmark, der Leber und der Milz durch Makrophagen phagozytiert (3,5,7–9).

2.1.2 Eigenschaften und Funktionen

Die PMNs schützen vor eindringenden Mikroorganismen durch deren Aufnahme und Destruktion durch die Phagozytose (8, 13). Erst seit Kurzem ist bekannt, dass die PMNs untereinander einer Heterogenität in ihrer Morphologie, Phänotypisierung und Funktionen unterliegen (12). Ferner konnte gezeigt werden, dass die PMNs wichtige chemotaktische Funktionen zur Aufrechterhaltung der Kommunikation der Leukozyten untereinander einnehmen (13).

2.1.3 Inflammation und PMNs

Über ein Gewebetrauma können Pathogene in den Körper gelangen. Daraufhin setzen Gewebemastzellen vasoaktive Mediatoren frei. Durch die lokale Reaktion mit Vasodilatation und gesteigerter Permeabilität wird die systemische Reaktion stimuliert, die als Akute-Phase-Reaktion bekannt ist. Über sezernierte Akute-Phase-Proteine wie das C-reaktive Protein (CRP) oder den Komplementfaktor C3 werden weitere Zytokine gebildet. Zytokine wie IL-1, IL-6 oder Tumornekrosefaktor (TNF) wirken chemotaktisch. PMNs migrieren aus dem Blutstrom in das inflammatorische Gebiet. Dieser Prozess erfolgt über die Adhäsion der PMNs am Endothel, welcher auch als Margination bezeichnet wird. Die Zellen überwinden durch die Diapedese das Endothel. Anschließend migrieren sie zum entzündlichen Geschehen wie in Abbildung 1 dargestellt (14).

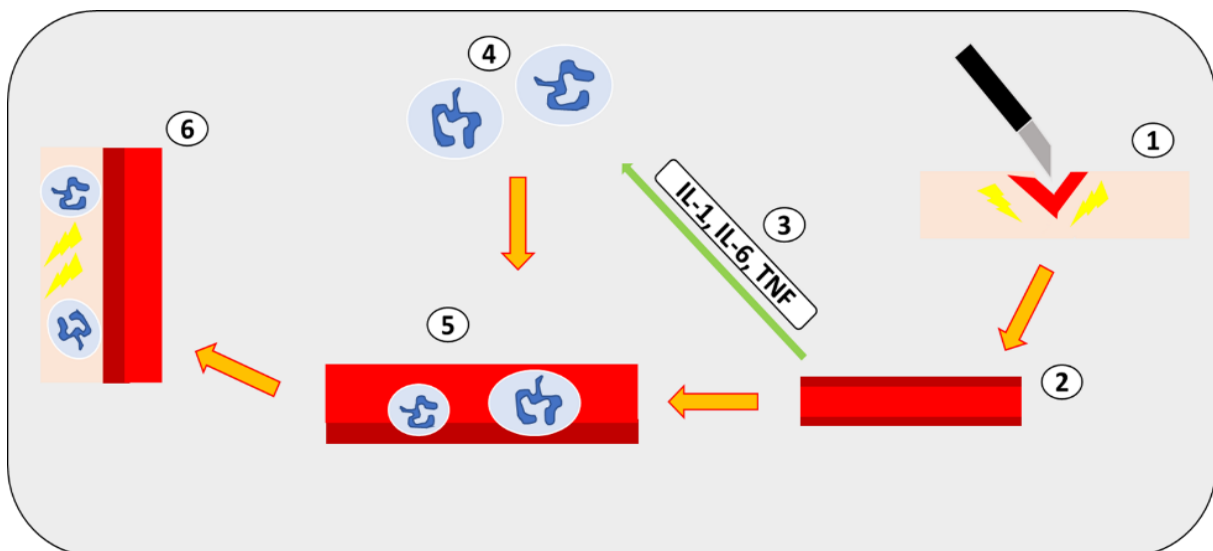


Abbildung 1: Reaktion auf ein Trauma

Ein Trauma [1] führt reflektorisch zur Vasodilatation [2] und anschließenden Chemotaxis [3] der PMNs [4]. Diese lagern sich am Endothel ab [5] und migrieren [6] ins entzündlich veränderte Gewebe (14). (eigene Darstellung)

Am Ort der eigentlichen Entzündungsreaktion werden die Pathogene bereits durch Serumantikörper opsoniert oder durch das zelluläre Immunsystem erkannt. Durch die NADPH-Oxidase, einem Enzymkomplex im PMN findet die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), auch respiratory burst genannt, (Abbildung 2) statt (14–16).

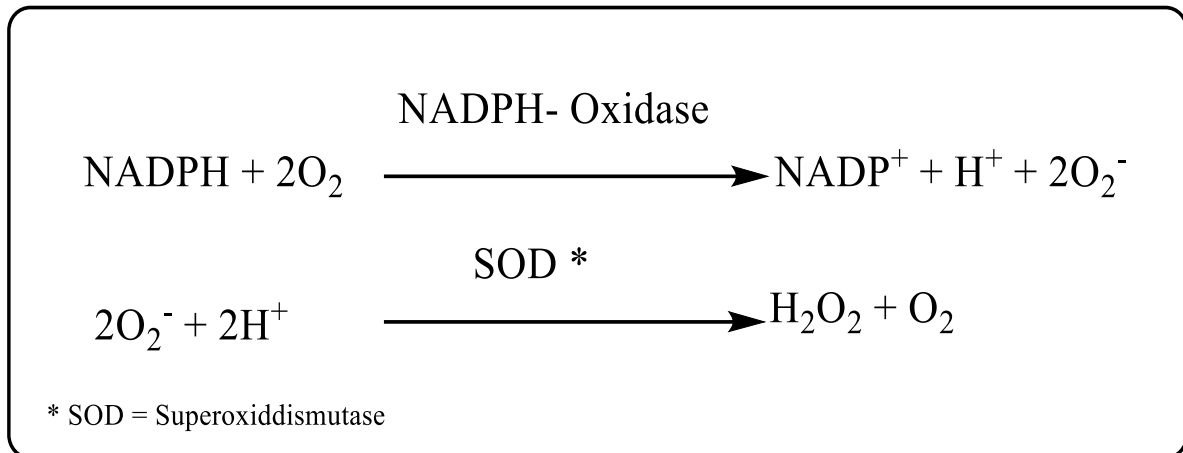


Abbildung 2: Respiratory burst

NADPH wird mit Sauerstoff [O₂] über die NADPH-Oxidase zu NADP⁺ sowie Protonen [H⁺] und Sauerstoffanionen [O₂⁻] oxidiert. Im Weiteren reagieren Protonen [H⁺] mit den entstandenen Sauerstoffanionen [O₂⁻] über die Superoxiddismutase [SOD] zu Wasserstoffperoxid [H₂O₂] und Sauerstoff [O₂]. In weiteren Reaktionen entstehen die Hydroxidionen [OH⁻] und die hypochlorige Säure [HClO] (15).

2.1.4 Biologische Bedeutung der NETose

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) wurden erstmals 1996 beschrieben und 2004 im Labor charakterisiert. Bei NETs handelt es sich um extrazelluläre Strukturen, die aus Chromatin und Proteinen bestehen. Hierzu gehören die neutrophile Elastase (NE), Myeloperoxidase (MPO), Calprotectin, Cathelicidin, Defensin und Aktin. NETs werden durch PMNs sezerniert. Die Bezeichnung NETose erfolgte in Anlehnung an andere Zell-Todesarten wie z.B. die Apoptose und Nekrose (17, 18). Die NETose ist durch unterschiedliche Stimuli auslösbar. Zu den möglichen Auslösern zählen Lipopolysaccharide (LPS), n-Formyl-L-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), Antikörper, Immunkomplexe, Ionophore, Chemokine, Mikrokristalle und zahlreiche weitere Stimulanzen (8, 18, 13, 19). Intrazellulär wird die NETose durch die Protein-Kinase-C (PKC) ausgelöst und aktiviert am Ende der Signalkaskade die NADPH-Oxidase (8, 20). Bekannte Signaltransduktionswege, wie der raf-MEK-ERK-, aber auch der p38- oder PI3K/Akt-Signalweg, die durch Proteinkinasen aktiviert werden, sind ebenfalls an der NETose beteiligt (19, 21, 22, 18).

Andere Autoren beschrieben, dass es eine NADPH-Oxidase unabhängige NETose gibt. Diese steht im Zusammenhang mit erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen und der dadurch entstehenden Beeinflussung von Kaliumkanälen (SK3). Diese Kanäle steigern jedoch lediglich die mitochondriale ROS-Produktion und nicht die der NADPH-Oxidase (23, 19). Es gibt Hinweise, dass fMLP die NADPH-Oxidase in den Granula über die direkte und indirekte Aktivierung des spezifischen Enzymabschnittes NOX2 aktivieren kann, und die mitochondriale ROS-Produktion Teil des Mechanismus ist (24, 9, 8).

Die gesteigerte ROS-Produktion wird über eine Aktivierung des GPCR ausgelöst und ist mit einer erhöhten Freisetzung intrazellulärer gespeicherter Kalziumdepots assoziiert. Dieses erfolgt über einen NOX-abhängigen und NOX-unabhängigen Weg durch Stimulation mit fMLP (25). Allgemein führt der Anstieg der ROS-Produktion zu einer Instabilität der granulären und nukleären Membranen (17, 26). Die sauren Bestandteile der Granula, wozu unter anderem die MPO und die NE zählen, gelangen ins Zytosol (8). Die NE erreicht durch die permeable Membran den Zellkern, baut teilweise Histone ab und dekondensiert gemeinsam mit MPO das Chromatin in einem synergistischen Prozess (26). Die Serinprotease NE kann parallel dazu im Zytosol befindliche Filamente destruieren und verändert so die zelluläre Morphologie (27).

In Betrachtung einer NOX-abhängigen oder NOX-unabhängigen NETose werden zwei Beobachtungen diskutiert. Beim NOX-unabhängigen Signalweg wird angenommen, dass es zur Expansion der Protein Arginin Deiminase 4 (PAD4) kommt. Diese PAD4 ist in der Lage die Histone, besonders das Histon H3, zu citrullinieren, wodurch vermutlich bei der NOX- unabhängigen Signalkaskade die Dekondensation von Chromatin initiiert wird (19, 23). Wichtig ist anzumerken, dass die Citrullination zum einen als ein Mechanismus der NETose erkannt wurde, es zum anderen jedoch auch Erkenntnisse gibt, dass die NETose PAD4-unabhängig erfolgen kann (28, 29). Dennoch ist der Effekt durch NE und MPO nicht zu vernachlässigen. Anschließend werden in der Plasmamembran durch das Protein Gasdermin D Poren gebildet, über die das mit anderen enzymatischen Proteinen besetzte Chromatingeflecht ausgestoßen wird (8, 30). Durch die unterschiedlichen Ladungszustände können Pathogene gebunden und fixiert werden (31). Siehe hierzu die folgende Abbildung 3.

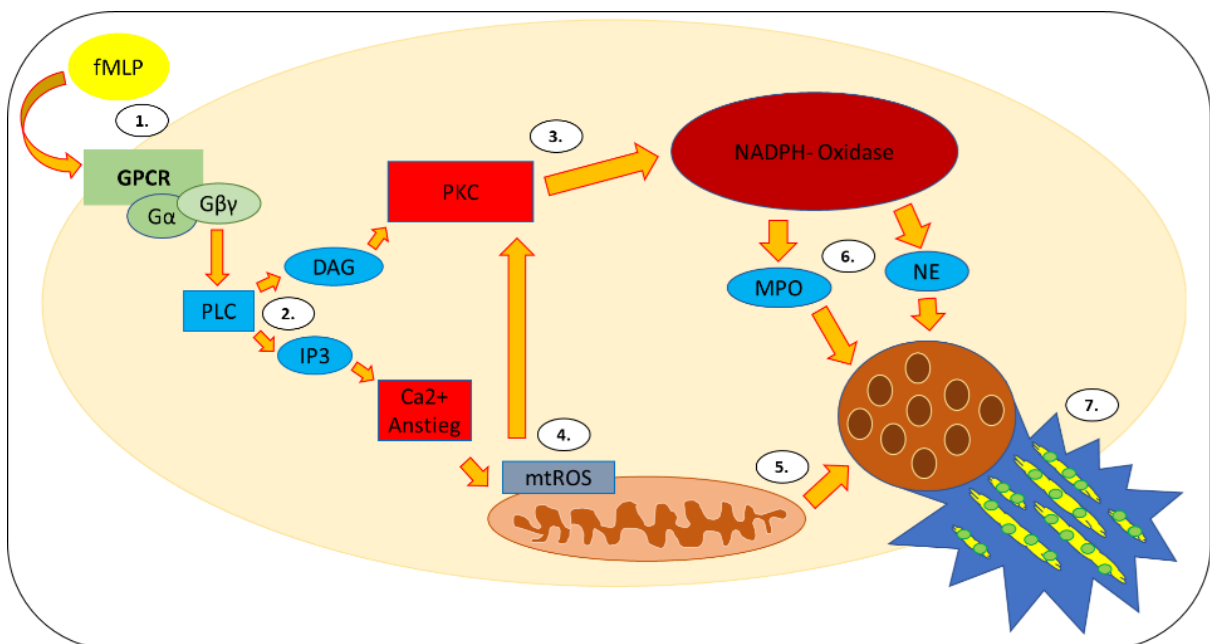


Abbildung 3: Die NETose

Die Aktivierung des GPCR über fMLP (1.) führt zur Auslösung der intrazellulären Signalkaskade der Phospholipase C (2.) mit Freisetzung von DAG und IP3. IP3 steigert die intrazelluläre Kalziumkonzentration, die zu einer Initiierung der mitochondrialen ROS-Produktion (4.) führt. DAG triggert die Proteinkinase C (3.), die die NADPH-Oxidase anregt. Im Folgenden werden MPO und NE (6.) freigesetzt, die durch Erreichen des Zellkerns, ebenso wie die mtROS (5.) die NETose (7.) verursachen können. (eigene Darstellung)

2.1.5 Effekte der NETs

2.1.5.1 Abwehr von Pathogenen

Im extrazellulären Gewebe dienen diese netzartigen Konstrukte dazu, Bakterien, Viren und mykotische Fremdkörper zu eliminieren (18, 32). Dieser positive Effekt der NETs konnte in *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt werden. Darunter fallen zum Beispiel die Untersuchung der bakteriziden Wirkung und Beeinflussung von *Klebsiella pneumoniae* (26), *Escherichia coli* (33), *Staphylococcus aureus* (34), *Salmonella typhimurium* und *Shigella flexneri* (35) durch NETs. Die NETs sind gegen *Candida albicans* antimykotisch wirksam (36) und können das Wachstum von *Aspergillus fumigatus* inhibieren (37). In Studien konnte gezeigt werden, dass Influenza A Viren, aber auch das HIV-1 durch die NETs beeinflusst werden (38–40). Andererseits war das HIV-1 in der Lage über eine IL-10-Interaktion mit den dendritischen Zellen den NETs zu entgehen (39).

2.1.5.2 Gewebeschäden durch NETs

Eine Studie zeigte, dass NETs das Bakterium *Staphylococcus aureus* effektiv destruieren. Parallel entstehen beim septischen Patienten Gewebeschäden des gesunden Endothels und Epithels. Als Ursache gilt eine Ischämie, die durch die Bindung von aktivierten Thrombozyten an den PMNs ausgelöst wird und die Freisetzung von Proteasen ins extrazelluläre Gewebe fördert (41, 33).

2.1.5.3 NETs als Teil autoimmuner Erkrankungen

Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg von Autoantikörperspiegeln und der Bildung von NETs. Zu diesen autoimmunen Erkrankungen zählen zum Beispiel die rheumatoide Arthritis oder die Kollagenosen wie der systemische Lupus erythematoses (SLE). Auch Anti-Neutrophile Cytoplasmatische Antikörper (ANCA)-assoziierte Vaskulitiden konnten bereits mit NETs assoziiert werden (42, 43).

2.1.5.4 Thrombogene Effekte

Auch die Hämostase unterliegt dem Einfluss der NETose (44, 45). Die thrombogene Eigenschaft der NETs liegt darin begründet, dass die netzartigen Strukturen für das Fibrin wie ein Gerüst wirken, an dem sich ein Thrombus formieren kann (45). In weiteren in vitro Studien wurde die gerinnungsfördernde Eigenschaft von NETs bestätigt. Diese wurde durch die Inhibition der neutrophilen Adhäsion am Gefäßendothel verhindert (46). Brühl et al. beschrieben, dass die PMNs über das Glykoprotein Ib-alpha mit Thrombozyten und dem Endothel interagieren (47). Auch die Expressierung von P-Selectin ermöglicht es den Thrombozyten an den P-Selectin Glykoprotein Liganden (PSGL-1) der PMNs zu binden, und deren gemeinsame Interaktion und Kommunikation zu verbessern (48). Auch das High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) der Thrombozyten verstärkt die NETose (49). Laut Studien liegen SARS-CoV-2 Infektionen mit einer erhöhten thrombogenen Aktivität durch die NETose vor. So besteht nach Skendros et al. die Annahme, dass durch das Komplement eine Aktivierung von Thrombozyten, NETs, Tissue Factor und Thrombin ausgelöst wird, wodurch es zur Aktivierung der Gerinnung kommt (50). Weitere Studien konnten diesen thrombogenen Effekt der NETose bei Mäusen und beim Menschen beobachten (51, 52).

2.1.5.5 NETs und das Komplementsystem

Neben der Wechselwirkung zwischen den Blutplättchen und den PMNs, besteht auch eine Interaktion zwischen der NETose und den Komplementfaktoren des Komplementsystems. Die NETose verstärkt die antibakteriellen Effekte der Opsonierung und der Lyseaktivierung (45).

Das Komplementsystem ist ein Teil des Immunsystems, welches über Kaskadenmuster multiple Proteine aktiviert und in drei Aktivierungswege aufgeteilt wird. Am Ende der Komplementkaskade steht der Membranangriffskomplex, der sich aus mehreren Komplementproteinen zusammensetzt und über eine Destruktion der bakteriellen Membran zur Lyse des Pathogens führt (53). Komplementfaktoren werden auch durch die PMNs gespeichert und sind an der Stabilisierung der für die Komplementreaktion wichtigen C3-Konvertase beteiligt. Die Stabilisierung erfolgt über Properdin, den Faktor B und C3 (45, 54).

Aufgrund der Aktivierung der PMNs durch das Komplement wird angenommen, dass die PMNs Anaphylatoxin C3a und C5a sezernieren. Diese Proteine verstärken die Aktivierung des Immunsystems, wodurch es zu einer überschießenden Immunantwort kommen kann (45).

2.1.5.6 Gerinnung, Komplementfaktoren und die NETs

Die Gerinnung und das Komplementsystem sind Prozesse, die sich gegenseitig beeinflussen. Ursächlich hierfür sind Proteinbestandteile, die auf beide Systeme regulierend wirken (55). Die NETs dienen als Gerüst für die Thrombogenese. Gleichzeitig aktivieren die Oponierung und Lyseaktivierung des Komplementsystems die bakteriziden Effekte der NETs. Eine Dysbalance dieser Prozesse kann zu Komplikationen wie tiefen Venenthrombosen, Autoimmunerkrankungen oder Tumoren führen (45).

2.1.5.7 NETs und Tumoren

In Studien wird die Interaktion der NETose mit Tumoren beschrieben. Es wurde beobachtet, dass die NETose tumorprogrede Eigenschaften besitzt. Es stellte sich heraus, dass bei einer gesteigerten Synthese von NETs vermehrt Tumorwachstum, Metastasierung und tumor-assoziierte postoperative Komplikationen wie venöse Thromboembolien auftreten (7, 56).

Aktuell ist bekannt, dass es PMNs gibt, die die Tumorentstehung begünstigen, indem sie eine für Tumoren günstige Mikroumgebung regulieren. Zu vernachlässigen sind nicht die speziellen PMNs, die im Vergleich dazu einen Anti-Tumoreffekt in Form einer Tumorzelllyse oder antikörperabhängigen Zytotoxizität aufweisen (57, 58). Die Tumor-assoziierten Neutrophilen (TAN) weisen somit pro- (TAN2) oder anti-tumoröse (TAN1) Eigenschaften auf (59–62).

Zhou et al. zeigten, dass eine Infiltration des Gewebes mit PMNs mit einer schlechteren Prognose beim hepatozellulären Karzinom einhergeht (63, 64) und einen Nachweis für die Begünstigung der Metastasierung wurde durch Gordon-Weeks et al. erbracht (63).

2.2 Intrazellulärer Kalziumhaushalt des PMNs

Das Ion Ca^{2+} ist ein essentieller second Messenger, der eine Vielzahl an intrazellulären Antworten transduziert, die über GPCR und Tyrosin-Kinase-Rezeptoren stimuliert werden. Dies gilt auch für PMNs (65). Zum Beispiel ist es an der oxidativen Antwort und der Zytokinsekretion (66, 67) beteiligt sowie Bestandteil der Signalkaskade der NETose (65). Der Effekt des intrazellulären Kalziums ist von dessen Dauer, Amplitude, Frequenz und auch der räumlichen Lokalisation abhängig (65).

2.2.1 Kalziumspeicher von PMNs

Der intrazelluläre Kalziumspeicher des PMNs befindet sich hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER). Zusätzlich befindet sich noch ein kleiner Speichervorrat in den Mitochondrien. Das Speicherlevel des ER wird über die Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA), Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptoren, Ryanodinrezeptoren (RYRs) und kalziumbindende Proteine wie Calreticulin und Calsequestrin reguliert (68–70). RYRs sind erst seit Kurzem als Bestandteile der PMNs bekannt. Frühere Arbeiten konnten ihre Existenz nur im Skelettmuskel (RYR Typ 1), im Herzmuskel (RYR Typ 2) und im Gehirn (RYR Typ3) nachweisen (71).

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration des PMNs beträgt durchschnittlich 100 nM. Dagegen liegt die Konzentration des gespeicherten Kalziums im endoplasmatischen Retikulum im dreistellig mikromolaren Bereich. (72). Im Vergleich dazu befindet sich die Kalziumkonzentration des Blutplasmas bei 2,5 mM (73).

2.2.2 Transportmechanismen des Kalziums

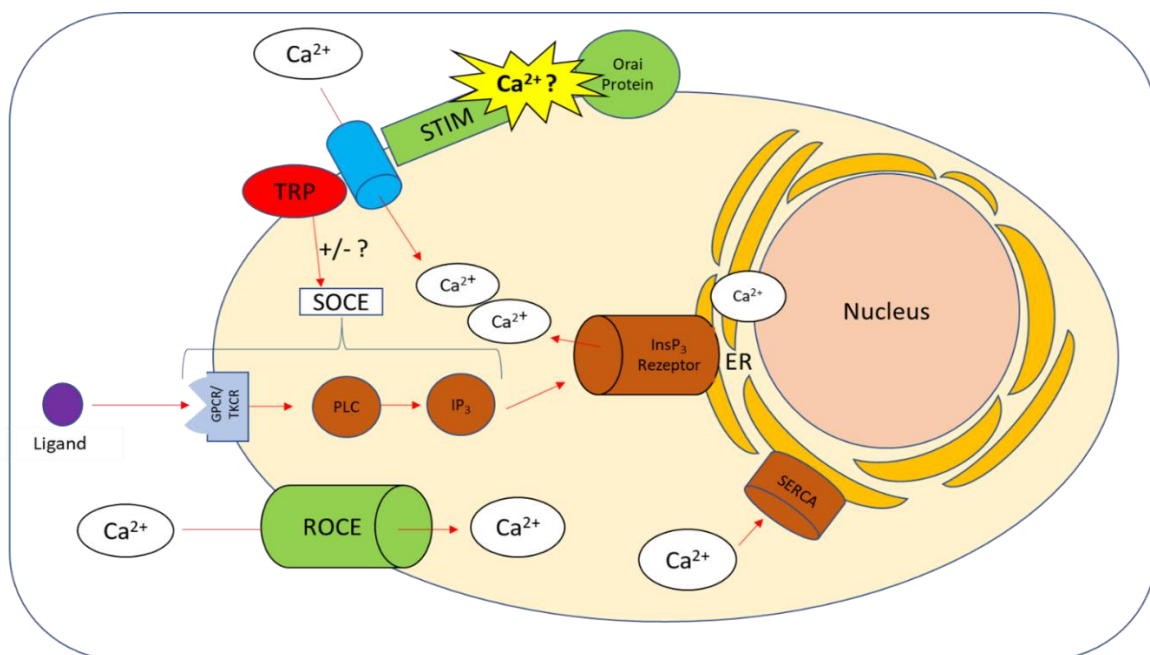


Abbildung 4: Transportmechanismen des Kalziums im PMN

Der intrazelluläre Kalziumhaushalt des PMNs wird über den intrazellulären Kalziumspeicher oder die Zufuhr aus dem extrazellulären Milieu aufrecht erhalten (65). Die Regulierung erfolgt über Transporter und Signalwege wie die store-operated calcium entry (SOCE), die receptor-operated calcium entry (ROCE) und die SERCA (67). Die SERCA pumpt intrazelluläres Kalzium in das ER, als wichtigsten Kalziumspeicher (74). Die SOCE ist ein über einen G-Protein-gekoppelten- (GPCR) und eine Tyrosin-Kinase-gekoppelten Rezeptor (TKCR) aktivierter Signalweg (65). Liganden aktivieren über diese Rezeptoren einen Phospholipase C-Inositol-1,4,5- triphosphat (IP_3) Signalweg (70). IP_3 bindet an spezifischen Rezeptor InsP_3 am ER, wodurch dieses seinen Kalziumspeicher freisetzt. Dieser Vorgang stimuliert den Kalziuminflux über die in der Plasmamembran befindliche SOCE (65). Die SOCE wird durch die stromal Interacting molecules (STIM), das Orai Protein, einem Kalziumkanal und die transient receptor potentials (TRP) gebildet. Dies ist ein tenärer Komplex, indem die STIMs die Aufgabe eines Kalziumsensoren haben (67, 75, 76). Die ROCEs sind Rezeptoren, die dem Influx von extrazellulärem Kalzium unabhängig vom intrazellulären Kalziumdepot dienen (65, 77). (eigene Darstellung)

2.3 Lokalanästhetika

Die zur lokalen oder regionalen Anästhesie angewendeten Lokalanästhetika wurden ursprünglich aus dem sog. Ester-Typ, wie er auch im Kokain enthalten ist, entwickelt. So war die Molekülstruktur des Kokains die Vorlage für das 1905 als erstes synthetisch entwickelte Lokalanästhetikum Procain (78).

2.3.1 Klassifizierung

Lokalanästhetika bestehen aus drei funktionellen Gruppen: einer lipophilen aromatischen Gruppe, einer mittleren Verbindungskette und einer hydrophilen Aminogruppe. Die aromatische Gruppe ermöglicht die Diffusion ins Gewebe, während die Aminogruppe, je nach Ladungszustand einen tertiären, fettlöslichen Amin- oder einen quartären, wasserlöslichen Ammoniumzustand annimmt. Abhängig von diesem Ladungszustand ist der Wirkstoff in der Lage die Membran zu passieren. Die mittlere Verbindungskette besteht aus einer funktionellen Gruppe eines Esters oder eines Amids. Durch diese Gruppe wird das Lokalanästhetikum klassifiziert (79). Siehe hierzu Abbildung 5.

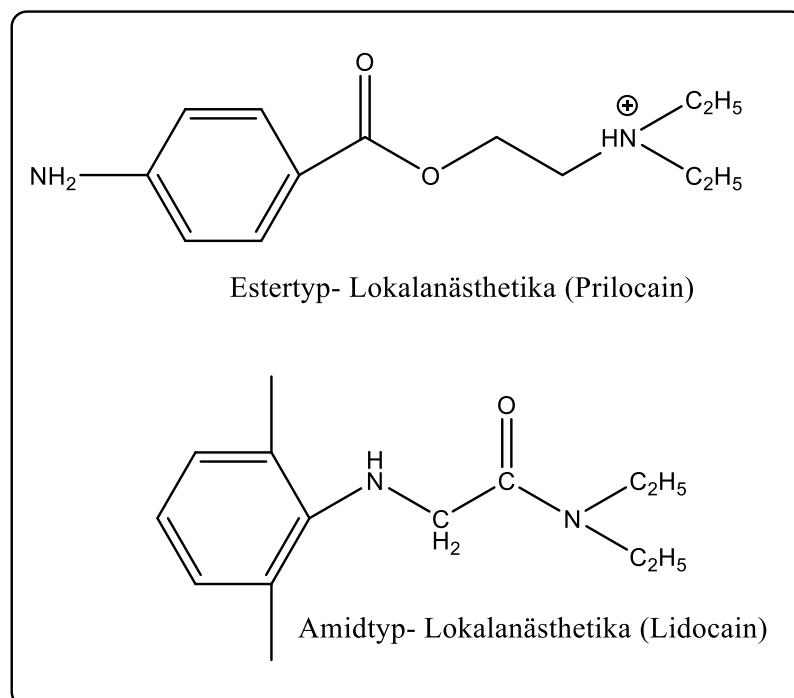


Abbildung 5: Chemische Struktur von Ester- und Amidtyp (80)

2.3.2 Metabolisierung der Lokalanästhetika

Wirkungsgeschwindigkeit und -eintritt von Lokalanästhetika sind von ihren biochemischen Eigenschaften wie zum Beispiel der Lipidlöslichkeit, der Proteinbindungsfähigkeit, aber auch dem Ionisationsgrad des Lokalanästhetikums abhängig. Die Lipidlöslichkeit eines Lokalanästhetikums ermöglicht erst die Penetration des neuronalen Gewebes. Die Lipophilie wird dadurch verbessert, dass das Pharmakon als freie, nicht ionisierte Base injiziert wird. Im Gewebe erfolgt dann eine Pufferung durch vorhandene Basen. Dies ermöglicht die optimale Gewebegängigkeit. Siehe hierzu Abbildung 6. (81)

Die Proteinbindungsfähigkeit eines Lokalanästhetikums entscheidet darüber, wie lange dieses Pharmakon im Zielgewebe verbleiben kann. Das Lokalanästhetikum wird von Gewebeproteinen gebunden und diffundiert verzögert ins Blut. Beispiele für Substanzen mit einer hohen Proteinbindungs- und Lipidlöslichkeit sind Bupivacain und Ropivacain (82).

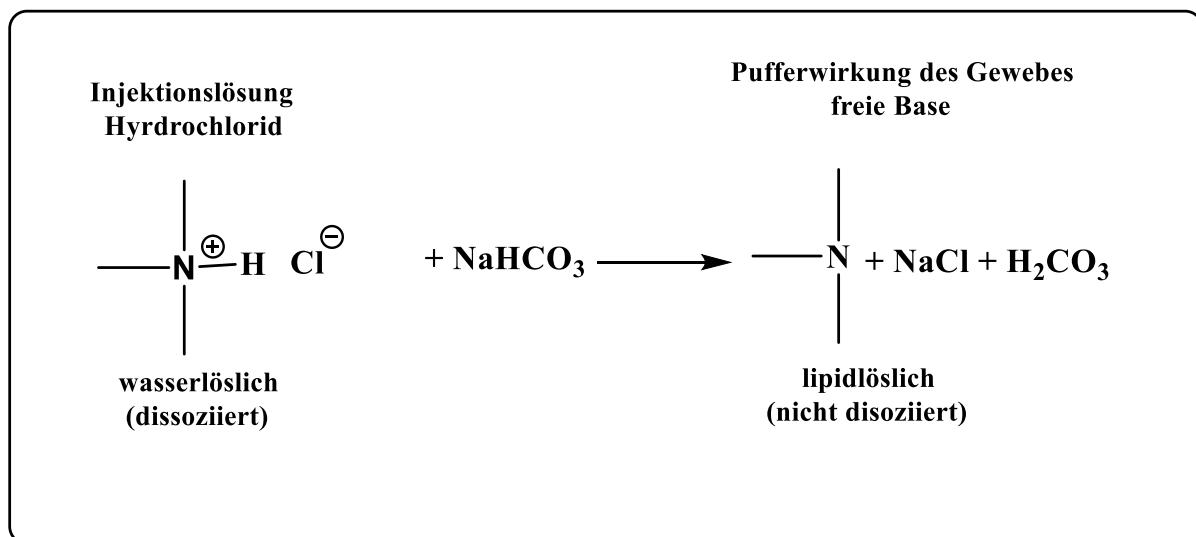


Abbildung 6: Dissoziation von Lokalanästhetika im Gewebe (81)

2.3.3 Wirkung an spannungsabhängigen Natriumkanälen

Die Hemmung der spannungsabhängigen Natriumkanäle und damit verbundene Unterbindung der Weiterleitung des Aktionspotenzials über die Nervenmembran verhindert die Depolarisation des Nerves und damit die Fortleitung des nervalen Impulses (83, 6).

Bei diesen Natriumkanälen handelt es sich um Poren, die durch I bis IV zueinander homolog stehenden Domänen gebildet werden, die jeweils sechs α -helikale Transmembransegmente aufweisen. Das Segment vier jeder Domäne besitzt einen positiv geladenen Aminosäurerest, der als Spannungssensor dient. Der Kanal selbst wird durch das jeweilige sechste Segment und der vorhandenen Schleife „poor loop“ gebildet, was auch die Abbildung 7 darstellen soll (78).

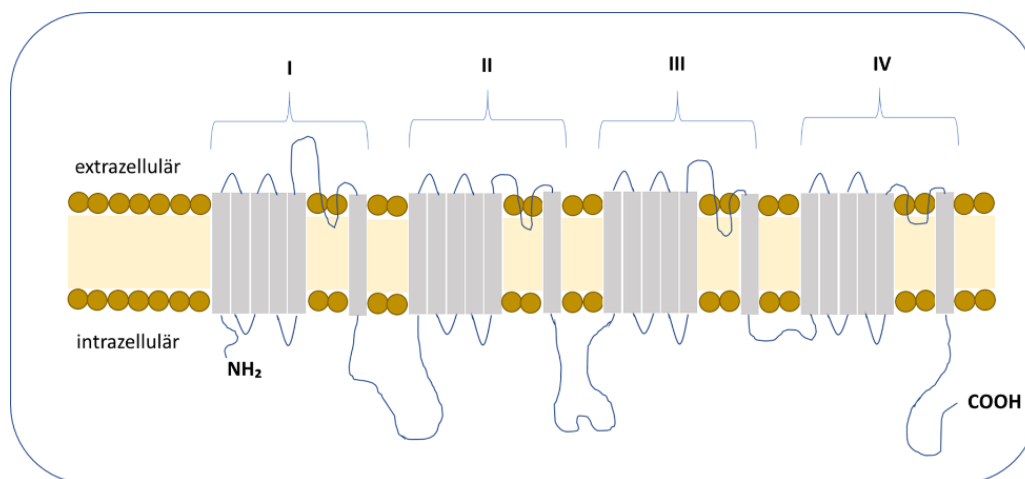


Abbildung 7: Strukturchemie der spannungsabhängigen Natriumkanäle (78)

Das Lokalanästhetikum kann mit seiner positiven Ladung mit den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin im sechsten Segment jeder vierten Domäne in eine Wechselwirkung eintreten und blockiert somit den Natriumeinstrom und die damit verbundene Depolarisation (78).

Die dünnen Fasern mit geringerer Myelinisierung unterliegen einem schnelleren Wirkungseintritt durch ein Lokalanästhetikum. Hierunter fallen die sensorischen Fasern, die in Bezug auf die Analgesie das primäre Ziel sind (84).

2.3.4 Nebenwirkungen durch Lokalanästhetika

Zu den Nebenwirkungen sind die allergischen Reaktionen und der toxische Effekt durch die Lokalanästhetika zu nennen. Die allergische Reaktion steht im Zusammenhang mit den Lokalanästhetika vom Ester-Typ wie zum Beispiel Procain oder Tetracain.

Ausgelöst werden diese systemischen Reaktionen durch den Metaboliten Paraaminobenzoesäure (81). Schwerwiegend sind unter anderen die toxischen Effekte aller Lokalanästhetika auf das zentrale Nervensystem. Zu den unerwünschten zentralnervösen Nebenwirkungen zählen Schwindel, Sedierung, Unruhe, Nystagmus bis hin zu tonisch-klonischen Krampfanfällen. In schweren Fällen kann ein komatöser Zustand mit respiratorischem und kardiovaskulärem Versagen folgen (85).

Die Nebenwirkungen auf das kardiovaskuläre System wie die Tachykardie beruht bei anfangs niedrigen Konzentrationen des Lokalanästhetikums auf einer Blockade inhibitorischer Neuronenverbände (86). Bei steigender Konzentration zeigt sich dagegen eine kardiale Depression, die durch Vasodilation, Elektrolytstörungen, Hypoxie und Azidose verstärkt wird. Herzrhythmusstörungen wie Torsade-de-Pointes bis hin zum Kammerflimmern beruhen auf Blockaden von spannungsabhängigen Kanälen (87).

2.3.5 Wirkung von Lokalanästhetika auf PMNs

Die Lokalanästhetika beeinflussen allgemein spannungsabhängige Natriumkanäle, aber auch Oberflächenstrukturen des PMNs wie die GPCRs (6). Diese Strukturen werden gezielt zur Therapie von Autoimmunerkrankungen, dem ARDS, der Sepsis oder von Tumorwachstum und –metastasierung adressiert. Die Gemeinsamkeit dieser Pathologien ist das Auftreten von NETs durch PMNs (14, 88). So können PMNs eine inflammatorische Überreaktion wie zum Beispiel beim Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), einer systemischen Entzündung oder beim Multiorganversagen zeigen (14, 89–91).

An PMNs konnten keine spannungsabhängigen Natriumkanäle nachgewiesen werden (14). Somit müssen die durch Lokalanästhetika ausgelösten Effekte wie die NETose durch andere Mechanismen gesteuert werden (92, 83).

Das Forschungsteam um Futosi et al. beschrieb zahlreiche Oberflächenstrukturen des PMNs. Hierzu gehören die GPCRs (93). Hollmann et al. beschrieben bereits vor Jahren in in-vitro und in-vivo Untersuchungen, dass die Lokalanästhetika unter bestimmten Expositionszeiten und unterschiedlichen Konzentrationen dazu in der Lage sind, GPCRs zu hemmen. Ein günstiger Effekt zeigte sich in vivo bereits bei niedrigen Konzentrationen. In-vitro konnte ein ähnlicher

Effekt erst mit einer 100-fach höheren Konzentration des Lokalanästhetikums erreicht werden (94). Ebenso zeigten sie, dass die Hemmung der Lysophosphatidsäure (LPA) durch Ropivacain möglich ist (95). Es handelt sich bei LPA um einen in der Zellmembran verankerten GPCR, der verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden wie zum Beispiel die Zellproliferation stimuliert (96).

3. Fragestellung und Zielsetzung

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass die NETose, aber auch die Migration, unter septischen Bedingungen durch Lokalanästhetika beeinflusst werden können (7, 97). Mechanismen der NETose wurden untersucht (14). Diskutiert wird die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration des PMNs und die damit zusammenhängenden Prozesse (65) sowie die molekulare Inhibition oder Stimulierung weiterer Angriffspunkte am PMN (93, 98).

Die Kinasen PI3-K und PLC, die über die Subeinheit G $\beta\gamma$ der GPCRs getriggert werden, sind als Teil der Signaltransduktion zur NETose bekannt (93, 99, 100). Die Interaktion zwischen intrazellulären Kalzium und diesen Kinasen kann in PMNs nicht ausgeschlossen werden. Es besteht eine Verbindung zwischen diesen Komponenten wie es Abbildung 3 darstellt (18, 8). Die PMNs können über einen GPCR durch das Tripeptid fMLP immunologisch aktiviert werden (101, 102).

Das Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob Lokalanästhetika Effekte auf das intrazelluläre Kalzium oder andere intrazelluläre Signalkaskaden und Rezeptoren des PMNs haben und somit deren Migration und NETose beeinflussen.

4. Projektplanung

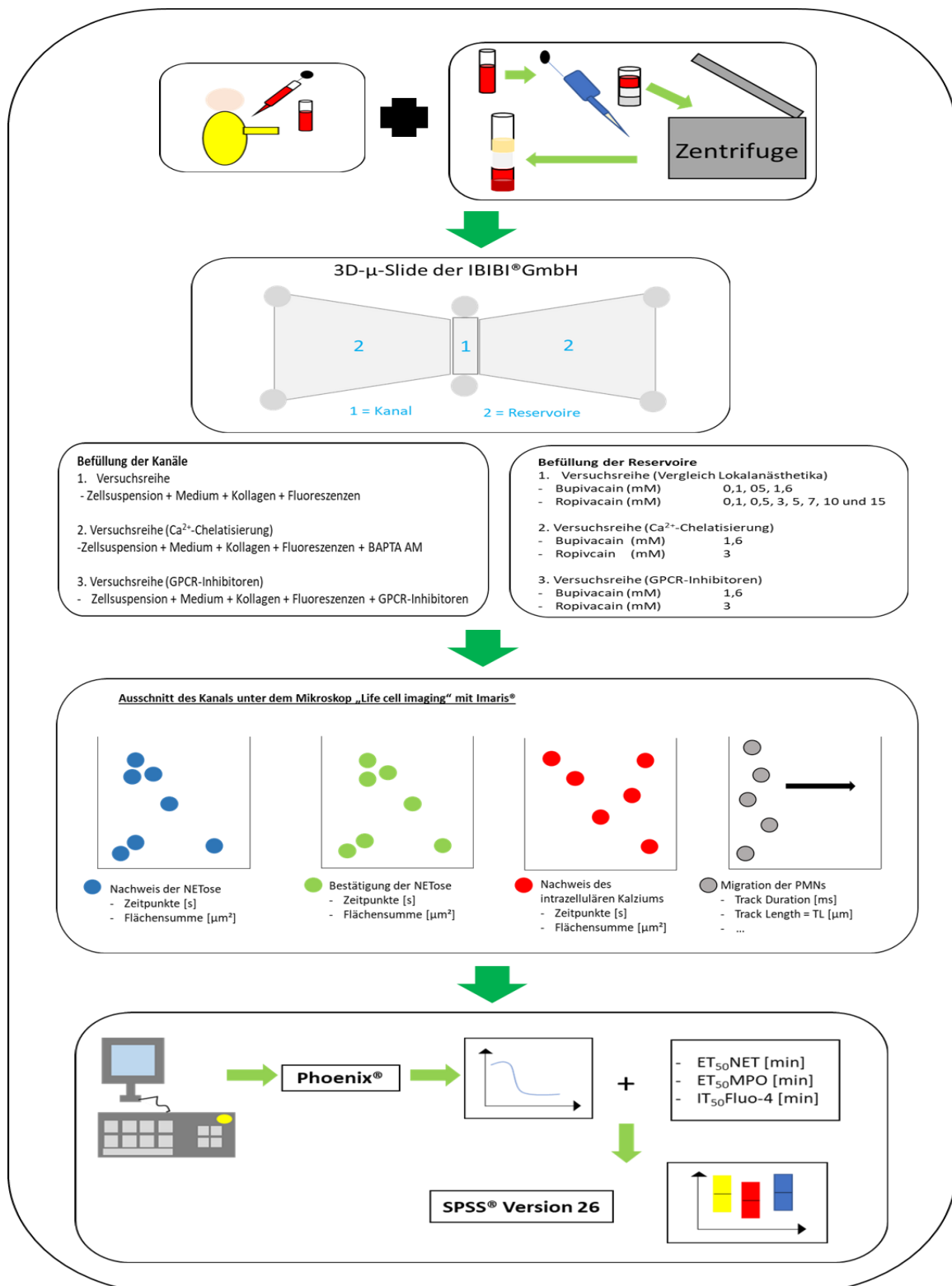


Abbildung 8: Übersicht der gesamten Projektplanung
(Fluoreszenzen = Zugabe von Farbstoff zur Bindung ans intrazelluläre Kalzium, DNA-Farbstoff oder antikörpergekoppelten Fluoreszenzfarbstoff)

Die PMNs wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation aus dem Vollblut der Probanden extrahiert. Es folgte die Befüllung des 3D- μ -Slides der Firma IBIDI®. Die PMNs wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen DAPI, MPO und Fluo-4 in die Kanäle gegeben. Die Befüllung der Reservoirs erfolgte in der ersten Versuchsreihe mit den zu testenden Lokalanästhetika in verschiedenen Konzentrationen und dem fMLP zur Induktion der Chemotaxis (Abbildung 9).

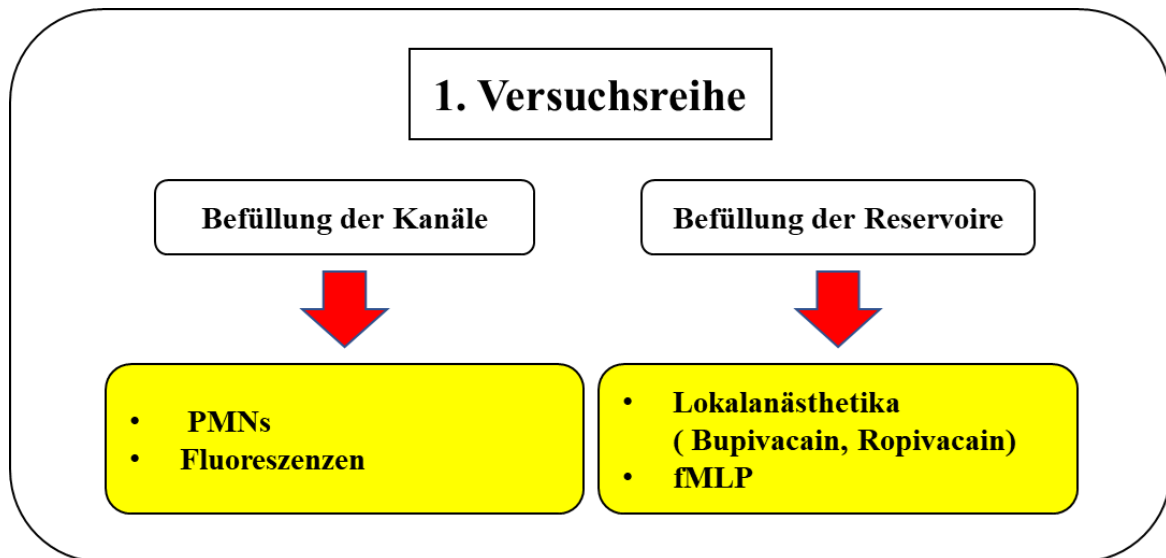


Abbildung 9: Projektablauf der 1. Versuchsreihe

Die Initialversuche erfolgten, um die Beeinflussung der Lokalanästhetika Bupivacain und Ropivacain auf die PMNs darzustellen.

Die darauffolgenden Versuche sollten zeigen, ob die Migration und NETose von intrazellulärem Kalzium abhängig sind. Hierzu wurde die Substanz BAPTA AM eingesetzt, die in der Lage ist, dass intrazelluläre Kalzium zu eliminieren.

BAPTA AM wurde zusätzlich zu den PMNs und den Fluoreszenzen in die Kanäle gefüllt. Als Lokalanästhetikum wurde Ropivacain verwendet und in den Reservoirs vorgelegt (Abbildung 10).

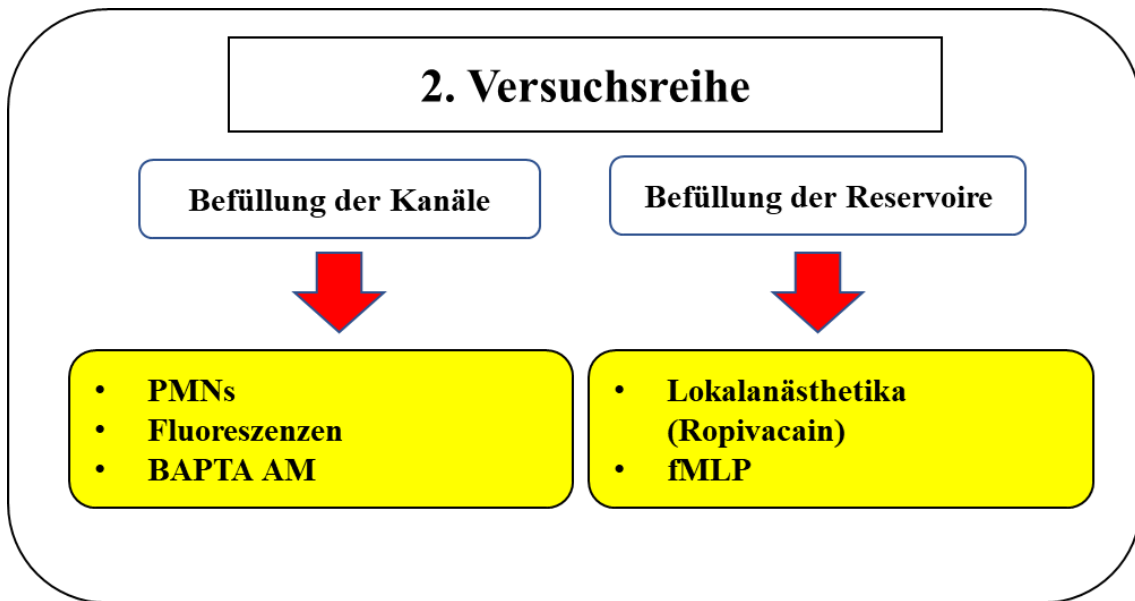


Abbildung 10: Projektablauf der 2. Versuchsreihe

In der 3. Versuchsreihe lag der Schwerpunkt auf dem GPCR. Dies sollte klären, ob die GPCR- Liganden Bindung eine Auswirkung auf die PMNs hat. Aus diesem Grund wurde die G β γ - Subeinheit des GPCR am Aktivierungsübergang zum IP3-K durch Gallein sowie dem PLC Signalweg durch U-73122 inhibiert. Diese Versuche wurden im Anschluss ergänzend mit Ropivacain durchgeführt, um den Einfluss des Lokalanästhetikums auf diese Signaltransduktionen zu erfassen (Abbildung 11).

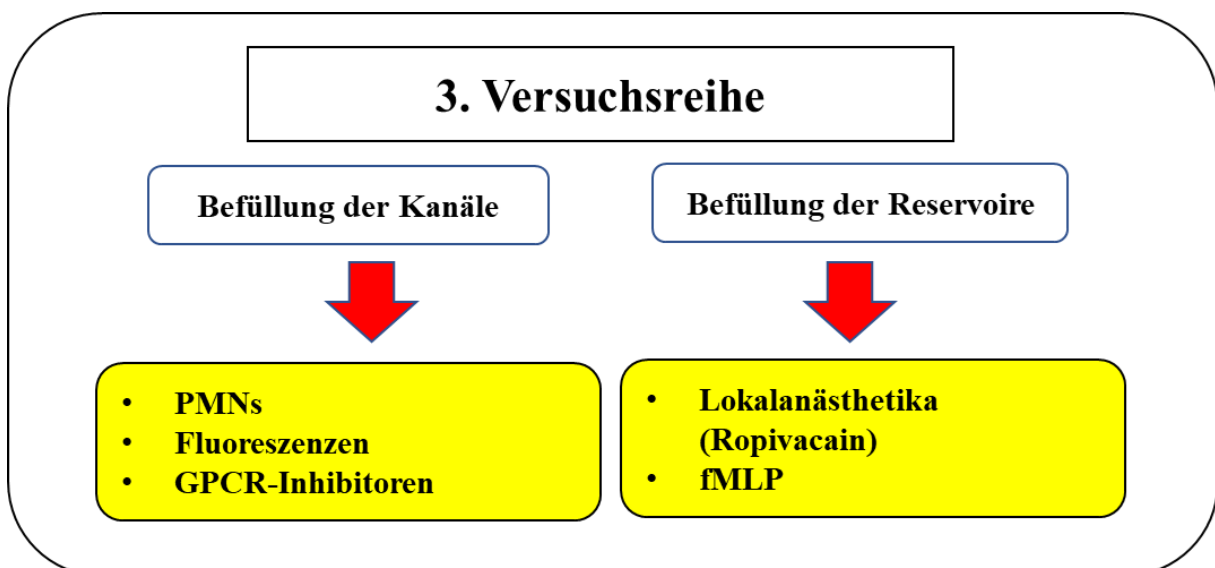


Abbildung 11: Projektablauf der 3. Versuchsreihe

Im Anschluss sind die Slides in jeder Versuchsreihe mit Hilfe des Life-Cell-Imaging mikroskopiert worden. Die Migration der PMNs wurde durch die Track Length [μm] und die Track Duration [ms] erfasst. Die ET_{50}NET [min] und ET_{50}MPO [min] dienen der Erkennung der NETose und die $\text{IT}_{50}\text{Fluo-4}$ [min] ermöglichte die Erfassung des intrazellulären Kalziums (Abbildung 12).

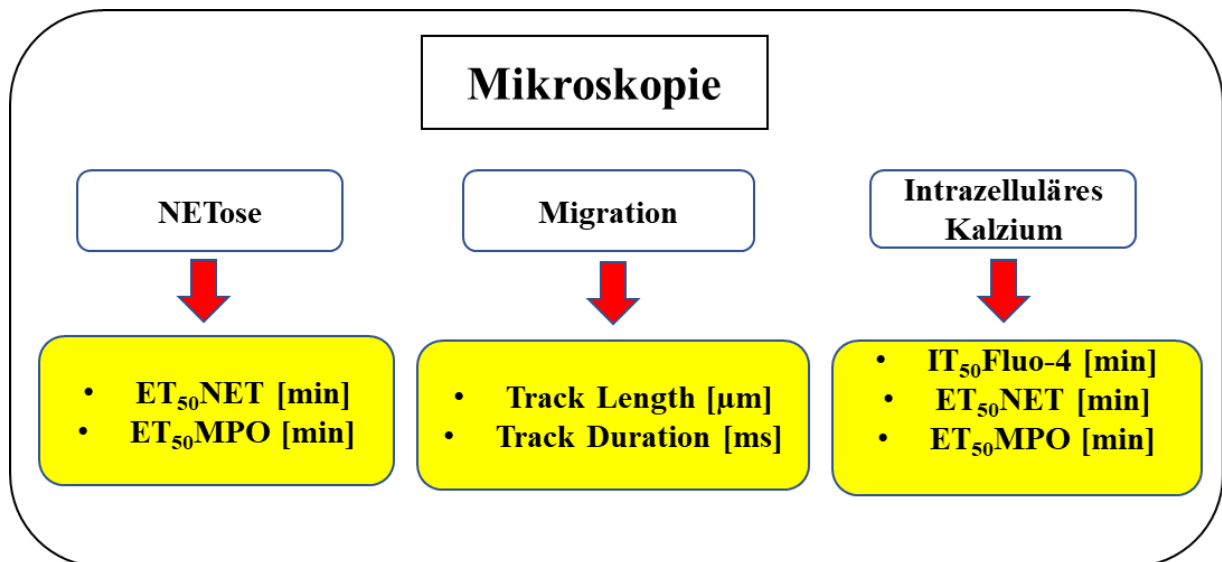


Abbildung 12: Projektablauf der Mikroskopie

5. Material & Methoden

In den experimentellen Untersuchungen wurden die Migration und NETose in Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration der PMNs beobachtet und analysiert. Hierfür wurden die Blutproben verschiedener Probanden verwendet. Durch die Ethikkommission des Klinikums der Universität Regensburg wurden diese in-vitro Versuche genehmigt. Die Projektnummer ist: 12- 101- 0192.

5.1 PMN-Isolation

5.1.1 Probengewinnung und Blutaufbereitung

Nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung der Probanden erfolgte die venöse Punktion. Diese erfolgte in der Ellenbeuge oder dem Handrücken zur Gewinnung von 10 mL Blut mit Hilfe einer Safety-Multifly®-Kanüle mit den Größen 0,8 x 19 mm oder 0,9 x 38 mm (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland). Die Blutprobe wurde in einer Lithium-Heparin-Monovette (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen. Deren enthaltene Antikoagulantien verhindern die Koagulation der Blutprobe.

5.1.2 Dichtegradientenzentrifugation

Die PMNs wurden mit der Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dieses Verfahren schont die Zellen. Hierzu wurden jeweils 3 mL Leuko Spin Medium (Pluri Select Life Science, Leipzig, Deutschland) mit 3 mL Lympho Spin Medium (Pluri Select Life Science, Leipzig, Deutschland) in zwei 15 mL Zentrifugenröhrchen geschichtet. Im Anschluss erfolgte die vorsichtige Aufschichtung von je 3 mL des Probandenblutes. Die eigentliche Zelltrennung erfolgte dann in der 20-minütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur mit einer Drehzahl von 756 G ohne die Zentrifugenbremse. Es wurde die Thermo Scientific™ Biofuge™ Stratos™ Zentrifuge (Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland) verwendet. Durch die Zentrifugation des Probenmaterials erfolgte die Auftrennung des Blutes in mehrere Phasen mit dem Ziel eines konsistenten PMN-Ringes. Siehe dazu Abbildung 13. Dabei entspricht der weißliche, leicht milchig wirkende Ring oberhalb der rötlichen Unterphase, der erwarteten PMN-Fraktion.

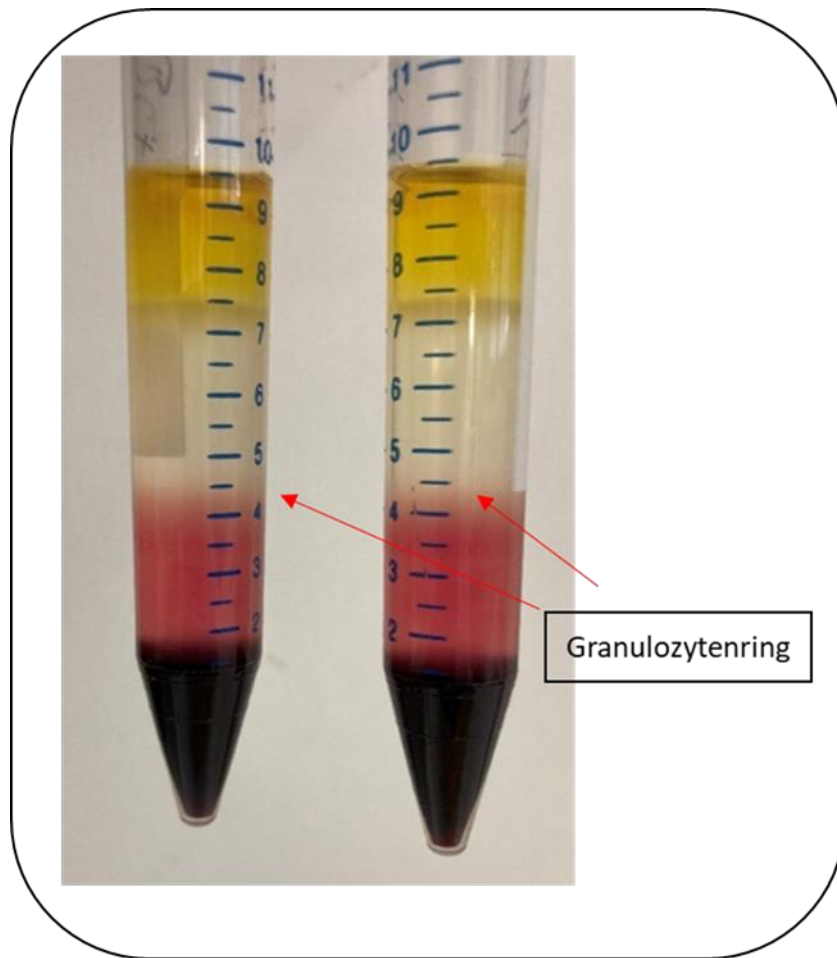


Abbildung 13: Dichtegradientenzentrifugation (eigenes Foto)

Die sich über dem PMN-Ring befindlichen Phasen wurden abgesaugt und verworfen. Im Anschluss wurden jeweils 300 μL des PMN-Ringes entnommen und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Die PMN-Suspension wurde nach Herstellerangabe mit 3 mL DPBS[®] (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline modified without calcium, magnesium and chlorid, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) versetzt. 10 μL dieser Verdünnung wurden entnommen, um mit der Neubauer Zählkammer die Anzahl der PMNs zu ermitteln. Im folgenden Schritt wurde das gewünschte Endvolumen berechnet, um eine Zielzellzahl von 18 Millionen Zellen pro Milliliter zu erlangen. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 272 G zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und mit dem berechneten Volumen des Zellkulturmedium RPMI 1640 (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) mit 10 % igem fetalem Kälberserum (FKS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) resuspendiert.

5.2 Fluoreszenzfarbstoff zur Darstellung von NETs und Kalzium

Für die Darstellung der NETose wurde 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) (D9542-5MG, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und zur Bestätigung des Ablaufs der NETose die Myeloperoxidase (MPO) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Die Migration der isolierten PMNs wurde ohne Fluoreszenzfärbung mit Hilfe einer Phasenkontrasteinstellung des Mikroskops beobachtet. Das DAPI wurde in einer Konzentration von 5 µg/mL verwendet und jeweils 50 µL der zuvor hergestellten PMN-Suspension hinzugegeben. DAPI ist in der Lage als fluoreszierender Komplex an die minor groove von Adenosin-Thymin-reichen Sequenzen der DNA zu binden (103). Bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht stellt sich dieser Fluoreszenzfarbstoff im sichtbaren Bereich des Farbspektrums in blau dar. Für ein ideales Wirkungsspektrum wurde in dieser Studie das Molekül mit der Wellenlänge 385 nm stimuliert.

Bei dem MPO Antikörper handelt es sich um eine gebrauchsfertige Anti-MPO Lösung. Hiervon wurden 10 µL ebenfalls zu dem Gesamtvolumen von 50 µL PMN-Suspension hinzugegeben. Anti-MPO bindet an DNA Fragmente und gelangt nicht nach intrazellulär. Dies ermöglichte es die durch die NETose ausgestoßenen chromatinhaltigen Netze extrazellulär zu bestätigen. Für die optimale Fluoreszenz der MPO wurde in den Versuchen mit der Wellenlänge des Lichts von 525 nm gearbeitet.

Um das intrazelluläre Kalzium und damit auch die Kalziumaktivität im Zusammenhang mit der stattfindenden NETose und Migration zu beobachten, wurde Fluo 4-Fluorescent labeling reagent (Abcam, Berlin, Deutschland) verwendet. Es gelangt in seiner Acetoxymetyler-Molekülstruktur (Fluo-4 Am) nach intrazellulär. Intrazellulär wird es in seine aktive fluoreszierende Struktur gespalten (104). In dieser Studie wurde der Farbstoff mit 3 µL und einer Konzentration von 30 µM zu den 50 µL Zellsuspension hinzugefügt.

5.3 Chemotaxis im Modell

Für die chemotaktische Aktivierung der PMNs und damit verbundene Migration wurde n-Formyl-L-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) (MolecularProbes®, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) verwendet. fMLP wurde in einer Endkonzentration von 10 nM in die linken Reservoire des 3D- μ -Slide-Chemotaxis-Kammersystems eingesetzt.

5.4 Kalziumelimination mit Kalziumchelator

Der membrangängige Kalziumchelator BAPTA AM (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) wurde zur Eliminierung des intrazellulären Kalziums verwendet. Die Abbildung 14 zeigt wie der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 dieses Reaktionsschema sichtbar macht.

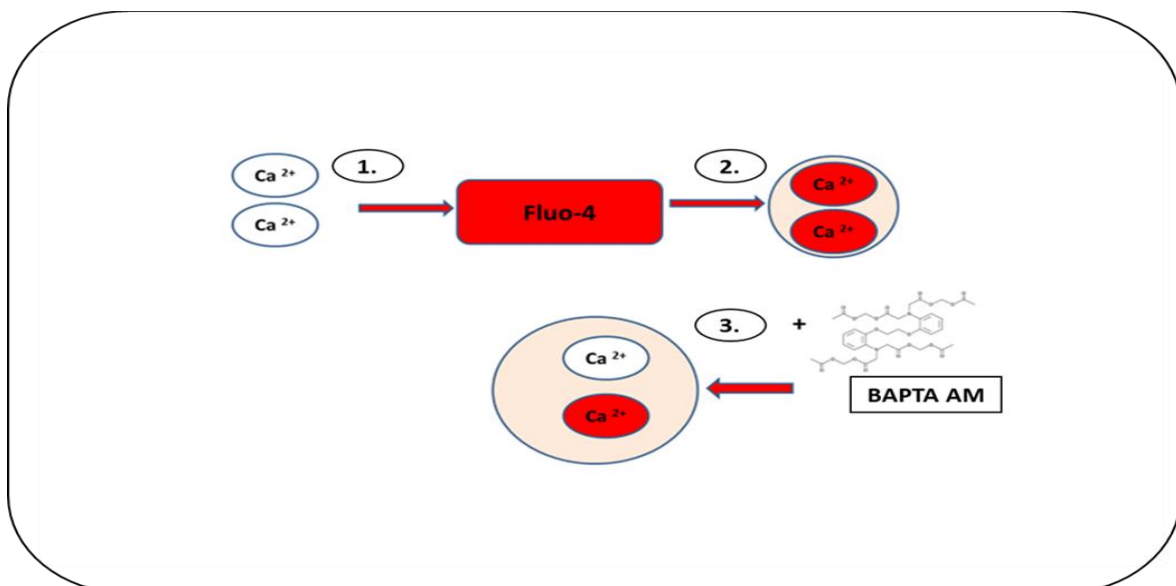


Abbildung 14: Reaktionsablauf mit BAPTA AM

Das intrazelluläre Kalzium wird durch den Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 gebunden. [1] Dadurch, ist die intrazelluläre Kalziumaktivität im Mikroskop sichtbar [2]. Bei Zugabe von BAPTA AM wird Kalzium eliminiert und die Fluoreszenzintensität nimmt unter dem Mikroskop ab [3]. (eigene Darstellung)

Die Substanz wurde wie unten beschrieben in den Endkonzentrationen 5 μM , 20 μM , 25 μM und 30 μM hinzugefügt. Laut dem Produktinformationsblatt wurde der kristalline Feststoff BAPTA AM dem Lösungsmittel DMSO zugegeben. Die DMSO Endkonzentration betrug 0,1 %.

5.5 Intrazelluläre Beeinflussung durch GPCR-Inhibition

Zur Darstellung des Einflusses der Lokalanästhetika auf die Migration und NETose, wurden Gallein, auch Pyrogallol Phthalein genannt, und U-73122 hinzugegeben. Beide hemmen durch GPCR aktivierte Signaltransduktionsschritte. Gallein (Hycultec GmbH, Beutelsbach, Deutschland) hemmt die Lipidkinase PI3-K. U-73122 (Hycultec GmbH, Beutelsbach, Deutschland) blockiert die Aktivierung von PLC und die damit assoziierte IP₃ und DAG Stimulierung. Dies zeigt Abbildung 15.

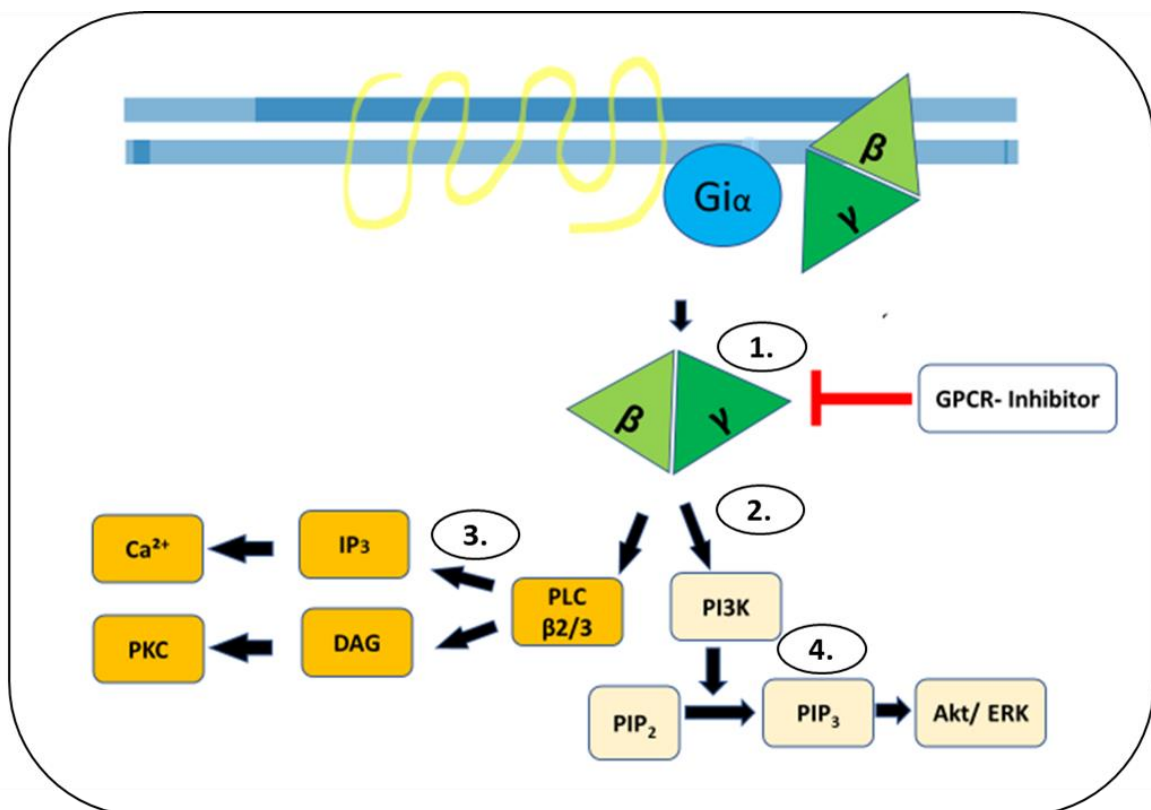


Abbildung 15: Effekt durch GPCR-Inhibitoren

Die Aktivierung eines GPCR wird an der Subeinheit G_βγ durch den GPCR-Inhibitor unterbrochen. [1] Daraufhin findet die weitere Signalkaskade über PLC und PI3K nicht statt. [2] PLCβ_{2/3} stimuliert die IP₃ und DAG. [3] PI3K aktiviert hingegen den Kinasesignalweg der Akt/ERK. [4] (eigene Darstellung)

Gallein wurde in einer Konzentration von 10 μM und U-73122 von 5 μM verwendet (105–107). Dazu wurde eine 10003 μM Gallein-Stammlösung sowie eine U-73122-Stammlösung mit einer Konzentration von 5244 μM hergestellt. Beide wurden nach Herstellerangaben in DMSO gelöst. Gewünschte Endkonzentration von DMSO war 0,1 % in allen drei Kanälen, um in allen drei Kanälen ähnliche Bedingungen zu schaffen.

5.6 Verwendete Lokalanästhetika

Für die Versuchsreihen wurde das Ropivacain-Hydrochlorid Monohydrat der Firma Falgron in Pulverform benutzt. Um die gewünschten Ropivacainkonzentrationen zu erzielen, wurde eine Stammlösung von 50 mM mit PBS hergestellt. In Initialversuchen wurde Bupivacain-Hydrochlorid Monohydrat der Firma Sigma Aldrich verwendet, um die Ergebnisse von Kolle et al. zu reproduzieren.

5.7 3D- μ -Slide-Chemotaxis-Kammer

Zur experimentellen Beobachtung und Funktionsanalyse der PMNs wurde mit 3D- μ -Slide-Chemotaxis-Kammern von IBIDI® (IBIDI® GmbH, Planegg/Martinsried, Deutschland) gearbeitet. Diese Kammersysteme ermöglichten es, eine Echtzeitmessung mit Hilfe eines stabilen chemotaktischen Gradienten durchzuführen und gleichzeitig drei verschiedene Zustände zu beobachten. Der Aufbau eines jeden 3D- μ -Slide besteht aus drei Kammern. Diese bestehen aus einem Kanal und jeweils zwei Reservoiren. Der Aufbau solch eines Kammersystems zeigt die Abbildung 16.

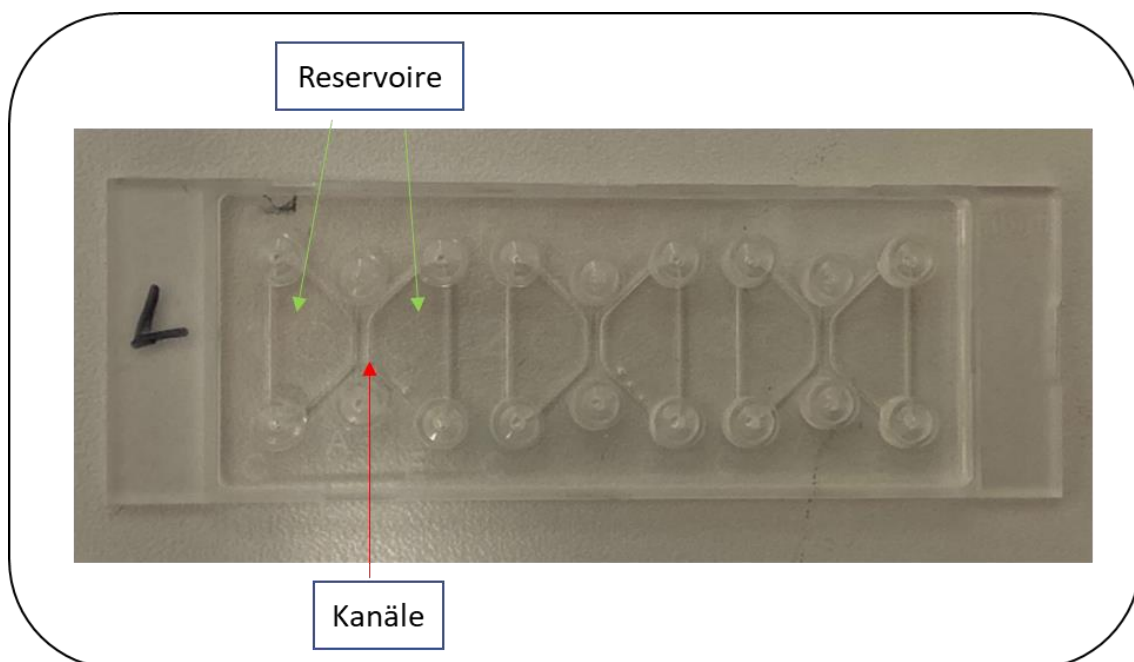


Abbildung 16: 3D- μ -Slide der IBIDI® GmbH

5.7.1 Befüllung der Kanäle

Die Kanäle wurden in den ersten Versuchen mit einem Gemisch, welches aus einem Medium, Kollagen, den isolierten Zellen sowie den Fluoreszenzfarbstoffen DAPI, MPO und Fluo-4 bestand, befüllt. Ziel war es im Gel eine 1,5 mg/mL bovine Kollagen-I Konzentration zu erreichen. Die Tabelle 1 zählt tabellarisch die Volumina für das Medium auf.

Substanz	Volumen [μL]
MEM 10- fach (<i>Minimum Essential Medium, M0275, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>)	20
Destilliertes Wasser	20
NaHCO_3^- (<i>Emsure® ACS, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland</i>)	10
RPMI 1640 (<i>PAN- Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland</i>)	50

Tabelle 1: Gemisch des Mediums

Das Volumen des Kanals setzte sich in den ersten Versuchen in denen lediglich mit und ohne Lokalanästhetika als Zusatz in den Reservoirs gearbeitet worden ist, aus den folgenden Komponenten, wie in Tabelle 2 aufgezählt, zusammen.

Substanz	Volumen [μL]
Medium	100
PureCol® (<i>Advanced BioMatrix, Inc. San Diego</i>)	150
Zellsuspension + Fluoreszenzen	50

Tabelle 2: Kanalgemisch ohne Zusatzsubstanz

In den darauffolgenden Versuchen mit BAPTA AM als Bestandteil des Kanalgels, wurde zu Beginn kein Ropivacain-Hydrochlorid in die Reservoirs hinzugegeben. Dies wurde zum späteren Zeitpunkt in weiteren Versuchen um Vergleiche ziehen zu können geändert (65). Wie in der Literatur beschrieben, wurden zunächst die Konzentrationen von 20 μM , 25 μM und 30 μM BAPTA AM verwendet (108). Zuletzt wurde entschieden, dass die Konzentrationen von 5 μM im mittleren Kanal und 20 μM im rechten Kanal verwendet werden sollten.

Der linke Kanal diente der Kontrolle ohne BAPTA AM. Zur Herstellung des Kanalgels in den BAPTA AM Versuchen wurde wieder die Anleitung der Herstellung des Mediums verwendet. Es wurden jedoch 10 μL des destillierten Wassers aus dem Medium durch die entsprechende dem Kanal vorgesehene BAPTA AM Vorverdünnung ersetzt. Ebenso wurden die in Tabelle 3 aufgezählten Substanzen für eine Endkonzentration des Kollagens von 1,5 mg/mL hinzugefügt.

Substanz	Volumen [μL]
BAPTA AM Vorverdünnung	33
Zellsuspension + Fluoreszenzen	17
PureCol® (<i>Advanced BioMatrix, Inc. San Diego</i>)	50

Tabelle 3: Kanalgemisch mit BAPTA AM

In den darauffolgenden Versuchen wurde die GPCR-Inhibition mit und ohne Ropivacain beobachtet. Um die Signalkaskade des GPCR über die G $\beta\gamma$ -Subeinheit zu inhibieren, musste der Versuchsaufbau angepasst werden. Die Substanzen Gallein und U-73122 wurden in ihrer Vorverdünnung dem Medium aus Tabelle 4 je Beobachtungszweck hinzugegeben.

Substanz [μL]	Linker Kanal	Mittiger Kanal	Rechter Kanal
Medium	90	90	80
Gallein	10	-	10
U-73122	-	10	10

Tabelle 4: Mediengemische mit GPCR-Inhibitoren

Daraufhin erfolgte die Zugabe der GPCR-Inhibitor- Medium- Gemische je Kanal zu den bereits mit Fluoreszenzen vorbereiteten Zellen und dem Kollagen. Wie Tabelle 5 zeigt, konnte so die Kollagenendkonzentration von 1,5 mg/mL für die Kanäle erreicht werden.

Substanzen [μ L]	Linker Kanal	Mittiger Kanal	Rechter Kanal
GPCR-Inhibitor Vorverdünnung	33	33	33
Zellsuspension + Fluoreszenzen	16	17	17
PureCol® (<i>Advanced BioMatrix, Inc.San Diego</i>)	50	50	50

Tabelle 5: Kanalgemisch mit GPCR-Inhibitoren

Dadurch wurden auch die gewünschten Endkonzentrationen der GPCR-Inhibitoren wie es in Tabelle 6 gezeigt wird, erreicht.

Endkonzentration [μ M]	Linker Kanal	Mittiger Kanal	Rechter Kanal
Gallein	10	-	10
U-73122	-	5	5

Tabelle 6: Endkonzentrationen der GPCR-Konzentrationen

5.7.2 Befüllung der Reservoirs

Die beiden jeweiligen Reservoirs der Kanäle wurden in jedem Versuch mit dem Grundmedium RPMI 1640 + 10 %iges fetales Kälberserum gefüllt, um die Vitalität der PMNs aufrecht erhalten zu können. Zusätzlich wurde in fast jedes linke Reservoir eine 10 nM Konzentration von fMLP hinzupipettiert, um die septischen Bedingungen zu simulieren.

Ein variabler Parameter in den Reservoirs war die Konzentration des Lokalanästhetikums Ropivacain. Wir pipettierten die Konzentrationen 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM und 15 mM. In weiteren Versuchen wurde das Lokalanästhetikum Bupivacain 0,1 mM, 0,5 mM und 1,6 mM verwendet. Das jeweilige Lokalanästhetikum wurde in beide Reservoirs in den entsprechenden Verdünnungen zugegeben.

5.8 Life Cell Imaging

Die Beobachtung der PMNs erfolgte über einen Zeitraum von 14 Stunden mittels eines Leica-Mikroskop DMi8 (Leica Mikroskopie & System GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit 100-facher Vergrößerung. Des Weiteren wurde die Software Leica Application Suite X (LAS X 3.0.4.16529, Leica Mikroskopie & System GmbH, Wetzlar, Deutschland) eingesetzt. Mit Hilfe der Leica DFC9000 GT Kamera (Leica Mikroskopie & System GmbH, Wetzlar, Deutschland) sowie dem Belichtungssystem CoolLED pE4000 (CoolLED Ltd., Andover, England) führten wir die Analyse und elektronische Dokumentation durch. Die IBIDI® Chemotaxis-Kammer wurde in die am Objektisch befindliche Klimakammer (IBIDI®) eingebettet. Im Anschluss erfolgte die Einstellung der Objektischpositionen, um den optimalen Fokus auf die jeweiligen Kanäle zu erhalten. Entsprechend der Versuche und deren Fluoreszenzen wurde die Belichtungsenergie gewählt. Die gewählten Wellenlängen und weitere Eigenschaften der Fluoreszenzen zeigt die folgende Tabelle 7.

	DAPI	Anti-MPO-APC	Fluo-4
Wellenlänge der maximalen Extinktion [nm]	395	650	510
Verwendete Wellenlänge [nm]	385	635	490
Verwendete Einlassfilter [nm]	380 – 410	615 - 635	472 - 498
Wellenlänge der maximalen Fluoreszenz [nm]	461	660	532
Verwendete Auslassfilter [nm]	420 - 460	650	505 - 545

Tabelle 7: Eigenschaften der Fluoreszenzen

Für die optimale detaillierte Datengewinnung wurden die Kammern in jedem Versuch alle 30 Sekunden abgelichtet. Die gesammelten Daten wurden in ihrem zeitlichen Verlauf in Bezug auf die Migration, NETose und intrazelluläre Kalziumaktivität analysiert.

5.9 Erfassung der Daten

Es erfolgt nun eine Beschreibung wie die Mengen an Daten mit Hilfe der Imaris® Software verarbeitet, die so analysierten Informationen mit Hilfe von Excel tabellarisch erfasst werden konnten, um diese im Anschluss mit Hilfe von Phönix® in Kurven zu verarbeiten, um am Ende diese mit der Statistiksoftware SPSS® Version 26 (SPSS® IBM® Company) zu analysieren.

5.9.1 Datensätze der Migration

Für die Migration wurde über die Imaris® Software die zurückgelegte Strecke der Zellen erkannt und die von uns bestätigten Zellen analysiert. Durch die Helligkeitsunterschiede der beobachteten Zellen und des Hintergrundes wurde mit dem Phasenkontrast die Migration der Zellen als sogenannte Spots erfasst. In den 14 Stunden der Beobachtung wurde die Zeit in 30 Minutenabschnitten frequentiert und entsprechend von der Software Imaris® die dazugehörigen mikroskopisch erfassten Bilder hinzugefügt. Daraus ergaben sich die Track Displacement X (TDX), die Track Displacement Y (TDY), die Track Displacement Length (TDL), die Track Length (TL), die Track Speed Max, die Track Speed Mean, die Track Speed Min, Track Duration und die Track Straightness. Die Tabelle 8 gibt genaue Angaben zur Bedeutung der einzelnen Parameter. Die gewonnenen Daten über die Migration wurden in einer Excel-Tabelle zusammengetragen.

Parameter	Definition
Track Displacement X = TDX [μm]	Wegstrecke auf der x-Achse
Track Displacement Y = TDY [μm]	Wegstrecke auf der y-Achse
Track Displacement Length = TDL [μm]	Distanz zwischen der ersten und letzten Position der Zelle
Track Length = TL [μm]	Gesamte Länge der veränderten Position
Track Speed Max [$\mu\text{m/s}$]	Maximale Geschwindigkeit zur Zurücklegung der Wegstrecke
Track Speed Mean [$\mu\text{m/s}$]	Durchschnittliche Geschwindigkeit zur Zurücklegung der Wegstrecke
Track Speed Min [$\mu\text{m/s}$]	Minimale Geschwindigkeit zur Zurücklegung der Wegstrecke
Track Duration [s]	Dauer zwischen dem ersten und letzten Zeitpunkt innerhalb eines Tracks
Track Straightness [D/L]	Aussage zur zielgerichteten Bewegung

Tabelle 8: Migrationsparameter

5.9.2 Datensätze der Fluoreszenzfarbstoffe

Im Imaris® Programm wurden die angewendeten Fluoreszenzfarbstoffe fiktiven Farben zugeordnet und entsprechende Kanäle gewählt. Die Abhebung der unterschiedlichen zellulären Ereignisse durch die Farbdarstellung vom eigentlichen Hintergrund in der Software zeigte sich durch die unterschiedlichen Fluoreszenzen und deren Wellenlängen. Für die NETose, die NETose Bestätigung mit MPO und die intrazelluläre Kalziumkonzentration wurden die „Surfaces“ mit Hilfe der Imaris® Software erhoben und daraus die Datensätze zur: Area, Birth [s], Death [s], Zeitpunkte [s] und die Flächensummen der Fluoreszenzen in Sekunden erfasst. So lagen nach Festlegung eines sich wiederholenden Befehls bei Excel (Makro) alle durch die Fluoreszenzfarbstoffe verursachten Farbflächen pro betrachteten Frame (Zeitpunkt) zu einer Gesamtflächensumme pro Frame vor. Diese Gesamtflächensummen pro Frame wurden dann zur weiteren Analyse in eine neue Excel Tabelle übertragen und in die Software Phoenix® übertragen.

5.9.3 Erstellung der $ET_{50}NET$, $ET_{50}MPO$ und $IT_{50}Fluo-4$ mit Phoenix®

In der Software Phoenix® war es möglich aus den bisherigen Datensätzen, die die Zeit-Flächen-Beziehung der Fluoreszenzfarbstoffe DAPI, MPO und Fluo-4 angaben, sigmoidale Kurven zu erfassen. Diese stellten das halbmaximale Wachstum der maximalen Flächensumme ($ET_{50}NET$ [min], $ET_{50}MPO$ [min] und $IT_{50}Fluo-4$ [min]) dar. Das Programm nähert eine, der Michaelis-Menten Formel angelehnte Gleichung, an den jeweiligen sigmoidalen Messpunkterverlauf an. Die mathematische Formel und der sigmoidale Kurvenverlauf sind in Abbildung 17 und Abbildung 18 dargestellt.

$$E = E_0 + \frac{E_{\max} * T^y}{(ET_{50}^y + T^y)}$$

T= Framenummer

E₀= initiale Effekthöhe

E= Effekt in Form der Flächensumme

E_{max}= maximale Effekthöhe

ET₅₀=halbmaximale Effekt der maximalen Flächensumme

y=Hill-Faktor

Abbildung 17: Formel zur Beschreibung des Messpunkteverlaufs aus Phoenix®

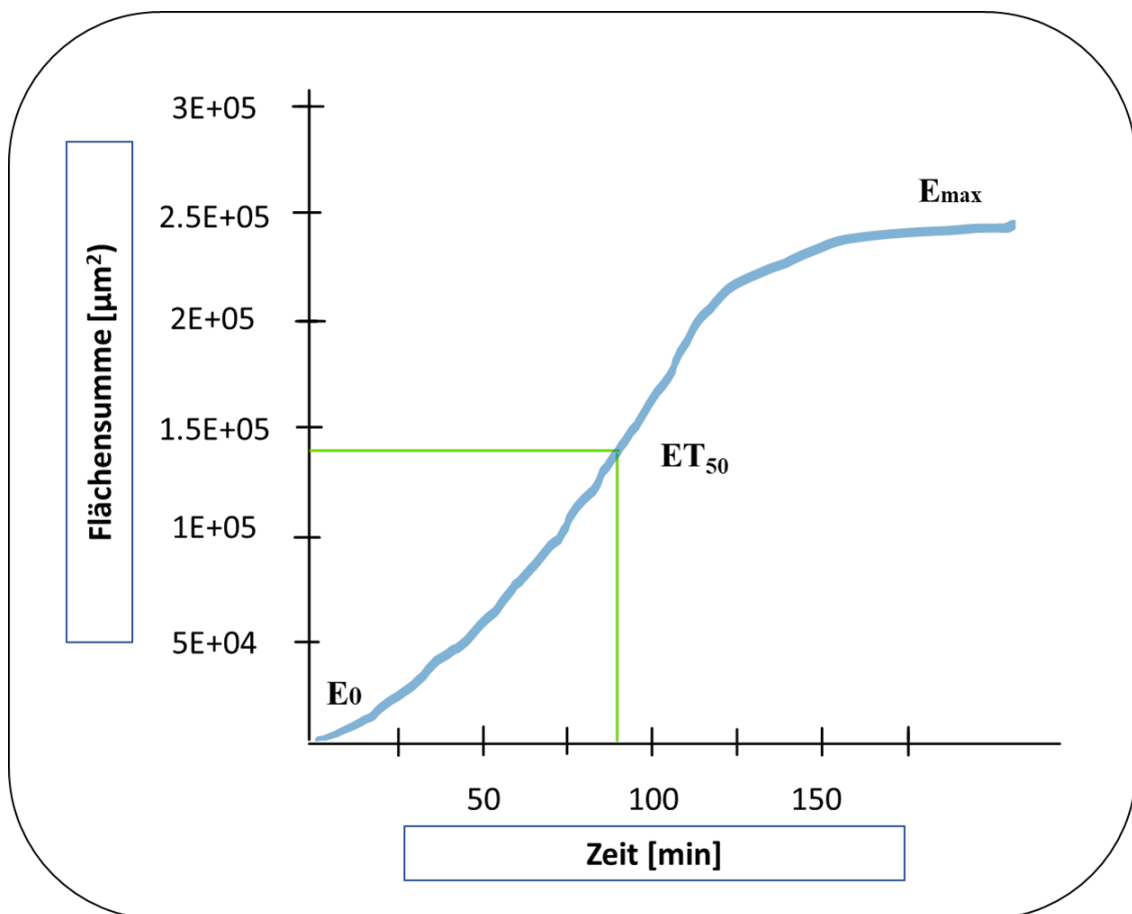


Abbildung 18: Messung der ET₅₀-Werte (eigene Darstellung)

Neben ET_{50} ließ sich mithilfe von y die Steigung der sigmoidalen Kurve ablesen. Für die ET_{50} , y , aber auch die initiale Effekthöhe (E_0) und den maximalen Effekt (E_{max}) wurden in einer zusätzlichen Excel-Tabelle mit weiteren für die Versuche relevante Variablen erfasst. Die Darstellung der $IT_{50}Fluo-4$ [min] in Abbildung 19 wies einen gegenläufigen sigmoidalen Verlauf als $ET_{50}NET$ [min] und $ET_{50}MPO$ [min] auf. Außerdem zeigte diese inhibitorische sigmoidale Kurve einen Zeitpunkt der maximalen Fluo-4 Aktivität und somit die maximale intrazelluläre Kalziumkonzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt.

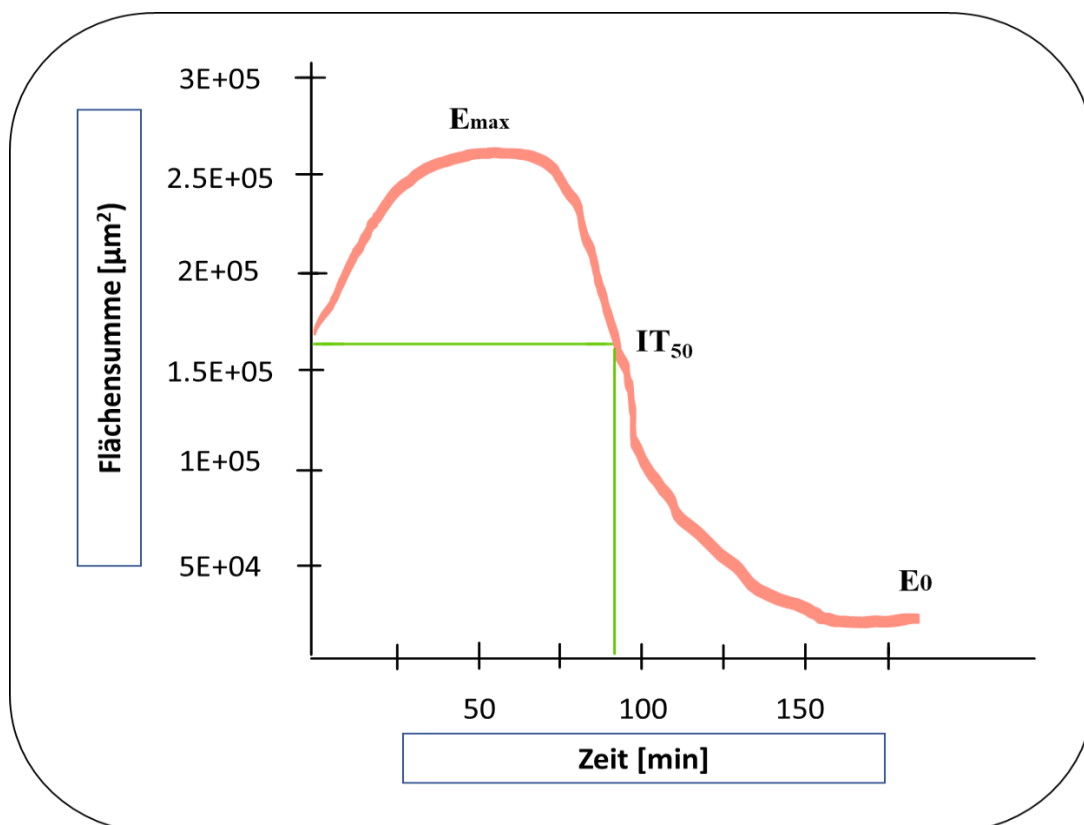


Abbildung 19: Messung der IT_{50} -Werte (eigene Darstellung)

Die erfassten ET_{50} und IT_{50} Werte wurden exportiert und als Exceldatensatz ins Statistikprogramm SPSS® Version 26 hochgeladen. Die Migrationsdaten wurden direkt zur statistischen Analyse verwendet und mussten nicht mit Phoenix® bearbeitet werden.

5.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS® Version 26 (SPSS® IBM® Company). Alle Gruppen wurden dem Test nach Kolmogorov-Smirnov zur Testung auf Normalverteilung unterzogen. Bei Mehrfachvergleichen wurde bei einer Normalverteilung der signifikante Unterschied zwischen den Gruppen mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) geprüft. Die Varianzhomogenität wurde nach Bonferroni und die Varianzheterogenität nach Dunnett T3 erfasst. Die Aussage über die Varianz wurde mit dem Levene-Test nachvollzogen. War die Normalverteilung in den einzelnen Gruppen nicht gegeben, wurde die zentrale Tendenz der einzelnen zu testenden Gruppen nach Kruskal-Wallis geprüft. Dieser folgte daraufhin ebenfalls die Varianzanalyse. Zur Betrachtung der zentralen Tendenz von zwei unabhängigen Stichproben, bei denen durch Fehlen der Normalverteilung kein t-Test angewendet werden konnten, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet.

Die statistische Signifikanz wurde als eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ definiert.

Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse erfolgten mit einfachen oder gruppierten Boxplots. Die Ausreißer stellten sich als Punkte oder Sternchen, außerhalb des oberen und unteren Whiskers dar.

6. Ergebnisse

6.1 Eigenschaften der Probanden

Es nahmen 51 Probanden an dieser Studie teil. Darunter waren 34 weibliche Teilnehmerinnen und 17 männliche Teilnehmer vertreten. Der Median des Alters der Teilnehmer/ -innen betrug 23 Jahre. Der Median der Körpergröße lag bei 172 cm und der des Körpergewichts bei 63 kg.

6.2 Einfluss von Lokalanästhetika auf die NETose

6.2.1 Bupivacain

In der Abbildung 20 werden die ET_{50NET} -Werte bei verschiedenen Konzentrationen von Bupivacain gezeigt.

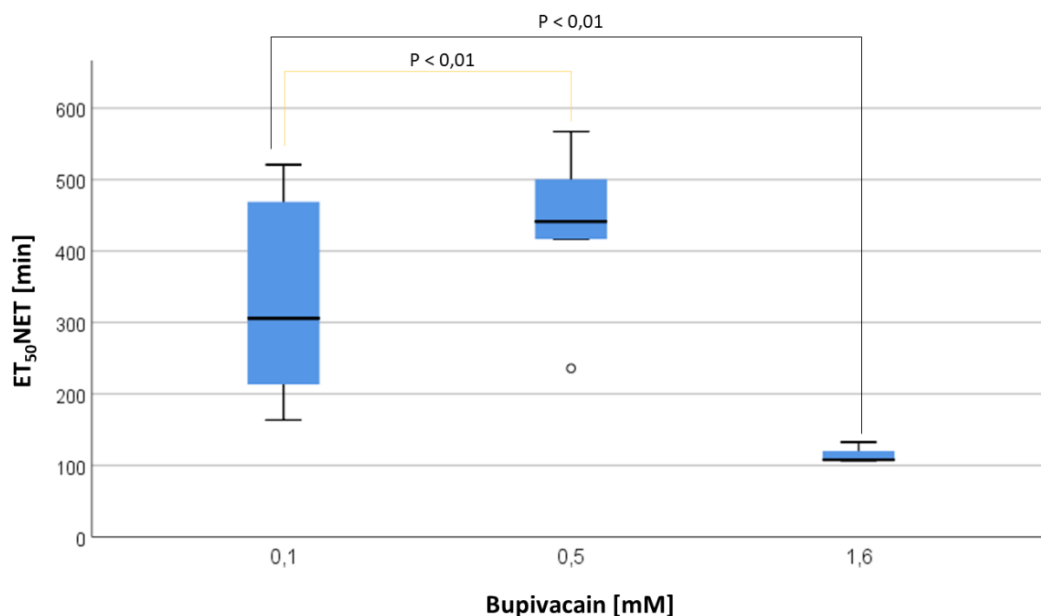


Abbildung 20: Einfluss von Bupivacain auf die ET_{50NET} [min]

Die x-Achse stellt die verwendeten Konzentrationen von Bupivacain dar. 0,1 mM fasst die Werte von 0 mM und 0,1 mM zusammen. 0,5 mM fasst die Konzentrationen 0,2 mM und 0,5 mM zusammen. Die y-Achse misst die ET_{50NET} [min].
o = Ausreißer

Beim Vergleich der ET_{50NET} [min] der Gruppe der Konzentration 0,1 mM mit der Gruppe der Konzentration von Bupivacain 0,5 mM und 1,6 mM zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$).

6.2.2 Ropivacain

Die folgende Abbildung 21 präsentiert den Einfluss von Ropivacain auf die ET_{50NET} [min].

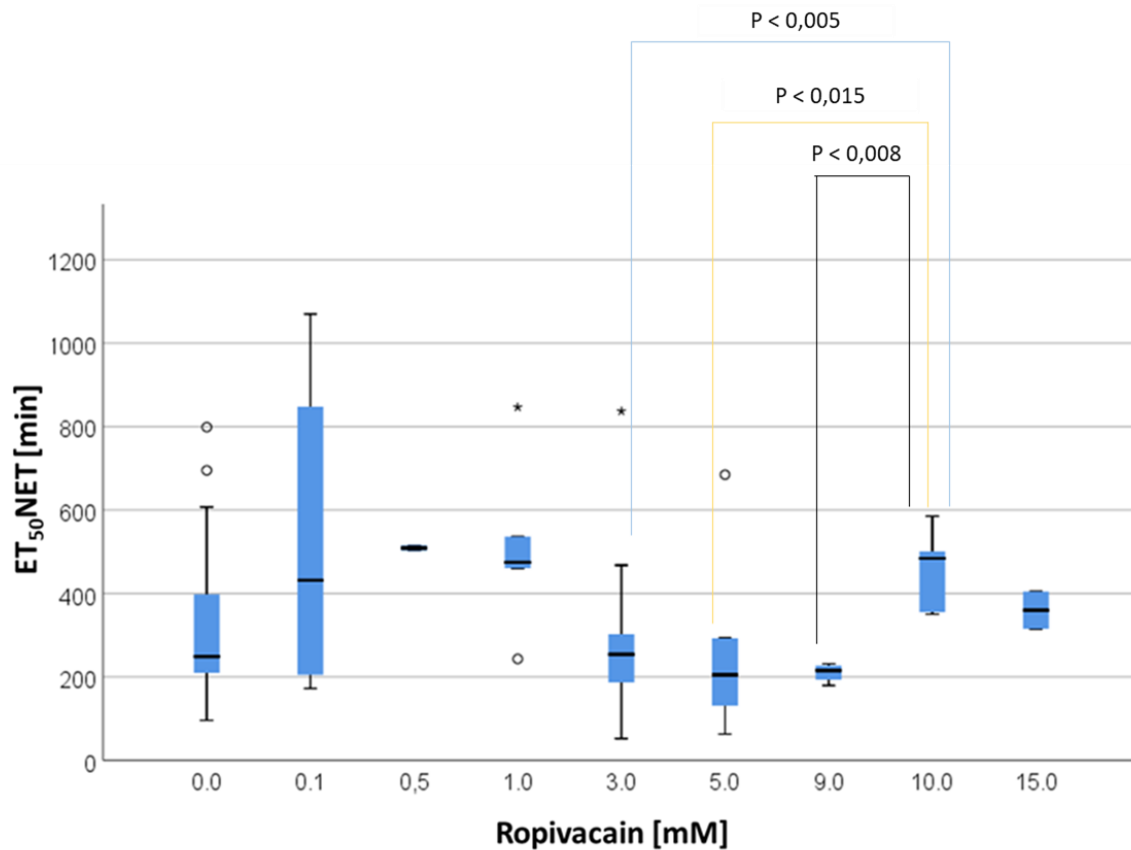


Abbildung 21: Einfluss von allen Ropivacainkonzentrationen auf die ET_{50NET} [min]

Die x-Achse stellt die Konzentration von Ropivacain dar. Die y-Achse zeigt die ET_{50NET} [min]. o = Ausreißer.

★ = Extremwerte.

Bei den mittleren Ropivacainkonzentrationen 3 mM, 5 mM und 9 mM zeigte sich im Vergleich zu den niedrigen Konzentrationen 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM, dass die NETosen (ET_{50NET}) zwar tendenziell zu früheren Zeitpunkten passieren, die Unterschiede aber nicht signifikant waren.

Bei den hohen Konzentrationen (10 mM und 15 mM) fanden die NETosen gegenüber den NETosen bei mittleren Konzentrationen (3 mM, 5 mM und 9 mM) verspätet statt. Aus diesem Grund verglichen wir die Zeitpunkte der NETosen bei hohen Konzentrationen 10 mM und 15 mM mit denen bei mittleren Konzentrationen (3 mM, 5 mM und 9 mM). Es konnte zwischen den Zeitpunkten der NETosen bei mittleren Konzentrationen 3 mM ($p < 0,005$), 5 mM ($p < 0,015$) und 9 mM ($p < 0,008$) im Vergleich zu den Zeitpunkten der NETosen bei der hohen Konzentration von 10 mM signifikante Unterschiede erfasst werden.

Im Vergleich der ET₅₀NET-Werte der Gruppe mit 15 mM Ropivacain mit den Werten der Konzentrationen 3 mM, 5 mM und 9 mM zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Im Folgenden werden die ET₅₀NET- Werte bei den Konzentrationen 0,1-1 mM und ≥ 3 mM jeweils zusammengefasst. Diese wurden mit ET₅₀NET-Werten verglichen, die ohne Zugabe von Ropivacain berechnet wurden (Abbildung 22).

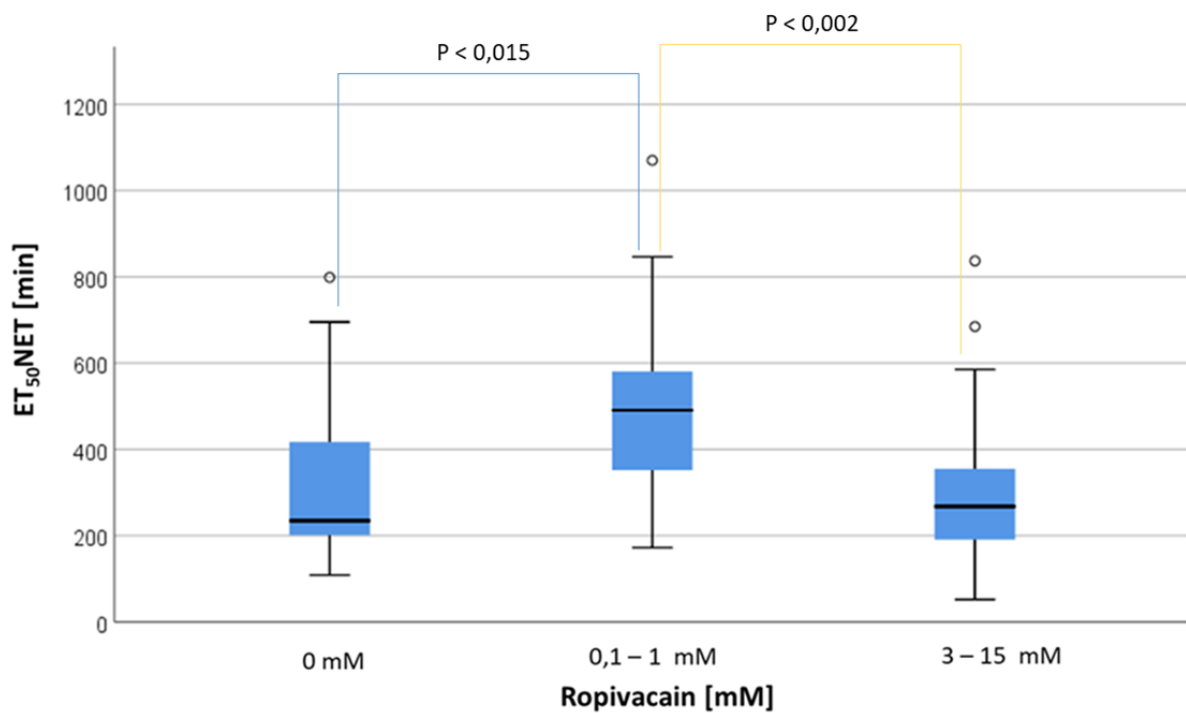


Abbildung 22: Vergleich gruppierter Ropivacainkonzentrationen
 Vergleich des Einflusses der Ropivacainkonzentrationen (0 mM, 0,1 mM – 1mM und 3 mM – 15 mM) auf die ET₅₀NET [min].
 Die x- Achse stellt die Ropivacainkonzentration und die y- Achse die ET₅₀NET [min] dar. o = milde Ausreißer.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Konzentration 0 mM und 0,1 – 1 mM ($p < 0,015$). Ein signifikanter Unterschied bestand auch zwischen der Konzentration 0,1 – 1 mM und 3 – 15 mM ($p < 0,002$). Es lag kein Unterschied zwischen der Kontrolle und der Konzentration (3 mM – 15 mM) vor.

6.3 Einfluss auf die NETose und das Kalzium

6.3.1 Beeinflussung der NETose

Die Abbildung 23 zeigt den Effekt von BAPTA AM und Ropivacain auf die ET_{50NET} [min].

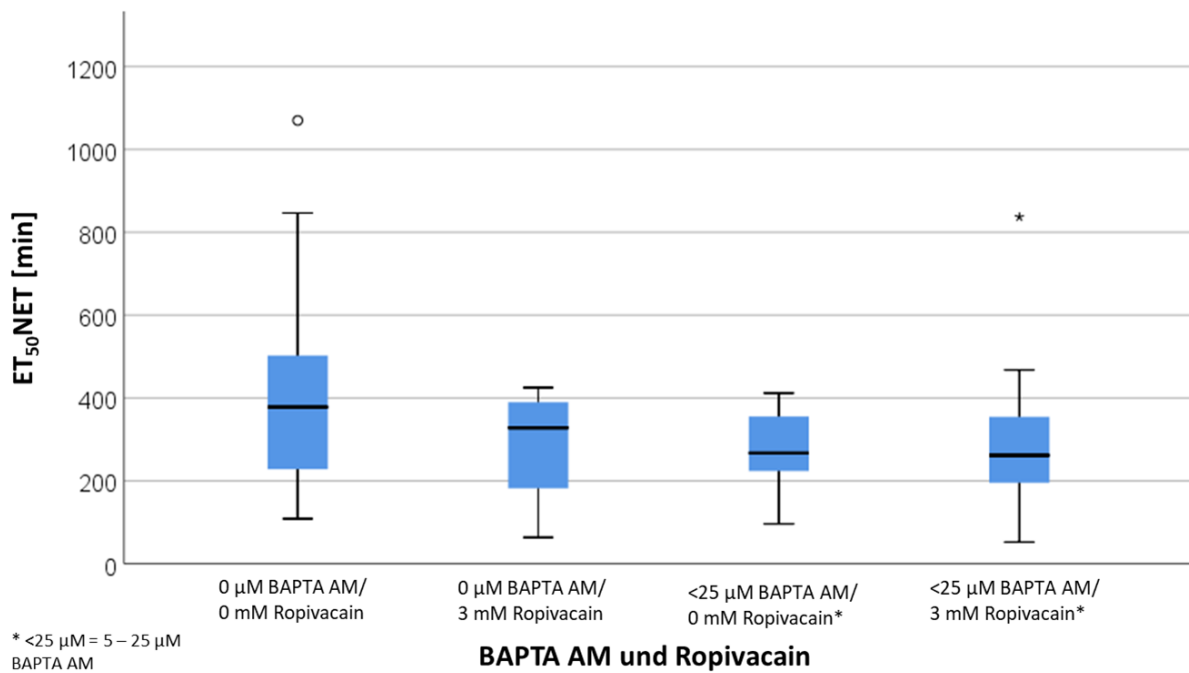


Abbildung 23: Einfluss BAPTA AM und Ropivacain auf die ET_{50NET} [min]

Die x-Achse stellt Konstellationen der Substanzen BAPTA AM und Ropivacain dar. Die y-Achse zeigt die Messung der ET_{50NET} [min]. o = Ausreißer. ★ = Extremwerte.

Ein signifikanter Unterschied der ET_{50NET} [min] Werte konnte zwischen den Gruppen nicht identifiziert werden.

6.3.2 Veränderungen des intrazellulären Kalziums

Die folgende Abbildung 24 zeigt den Einfluss von BAPTA AM und Ropivacain auf die Messungen der $IT_{50}Fluo-4$ [min].

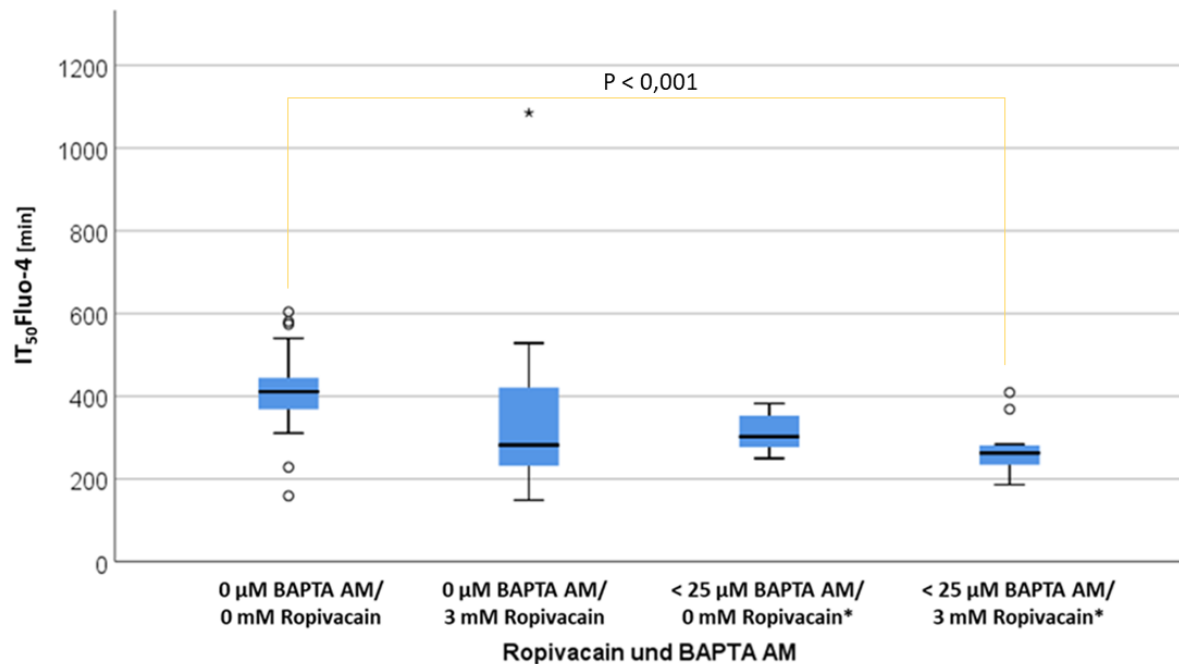


Abbildung 24: Einfluss von BAPTA AM und Ropivacain auf die $IT_{50}Fluo-4$ [min]

Auf der x-Achse wird die Konstellation der Substanzen BAPTA AM und Ropivacain dargestellt. Die y-Achse dient dem Ablesen der Werte von $IT_{50}Fluo-4$ [min]. o = Ausreißer. ☆ = Extremwert.

Beim Vergleich der $IT_{50}Fluo-4$ [min] der Kontrolle mit den $IT_{50}Fluo-4$ [min] Werten der Gruppen in der kombiniert BAPTA AM (5 – 25 μM) und Ropivacain (3 Mm) verwendet worden, ergab sich ein signifikanter Unterschied von $p < 0,001$. Es lagen keine weiteren signifikanten Unterschiede vor.

6.4 Einfluss der GPCR-Inhibitoren auf die NETose

6.4.1 GPCR-Inhibitoren

Die Abbildung 25 präsentiert den Einfluss der GPCR-Inhibitoren auf die $ET_{50}NET$ [min].

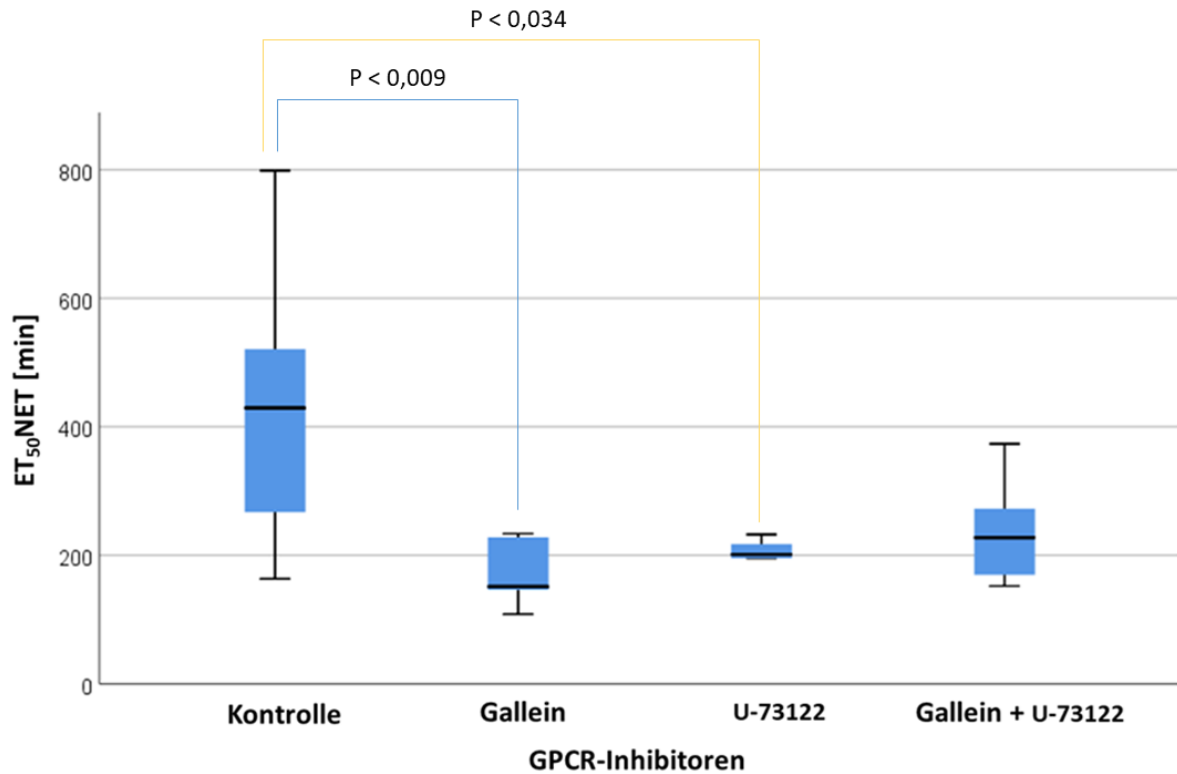


Abbildung 25: Einfluss der GPCR-Inhibitoren auf die $ET_{50}NET$ [min]

Die x-Achse zeigt die verwendeten GPCR-Inhibitoren. Gallein wurde mit je $10 \mu M$ und U-73122 mit je $5 \mu M$ verwendet. Die y-Achse stellt die $ET_{50}NET$ [min] dar.

Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den $ET_{50}NET$ [min] Werten der Kontrolle und denen von $10 \mu M$ Gallein ($p < 0,009$) und U-73122 ($p < 0,034$). Im Vergleich bestand kein Unterschied der Werte der Kontrollgruppe zur kombinierten Zugabe von Gallein und U-73122.

6.4.2 GPCR-Inhibitoren und Ropivacain

In der folgenden Abbildung 26 wird der Effekt auf die $ET_{50}NET$ [min] durch die GPCR-Inhibitoren unter gleichzeitiger Verwendung von Ropivacain dargestellt.

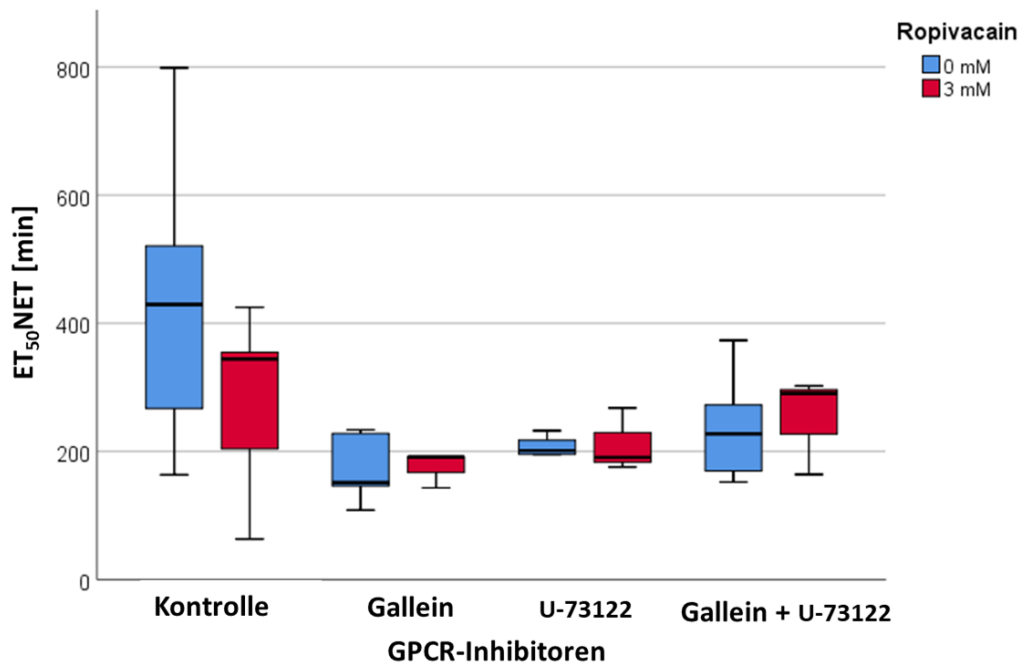


Abbildung 26: Einfluss von GPCR-Inhibitoren und Ropivacain auf die $ET_{50}NET$
Die x-Achse zeigt die verwendeten GPCR-Inhibitoren Gallein ($10\mu M$), U-73122 ($5\mu M$). Die y-Achse stellt die $ET_{50}NET$ [min] dar. Die Clusterung unterteilt die Ropivacainkonzentrationen in blau (0 mM) und rot (3 mM).

Es lag kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der $ET_{50}NET$ [min] Werte der Gruppen der Kontrolle, der Werte von Gallein, der Werte von U-73122 und den Werten bei Gallein + U-73122 vor, wenn 3 mM Ropivacain zugegeben worden waren. Aus diesem Grund wurden die Gruppen der Kontrolle mit und ohne 3 mM Ropivacain untereinander zusammengefasst sowie die Gruppen von Gallein, U-73122 und deren Kombination. Dies stellt die Abbildung 27 dar.

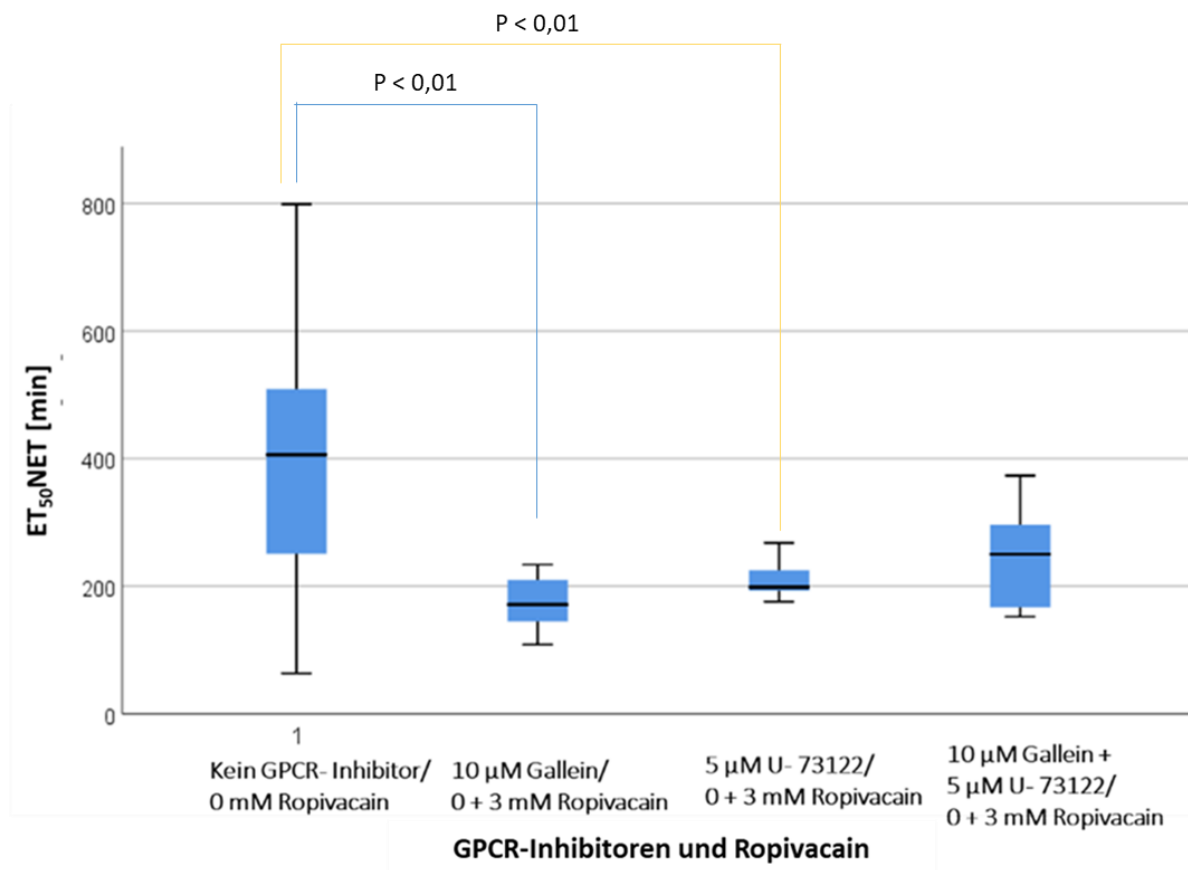


Abbildung 27: Einfluss von GPCR-Inhibitoren und Ropivacain auf die ET₅₀NET [min]

Die x-Achse zeigt die Anwendung von verschiedenen Kombinationen mit und ohne GPCR-Inhibitoren und den zusammengefassten Ropivacainkonzentrationen (0 mM und 3mM). Die y-Achse stellt die Zeitpunkte der ET₅₀NET [min] dar.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der ET₅₀NET [min] der Gruppe mit Gallein ($p < 0,01$) und U-73122 ($p < 0,01$) im Vergleich zur ET₅₀NET [min] der Kontrollgruppe. Es bestanden keine weiteren signifikanten Unterschiede.

6.5 Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentration

6.5.1 GPCR-Inhibitoren

Die Abbildung 28 zeigt den Effekt der GPCR-Inhibitoren auf die $IT_{50Fluo-4}$ [min] Werte der PMNs.

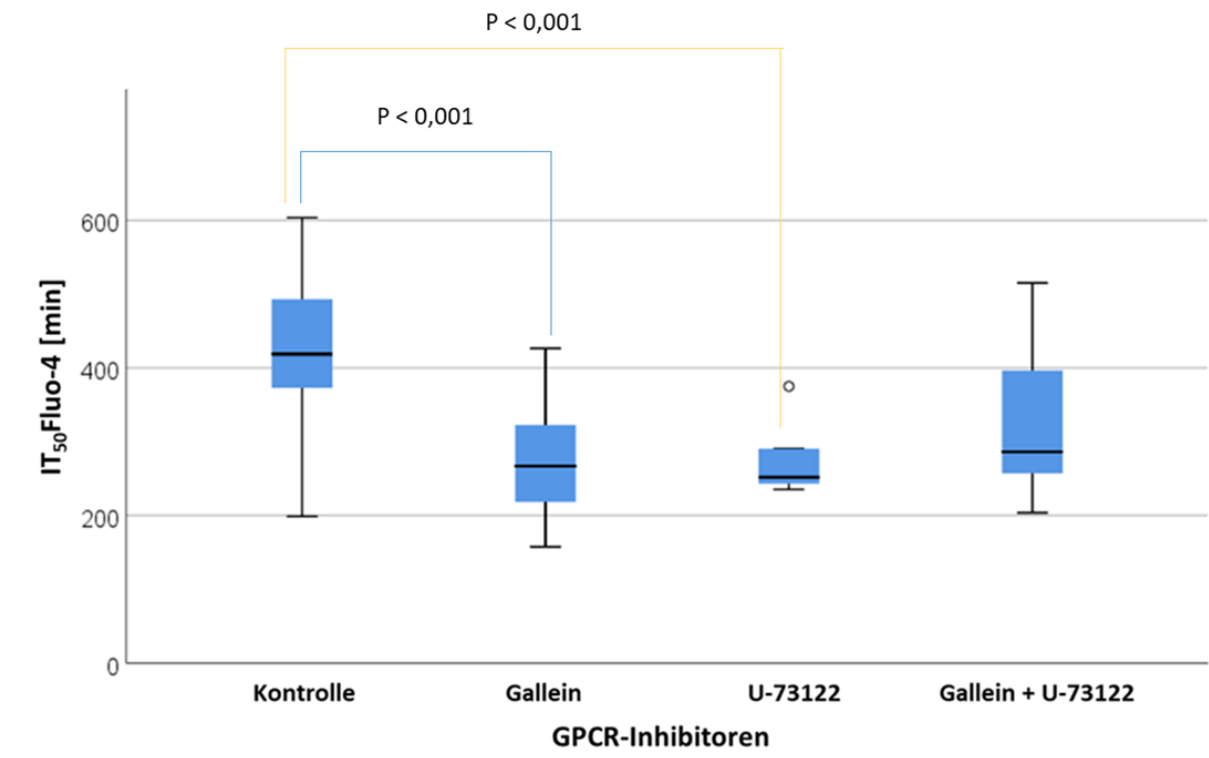


Abbildung 28: Einfluss von GPCR-Inhibitoren auf die $IT_{50Fluo-4}$ [min]

Die x-Achse stellt die GPCR-Inhibitoren Gallein (10 μ M), U-73122 (5 μ M) und deren Kombination dar. Die y-Achse misst die $IT_{50Fluo-4}$ [min] Werte. o = Ausreißer.

Zwischen den $IT_{50Fluo-4}$ [min] Werten der Kontrollgruppe und den Gruppen der GPCR- Inhibitoren Gallein ($p < 0,001$) und U-73122 ($p < 0,001$) bestand ein signifikanter Unterschied.

6.5.2 GPCR-Inhibitoren und Ropivacain

In der folgenden Abbildung 29 wird der Einfluss der GPCR-Inhibitoren mit und ohne Ropivacain auf die $IT_{50}Fluo-4$ [min] dargestellt.

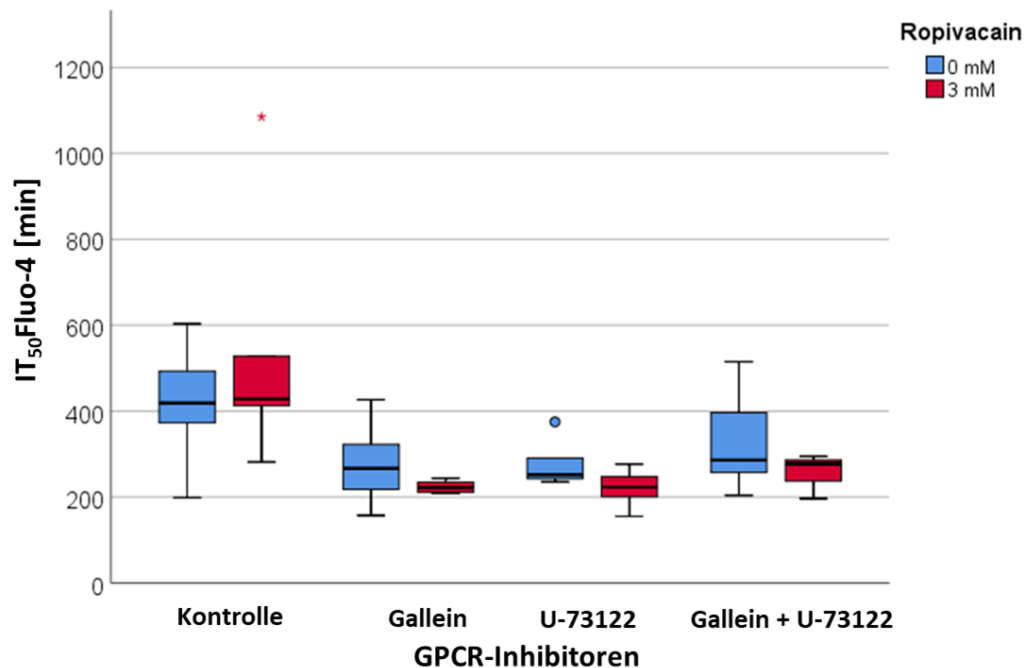


Abbildung 29: Einfluss von GPCR-Inhibitoren und Ropivacain auf die $IT_{50}Fluo-4$ [min]
Die x-Achse stellt die angewendeten GPCR-Inhibitoren dar. Die y-Achse erfasst die $IT_{50}Fluo-4$ [min] Werte. Die Clusterung zeigt die Ropivacainkonzentrationen in blau (0 mM) und in rot (3 mM). ● = Ausreißer. ★ = Extremwerte.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der $IT_{50}Fluo-4$ [min] Werte der Kontrollgruppen und der $IT_{50}Fluo-4$ [min] Ergebnisse von Gallein, U-73122 und deren Kombination. Deshalb präsentiert Abbildung 30 wie die Gruppen der Kontrolle mit und ohne 3 mM Ropivacain untereinander zusammengefasst worden waren und dies auch mit den Gruppen von Gallein, U-73122 und deren Kombination erfolgte.

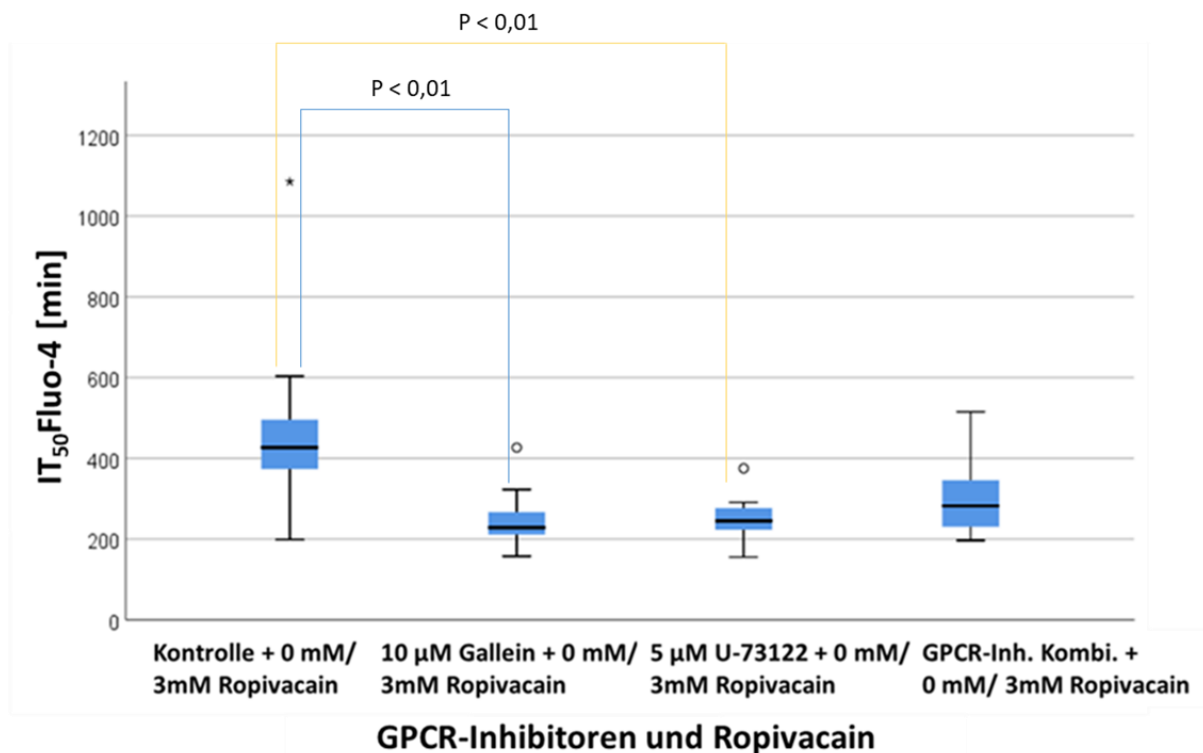


Abbildung 30: Vergleich GPCR-Inhibitoren und Ropivacainkonzentrationen
 Die x-Achse zeigt die verwendeten Kombinationen aus GPCR-Inhibitoren und Ropivacain. Die y-Achse misst die IT₅₀Fluo-4 [min]. o = Ausreißer; ☆ = Extremwert.

Es stellte sich so ein signifikanter Unterschied zwischen den IT₅₀Fluo-4 [min] Werten der Kontrollgruppen und der IT₅₀Fluo-4 [min] Werte von den Gruppen Gallein sowie auch bei U-73122 mit $p < 0,01$ dar.

6.6 Einfluss auf die PMN-Migration

6.6.1 Bupivacain und Ropivacain

Die folgende Abbildung 31 präsentiert den Einfluss der Lokalanästhetika Bupivacain und Ropivacain auf die Track Length [μm] der PMNs.

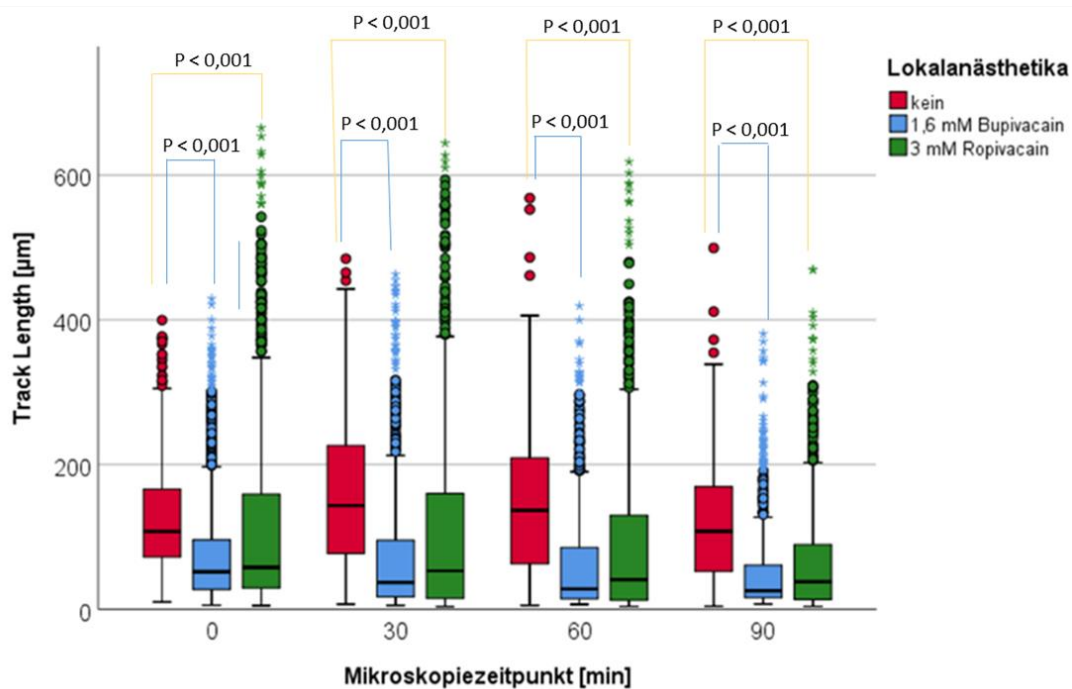


Abbildung 31: Einfluss von Bupivacain und Ropivacain auf die Migration

Die x-Achse stellt den Zeitpunkt der Beobachtung mit life cell imaging in Abstand von 30 Minuten dar. Die y-Achse zeigt die Migration als Track Length [μm]. Die Clusterung stellt in rot Kontrolle, in blau Bupivacain (1,6 mM) und in grün Ropivacain (3 mM) dar. o = Ausreißer. ★ = Extremwerte.

Die statistische Analyse zeigte einen signifikanten Unterschied von $p < 0,001$ bei beiden angewendeten Pharmaka gegenüber der Track Length [μm] der Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

6.6.2 BAPTA AM

In der Abbildung 32 wird der Effekt des Kalziumchelators BAPTA AM auf die Track Length [μm] der PMNs gezeigt.

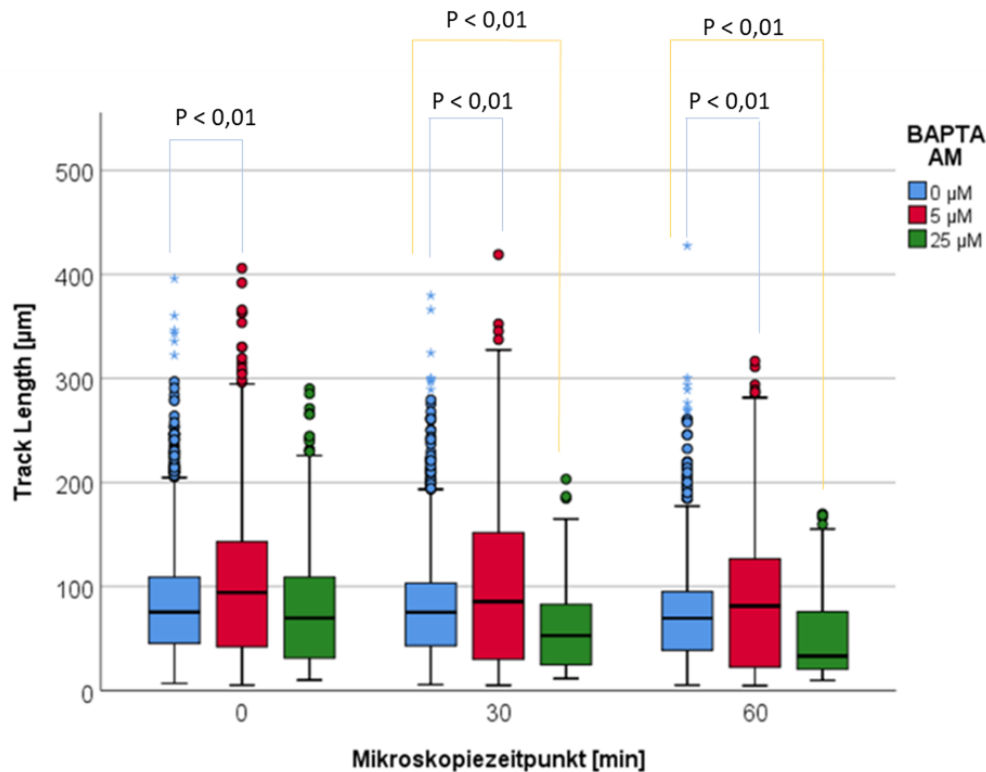


Abbildung 32: Einfluss von BAPTA AM auf die Track Length [μm]

Die x-Achse stellt den zeitlichen Beobachtungsverlauf in 30-minütigen Abständen dar. Die y-Achse misst die Track Length [μm]. Die Clusterung erfasst die BAPTA AM Konzentration in blau ($0 \mu\text{M}$), rot ($5 \mu\text{M}$) und in grün ($25 \mu\text{M}$). o = Ausreißer.

★ = Extremwerte.

Es zeigte sich zum Zeitpunkt 0 Minuten ein signifikanter Unterschied zwischen der Track Length der Kontrolle ($p < 0,01$) und BAPTA AM ($5 \mu\text{M}$), jedoch nicht gegenüber der Konzentration von $25 \mu\text{M}$. Bei den Track Lengths der Kontrollen nach 30 und 60 Minuten konnte ein signifikanter Unterschied gegenüber den Track Lengths bei BAPTA AM $5 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$) und $25 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$) gezeigt werden.

6.6.3 BAPTA AM und Ropivacain

Die Abbildung 33 zeigt den Effekt von BAPTA AM und Ropivacain auf die Track Length [μm].

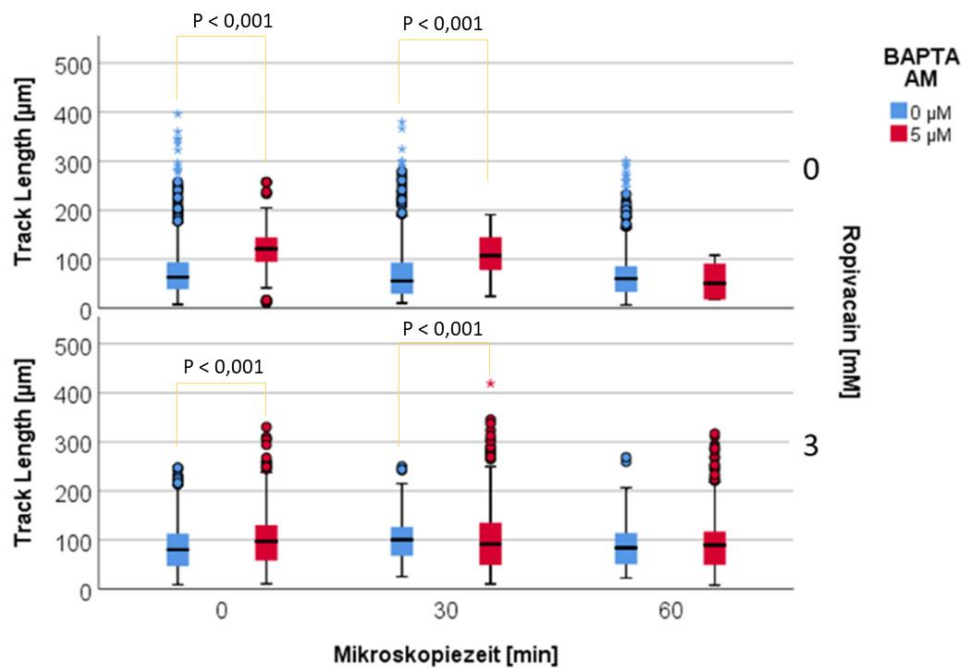


Abbildung 33: Einfluss von BAPTA AM und Ropivacain auf die Track Length [μm]
 Die x-Achse stellt den zeitlichen Verlauf der Mikroskopie in 30 Minutenabständen dar. Die y-Achse zeigt die Track Length [μm] der PMNs. Die Clusterung unterteilt die BAPTA AM Konzentration in blau (0 μM) und rot (5 μM). o = Ausreißer.
 ☆ = Extremwerte.

Zum Zeitpunkt 0 Minuten und 30 Minuten zeigte sich beim paarweisen Vergleich ein signifikanter Unterschied von $p < 0,001$ zwischen der Track Lengths der Kontrolle und bei BAPTA AM (5 μM) unabhängig von Ropivacain (0 mM oder 3 mM).

6.6.4 GPCR-Inhibitoren und Ropivacain

In der Abbildung 34 wird der Effekt von den GPCR-Inhibitoren und Ropivacain dargestellt.

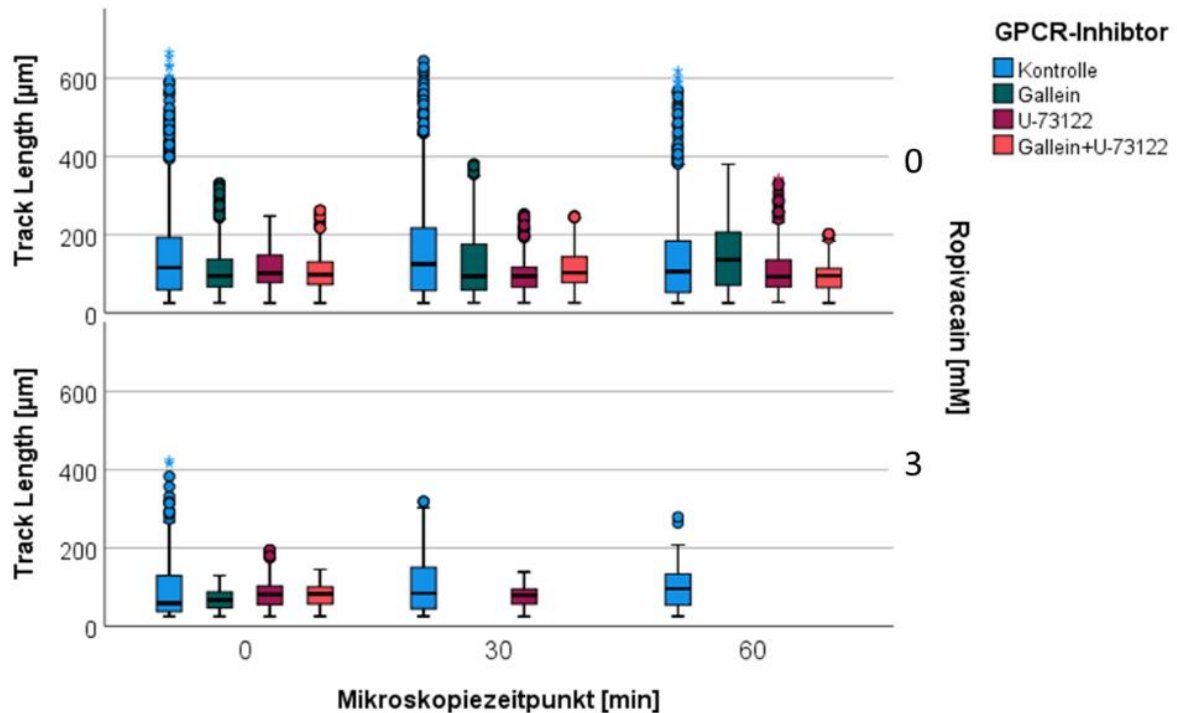


Abbildung 34: Einfluss GPCR-Inhibitoren und Ropivacain auf die Track Length [µm]

Die x-Achse erfasst den zeitlichen Verlauf der Mikroskopie in Minuten. Die y-Achse zeigt die Track Length [µm] der verschiedenen Gruppen der Substanzen. Die Clusterung unterteilt die GPCR-Inhibitoren in blau (Kontrolle), grün (10 µM Gallein), rot (5 µM U-73122) und orange (10 µM Gallein + 5 µM U-73122). o = Ausreißer. ☆ = Extremwerte.

Bei der kombinierten Anwendung von GPCR-Inhibitoren mit 3 mM Ropivacain zeigte sich im zeitlichen Verlauf ein früheres Sistieren der zellulären Fortbewegung (keine Track Lengths > 25 µm). Dieser frühere Abbruch ist im unteren Diagramm bei den Versuchen mit Gallein und Ropivacain bereits ab dem Zeitintervall 30 Minuten Versuchsablauf zu erkennen. Im Zeitabschnitt 60 Minuten präsentiert sich dies auch bei U-73122 und Ropivacain. Im Zeitraum 60 Minuten ist zuletzt nur noch eine geringe Zellanzahl (n=124 Tracks) in der Kontrolle zu verzeichnen. Im Vergleich liegt zum Zeitpunkt 30 Minuten bei der Anwendung mit Ropivacain (3 mM) eine höhere Zellzahl (n=366 Tracks) vor. Aus diesem Grund wurden nur die Ergebnisse der Migration von den Kontrollversuchen mit und ohne 3 mM Ropivacain, was Abbildung 35 verdeutlicht, angeschaut.

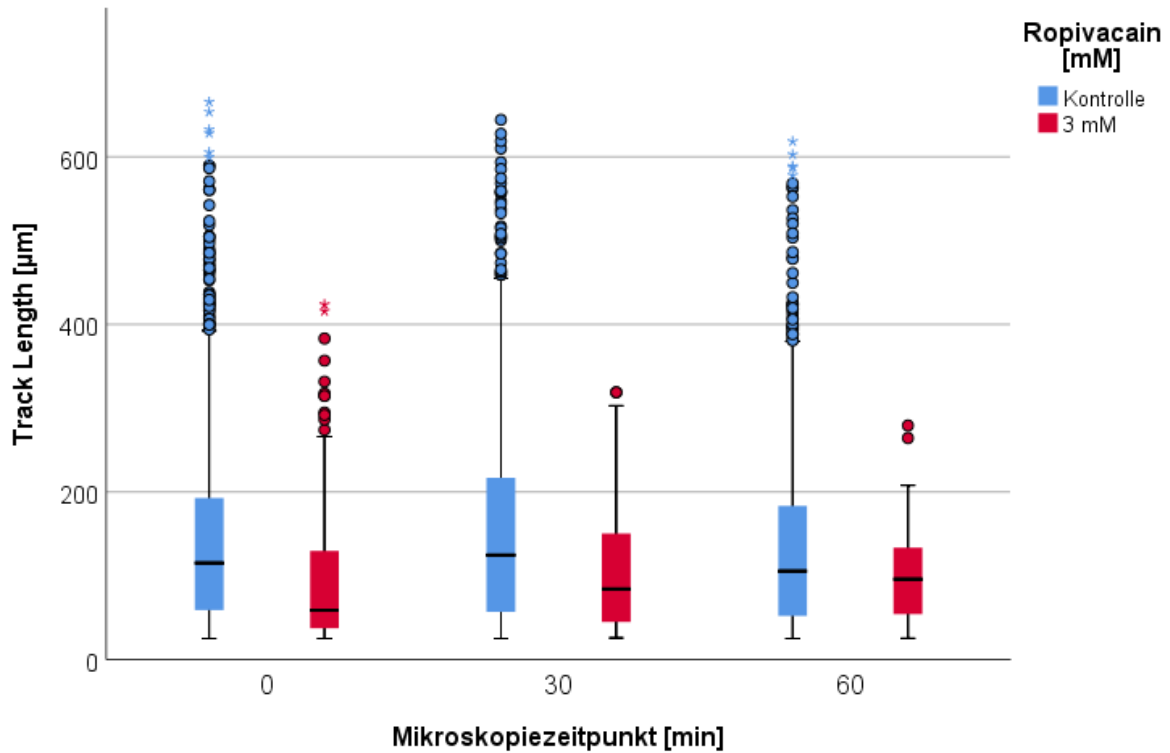


Abbildung 35: Effekt zusammengefasste Ropivacain auf die Track Length [µm]
 Die x-Achse zeigt den Zeitpunkt der Mikroskopie in Minuten. Die y-Achse misst die Track Length [µm]. Die Clusterung unterteilt Ropivacain in blau (Kontrolle) und rot (3 mM). o = Ausreißer. ★ = Extremwerte.

Da sich mit Zunahme der Mikroskopiezeit jeweils bei der Kontrolle und den Versuchen mit 3 mM Ropivacain keine eindeutige Veränderung in der Track Length [µm] zeigte, wurden diese zusammengefasst und im Anschluss die Ergebnisse der Kontrollen mit denen bei Anwendung von 3 mM Ropivacain unabhängig vom Mikroskopiezeitpunkt verglichen. Siehe hierzu die Abbildung 36.

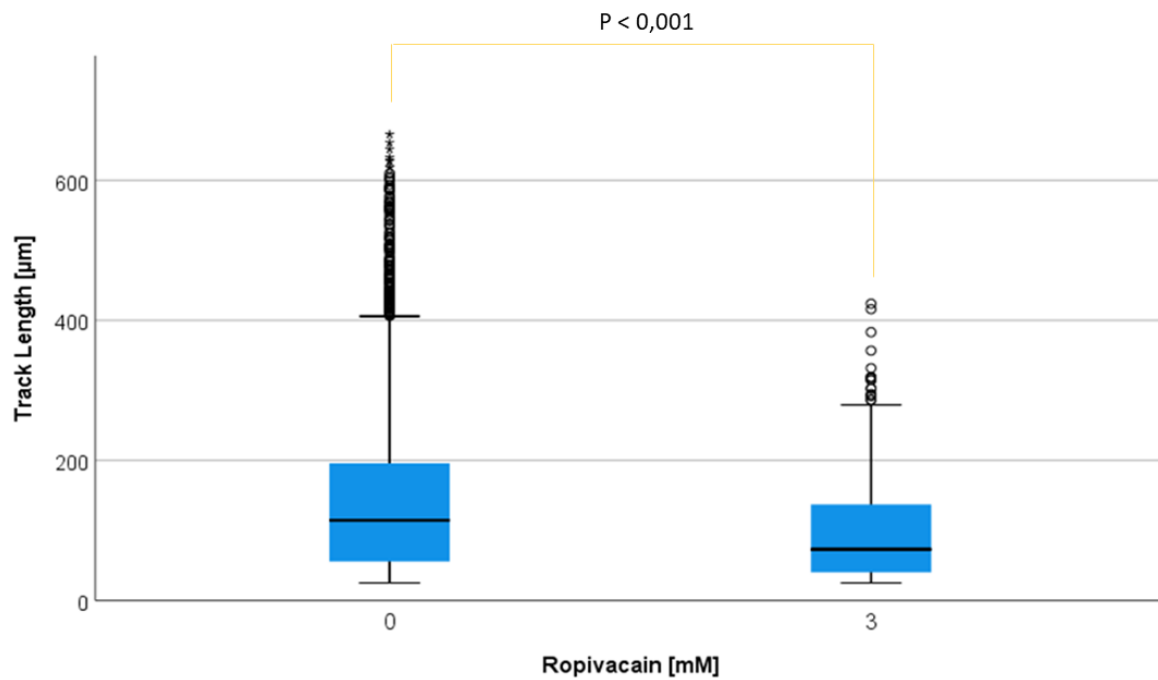


Abbildung 36: Vergleich des Einflusses von Ropivacain auf die Migration
 Die x-Achse stellt die verwendete Ropivacainkonzentration in Millimolar dar. Die y-Achse definiert die zurückgelegte Strecke der PMNs im Abstand von 200 Mikrometern. o = Ausreißer.

In dieser Darstellung konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchen mit und ohne 3 mM Ropivacain von $p < 0,001$ verzeichnet werden.

7. Diskussion

In dieser Studie wurde untersucht, ob durch die Reduktion der intrazellulären Kalziumkonzentration oder die Inhibition der GPCR-Signaltransduktion die NETose und Migration der PMNs inhibiert werden kann. Des Weiteren wurde der Effekt von Lokalanästhetika, insbesondere Ropivacain, auf diese Parameter untersucht.

7.1 Vergleich der experimentellen Methoden und Substanzen

Kolle et al. nutzten zur Isolierung der PMNs das hypotone Lyseverfahren. Dieses Verfahren ermöglicht eine erfolgreiche Isolation der PMNs. Dieses Verfahren wurde auch bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe verwendet (7). Ein weiteres Isolationsverfahren für PMNs stellt die Dichtegradientenzentrifugation dar (109–112).

Yehfang et al. beschrieben im Zusammenhang mit der Dichtegradientenzentrifugation eine geringere Kontamination der Zellsuspension mit Erythrozyten sowie einen geringeren Verlust von Neutrophilen gegenüber dem hypotonen Lyseverfahren (110).

Najmeh et al. führten aus, dass die Isolierung der PMNs mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation ein gutes Zeitmanagement und eine gute Experimentplanung voraussetzt, da nach 12 bis 24 Stunden die NETose einsetzt (111).

Gleichzeitig erhält man durch die richtige Durchführung der Methode einen hohen Anteil von PMNs bei hoher Viabilität (113). Ebenso erhielten Hirz et al. mit dieser Isoliertechnik eine hohe Reinheit > 90 % und beschrieben dieses Verfahren als effektiv, einfach, schnell und günstig (112). In der vorliegenden Arbeit wurde - wie auch in der Studie von Pai et al - die Dichtegradientenzentrifugation entsprechend dem Protokoll von Pluriselect Life Science verwendet (114).

7.2 Chemoattraktoren und Fluoreszenzen

In zahlreichen Studien werden verschiedene endogene und exogene Chemoattraktoren zur Rekrutierung der PMNs eingesetzt. Hierzu zählen IL-8, PMA, Lipopolysaccharide aus Bakterien oder fMLP (114–116). Aufgrund der Beschreibung von fMLP als einen starken Chemoattraktor und aufgrund seiner zahlreichen Auswirkungen auf die PMNs wie zum Beispiel die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wurde es in dieser Arbeitsgruppe verwendet (117). In der vorliegenden Studie wurde fMLP in einer Konzentration von 10 nM als Lockstoff verwendet, wie zuvor in den Arbeitsgruppen von Pai et al. und Kolle et al. (114, 7). Angelehnt an die Vorarbeiten von Pai et al. (114), Kolle et al. (7) und Bredthauer et al. (118) wurde die NETose und Migration, sowie das intrazelluläre Kalzium mit dem Fluoreszenzmikroskop und live cell imaging beobachtet.

In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf dem Nachweis des intrazellulären Kalziums mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4. Fluo-4 besitzt ein ähnliches Emissionsspektrum wie Dihydrorhodamin (104). Deshalb wurde anstelle von DHR in dieser Arbeit MPO zur Bestätigung der NETose verwendet, da es an die extrazelluläre DNA bindet.

7.3 Effekte von Bupivacain

Verschiedene Lokalanästhetika sind in der Lage konzentrationsabhängig die Phagozytose, die Bildung von Superoxiden und Wasserstoffperoxid sowie der NETose der PMNs zu hemmen. Dazu zählen die Lokalanästhetika Lidocain, Mepivacain, Procain und Tetracain, aber auch Bupivacain (119, 120). Die ROS-Bildung wurde als Auslöser der NET-Bildung durch Hann et al. beschrieben (65). Das ein früheres Einsetzen der NETose durch die Lokalanästhetika Bupivacain (1,58 mM bis 3,16 mM) und Lidocain (0,007 mM bis 1,42 mM) in klinisch typischen Konzentrationen möglich ist, zeigten auch Kolle et al. (7).

In dieser Studie war es ebenfalls möglich, die NETose mit Bupivacain (0,1 mM bis 1,6 mM), in klinisch angewendeten Konzentrationen, früher auszulösen. Im Gegensatz dazu erläuterten Mikawa et al., dass nur eine 100-fach höhere Konzentration von Lidocain und Mepivacain als klinisch verwendet, die ROS-Produktion reduzierten. Bupivacain zeigte keinen Effekt auf die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (121). Lidocain zeigte dagegen bei klinischen Plasmaspiegeln eine Beeinträchtigung der PMN Produktion von O_2^- , H_2O_2 und OH^- (122).

7.4 Effekte von Ropivacain

Blumenthal et al. konnten bei Anwendung von Ropivacain eine starke entzündungshemmende Wirkung auf die PMNs beobachten. Dies zeigte sich durch eine Reduktion der ICAM-1 Expression sowie eine Reduzierung der Adhärenz der PMNs. Diese Beobachtungen waren jedoch auf durch Lipopolysaccharid stimulierte PMNs begrenzt (123).

Auch Piegler et al. konnten einen inhibitorischen Effekt von Ropivacain auf die TNF α - getriggerte Entzündungen nachweisen und die Adhäsion und endotheliale Hyperpermeabilität für die PMNs verringern (124).

Dahingegen zeigte sich bei Yamada et al. eine Hemmung der Bildung von freien Sauerstoffradikalen bei niedrigen und hohen Ropivacainkonzentrationen (20 μ M). Mit steigender Lipophilie des Lokalanästhetikums wurde die Produktion von Sauerstoffradikalen stärker gehemmt (125).

Die hemmende Wirkung von Ropivacain auf die Bildung von freien Sauerstoffradikalen und die ebenso beobachtete Veränderung der Kalziumantwort der PMNs konnte auch durch

Mikawa et al bestätigt werden. Jedoch waren in diesen Beobachtungen die Phagozytose und die Migration unbeeinträchtigt (122).

Bezüglich der NETose konnten Kulinska et al. in ihrer Studie mit PMNs von Neugeborenen und Erwachsenen beobachten, dass die NO-Synthese der PMNs eine entscheidende Funktion für die Bildung der NETose sei (126). Dieses bezieht sich ebenso auf die Migration, Adhäsion und bakterielle Abwehr (127–129).

In dieser Studie wurde Ropivacain in verschiedenen Konzentrationen bezüglich seines Effektes auf die NETose überprüft. Die Versuche zeigten, dass hohe Konzentrationen von Ropivacain (10 mM und 15 mM) keinen nennenswerten Effekt auf die NETose haben. Ein signifikanter Unterschied bestand lediglich zwischen den Konzentrationen (3 mM, 5 mM und 9 mM) gegenüber der Ropivacainkonzentration von 10 mM. Bei einer noch höheren Konzentration von 15 mM konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Dies ist eventuell einer geringen Fallzahl der Konzentrationen (10 mM und 15 mM) geschuldet. Somit war der Effekt von Ropivacain auf die NETose nicht wie der von Bupivacain in unseren vorherigen Versuchen, aber auch nicht wie von Lidocain in Messungen der anderen Arbeitsgruppen zu erkennen (7).

7.5 Stereoisomerie der Lokalanästhetika

Im klinischen Alltag werden 25 Prozent der verwendeten Medikamente als racemische Form verwendet. Diese weisen Unterschiede in ihrer Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Toxizität auf (130). Die Lokalanästhetika Levobupivacain und Ropivacain werden in der Praxis als S-Enantiomere eingesetzt, da das R-Enantiomer ein höheres Nebenwirkungsprofil aufweist (131, 132).

Für das R-Enantiomer von Bupivacain wurde eine hohe Toxizität beschrieben (133). Beispielsweise zeigten Vanhouette et al. an Herzen von Meerschweinchen, dass das R-Enantiomer von Bupivacain die Aktionspotentialdauer stärker verkürzt als das S-Enantiomer (134).

Die unterschiedliche kardiotoxische Wirkung verschiedener Lokalanästhetika wurde auch durch Tsuchiya et al. untersucht. Sie beschrieben, dass die Membrankanäle der Kardiomyozyten und die physiologisch-chemischen Eigenschaften der Membrandoppelschicht durch die verschiedenen Enantiomere unterschiedlich beeinflusst werden (135).

Ebenso wurde beschrieben, dass die Enantiomere des Lokalanästhetikums Bupivacain unterschiedliche Auswirkungen auf die Oberflächenrezeptorexpressionen der PMNs, deren Phagozytose und ROS-Produktion haben (136, 120). Somit ist es in vorliegender Studie

möglich die gemessenen Effekte der Lokalanästhetika Bupivacain und Ropivacain bezüglich der NETose als Folge der unterschiedlichen Stereoisomerie zu bewerten.

7.6 Intrazelluläres Kalzium als Trigger der NETose

Zahlreiche Studien beschrieben das intrazelluläre Kalzium des PMNs als eine Voraussetzung für das Einsetzen der NETose (65, 137, 108, 138).

Vorobjeva et al. triggerten die NETose durch fMLP. Die darauffolgende Signaltransduktion führt zur Freisetzung von im ER gespeicherten Kalzium (8). In einer weiteren Studie mit dem Kalzium-Ionophor A23187 beschrieben sie, dass die NETose durch einen bakteriell getriggerten Anstieg des intrazellulären Kalziums vermittelt wird. Sie diskutierten, dass eine spezielle Form des ROS die Induktion der NETose bestimmt. Diese entspricht der mtROS. Also eine in den Mitochondrien stattfindende durch A23187 getriggerte ROS-Produktion. Somit wird an dieser Stelle ein alternativer Weg aufgezeigt, der durch Kalziumstimulation zur NETose führt (139). Der Mechanismus der die vermehrte mtROS Produktion auslöst, entspricht einer Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätsübergangsporen (mPTP).

Diese NADPH-Oxidase unabhängige NETose wurde auch durch Douda et al. beschrieben. Sie konnten erkennen, dass das intrazelluläre Kalzium eine Schlüsselrolle zur Öffnung des Kaliumkanals des Mitochondriums (SK_3) und damit des mPTP darstellt. Dessen Aktivierung sei ausreichend für diese NOX-unabhängige NETose. Ebenso beobachteten sie, dass die Signalwege der Kinasen „Akt“ und „ERK“ im Vergleich dazu bei der NOX-abhängigen NETose aktiviert worden sind. Dies ist bei der Anwendung von A23187 mit geringen Aktivierungsgrad der Kinasen nicht der Fall (19).

Auch das in dieser Studie angewendete fMLP stimuliert diese Kinasen und aktiviert die PMNs (140, 141). Entsprechend wurde in dieser Studie der NADPH-Oxidase abhängige Signalweg aktiviert.

7.7 Chelatisierung des intrazellulären Kalziums

Eine Chelatisierung des intrazellulären Kalziums ist mit BAPTA möglich. Dieses konnten Parker et al. (108) und Sato et al. (142) mit BAPTA AM unter fMLP Stimulierung bestätigen. In vorliegender Studie wurde ebenfalls mit BAPTA AM die Chelatisierung des intrazellulären Kalziums angestrebt, um deren Effekt auf die NETose zu beobachten. Die Konzentrationen von BAPTA AM wurden vergleichbar denen der Arbeit von Parker et al. gewählt (108).

Neben den Konzentrationen 10 μ M und 25 μ M wurde zusätzlich mit den Konzentrationen 5 μ M, 20 μ M und 30 μ M gearbeitet. Aufgrund der zunehmenden Instabilität des Gels der 3D- μ - Slide Chemotaxiskammern waren die Versuche mit der höchsten Konzentration von

30 μM nicht auswertbar. Es wurden somit nur die Konzentrationen 5 μM bis 25 μM verwendet. Die Ergebnisse konnten jedoch keine Übereinstimmung mit den Studien von Parker et al. (108) oder auch Gupta et al. (137) zeigen. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen dem Zeitpunkt der NETose unter Verwendung von BAPTA AM gegenüber den Kontrollen vor.

Kenny et al. sahen bei Anwendung von BAPTA AM das gewünschte Ergebnis der Kalziumchelatisierung (143). Jedoch beschrieben sie, dass intrazellulär erreichbare Konzentrationen von BAPTA zu hohe Kalziumkonzentration nicht mehr vollständig chelatisieren können, wie es bereits durch Gennaro et al. beobachtet worden war (144). In vorliegender Studie konnte bei gleichzeitiger Anwendung von BAPTA AM und Ropivacain (3 mM), aber nicht bei der alleinigen Anwendung von Ropivacain (3 μM) gegenüber den Kontrollgruppen ein signifikanter Unterschied der $IT_{50}\text{Fluo-4}$ [min] festgestellt werden.

In den vorherigen Versuchen dieser Studie zeigte BAPTA AM keinen Effekt auf die NETose, was auch durch die Beobachtungen von Mikawa et al. bestärkt wird. Sie beschrieben, dass mit hohen Konzentrationen von Ropivacain eine Unterdrückung der Kalziumkonzentration zu messen war und dadurch die PMN-Funktionen beeinflusst werden konnten (122).

7.8 Oberflächenstrukturen der PMNs

Die Exprimierung von Rezeptoren, darunter den GPCRs, wurde in Arbeiten von Lämmermann et al., Chen et al. und weiteren Autoren beschrieben (145, 146, 93, 94).

Die Aktivierung der GPCRs der PMNs führt zur Aktivierung von Migration, ROS-Produktion und Exozytose von intrazellulären Granula (93). Das in dieser Studie angewendete fMLP interagiert mit einem GPCR und initiiert so die Chemotaxis von PMNs (101). Lehmann et al. und Neptun et al. erläuterten, dass die GPCR-Signaltransduktion im PMN nicht durch $G\alpha$ -Untereinheiten, sondern die $G\beta\gamma$ -Untereinheiten stattfindet (100, 147).

In den Studien von Karuppergoundar et al. (106) und Sanz et al. (107) wurde zur Inhibition der GPCR-Signaltransduktion Gallein eingesetzt, welches die PI3-K und somit die Migration der PMNs und anteilig deren Superoxidsynthese hemmt. Andreeva et al. verwendeten dagegen U-73122 zur Inhibition des GPCR-getriggerten PLC Signalweges, um die Superoxidsynthese zu inhibieren (105).

In dieser Studie konnte bei Anwendung der GPCR-Inhibitoren Gallein und U-73122 ein signifikant früheres Einsetzen der NETose und der zeitlichen Aktivität des Fluo-4 und somit der maximalen intrazellulären Kalziumaktivität beobachtet werden. Bei der parallelen Anwendung von Gallein und U-73122 waren diese Effekte nicht zu beobachten.

Hilger et al. schrieben bereits über die GPCRs, dass die Signalübertragung über den GPCR durch die verschiedenen Agonisten moduliert und dadurch unterschiedliche Effekte durch die Bindung von Liganden erreicht würden. Ebenso folgerten sie, dass sich eine Konformationsänderung des GPCR zugunsten eines Liganden ergeben würde. Dies hätte Auswirkung auf eine unterschiedliche Effizienz und Kinetik in den G-Protein Kopplungen (148). Die Komplexität der GPCRs wurde auch durch Masuho et al. erläutert. So soll der GPCR aus einer unterschiedlichen Zusammenstellung der $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten bestehen. Allein die $G\alpha$ -Untereinheit weise 16 Möglichkeiten auf. Im Vergleich dazu weist der $G\beta\gamma$ -Komplex 5 Möglichkeiten der $G\beta$ - und 12 der $G\gamma$ -Untereinheiten auf. Dies ermöglicht zahlreiche Kombinationen des Auftretens der GPCRs und beeinflusst dessen Wirksamkeit (149).

Durch den differenten Aufbau der GPCRs und deren unterschiedliche Konformationen auf verschiedene Liganden wäre der in dieser Arbeit nicht signifikant gemessene Effekt der kombinierten GPCR-Anwendung erklärbar.

7.9 GPCR-Inhibitoren und Lokalanästhetika

Ein möglicher Angriffspunkt der Lokalanästhetika sind ligandenaktivierte Ionenkanäle. Rao et al. erläuterten, dass die GPCRs als Membranproteine in der Lipiddoppelschicht eine Rolle bei der Wirkung der Lokalanästhetika einnehmen (150). Die Effizienz der GPCR-Signaltransduktion kann durch ihre eigene Dynamik moduliert und deren Wechselwirkung in der Membran reguliert werden (151, 152). Die laterale Diffusion der Membranproteine, und damit der GPCRs, spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion (151). Ein wichtiger Faktor, der die laterale Diffusion in der biologischen Membran einschränkt, ist das Aktin-Zytoskelett unterhalb der Plasmamembran (153). Des Weiteren schlussfolgerten Rao et al. aus ihrer Studie, dass die Rezeptordynamik der GPCRs und deren Zusammenspiel mit dem Aktin-Zytoskelett als relevante Faktoren für den Wirkungsmechanismus von Lokalanästhetika auftreten können (150). Trotz allem zeigte sich bei Anwendung des Lokalanästhetikums Ropivacain in der vorliegenden Studie kein zusätzlicher signifikanter Effekt auf das frühere Eintreten der NETose und das intrazelluläre Kalzium.

7.10 Effekte der Lokalanästhetika auf die Migration

Das Lokalanästhetika einen hemmenden Effekt auf die Migration ausüben, konnte durch verschiedene Studien gezeigt werden (7, 154, 155, 120).

Diese Studie konnte wie die genannten Arbeiten beim Einsatz von Bupivacain (1,6 mM) und Ropivacain (3 mM) einen früheren Abbruch der Migration beobachten.

7.11 Effekte von BAPTA AM auf die Migration

In den Versuchen dieser Studie sollte getestet werden, ob das intrazelluläre Kalzium des PMNs ein entscheidender Faktor für das Auslösen der Migration ist. Parker et al. (108) und Gupta et al. (137) war dies in ihrer Studie möglich. Ebenso konnten wir mit unseren Tests bestätigen, dass durch die Chelatisierung des intrazellulären Kalziums mit BAPTA AM ein früheres Einsetzen der Migration im Vergleich zur Kontrolle nachzuweisen ist. Dies spricht dafür, dass das intrazelluläre Kalzium ein wichtiger Bestandteil der Signalwege für die Migration ist. Ein signifikanter Effekt von Ropivacain in Kombination mit BAPTA AM war nicht zu messen.

7.12 Inhibition der Migration durch GPCR-Inhibitoren

Bereits Surve et al. zeigten, dass die G $\beta\gamma$ -Subeinheit des GPCRs entscheidend für die Chemotaxis von PMNs und deren Migration ist (99). Ebenso konnten Dixit et al. darstellen, dass der GPCR Signalweg eine wesentliche Rolle bei der Verstärkung der Adäsion der PMNs und deren Migration auslöst (156). Die vorliegende Studie konnte bei Anwendung der GPCR-Inhibitoren Gallein und U-73122 ein früheres Sistieren der Migration und des maximalen intrazellulären Kalziumspiegels beobachten. Jedoch war das Ergebnis nicht signifikant auswertbar, weil unterschiedliche Zellzahlen zu den unterschiedlich detektierten Zeitpunkten vorlagen. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Surve et al. und Dixit et al.

8. Zusammenfassung

Diese Studie untersuchte, ob durch die Beeinflussung des intrazellulären Kalziums der PMNs oder die Inhibition ihrer GPCR-Signaltransduktion die NETose oder Migration beeinflusst werden kann. Des Weiteren wurden Lokalanästhetika wie zum Beispiel Ropivacain hinzugegeben, um deren Effekt auf diese Parameter zu testen.

Die getesteten Lokalanästhetika hatten unterschiedliche Effekte auf die NETose und das intrazelluläre Kalzium der PMNs. Während Bupivacain die NETose früher stattfinden ließ, konnte dieser Effekt mit Ropivacain nicht beobachtet werden. Im Vergleich dazu waren beide Lokalanästhetika in der Lage, die Migration früher sistieren zu lassen.

In dieser Studie konnte die Chelatisierung des intrazellulären Kalziums der PMNs mit BAPTA AM nur in isolierten Versuchsreihen erreicht werden. Somit konnte kein Effekt auf die NETose beobachtet werden. Jedoch war bei Elimination der maximalen intrazellulären Kalziumkonzentration durch BAPTA AM ein Effekt auf die Migration zu messen. Somit wäre es möglich, dass das intrazelluläre Kalzium nicht für die NETose, jedoch für die Migration einen entscheidenden Faktor darstellt.

Durch die Inhibition der G $\beta\gamma$ -Subeinheit mit Gallein und U-73122 zeigte sich ein früheres Einsetzen der NETose und der maximalen intrazellulären Kalziumkonzentration des PMNs. Ein zusätzlicher Effekt des Lokalanästhetikums Ropivacain auf den GPCR-Signalweg konnte nicht gemessen werden. Ebenso war kein signifikanter Effekt der GPCR-Inhibitoren Gallein und U-73122 bei einer kombinierten Anwendung auf die GPCR-Signaltransduktion des PMNs zu erkennen. Der Effekt beider Substanzen liegt auf dem gleichen Niveau wie der der Einzelsubstanzen. Nur ist die Streuung größer, weswegen der Unterschied zur Kontrollgruppe nicht mehr signifikant ist. Ein additiver Effekt scheint somit nicht vorzuliegen.

Zukünftige Forschungen werden notwendig sein, um die Signaltransduktionswege im PMN genauer zu erfassen. So wäre es ein Ziel, die NETose gezielt durch pharmakologische Beeinflussung zu verstärken oder zu hemmen. Dies wäre ein weiterer Schritt im Verständnis der molekularen Abläufe der PMNs und für die Therapie von NETose getriggerten Erkrankungen.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktion auf ein Trauma	11
Abbildung 2: Respiratory burst	12
Abbildung 3: Die NETose	14
Abbildung 4: Transportmechanismen des Kalziums im PMN.....	18
Abbildung 5: Chemische Struktur von Ester-und Amidtyp (80)	19
Abbildung 6: Dissoziation von Lokalanästhetika im Gewebe (81)	20
Abbildung 7: Strukturchemie der spannungsabhängigen Natriumkanäle (78)	21
Abbildung 8: Übersicht der gesamten Projektplanung	24
Abbildung 9: Projektablauf der 1. Versuchsreihe	25
Abbildung 10: Projektablauf der 2. Versuchsreihe	26
Abbildung 11: Projektablauf der 3. Versuchsreihe	26
Abbildung 12: Projektablauf der Mikroskopie	27
Abbildung 13: Dichtegradientenzentrifugation (eigenes Foto).....	29
Abbildung 14: Reaktionsablauf mit BAPTA AM.....	31
Abbildung 15: Effekt durch GPCR-Inhibitoren	32
Abbildung 16: 3D- μ -Slide der IBIDI [®] GmbH	33
Abbildung 17: Formel zur Beschreibung des Messpunkteverlaufs aus Phoenix [®]	40
Abbildung 18: Messung der ET ₅₀ -Werte (eigene Darstellung).....	40
Abbildung 19: Messung der IT ₅₀ -Werte (eigene Darstellung).....	41
Abbildung 20: Einfluss von Bupivacain auf die ET ₅₀ NET [min]	43
Abbildung 21: Einfluss von allen Ropivacainkonzentrationen auf die ET ₅₀ NET [min].....	44
Abbildung 22: Vergleich gruppierter Ropivacainkonzentrationen	45
Abbildung 23: Einfluss BAPTA AM und Ropivacain auf die ET ₅₀ NET [min].....	46
Abbildung 24: Einfluss von BAPTA AM und Ropivacain auf die IT ₅₀ Fluo-4 [min].....	47
Abbildung 25: Einfluss der GPCR-Inhibitoren auf die ET ₅₀ NET [min].....	48
Abbildung 26: Einfluss von GPCR-Inhibitoren und Ropivacain auf die NETose.....	49
Abbildung 27: Einfluss von GPCR-Inhibitoren und Ropivacain auf die ET ₅₀ NET [min].....	50
Abbildung 28: Einfluss von GPCR-Inhibitoren auf die IT ₅₀ Fluo-4 [min]	51
Abbildung 29: Einfluss von GPCR-Inhibitoren und Ropivacain auf die IT ₅₀ Fluo-4 [min].....	52
Abbildung 30: Vergleich GPCR-Inhibitoren und Ropivacainkonzentrationen	53
Abbildung 31: Einfluss von Bupivacain und Ropivacain auf die Migration	54
Abbildung 32: Einfluss von BAPTA AM auf die Track Length [μ m]	55

Abbildung 33: Einfluss von BAPTA AM und Ropivacain auf die Track Length [μm]	56
Abbildung 34: Einfluss GPCR-Inhibitoren und Ropivacain auf die Track Length [μm]	57
Abbildung 35: Effekt zusammengefasste Ropivacain auf die Track Length [μm]	58
Abbildung 36: Vergleich des Einflusses von Ropivacain auf die Migration	59

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gemisch des Mediums	34
Tabelle 2: Kanalgemisch ohne Zusatzsubstanz	34
Tabelle 3: Kanalgemisch mit BAPTA AM	35
Tabelle 4: Mediengemische mit GPCR-Inhibitoren	35
Tabelle 5: Kanalgemisch mit GPCR-Inhibitoren	36
Tabelle 6: Endkonzentrationen der GPCR-Konzentrationen	36
Tabelle 7: Eigenschaften der Fluoreszenzen	37
Tabelle 8: Migrationsparameter	38

11. Anhang

Probanden Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung zur Untersuchung Fragebogen zur Blutentnahme

AN_FO_20.02.2018_GrM



Probandenaufklärung und Einwilligungserklärung

Die Beeinflussung von PMNs durch Lokalanästhetika im septischen Geschehen

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband

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

Im Rahmen der Studie untersuchen wir Granulozytenfunktionen

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

Risiken, die bei der Blutentnahme auftreten können ([SOP Blutentnahme](#)) und Maßnahmen um das Auftreten zu verhindern:

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

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

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

Alle meine Fragen wurden verständlich und umfänglich beantwortet.

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

Vor- und Nachname: _____

Regensburg, den _____

Unterschrift der/des Probandin/Probanden

Erklärung zum Datenschutz:

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie personenbezogene Daten und Angaben auf elektronischen Datenträgern aufgezeichnet, gespeichert und verarbeitet werden. Ich

**Probanden Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung
zur Untersuchung
Fragebogen zur Blutentnahme**

AN_FO_20.02.2018_GrM



bin auch damit einverstanden, dass die Studienergebnisse in nicht entschlüsselbarer (anonymer) Form, die keinen Rückschluss auf meine Person zulassen, veröffentlicht werden.
Ferner erkläre ich mich einverstanden, dass an der Studie beteiligte Personen in die mit meinen Personalien versehenen Akten Einsicht nehmen dürfen.

- Probandenaufklärung und Einverständniserklärung werden auf das jeweilige Projekt eingescannt.
- Zugriff auf die jeweiligen Projekte haben nur die an der Studie beteiligten, vom Projektleiter autorisierte Personen und der Direktor der Klinik für Anästhesie (Prof. B. Graf) und der EDV Beauftragte der Klinik für Anästhesie (Dr. M. Kieninger)
- Im Falle unerwünschter Wirkungen dürfen die verschlüsselten Daten an den Datenschutzbeauftragten der Klinik für Anästhesie und an die zuständige Bundesoberbehörde weitergegeben werden.
- Daten der Probanden werden auf dem gesicherten Netzlaufwerk der Forschung der Klinik für Anästhesie gespeichert.
- Sofern die Daten zur Veröffentlichung erforderlich sind, dürfen sie in verschlüsselter Form im Rahmen einer wissenschaftlichen Veröffentlichung an ein dafür und nach Maßstäben guter wissenschaftlicher Praxis ausgewähltes Journal weitergegeben werden.
- Nach Abschluss des Projekts werden die Daten auf einer Festplatte/DVD für 10 Jahre in einem zugangsbeschränktem Raum aufbewahrt.

Einverständniserklärung:

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

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

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

Vor- und Nachname: _____

Geburtsdatum: _____

Anschrift: _____

Regensburg, den _____

Unterschrift der/des Probandin/Probanden

Regensburg, den _____

Unterschrift der/des aufklärenden Ärztin/Arztes

**Probanden Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung
zur Untersuchung
Fragebogen zur Blutentnahme**



AN_FO_20.02.2018_GrM

Fragebogen zur Blutentnahme

Projektnummer: _____ Probandennummer: _____ Entnahmezeitpunkt: ____: ____

Datum: ____ Name des Blutentnehmenden: _____

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

Ausschlussfragen	
Sind bei Ihnen jemals Infektionskrankheiten wie HIV oder Hepatitis C festgestellt worden?	nein <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"/>
Rauchen Sie?	nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>
Falls ja: wann haben Sie zuletzt geraucht (Datum + Uhrzeit)? _____ um ____: ____ Uhr Nicht ausfüllen: $\Delta t =$ _____ min	
Haben Sie in letzter Zeit Medikamente eingenommen?	nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>
Falls ja, wann und welche? _____	
Sind bei Ihnen Allergien bekannt?	nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>
Falls ja, auf welche Stoffe? _____	
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"/>

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

_____, den _____
Ort Datum Unterschrift Proband

12.Literaturverzeichnis

1. Okeke EB, Louttit C, Fry C, Najafabadi AH, Han K, Nemzek J et al. Inhibition of neutrophil elastase prevents neutrophil extracellular trap formation and rescues mice from endotoxic shock. *Biomaterials* 2020; 238:119836.
2. Ravindran M, Khan MA, Palaniyar Nades. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules* 2019; 9(8):365.
3. Ling S, Xu J-W. NETosis as a Pathogenic Factor for Heart Failure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021; 2021:6687096.
4. Ackermann M, Anders H-J, Bilyy R, Bowlin GL, Daniel C, Lorenzo R de et al. Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils. *Cell Death and Differentiation* 2021; 28(11):3125–39.
5. Bitzinger D, Zausig YA, Paech C, Gruber M, Busse H, Sinner B et al. Modulation of immune functions in polymorphonuclear neutrophils induced by physostigmine, but not neostigmine, independent of cholinergic neurons. *Immunobiology* 2013; 218(8):1049–54.
6. Yanagidate F, Strichartz GR, editors. Local Anesthetics [(eds.) Analgesia. Handbook of Experimental Pharmacology]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2006.
7. Kolle G, Metterlein T, Gruber M, Seyfried T, Petermichl W, Pfähler S-M et al. Potential Impact of Local Anesthetics Inducing Granulocyte Arrest and Altering Immune Functions on Perioperative Outcome. *Journal of Inflammation Research* 2021; 6(14):1–12.
8. Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry Moscow* 2020; 85(10):1178–90.
9. Tan X, Luo M, Liu AP. Clathrin-mediated endocytosis regulates fMLP-mediated neutrophil polarization. *Heliyon* 2018; 4(9):e00819.
10. Lehman HK, Segal BH. The role of neutrophils in host defense and disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2020; 145(6):1535–44. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32283205/>.
11. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010; 33(5):657–70. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21094463/>.

12. Hassani M, Hellebrekers P, Chen N, van Aalst C, Bongers S, Hietbrink F et al. On the origin of low-density neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 2020; 107(5):809–18. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32170882/>.
13. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 2011; 11(8):519–31.
14. Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology* 2000; 2000(3):858–75. Available from: URL: <https://pubs.asahq.org/anesthesiology/article/93/3/858/38525/Local-Anesthetics-and-the-Inflammatory-ResponseA>.
15. Wittmann S, Fröhlich D, Mietens A, Daniels S. Anaesthetic sensitivity of fMLP-induced cell signalling in *Xenopus* oocytes. *International Immunopharmacology* 2006; 2006(1):61–70. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16332514/>.
16. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & Redox Signaling* 2014; 20(7):1126–67.
17. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology* 2007; 176(2):231–41. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17210947/>.
18. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology* 2018; 18(2):134–47.
19. Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2015; 112(9):2817–22.
20. Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PM-C, El-Benna J. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *European Journal of Clinical Investigation* 2018; 48(2):e12951. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29757466/>.
21. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature Chemical Biology* 2011; 7(2):75–7. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21170021/>.

22. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298(5600):1911–2. Available from: URL: <https://science.sciencemag.org/content/298/5600/1911.long>.
23. Ravindran M. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules* 2019; 9(8):365.
24. Dikalova AE, Bikineyeva AT, Budzyn K, Nazarewicz RR, McCann L, Lewis W et al. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circulation Research* 2010; 107(1):106–16. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20448215/>.
25. Vorobjeva N, Prikhodko A, Galkin I, Pletjushkina O, Zinovkin R, Sud'ina G et al. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro. *European Journal of Cell Biology* 2017; 96(3):254–65. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28325500/>.
26. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology* 2010; 191(3):677–91. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20974816/>.
27. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Reports* 2014; 8(3):883–96. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25066128/>.
28. Rada B. Neutrophil Extracellular Traps. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2019; 1982:517–28. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31172493/>.
29. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of Cell Biology* 2009; 184(2):205–13. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19153223/>.
30. Kambara H, Liu F, Zhang X, Liu P, Bajrami B, Teng Y et al. Gasdermin D Exerts Anti-inflammatory Effects by Promoting Neutrophil Death. *Cell Reports* 2018; 22(11):2924–36. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29539421/>.

31. Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochimica Polonica* 2013; 60(3):277–84. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23819131/>.
32. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood* 2013; 122(16):2784–94. Available from: URL: <https://ashpublications.org/blood/article/122/16/2784/31774/NETosis-how-vital-is-it>.
33. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine* 2007; 13(4):463–9. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17384648/>.
34. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine* 2012; 18(9):1386–93. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22922410/>.
35. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303(5663):1532–5. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15001782/>.
36. Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2013; 190(8):4136–48. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23509360/>.
37. McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection* 2010; 12(12-13):928–36. Available from: URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1286457910001644?token=1D0E8ED1289E31A533CBD547B289FC8294CEE35E7CDCA283B34AB1861BFA15EDECFB AF CB0B912FE0C0027BFECB19C5B9&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210514103707>.
38. Hemmers S, Teijaro JR, Arandjelovic S, Mowen KA. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *Public Library of Science ONE* 2011; 6(7):e22043.
39. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell*

Host Microbe 2012; 12(1):109–16. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312812002016>.

40. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew A-A et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *The American Journal of Pathology* 2011; 179(1):199–210.

41. Pilszczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology* 2010; 185(12):7413–25. Available from: URL: <https://www.jimmunol.org/content/185/12/7413.long>.

42. Gupta S, Kaplan MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nature Reviews Nephrology* 2016; 12(7):402–13. Available from: URL: <https://www.nature.com/articles/nrneph.2016.71>.

43. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature Medicine* 2017; 23(3):279–87. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28267716/>.

44. Geddings JE, Mackman N. New players in haemostasis and thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* 2014; 111(4):570–4. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24573314/>.

45. Bont CM de, Boelens WC, Pruijn GJM. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cellular & Molecular Immunology* 2019; 16(1):19–27. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29572545/>.

46. Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frère C, Bonier R, Mackman N et al. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 2012; 120(10):2133–43. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22837532/>.

47. Brühl M-L von, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 2012; 209(4):819–35.

48. Ma AC, Kubes P. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2008; 6(3):415–20. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18088344/>.

49. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, Metrio M de, Panciroli C et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2014; 12(12):2074–88. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25163512/>.
50. Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A, Mastellos DC, Metallidis S, Rafailidis P et al. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *The Journal of Clinical Investigation* 2020; 130(11):6151–7. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32759504/>.
51. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, Meyer SF de et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2012; 10(1):136–44. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22044575/>.
52. Boer OJ de, Li X, Teeling P, Mackaay C, Ploegmakers HJ, van der Loos CM et al. Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thrombosis and Haemostasis* 2013; 109(2):290–7. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23238559/>.
53. Amann K, Daniel C, Büttner-Herold M. Das Komplementsystem – ein „hot topic“ nicht nur bei Nierenerkrankungen. *Pathologie* 2020; 41(3):238–47. Available from: URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00292-020-00773-0>.
54. Yuen J, Pluthero FG, Douda DN, Riedl M, Cherry A, Ulanova M et al. NETosing Neutrophils Activate Complement Both on Their Own NETs and Bacteria via Alternative and Non-alternative Pathways. *Frontiers in Immunology* 2016; 7:137.
55. Conway EM. Reincarnation of ancient links between coagulation and complement. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2015; 13(1):121-32.
56. Snoderly HT, Boone BA, Bennewitz MF. Neutrophil extracellular traps in breast cancer and beyond: current perspectives on NET stimuli, thrombosis and metastasis, and clinical utility for diagnosis and treatment. *Breast Cancer Research* 2019; 21(1):145.
57. Otten MA, Rudolph E, Dechant M, Tuk CW, Reijmers RM, Beelen RHJ et al. Immature neutrophils mediate tumor cell killing via IgA but not IgG Fc receptors. *Journal of Immunology* 2005; 174(9):5472–80. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15843545/>.

58. Stockmeyer B, Beyer T, Neuhuber W, Repp R, Kalden JR, Valerius T et al. Polymorphonuclear granulocytes induce antibody-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Journal of Immunology* 2003; 171(10):5124–9. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14607911/>.
59. Huang H, Zhang H, Onuma AE, Tsung A. Neutrophil Elastase and Neutrophil Extracellular Traps in the Tumor Microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2020; 1263:13–23. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32588320/>.
60. Shaul ME, Fridlender ZG. Neutrophils as active regulators of the immune system in the tumor microenvironment. *Journal of Leukocyte Biology* 2017; 102(2):343–9. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28264904/>.
61. Tecchio C, Scapini P, Pizzolo G, Cassatella MA. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. *Seminars in Cancer Biology* 2013; 23(3):159–70. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23410636/>.
62. Wu L, Saxena S, Awaji M, Singh RK. Tumor-Associated Neutrophils in Cancer: Going Pro. *Cancers* 2019; 11(4):564. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31010242/>.
63. Gordon-Weeks AN, Lim SY, Yuzhalin AE, Jones K, Markelc B, Kim KJ et al. Neutrophils promote hepatic metastasis growth through fibroblast growth factor 2-dependent angiogenesis in mice. *Hepatology* 2017; 65(6):1920–35. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28133764/>.
64. Zhou S-L, Dai Z, Zhou Z-J, Wang X-Y, Yang G-H, Wang Z et al. Overexpression of CXCL5 mediates neutrophil infiltration and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012; 56(6):2242–54. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22711685/>.
65. Hann J, Bueb J-L, Tolle F, Brécard S. Calcium signaling and regulation of neutrophil functions: Still a long way to go. *Journal of Leukocyte Biology* 2020; 107(2):285–97. Available from: URL: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/JLB.3RU0719-241R>.
66. Tintinger GR, Theron AJ, Potjo M, Anderson R. Reactive oxidants regulate membrane repolarization and store-operated uptake of calcium by formyl peptide-activated human neutrophils. *Free Radical Biology & Medicine* 2007; 42(12):1851–7. Available from: URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0891584907002079?token=B8CEB65F336B6C8EF>

5DEC93C48BD88CC1A52E4FB3701B57CE5E8D646F55496F0A323B4ABF603D04853F288BC2919B3F6&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210705184357.

67. Ribeiro D, Freitas M, Rocha S, Lima JLFC, Carvalho F, Fernandes E. Calcium Pathways in Human Neutrophils-The Extended Effects of Thapsigargin and ML-9. *Cells* 2018; 7(11):204. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30423935/>.

68. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003; 4(7):552–65. Available from: URL: <https://www.nature.com/articles/nrm1150>.

69. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2000; 1(1):11–21. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11413485/>.

70. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 2007; 131(6):1047–58. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867407015310>.

71. Hauser CJ, Kannan KB, Deitch EA, Itagaki K. Non-specific effects of 4-chloro-m-cresol may cause calcium flux and respiratory burst in human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 336(4):1087–95. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16168959/>.

72. Demaurex N, Frieden M. Measurements of the free luminal ER Ca²⁺ concentration with targeted “cameleon” fluorescent proteins. *Cell Calcium* 2003; 34(2):109–19. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12810053/>.

73. Bronner F. Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *The Scientific World Journal* 2001; 1:919–25. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12805727/>.

74. Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle & Nerve* 2007; 35(4):430–42. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17286271/>.

75. Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE et al. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current Biology* 2005; 15(13):1235–41. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16005298/>.

76. Prakriya M, Lewis RS. Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews* 2015; 95(4):1383–436. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26400989/>.

77. Salmon MD, Ahluwalia J. Discrimination between receptor- and store-operated Ca(2+) influx in human neutrophils. *Cellular Immunology* 2010; 265(1):1–5. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20716450/>.
78. Aktories K, editor. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker*; 303 Tabellen. 9.überarbeitete Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer; 2006.
79. Cherobin, Ana Carolina Figueiredo Pereira, Tavares GT. Safety of local anesthetics. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2020; 95(1):82–90.
80. van Aken H, Wulf H. *Regionalanästhesie, Lokalanästhesie, regionale Schmerztherapie*. 2.überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Thieme; 2003. Available from: URL: <https://www.thieme-connect.de/products/ebooks/lookinside/10.1055/b-0034-46268>.
81. Töpfer L, Vater J, Boldte M, Keppeler P, editors. *Basics Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie*. 4. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer; 2016. (Basics).
82. Larsen R. *Anästhesie*. 11.überarbeitete Auflage. München: Elsevier; 2018.
83. Lirk P, Hollmann MW, Strichartz G. The Science of Local Anesthesia: Basic Research, Clinical Application, and Future Directions. *Anesthesia and Analgesia* 2018; 126(4):1381–92. Available from: URL: https://journals.lww.com/anesthesia-analgesia/Fulltext/2018/04000/The_Science_of_Local_Anesthesia__Basic_Research,.44.aspx.
84. Gokin AP, Philip B, Strichartz GR. Preferential block of small myelinated sensory and motor fibers by lidocaine: in vivo electrophysiology in the rat sciatic nerve. *Anesthesiology* 2001; 95(6):1441–54. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11748404/>.
85. Katzung & Trevor's, editor. *Basic & Clinical Pharmacology: Chapter 26. Local Anesthetics*. 15.Auflage. The McGraw-Hill Companies, Inc; 2021.
86. Denson DD, Behbehani MM, Gregg RV. Enantiomer-specific effects of an intravenously administered arrhythmogenic dose of bupivacaine on neurons of the nucleus tractus solitarius and the cardiovascular system in the anesthetized rat. *Regional Anesthesia* 1992; 17(6):311–6. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1286051/>.
87. Hadzic A, editor. *Hadzic's textbook of regional anesthesia and acute pain management*. 2.Auflage. New York: McGraw-Hill Education; 2017.

88. Galoş EV, Tat T-F, Popa R, Efrimescu C-I, Finnerty D, Buggy DJ et al. Neutrophil extracellular trapping and angiogenesis biomarkers after intravenous or inhalation anaesthesia with or without intravenous lidocaine for breast cancer surgery: a prospective, randomised trial. *British Journal of Anaesthesia* 2020; 2020(5):712–21. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007091220303457>.
89. Cruz FF, Rocco PRM, Pelosi P. Anti-inflammatory properties of anesthetic agents. *Critical Care* 2017; 21(1):67.
90. Krishnamoorthy V, Chung L. Bench-to-bedside: The use of local anesthetics to attenuate inflammation in acute respiratory distress syndrome. *International Journal of Critical Illness and Injury Science* 2014; 4(2):98–100. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25024936/>.
91. Hatakeyama N, Matsuda N. Alert cell strategy: mechanisms of inflammatory response and organ protection. *Current Pharmaceutical Design* 2014; 20(36):5766–78. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25229471/>.
92. Krause KH, Demarex N, Jaconi M, Lew DP. Ion channels and receptor-mediated Ca²⁺ influx in neutrophil granulocytes. *Blood Cells* 1993; 19(1):165-73. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7691267/>.
93. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International Immunopharmacology* 2013; 17(3):638–50. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23994464/>.
94. Hollmann MW, Herroeder S, Kurz KS, Hoenemann CW, Struemper D, Hahnenkamp K et al. Time-dependent inhibition of G protein-coupled receptor signaling by local anesthetics. *Anesthesiology* 2004; 100(4):852–60. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15087620/>.
95. Hollmann MW, Wiczorek KS, Berger A, Durieux ME. Local anesthetic inhibition of G protein-coupled receptor signaling by interference with G α (q) protein function. *Molecular Pharmacology* 2001; 59(2):294–301. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11160866/>.
96. Woławek-Potocka I, Rawińska P, Kowalczyk-Zieba I, Boruszewska D, Sinderewicz E, Waśniewski T et al. Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in human and ruminant

reproductive tract. *Mediators of Inflammation* 2014; 2014:649702. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24744506/>.

97. Caracas HCPM, Maciel JVB, Martins PMRES, Souza MMG de, Maia LC. The use of lidocaine as an anti-inflammatory substance: a systematic review. *Journal of Dentistry* 2009; 37(2):93–7. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19058888/>.

98. Metzemaekers M, Gouwy M, Proost P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cellular & Molecular Immunology* 2020; 17(5):433–50.

99. Surve CR, Lehmann D, Smrcka AV. A chemical biology approach demonstrates G protein $\beta\gamma$ subunits are sufficient to mediate directional neutrophil chemotaxis. *The Journal of Biological Chemistry* 2014; 289(25):17791–801. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24808183/>.

100. Lehmann DM, Seneviratne AMPB, Smrcka AV. Small molecule disruption of G protein beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation. *Molecular Pharmacology* 2008; 73(2):410–8. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18006643/>.

101. Bedouhene S, Liu M, Senani N, Boussetta T, Pintard C, Dang PM-C et al. Prolyl-Isomerase Pin1 Controls Key fMLP-Induced Neutrophil Functions. *Biomedicines* 2021; 9(9):1130.

102. Wen X, Xu X, Sun W, Chen K, Pan M, Wang JM et al. G-protein-coupled formyl peptide receptors play a dual role in neutrophil chemotaxis and bacterial phagocytosis. *Molecular Biology of the Cell* 2019; 30(3):346–56. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30540534/>.

103. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry* 1995; 70(5):220–33.

104. Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 2000; 27(2):97–106. Available from: URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0143416099900957?token=52A2D2ADAC32FB9E13283E71CDB37B0C88FE427F66A5A337F3C87299B716401906CB00E2596778B5313D319290479E5C&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210714150408>.

105. Andreeva Z, Barton D, Armour WJ, Li MY, Liao L-F, McKellar HL et al. Inhibition of phospholipase C disrupts cytoskeletal organization and gravitropic growth in *Arabidopsis* roots.

Planta 2010; 232(5):1263–79. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20803215/>.

106. Karuppagounder V, Bajpai A, Meng S, Arumugam S, Sreedhar R, Giridharan VV et al. Small molecule disruption of G protein $\beta\gamma$ subunit signaling reprograms human macrophage phenotype and prevents autoimmune myocarditis in rats. *Public Library of Science ONE* 2018; 13(7):e0200697. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30024944/>.

107. Sanz G, Leray I, Muscat A, Acquistapace A, Cui T, Rivière J et al. Gallein, a $G\beta\gamma$ subunit signalling inhibitor, inhibits metastatic spread of tumour cells expressing OR51E2 and exposed to its odorant ligand. *BMC Research Notes* 2017; 10(1):541.

108. Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *Journal of Leukocyte Biology* 2012; 92(4):841–9. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22802447/>.

109. Samaï HC, Rioult D, Bado-Nilles A, Delahaut L, Jubréaux J, Geffard A et al. Procedures for leukocytes isolation from lymphoid tissues and consequences on immune endpoints used to evaluate fish immune status: A case study on roach (*Rutilus rutilus*). *Fish & Shellfish Immunology* 2018; 74:190–204. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29288813/>.

110. Hu Y, Maisey K, Subramani PA, Liu F, Flores-Kossack C, Imarai M et al. Characterisation of rainbow trout peripheral blood leucocytes prepared by hypotonic lysis of erythrocytes, and analysis of their phagocytic activity, proliferation and response to PAMPs and proinflammatory cytokines. *Developmental and Comparative Immunology* 2018; 88:104–13.

111. Najmeh S, Cools-Lartigue J, Giannias B, Spicer J, Ferri LE. Simplified Human Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Isolation and Handling. *Journal of Visualized Experiments* 2015; (98). Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25938591/>.

112. Hirz T, Dumontet C. Neutrophil Isolation and Analysis to Determine their Role in Lymphoma Cell Sensitivity to Therapeutic Agents. *Journal of Visualized Experiments* 2016; (109):e53846. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27078837/>.

113. Oh H, Siano B, Diamond S. Neutrophil isolation protocol. *Journal of Visualized Experiments* 2008; (17). Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19066523/>.

114. Pai D, Gruber M, Pfaehler S-M, Bredthauer A, Lehle K, Trabold B. Polymorphonuclear Cell Chemotaxis and Suicidal NETosis: Simultaneous Observation Using fMLP, PMA, H7, and Live Cell Imaging. *Journal of Immunology Research* 2020; 2020:1415947. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32879894/>.
115. Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 2008; 125(3):281–8. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19128361/>.
116. Roberts HM, Ling MR, Insall R, Kalna G, Spengler J, Grant MM et al. Impaired neutrophil directional chemotactic accuracy in chronic periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* 2015; 42(1):1–11. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25360483/>.
117. Panaro MA, Mitolo V. Cellular responses to FMLP challenging: a mini-review. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 1999; 21(3):397–419. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10466071/>.
118. Bredthauer A, Kopfmuehler M, Gruber M, Pfaehler S-M, Lehle K, Petermichl W et al. Therapeutic Anticoagulation with Argatroban and Heparins Reduces Granulocyte Migration: Possible Impact on ECLS-Therapy? *Cardiovascular Therapeutics* 2020; 2020:9783630. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32405324/>.
119. Azuma Y, Shinohara M, Wang PL, Suese Y, Yasuda H, Ohura K. Comparison of inhibitory effects of local anesthetics on immune functions of neutrophils. *International Journal of Immunopharmacology* 2000; 22(10):789–96.
120. Welters ID, Menzebach A, Langefeld TW, Menzebach M, Hempelmann G. Inhibitory effects of S(-) and R(+) bupivacaine on neutrophil function. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2001; 45(5):570–5. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11309006/>.
121. Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H et al. Inhibitory effect of local anaesthetics on reactive oxygen species production by human neutrophils. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 1997; 41(4):524–8. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9150783/>.
122. Mikawa K, Akamarsu H, Nishina K, Shiga M, Obara H, Niwa Y. Effects of ropivacaine on human neutrophil function: comparison with bupivacaine and lidocaine. *European Journal*

of *Anaesthesiology* 2003; 20(2):104–10. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12622492/>.

123. Blumenthal S, Borgeat A, Pasch T, Reyes L, Booy C, Lambert M et al. Ropivacaine decreases inflammation in experimental endotoxin-induced lung injury. *Anesthesiology* 2006; 104(5):961–9. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16645448/>.

124. Piegeler T, Votta-Velis EG, Bakhshi FR, Mao M, Carnegie G, Bonini MG et al. Endothelial barrier protection by local anesthetics: ropivacaine and lidocaine block tumor necrosis factor- α -induced endothelial cell Src activation. *Anesthesiology* 2014; 120(6):1414–28. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24525631/>.

125. Hattori M, Dohi S, Nozaki M, Niwa M, Shimonaka H. The inhibitory effects of local anesthetics on superoxide generation of neutrophils correlate with their partition coefficients. *Anesthesia & Analgesia* 1997; 84(2):405–12. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9024038/>.

126. Kulinska KI, Billert M, Sawinski K, Czerniak K, Gaca M, Kusza K et al. Local anaesthetics upregulate nitric oxide generation in cord blood and adult human neutrophils. *Scientific Reports* 2019; 9(1):569. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30679708/>.

127. Sethi S, Dikshit M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thrombosis Research* 2000; 100(3):223–47. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11108909/>.

128. Bhopale VM, Yang M, Yu K, Thom SR. Factors Associated with Nitric Oxide-mediated β 2 Integrin Inhibition of Neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry* 2015; 290(28):17474–84. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26032418/>.

129. Dubey M, Nagarkoti S, Awasthi D, Singh AK, Chandra T, Kumaravelu J et al. Nitric oxide-mediated apoptosis of neutrophils through caspase-8 and caspase-3-dependent mechanism. *Cell Death & Disease* 2016; 7(9):e2348. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27584786/>.

130. Valenzuela C, Moreno C, La Cruz A de, Macías Á, Prieto Á, González T. Stereoselective interactions between local anesthetics and ion channels. *Chirality* 2012; 24(11):944–50. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22674834/>.

131. Čižmáriková R, Čižmárik J, Valentová J, Habala L, Markuliak M. Chiral Aspects of Local Anesthetics. *Molecules* (Basel, Switzerland) 2020; 25(12). Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32545678/>.
132. Ekatodramis G, Borgeat A. The enantiomers: revolution or evolution. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2001; 1(3):205–6. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11895137/>.
133. Tsuchiya H, Mizogami M. R(+)-, Rac-, and S(-)-bupivacaine stereostructure-specifically interact with membrane lipids at cardiotoxically relevant concentrations. *Anesthesia and Analgesia* 2012; 114(2):310–2. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22156330/>.
134. Vanhoutte F, Vereecke J, Verbeke N, Carmeliet E. Stereoselective effects of the enantiomers of bupivacaine on the electrophysiological properties of the guinea-pig papillary muscle. *British Journal of Pharmacology* 1991; 103(1):1275–81. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1878762/>.
135. Tsuchiya H, Ueno T, Mizogami M. Stereostructure-based differences in the interactions of cardiotoxic local anesthetics with cholesterol-containing biomimetic membranes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011; 19(11):3410–5. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21550810/>.
136. Hollmann MW, Kurz K, Herroeder S, Struemper D, Hahnenkamp K, Berkelmans NS et al. The effects of S(-)-, R(+)-, and racemic bupivacaine on lysophosphatidate-induced priming of human neutrophils. *Anesthesia & Analgesia* 2003; 97(4):1053–8. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14500156/>.
137. Gupta AK, Giaglis S, Hasler P, Hahn S. Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A. *Public Library of Science ONE* 2014; 9(5):e97088. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24819773/>.
138. Bont CM de, Koopman WJH, Boelens WC, Pruijn GJM. Stimulus-dependent chromatin dynamics, citrullination, calcium signalling and ROS production during NET formation. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 2018; 1865(11 Pt A):1621–9.
139. Vorobjeva N, Galkin I, Pletjushkina O, Golyshev S, Zinovkin R, Prikhodko A et al. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human

neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 2020; 1866(5):165664. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31926265/>.

140. Lee J, Li Y, Chen H, Lin R, Huang S, Chen H et al. Protective effects of luteolin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury involves inhibition of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in neutrophils. *Acta Pharmacologica Sinica* 2010; 31(7):831–8. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20562902/>.

141. Selvatici R, Falzarano S, Mollica A, Spisani S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *European Journal of Pharmacology* 2006; 534(1-3):1–11. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16516193/>.

142. Sato T, Hongu T, Sakamoto M, Funakoshi Y, Kanaho Y. Molecular mechanisms of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils: phospholipase D is dispensable. *Molecular and Cellular Biology* 2013; 33(1):136–45. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23109426/>.

143. Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *eLife* 2017; 6.

144. Gennaro R, Pozzan T, Romeo D. Monitoring of cytosolic free Ca²⁺ in C5a-stimulated neutrophils: loss of receptor-modulated Ca²⁺ stores and Ca²⁺ uptake in granule-free cytoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1984; 81(5):1416–20. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC344846/>.

145. Lämmermann T, Kastenmüller W. Concepts of GPCR-controlled navigation in the immune system. *Immunological Reviews* 2019; 289(1):205–31. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30977203/>.

146. Chen T, Li Y, Sun R, Hu H, Liu Y, Herrmann M et al. Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils. *Frontiers in Immunology* 2021; 12:775267. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34804066/>.

147. Neptune ER, Bourne HR. Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1997; 94(26):14489–94. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9405640/>.

148. Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology* 2018; 25(1):4–12. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29323277/>.
149. Masuho I, Skamangas NK, Muntean BS, Martemyanov KA. Diversity of the Gβγ complexes defines spatial and temporal bias of GPCR signaling. *Cell Systems* 2021; 12(4):324-337.e5. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33667409/>.
150. Rao BD, Sarkar P, Chattopadhyay A. Effect of tertiary amine local anesthetics on G protein-coupled receptor lateral diffusion and actin cytoskeletal reorganization. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes* 2021; 1863(9):183547. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33417968/>.
151. Ganguly S, Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. Actin cytoskeleton-dependent dynamics of the human serotonin1A receptor correlates with receptor signaling. *Biophysical Journal* 2008; 95(1):451–63. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18339759/>.
152. Veya L, Piguet J, Vogel H. Single Molecule Imaging Deciphers the Relation between Mobility and Signaling of a Prototypical G Protein-coupled Receptor in Living Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2015; 290(46):27723–35. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26363070/>.
153. Kwik J, Boyle S, Fooksman D, Margolis L, Sheetz MP, Edidin M. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2003; 100(24):13964–9. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14612561/>.
154. Sasagawa S. Inhibitory effects of local anesthetics on migration, extracellular release of lysosomal enzyme, and superoxide anion production in human polymorphonuclear leukocytes. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 1991; 13(4):607–22. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1663527/>.
155. Berger C, Rossaint J, van Aken H, Westphal M, Hahnenkamp K, Zarbock A. Lidocaine reduces neutrophil recruitment by abolishing chemokine-induced arrest and transendothelial migration in septic patients. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2014; 192(1):367–76. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24293632/>.

156. Dixit N, Simon SI. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest. *Frontiers in Immunology* 2012; 3:188. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22787461/>.

Erklärung zum Promotionsverfahren

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

Ich erkläre,

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

Außerdem erkläre ich,

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

Regensburg, 08. Juli 2024

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernhard M. Graf dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit zur Absolvierung meiner Dissertation in der Abteilung für Anästhesiologie ermöglichte. Ebenso gilt ein besonderer Dank meiner Doktormutter Frau PD Dr. Sigrid Wittmann, die mir ermöglichte diese Dissertation zu verfassen.

Auch möchte ich allen weiteren Beteiligten meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Darunter gilt ein besonderer Dank den Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Anästhesiologie, insbesondere Herrn Dr. Michael Gruber, der mich jederzeit bei der Planung, der Durchführung und der Auswertung meiner experimentellen Doktorarbeit unterstützte. Ebenso möchte ich den restlichen Labormitarbeitern/ - innen der Abteilung für Anästhesiologie dafür danken, dass Sie mich jederzeit als Mitglied des Teams betrachtet haben und auch bei sämtlichen Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen. Insbesondere möchte ich mich bei Regina Lindner bedanken, die sich mehrmals der Korrektur meiner Dissertation annahm und auch beim mehrmaligen Fragen sehr geduldig und verständnisvoll mir gegenüber war.

Ein weiterer Dank gebührt allen Probanden, die sich dazu bereit erklärten mich und meine wissenschaftliche Arbeit durch ihre Blutspende zu unterstützen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Lebenspartner, meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich in der Zeit der Anfertigung meiner Dissertation immer unterstützten, Verständnis zeigten und an meinen Erfolg glaubten.