

AUS DEM LEHRSTUHL bzw. DER ABTEILUNG

FÜR HERZ – THORAX - CHIRURGIE

Prof. Dr. Christof Schmid

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

Untersuchung zur Wirkung von molekularem Wasserstoff und Sevofluran auf die
Granulozytenfunktionalität

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Thomas Francis Burke

2025

AUS DEM LEHRSTUHL bzw. DER ABTEILUNG

FÜR HERZ – THORAX - CHIRURGIE

Prof. Dr. Christof Schmid

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

Untersuchung zur Wirkung von molekularem Wasserstoff und Sevofluran auf die
Granulozytenfunktionalität

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Thomas Francis Burke

2025

Dekan: *Prof. Dr. Dipl. – Phys. Dirk Hellwig*

1. Berichterstatter: *PD Dr. med. vet. Marietta von Süsskind-Schwendi*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. Stephan Schreml*

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis und Gliederung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	6
1.1 Humane Granulozyten	6
1.1.1 Granulozyten: Arten und Aufbau	6
1.2 Mechanismen der neutrophilen Granulozyten	7
1.2.1 Migration der Granulozyten an den Ort der Infektion	7
1.2.2 Oxidativer Burst, reaktive Sauerstoffspezies und die NADPH-Oxidase	8
1.2.3 Die Superoxiddismutase	8
1.2.4 Das Enzym Myeloperoxidase	9
1.2.5 Die Ausbildung neutrophiler extrazellulärer Fallen	10
1.3 Wasserstoff in der Medizin und Wirkung auf den Organismus	10
1.4 Sevofluran in der Medizin und Wirkung auf den Organismus	13
1.5 Fragestellung	14
1.6 Studiendesign zur Untersuchung der Interaktion von PMNs mit H ₂ und Sevofluran	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Methoden	16
2.1.1 Granulozyten-Isolierung und Befüllung der Ibidi-Slides	19
2.1.2 Aufbau und Durchführung des Versuchs am Mikroskop	23
2.1.2.1 Versuchsdurchführung am Mikroskop mit molekularem Wasserstoff	24
2.1.2.2 Versuchsdurchführung am Mikroskop mit Sevofluran	25
2.1.3 Auswertung der Aufnahmen des Mikroskops mit Imaris	25
2.1.3.1 Aufzeichnung der Migration und untersuchte Migrationsparameter	25
2.1.3.2 Aufzeichnung der Granulozytenfunktionen am Mikroskop	26
2.1.4 Datenkonvertierung und Auswertung der Granulozytenfunktionalität	27
2.1.4.1 Datenkonvertierung und Auswertung der ROS-Produktion und der Myeloperoxidase-Reaktion	27
2.1.4.2 Datenkonvertierung und Auswertung der NETose	28

2.1.5 Die Durchflusszytometrie und die untersuchten Aspekte	30
2.1.5.1 Versuchsaufbau der Burst Versuche unter dem Durchflusszytometer	30
2.1.5.2 Antikörper – Versuchsdurchführung am Durchflusszytometer	32
2.1.5.3 Auswertung der Durchflusszytometrie - Versuche	33
2.1.6 Filterkriterien, statistische Tests und Erläuterungen zur Auswertung	36
2.1.6.1 Verwendete Filterkriterien bei der Auswertung der Mikroskop Aufnahmen	36
2.1.6.2 Verwendete Tests zur statistischen Auswertung	37
2.1.6.3 Erläuterung zu den ausgewerteten Ergebnissen	38
3. Ergebnisse der Versuche am Mikroskop mittels Live Cell Imaging	39
3.1 Migrationsverhalten humaner neutrophiler Granulozyten mittels Live Cell Imaging	39
3.1.1 Gesamte zurückgelegte Strecke der PMNs	40
3.1.2 Bewegung der PMNs in X - Richtung	41
3.1.3 Bewegung der PMNs in Y - Richtung	42
3.1.4 Migrationsgeschwindigkeit der PMNs	42
3.1.5 Geradlinigkeit der Migration der PMNs	43
3.1.6 Migration der Wasserstoffversuche mit 10 nM fMLP im Vergleich zu 10 μ M fMLP	44
3.2 Defensivreaktionen humaner neutrophiler Granulozyten	46
3.2.1 Reaktionen mit der Bildung freier Radikale: ROS - Produktion	46
3.2.2 Reaktionen des Enzyms Myeloperoxidase	48
3.2.3 Reaktionen mit der Ausbildung von NETs	50
3.2.4 Reaktionsversuche mit molekularem Wasserstoff und dem Vergleich von 10 nM fMLP und 10 μ M fMLP	51
3.3 Versuche mit dem Durchflusszytometer	53
3.3.1 BURST – Versuche: Mediane Fluoreszenzintensität	54
3.3.2 Antikörperexprimierung an dem Durchflusszytometer	55
3.3.2.1 Einfluss von molekularem Wasserstoff auf CD11b	55
3.3.2.2 Einfluss von molekularem Wasserstoff CD62L	56
3.3.2.3 Einfluss von molekularem Wasserstoff CD66b	57
4. Diskussion	58
4.1 Diskussion der Methodik	58
4.2 Diskussion des Versuchsaufbaus	60
4.3 Diskussion der Ergebnisse	60

4.4 Ausblick	63
4.5 Zusammenfassung	64
4.6 Summary	65
5. Anhang	67
5.1 Materialliste	67
5.2 Abbildungsverzeichnis	71
5.3 Tabellenverzeichnis	73
5.4 Formelverzeichnis	73
5.5 Literaturverzeichnis	73
References	73

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance, einfaktorielle Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin
CD	Cluster of Differentiation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHR	Dihydrorhodamin-123
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
FC	Flow Cytometry (Durchflusszytometrie)
FMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
FKS	RPMI ohne fetalem Kälberserum
FSC	Forward Scatter
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat

H ₂	Molekularer Wasserstoff
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL-1	Interleukin-1
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Antigen – 1
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Macrophage Antigen
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MPO	Myeloperoxidase
n	Stichprobenumfang
NADPH-Oxidase	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat-Oxidase
NET	Neutrophil Extracellular Traps
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	Polymorphnukleärer/ Polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyt
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SOD	Superoxiddismutase
SOP	Standard Operating Procedure
SSC	Side Scatter
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein -1

1. Einleitung

1.1 Humane Granulozyten

Humane Neutrophile Granulozyten sind eine Art der polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten (Englisch für polymorphnuclear neutrophils/leucocytes, im Folgenden „PMNs“ oder „Neutrophile“) und zählen zur Gruppe der Leukozyten. Sie sind Zellen des angeborenen, unspezifischen Immunsystems (1). Sie gelangen typischerweise als erste Leukozyten an den Ort einer Infektion und können durch verschiedene Mechanismen zur Pathogenabwehr beitragen (2).

1.1.1 Granulozyten: Arten und Aufbau

Die Granulozyten werden in drei Gruppen unterteilt.

Die basophilen Granulozyten bilden mit 0 – 1 % die kleinste Gruppe der Granulozyten. Aktivierte Basophile Granulozyten sezernieren unter anderem Histamin und Leukotrien C₄ (3).

Die Eosinophilen Granulozyten bilden die zweite Untergruppe. Mit 1 – 3 % sind sie stärker im Blut vertreten als die Basophilen Granulozyten. In ihren Granula enthalten sind unter anderem das Major Basic Protein und die Eosinophile Peroxidase (4). Sie dienen als Indikatorzellen für allergische Reaktionen. Sie spielen eine Rolle bei der Abwehr von Pathogenen wie Würmern, Viren und Bakterien. (5)

Neutrophile Granulozyten stellen mit 50 – 70 % den größten Anteil an Leukozyten im Blut.

Enthalten im Zytoplasma der Neutrophilen Granulozyten sind verschiedene Granula und Enzyme, welche die Grundlage ihrer Funktion als Zellen des unspezifischen Immunsystems bildet. Die primären, unspezifischen, azurophilen Granula entsprechen den Lysosomen und beinhalten unter anderem antimikrobielle Enzyme, saure Hydrolasen, Defensine, Elastase und die Myeloperoxidase (im Folgenden „MPO“) (6–8). Die sekundären Granula werden auch spezifische Granula genannt, da sie spezifisch für neutrophile Granulozyten sind. Diese

sekundären Granula enthalten Enzyme wie Lysozyme, Kollagenase, Laktoferrin, Gelatinase, Histaminase und Plasminogenaktivatoren (8,9). Vorhanden sind des Weiteren die tertiären Granula, welche vornehmlich Gelatinase enthalten (9,10), sowie die sekretorischen Granula (6,8).

Damit stehen den neutrophilen Granulozyten mehrere Methoden der Immunabwehr zur Verfügung: Auf nicht oxidative Mikrobizide Art und Weise, etwa durch Proteasen und Peptide wie die Gelatinase, Elastase oder Cathepsin G; durch oxidative Reaktionen oder etwa der Bildung neutrophiler extrazellulärer Fallen (Englisch für neutrophil extracellular traps, im Folgenden „NET“ oder wenn der Prozess der NET-Bildung gemeint ist, „NETose“).

1.2 Mechanismen der neutrophilen Granulozyten

1.2.1 Migration der Granulozyten an den Ort der Infektion

Im Falle einer Infektion müssen die Neutrophilen Granulozyten aus der Blutbahn in das betroffene Gewebe wandern. Dieser Vorgang lässt sich unterteilen in Bindung, Rollen, langsames Rollen, Aktivierung, Adhäsion, intraluminales Kriechen und als letzten Schritt Transmigration, welche trans – oder parazellulär ablaufen kann (2,11).

Im Bindegewebe angekommen nehmen Rezeptoren auf der Oberfläche der Granulozyten chemotaktische Signale wahr und polarisieren sich in Richtung der Infektion. Bei dieser amöboiden Art der Fortbewegung bilden sich am sich herausbildenden vorderen Ende der Zelle Pseudopodien aus. Die Vorwärtsbewegung kommt durch De- und Polymerisierung der Aktinfilamente am vorderen Ende, sowie die Kontraktion von Myosin-II-abhängigen Aktinfilamentbündeln am hinteren Ende (sog. Uropodium) zustande. Bindungen der Aktinfilamente an Integrine stabilisieren die Granulozyten zusätzlich und ermöglichen eine Regulierung der Migrationsgeschwindigkeit. Diese Zell-Matrix-Kontakte werden am Uropodium wieder aufgelöst. (12–14)

1.2.2 Oxidativer Burst, reaktive Sauerstoffspezies und die NADPH-Oxidase

Der Begriff des oxidativen Bursts bezeichnet die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (Englisch für reactive oxygen species, im Folgenden „ROS“). ROS spielen im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle, etwa bei der Signalübertragung oder der antimikrobiellen Antwort auf Entzündungen (15). Vertreter der ROS sind etwa das Hyperoxid – Anion $O_2^{\bullet-}$, Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Hypochlorige Säure HOCL und das Hydroxylradikal $\bullet OH$ (16).

In biologischen Systemen ist die Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat - Oxidase (im Folgenden „NADPH-Oxidase“) eine entscheidende Quelle für reaktive Sauerstoff Spezies. Der aktivierte Enzymkomplex reduziert Sauerstoff mithilfe des Elektronendonors NADPH und es entsteht das Hyperoxid Anion $O_2^{\bullet-}$ (17), siehe dazu auch Formel 1. Freie Sauerstoff Spezies, auch Sauerstoffradikale genannt, sind Sauerstoff enthaltende Moleküle mit einem oder mehr ungepaarten Valenzelektronen, weshalb sie eine hohe chemische Reaktionsbereitschaft aufweisen (16). Ein zu hohes Aufkommen von ROS kann sich jedoch durch den oxidativen Stress krankheitsfördernd auf den Organismus auswirken (16,18), ebenso wie deren ausbleiben, beispielsweise die chronische Granulomatose, welche mit einer Funktionsstörung der NADPH–Oxidase einhergeht.

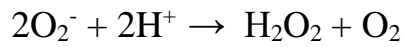


Formel 1: NADPH Oxidase

1.2.3 Die Superoxiddismutase

Die Superoxiddismutase (im Folgenden „SOD“) ist ein Enzym, welches Superoxid-Anionen in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umwandelt (19). Wasserstoffperoxid fungiert als Substrat für die von der darauffolgenden von der Myeloperoxidase katalysierten Reaktion.

Die enzymatische Reaktion in Formel 2 veranschaulicht:

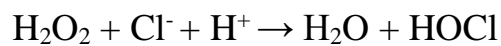


Formel 2: Superoxiddismutase

1.2.4 Das Enzym Myeloperoxidase

Das Enzym Myeloperoxidase spielt eine bedeutende Rolle bei Entzündungsprozessen und ist in den sekundären, azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten lokalisiert (20). Die MPO reagiert unter anderem mit Thiocyanat und Halogenid Ionen wie Chlorid, Bromid und Iodid (20,21). Durch die hohe intrazelluläre Cl^- – Konzentration – bedingt durch zahlreiche Kanäle, unter anderem durch den cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, welcher bis zu 50 % des Halogentransports übernimmt – ist der Hauptreaktionspartner der MPO in Neutrophilen Granulozyten jedoch Cl^- (22,23).

Wie in Formel 3 zu sehen, wird das von der SOD produzierte Wasserstoffperoxid und Chlor von der MPO in die hypochlorige Säure HOCl bzw. Hypochlorit OCl^- umgewandelt (22,24,25).



Formel 3: Myeloperoxidase

1.2.5 Die Ausbildung neutrophiler extrazellulärer Fallen

Die Bildung von neutrophilen extrazellulären Fallen stellt einen weiteren Mechanismus dar, mit dem Granulozyten Krankheitserreger bekämpfen (26). NETs sind netzartige DNA - Strukturen, die Chromatinfäden und granuläre Proteine wie etwa Cathepsin G, Calprotectin, neutrophile Elastase und Myeloperoxidase enthalten. Diese Strukturen fangen, immobilisieren und töten letztendlich die Krankheitserreger (27,28). Die NETose kann auf drei verschiedenen Wegen ablaufen: Die suizidale, die vitale und die mitochondriale NETose (29).

Bei der suizidalen NETose lösen sich zunächst die nukleäre und granuläre Membran auf, gefolgt von der Ruptur der Plasmamembran. Die daraufhin freiwerdenden Chromatinfäden sind mit den granulären Proteinen bestückt (29,30). Diese Art der NETose kann beispielsweise durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (im Folgenden „PMA“) induziert werden (31).

Bakterielle Lipopolysaccharide (im Folgenden „LPS“) können die vitale NETose induzieren, welche schneller abläuft als die suizidale NETose (32). Hierbei kommt es zu einem sogenannten „blebbing“ des Nukleus, bei welchem ein mit DNA beladenes Vesikel durch Exozytose durch die Zellmembran geschleust und erst extrazellulär freigesetzt wird. Die Plasmamembran bleibt hierbei intakt. (32)

Bei der vitalen mitochondrialen NETose wird mitochondriale DNA anstelle von nukleärer DNA freigesetzt (33). Diese Art der NETose kann etwa durch den Granulozyten /Makrophagen Koloniestimulierenden Faktor und anschließender Aktivierung von dem Toll-like Rezeptor 4 oder der Komplementkomponente 5a hervorgerufen werden (29).

1.3 Wasserstoff in der Medizin und Wirkung auf den Organismus

Molekularer Wasserstoff (im Folgenden auch „H₂“) ist ein kleines, leichtes Molekül (2 Da), das elektrisch neutral und unpolar ist. Diese Eigenschaften ermöglichen es H₂, schnell in Zellen einzutreten und durch die Zellmembran zu diffundieren. Dadurch kann es auch subzelluläre Kompartimente wie Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum und den Zellkern

erreichen. Da dort ein Großteil der ROS – Produktion bzw. DNA – Schäden entstehen, könnte dies ein therapeutisch wichtiger Ansatzpunkt sein. Zahlreiche Studien haben bereits dessen antioxidativen Eigenschaften belegen können. Die Applikationsmöglichkeiten von H₂ sind ebenfalls sehr vielseitig. So kann H₂ oral, inhalativ, intraperitoneal oder z.B. durch Augentropfen verabreicht werden. In klinischen Studien wird in der Regel mit 0,55 – 0,65 mM H₂ – angereichertem Trinkwasser oder inhalativ mit 1-4 % Wasserstoff gearbeitet. Das seit Jahrzehnten bei Tiefseetauchern zur Vorbeugung der Dekompressionskrankheit verwendete Hydreliox (eine Mischung aus 49 % H₂, 50 % Helium und 1 % O₂) belegt die Unbedenklichkeit hinsichtlich einer versehentlichen akuten Überdosierung mit H₂. (34)

Die Studie von Ohsawa et al. initiierte das erneute wissenschaftliche Interesse an molekularem Wasserstoff in der Medizin, als sie 2007 an einem Rattenmodell zeigten, dass H₂ den Ischämie - Reperfusion - Hirnschaden besser behandelte als das damals zugelassene Medikament Edaravone. Mit der Inhalation von H₂ war das betroffene Infarktareal kleiner. Zudem erholten sich das Gewicht, die Körpertemperatur und die Bewegungsabläufe der untersuchten Ratten mit H₂, während die unbehandelten Ratten abbauten. Sie konnten zeigen, dass H₂ •OH abfangen kann, was dahingehend von besonderem Interesse ist, da für •OH im Körper kein schnelles und effizientes System zur Detoxifizierung bekannt ist. Auch konnte mitochondriale sowie nukleäre DNA geschützt werden, ein Indiz dafür, dass H₂ die meisten Membrane passieren und sogar in die Organellen gelangen konnte. (35)

Ebenso kann H₂ im Gegensatz zu vielen Therapeutika die Blut–Hirn–Schranke passieren, was eine neue Bandbreite der therapeutischen Möglichkeiten eröffnet. Die höchste Reaktionsbereitschaft hat H₂ mit •OH und Peroxinitrit (ONOO⁻) aber kaum mit an der Signaltransduktion beteiligtem O₂⁻, H₂O₂ oder NO•. (34,36) Da es kaum mit NO• reagiert, könnte man H₂ zusammen mit anderen therapeutischen Gasen oder inhalativen Anästhetika oder NO• verabreichen (37). Shinbo et al. haben bereits gezeigt, dass nach Koronarer Ischämie im Rattenmodell eine gleichzeitige Gabe von NO und H₂ den Ischämie – Reperfusionsschaden mehr senkt als die alleinige Gabe von NO. Ebenso wurde die Produktion von Nitrotyrosin (Verursacht durch die Gabe von NO) durch die zeitgleiche Gabe von H₂ gesenkt. (38)

Die Vielfältigen Wirkungen von H₂ werden noch erforscht, es zeichnen sich aber vier molekulare Mechanismen ab: Das abfangen freier Radikale von •OH und ONOO⁻, die Änderung der Gen-Expression und die Rolle als Modulator in der Signalkaskade (39).

H₂ reagiert mit •OH und Peroxinitrit (ONOO⁻) aber kaum mit an der Signaltransduktion beteiligtem O₂⁻, H₂O₂ oder NO• (34–36).

Es wirkt entzündungshemmend und zytoprotektiv (34,40). Beispielsweise wurden bereits positive Auswirkungen bei myokardialen Verletzungen (41) und Reperfusionsschäden (42) festgestellt, ebenso wie sein potentieller Nutzen bei der Behandlung der Risikofaktoren des metabolischen Syndroms (43,44) oder der Rheumatoiden Arthritis (45). (46)

Studien zeigen, dass H₂ die Genexpression zahlreicher antiinflammatorischer Gene hoch – und die Gene vieler proinflammatorischer runterreguliert. Beispielsweise aktiviert H₂ Nrf2 (Englisch für Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), steigert die Produktion von Hämoxigenase-1 (34,47), SOD und Katalase senkt aber ebenso die Expression von TNF – α (und damit die von TNF-α induzierte Aktivierung von NFκB), IL-6 und IL-8 (u.a.) (39,48,49). Die Aktivität von NF-κB (Englisch für nuclear factor kappa B), welches die Expression vieler proinflammatorischer Zytokine reguliert, wird durch H₂ reduziert (50,51).

Eine Vielzahl menschlicher Erkrankungen wird durch eine überschießende ROS – Produktion verursacht bzw. exazerbiert. Die antioxidativen Eigenschaften von molekularem Wasserstoff scheinen eine große Bandbreite von Erkrankungen positiv zu beeinflussen:

Xie et al. führten Studien durch, in welchen untersucht wurde Effekt die Inhalation von 2% - igem Wasserstoff auf Sepsis beziehungsweise eine durch Zymosan oder LPS erzeugte systemische Inflammation auf Ratten hat. Durch Wasserstoff stieg die 14 Tage Überlebensrate der Ratten bei den Versuchen mit Zymosan von 10 % ohne Wasserstoff auf 70 % mit H₂. (52) Xie et al. kamen zu dem Schluss, dass molekularer Wasserstoff eine vielversprechende Unterstützung bei der Behandlung von Sepsis darstellen könnte (53). Yu et al. fanden heraus, dass molekularer Wasserstoff ebenfalls einen Effekt auf die Permeabilität der Endothelzellen hat. Im Falle einer Sepsis beispielsweise nimmt die Permeabilität der Endothelzellen zu. Die Exposition mit H₂ bewirkte jedoch, dass sowohl die Exprimierung von VCAM – 1, ICAM – 1 und E- Selektin sank, während die Exprimierung von VE – Cadherin anstieg. Dies könnte dabei helfen, die erhöhte Permeabilität abzumildern. (46,54)

Hayashida et al. konnten am Rattenmodell zeigen, dass durch Zugabe von H₂ die Ischämie – Reperfusionsschäden nach einem Herzinfarkt mitigiert werden konnten (55). Es wurde ebenfalls ein positiver Effekt von H₂ auf die Risikofaktoren des Krankheitsspektrums des metabolischen Syndroms gefunden, etwa sank der LDL – Wert oder das Körpergewicht reduzierte sich. (43,44,56) In einer Studie von Nakao et al. verringerte sich durch Trinken von stark mit H₂-angereichertem Wasser nach 4 Wochen der Gesamt - Cholesterinwert / HDL – Cholesterinwert um 13 % und das HDL stieg um 8 %. Nach 8 Wochen war das Vorhandensein/Aktivität des antioxidativen Enzyms Superoxiddismutase ebenfalls um 39 % gesteigert (43). Kang et al. konnten in einer Studie zeigen, dass das Trinken von mit H₂ angereichertem Wasser über 6 Wochen während einer Chemotherapie die oxidativen Marker senken, sowie die Quality of Life signifikant steigern konnte, ohne dass H₂ die Chemotherapie an sich beeinträchtigte (57). Huang et al. zeigten, dass H₂ positive Effekte auf Ventilator induzierte Lungenschäden hat (58).

Zahlreiche Studien zeigen deutlich die antioxidativen Eigenschaften und den enormen potenziellen Nutzen von molekularem Wasserstoff in der Medizin. Er könnte einen wichtigen Bestandteil der Adjuvanten Therapie darstellen, da er auf viele Erkrankungen, besonders solche, die durch oxidativen Stress entstanden sind, einen positiven Effekt zu haben scheint und zugleich bisher keine unerwünschten Wirkungen bekannt sind (46).

1.4 Sevofluran in der Medizin und Wirkung auf den Organismus

Das weit verbreitete Anästhetikum Sevofluran hat in mehreren Studien Auswirkungen auf die Immunantwort und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies gezeigt.

Wagner et al. zeigten, dass Sevofluran bei mechanischer Ventilation die ROS-Produktion reduzierte (59). In einer weiteren Studie von Hu et al. wurde festgestellt, dass Sevofluran die Superoxid-Produktion in von plättchenaktivierendem Faktor stimulierten Neutrophilen Granulozyten um 33 % verringerte (60).

Eine Studie von Liu et al. zeigte, dass die Inhalation von 1 % Sevofluran über einen Zeitraum von 6 Stunden nach einer Zäkalverschluss- und Punktion, einem etablierten Verfahren zur Induktion von Sepsis in Tierversuchen, die 7-Tages-Überlebensrate der Ratten von 16,6 % auf 83,3 % erhöhte (61).

Sevofluran beeinflusst auch das Immunsystem und humane Granulozyten. Eine Studie von Fröhlich et al. zeige, dass unter dem Einfluss von Sevofluran und N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (im Folgenden „fMLP“) die Aktivierungsgrenze für neutrophile Granulozyten angehoben wird und zudem die Konzentration von H₂O₂ gesenkt wird (62).

1.5 Fragestellung

Die Hypothese dieser Arbeit ist, ob molekularer Wasserstoff im Vergleich zu Sevofluran eine stärker inhibierende Wirkung auf humane neutrophile Granulozyten hat. Es ist bekannt, dass Sevofluran eine anti-oxidative Wirkung auf den menschlichen Organismus hat, ebenso wie molekularer Wasserstoff. Ein großer Teil der Studien mit H₂ wurde bis jetzt jedoch an Tiermodellen durchgeführt. Diese Studie soll untersuchen, ob und wie groß der Effekt von H₂ auf humane neutrophile Granulozyten ist und inwiefern er sich von dem Effekt unter Sevofluran – Begasung oder normoxischer Kontrollversuche unterscheidet.

Das Augenmerk dieser Arbeit ist die Untersuchung des Migrationsverhaltens und der Reaktionen der (neutrophilen) Granulozyten: Der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, der Myeloperoxidase und der Exprimierung extrazellulärer Fallen. Der molekulare Wasserstoff könnte helfen, eine überschießende oder ungewollte ROS-Produktion abzumildern, hinauszuzögern oder gar zu unterbinden.

1.6 Studiendesign zur Untersuchung der Interaktion von PMNs mit H₂ und Sevofluran

Untersuchungsaspekt der Versuche war die potenzielle Beeinflussung von molekularem Wasserstoff und Sevofluran auf die Funktionalität und das Migrationsverhalten humaner neutrophiler Granulozyten. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die durchgeführten Versuchsarten.

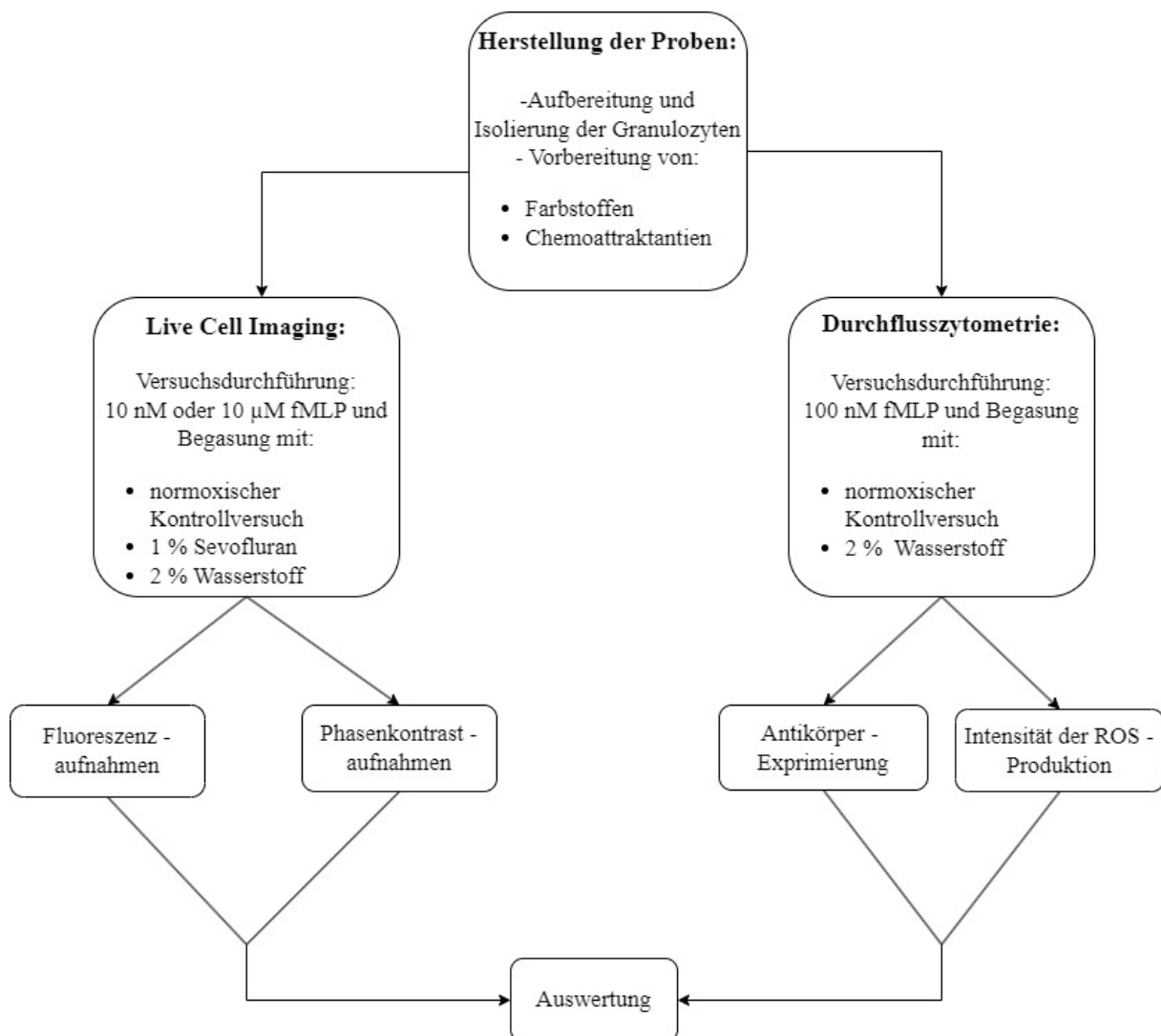


Abbildung 1: Projektskizze

Einen Überblick über die jeweils erhobenen Parameter bietet Abbildung 2.

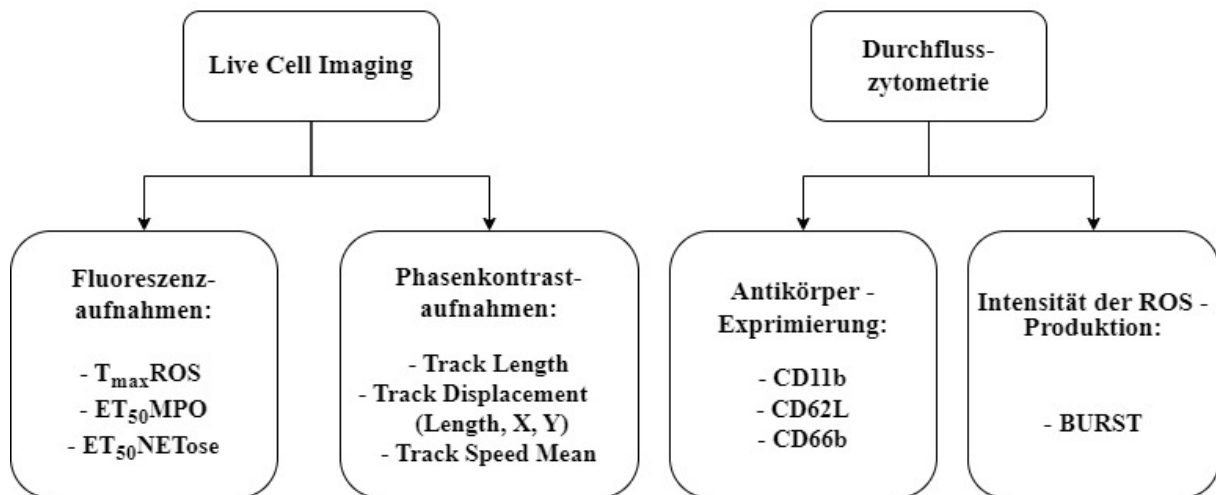


Abbildung 2: Erhobene und untersuchte Parameter

2. Material und Methoden

Eine Übersicht der verwendeten Materialien ist der Tabelle unter 5.1 Materialliste zu entnehmen.

2.1 Methoden

Das Prozedere zur Granulozytenisolierung und Gelherstellung ist mit dem anderer Studien unseres Labors vergleichbar (63–68). Abbildung 3 zeigt schematisch den Ablauf für die Mikroskopie-Versuche nach der Granulozyten-Isolierung.

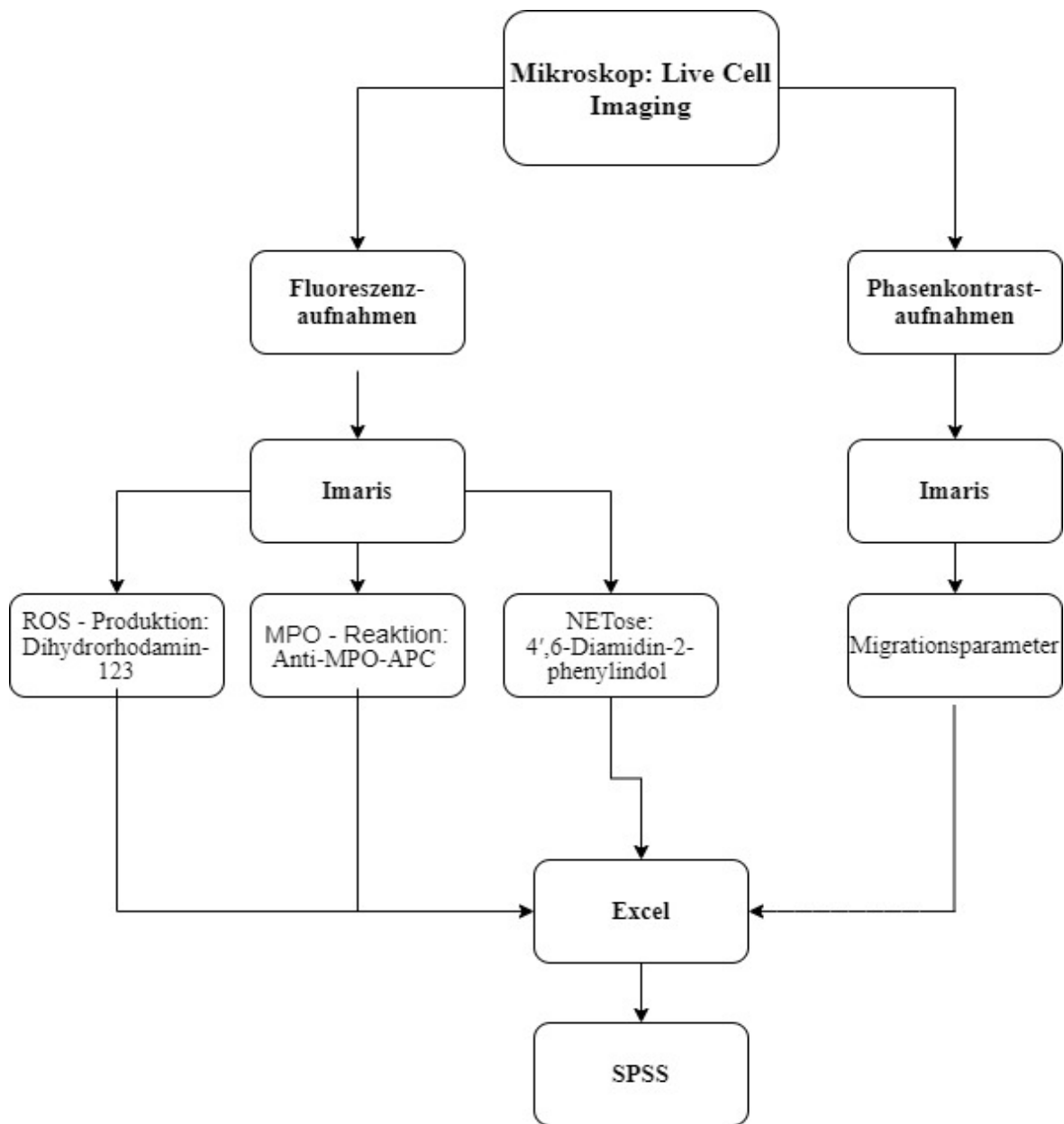


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Versuche an dem Mikroskop

Die Versuche am Mikroskop ließen nur Aussagen zu dem zeitlichen Aspekt der ablaufenden Reaktionen zu. Deshalb wurden humane neutrophile Granulozyten zudem mit Hilfe des FACSCalibur Durchflusssytometers und der Software CellQuest Pro (Version 5.2) untersucht.

Hierbei ließen sich Aussagen zur Intensität der Reaktionen machen. In Abbildung 4 ist schematisch der Ablauf der Versuche an dem Durchflusszytometer gezeigt.

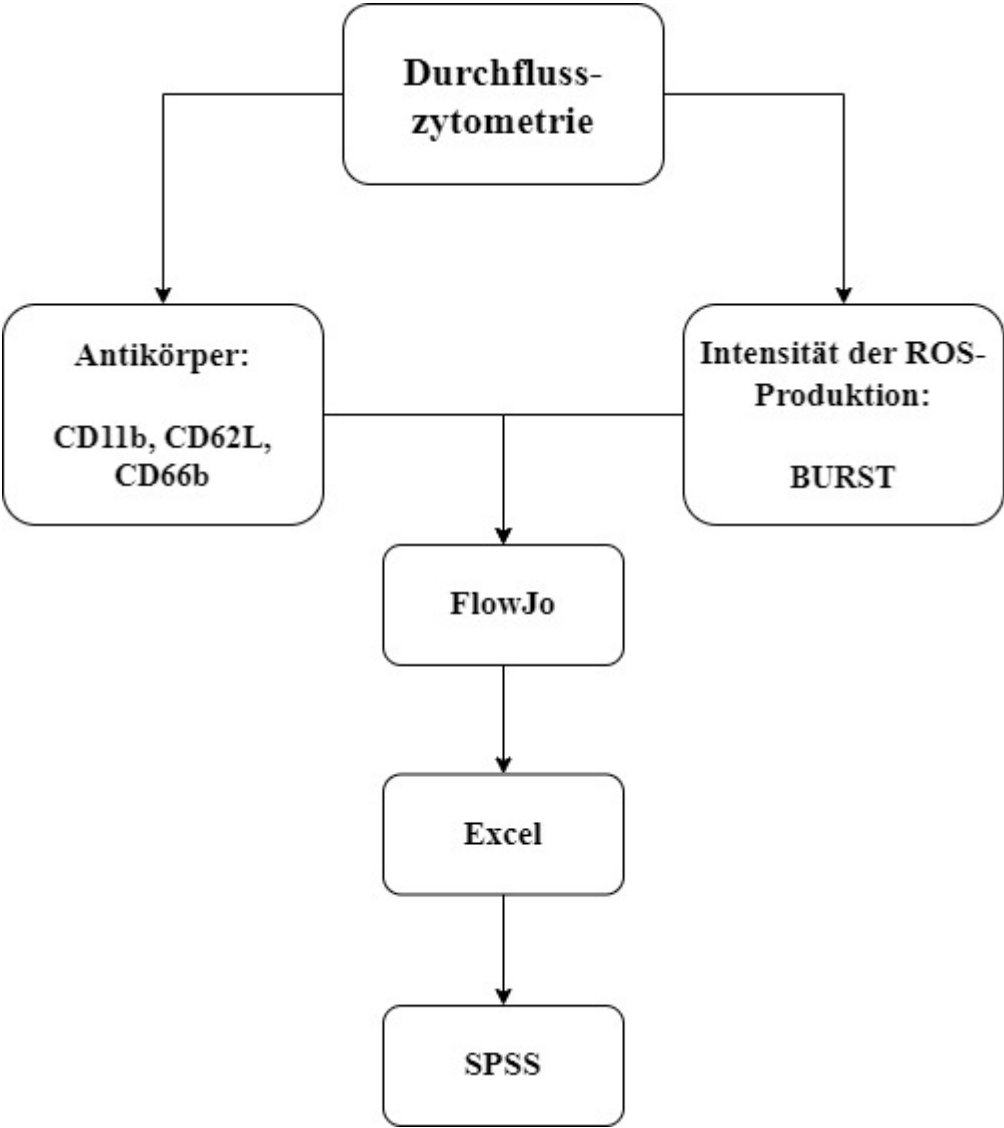


Abbildung 4: Ablauf der Versuche an dem Durchflusszytometer

2.1.1 Granulozyten-Isolierung und Befüllung der Ibidi-Slides

Den Probanden wurde, nach vorheriger Aufklärung über die Studie sowie nach Ihrer Einwilligung, 7 mL Blut abgenommen. Das Vollblut wurde anschließend aufbereitet, um die Granulozyten zu isolieren. Hierfür wurden je 3 mL, auf Raumtemperatur erwärmtes, Leuko Spin Medium, PBMC Lympho Spin Medium und 3 mL Vollblut in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen vorsichtig übereinandergeschichtet, um eine Phasenvermischung zu vermeiden. Leuko – sowie Lympho-Spin sind Dichtegradientenmedien, welche es ermöglichen, Blut anhand ihrer Dichte aufzutrennen. Dadurch war es möglich, die Granulozyten zu isolieren.

Das Zentrifugenröhrchen wurde ohne Bremse mit 756g für 20 Minuten bei 21 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 150 µL des Granulozytenrings, in Abbildung 5 als gräulicher Schleier direkt über der roten Bande zu sehen, vorsichtig mit einer Pipette abgehoben und mit 300 µL RPMI ohne fetalem Kälberserum in einem neuen Zentrifugenröhrchen vermischt.

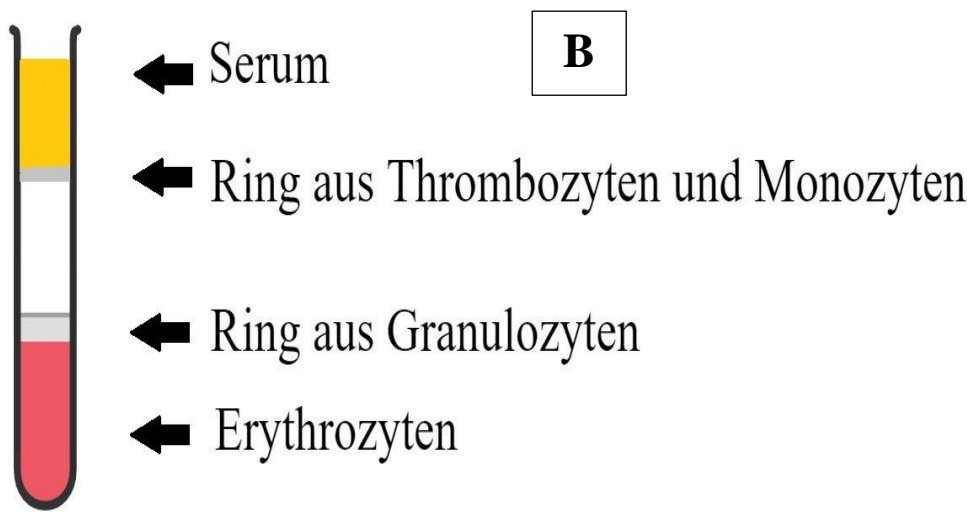
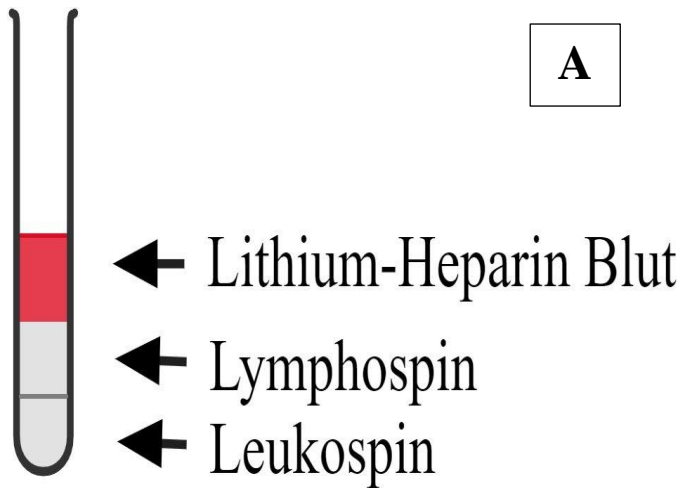
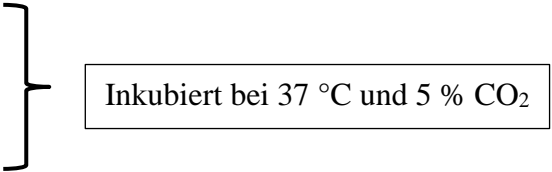


Abbildung 5: Bild A: Blutprobe vor der Zentrifugation mit Dichtegradientenmedien. Bild B: Nach Dichte aufgetrennte Blutprobe nach Isolierung

Um stets die angestrebte Zell-Konzentration von 3 Mio. Zellen/mL in den Kanälen zu gewährleisten, wurden 10 µL der Suspension auf einer Neubauer Zählkammer an einem Mikroskop gezählt und berechnet in wie viel RPMI + FKS (fetales Kälberserum, im Folgenden „FKS“) das Granulozytenpellet aufgenommen werden musste. Die Zellsuspension wurde abermals zentrifugiert, diesmal für fünf Minuten mit Bremse mit 756g und 21 °C. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Zellpellet mit der entsprechenden Menge RPMI + FKS, welches als Nährmedium für die Granulozyten fungiert, vermischt.

Die Ersten Substanzen des Gels wurden wie folgt unter Sterilen Bedingungen hergestellt und schließlich im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert:

- 50 µL RPMI + FKS (10 % FKS)
 - 20 µL H₂O (autoklaviert und destilliert)
 - 20 µL Minimum Essential Medium (10 x)
 - 10 µL Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)
- 
- Inkubiert bei 37 °C und 5 % CO₂

Diesen Substanzen wurden die Fluoreszenzfarbstoffe, Kollagen und die Granulozyten-Suspension in folgender Dosierung beigemischt.:

- 50 µL Granulozyten/RPMI/FKS-Gemisch
- 10 µL Anti-MPO-APC (Allophycocyanin, im Folgenden „APC“)
- 5 µL (0,5 µg/mL) 4',6-Diamidin-2-phenylindol (im Folgenden „DAPI“)
- 3 µL (1 µM) Dihydrorhodamin-123 (im Folgenden „DHR“)
- 150 µL Kollagen-Typ-I (1,5 mg/mL PureCol)

Kollagen wurde erst unmittelbar vor dem Befüllen der Kanäle hinzugegeben, um ein vorzeitiges Erhärten zu vermeiden.

Um die Granulozyten beobachten zu können, wurden sie in spezielle µ-Slides gegeben. Jede dieser Ibidi-Platten enthielt jeweils 3 identische Kammern. Die mittig gelegenen und für die Beobachtung relevanten Kanäle wurden mit all den zuvor genannten Substanzen

Herstellerkonform befüllt. Dieser ist, wie auf Abbildung 6 zu sehen, beidseits von einem Reservoir begrenzt. Das linke Reservoir enthielt stets den Lockstoff fMLP.

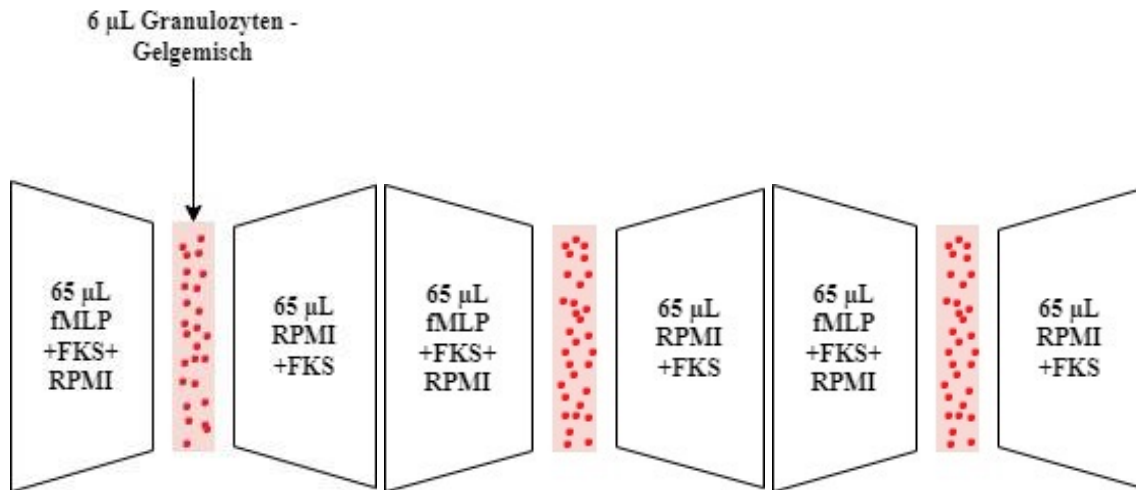


Abbildung 6: Ibidi - Slide

fMLP ist ein chemotaktisches Peptid, welches aufgrund seiner Oberflächenstruktur das Vorhandensein von Bakterien simuliert und somit die Granulozyten anregt

Der befüllte Ibidi-Slide wurde in einer feuchten Kammer für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dabei sollte das Gel soweit aushärten, dass beim Befüllen der Reservoire die Granulozyten nicht aus dem Kanal geschwemmt werden.

Nach der Inkubationsphase wurde jeweils das rechte Reservoir jedes Kanals mit 65 µL RPMI + FKS und das linke Reservoir mit 65 µL fMLP + RPMI + FKS vorsichtig befüllt. Die fMLP-Konzentration betrug dabei entweder 10 nM oder 10 µM.

2.1.2 Aufbau und Durchführung des Versuchs am Mikroskop

Gearbeitet wurde mit dem Inversionsmikroskop Leica DMi8 (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland), der Fluoreszenzkamera Leica DFC9000 GT (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH), dem Objektiv HC, PL FL L10x/0,40 CORR PH1 (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH) und der Lichtquelle CoolLED pE-4000 (CoolLED Ltd, Andover, Großbritannien). Da bei jedem Versuch stets nur die gesamte Ibidi-Platte begast werden konnte, war es nicht möglich simultan einen Kontroll-, Sevofluran- und Wasserstoff - Versuch durchzuführen. Die Einstellungen des Mikroskops waren sowohl bei den Versuchen mit Sevofluran, den normoxischen Kontrollversuchen als auch mit molekularem Wasserstoff die gleichen. Mit Hilfe einer integrierten Klimakammer wurde sichergestellt, dass die Versuche stets bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % stattfanden.

Die Ibidi-Platte befand sich auf einem motorgesteuerten Mikroskoptisch, welcher es ermöglichte im Abstand von ca. 30-40 s vier Aufnahmen pro Kanal, drei mit einem Fluoreszenzfarbfilter für DHR, MPO und DAPI, sowie eine im Phasenkontrast für die Migration zu machen. Die Beobachtungsdauer betrug zwischen 6 und 10 Stunden mit mindestens 300 Phasenkontrast-Aufzeichnungen. Versuche wurden automatisch aufgezeichnet und anschließend mithilfe des Programms Imaris x64 9.0.2 am Computer ausgewertet.

Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe wurde der LED QUAD Filterwürfel und zur Detektion der emittierten Wellenlängen der Filterwürfel DAPI/FI (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH) verwendet. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Eigenschaften dieser Filterwürfel.

Filtereigenschaft	Extinktion	DC Filter	Emission
DUAL-Filter	380-410; 472-498	418; 502	424-460; 505-545
QUAD-Filter	350-380; 460-480; 522-548; 615-635	405;485; 555; 645	410-450; 492-518; 560-590; LP 650

Tabelle 1: Eigenschaften der Filterwürfel

Zur Darstellung der ROS-Produktion, der ablaufenden Myeloperoxidase - Reaktion und der NETose wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Diese emittierten eine Fluoreszenz in einer spezifischen Wellenlänge, sobald eine Reaktion stattfand. Es folgt eine kurze Erläuterung der verwendeten Farbstoffe:

Zur Beurteilung der ROS-Produktion wurde Dihydrorhodamin-123 verwendet. DHR ist ein ungeladener Indikator für reaktive Sauerstoffspezies, welcher durch H_2O_2 oxidiert wird zu kationischem, fluoreszierendem Rhodamin-123. Angeregt wurde das DHR durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 490 nm und dessen Emissionsmaximum liegt bei 534 nm. Dies ist das erste Indiz dafür, dass die ROS-Produktion der Granulozyten begonnen hat.

Um die Aktivität des Enzyms Myeloperoxidase zu messen, wurde Anti-MPO-APC verwendet. Dies ist ein mit Allophycocyanin konjugiertes anti-human Myeloperoxidase - Antigen, welches an das aktivierte Enzym Myeloperoxidase bindet. Das Absorptionsmaximum für Anti-MPO-APC liegt bei 650 nm, in diesen Versuchen wurde es jedoch mit Licht der Wellenlänge 635 nm angeregt. Das Emissionsmaximum liegt bei 660 nm.

4',6-Diamidin-2-phenylindol bindet an bei der NETose freiwerdenden Chromatinfäden der Zellen. Das Absorptionsmaximum von DAPI liegt bei Licht der Wellenlänge 359 nm, in diesen Versuchen wurde es jedoch mit Licht der Wellenlänge 385 nm angeregt. Das Emissionsmaximum liegt bei 461 nm. Somit fungiert dieses Färbemittel als Indikator für die stattfindende NETose.

2.1.2.1 Versuchsdurchführung am Mikroskop mit molekularem Wasserstoff

Die Isolierung, Aufarbeitung und Inkubation der Granulozyten wurden wie in 2.2.1 beschrieben durchgeführt. 30 Minuten vor dem Mikroskopieren des Ibidi-Slides wurde anstelle von Druckluft 2 %-iger molekularer Wasserstoff mit 1 bar Druck über einen Wasserfilter in die Klimakammer des Mikroskops geleitet. So wurde gewährleistet, dass sich beim Start des Mikroskopierens bereits die erwünschte Konzentration von 2 % Wasserstoff in der Klimakammer befand und sich das Wasser nicht erst mit Wasserstoff sättigen musste.

2.1.2.2 Versuchsdurchführung am Mikroskop mit Sevofluran

Die Granulozyten-Isolierung erfolgte gemäß 2.2.1. Die 20-minütige Inkubation bei 37 °C unterschied sich von den Versuchen mit Druckluft dadurch, dass die Zellen im Kanal dauerhaft 1 %-igem Sevofluran ausgesetzt waren. Die Druckluft wurde über einen Wasserfilter im Wasserbad in einen Trajan (Dräger Trajan 808) geleitet. Über diesen wurde das 1 %-ige Sevofluran beigemischt und in einen speziellen Inkubator geleitet. Die angestrebte Konzentration von 1 % Sevofluran und 5 % CO₂ wurde über ein Datex-Messgerät ermittelt. Kurz vor dem Start des Mikroskopierens wurden ein Trajan mit Sevofluranvapor, das Datex-Messgerät sowie das mit Sevofluran angereicherte Wasser an das Mikroskop angeschlossen. Unter den gleichen Bedingungen wie bei der Inkubation, 1 % Sevofluran und 5 % CO₂, wurden Aufnahmen des befüllten Ibidi-Slides mit dem Mikroskop gemacht.

2.1.3 Auswertung der Aufnahmen des Mikroskops mit Imaris

Um die an dem Mikroskop aufgezeichneten Bilder zu verwertbaren Daten umzuwandeln, wurden sie mit dem Programm Imaris x64 9.0.2 ausgewertet. Der dadurch gewonnene Datensatz ermöglichte es im weiteren Verlauf, die einzelnen Zellreaktionen zu quantifizieren und miteinander zu vergleichen.

2.1.3.1 Aufzeichnung der Migration und untersuchte Migrationsparameter

Das Softwareprogramm identifizierte und verfolgte, sogenanntes „tracking“, jeden Granulozyten einzeln. Über die einzelnen Bildabfolgen war es so möglich, dessen Bewegungen zeitlich zu verfolgen. Um das zeitlich abnehmende Migrationsverhalten besser verfolgen zu können, wurden die Daten bei der Auswertung in Serien von je 60 Aufnahmen unterteilt, was einer zeitlichen Auftrennung in 30-minütige Abschnitte ermöglichte. Analysiert wurden lediglich die ersten 300 Aufnahmen, da nach einer Dauer von 2,5 Stunden die Aussagekraft bezüglich der Migration stark abnahm. In Abbildung 7 sind die einzelnen untersuchten Migrationsparameter dargestellt. Die Track Length umfasst die gesamte zurückgelegte Distanz eines Granulozyten, während die Track Displacement Length die kürzeste Strecke vom Anfang

zum Endpunkt beschreibt. Die Track Displacement in X - bzw. Y - Richtung bezeichnet die Distanz, die ein Granulozyt in Bezug auf die jeweilige Koordinate zurücklegte.

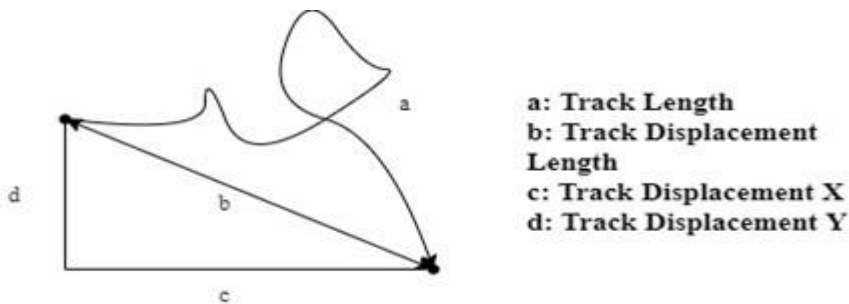


Abbildung 7: Untersuchte Migrationsparameter

Des Weiteren wurde ebenfalls die Track Speed Mean [$\mu\text{m/s}$] untersucht, welche die Geschwindigkeit der Granulozyten angab, sowie die Track Straightness, welche als Maß für die Zielgerichtete Migration diente.

2.1.3.2 Aufzeichnung der Granulozytenfunktionen am Mikroskop

Bei der Auswertung der Reaktionen wurde, anders als bei der Migration, lediglich jede fünfte Aufnahme (alle 150 s) verwendet, da Veränderungen sich langsamer zeigten. Dauer und Ausmaß der Reaktionen ließen sich über die Surface – Funktion nachverfolgen, bei der die Summe der fluoreszierenden Flächen pro Aufnahme ermittelt werden konnte. Abbildung 8 zeigt beispielhaft die mittels Imaris ermittelte DAPI – Fluoreszenz eines Versuchs.

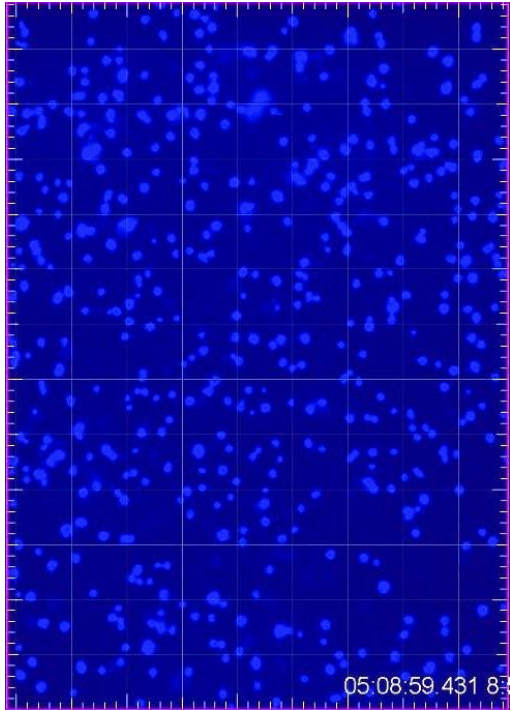


Abbildung 8: DAPI-Fluoreszenz mittels Imaris Software

2.1.4 Datenkonvertierung und Auswertung der Granulozytenfunktionalität

Um verwendbare Datensätze zu erstellen, wurden die Aufzeichnungen des Mikroskops mittels der Imaris Software in Excel – Dateien konvertiert. Nach der Datenkonvertierung wurden alle unplausiblen Ergebnisse ausgeschlossen. Anschließend wurden die Daten aus Excel in das Softwareprogramm SPSS überführt.

2.1.4.1 Datenkonvertierung und Auswertung der ROS-Produktion und der Myeloperoxidase-Reaktion

Aus der jeweiligen Momentaufnahme wurde die Fläche der fluoreszierenden Zellen aufsummiert. In Excel ergab sich für die Berechnung ROS-Produktion eine Funktion, deren Nullstelle in der 1. Ableitung deren Maximalwert entsprach. Beispielhaft in Abbildung 9 zu

sehen, entspricht der X-Wert der Nullstelle die $T_{\max ROS}$, also den Zeitpunkt, bei dem sich die maximale Anzahl/Flächensumme an Zellen in der ROS – Produktion befanden.

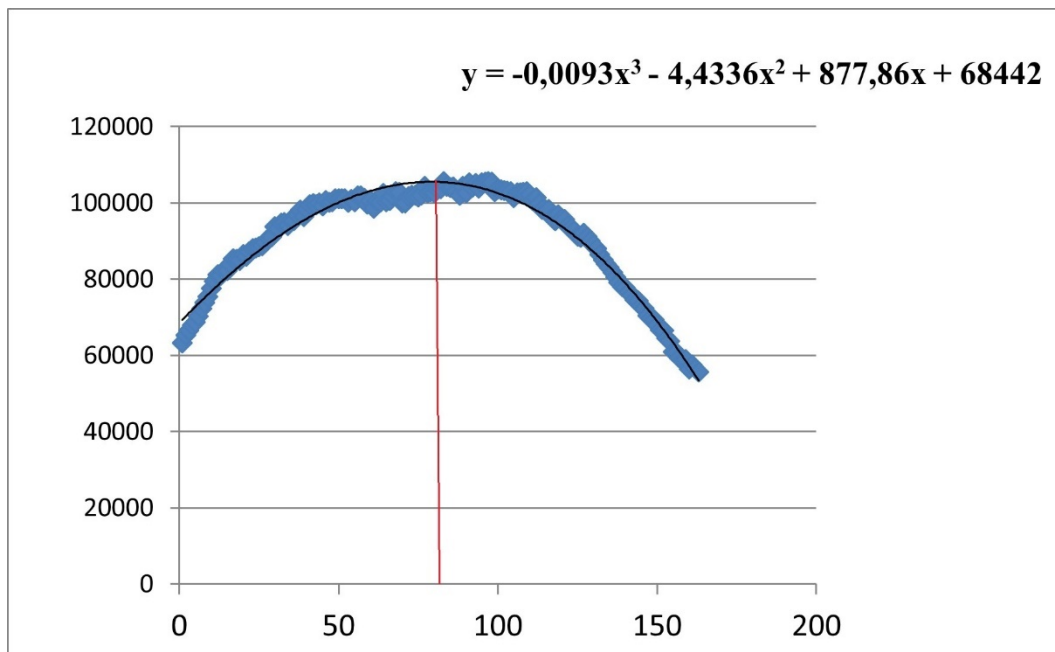


Abbildung 9: Beispielhafte Berechnung der $T_{\max ROS}$, In diesem Fall liegt der X-Wert der Nullstelle der ersten Ableitung bei 79,2.

Der für die Myeloperoxidase – Reaktion verwendete Wert war die Halbwertszeit der MPO, die $ET_{50 MPO}$. Dieser Wert entspricht dem Zeitpunkt, an welchem sich die Hälfte der von Imaris erkannten Flächen in einer Reaktion mit dem Enzym Myeloperoxidase befanden.

2.1.4.2 Datenkonvertierung und Auswertung der NETose

Die Daten der NETose wurden, anders als die der ROS- und MPO– Reaktionen, nicht direkt zu Excel, sondern zuerst von Imaris in das Softwareprogramm Phoenix exportiert. Das Programm zeichnete hier die Flächensummen der Reaktion/Fluoreszenz gegen die Zeit (alle 150 s) auf. Die dazu benutzte Formel ist Formel 4 zu entnehmen, wobei ET_{50} der Zeitpunkt ist, bei dem

die Hälfte der reagierenden Flächensumme erreicht wird und γ die Steigung der Kurve repräsentiert. Daraus ließ sich die $ET_{50NETose}$ ermitteln.

$$E = E0 + \frac{E_{max} \times T^\gamma}{(ET_{50}^\gamma + T^\gamma)}$$

Formel 4: Rechnungsformel Phoenix

Zum besseren Verständnis ist eine von Phoenix ausgewertete DAPI-Reaktion in Abbildung 10 dargestellt.

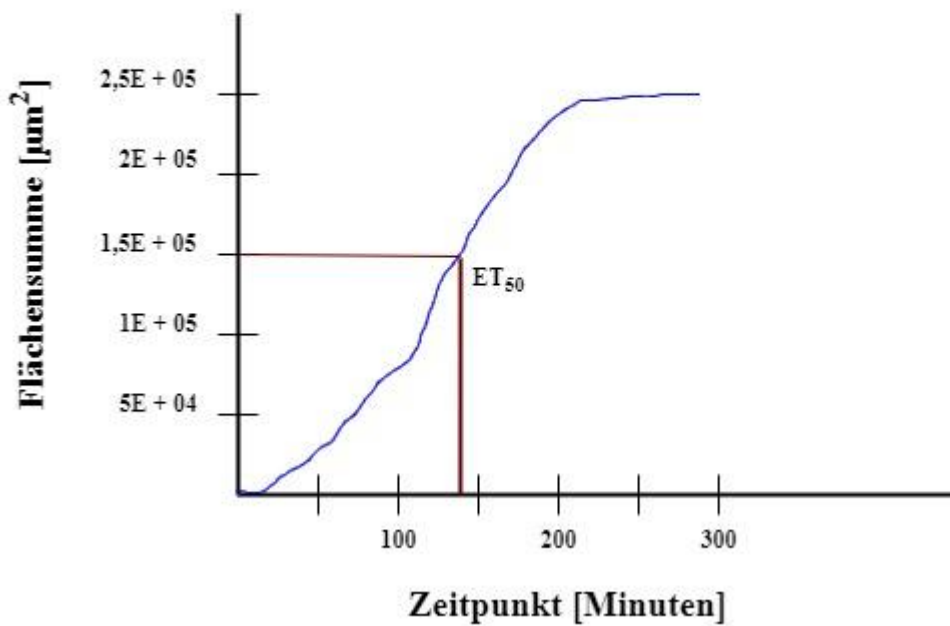


Abbildung 10: Auswertung der $ET_{50NETose}$ mit dem Programm Phoenix. Erreich die Flächensumme der fluoreszierenden Zellen die Hälfte ihrer gesamten Ausdehnung, korreliert der Nullpunkt der X-Achse mit der $ET_{50NETose}$.

Im Anschluss daran erfolgte die weitere Auswertung, inklusive des untersuchten Zeitfensters, gemäß 2.1.4.1 wie die der MPO-Reaktionen.

2.1.5 Die Durchflusszytometrie und die untersuchten Aspekte

Bei der Durchflusszytometrie (Englisch für flow cytometry, im Folgenden „FC“ genannt) wurde die Größe und Granularität der Zellen untersucht. Hierbei wurden die Zellen einzeln durch eine Kapillare gesaugt und mit einem Laser bestrahlt. Die Zellgröße wurde anhand des vorwärts gestreuten Lichts (im englischen forward scatter, im Folgenden „FSC“), die Granularität mit dem seitlich gestreuten Licht (im englischen side scatter, im Folgenden „SSC“) gemessen.

Mit dem Durchflusszytometer wurde sowohl die Intensität der ROS-Produktion als auch die Expression von drei Antikörpern, CD11b (Englisch für cluster of differentiation, im Folgenden „CD“), CD62L (L-Selektin) und CD66b (CEACAM8) untersucht. Alle drei Glykoproteine unterstützen die Zelladhäsion bei der Diapedese.

2.1.5.1 Versuchsaufbau der Burst Versuche unter dem Durchflusszytometer

Bei den „BURST“ - Versuchen wurde die Intensität der ROS-Produktion untersucht.

Gemessen wurden die Werte sowohl ohne Stimulans (Leerwert), unter dem Einfluss von LPS, TNF- α , fMLP, TNF- α + fMLP, als auch PMA, jeweils mit und ohne Begasung mit Wasserstoff.

Die DHR-Intensität der Kontrollgruppen ohne Stimulus wurde als Leer- bzw. Referenzwert verwendet. Die mit PMA stimulierten PMNs sollten einen massiven oxidativen Burst herbeirufen und somit als Positiv-Kontrolle dienen. Die mit fMLP und TNF- α versehenen Röhrchen sollten hingegen zu einer -im Vergleich- moderateren ROS-Produktion angeregt werden. Es wurde jede Probe in einem Doppelansatz, einmal mit H₂ – Begasung und einmal als normoxischer Kontrollversuch, gemessen.

Um einen aussagekräftigen Effekt mit Wasserstoff herbeizuführen, wurde Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (im Folgenden „DPBS“) in einer in einem Wasserbad befindlichen Glasflasche durchgehend mit 2 %-igem Wasserstoff durchsetzt. Dieses DPBS wurde erst unmittelbar vor der Applikation aus dem Wasserbad genommen. Bei der anschließenden Inkubation bei 37 °C wurden die Wasserstoff-Proben in eine Wärmekammer gestellt, welche durchgängig mit H₂ begast wurde.

2.1.5.2 BURST - Versuchsdurchführung am Durchflusszytometer

Die Blutabnahme so wie die Granulozytenisolierung entsprachen dem gleichen Prozedere wie für die Mikroskopieversuche.

Alle Rörchen beinhalteten:

- 10 µL [1 µM] DHR
- 10 µL [100 nM] Seminaphtharhodafluor (im Folgenden „SNARF“)
- 20 µL Granulozyten – Zellsuspension (rund 100000 Zellen)
- 10 µL [15 µM] Propidiumiodid (im Folgenden „PI“) am Ende

Unterschiede in der Befüllung:

- 10 µL (1µg/mL) TNF- α in den Rörchen, in welche später fMLP zugegeben wurde
- 1 mL DPBS in Rörchen der Kontrollgruppe
- 1 mL mit molekularem Wasserstoff angereichertem DPBS in Rörchen der H₂-Gruppe
- 10 µL fMLP [100 nM] in die Rörchen der TNF- α + fMLP-Gruppe
- 10 µL PMA [100 nM] in die Rörchen der PMA-Gruppe

Unterschiede in der Inkubation:

- Wasserbad in Raumluft für die Rörchen der Kontrollgruppe
- H₂ geflutete Wärmekammer für die Rörchen der H₂-Gruppe

Einen gesammelten Überblick in zeitlicher Abfolge gibt Tabelle 2 .

Doppelansatz in 1 mL PBS	Zellsuspension 20 µL	10 µL DHR 10 µL SNARF	TNF-α	37 °C 10 min	fMLP oder PMA	37 °C 20 min	Mind. 5 min 4°C	10 µL Propidiumjodid auf Eis bis zur Messung
LW	x	X		x		x	x	x
TNF-α + fMLP	x	X	x	x	10 µL fMLP	x	x	x
PMA	x	X		x	10 µL PMA	x	x	x

Tabelle 2: BURST – Versuchsaufbau

2.1.5.3 Antikörper – Versuchsdurchführung am Durchflusszytometer

Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurde ebenfalls der Einfluss von molekularem Wasserstoff auf drei Antikörper untersucht:

CD11b (150 µg/mL, konjugiert mit Phycoerythrin, „PE“), CD62L (200 µg/mL, konjugiert mit Fluorescein Isothiocyanat „FITC“) und CD66b (200 µg/mL, konjugiert mit Allophycocyanin, „APC“). Da die BURST- und Antikörperversuche zeitgleich durchgeführt wurden, stammten die Granulozyten aus denselben Proben/ von denselben Probanden. Auch hier entsprachen die Blutabnahmen sowie die Granulozytenisolierung den gleichen Präparationsschritten wie für die Mikroskop Versuche. Gemessen wurde ebenfalls im Doppelansatz. Die 20 µL Granulozyten wurden mit 1 mL kaltem PBS (mit Ca/Mg) vermengt. Das PBS der Wasserstoffreihe wurde zuvor wieder mit Wasserstoff angereichert, diesmal jedoch nicht im Wasserbad, sondern kalt. Die Röhren wurden dann bei 4 °C für 3 Minuten bei 425g zentrifugiert und anschließend abgekippt. Daraufhin wurden den Röhren je 5 µL der drei Oberflächenproteine beigemischt und anschließend bei 4 °C im Kühlschrank für 15 Minuten inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 2 mL PBS gewaschen, wieder 3 Minuten zentrifugiert (bei 4 °C und 425g), abgekippt und mit 200 µL PBS aufgefüllt. Einen Überblick für den Versuchsablauf bietet Tabelle 3.

Doppelansatz	Granulozytenkonzentrat	Kaltes PBS (mit Ca/Mg) zentrifugieren 4 °C, 3 min 425g	abkippen, AK zugeben CD 11b +62L+66b	15 min finster bei 4 °C inkubieren,	+ 2 mL PBS zentrifugieren bei 4 °C, 3 min 425g, abkippen	+ PBS ...messen
LW	20 µL	1 mL		X	X	200 µL PBS
AK	20 µL	1 mL	Je 5 µL	X	X	200 µL PBS

Tabelle 3: Antikörper - Versuchsaufbau

2.1.5.4 Auswertung der Durchflusszytometrie - Versuche

Bei den Versuchen wurden pro Röhrchen stets 10.000 Zellen erfasst und deren Fluoreszenzen aufgezeichnet. Aufgrund ihrer spezifischen Größe und Granularität (FSC und SSC) konnten mit Hilfe des sogenannten „gates“ die Granulozyten identifiziert werden. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz der vitalen Zellen ermittelt. Die Software FlowJo (Version 10.0.7) wurde verwendet, um die von CellQuest Pro erfassten Messdaten auszuwerten. Als Beispiel für das gate der Rhodamin-fluoreszierenden Granulozyten siehe Abbildung 11.

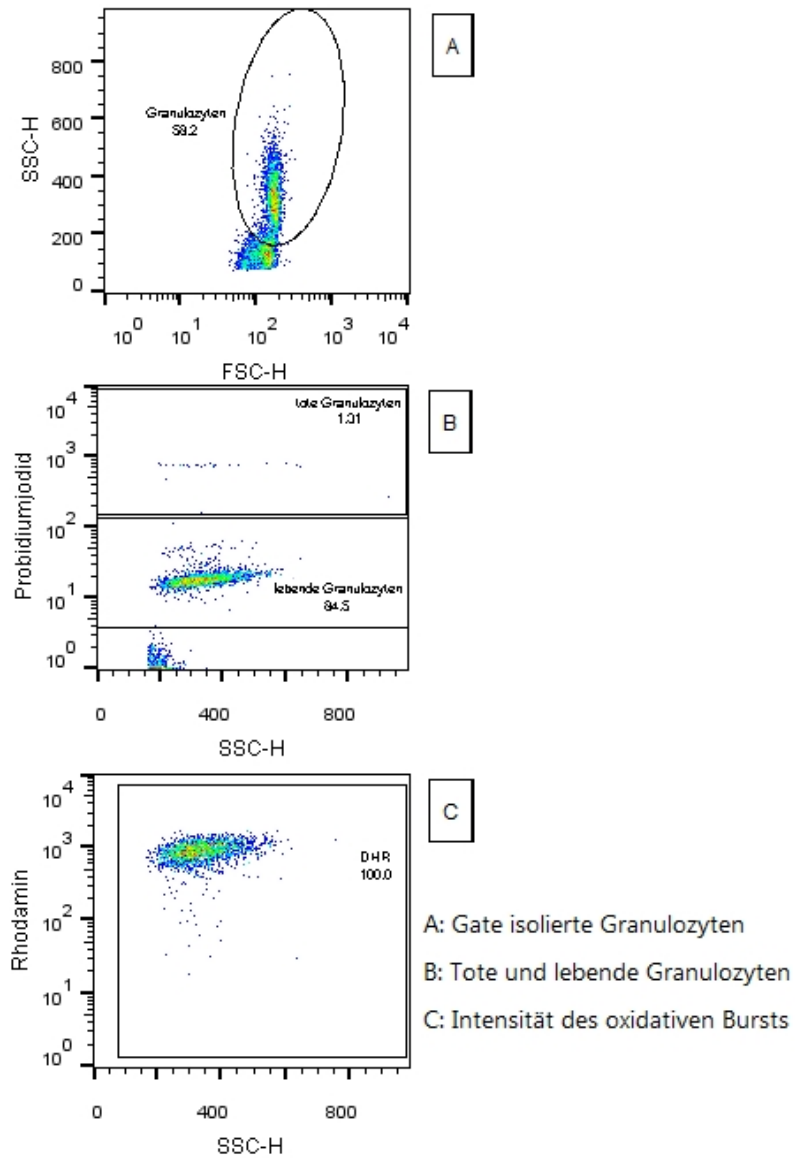


Abbildung 11: Beispielhaftes gaten des BURST - Versuches mit PMA am FlowJo. Bild A: Isolierung/Auftrennung der Granulozyten anhand ihrer Granularität und Größe von anderen Zellen (etwa Monozyten). Bild B: Auftrennung der lebenden von den toten Granulozyten mittels PI. Bild C: Ermittlung der Rhodamin – Fluoreszenz der vitalen Granulozyten.

Abbildung 12 zeigt beispielhaft das gaten in Bezug auf CD11b/Phycoerythrin - markierte Granulozyten.

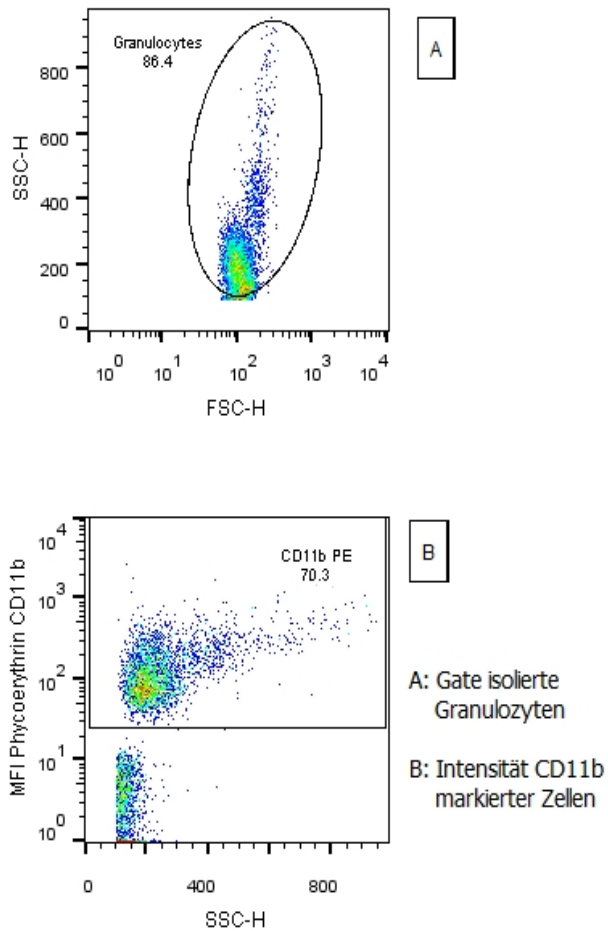


Abbildung 12: Gaten von CD11b-markierten Granulozyten. In Bild A wurden die Granulozyten anhand ihrer Granularität und Größe von anderen Zellen (etwa Monozyten) isoliert. In Bild B wurde die Fluoreszenz-Intensität der CD11b-markierten Granulozyten ermittelt

Die medianen Fluoreszenzintensitäten (im Folgenden „MFI“) wurden in eine Excel-Tabelle exportiert.

2.1.6 Filterkriterien, statistische Tests und Erläuterungen zur Auswertung

2.1.6.1 *Verwendete Filterkriterien bei der Auswertung der Mikroskop Aufnahmen*

Bevor die Versuche ausgewertet wurden, war es zudem notwendig einige Filter anzuwenden, um unplausible Ergebnisse herauszufiltern.

Bei der jeweils halbstündig unterteilten Migrationsauswertung wurden nur diejenigen Datensätze in die statistische Auswertung mit aufgenommen, welche eine Track Length von $\geq 25 \mu\text{m}$ und eine Track Duration von $\geq 900 \text{ s}$ und $\leq 1800 \text{ s}$ aufwiesen. Der Filter der Track Length entspricht damit in etwa dem doppelten Umfang eines humanen neutrophilen Granulozyten. Dadurch wurden diejenigen Zellen aus der Betrachtung ausgeschlossen, welche sich gar nicht beziehungsweise nur so geringfügig bewegten, dass sie die Ergebnisse verzerren würden.

Bei der Auswertung der Reaktionen wurden nur die Reaktionen ausgewertet, welche in einem bestimmten Zeitfenster abliefen. Dadurch fanden sowohl diejenigen Zellen, welche sich bereits zum Beginn der Aufzeichnung in einer aktiven Reaktion befanden als auch diejenigen, welche unplausibel spät mit der Reaktionskaskade begannen, keine Beachtung. Die Zeitzählung begann ab dem Moment, an dem die Granulozyten zur Gel-Matrix hinzugegeben wurden und anschließend inkubiert wurden. Das Zeitfenster bei den ROS-Aufzeichnungen lag zwischen 60 – 500 Minuten nach Kontakt der Granulozyten mit dem Gel. Das beobachtete Zeitfenster der MPO-Reaktionen und auch der NETose lag zwischen 60 – 550 Minuten.

Dadurch entstand eine zusätzliche Diskrepanz der Fallzahl zwischen den durchgeführten Versuchen und den ausgewerteten Versuchen. In Bezug auf die Reaktionsversuche ist diese Tabelle 4 zu entnehmen.

	Kontrollversuch	Sevofluran	Wasserstoff	Wasserstoff und 10 nM fMLP
Durchgeführte Versuche	n = 27	n = 24	n = 57	n = 12
ROS	n = 20	n = 16	n = 41	n = 8
MPO	n = 15	n = 7	n = 25	n = 8
NET _{ose}	n = 4	n = 12	n = 25	n = 4

Tabelle 4: Fallzahlen der Versuche hinsichtlich der Reaktionen

2.1.6.2 Verwendete Tests zur statistischen Auswertung

Die einzelnen Datensätze wurden zuerst jeweils mittels des Shapiro – Wilk – Tests und des Kolmogorov – Smirnov – Tests auf Normalverteilung überprüft. P-Werte $\leq 0,05$ wurden hier als nichtnormalverteilt angesehen.

Der Vergleich zweier normalverteilter Gruppen wurde mithilfe des t-Tests für unabhängige Variablen durchgeführt. Bei dem Vergleich mehrerer Gruppen wurde im Falle einer „einstimmigen“ Normalverteilung und Homogenität der Varianzen (nach Levene) mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (Englisch für analysis of variance, im Folgenden „ANOVA“) und dem post -hoc Test nach Bonferroni gearbeitet. Falls keine Varianzhomogenität vorlag, wurde mit der ANOVA nach Welch gearbeitet.

Nichtnormalverteilte Gruppen wurden mittels nichtparametrischer Tests untersucht. Mit dem Man-Whitney-U-Test wurde bei dem Vergleich von zwei Gruppen, mit dem Kruskal-Wallis-Test – modifiziert nach Bonferroni - bei dem zeitgleichen Vergleich von mindestens drei Gruppen gearbeitet. Bei allen Tests wurden P-Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant erachtet.

2.1.6.3 Erläuterung zu den ausgewerteten Ergebnissen

Sind bei der Auswertung der Versuche alle Versuche normalverteilt, so wurde daraufhin mittels SPSS ein Fehlerbalkendiagramm zur Veranschaulichung erstellt. Dabei befinden sich 95 % der Daten zwischen dem oberen und dem unteren Ende der Balken. Waren die zu vergleichende Versuche nicht normalverteilt, so wurde mit einem Boxplot-Diagramm gearbeitet. Abbildung 13 dient als Beispiel, wie diese Art Diagramm zu interpretieren ist. Der Strich inmitten der Box entspricht dem Median, welcher die Daten in zwei Teile trennt, von welchen jeweils 50 % darüber oder darunter liegen. Die Box als Gesamtes spiegelt 50 % der Daten wider und deren Länge entspricht einem Interquartilabstand.

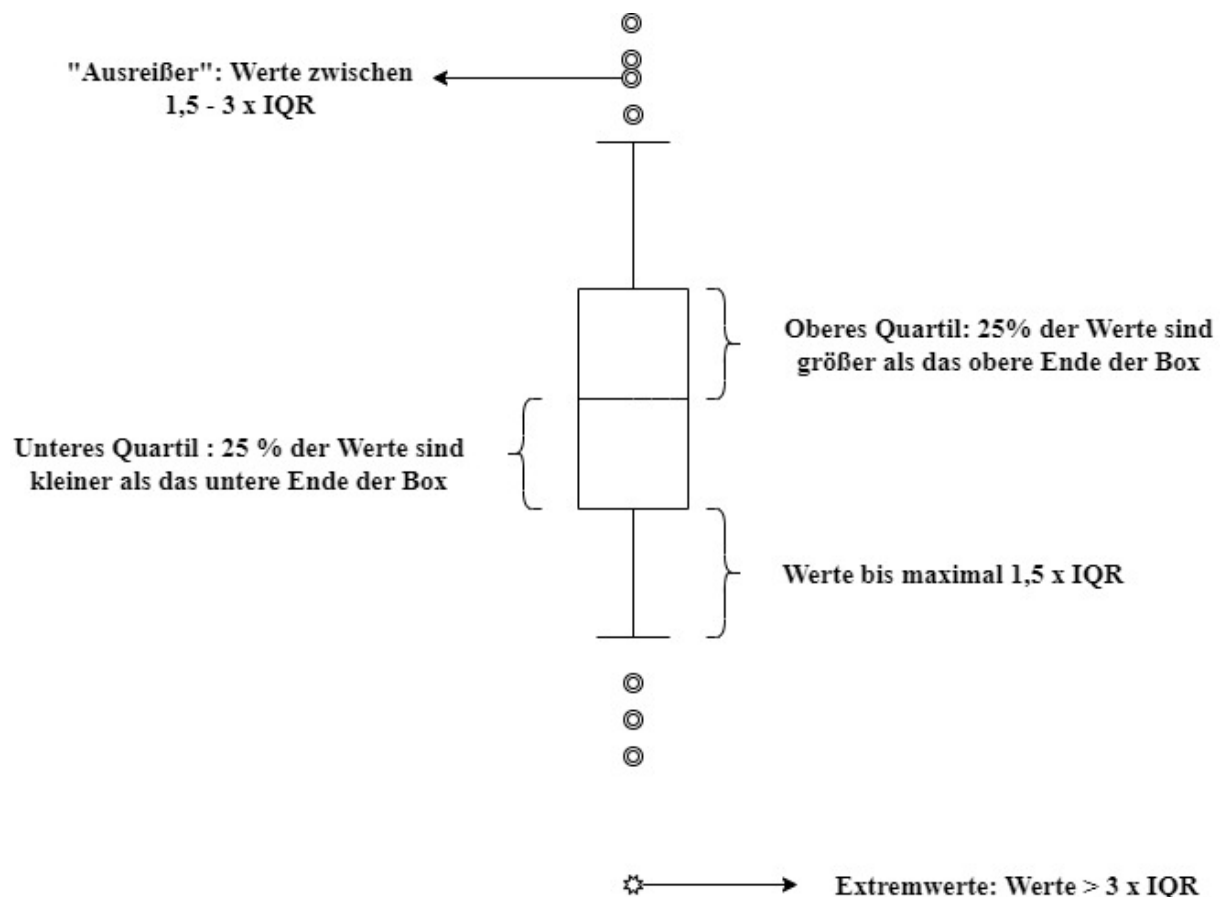


Abbildung 13: Beispielhafte Darstellung eines Boxplots.

3. Ergebnisse der Versuche am Mikroskop mittels Live Cell Imaging

Die Daten der einzelnen Versuche wurden in Excel gesammelt und anschließend in SPSS Statistics ausgewertet.

3.1 Migrationsverhalten humaner neutrophiler Granulozyten mittels Live Cell Imaging

Die untersuchten Migrationsparameter und die Anzahl der ausgewerteten Versuche sind in Abbildung 14 zu sehen.

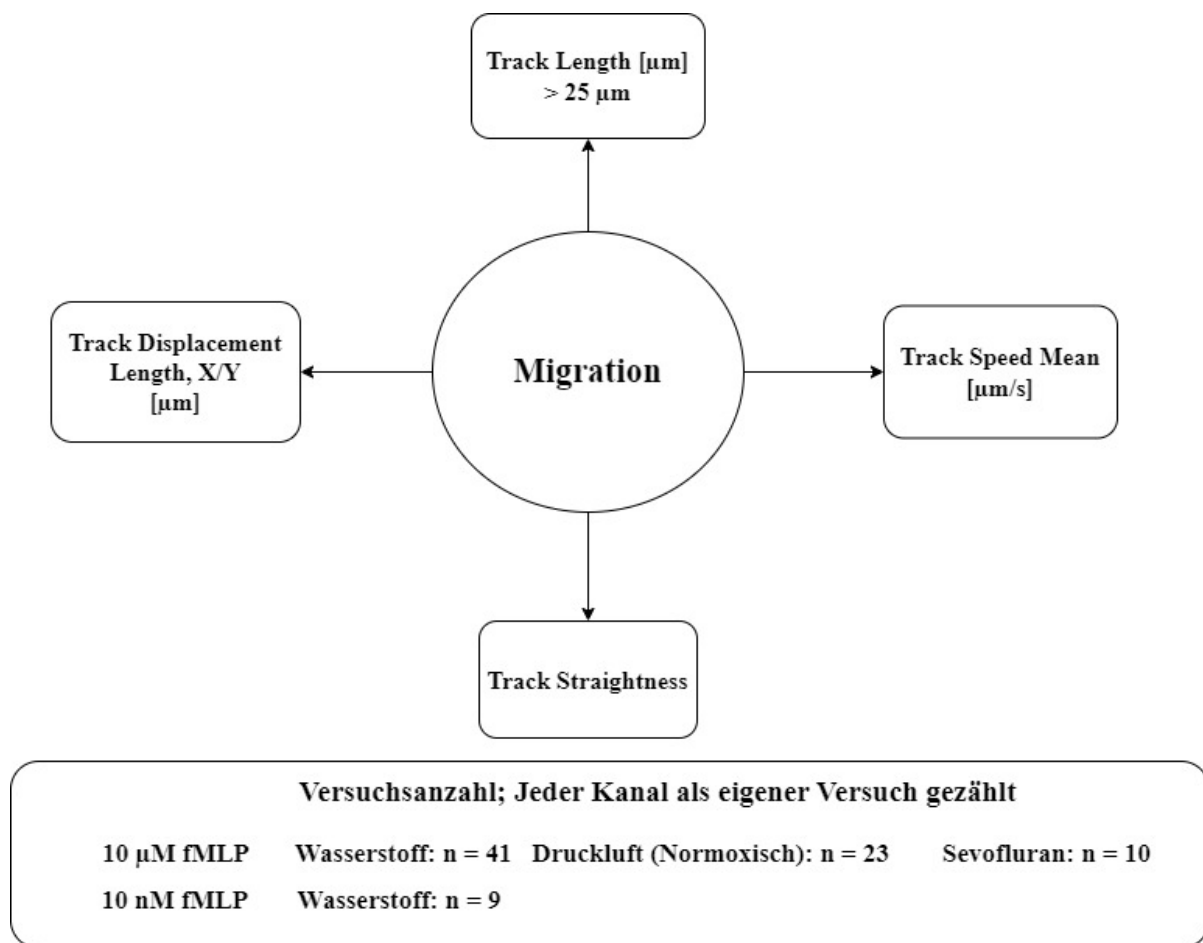


Abbildung 14: Untersuchte Migrationsparameter

Tabelle 5 zeigt die Anzahl der Tracks und die jeweiligen Mediane der Track Lengths, welche in den ersten 30 Minuten ausgewertet wurden.

Gasart	Tracks	Mediane Track Length [μm] (25. Perzentile; 75. Perzentile)
2 % Wasserstoff (mit 10 nM fMLP)	1523	181 (108; 259)
2 % Wasserstoff (mit 10 μM fMLP)	4251	125 (84; 169)
normoxischer Kontrollversuch (mit 10 μM fMLP)	3259	117 (72; 166)
1 % Sevofluran (mit 10 μM fMLP)	273	144 (75; 195)

Tabelle 5: Mediane Track Length in den ersten 30 Minuten

3.1.1 Gesamte zurückgelegte Strecke der PMNs

Verglichen wurden die medianen Track Lengths der ersten halben Stunde mit einer fMLP - Konzentration von 10 μM . Hierbei gab es zwischen den mit H_2 begasten Zellen und den Versuchen unter normoxischen Bedingungen einen statistisch signifikanten Unterschied ($p \leq 0,001$). Ebenso unterschieden sich die medianen Track Lengths unter dem Einfluss von Sevofluran statistisch signifikant von den Track Lengths unter normoxischen Bedingungen ($p \leq 0,001$). Lediglich die medianen Track Lengths der mit H_2 begasten Zellen unterschieden sich nicht statistisch signifikant von den medianen Track Lengths der mit Sevofluran begasten Zellen.

3.1.2 Bewegung der PMNs in X - Richtung

Die Mediane Track Displacement in X - Richtung lag in der ersten halben Stunde bei den mit H₂ begasten Zellen bei – 3,9 µm, bei den normoxischen Versuchen bei – 0,7 µm und bei den mit Sevofluran begasten Zellen bei -2 µm, siehe dazu auch Abbildung 15. Die Mediane Track Displacement in X - Richtung der mit H₂ begasten Zellen unterschied sich statistisch signifikant sowohl von den Versuchen unter normoxischen Bedingungen ($p \leq 0,001$) als auch von der Medianen Track Displacement in X - Richtung der mit Sevofluran begasten Zellen ($p \leq 0,014$). Hinsichtlich der Track Displacement in X - Richtung hab es in der ersten halben Stunde zwischen den normoxischen Kontrollversuchen und den mit Sevofluran begasten Zellen keinen statistisch signifikanten Unterschied.

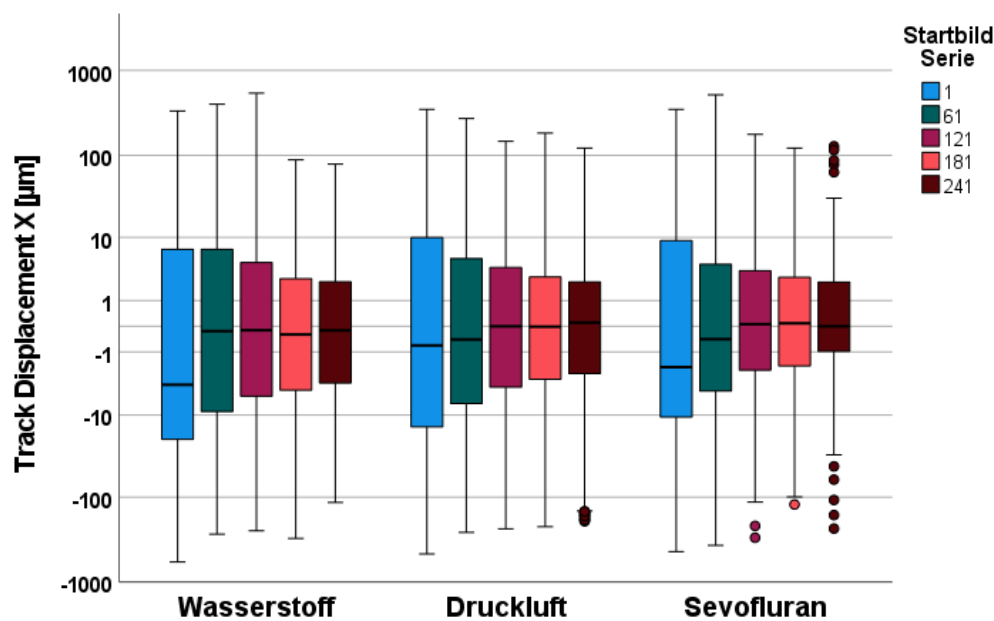


Abbildung 15: Track Displacement in X - Richtung der Versuche mit 10 µM fMLP

3.1.3 Bewegung der PMNs in Y - Richtung

Die Mediane Track Displacement in Y - Richtung der ersten halben Stunde lag bei den Versuchen der mit Wasserstoff begasten Zellen bei $-0,03 \mu\text{m}$, bei den normoxischen Versuchen bei $-0,7 \mu\text{m}$ und bei den mit Sevofluran begasten Zellen bei $-0,4 \mu\text{m}$.

Die mediane Track Displacement in Y - Richtung der ersten halben Stunde der mit molekularem Wasserstoff begasten Zellen unterschied sich weder von der medianen Track Displacement in Y - Richtung der normoxischen Kontrollversuche noch von der medianen Track Displacement in Y - Richtung der mit Sevofluran begasten Zellen statistisch signifikant. Ebenfalls unterschied sich die mediane Track Displacement in Y - Richtung der normoxischen Kontrollversuche in der ersten halben Stunde nicht statistisch signifikant von der medianen Track Displacement in Y - Richtung der mit Sevofluran begasten Zellen.

3.1.4 Migrationsgeschwindigkeit der PMNs

Die mediane Track Speed der ersten 30 Minuten lag bei den mit molekularem Wasserstoff begasten Zellen bei $0,088 \mu\text{m/s}$ ($158 \mu\text{m}/30$ Minuten), die der Kontrollversuche unter normoxischen Bedingungen bei $0,080 \mu\text{m/s}$ ($144 \mu\text{m}/30$ Minuten) und die mediane Track Speed der mit Sevofluran begasten Zellen bei $0,093 \mu\text{m/s}$ ($167 \mu\text{m}/30$ Minuten).

In der ersten halben Stunde unterschied sich die mediane Track Speed Mean der mit H_2 begasten Zellen statistisch signifikant von der medianen Track Speed Mean der normoxischen Kontrollversuche ($p \leq 0,001$). Es gab jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich der medianen Track Speed Mean zwischen den mit H_2 begasten Zellen und den mit Sevofluran begasten Zellen.

Die Track Speed Mean der normoxischen Kontrollversuche unterschieden sich in der ersten halben Stunde statistisch signifikant von der Track Speed Mean der mit Sevofluran begasten Zellen ($p \leq 0,006$).

3.1.5 Geradlinigkeit der Migration der PMNs

Die mediane Track Straightness der ersten 30 Minuten lag bei den mit molekularem Wasserstoff begasten Zellen bei 0,22, die der Kontrollversuche unter normoxischen Bedingungen bei 0,215 und bei den mit Sevofluran begasten Zellen bei 0,18.

In der ersten halben Stunde unterschied sich die mediane Track Straightness der mit H₂ begasten Zellen statistisch signifikant von der medianen Track Straightness der mit Sevofluran begasten Zellen ($p \leq 0,013$). Es gab jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich der medianen Track Straightness zwischen den mit H₂ begasten Zellen und den normoxischen Kontrollversuchen. Die mediane Track Straightness der normoxischen Kontrollversuche unterschied sich in der ersten halben Stunde statistisch signifikant von der medianen Track Straightness der mit Sevofluran begasten Zellen ($p \leq 0,004$). Einen Überblick bietet Abbildung 16.

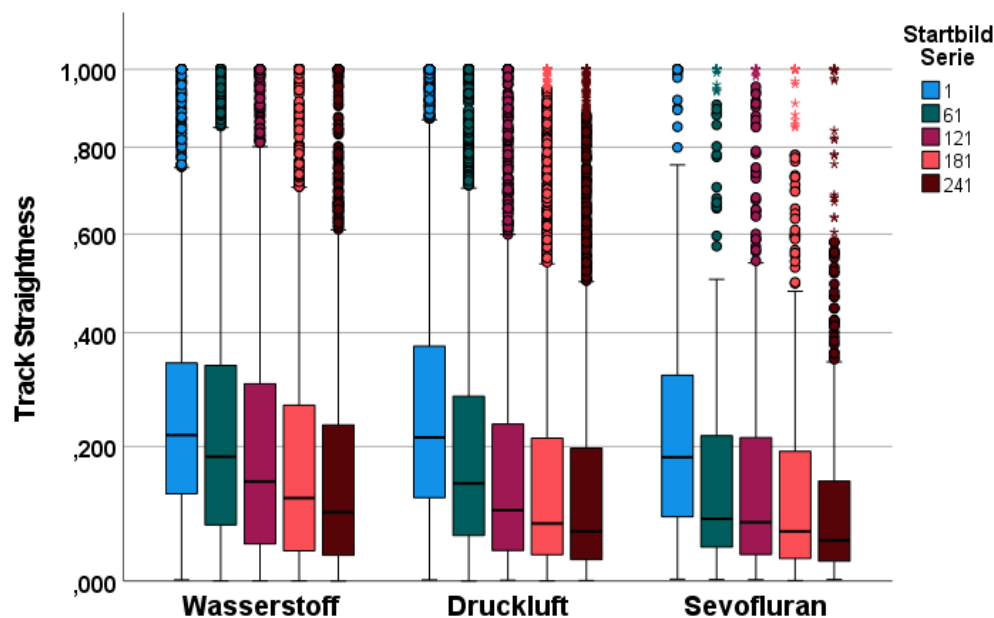


Abbildung 16: Track Straightness der Versuche mit 10 μ M fMLP

Bei der Auswertung der Migrationsparameter unterschieden sich die jeweiligen Startbildserien bis auf wenige Ausnahmen statistisch signifikant voneinander. Nur in wenigen Fällen, etwa bei den normoxischen Kontrollversuchen im Vergleich der Startbildserien 1 und 61 in Bezug auf die Track Speed oder bei der Track Displacement Length der Startbildserien 1 und 61 der mit Sevofluran begasten Zellen gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied.

3.1.6 Migration der Wasserstoffversuche mit 10 nM fMLP im Vergleich zu 10 μ M fMLP

Die Mediane der untersuchten Migrationsparameter der mit H₂ begasten Zellen mit 10 nM fMLP wurden mit den Medianen der mit H₂ begasten Zellen mit 10 μ M fMLP verglichen. Einen Überblick bietet Tabelle 6.

Startbild Serie 1	Median (25. Perzentile; 75. Perzentile)	
	10 [nM] fMLP	10 [μM] fMLP
Track Displacement X [μm]	28,5 (0,5; 75,2)	- 3,85 (-20,2; 7)
Track Displacement Length [μm]	58,7 (28,6; 103)	24,6 (12,2; 42)
Track Length [μm]	181 (108; 259)	125 (84; 169)
Track Speed Mean [μm/s]	0,15 (0,09; 0,21)	0,08 (0,06; 0,12)
Track Straightness	0,36 (0,22; 0,51)	0,22 (0,13; 0,34)

Tabelle 6: Mediane der Wasserstoffversuche im Vergleich

Eine grafische Gegenüberstellung der Track Straightness ist Abbildung 17 zu entnehmen.

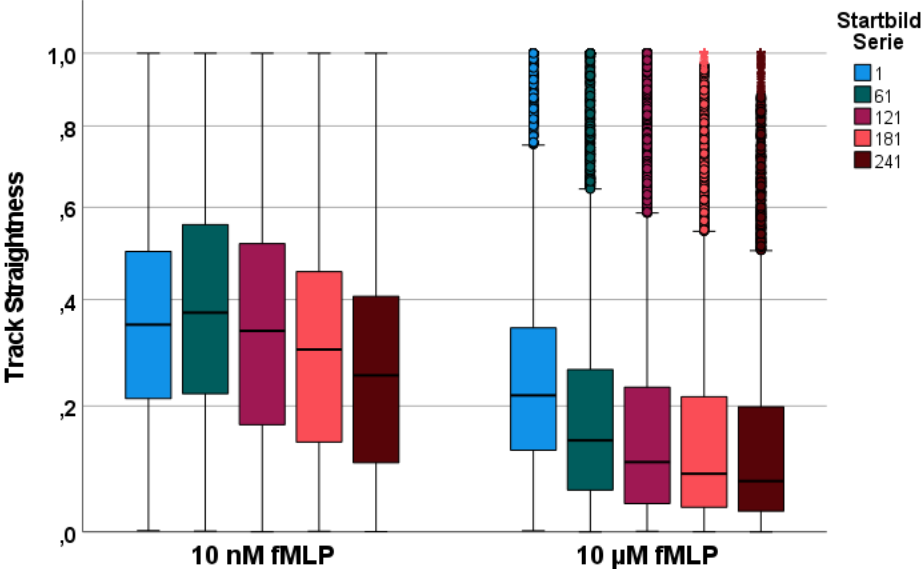


Abbildung 1: Vergleich der Migrationsparameter der mit H₂ begasten PMNs und unterschiedlicher fMLP-Konzentration

3.2 Defensivreaktionen humaner neutrophiler Granulozyten

Bei der Auswertung der ablaufenden Defensivreaktionen wurde jeder untersuchte Kanal als eigener Versuch gezählt.

3.2.1 Reaktionen mit der Bildung freier Radikale: ROS - Produktion

Die Fallzahlen der ausgewerteten Versuche der ROS – Produktion sind zu Abbildung 18 entnehmen.

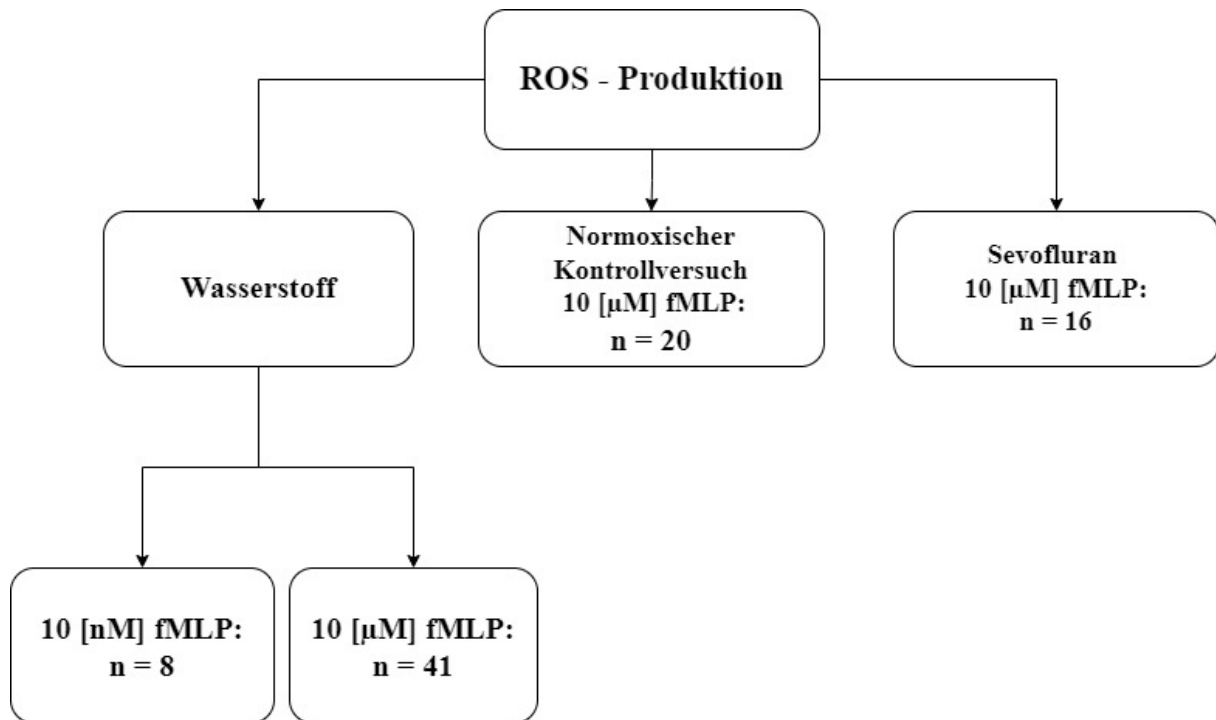


Abbildung 18: Fallzahlen der ausgewerteten Versuche bezüglich der ROS-Produktion

Der Median der T_{\max} ROS war bei den mit Wasserstoff begasten Zellen nach 180 Minuten und bei den normoxischen Kontrollversuchen nach 166 Minuten erreicht. Der Median der T_{\max} ROS lag bei den mit Sevofluran begasten Zellen bei 116 Minuten.

Die medianen T_{\max} ROS – Werte der mit molekularem Wasserstoff begasten Zellen unterschieden sich statistisch nicht signifikant von den normoxischen Kontrollversuchen. Im Vergleich dazu unterschieden sich die Mediane der T_{\max} ROS – Werte der mit Sevofluran begasten Zellen statistisch signifikant sowohl von den T_{\max} ROS – Werten der mit molekularem Wasserstoff begasten Zellen ($p \leq 0,003$), als auch von den T_{\max} ROS – Werten der normoxischen Kontrollversuche ($p \leq 0,008$). Einen Überblick der Versuche mit $10 \mu\text{M}$ fMLP in Bezug auf die T_{\max} ROS - Werte bietet Abbildung 19.

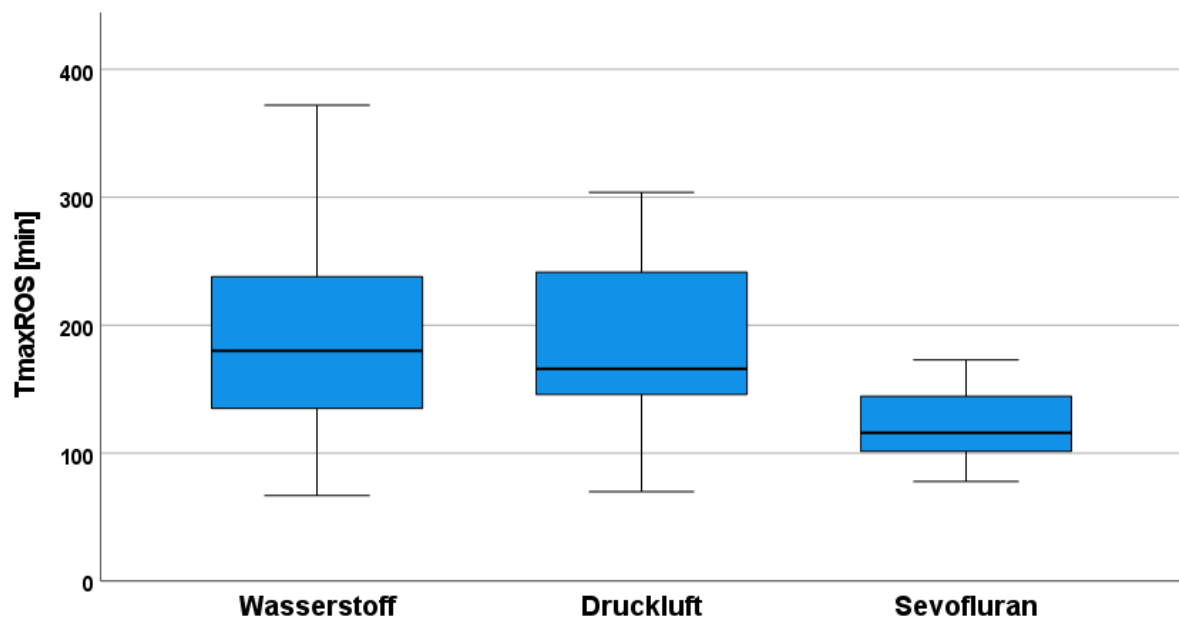


Abbildung 19: ROS-Produktion: Gase im Vergleich mit $10 \mu\text{M}$ fMLP

3.2.2 Reaktionen des Enzyms Myeloperoxidase

Die Fallzahlen der ausgewerteten Versuche in Bezug auf das Enzym Myeloperoxidase sind Abbildung 20 zu entnehmen.

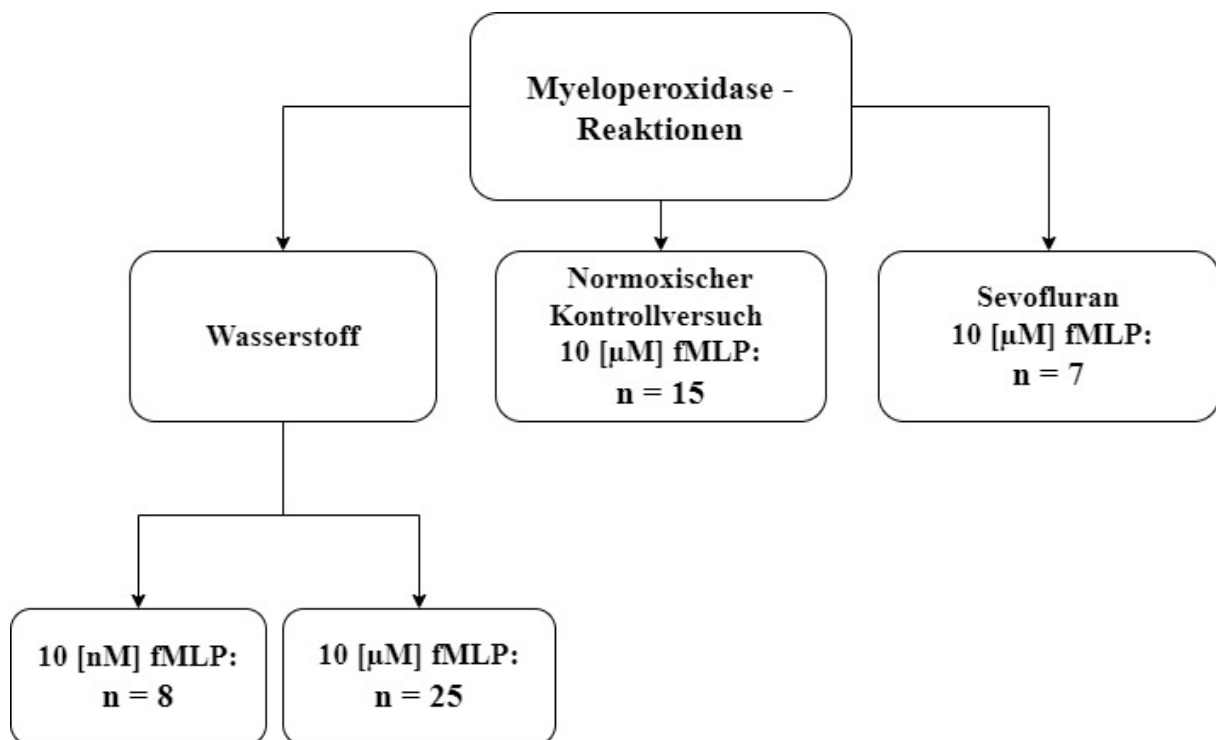


Abbildung 20: Fallzahlen der ausgewerteten Versuche bezüglich der Myeloperoxidase-Aktivität

Die $ET_{50}MPO$ der mit H_2 begasten Zellen unterschied sich statistisch signifikant sowohl von der $ET_{50}MPO$ der normoxischen Kontrollversuchen ($p \leq 0,031$), als auch von der $ET_{50}MPO$ der mit Sevofluran begasten Zellen ($p \leq 0,006$). Die $ET_{50}MPO$ der mit Sevofluran begasten Zellen unterschied sich nicht statistisch signifikant von der $ET_{50}MPO$ der normoxischen Kontrollversuche. Der Median der $ET_{50}MPO$ lag bei den mit H_2 begasten Zellen bei 392 Minuten, bei den normoxischen Kontrollversuchen bei 352 Minuten und bei den mit Sevofluran

begasten Zellen bei 242 Minuten. Einen Überblick der Versuche mit 10 µM fMLP in Bezug auf die ET₅₀MPO zeigt Abbildung 21.

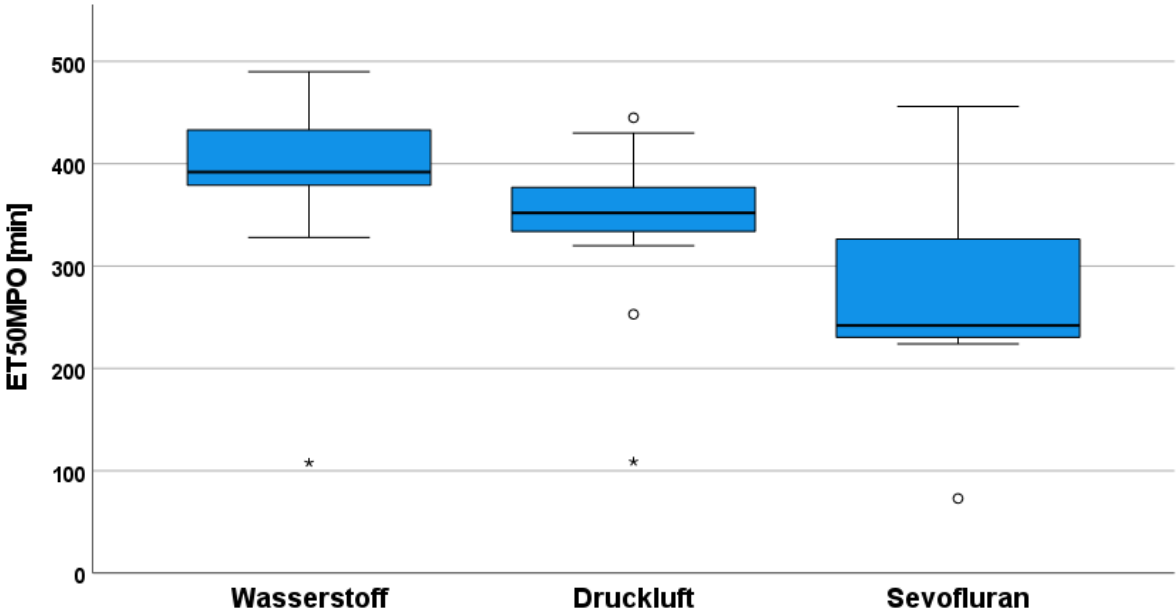


Abbildung 21: ET₅₀MPO im Gasvergleich mit 10 µM fMLP

3.2.3 Reaktionen mit der Ausbildung von NETs

Die Fallzahlen der ausgewerteten NETose – Versuche ist Abbildung 22 zu entnehmen.

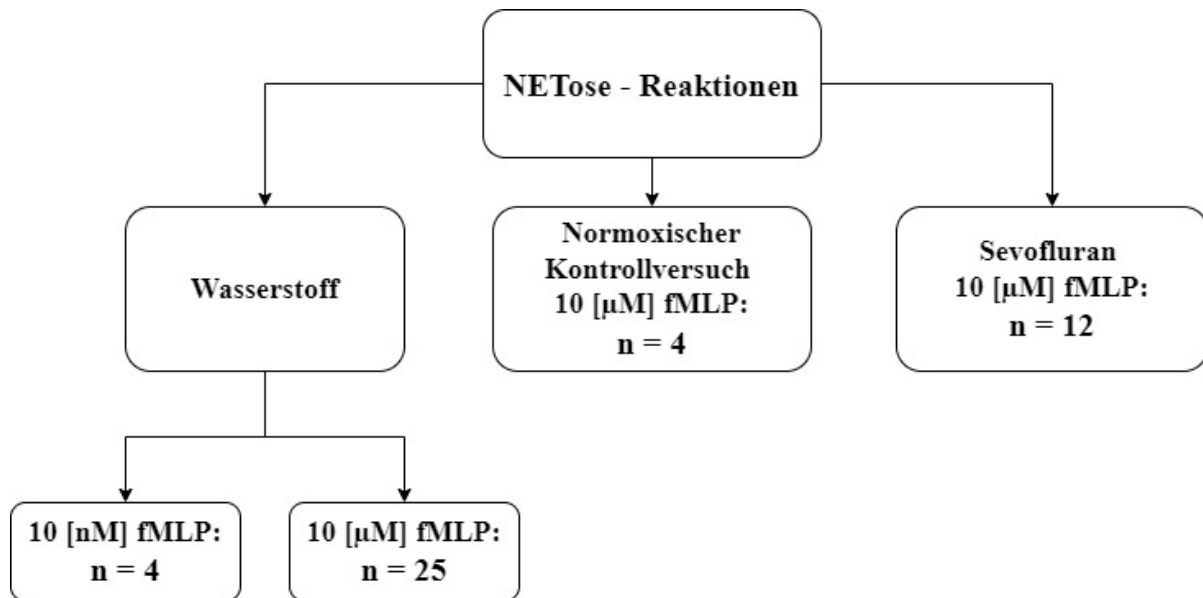


Abbildung 22: Fallzahlen der ausgewerteten Versuche bezüglich der NETose.

Die ET_{50} NETosis wurde im Median bei den mit molekularem Wasserstoff begasten Zellen nach 405 Minuten, bei den mit Sevofluran begasten Zellen nach 273 Minuten und bei den normoxischen Kontrollversuchen nach 232 Minuten erreicht. Die ET_{50} NETosis der mit molekularem Wasserstoff begasten Zellen unterschied sich statistisch signifikant von der ET_{50} NETosis der mit Sevofluran begasten Zellen ($p \leq 0,004$). Die ET_{50} NETosis der Kontrollversuche unterschied sich jedoch nicht statistisch signifikant von sowohl der ET_{50} NETosis der mit H_2 begasten Zellen als auch der ET_{50} NETosis der mit Sevofluran begasten Zellen. Einen Überblick bietet Abbildung 23.

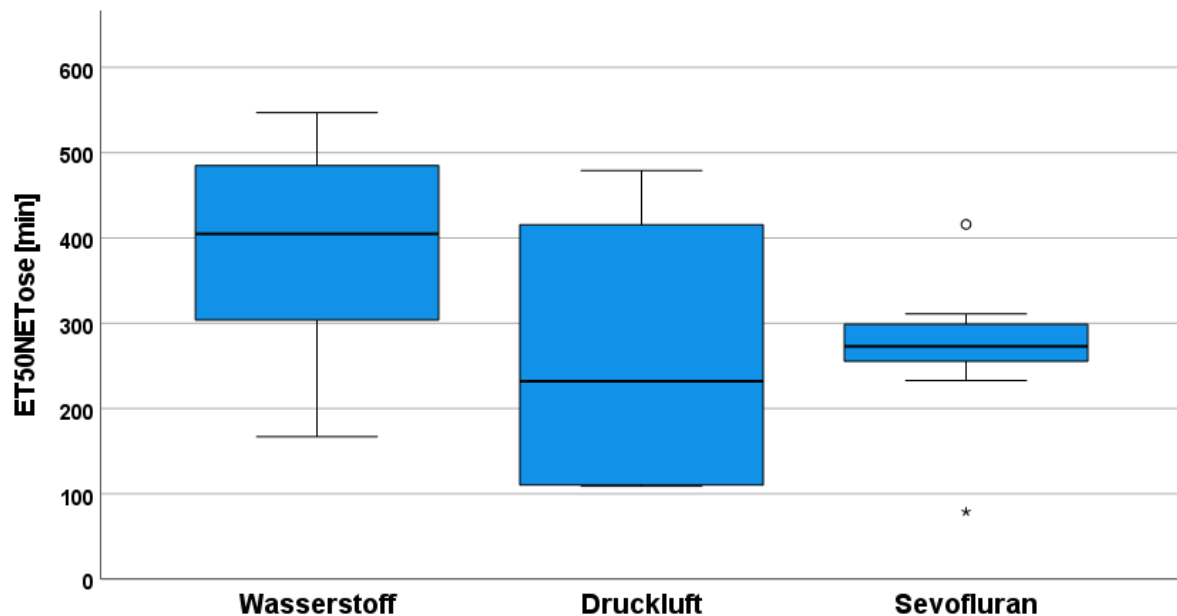


Abbildung 23: $ET_{50}NETose$ im Vergleich mit $10 \mu M$ fMLP

3.2.4 Reaktionsversuche mit molekularem Wasserstoff und dem Vergleich von 10 nM fMLP und $10 \mu M$ fMLP

Es folgt nun ein Überblick der mit H_2 begasten Zellen mit verschiedenen fMLP - Konzentrationen.

Einen statistisch signifikanten Unterschied gab es sowohl hinsichtlich der $T_{max}ROS$ - Zeit ($p \leq 0,001$) als auch bei der Zeit bis zum Erreichen der $ET_{50}MPO$ ($p \leq 0,046$, Man - U: $p \leq 0,007$). Lediglich im Vergleich der Zeiten bis zum Erreichen der $ET_{50}NETose$ gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den mit H_2 begasten Zellen mit unterschiedlicher fMLP - Konzentration. Der Vergleich der Mediane ist Abbildung 24 zu entnehmen.

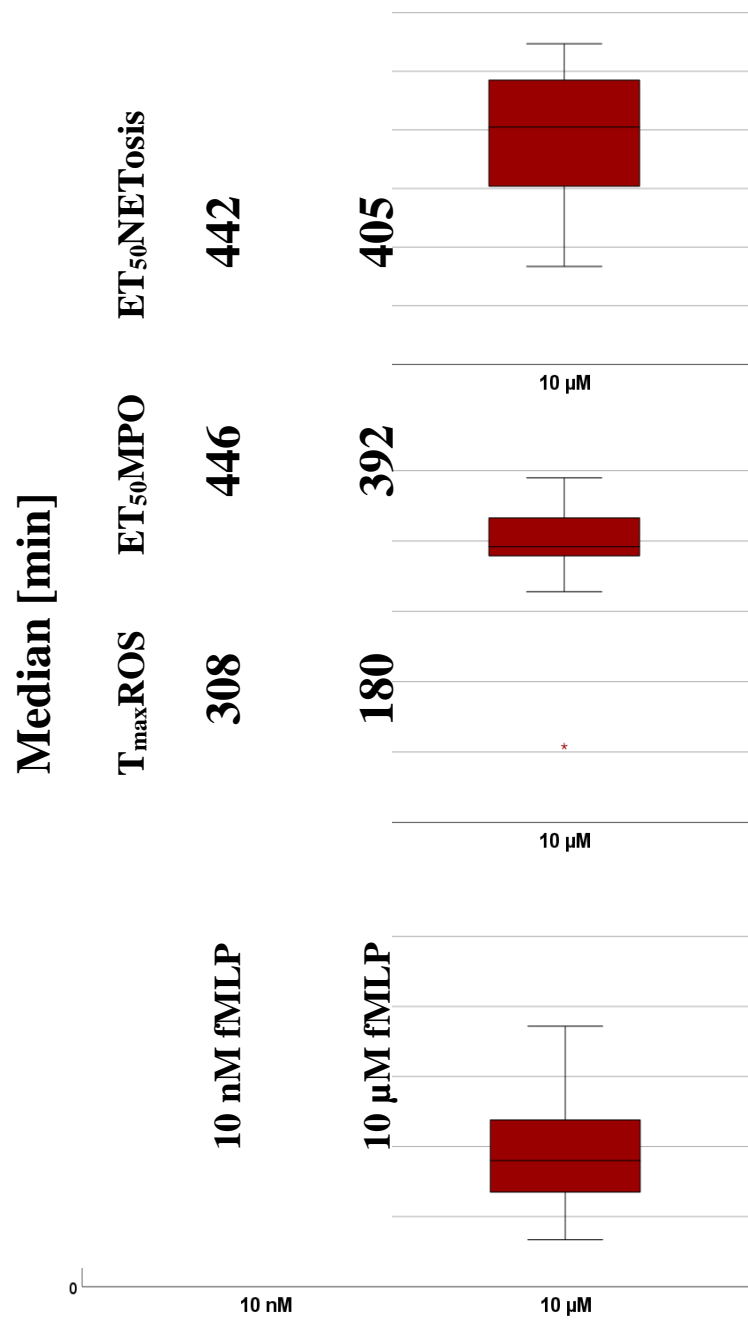


Abbildung 2: Mediane der T_{maxROS} , ET_{50MPO} und $ET_{50NETosis}$ mit H_2 begasten Zellen. Der X-Achse ist die jeweilige fMLP - Konzentration zu entnehmen.

3.3 Versuche mit dem Durchflusszytometer

Die Fallzahlen der ausgewerteten Versuche sind Abbildung 25 zu entnehmen. Jeweils die Hälfte der Versuche wurden unter normoxischen Bedingungen als Kontrollversuche durchgeführt, die andere Hälfte unter dem Einfluss von molekularem Wasserstoff. Bei diesen Versuchen wurde stets eine fMLP – Konzentration von 100 nM verwendet.

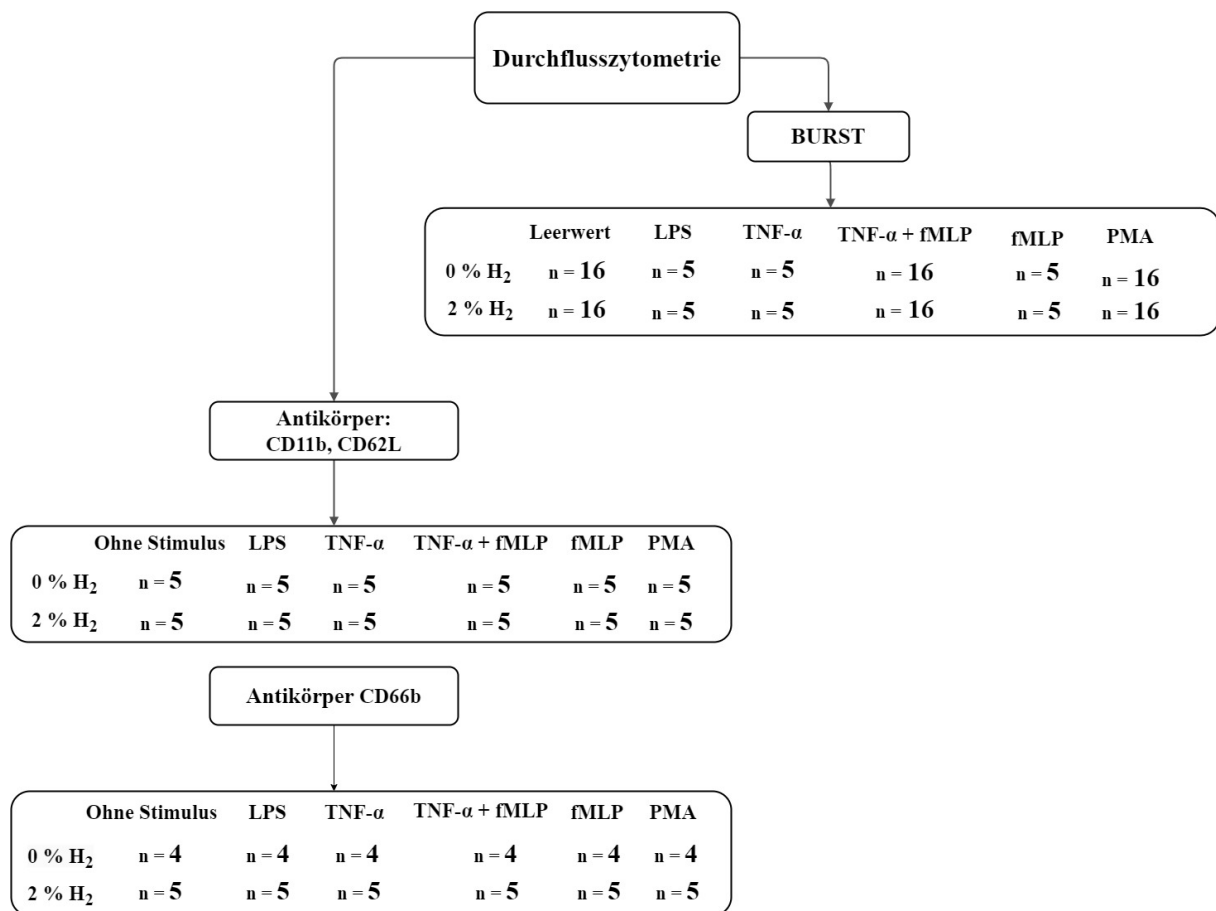


Abbildung 25: Fallzahlen Durchflusszytometrie

3.3.1 BURST – Versuche: Mediane Fluoreszenzintensität

Die MFI der mit fMLP + TNF- α versetzten Proben unter normoxischen Bedingungen unterschieden sich nicht statistisch signifikant von den MFI der mit fMLP + TNF- α versetzten Proben unter H₂ Begasung. Dagegen gab es einen statistisch signifikanten Unterschied der MFI im Vergleich der mit H₂ begasten Zellen und den normoxischen Versuchen sowohl bei, den mit LPS versetzten Proben ($p \leq 0,024$), den mit TNF- α versetzten Proben ($p \leq 0,014$), den mit fMLP versetzten Proben ($p \leq 0,017$), den mit PMA versetzten Proben ($p \leq 0,001$) als auch den Proben ohne zusätzlichen Stimulus ($p \leq 0,001$). Einen Überblick bietet Abbildung 26.

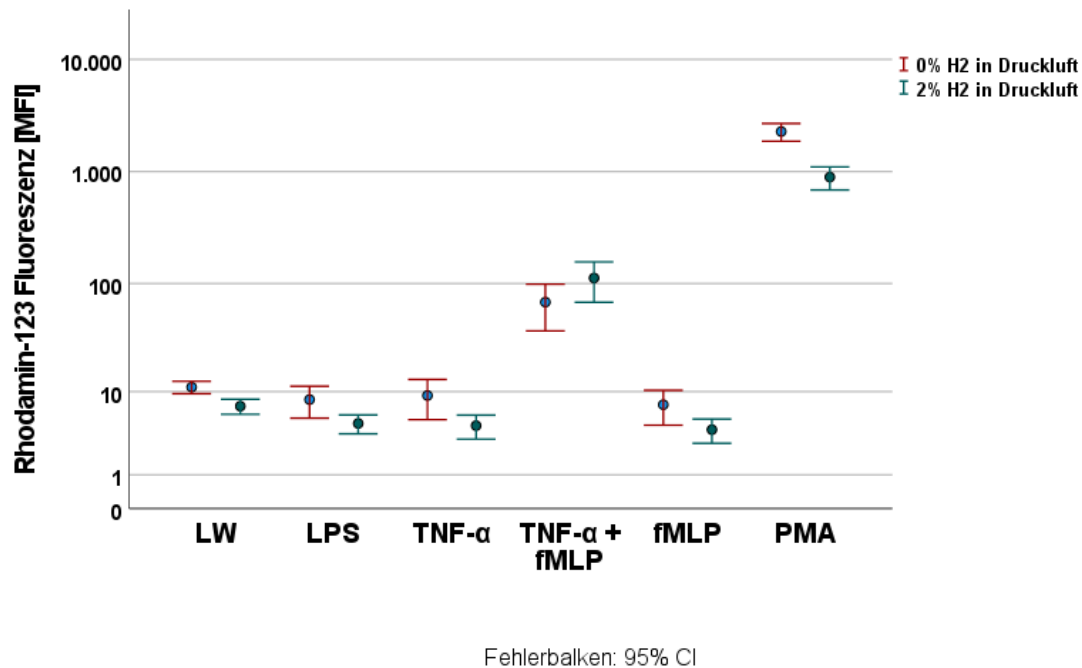


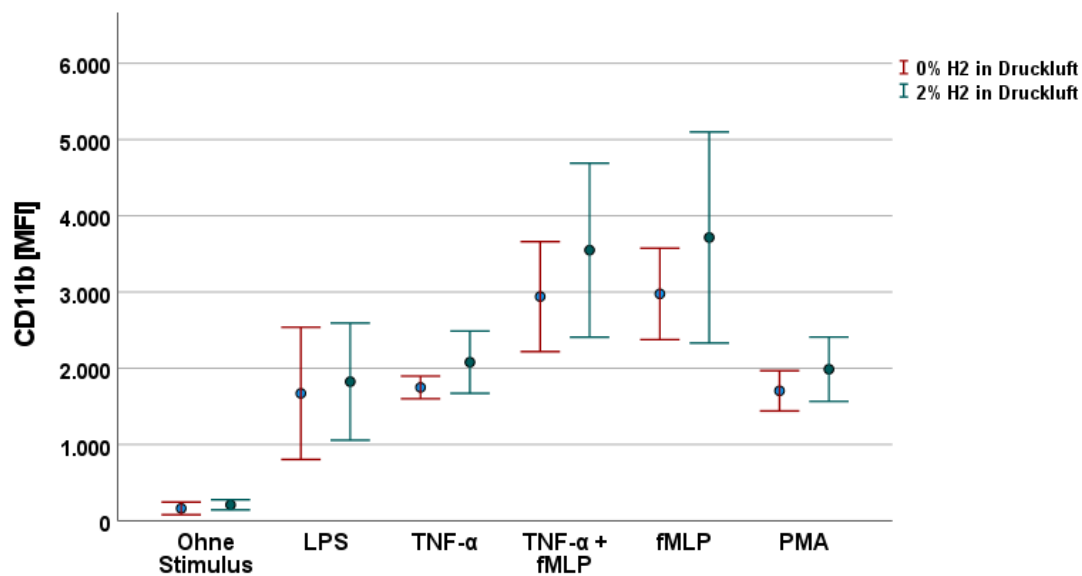
Abbildung 26: Mediane Fluoreszenzintensitäten der BURST Versuche

3.3.2 Antikörperexprimierung an dem Durchflusszytometer

Es folgen die ausgewerteten Versuche in Bezug auf die Expressierung der Antikörper CD11b, CD62L und CD66b. Diese wurden entweder unter normoxischen Bedingungen oder unter Begasung mit H₂ durchgeführt.

3.3.2.1 Einfluss von molekularem Wasserstoff auf CD11b

Die MFI der jeweiligen Gruppen (Ohne Stimulus, LPS, TNF- α , fMLP, TNF- α + fMLP und PMA) unter normoxischen Bedingungen unterschieden sich nicht statistisch signifikant von den jeweiligen MFI unter dem Einfluss von Wasserstoff, siehe auch Abbildung 27.



Fehlerbalken: 95% CI

Abbildung 27: Beeinflussung verschiedener Stimulantien und molekularen Wasserstoffs auf die Expressierung von CD11b

3.3.2.2 Einfluss von molekularem Wasserstoff CD62L

Die MFI der jeweiligen Gruppen (Ohne Stimulus, LPS, TNF- α , fMLP, TNF- α + fMLP und PMA) unter normoxischen Bedingungen unterschieden sich nicht statistisch signifikant von den jeweiligen MFI unter dem Einfluss von Wasserstoff, siehe auch Abbildung 28.

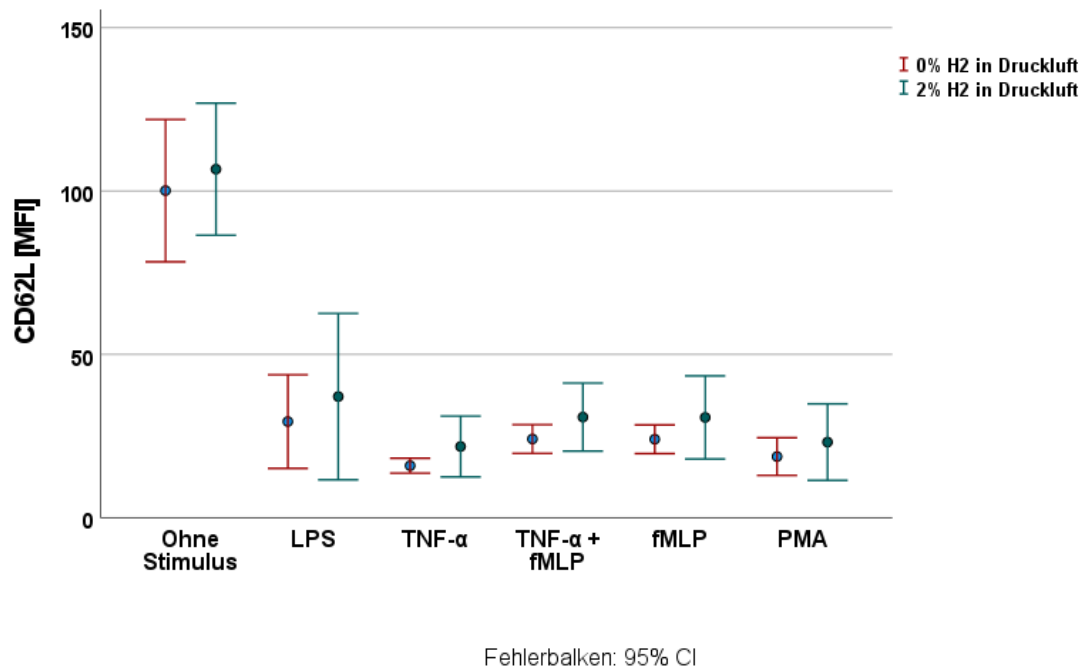


Abbildung 28: Beeinflussung verschiedener Stimulantien und molekularen Wasserstoffs auf die Exprimierung von CD62L

3.3.2.3 Einfluss von molekularem Wasserstoff CD66b

Die MFI der jeweiligen Gruppen (Ohne Stimulus, LPS, TNF- α , fMLP, TNF- α + fMLP und PMA) unter normoxischen Bedingungen unterschieden sich nicht statistisch signifikant von den jeweiligen MFI unter dem Einfluss von Wasserstoff. Einen Überblick bietet Abbildung 29.

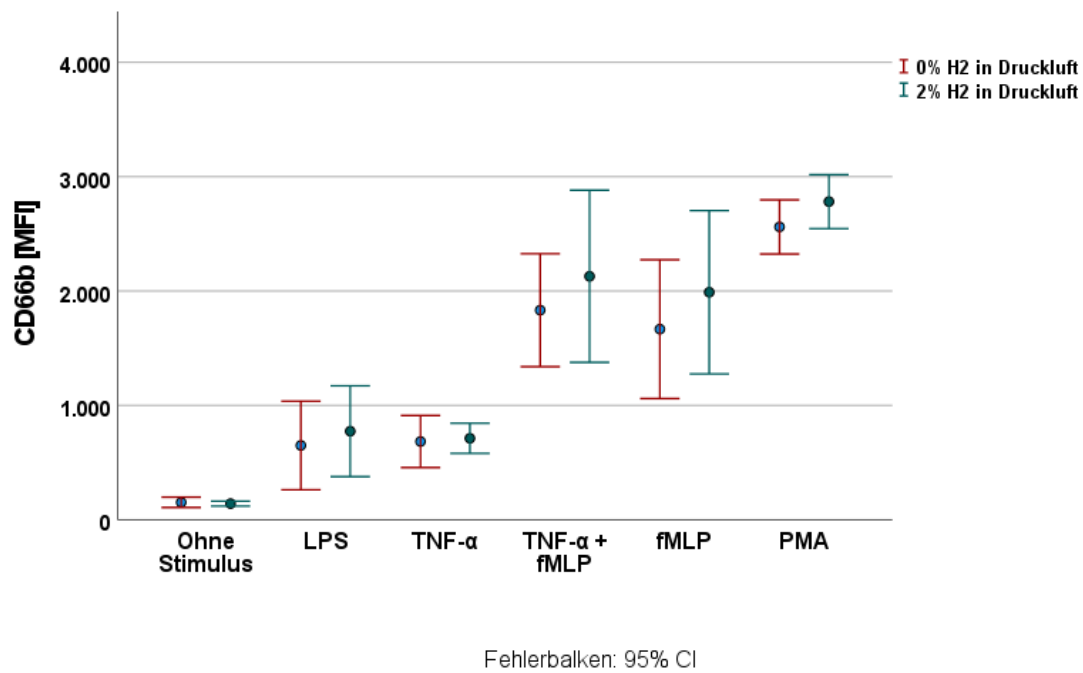


Abbildung 29: Beeinflussung verschiedener Stimulantien und molekularen Wasserstoffs auf die Exprimierung von CD66b

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt eine Begasung neutrophiler Granulozyten mit molekularem Wasserstoff und Sevofluran auf deren Reaktions- und Migrationsverhalten hat. Das Reaktionsverhalten humaner neutrophiler Granulozyten wird wesentlich von molekularem Wasserstoff beeinflusst. So trat die Maximalausprägung der DHR-, MPO- und DAPI- Fluoreszenz bei Begasung der Zellen mit H₂ später auf als bei den Kontrollversuchen oder mit der Begasung der Zellen durch Sevofluran.

4.1 Diskussion der Methodik

Der gewählte Versuchsaufbau ähnelt dem anderer Studien (63,65,66,68,69).

Das Gel im Kanal gleicht in seiner Konsistenz der extrazellulären Matrix, wodurch versucht wurde, das Reaktions - und Migrationsverhalten der Granulozyten annähernd *in vivo* zu simulieren. Es ist jedoch zu beachten, dass *in vitro*-Bedingungen im Labor nie vollständig mit physiologischen Bedingungen übereinstimmen. Das osmotisch wirksame chemotaktische Peptid fMLP diffundiert in das Gel hinein, wodurch die PMNs stimuliert werden. Da die einzelnen Ibidi-Slides nicht separat begast werden konnten, wurden die drei Kanäle in jedem Versuch entweder als Kontrollversuch, als Versuch mit Sevofluran-Begasung oder mit Wasserstoff-Begasung durchgeführt. Das Verhalten humaner Granulozyten variiert sowohl zwischen verschiedenen Personen als auch bei der gleichen Person an verschiedenen Tagen. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Beim Befüllen der Ibidi – Slides konnte trotz größter Sorgfalt nicht immer eine zufriedenstellende Befüllung gewährleistet werden. So konnten sich leicht Blasen in dem zu untersuchenden Kanal bilden, welche die Auswertung erschweren oder gar unmöglich machen konnte. Ein zu hoher Druck beim Pipettieren konnte dazu führen, dass Zellen aus dem Gel in das Reservoir geschwemmt wurden. Dadurch war es nicht möglich, in jedem Kanal eine annähernd gleiche Zelldichte zu gewährleisten. Zudem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass beim Abheben des Granulozyterings versehentlich auch andere Zellen wie etwa

Monozyten oder Erythrozyten abgehoben wurden. Zudem konnte es passieren, dass ein Fluoreszenzfarbstoff zu schwach reagierte, um ausgewertet werden zu können. Aus den genannten Gründen konnte nicht jeder Versuch stets zur Auswertung aller Reaktionen genutzt werden, weshalb sich gelegentlich die Fallzahl der einzelnen Reaktionen unterschied.

Das Live Cell Imaging ermöglichte die gleichzeitige Untersuchung des Migrationsverhaltens, der ROS-Produktion, der Aktivität des Enzyms Myeloperoxidase sowie der NET-Bildung. Durch die motorisierte Platte an dem Mikroskop konnten zudem drei Kanäle und damit auch drei Versuche gleichzeitig aufgezeichnet werden.

In zahlreichen Studien wurde fMLP als Chemoattraktant verwendet, um Neutrophile Granulozyten etwa zur Migration oder zum oxidativen Burst anzuregen (70–73). Diese Aktivierung der Granulozyten konnte auch in den Versuchen dieser Studie beobachtet werden.

Bisher gibt es nur wenige Studien, die den Effekt von 10 μM fMLP auf die Funktion von Neutrophilen untersuchten (73), und unseres Wissens nach keine, welche den Effekt von 10 μM fMLP auf die ROS Produktion, die Aktivität der MPO sowie die NETose gleichzeitig untersucht. Lediglich bei den letzten vier Versuchsreihen am Mikroskop mit molekularem Wasserstoff wurde eine fMLP - Konzentration von 10 nM und bei den Versuchen mit dem Durchflusszytometer eine fMLP - Konzentration von 100 nM verwendet.

Zahlreiche Studien benutzten in ihren Versuchen fMLP in einer Konzentration von 10 μM oder höher (70,73–78). Zhu et al. verwendeten eine Konzentration von 10 μM fMLP und fanden heraus, dass mit TNF- α und fMLP stimulierte Zellen einen respiratorischen Burst verursachten und die Permeabilität der Gefäße zu erhöhen (76). In einer anderen Studie nutzten Ren et al. verschiedene fMLP – Konzentrationen bis zu 10 μM , wobei die Aktivierungsrate von Neutrophilen Granulozyten mit steigender fMLP – Konzentration ebenfalls anstieg (73). Dies stimmt mit einer anderen Studie von Hidalgo et al. überein, in welcher die fMLP – induzierte ROS – Produktion ebenfalls dosisabhängig stieg (78). Herrmann et al. nutzten in ihrer Studie unter anderem fMLP – Konzentrationen von 100 nM und 10 μM . Bei der alleinigen Anregung durch fMLP wurden oxidative Reaktionen der PMNs erst durch die höhere Dosis von 10 μM initiiert (74). In dieser Studie wie auch in unserer Arbeitsgruppe wurden fMLP - Konzentrationen von 10 nM und 10 μM benutzt (66,68,69,79).

Zusammenfassend zeigte sich, dass eine fMLP - Konzentration von 10 μ M Neutrophile Granulozyten zur Migration, oxidativem Burst sowie zur NETose stimulierte.

4.2 Diskussion des Versuchsaufbaus

Die Durchführung der Versuche mit Sevofluran – Begasung gestaltete sich aufwendiger als die mit molekularem Wasserstoff.

Um die PMNs dauerhaft – inklusive der Inkubation - mit 1 % Sevofluran zu begasen, bedurfte es einen speziellen Inkubator. An diesem befand sich ein Datex – Messgerät, um sicherzustellen, dass stets die erwünschte Konzentration von 1 % Sevofluran und 5 % CO₂ im Inkubator vorhanden war. Aufgrund der örtlichen Gegebenheiten war eine kurze Unterbrechung der Begasung mit Sevofluran kurz vor den Mikroskop Aufzeichnungen unvermeidbar.

Bei den Versuchen mit molekularem Wasserstoff wurden die Zellen wie bei den Kontrollversuchen im Inkubationsschrank inkubiert. Währenddessen wurde bereits 2 % -iger molekularer Wasserstoff durch den Wasserfilter am Mikroskop geleitet, um ihn mit H₂ anzureichern, damit beim Start der Aufnahmen am Mikroskop bereits eine 2 %-ige H₂ Konzentration in der Klimakammer gewährleistet werden konnte. Der Kontakt der Zellen mit molekularem Wasserstoff erfolgte also erst beim Start des Mikroskopierens. Bei vielen Versuchen mit inhalativer Applikation von H₂ wurde eine Konzentration von 2 % H₂ genutzt, weshalb in dieser Studie ebenfalls mit dieser gearbeitet wurde (47,55,58,80).

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Es gab statistisch signifikante Unterschiede bei den untersuchten Migrationsparametern zwischen den verschiedenen Begasten PMNs. Dennoch sollten diese Ergebnisse nicht als relevant angesehen werden, da die hohe Konzentration von 10 μ M fMLP die Aussagekraft der Chemotaxis erheblich reduzierte. Wie bereits in anderen Studien beschrieben, verschlechterte sich die Orientierung der Neutrophilen Granulozyten, sobald eine bestimmte Konzentration an

fMLP überschritten wird (81,82). Wenn ein PMN einen Chemoattraktanten wahrnimmt, verlagern sich Chemorezeptoren in Richtung des Lockstoffs, was zu einer Polarisierung der Zelle führt. Dabei bildet sich ein vorderes Ende mit Pseudopodien und ein hinteres Ende, das sogenannte Uropodium aus. Ist die anfängliche Konzentration eines Lockstoffs zu hoch, wird eine gerichtete Polarisierung der Zelle verhindert, da zu viele Chemorezeptoren über die gesamte Zelloberfläche besetzt sind. (82)

Dies zeigte sich auch in den Ergebnissen unserer Studie. Beispielsweise war die Track Straightness der mit H₂ begasten Zellen und einer fMLP - Konzentration von 10 µM im Median mit 0,22 wesentlich niedriger als bei den mit H₂ begasten Zellen und einer fMLP - Konzentration von 10 nM mit 0,36. Dieses Ergebnis korreliert mit den zuvor genannten Studien, in welchen eine zu hohe Konzentration an einem Lockstoff die Orientierung und gerichtete Migration der PMNs reduziert. Des Weiteren sollte die Track Displacement in X – Richtung positiv sein, sofern die PMNs in Richtung des Lockstoffs wandern. Während die Mediane aller Versuche mit 10 µM fMLP negativ waren, stieg die mediane Track Displacement in X - Richtung bei einer fMLP - Konzentration von 10 nM sprunghaft auf 28,4 µm an, ebenso hat sich die Track Displacement Length im Vergleich der mit molekularem Wasserstoff begasten Zellen mit 10 µM fMLP und 10 nM fMLP mehr als verdoppelt. Die Aussagekraft der mit Sevofluran begasten PMNs ist zusätzlich dadurch reduziert, dass die Anzahl der untersuchten Tracks erheblich niedriger war als bei den normoxischen Kontrollversuchen oder den mit molekularem Wasserstoff begasten PMNs.

Die Migration wäre vermutlich aussagekräftiger geworden, wenn man die PMNs zunächst mit 10 nM fMLP stimuliert und die Konzentration später auf 10 µM erhöht hätte. Zigmond et al. zeigten, dass eine Lageänderung eines Chemoattraktanten bei bereits polarisierten PMN keine Umpolarisierung bewirkt, sondern sich das vordere Ende der Zelle langsam in Richtung des neuen Gradienten dreht (83). Wären also nicht bereits bei Beginn des Versuchs so viele Chemorezeptoren besetzt gewesen, so hätten sich die PMNs polarisieren und daraufhin auch bei einer späteren fMLP - Konzentration von 10 µM fMLP eventuell gerichteter migrieren können.

Die Begasung mit molekularem Wasserstoff hatte einen klaren Einfluss auf das Reaktionsverhalten humaner neutrophiler Granulozyten. Alle drei untersuchten Reaktionen

fanden unter dem Einfluss von H_2 im Median später statt als bei den Kontrollversuchen oder unter dem Einfluss von Sevofluran. Diese Ergebnisse scheinen unsere Hypothese und die Erkenntnisse zahlreicher anderer Studien hinsichtlich der Antioxidativen Eigenschaften von molekularem Wasserstoff zu unterstützen (34,35,37,41,46).

Zhang et al. (84) berichteten, dass H_2 die NADPH – Oxidase teilweise inhibiert, was mit unseren Ergebnissen korreliert: Der Zeitpunkt, an dem sich die maximale Anzahl an PMNs in der ROS-Produktion befanden, wurde unter dem Einfluss von molekularem Wasserstoff verzögert.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass H_2 die Aktivität der MPO reduzieren kann (80,85,86). Xie et al. fanden heraus, dass durch H_2 die Aktivität der MPO bei einer Lungeninfektion gesenkt werden konnte (80). Guo et al. konnten zeigen, dass die MPO-Aktivität bei Brandwunden in Ratten durch H_2 gesenkt wurde (86). Das Ergebnis ihrer Studien scheint auch das Ergebnis dieser Arbeit zu unterstützen, da molekularer Wasserstoff den Zeitpunkt bis zum Erreichen des $ET_{50}MPO$ im Vergleich zu den Kontrollversuchen hinauszögerte.

Shirakawa et al. konnten zeigen, dass H_2 die NETose – Bildung und die Freisetzung der NET– Bestandteile inhibieren/hinauszögern konnte (87). Dies scheint unser Ergebnis zu unterstützen, in dem der $ET_{50}NETose$ – Zeitpunkt durch molekularen Wasserstoff im Vergleich zu den Kontrollversuchen, wenn auch nicht statistisch signifikant, hinausgezögert wurde.

Dieses von uns erhoffte Ergebnis ist jedoch dahingehend interessant, dass molekularer Wasserstoff im Wesentlichen nur mit $\bullet OH$ und $ONOO^-$ reagieren sollte. Ein relevanter Einfluss auf H_2O_2 oder O_2^- wurde jedoch nicht nachgewiesen (35,36). Aufgrund unseres Versuchsaufbaus war es uns nicht möglich, OH^- und $ONOO^-$ in die Versuche mit einzubeziehen. Des Weiteren wäre es nicht zielführend gewesen, da wir uns bei der Auswertung auf die Analyse der Reaktionskaskade der Granulozyten beschränkten. Dies liefert ein wichtiges Indiz dafür, dass molekularer Wasserstoff ohne Vorhandensein von $\bullet OH$ und $ONOO^-$ sehr wohl mit H_2O_2 und O_2^- reagiert, im menschlichen Organismus jedoch bevorzugt $\bullet OH$ und $ONOO^-$ als Reaktionspartner verwendet.

Minguet et al. belegten, dass Sevofluran die Expressierung von MPO verringert. (88,89) Diese Ergebnisse korrelieren mit unseren eigenen, da die $ET_{50}MPO$ bei den mit Sevofluran begasteten Zellen früher erreicht wurde als bei den Kontrollversuchen unter normoxischen Bedingungen.

Das Ergebnis, dass die mediane Fluoreszenzintensität des oxidierten Rhodamins-123 bei H_2 -Begasung unter dem Einfluss von PMA sinkt aber unter dem Einfluss von $TNF-\alpha + fMLP$ steigt, lässt sich womöglich dadurch erklären, dass die neutrophilen Granulozyten an unterschiedlichen Stellen durch PMA beziehungsweise fMLP aktiviert und beeinflusst werden. Die membrangängige PMA aktiviert direkt die Protein Kinase C (im Folgenden „PKC“), bzw. PKC- α , PKC- β sowie PKC- δ (17,27,90). fMLP hingegen wirkt über Rezeptor vermittelte Signalwege mit nachgeschalteter Protein Kinase - Aktivierung, kann den oxidativen Metabolismus jedoch auch unabhängig von der PKC aktivieren (27,68,91). Die fMLP-haltigen Proben wurden zusätzlich mit $TNF-\alpha$ stimuliert, was die ROS-Produktion von PMNs weiter anregt. Diese Unterschiede könnten den Anstieg der Fluoreszenzintensität unter H_2 -Begasung erklären.

4.4 Ausblick

Die Relevanz dieses Forschungsbereichs ist größer denn je. Molekularer Wasserstoff ist als Antioxidans von besonderem Interesse, da er moderate Effekte zeigt, ohne in andere wichtige physiologische Prozesse einzugreifen. Er ist nicht toxisch, leicht zu applizieren und wird per Exhalation eliminiert.

Die globale Covid-19 Pandemie lastet immer wieder die Intensiv-Kapazitäten der Krankenhäuser aus. Dadurch ist auch die Zahl der Patienten mit Lungenschäden die eine Extrakorporale-Membran Oxygenierung (im Folgenden „ECMO“) benötigen, gestiegen. Ein potenzielles Anwendungsbeispiel für eine adjuvante Therapie mit molekularem Wasserstoff wäre die ECMO, bei welcher das Blut - und damit die Granulozyten - unter anderem aufgrund des direkten Kontaktes mit den Schläuchen und dem Scherstress oxidativem Stress ausgesetzt sind (92). Studien zeigten, dass der Oxygenator während der ECMO dazu beiträgt, Leukozyten zu stimulieren (93,94). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die Nutzung einer ECMO die

Bildung von NETs erhöht (95). Das Blut mit den aktivierten Granulozyten wird wieder in den Patienten geleitet, wobei die produzierten freien Radikale und NETs ungerichtet mit körpereigenem Gewebe reagieren können (92,95,96). Beigefügter molekularer Wasserstoff könnte womöglich bei dem Versuch dieses Problem zu beheben eine unterstützende Maßnahme darstellen. Guan et al. zeigten, dass COVID-19-Patienten, welche ein Gemisch aus Sauerstoff und Wasserstoff inhalierten, im Vergleich zur Kontrollgruppe einen milderen Krankheitsverlauf und weniger Dyspnoe aufwiesen (97). Oxidativer Stress, der Lungenschäden begünstigen kann (98), sowie andere Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Ischämie-Reperfusionsschäden, Infektionen, Sepsis und Risikofaktoren des metabolischen Syndroms könnten durch die Zugabe von molekularem Wasserstoff abgemildert und somit das Patientenoutcome verbessert werden (34,35,46,53).

Eine sinnvolle weiterführende Studie wäre, den Effekt von beigefügtem molekularem Wasserstoff an einem ECMO-Modell zu untersuchen.

4.5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation untersucht die Wirkung von molekularem Wasserstoff und Sevofluran auf die Funktionalität humaner neutrophiler Granulozyten. Ziel war es, die Einflüsse beider Substanzen auf zentrale Mechanismen wie Migration, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, Aktivierung des Enzyms Myeloperoxidase sowie die Ausbildung neutrophiler extrazellulärer Fallen zu vergleichen. Diese Arbeit untersucht die Hypothese, ob H₂ eine stärkere hemmende Wirkung auf PMNs zeigt als Sevofluran.

Die Effekte auf die Migration und Funktionalität der PMNs wurden mittels Live-Cell-Imaging analysiert. Die ROS-Produktion, MPO-Aktivität und NETose wurden über fluoreszenzbasierte Marker gemessen und quantitativ ausgewertet. Darüber hinaus wurden mithilfe der Durchflusszytometrie die mediane Fluoreszenzintensität sowie die Expression der Oberflächenmoleküle CD11b, CD62L und CD66b untersucht, die essenziell für die Zelladhäsion und die Immunantwort sind.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Migration sollten aufgrund der verwendeten Lockstoffkonzentration als nicht relevant erachtet werden. Bei der ROS-Produktion wurde bei mit H₂ begasten Zellen eine längere Zeit bis zum Erreichen der T_{max}ROS gemessen, während Zellen, die mit Sevofluran begast wurden, diese deutlich schneller erreichte. Die Zeit bis zum Erreichen der ET₅₀MPO wurde durch Begasen der Zellen mit H₂ signifikant verzögert, während Sevofluran keinen vergleichbaren Effekt zeigte. Die Zeit bis zum Erreichen der ET₅₀NETose wurde bei Zellen, die mit H₂ begast wurden im Vergleich zu mit Sevofluran begasten Zellen ebenfalls hinausgezögert. Die Durchflusszytometrie zeigte eine statistisch signifikante Verringerung der Medianen Fluoreszenzintensität der mit H₂ begasten Zellen im Vergleich zu normoxischen Kontrollversuchen mit Aktivierung durch PMA, fMLP, TNF- α sowie LPS.

Molekularer Wasserstoff zeigte eine deutliche modulierende Wirkung auf neutrophile Granulozyten, insbesondere durch die Verzögerung der T_{max}ROS, der ET₅₀MPO und ET₅₀NETose. Die Kombination aus Live-Cell-Imaging und Durchflusszytometrie ermöglichte eine umfassende Analyse dieser Effekte. Diese Eigenschaften könnten therapeutisch genutzt werden, um eine überschießende Immunantwort zu regulieren. Sevofluran zeigte ebenfalls Effekte, jedoch weniger ausgeprägt und schneller einsetzend. Die Ergebnisse unterstreichen das Potenzial von H₂ als adjuvantes Therapeutikum bei entzündlichen Erkrankungen.

4.6 Summary

This dissertation investigates the effects of molecular hydrogen and sevoflurane on the functionality of human neutrophil granulocytes. The aim of this study was to compare the influence of both substances on key mechanisms such as migration, the production of reactive oxygen species, activation of the enzyme myeloperoxidase and the formation of neutrophil extracellular traps. This work examines the hypothesis that H₂ exhibits stronger inhibitory effects on PMNs than sevoflurane.

The effects on PMN migration and functionality were analyzed using live-cell imaging. ROS production, MPO activity, and NETosis were measured using fluorescence-based markers and were evaluated quantitatively. Additionally, the median fluorescence intensity of ROS

production and the expression of surface molecules CD11b, CD62L and CD66b was examined via flow cytometry.

The results concerning the migration of the PMNs should not be considered relevant due to the concentration of the used chemoattractant. Cells exposed to molecular exhibited a longer time to reach T_{\max} ROS, whereas cells exposed to sevoflurane reached this point faster. The amount of time needed to reach ET_{50} MPO was significantly delayed in cells exposed to H_2 , whereas sevoflurane showed no comparable effect. Regarding ET_{50} NETosis, the amount of time needed to reach this marker was prolonged in cells exposed to H_2 compared to cells exposed to sevoflurane. Flow cytometry showed a significant reduction in the median fluorescence intensity of ROS production when cells were exposed to molecular hydrogen compared to normoxic controls. This effect was noticeable when activated with either LPS, $TNF-\alpha$, fMLP or PMA.

Molecular hydrogen demonstrated a modulatory effect on neutrophil granulocytes, particularly by delaying ROS production, MPO activity, and NETosis. The combination of live-cell imaging and flow cytometry allowed for a comprehensive analysis. These properties could be therapeutically utilized to regulate excessive immune responses. Sevoflurane also exhibited effects, though less pronounced and with a quicker onset. These findings underscore H_2 's potential as an adjuvant therapeutic in inflammatory diseases.

5. Anhang

5.1 Materialliste

Geräte und Materialien	
CO ₂ -Inkubator Heracell 150i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Wasserbad ohne integriertes Thermometer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad ThermoHaake SWB25	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Biofuge stratos	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Heraeus™, Megafuge 1.0 R Zentrifuge	ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Herasafe KS 18 biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II	ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
DM IRB Mikroskop	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Inkubator Lab-Therm LT-W	Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz
PIPETMAN® Classic P200 Pipette	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
PIPETMAN® Classic P1000 Pipette	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Multipipette M4	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Combitips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cellstar® Tubes, 15 mL, PP	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Rotilabo®-Reaktionsgefäße PP, farblos, 1,5 mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Druckminderer	Linde

Safety-Multifly-Kanüle 0,9 x 19 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Monovette Lithium-Heparin 5,5 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Pur-Zellin Zellstofftupfer	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Venenstauschlauch	Kimetec GmbH, Ditzingen, Deutschland
Softasept N	Braun, Melsungen, Deutschland
Cutiplast steril 7,2 x 5 cm	Smith & Nephew GmbH, Hamburg, Deutschland
Leuko Spin Medium, pluriSpin	pluriSelect Life Science – Worldwide, Leipzig, Deutschland
PBMC Spin Medium (Lympho Spin Medium), pluriSpin	pluriSelect Life Science – Worldwide, Leipzig, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (D8537-500ML) (DPBS)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, Product of United Kingdom
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with MgCl ₂ and CaCl ₂ , liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (D8662-500ML)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, Product of United Kingdom
Zählkammer Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser (Menzel-Gläser)	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anti-MPO-APC, human 1 mL	Miltenyl Biotec, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol ("DAPI")	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, Product of Israel
Dihydrorhodamine 123 ("DHR"), 1 mM in DMF (10 mg/26,2 mL DMF)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Propidiumiodid P1304MP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Human TNF Perotech 1 µg/mL	PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
Aqua Dest	Laborintern destilliert
Minimum Essential Medium Eagle 10x with Earle's salts, without l-glutamine and sodium bicarbonate	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, Product of United Kingdom
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	VWR International GmbH (Radnor, Pennsylvania, USA)
RPMI 1640, w/o: L-Glutamine, w/o: Phenol red, w: 2.0 g/L NaHCO ₃	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
PureCol Type I Bovine Collagen Solution (3 mg/mL) (Kollagen)	Advanced BioMatrix , Carlsbad, USA
µ-Slide Chemotaxis ibiTreat	Ibidi, Martinsried, Deutschland
N-Formyl-Met-Leu-Phe ≥97 % 50 mg (HPLC)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Inversmikroskop DMI8	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Ibidi Gas Mixer	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Ibidi Temperature Controller	Ibidi, Martinsried, Deutschland
ibidi Heating System, Universal Fit, for 1 Chamber	Ibidi, Martinsried, Deutschland
ibidi Gas Incubation System for CO ₂	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Leica DFC9000 GT Kamera	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Objektiv HC, PL FL L20x/0,40 CORR PH1	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtquelle CoolLED pE-4000	CoolLED Ltd, Andover, Großbritannien

LED QUAD Filterwürfel	Chroma Technology Corp., Vermont, USA
DUAL Filterwürfel	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica Application Suite 3.4.2.18368 Softwareplattform Leica Application Suite X	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Wasserstoff-Flasche (2 % Wasserstoff, 21 % Sauerstoff, 77 % Stickstoff)	Linde AG; Pullach, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
SNARF	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Röhre 5 mL PP (FACS-Röhrchen)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
FITC anti-human CD62L Clone: DREG-56	BioLegend, San Diego, USA
PE anti-human CD11b Clone: ICRF44 150 µg/mL	BioLegend, San Diego, USA
APC anti-human CD66b Clone: G10F5 200 µg/mL	BioLegend, San Diego, USA
PE Anti-human CD16b	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
CellQuest Pro	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
FACSClean Solution	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FACSRinse Solution	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FACSFlow™	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Datex-Engstrom, Capnomac ultima	Division Instrumentarium Corp., Helsinki, Finland

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

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Projektskizze	15
Abbildung 2: Erhobene und untersuchte Parameter	16
Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Versuche an dem Mikroskop	17
Abbildung 4: Ablauf der Versuche an dem Durchflusszytometer	18
Abbildung 5: Bild A: Blutprobe vor der Zentrifugation mit Dichtegradientenmedien. Bild B: Nach Dichte aufgetrennte Blutprobe nach Isolierung	20
Abbildung 6: Ibidi - Slide	22
Abbildung 7: Untersuchte Migrationsparameter	26
Abbildung 8: DAPI-Fluoreszenz mittels Imaris Software	27
Abbildung 9: Beispielhafte Berechnung der $T_{\max ROS}$, In diesem Fall liegt der X-Wert der Nullstelle der ersten Ableitung bei 79,2.	28

Abbildung 10: Auswertung der ET ₅₀ NETose mit dem Programm Phoenix. Erreich die Flächensumme der fluoreszierenden Zellen die Hälfte ihrer gesamten Ausdehnung, korreliert der Nullpunkt der X-Achse mit der ET ₅₀ NETose.	29
Abbildung 11: Beispielhaftes gaten des BURST - Versuches mit PMA am FlowJo. Bild A: Isolierung/Auftrennung der Granulozyten anhand ihrer Granularität und Größe von anderen Zellen (etwa Monozyten). Bild B: Auftrennung der lebenden von den toten Granulozyten mittels PI. Bild C: Ermittlung der Rhodamin – Fluoreszenz der vitalen Granulozyten.	34
Abbildung 12: Gaten von CD11b-markierten Granulozyten. In Bild A wurden die Granulozyten anhand ihrer Granularität und Größe von anderen Zellen (etwa Monozyten) isoliert. In Bild B wurde die Fluoreszenz-Intensität der CD11b-markierten Granulozyten ermittelt	35
Abbildung 13: Beispielhafte Darstellung eines Boxplots.	38
Abbildung 14: Untersuchte Migrationsparameter	39
Abbildung 15: Track Displacement in X - Richtung der Versuche mit 10 µM fMLP	41
Abbildung 16: Track Straightness der Versuche mit 10 µM fMLP	43
Abbildung 17: Vergleich der Migrationsparameter der mit H ₂ begasten PMNs und unterschiedlicher fMLP Konzentration	45
Abbildung 18: Fallzahlen der ausgewerteten Versuche bezüglich der ROS-Produktion	46
Abbildung 19:ROS- Produktion: Gase im Vergleich mit 10 µM fMLP	47
Abbildung 20: Fallzahlen der ausgewerteten Versuche bezüglich der Myeloperoxidase-Aktivität	48
Abbildung 21: ET ₅₀ MPO im Gasvergleich mit 10 µM fMLP	49
Abbildung 22: Fallzahlen der ausgewerteten Versuche bezüglich der NETose.	50
Abbildung 23: ET ₅₀ NETose im Vergleich mit 10 µM fMLP	51
Abbildung 24: Mediane der T _{max} ROS, ET ₅₀ MPI und ET ₅₀ NETosis mit H ₂ begasten Zellen. Der X-Achse ist die jeweilige fMLP - Konzentration zu entnehmen.	52
Abbildung 25: Fallzahlen Durchflusszytometrie	53
Abbildung 26:Mediane Fluoreszenzintensitäten der BURST Versuche	54
Abbildung 27: Beeinflussung verschiedener Stimulantien und molekularen Wasserstoffs auf die Exprimierung von CD11b	55
Abbildung 28: Beeinflussung verschiedener Stimulantien und molekularen Wasserstoffs auf die Exprimierung von CD62L	56

Abbildung 29: Beeinflussung verschiedener Stimulantien und molekularen Wasserstoffs auf die Exprimierung von CD66b	57
--	----

5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der Filterwürfel	23
Tabelle 2: BURST – Versuchsaufbau	32
Tabelle 3: Antikörper - Versuchsaufbau	33
Tabelle 4: Fallzahlen der Versuche hinsichtlich der Reaktionen	37
Tabelle 5: Mediane Track Length in den ersten 30 Minuten	40
Tabelle 6: Mediane der Wasserstoffversuche im Vergleich	44

5.4 Formelverzeichnis

Formel 1: NADPH Oxidase	8
Formel 2: Superoxiddismutase	9
Formel 3: Myeloperoxidase	9
Formel 4: Rechnungsformel Phoenix	29

5.5 Literaturverzeichnis

References

1. Malech HL, Deleo FR, Quinn MT. The role of neutrophils in the immune system: an overview. *Methods Mol Biol.* 2014;11243–10. doi:10.1007/978-1-62703-845-4_1 Cited in: PubMed; PMID 24504942.
2. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159–75. doi:10.1038/nri3399 Cited in: PubMed; PMID 23435331.
3. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S73-80. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.017 Cited in: PubMed; PMID 20176269.
4. Ramirez GA, Yacoub M-R, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, Ciceri F, Castagna A, Colombo G, Dagna L. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *Biomed Res Int.* 2018;20189095275. doi:10.1155/2018/9095275 Cited in: PubMed; PMID 29619379.

5. Sokollik C, Simon H-U. Eosinophile Granulozyten – Physiologie und Pathophysiologie [Eosinophilic granulocytes-Physiology and pathophysiology]. *Z Rheumatol.* 2019;78(4):306–12. ger. doi:10.1007/s00393-018-0574-7 Cited in: PubMed; PMID 30627844.
6. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood.* 1997;89(10):3503–21. doi:10.1182/blood.V89.10.3503
7. Lominadze G, Powell DW, Luerman GC, Link AJ, Ward RA, McLeish KR. Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(10):1503–21. doi:10.1074/mcp.M500143-MCP200 Cited in: PubMed; PMID 15985654.
8. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003;5(14):1317–27. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.008 Cited in: PubMed; PMID 14613775.
9. Moraes TJ, Zurawska JH, Downey GP. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr Opin Hematol.* 2006;13(1):21–7. doi:10.1097/01.moh.0000190113.31027.d5 Cited in: PubMed; PMID 16319683.
10. Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, Nielsen MH, Borregaard N. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood.* 1994;83(6):1640–9. doi:10.1182/blood.V83.6.1640.1640
11. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678–89. doi:10.1038/nri2156 Cited in: PubMed; PMID 17717539.
12. Weninger W, Biro M, Jain R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(4):232–46. doi:10.1038/nri3641 Cited in: PubMed; PMID 24603165.
13. Lämmermann T, Germain RN. The multiple faces of leukocyte interstitial migration. *Seminars in Immunopathology.* 2014;36(2):227–51. doi:10.1007/s00281-014-0418-8 Cited in: PubMed; PMID 24573488.
14. Friedl P, Weigelin B. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol.* 2008;9(9):960–9. doi:10.1038/ni.f.212 Cited in: PubMed; PMID 18711433.
15. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005 Cited in: PubMed; PMID 17237347.
16. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613 Cited in: PubMed; PMID 23268465.
17. 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. *Eur J Clin Invest.* 2018;48 Suppl 2e12951. doi:10.1111/eci.12951 Cited in: PubMed; PMID 29757466.

18. Zeng MY, Miralda I, Armstrong CL, Uriarte SM, Bagaitkar J. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Mol Oral Microbiol.* 2019;34(2):27–38. doi:10.1111/omi.12252 Cited in: PubMed; PMID 30632295.
19. McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry.* 1969;244(22):6049–55. doi:10.1016/S0021-9258(18)63504-5
20. Siraki AG. The many roles of myeloperoxidase: From inflammation and immunity to biomarkers, drug metabolism and drug discovery. *Redox Biol.* 2021;46:102109. doi:10.1016/j.redox.2021.102109 Cited in: PubMed; PMID 34455146.
21. van Dalen CJ, Whitehouse MW, Winterbourn CC, Kettle AJ. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *Biochem J.* 1997;327 (Pt 2)(Pt 2):487–92. doi:10.1042/bj3270487 Cited in: PubMed; PMID 9359420.
22. Nauseef WM. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiol.* 2014;16(8):1146–55. doi:10.1111/cmi.12312 Cited in: PubMed; PMID 24844117.
23. Aiken ML, Painter RG, Zhou Y, Wang G. Chloride transport in functionally active phagosomes isolated from Human neutrophils. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(12):2308–17. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.542 Cited in: PubMed; PMID 23089227.
24. Davies MJ. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J Clin Biochem Nutr.* 2011;48(1):8–19. doi:10.3164/jcfn.11-006FR Cited in: PubMed; PMID 21297906.
25. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005;77(5):598–625. doi:10.1189/jlb.1204697 Cited in: PubMed; PMID 15689384.
26. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532–5. doi:10.1126/science.1092385 Cited in: PubMed; PMID 15001782.
27. Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner W-D. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules.* 2015;5(2):702–23. doi:10.3390/biom5020702 Cited in: PubMed; PMID 25946076.
28. Chen T, Li Y, Sun R, Hu H, Liu Y, Herrmann M, Zhao Y, Muñoz LE. Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils. *Front Immunol.* 2021;12:775267. doi:10.3389/fimmu.2021.775267 Cited in: PubMed; PMID 34804066.
29. Wang Y, Du C, Zhang Y, Zhu L. Composition and Function of Neutrophil Extracellular Traps. *Biomolecules.* 2024;14(4). doi:10.3390/biom14040416 Cited in: PubMed; PMID 38672433.
30. Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2020;36:191–218. doi:10.1146/annurev-cellbio-020520-111016 Cited in: PubMed; PMID 32663035.
31. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular

- traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231–41. doi:10.1083/jcb.200606027 Cited in: PubMed; PMID 17210947.
32. Pilszczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FHY, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010;185(12):7413–25. doi:10.4049/jimmunol.1000675 Cited in: PubMed; PMID 21098229.
 33. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009;16(11):1438–44. doi:10.1038/cdd.2009.96 Cited in: PubMed; PMID 19609275.
 34. Ohta S. Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacol Ther.* 2014;144(1):1–11. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.04.006 Cited in: PubMed; PMID 24769081.
 35. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K-I, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med.* 2007;13(6):688–94. doi:10.1038/nm1577 Cited in: PubMed; PMID 17486089.
 36. Ohta S. Recent progress toward hydrogen medicine: potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic applications. *Curr Pharm Des.* 2011;17(22):2241–52. doi:10.2174/138161211797052664 Cited in: PubMed; PMID 21736547.
 37. Barancik M, Kura B, LeBaron TW, Bolli R, Buday J, Slezak J. Molecular and Cellular Mechanisms Associated with Effects of Molecular Hydrogen in Cardiovascular and Central Nervous Systems. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(12). doi:10.3390/antiox9121281 Cited in: PubMed; PMID 33333951.
 38. Shinbo T, Kokubo K, Sato Y, Hagiri S, Hataishi R, Hirose M, Kobayashi H. Breathing nitric oxide plus hydrogen gas reduces ischemia-reperfusion injury and nitrotyrosine production in murine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;305(4):H542–50. doi:10.1152/ajpheart.00844.2012 Cited in: PubMed; PMID 23771690.
 39. Slezák J, Kura B, Frimmel K, Zálešák M, Ravingerová T, Viczenczová C, Okruhlicová Ľ, Tribulová N. Preventive and therapeutic application of molecular hydrogen in situations with excessive production of free radicals. *Physiol Res.* 2016;65 Suppl 1S11–28. doi:10.33549/physiolres.933414 Cited in: PubMed; PMID 27643933.
 40. LeBaron TW, Kura B, Kalocayova B, Tribulova N, Slezak J. A New Approach for the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disorders. Molecular Hydrogen Significantly Reduces the Effects of Oxidative Stress. *Molecules.* 2019;24(11). doi:10.3390/molecules24112076 Cited in: PubMed; PMID 31159153.
 41. Yao L, Chen H, Wu Q, Xie K. Hydrogen-rich saline alleviates inflammation and apoptosis in myocardial I/R injury via PINK-mediated autophagy. *Int J Mol Med.* 2019;44(3):1048–62. doi:10.3892/ijmm.2019.4264 Cited in: PubMed; PMID 31524220.
 42. Ichihara M, Sobue S, Ito M, Ito M, Hirayama M, Ohno K. Beneficial biological effects and the underlying mechanisms of molecular hydrogen - comprehensive review of 321

- original articles. *Med Gas Res.* 2015;512. doi:10.1186/s13618-015-0035-1 Cited in: PubMed; PMID 26483953.
43. Nakao A, Toyoda Y, Sharma P, Evans M, Guthrie N. Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome-an open label pilot study. *J Clin Biochem Nutr.* 2010;46(2):140–9. doi:10.3164/jcbrn.09-100 Cited in: PubMed; PMID 20216947.
 44. Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, Kitawaki J, Imai S, Nakano K, Ohta M, Adachi T, Obayashi H, Yoshikawa T. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res.* 2008;28(3):137–43. doi:10.1016/j.nutres.2008.01.008 Cited in: PubMed; PMID 19083400.
 45. Toru Ishibashi, Bunpei Sato, Mariko Rikitake, Tomoki Seo, Ryosuke Kurokawa, Yuichi Hara, Yuji Naritomi, Hiroshi Hara, Tetsuhiko Nagao. Consumption of water containing a high concentration of molecular hydrogen reduces oxidative stress and disease activity in patients with rheumatoid arthritis: an open-label pilot study.
 46. Nicolson GL, Mattos GF de, Settineri R, Costa C, Ellithorpe R, Rosenblatt S, La Valle J, Jimenez A, Ohta S. Clinical Effects of Hydrogen Administration: From Animal and Human Diseases to Exercise Medicine. *IJCM.* 2016;07(01):32–76. doi:10.4236/ijcm.2016.71005
 47. Kawamura T, Wakabayashi N, Shigemura N, Huang C-S, Masutani K, Tanaka Y, Noda K, Peng X, Takahashi T, Billiar TR, Okumura M, Toyoda Y, Kensler TW, Nakao A. Hydrogen gas reduces hyperoxic lung injury via the Nrf2 pathway in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013;304(10):L646-56. doi:10.1152/ajplung.00164.2012 Cited in: PubMed; PMID 23475767.
 48. Ohta S. Direct Targets and Subsequent Pathways for Molecular Hydrogen to Exert Multiple Functions: Focusing on Interventions in Radical Reactions. *Curr Pharm Des.* 2021;27(5):595–609. doi:10.2174/1381612826666200806101137 Cited in: PubMed; PMID 32767925.
 49. DU Z, Jia H, Liu J, Zhao X, Wang Y, Sun X. Protective effects of hydrogen-rich saline in uncontrolled hemorrhagic shock. *Exp Ther Med.* 2014;7(5):1253–8. doi:10.3892/etm.2014.1572 Cited in: PubMed; PMID 24940421.
 50. Tao G, Song G, Qin S. Molecular hydrogen: current knowledge on mechanism in alleviating free radical damage and diseases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2019;51(12):1189–97. doi:10.1093/abbs/gmz121 Cited in: PubMed; PMID 31738389.
 51. Shi Q, Liao K-S, Zhao K-L, Wang W-X, Zuo T, Deng W-H, Chen C, Yu J, Guo W-Y, He X-B, Abliz A, Wang P, Zhao L. Hydrogen-rich saline attenuates acute renal injury in sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis by inhibiting ROS and NF- κ B pathway. *Mediators Inflamm.* 2015;2015685043. doi:10.1155/2015/685043 Cited in: PubMed; PMID 25878401.
 52. Xie K, Yu Y, Zhang Z, Liu W, Pei Y, Xiong L, Hou L, Wang G. Hydrogen gas improves survival rate and organ damage in zymosan-induced generalized inflammation model.

- Shock. 2010;34(5):495–501. doi:10.1097/SHK.0b013e3181def9aa Cited in: PubMed; PMID 20351628.
53. Xie K, Liu L, Yu Y, Wang G. Hydrogen gas presents a promising therapeutic strategy for sepsis. *Biomed Res Int*. 2014;2014807635. doi:10.1155/2014/807635 Cited in: PubMed; PMID 24829918.
 54. Yu Y, Wang WN, Han HZ, Xie KL, Wang GL, Yu YH. Protective effects of hydrogen-rich medium on lipopolysaccharide-induced monocytic adhesion and vascular endothelial permeability through regulation of vascular endothelial cadherin. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):6202–12. doi:10.4238/2015.June.9.6 Cited in: PubMed; PMID 26125821.
 55. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(1):30–5. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.165 Cited in: PubMed; PMID 18541148.
 56. Kamimura N, Nishimaki K, Ohsawa I, Ohta S. Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing hepatic FGF21 and stimulating energy metabolism in db/db mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(7):1396–403. doi:10.1038/oby.2011.6 Cited in: PubMed; PMID 21293445.
 57. Kang K-M, Kang Y-N, Choi I-B, Gu Y, Kawamura T, Toyoda Y, Nakao A. Effects of drinking hydrogen-rich water on the quality of life of patients treated with radiotherapy for liver tumors. *Med Gas Res*. 2011;1(1):11. doi:10.1186/2045-9912-1-11 Cited in: PubMed; PMID 22146004.
 58. Huang C-S, Kawamura T, Lee S, Tochigi N, Shigemura N, Buchholz BM, Kloke JD, Billiar TR, Toyoda Y, Nakao A. Hydrogen inhalation ameliorates ventilator-induced lung injury. *Crit Care*. 2010;14(6):R234. doi:10.1186/cc9389 Cited in: PubMed; PMID 21184683.
 59. Wagner J, Strosing KM, Spassov SG, Lin Z, Engelstaedter H, Tacke S, Hoetzel A, Faller S. Sevoflurane posttreatment prevents oxidative and inflammatory injury in ventilator-induced lung injury. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192896. doi:10.1371/journal.pone.0192896 Cited in: PubMed; PMID 29470503.
 60. Hu G, Vasiliauskas T, Salem MR, Rhone DP, Crystal GJ. Neutrophils pretreated with volatile anesthetics lose ability to cause cardiac dysfunction. *Anesthesiology*. 2003;98(3):712–8. doi:10.1097/00000542-200303000-00020 Cited in: PubMed; PMID 12606916.
 61. Liu D, Mei L, Zhao P. Immunomodulatory effects of anaesthetic sevoflurane in septic mouse model. *Saudi J Biol Sci*. 2021;28(5):2733–8. doi:10.1016/j.sjbs.2021.03.023 Cited in: PubMed; PMID 34012317.
 62. Fröhlich D, Rothe G, Schwall B, Schmid P, Schmitz G, Taeger K, Hobbhahn J. Effects of volatile anaesthetics on human neutrophil oxidative response to the bacterial peptide FMLP. *Br J Anaesth*. 1997;78(6):718–23. doi:10.1093/bja/78.6.718 Cited in: PubMed; PMID 9215026.

63. Bredthauer A, Geiger A, Gruber M, Pfaehler S-M, Petermichl W, Bitzinger D, Metterlein T, Seyfried T. Propofol Ameliorates Exaggerated Human Neutrophil Activation in a LPS Sepsis Model. *J Inflamm Res.* 2021;143849–62. doi:10.2147/JIR.S314192 Cited in: PubMed; PMID 34408467.
64. Andre Bredthauer, Manuel KopfmueLLer, M. Gruber, S. Pfaehler, K. Lehle, Walter Petermichl, T. Seyfried, D. Bitzinger, A. Redel. Therapeutic Anticoagulation with Argatroban and Heparins Reduces Granulocyte Migration: Possible Impact on ECLS-Therapy? <https://www.semanticscholar.org/paper/Therapeutic-Anticoagulation-with-Argatroban-and-on-Bredthauer-KopfmueLLer/99b32e84e4c2ec9ceb99caba302cb9bc414cd337> [Internet]. 2020. Available from:
65. Doblinger N, Bredthauer A, Mohrez M, Hähnel V, Graf B, Gruber M, Ahrens N. Impact of hydroxyethyl starch and modified fluid gelatin on granulocyte phenotype and function. *Transfusion.* 2019;59(6):2121–30. doi:10.1111/trf.15279 Cited in: PubMed; PMID 30934131.
66. Kolle G, Metterlein T, Gruber M, Seyfried T, Petermichl W, Pfaehler S-M, Bitzinger D, Wittmann S, Bredthauer A. Potential Impact of Local Anesthetics Inducing Granulocyte Arrest and Altering Immune Functions on Perioperative Outcome. *J Inflamm Res.* 2021;141–12. doi:10.2147/JIR.S275525 Cited in: PubMed; PMID 33442284.
67. Kraus RF, Gruber MA, Kieninger M. The influence of extracellular tissue on neutrophil function and its possible linkage to inflammatory diseases. 2021-05-012021-02-122021-05-202021-6-11T17:292021-6-12T06:002021-6-12T06:00.
68. Pai D, Gruber M, Pfaehler S-M, Bredthauer A, Lehle K, Trabold B. Polymorphonuclear Cell Chemotaxis and Suicidal NETosis: Simultaneous Observation Using fMLP, PMA, H7, and Live Cell Imaging. *J Immunol Res.* 2020;20201415947. doi:10.1155/2020/1415947 Cited in: PubMed; PMID 32879894.
69. Kupke LS, Arndt S, Lenzer S, Metz S, Unger P, Zimmermann JL, Bosserhoff A-K, Gruber M, Karrer S. Cold Atmospheric Plasma Promotes the Immunoreactivity of Granulocytes In Vitro. *Biomolecules.* 2021;11(6). doi:10.3390/biom11060902 Cited in: PubMed; PMID 34204360.
70. Szkudlarek U, Maria L, Kasielski M, Kaucka S, Nowak D. Exhaled hydrogen peroxide correlates with the release of reactive oxygen species by blood phagocytes in healthy subjects. *Respir Med.* 2003;97(6):718–25. doi:10.1053/rmed.2003.1506 Cited in: PubMed; PMID 12814160.
71. Torres M, Hall FL, O'Neill K. Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases. *The Journal of Immunology.* 1993;150(4):1563–77. doi:10.4049/jimmunol.150.4.1563
72. Polesskaya O, Wong C, Lebron L, Chamberlain JM, Gelbard HA, Goodfellow V, Kim M, Daiss JL, Dewhurst S. MLK3 regulates fMLP-stimulated neutrophil motility. *Mol Immunol.* 2014;58(2):214–22. doi:10.1016/j.molimm.2013.11.016 Cited in: PubMed; PMID 24389043.

73. Ren DC, Du GH, Zhang JT. Inhibitory effect of the water-soluble extract of *Salvia miltiorrhiza* on neutrophil-endothelial adhesion. *Jpn J Pharmacol.* 2002;90(3):276–80. doi:10.1254/jjp.90.276 Cited in: PubMed; PMID 12499583.
74. Herrmann JM, Bernardo J, Long HJ, Seetoo K, McMenamin ME, Batista EL, van Dyke TE, Simons ER. Sequential chemotactic and phagocytic activation of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun.* 2007;75(8):3989–98. doi:10.1128/IAI.00388-07 Cited in: PubMed; PMID 17526745.
75. 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. *Mol Cell Biol.* 2013;33(1):136–45. doi:10.1128/MCB.00869-12 Cited in: PubMed; PMID 23109426.
76. Zhu L, He P. fMLP-stimulated release of reactive oxygen species from adherent leukocytes increases microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(1):H365-72. doi:10.1152/ajpheart.00812.2005 Cited in: PubMed; PMID 16155097.
77. Cundell DR, Kanthakumar K, Taylor GW, Goldman WE, Flak T, Cole PJ, Wilson R. Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function in vitro. *Infect Immun.* 1994;62(2):639–43. doi:10.1128/iai.62.2.639-643.1994 Cited in: PubMed; PMID 8300220.
78. Hidalgo MA, Carretta MD, Teuber SE, Zárata C, Cárcamo L, Concha II, Burgos RA. fMLP-Induced IL-8 Release Is Dependent on NADPH Oxidase in Human Neutrophils. *J Immunol Res.* 2015;2015120348. doi:10.1155/2015/120348 Cited in: PubMed; PMID 26634216.
79. Hundhammer T, Gruber M, Wittmann S. Paralytic Impact of Centrifugation on Human Neutrophils. *Biomedicines.* 2022;10(11). doi:10.3390/biomedicines10112896 Cited in: PubMed; PMID 36428463.
80. Xie K, Yu Y, Huang Y, Zheng L, Li J, Chen H, Han H, Hou L, Gong G, Wang G. Molecular hydrogen ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through reducing inflammation and apoptosis. *Shock.* 2012;37(5):548–55. doi:10.1097/SHK.0b013e31824ddc81 Cited in: PubMed; PMID 22508291.
81. Liu X, Ma B, Malik AB, Tang H, Yang T, Sun B, Wang G, Minshall RD, Li Y, Zhao Y, Ye RD, Xu J. Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. *Nat Immunol.* 2012;13(5):457–64. doi:10.1038/ni.2258 Cited in: PubMed; PMID 22447027.
82. Shields JM, Haston WS. Behaviour of neutrophil leucocytes in uniform concentrations of chemotactic factors: contraction waves, cell polarity and persistence. *J Cell Sci.* 1985;7475–93. doi:10.1242/jcs.74.1.75 Cited in: PubMed; PMID 3161901.
83. Zigmond SH, Levitsky HI, Kreel BJ. Cell polarity: an examination of its behavioral expression and its consequences for polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. *The Journal of Cell Biology.* 1981 Jun, 89(3):585-592. DOI: 10.1083/jcb.89.3.585. PMID: 7251666, PMCID: PMC2111809. 585 [Internet] [cited 2024 Oct 7]. Available from: <https://rupress.org/jcb/article->

pdf/89/3/585/1638631/585.pdf?casa_token=Jg5xjvIWf5sAAAAA:7R_0b0BAmaYKnx
O4rRiPaywlyegxmEHPFNeLFylzFfFfTU0ibr260dDDTG6lhY3Ab53T-3g

84. Zhang Y, Xu J, Long Z, Wang C, Wang L, Sun P, Li P, Wang T. Hydrogen (H₂) Inhibits Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy via Antioxidative Pathways. *Front Pharmacol.* 2016;7:392. doi:10.3389/fphar.2016.00392 Cited in: PubMed; PMID 27833552.
85. Zhang D-Q, Feng H, Chen W-C. Effects of hydrogen-rich saline on taurocholate-induced acute pancreatitis in rat. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:731932. doi:10.1155/2013/731932 Cited in: PubMed; PMID 23983797.
86. Guo SX, Jin YY, Fang Q, You CG, Wang XG, Hu XL, Han C-M. Beneficial effects of hydrogen-rich saline on early burn-wound progression in rats. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124897. doi:10.1371/journal.pone.0124897 Cited in: PubMed; PMID 25874619.
87. Shirakawa K, Kobayashi E, Ichihara G, Kitakata H, Katsumata Y, Sugai K, Hakamata Y, Sano M. H₂ Inhibits the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *JACC Basic Transl Sci.* 2022;7(2):146–61. doi:10.1016/j.jacbts.2021.11.005 Cited in: PubMed; PMID 35257042.
88. Minguet G, Franck T, Joris J, Ceusters J, Mouithys-Mickalad A, Serteyn D, Sandersen C. Effects of isoflurane and sevoflurane on the neutrophil myeloperoxidase system of horses. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;165(1-2):93–7. doi:10.1016/j.vetimm.2015.02.010 Cited in: PubMed; PMID 25796094.
89. Minguet G, Franck T, Joris J, Serteyn D. Sevoflurane modulates the release of reactive oxygen species, myeloperoxidase, and elastase in human whole blood: Effects of different stimuli on neutrophil response to volatile anesthetic in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2017;30(4):362–70. doi:10.1177/0394632017739530 Cited in: PubMed; PMID 29087224.
90. Damascena HL, Silveira WAA, Castro MS, Fontes W. Neutrophil Activated by the Famous and Potent PMA (Phorbol Myristate Acetate). *Cells.* 2022;11(18). doi:10.3390/cells11182889 Cited in: PubMed; PMID 36139464.
91. Klink M, Tchorzewski H, Sulowska Z. Oxidative and adhesive responses of human neutrophils to nitrovasodilators in vitro: the role of protein kinases. *Mediators Inflamm.* 2003;12(6):345–53. doi:10.1080/09629350310001633388 Cited in: PubMed; PMID 14668094.
92. Millar JE, Fanning JP, McDonald CI, McAuley DF, Fraser JF. The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a review of the pathophysiology. *Crit Care.* 2016;20(1):387. doi:10.1186/s13054-016-1570-4 Cited in: PubMed; PMID 27890016.
93. Raffaelli G, Ghirardello S, Passera S, Mosca F, Cavallaro G. Oxidative Stress and Neonatal Respiratory Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Front Physiol.* 2018;9:1739. doi:10.3389/fphys.2018.01739 Cited in: PubMed; PMID 30564143.
94. Rungatscher A, Tessari M, Stranieri C, Solani E, Linardi D, Milani E, Montresor A, Merigo F, Salvetti B, Menon T, Faggian G. Oxygenator Is the Main Responsible for

- Leukocyte Activation in Experimental Model of Extracorporeal Circulation: A Cautionary Tale. *Mediators Inflamm.* 2015;2015484979. doi:10.1155/2015/484979 Cited in: PubMed; PMID 26063972.
95. Haus M, Foltan M, Philipp A, Mueller T, Gruber M, Lingel MP, Krenkel L, Lehle K. Neutrophil extracellular traps - a potential trigger for the development of thrombocytopenia during extracorporeal membrane oxygenation. *Front Immunol.* 2024;151339235. doi:10.3389/fimmu.2024.1339235 Cited in: PubMed; PMID 38449869.
 96. McDonald CI, Fraser JF, Coombes JS, Fung YL. Oxidative stress during extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014;46(6):937–43. doi:10.1093/ejcts/ezt637 Cited in: PubMed; PMID 24482384.
 97. Guan W-J, Wei C-H, Chen A-L, Sun X-C, Guo G-Y, Zou X, Shi J-D, Lai P-Z, Zheng Z-G, Zhong N-S. Hydrogen/oxygen mixed gas inhalation improves disease severity and dyspnea in patients with Coronavirus disease 2019 in a recent multicenter, open-label clinical trial. *J Thorac Dis.* 2020;12(6):3448–52. doi:10.21037/jtd-2020-057 Cited in: PubMed; PMID 32642277.
 98. Chow C-W, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(4):427–31. doi:10.1165/rcmb.F278 Cited in: PubMed; PMID 14500253.

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Arbeit an dieser Dissertation unterstützt haben.

Sowohl bei Belangen, welche direkt etwas mit dieser Arbeit zu tun hatten als auch alle Gedankenanstöße oder Ermutigungen, welche dazu geführt haben, dass diese Arbeit fertiggestellt wurde.

Ich bedanke mich bei PD Dr. med. vet. Marietta von Süsskind – Schwendi, welche mir als Doktormutter mit professionellem Rat zur Seite stand. Ein besonderer Dank gilt Dr. Michael Gruber, vor dessen schier unerschöpflichem Enthusiasmus für sein Forschungsgebiet man sich nicht erwehren kann, seinen vielen Ideen, Ratschlägen, Hilfe und Geduld.

Zur positiven und gemeinschaftlichen Atmosphäre im Labor trugen nicht nur er, sondern auch Regina Lindner, Gabi Bollwein, Ruth Späth, Sigrid Bamberger, Simon Tuemmler und Marion Schindler von der Abteilung der Anästhesiologie sowie Angelika Urbanek und Karin Hollnberger von der Abteilung der Herz-Thorax-Chirurgie bei. Euch allen danke ich sehr.

In emotionalen Krisenzeiten hatte Regina Lindner stets ein oder zwei offene Ohren und Rat, sowohl zu fachlichen Angelegenheiten als auch zu sehr vielen persönlichen. Jeder Tag im Labor wäre um einiges trister ohne sie gewesen.

Auf andere Art und Weise wertvoll war auch die Unterstützung außerhalb des Labors.

Allen voran meine Eltern James und Andrea, ohne deren finanzielle Unterstützung diese Dissertation wohl zwei Jahre früher & ohne deren emotionaler Unterstützung diese Dissertation wohl niemals fertig geworden wäre. Ein Dank auch an meine Geschwister: die didaktisch wertvollen Tritte meines Bruders Daniel in meinen Gluteus Maximus zum Weiterarbeiten, die Ratschläge von Patrick und die erholsame Zeit mit Elisabeth.

Zur Wichtigkeit meiner Freunde könnte ich wohl mehrere Seiten füllen, von der Vorbildfunktion von Anna, den Marathon-Dissertations-Wochenenden mit Miriam (inkl. Kulinarischer Verpflegung von Kathi) oder fachlich unnützen „Tipps“ von Benedikt. Damit die Danksagung nicht länger als mein Diskussionsteil wird, ziehe ich hier aber nun einen Schlussstrich. Alle nicht genannten Personen dürfen sich, ob zu Recht oder Unrecht, ebenfalls erwähnt fühlen.

