

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Joachim Windolf

Die Auswirkungen der hyperbaren Sauerstofftherapie
auf die Aktivität von polymorphnukleären Granulozyten
nach schwerem Trauma

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Deborah Grimberg-Peters

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü

Zweitgutachter: PD Dr. med. Hans-Jürgen Laws

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Grimberg-Peters,D.; Büren,C.; Windolf, J.; Wahlers, T.; Paunel-Görgülü, A. 2016. *Hyperbaric oxygen reduces production of reactive oxygen species in neutrophils from polytraumatized patients yielding in the inhibition of p38 MAP kinase and downstream pathways*. PLoS ONE, 11(8), pp.1–14. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0161343>

Zusammenfassung

Die Regulation der Immunantwort im Verlauf der Genesung ist für Patienten nach schwerem Trauma von essenzieller Bedeutung. Eine zentrale Rolle spielt die posttraumatische Reaktion der polymorphnukleären Granulozyten (PMN). Kommt es zu einer Überreaktion und damit zu einem *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), ergeben sich bedingt durch die verzögerte Apoptose und die starke Abwehrreaktion der aktivierten PMN in Form einer verstärkten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und *neutrophil extracellular traps* (NETs) häufig Einschränkungen der endothelialen Funktionen und multiple Organschäden. Ziel der Studie war, Erkenntnisse darüber zu erlangen, ob die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff (HBO), durch die z.B. in der Therapie lokaler Wundheilungsstörungen gute Erfolge erzielt werden können, einen protektiven Effekt durch Supprimieren der PMN-Aktivität nach schwerem Trauma hat. Dazu wurde der Einfluss der HBO auf die NETose, die ROS-Produktion und die Chemotaxis von PMN polytraumatisierter Patienten sowie gesunder Kontrollprobanden *in vitro* untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von HBO auf die intrazelluläre Signalweiterleitung MAP Kinasen p38 und ERK und auf die Expression des antiapoptotischen Mcl-1-Proteins analysiert.

Zusammengefasst legen die Ergebnisse einen positiven Effekt der HBO auf die durch PMN vermittelte Immunantwort in Patienten nach schwerem Trauma nahe. Zwar war kein Effekt der HBO auf die Chemotaxis und nur ein geringer Effekt auf die NETose der PMN nachweisbar, jedoch konnte eine signifikante Reduktion der Produktion potentiell organschädigender ROS in den PMN der polytraumatisierten Patienten beobachtet werden. Auch die Aktivität der p38 MAPK wurde durch die HBO verringert. Diese ist in viele traumabedingte Veränderungen mit organschädigenden Konsequenzen involviert. Ein Effekt auf die ebenfalls in viele Prozesse der PMN eingebundenen ERK MAPK war nicht signifikant, es zeigte sich jedoch auch hier tendenziell ein inhibitorischer Effekt durch die HBO-Therapie. Auf die verzögerte Apoptose der PMN nach schwerem Trauma konnte anhand der Mcl-1-Expression kein Effekt durch die HBO-Behandlung beobachtet werden. Für den Organismus könnten diese Veränderungen der PMN-Aktivität eine geringere Gefahr eines SIRS und eines dadurch entstehenden Multiorganversagens bedeuten.

Abstract

Patients after severe trauma are especially vulnerable for suffering from the distinct activation of neutrophils. In case of a systemic inflammatory response syndrome (SIRS), delayed apoptosis and enhanced release of toxic metabolites and enzymes like reactive oxygen species (ROS) and neutrophil extracellular traps (NETs) lead to tissue damages, multiple organ dysfunctions and endothelial damages. This study aimed to elaborate, if hyperbaric oxygen (HBO) therapy, that is used for example for the therapy of wound healing disorders, reduces neutrophil-induced risks for tissue damages in patients after severe trauma. To examine the effects of HBO, an *in vitro* study with neutrophils from severely injured patients and healthy blood donors was conducted. The production of ROS and NETs and the effect on the neutrophil chemotactic activity were quantified. Additionally, the impact of HBO on the MAP kinases p38 and ERK and the expression of the antiapoptotic Mcl-1 protein were investigated.

The results show suppressive effects of the HBO on the neutrophil-induced inflammatory reactions after severe trauma. There was no effect on the chemotactic activity of neutrophils and only a slight effect on NETosis. Contrary, a significant reduction of the production of ROS and of the phosphorylation of p38 MAPK could be demonstrated. There were signs of the reduction of the phosphorylation of ERK MAPK by HBO therapy as well, but these results were not significant. No effect of HBO treatment could be found on the delayed apoptosis of neutrophils by measuring of the Mcl-1-protein expression.

In conclusion, the results of this study demonstrate a reduction of the overwhelming activity of neutrophils by HBO therapy and could result in a reduced risk of SIRS-induced tissue damages and multiple organ failure in patients after severe trauma.

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>
BPI	<i>Bactericidal permeability increasing Protein</i>
CARS	<i>Compensatory antiinflammatory response syndrome</i>
cfDNA	<i>Cell-free DNA</i>
DAG	Diacylglycerin
DHR	Dihydrorhodamine-123
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure</i>
Em.	Emission
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinasis</i>
Ex.	Extinktion
FACS	<i>Fluorescent-activated cell sorting, Durchflusszytometer</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
fMLP	<i>Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HBO	Hyperbare Sauerstofftherapie
INF- γ	Interferon- γ
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
ISS	<i>Injury severity score</i>
MAP	<i>Mean arterial pressure</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinasis</i>
MARS	<i>Mixed antagonist response syndrome</i>

MODS	<i>Multi organ dysfunction syndrome</i>
MOV	Multiorganversagen
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
NOX	NADPH-Oxidase
PAF	<i>Platelet-activating factor</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PKC	Proteinkinase C
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
PMN	Polymorphnukleäre Granulozyten
P / S	Penicillin / Streptomycin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardabweichung
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline mit Tween 20</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Trauma	
1.1.1	Die Immunantwort nach schwerem Trauma.....	1
1.1.2	Posttraumatische intensivmedizinische Versorgung.....	3
1.2	Polymorphnukleäre Granulozyten (PMN)	
1.2.1	Physiologie.....	4
1.2.2	Aktivierung der PMN.....	4
1.2.3	Abwehrmechanismen der PMN.....	5
1.2.4	Die Rolle der MAPK in PMN.....	6
1.2.5	Die Rolle der NADPH-Oxidase in PMN.....	7
1.2.6	Veränderungen der PMN nach schwerem Trauma.....	8
1.3	Hyperbare Sauerstofftherapie (HBO)	
1.3.1	Grundlagen der HBO-Therapie.....	9
1.3.2	Indikation und Risiken der HBO-Therapie.....	10
1.3.3	Effekte der HBO-Therapie.....	11
2	Fragestellung.....	13
3	Material und Methoden	
3.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Software	
3.1.1	Geräte.....	14
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	15
3.1.3	Kits.....	16
3.1.4	Chemikalien.....	16
3.1.5	Medien, Lösungen und Puffer.....	19
3.1.6	Antikörper.....	21
3.1.7	Software.....	22
3.2	Methoden	
3.2.1	Auswahl der Probanden und Probengewinnung.....	22
3.2.2	Isolation einer reinen Population humaner PMN.....	23
3.2.3	Vitalfärbung und Bestimmung der Zellzahl.....	24

3.2.4	HBO.....	25
3.2.5	Bestimmung der Produktion von <i>Neutrophil extracellular traps</i>	26
3.2.6	Bestimmung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies.....	26
3.2.7	Bestimmung der Chemotaxis.....	27
3.2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	28
3.2.9	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
3.2.10	Western Blotting.....	30
3.2.11	Immunoblotting.....	31
3.2.12	Blot-Stripping.....	32
3.2.13	Statistik.....	32
4	Ergebnisse	
4.1	Der Effekt der HBO auf die Freisetzung von <i>cell free DNA</i>	34
4.2	Der Effekt der HBO auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies.....	35
4.3	Der Effekt der HBO auf die Chemotaxis.....	37
4.4	Der Effekt der HBO auf die Phosphorylierung der p38 MAPK.....	37
4.5	Der Effekt der HBO auf die Phosphorylierung der ERK MAPK.....	38
4.6	Der Effekt der HBO auf die Expression von Mcl-1.....	39
5	Diskussion	
5.1	Stimulierbarkeit der polymorphnukleären Granulozyten mit Phorbol 12-Myristate 13-Acetate.....	42
5.2	Effekte der hyperbaren Oxygenierung auf die PMN-Aktivität.....	43
5.3	Ausblick.....	50
6	Literaturverzeichnis.....	52
7	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Trauma

1.1.1 Die Immunantwort nach schwerem Trauma

Schwere Traumata sind die häufigste Todesursache von Patienten jünger als 40 Jahre in Deutschland (Lefering 2008) und den USA (Lenz et al. 2007). Neben den primären Traumafolgen und den besonders in den ersten 24 h auftretenden Komplikationen wie Hypoxie, Hypovolämie und den Folgen schwerer Schädel-Hirn-Traumata sind die Betroffenen im weiteren Verlauf verstärkt durch die Veränderungen der Immunantwort nach schwerem Trauma gefährdet. So entwickeln viele der Patienten, die an den Spätfolgen des Traumas versterben, im Verlauf ein *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) (Lenz et al. 2007). Durch den Konsens des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* wird SIRS durch das Vorhandensein von wenigstens zwei der in Tabelle 1 aufgeführten Parameter definiert (Bone et al. 1992).

Tabelle 1 Klinische Parameter des *systemic inflammatory response syndromes* (SIRS), für die Diagnose eines SIRS müssen mindestens zwei der aufgeführten Parameter vorhanden sein

Herzfrequenz	> 90 / min
Atemfrequenz	> 20 / min, alternativ Hyperventilation mit Abfall des arteriellen CO ₂ -Partialdruckes unter 32 mmHg
Temperatur	> 38°C oder < 36°C
Leukozyten	> 12.000 / mm ³ oder < 4.000 / mm ³ oder ≥ 10% juvenile neutrophile Granulozyten

Als Folge dieser überschießenden Immunantwort entwickeln die Patienten häufig multiple Organdysfunktionen (*multiple organ dysfunction syndrome*, MODS (Mannick et al. 2001)) bis hin zum Multiorganversagen (MOV). Hierbei kommt es durch Endothelschäden, Leukozytenakkumulation, Mikrozirkulationsstörungen und disseminierte intravasale Koagulation zu apoptotischem und nekrotischem Untergang der endothelialen und parenchymatösen Zellen (Keel & Trentz 2005).

Gleichzeitig versucht der Organismus, die überschießende Immunreaktion zu supprimieren, es kommt zum *compensatory antiinflammatory response syndrome* (CARS). Die Immunantwort kann durch diesen Prozess nicht mehr ausreichend auf Pathogene reagieren und die Patienten haben ein erhöhtes Risiko, an nosokomialen Infektionen zu erkranken. Infektionen zu diesem Zeitpunkt können zu einer Sepsis führen, in Folge ein MODS bedingen und in schwerwiegenden Fällen tödlich verlaufen (Mannick et al. 2001).

SIRS und CARS können auch gleichzeitig in relativ ausgeglichener Ausprägung vorhanden sein. In diesem als MARS (*mixed antagonist response syndrome*) bezeichneten Zustand überwiegt weder die überschießende noch die supprimierte Immunantwort deutlich, das Immunsystem ist dennoch zu keiner adäquaten Abwehrleistung in der Lage und die Patienten sind nicht fähig, ausreichend auf Pathogene wie Mikroorganismen zu reagieren (Abb. 1) (Keel & Trentz 2005).

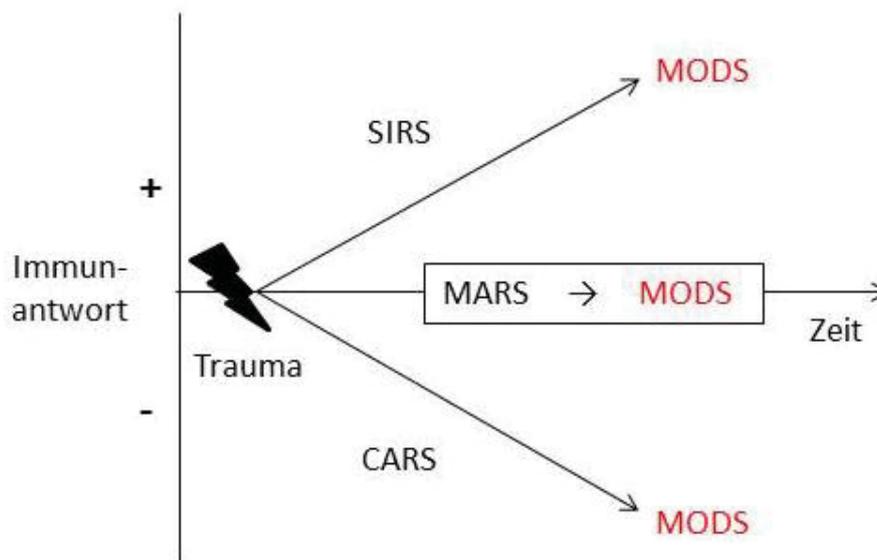


Abb. 1 Die Immunantwort nach schwerem Trauma wird durch ihre pro- und antiinflammatorischen Komponenten bestimmt. Kommt es nach schwerem Trauma zu einer Überaktivierung der Immunantwort, besteht für die Patienten ein deutlich erhöhtes Risiko, als Folge des SIRS multiple Organdysfunktionen zu erleiden. Gleichzeitig werden durch den Organismus antiinflammatorische Prozesse eingeleitet, die zum CARS und infolge dessen besonders im Rahmen von Infektionen ebenfalls zu multiplen Organdysfunktionen führen können. Überwiegen weder SIRS noch CARS kommt es zu MARS, einer Situation, in der zwar keine extreme Immunreaktion überwiegt, das Immunsystem sich aber in einem paralytischen Zustand befindet und eine adäquate Reaktion auf Pathogene nicht möglich ist. *SIRS = systemic inflammatory response syndrome, CARS = compensatory antiinflammatory response syndrome, MARS = mixed antagonist response syndrome, MODS = multiple organ dysfunction syndrome*, Modifiziert nach (Keel & Trentz 2005)

Lässt sich zusätzlich zu den Symptomen eines SIRS blutkulturell die Infektion mit einem mikrobiellen Erreger nachweisen, spricht man von Sepsis. Bei einer Sepsis liegt eine

systemische Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion vor, die in schwerwiegenden Fällen zum Multiorganversagen bis hin zum Tod des Patienten führen kann (Bone et al. 1992).

Die Inzidenz des MOV bei Patienten nach schwerem Trauma (ISS > 16, *Injury Severity Score*) lag in Deutschland zwischen 2002 und 2011 bei etwa 33%, die durch das MOV bedingte Mortalität unter den betroffenen Patienten betrug im selben Zeitraum etwa 43%. Besonders gefährdet waren Patienten höheren Alters sowie Patienten mit hohem ISS. Auch das Verletzungsmuster, vor allem das Vorhandensein schwerer Kopfverletzungen, zeigte sich für die potentielle Entwicklung des MOV von Relevanz (Fröhlich et al. 2014).

1.1.2 Posttraumatische intensivmedizinische Versorgung

Patienten nach schwerem Trauma bedürfen einer interdisziplinären Therapie unter ständiger Überwachung auf einer Intensivstation (Waydhas & Nast-Kolb 1999). Zum Monitoring gehören die arterielle Blutdruckmessung mit der Kontrolle des MAP (*mean arterial pressure*, Zielwert ≥ 65 mmHg (Briegel & Möhnle 2013)), die Überwachung der Sauerstoffsättigung und der Herz- und Atemfrequenz sowie der Körpertemperatur und der Diurese (Waydhas & Nast-Kolb 1999). In engmaschigen Abständen erfolgen eine laborchemische Untersuchung des Blutes mit Bestimmung der Blutgerinnungswerte, der Elektrolyte, des Blutzuckers und des Laktatwertes sowie eine Blutgasanalyse. Zusätzlich werden regelmäßig die Organfunktionen und die Infektionsparameter bestimmt und ein Blutbild mit Bestimmung des Hämoglobinwertes angefertigt (Waydhas & Nast-Kolb 1999). Wurde der Patient nicht bereits im präklinischen Bereich oder im Rahmen einer sofortigen Operation intubiert, wird eine entsprechende Indikation (z.B. Gefährdung der Atemwege, verminderter Atemantrieb, stark erhöhte Atemarbeit, gestörter Gasaustausch) im Rahmen der Intensivbetreuung überprüft (Waydhas & Nast-Kolb 1999). Da es sich oft um junge Patienten handelt, gilt es die Konstitution des Patienten zu berücksichtigen und die Therapie gezielt an diese sowie an das Verletzungsmuster anzupassen (Martin et al. 2010). Zur grundlegenden pharmazeutischen Therapie gehören eine adäquate Analgosedierung sowie die Gerinnungsprophylaxe. Soweit notwendig erhalten die Patienten eine Volumentherapie und Erythrozyten- bzw. Thrombozytenkonzentrate. Eine antibiotische Therapie sollte bei isoliertem Vorliegen eines SIRS nicht erfolgen. Dies ist praktisch kaum umsetzbar, da schon bei einem Verdacht auf Sepsis vor einem endgültigen

Erregernachweis mit einer breit aufgestellten antibiotischen Kombinationstherapie begonnen wird. Weitere pharmazeutische Optionen sind von den individuellen Bedürfnissen des Patienten abhängig (Briegel & Möhnle 2013) (Martin et al. 2010). Operative Maßnahmen richten sich nach der Dringlichkeit, den individuellen Voraussetzungen und dem Zustand des Patienten und beinhalten gegebenenfalls primäre Notfalloperationen, auf die zeitversetzt eine endgültige operative Versorgung folgt (Waydhas et al. 2006).

1.2 Polymorphnukleäre Granulozyten (PMN)

1.2.1 Physiologie

Polymorphnukleäre Granulozyten (PMN) bilden mit ca. 65% die größte Fraktion unter den Leukozyten und stellen die erste Abwehrreihe des Immunsystems dar. Sie dienen der Abwehr von Pathogenen wie Pilzen und Bakterien (Akgul et al. 2001). Täglich werden ca. 2×10^{11} PMN im Knochenmark von myeloiden Stammzellen ausgehend gebildet und als ausdifferenzierte Zellen in die Zirkulation entlassen. Ihre physiologische Lebensdauer beträgt meist weniger als 24 Stunden. Werden sie nicht aktiviert gehen sie apoptotisch zugrunde und werden von Makrophagen der Leber, der Milz und des Knochenmarks abgebaut. Reguliert wird dieser kontrollierte Untergang unstimulierter PMN vor allem durch eine Reihe pro- und antiapoptotischer Signalmoleküle, die dem intrinsischen Apoptoseweg angehören (Mccracken & Allen 2014). Hierzu zählen die proapoptotischen Proteine Bad, Bak, Bax und Bid, die aufgrund ihrer relativ langen Halbwertszeit für die kurze Lebensspanne der nicht aktivierten zirkulierenden PMN verantwortlich gemacht werden, sowie das antiapoptotische Mcl-1 und Bcl-1 Protein, deren Halbwertszeit jeweils nur ca. 2-3 Stunden beträgt (Derouet et al. 2004)(Akgul et al. 2001)(Mccracken & Allen 2014).

1.2.2 Aktivierung der PMN

Kommt es zum Kontakt des Organismus mit Pathogenen oder einer Gewebsschädigung, werden die PMN durch Zytokine der ortsständigen Makrophagen und Gewebszellen und das Komplementsystem aktiviert und wandern zügig aus dem Gefäßsystem in die betroffenen Bereiche aus (Hietbrink et al. 2006). Nach Stimulation durch Zytokine wie

TNF- α (Tumornekrosefaktor α) und IL-1 (Interleukin-1) oder Endotoxine exprimieren Endothelzellen E-Selektine (Albelda et al. 1994), durch die im Zusammenspiel mit den in den Blutgefäßen wirkenden Scherkräften und den auf PMN exprimierten L-Selektinen ein loser, reversibler Zellkontakt der PMN mit dem Endothel hergestellt wird (Powner et al. 2007)(Hietbrink et al. 2006). Es kommt zum *Rolling* der PMN entlang des Endothels. Die chemotaktische Stimulation der PMN führt nun zu einer Aktivierung des MAC-1 (CD18/CD11b)-Integrins, das mit dem ICAM-1-Molekül (*Intercellular adhesion molecule*) des Endothels einen stabilen Komplex bildet (Hietbrink et al. 2006), woraufhin die Migration aus dem Gefäßsystem in das Gewebe stattfindet (Powner et al. 2007).

1.2.3 Abwehrmechanismen der PMN

Am Ort der Infektion angekommen verfügen PMN über multiple Abwehrmechanismen. Einer dieser Mechanismen ist die Beseitigung der Pathogene durch Phagozytose und Prozessierung des Pathogens im granula-, säure- und ROS (reaktive Sauerstoffspezies)-haltigen Phagosom. Die PMN gehen anschließend apoptotisch zu Grunde und werden durch Makrophagen abgeräumt (Greenlee-Wacker et al. 2014). Im Rahmen des *respiratory burst* sind PMN in der Lage, Pathogene über eine stark gesteigerte ROS-Produktion anzugreifen und zu schädigen (Dahlgren & Karlsson 1999). Zusätzlich verfügen ausdifferenzierte PMN über verschiedene Formen von Granula, die bereits im Verlauf der Granulopoese im Knochenmark entstehen. Während die primäre azurophile Granula vor allem saure Hydrolasen, Myeloperoxidase und antimikrobielle Proteine enthält, zeichnen sich die spezifische sekundäre Granula durch antibiotisch wirksame Substanzen aus. Die tertiäre Gelatinase-Granula hat kaum antibiotische Wirkung, ist aber durch ihren hohen Gehalt an Matrix-degenerierenden Stoffen, Membranrezeptoren und die Möglichkeit der schnellen Exozytose besonders für die Extravasation von Bedeutung. Sekretorische Vesikel enthalten eine große Menge verschiedener Membranrezeptoren, die während der Exozytose der Vesikel in die Plasmamembran der PMN eingebaut werden und unter anderem den Kontakt der PMN mit dem Endothel vermitteln (Faurichou & Borregaard 2003).

Ein erst in jüngerer Vergangenheit entdeckter Abwehrmechanismus der PMN ist die Freisetzung von NETs (*neutrophil extracellular traps*) (Papayannopoulos & Zychlinsky 2009)(Brinkmann et al. 2004). Während diesem als NETose genannten Prozess wird durch

die PMN von Granula und antimikrobiell wirksamen Proteinen wie Elastase, Myeloperoxidase und BPI (*bactericidal permeability increasing protein*) sowie den Histonen H1, H2A, H2B, H3 und H4 begleitetes dekondensiertes Chromatin ausgeschleust (Ma & Kubes 2008). Diese DNA-Netze sind in der Lage, eine große Bandbreite von Bakterien einzufangen und sie mit Hilfe der begleitenden antimikrobiell wirksamen Peptide unschädlich zu machen (Brinkmann et al. 2004). Am Anfang dieses Prozesses steht die Aktivierung der PMN über verschiedene Zytokine und Mediatoren, die von ortsständigen Makrophagen und Gewebszellen sezerniert werden. Die im Folgenden aktivierte intrazelluläre Kaskade von Kinasen führt über eine Phosphorylierung der NOX (NADPH-Oxidase, s. u.) zu einer gesteigerten Produktion von ROS (Yamamori et al. 2000), welche eine essentielle Voraussetzung für die Bildung von NETs sind (Hakkim et al. 2011)(Gray et al. 2013). Zu potentiellen Aktivatoren der NOX zählen die p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinasis*) (Yamamori et al. 2000) und der Raf-MEK-ERK Signalweg (Hakkim et al. 2011), die gleichzeitig über eine Phosphorylierung und Inaktivierung von Caspasen die Apoptose zugunsten der NETose unterdrücken können (Hakkim et al. 2011)(Alvarado-Kristensson et al. 2004). Während der NETose verliert der Nukleus zunächst seine lobuläre Morphologie, im Verlauf lösen sich erst die intrazellulären Membranen und schließlich auch die Zytoplasmamembran auf. Dieser Prozess unterscheidet sich von den Vorgängen der Apoptose und Nekrose und scheint eine eigene Art des kontrollierten Zelltodes darzustellen (Fuchs et al. 2007).

1.2.4 Die Rolle der MAPK in PMN

Zu den drei prominenten MAPK in PMN gehören die p38 MAPK, die ERK MAPK und die JNK (*C-Jun NH₂-terminal* MAPK), die in viele intrazelluläre Signalwege eingebunden sind (Akgul et al. 2001). Aktiviert werden die Serin-/Threoninkinasen im Rahmen der Phosphorylierungskaskaden z.B. durch MAP Kinasen (Hazzalin et al. 1996)(Keesler et al. 1998) und über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (El Benna et al. 1996), aber auch durch künstliche Stimulatoren wie PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat), welches als Strukturanalogon zu DAG (Diacylglycerin) die MAPK über einen PKC (Proteinkinase C)-abhängigen Mechanismus aktiviert (Krump et al. 1997)(Gray et al. 2013). Die MAPK-Signalwege spielen eine zentrale Rolle für die Regulation der Abwehrleistung und der Apoptose der PMN. In Folge der intrazellulären Signalkaskaden über die p38- und ERK-MAPK kommt es zu verschiedensten Konsequenzen für die Zelle. So führt die

Phosphorylierung der unten beschriebenen NOX durch diese MAPK zu einer gesteigerten ROS-Produktion (El Benna et al. 1996). Auch haben die MAPK Einfluss auf verschiedene Caspasen. Eine Phosphorylierung der Caspasen-3 und -8 bzw. deren Procaspasen durch die p38 MAPK führt zu einer verzögerten Apoptose der PMN (Alvarado-Kristensson et al. 2004). Der Raf-MEK-ERK-Signalweg hemmt die Apoptose über Einflussnahme auf die Caspase-9 (Allan et al. 2003). Zusätzlich verringert die Signaltransduktion über die ERK MAPK die Apoptose der PMN durch eine Stabilisierung des Mcl-1-Proteins, das in Konsequenz verzögert durch Proteasen abgebaut wird (Derouet et al. 2004). Aktivierung der p38 MAPK als Folge einer Hypoxie resultiert in einem Anstieg der Mcl-1-Expression in PMN (Leuenroth et al. 2000). Über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren hat die Aktivierung der MAPK Relevanz für das Genexpressionsmuster in den PMN (Hazzalin et al. 1996).

1.2.5 Die Rolle der NADPH-Oxidase in PMN

Die NOX (NADPH-Oxidase) ist ein zentrales Enzym in der Aktivierung der verschiedenen Abwehrmechanismen der PMN. Sie besteht aus den Untereinheiten gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox, p40phox, Rac2 und Rap1A, von denen die ersten beiden membrangebundene Komponenten darstellen (Clark 1999). Nach Stimulation der PMN findet eine Translokation der p47phox-, der p67phox- und der Rac2-Untereinheiten zur Plasmamembran statt (Clark 1999)(Stolk et al. 1994). Die p47phox-Untereinheit bildet auch das Ziel der oben beschriebenen intrazellulären MAPK-Signalwege. Sie wird durch die entsprechenden Kinasen an ihrem C-terminalen Ende phosphoryliert und damit verstärkt aktiviert (Clark 1999). Die Aktivierung der NOX resultiert in einem Anstieg der ROS-Produktion, ein Prozess welcher der Abwehr verschiedenster Pathogene dient (Hietbrink et al. 2006) und essentiell für die Induktion der NETose ist (Hakkim et al. 2011). Auch führt eine deutlich gesteigerte Aktivität der ROS-Produktion zu einer erhöhten Gefahr der Gewebsschädigungen insbesondere in Patienten nach schwerem Trauma (Hietbrink et al. 2006)(Biffi et al. 1999). Die Gleichung der durch die NOX vermittelten Reaktion lautet wie folgt (Block et al. 1980):



Die hierbei entstandenen Superoxidanionen können nun durch verschiedene Enzyme zu unterschiedlichen ROS wie z.B. H₂O₂ umgesetzt werden (Block et al. 1980).

1.2.6 Veränderungen der PMN nach schwerem Trauma

Für die Entstehung der pathologischen Folgen der Immunantwort nach schwerem Trauma sind nicht zuletzt Veränderungen der PMN verantwortlich. Als Folge des Traumas kommt es vor der Aktivierung der oben genannten Abwehrmechanismen zu einer Verzögerung der Apoptose (Biffl et al. 1999)(Biffl et al. 2001) und zum *Priming* der PMN. Zu den Mediatoren des *Priming* zählen z.B. GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), INF- γ (Interferon- γ), TNF- α , Substanz P, IL-1, IL-6, IL-8, PAF (*platelet-activating factor*) und der Komplementfaktor C5a (Lloyds et al. 1995) (Ogura et al. 1999). Eine Folge des *Priming* ist die erhöhte Sensibilität der PMN für aktivierende Stimuli, deren Konsequenz unter anderem die gesteigerte Produktion von ROS ist (Ogura et al. 1999). So führt das *Priming* zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Nukleus und in Folge zu einer gesteigerten Expression der NADPH-Oxidase, deren Aktivität gleichzeitig erhöht ist (Shih et al. 2010). Auch die PMN-Migration in die betroffenen Gewebe nimmt zu. Das „*2-hit-model*“ geht davon aus, dass die PMN bereits durch das primäre Trauma innerhalb weniger Stunden ein im Rahmen des *first hit* induziertes *Priming* erfahren (Biffl et al. 1999), sich also in einem Zustand unterschwelliger Erregung befinden. Ein *second hit* in Form eines weiteren endogenen (z.B. Hypoxie, kardiovaskuläre Instabilität, metabolische Azidose) oder exogenen (z.B. massive Transfusionen, spätere chirurgische Eingriffe) Reizes erhöht die Gefahr eines MOV für den Patienten deutlich (Keel & Trentz 2005) (Dunham et al. 1995). Dies zeigt sich besonders zwischen Tag 2 und Tag 5 nach Trauma (Ogura et al. 1999).

Für die verzögerte Induktion der Apoptose der PMN nach schwerem Trauma sind verschiedene Mediatoren beschrieben: PAF oder PAF-ähnliche proinflammatorische Phospholipide scheinen eine verzögerte Apoptose der PMN über den PKC Signalweg zu bedingen (Biffl et al. 2001). Andere Mediatoren der unterdrückten Apoptose sind z.B. IL-8, INF- γ und GM-CSF (Kettritz et al. 1998) (Colotta et al. 1992).

Eine Folge der starken Aktivierung der PMN ist die Zerstörung endothelialer und parenchymatöser Zellen der betroffenen Organe. Die ausgeschütteten Substanzen wie ROS, proteolytische Enzyme und NETs richten sich nun nicht nur gegen potenzielle Pathogene, sie führen auch zu Schäden des lokalen Gewebes. Es kommt zur Dysfunktion bis hin zum Versagen des kompletten Organs (Biffl et al. 1999). Gleichzeitig führt die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-8 und TNF- α zur Stimulation weiterer PMN (Tsukamoto et al. 2010). Diese führen nach verstärkter Aktivierung auch zu

Beeinträchtigungen der Endothelzellen, deren Folgen eine gesteigerte Expression der Adhäsionsmoleküle mit Schwellung der Endothelzellen, eine Veränderung der Permeabilität und eine endotheliale Dysfunktion sind (Tsukamoto et al. 2010).

1.3 Hyperbare Sauerstofftherapie (HBO-Therapie)

1.3.1 Grundlagen der HBO-Therapie

Die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff ist bei verschiedensten Befunden indiziert. Sie findet in Deutschland in der Regel in Mehrpersonenkammern statt, diese bieten oft auch die Möglichkeit, intensivpflichtige bettlägerige Patienten zu beherbergen. Der Überdruck wird in diesen Kammern mit Luft erreicht, den Sauerstoff atmen die Patienten über eine Maske oder, z.B. bei orofazialen Wunden, über ein den Kopf umgebendes Zelt ein (Wiese et al. 2006). Da die Patienten auch Sauerstoff in hohen Konzentrationen abatmen, wird die ausgeatmete Luft aus der Kammer abgeleitet. Eine Anreicherung des Sauerstoffes in der Mehrpersonenkammer würde eine zu große Brandgefahr darstellen. In den USA findet man auch häufiger die Behandlung meist liegender Patienten in Einpersonenkammern, die mit 100% Sauerstoff geflutet werden (Wiese et al. 2006) (Frey et al. 1998).

Der Patient ist im Rahmen der Therapie in der Druckkammer 100% Sauerstoff mit einem den Umgebungsluftdruck übersteigenden Druck ausgesetzt (Kemmer & Bühren 2004). Dieser Behandlungsdruck liegt im Bereich von 240-300 kPa (Wiese et al. 2006). Der durch den Patienten alveolär aufgenommene Sauerstoff wird nun nicht nur gebunden an Hämoglobin sondern nach den Gesetzen von Dalton, Henry und Boyle-Mariorette mit steigender Sauerstoffkonzentration und erhöhtem Umgebungsdruck vermehrt auch physikalisch gelöst im Blutkreislauf transportiert und gelangt so in die Peripherie (Wiese et al. 2006) (Kemmer & Bühren 2004). Aufgrund des infolge der HBO um das 15 – 20 fache erhöhten arteriellen Sauerstoffpartialdruckes und der damit erhöhten Differenz zwischen Blut und Gewebe kommt es zu einer gesteigerten Diffusion des Sauerstoffes aus der Zirkulation in das Gewebe (Kemmer & Bühren 2004). Durch das erhöhte Konzentrationsgefälle ist eine Oxygenierung minderperforierter Gewebsareale über eine erhöhte Diffusionsstrecke erleichtert, die HBO-Therapie kann die Versorgung durch die Mikrozirkulation allerdings nicht vollständig ersetzen (Frey et al. 1998).

1.3.2 Indikationen und Risiken der HBO-Therapie

Am häufigsten dient die HBO zur Therapie der Kohlenstoffmonoxidvergiftung, sie findet jedoch auch in der Therapie zum Beispiel nach Dekompressionsunfällen und bei Wundheilungsstörungen, Kompartmentsyndromen, Verbrennungen, Osteomyelitiden oder nekrotisierenden Weichteilinfektionen und Abszessen Anwendung (Ganguly et al. 2002) (Wiese et al. 2006). Ein Effekt der HBO-Therapie ist ihre vasokonstriktorische Wirkung. Durch die verminderte Abgabe des an Hämoglobin gebundenen Sauerstoffs muss ein größerer Anteil des CO₂ physikalisch gelöst im Blut transportiert werden. Durch den gesteigerten CO₂-Partialdruck kommt es zu einer Stimulation des Atemzentrums mit kompensatorischer Hyperventilation und Absenkung des pCO₂ unter den Ausgangswert. Die Folge ist eine Vasokonstriktion bei Erhalt bzw. Wiederherstellung einer ausreichenden Oxygenierung des Gewebes (Frey et al. 1998). Dies sorgt für einen lokalen antiödematösen Effekt z.B. bei Patienten mit traumatisch entstandenen Verletzungen (Kemmer & Bühren 2004). Die Indikation zur HBO-Therapie muss sorgfältig gestellt werden, da sie meist den Transport des Patienten in ein entsprechendes Zentrum bedeutet und während der Überdruckphase eine Notfallbehandlung des Patienten in der Kammer nur eingeschränkt möglich ist. (Wiese et al. 2006).

Die Behandlung des Patienten in der HBO-Kammer kann zu verschiedenen unerwünschten Effekten führen, sehr selten kommt es zu schwerwiegenden Komplikationen (Kemmer & Bühren 2004). Durch der Differenz zwischen dem Umgebungsdruck und dem Druck in knochenumschlossenen Lufträumen kann es zu Barotraumata vor allem im Bereich des Mittelohres und der Nasennebenhöhlen kommen, die sich in Schmerzen und Blutungen äußern und in extremen Fällen in einer Ruptur des Trommelfells resultieren (Frey et al. 1998). Eine weitere Gefahr besteht in den toxischen Effekten des Sauerstoffes auf das zentrale Nervensystem, die von Beeinträchtigungen wie Sehstörungen, Schwindel oder Benommenheit bis hin zu epileptiformen Anfällen führen können (Kemmer & Bühren 2004)(Frey et al. 1998). Kommt es unter den Druckbedingungen der Behandlung bei vorbestehender partieller Stenose zu einem funktionellen Verschluss einzelner Bronchialabschnitte, kann es in der Dekompressionsphase durch mangelnde Ausdehnungskapazitäten der Gase in den abgeschlossenen Lungenbereichen zu einem Überdruck kommen, der eine Ruptur der Alveolarmembranen bedingen kann und im Extremfall in einem Spannungspneumothorax oder einer arteriellen Luftembolie gipfelt.

Dies bedeutet eine besonders sorgfältige Überprüfung der Indikation und Durchführung bei Patienten mit obstruktiven Lungenerkrankungen (Frey et al. 1998).

1.3.3 Effekte der HBO-Therapie

Auf zellulärer Ebene sind verschiedene Auswirkungen der HBO beschrieben. Durch die HBO wird das Sauerstoffangebot im Gewebe erhöht und so unter Anderem Einfluss auf die Genexpressionsmuster der Zellen genommen (Tompach et al. 1997). Über die Modifikation der Genexpressionsmuster und der Einflussnahme auf intrazelluläre Signalwege ist die HBO in der Lage, beispielsweise die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu beeinflussen (Lin et al. 2014). Als Folge der HBO zeigte sich in Studien mit Jurkat-T-Zellen und HL-60-Zellen eine gesteigerte Apoptoserate (Weber et al. 2009)(Ganguly et al. 2002), deren Ursache in einer Induktion des mitochondrialen Apoptosewegs über die Depolarisation der mitochondrialen Membran und die Aktivierung der Caspasen-9 und -3 beschrieben wird (Weber et al. 2009). Andererseits ließ sich in degenerierten Zellen der *disci intervertebrales* nach HBO eine gesteigerte Expression des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins und eine verringerte Expression des proapoptotischen Bax-Proteins sowie eine verminderte Expression der Caspase-3 und Caspase-9 messen, was für einen antiapoptotischen Effekt der HBO auf diese Zellen spricht (Niu et al. 2013). Auch wird eine gesteigerte intrazelluläre ROS-Produktion nach HBO für HL-60-Zellen und pankreatische Zellen beschrieben (Matsunami et al. 2011)(Ganguly et al. 2002). In den Neuronen der Großhirnrinde zeigten Versuche mit Ratten allerdings eine verringerte Expression der gp91 Untereinheit der NOX nach subarachnoidaler Blutung, die mit einer verminderten ROS-Produktion einherging (Ostrowski et al. 2006). Ein immunsuppressiver Aspekt der HBO ist die Reduktion der Aktivität der B- und T-Lymphozyten (Saito et al. 1991).

Die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff hat Auswirkungen auf verschiedene intrazelluläre Signalwege. Als Folge der HBO kommt es zu einer verminderten Phosphorylierung und damit zu einer reduzierten Aktivität der p38 und ERK MAPK in degenerierten Zellen der *disci intervertebrales* (Niu et al. 2013)(Niu et al. 2011). Stromabwärts nehmen diese Signalwege unter anderem Einfluss auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Niu et al. 2011) und führen in aktiviertem Zustand zu einer Phosphorylierung der p47phox-Untereinheit der NOX, die zu einer verstärkten ROS-

Produktion führt, und zu einer Phosphorylierung der Caspase-8, Caspase-9 und Caspase-3 (Alvarado-Kristensson et al. 2004)(Allan et al. 2003). Diese Caspasen sind in phosphoryliertem Zustand inaktiv, phosphorylierte Procaspasen werden nicht prozessiert, die Apoptose ist folglich bei aktivierten MAP-Kinasewegen vermindert (Alvarado-Kristensson et al. 2004)(Allan et al. 2003). In PMN beeinträchtigt die HBO nach *in vivo*-Exposition die Fähigkeit zu Adhäsion an des Endothel und beeinflusst Membranrezeptorinteraktionen (Kalns et al. 2002) (Labrousche et al. 1999).

In Versuchen mit Ratten konnte sich ein protektiver Effekt der HBO nach Zymosan-induzierter Inflammation beobachten lassen. Die der HBO exponierten Ratten entwickelten geringere Organschäden und weniger ausgeprägte Symptome eines MOV als die Ratten der nicht-exponierten Kontrollgruppe, auch die Mortalität in der HBO-Gruppe war deutlich geringer. Als Folge der HBO wird für diese Ratten eine geringere Gewebskonzentration der Myeloperoxidase als Marker für die Infiltration mit PMN und eine verminderte Auswirkung des Zymosans auf die Blutgerinnung und die Blutgase beschrieben (Cuzzocrea et al. 2000)(Imperatore et al. 2006). Ein weiterer protektiver Effekt ist die gesteigerte Produktion antioxidativ wirksamer Enzyme und der dadurch reduzierten ROS-induzierten Schäden durch die HBO in verletztem ischämischem Gewebe (Zhang & Gould 2013).

2 Fragestellung

Patienten nach schwerem Trauma sind durch die folgende Immunantwort einer erhöhten Gefahr ausgesetzt, Einschränkungen der Organfunktionen bis hin zum lebensbedrohlichen Multiorganversagen zu erleiden. Für diese Beeinträchtigungen sind die zur Abwehr von Pathogenen benötigten Mechanismen der PMN grundlegend mitverantwortlich. Die verzögerte Apoptose und die gesteigerte Produktion und Freisetzung von ROS, NETs und proteolytischen Proteinen sowie die starke Aktivierung der endothelialen Adhäsionsmoleküle führen in vielen Fällen zu einer für den Patienten bedrohlichen Organdysfunktion. Ist der Organismus in der Lage, die überschießende Immunantwort zu unterdrücken, ist der Patient einer Infektion nahezu schutzlos ausgeliefert.

Bisherige Studien haben gezeigt, dass aus der im Rahmen der Therapie verschiedener Erkrankungen bereits etablierten HBO-Therapie unterschiedliche Konsequenzen auf zellulärer Ebene resultieren. Dies betrifft unter anderem die Aktivierung der MAPK, der NOX und die darauffolgenden Prozesse. Da diese Signalwege und Enzyme eine zentrale Rolle in der Aktivierung der PMN-vermittelten Immunreaktion innehaben, liegt in ihnen ein potentiell Ziel therapeutischer Maßnahmen zur Prävention der immunbedingten Traumafolgen. Ob und in welcher Form die HBO-Therapie Auswirkungen auf die Aktivierung der PMN in Patienten nach schwerem Trauma hat, wurde anhand verschiedener zentraler Parameter im Vergleich zu den PMN gesunder Probanden untersucht. Da die Produktion von NETs und ROS bei der Entstehung von Gewebsschäden maßgeblich beteiligt ist, wurde die Konzentration von NETs in den Überständen der PMN sowie die Produktion von intrazellulärem ROS photometrisch bestimmt. Ob es einen Effekt der HBO auf die Chemotaxis der PMN gibt, wurde durchflusszytometrisch überprüft. Im Western Blot Verfahren wurde die Phosphorylierung der p38 und der ERK MAPK als Bestandteil zentraler intrazellulärer Signalwege quantifiziert. Mit der gleichen Methode wurde auch die Relevanz der HBO für die Expression des antiapoptotischen Mcl-1 Proteins bestimmt.

Die Ergebnisse der Studie sollen erste Aufschlüsse liefern, ob die HBO-Therapie PMN-vermittelte organschädigende Prozesse nach schwerem Trauma supprimieren könnte und somit eine Option für die Prävention und Therapie des posttraumatischen SIRS bieten würde.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Software

3.1.1 Geräte

Gerät	Gerätenummer
<i>Allegra 6KR Centrifuge</i> , Beckman und Coulter	45265
ChemiDoc Detektier-System, BioRad	57624
FACScalibur, BD Biosciences Heidelberg	71478
HAUX-TESTCOM 200/2 (HBO-Kammer), HAUX.LIFE-Support	200 832
Hera Cell 150 Inkubator, Thermo	
HERAEUS FRESCO 17, Tischzentrifuge, Thermo	55271
Lichtmikroskop Axiovert 40 C, Zeiss	57553
Megafuge 1.0R Heraeus	54390
<i>Mini-PROTEAN Tetra Cell</i> , BioRad	67374
Trans-Blot Turbo Transfer System, BioRad	68408
Ultraschallgerät UP50H, Sonotrode MS1, Welabo	57314

Victor ³ <i>Multilabel Reader</i> , Perkin Elmer	57134
---	-------

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Material-/Bestell-Nr.
<i>Butterfly</i> -System	
<i>Casting Frames</i> , BioRad	165-3304
<i>Casting Stand</i> , BioRad	165-3303
<i>CountBright Absolute Counting Beads</i> , Invitrogen	Molecular Probes Art. VXC36950
FACS-Röhrchen 6 ml, BD Falcon	352052
Falconröhrchen 15 ml	
Falconröhrchen 50 ml	
Filterpapier 2,5 mm, Invitrogen	LC2010
96-F-Mikrotiterplatten	
Glasplatten 1,0 mm, BioRad	165-3329
Heparinröhrchen	
Neubauer-Zählkammer	

Nitrocellulose-Membran (0,2 µm), BioRad	162-0112
<i>Roti-Mark Western Set</i> , Roth	0947.1
<i>Tissue Culture Inserts for Multiwell Plates, 24-Well</i> , 3µm, Greiner Bio-One	662 630
<i>24-Well-Plate</i> , Cellstar, Greiner Bio-One	662 160
<i>48-Well-Plate</i> , Cellstar, Greiner Bio-One	677 180
96-Well Microplatte Schwarz, Greiner	655076

3.1.3 Kits

<i>ECL Western Blotting Substrate-Kit</i> , BioRad	
<i>Pierce BCA Protein Assay Kit</i> , Thermo	23225

3.1.4 Chemikalien

30% Acrylamide/Bis Solution 37,5, 5:1, BioRad	161-0158
0,83% Amoniumchlorid / Sigma	A9434
APS, Sigma	A-3678

Bromphenolblau, Roth	A512.1
BSA, PAA	K41-001-100
Complete, Mini, Roche	11 836 153 001
Dihydrorhodamine-123, Santa Cruz Biotechnology	Sc-203027
<i>ds-DNA-Standard from Calf Thymus</i> , Sigma	D-4810/D-1501
0,004% EDTA	
FCS-Gold fötales Kälberserum, PAA	A15-649
Glycin, Roth	3908.2
Glycerol, Roth	3783.1
0,1% KHCO ₃	
Mercaptoethanol, Sigma	M7154
Methanol, Merck	1.06009.2511
Milchpulver, Roth	T145.2
Na-deoxycholat, Roth	3484.1
Nonidet-P40, Biomol	N3500
Pen-Strep, Invitrogen	15140-148

<i>Percoll Seperating Solution</i> , Biochrom	L6145
<i>Picogreen ds DNA</i> , Molecular Probes	P-7581
Phorbol-12-Myristate 13-Acetate, Sigma	P 1585
Physiologische Kochsalzlösung 0,9%, Delta Select	
PonceauS, Serva	33427
<i>rhIL-8 recomb. Human (E.coli-derived)</i> Zytokin	R&D Cat.No. 208-IL8
<i>Sodium dodecylsulfate (SDS)</i> , Sigma	L-3771
TEMED, Roth	2367.3
Tris Base, Calbiochem	648310
Tris HCl, Calbiochem	648317
Trypanblau	
Tween 20, Sigma	P5927

3.1.5 Medien, Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
Blottingpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 40 ml Transferpuffer • 50 ml Methanol <p style="text-align: center;">ad 500 ml H₂O</p>
4 x Laemmli-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 252 mM Tris-HCl • 40% Glycerol • 8% SDS • 0,01% Bromphenolblau
Laufpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mM Tris, pH 8,3 - 8,8 • 192 mM Glycin • 0,1% SDS
Lysis-Solution	<ul style="list-style-type: none"> • 0,83% Amoniumchlorid • 0,1% KHCO₃ • 0,004% EDTA <p style="text-align: center;">ad 1000 ml H₂O</p>
Medium	<ul style="list-style-type: none"> • RPMI-1640-Medium Biochrome Ag, Berlin • 1% Penicillin / Streptomycin • je nach Versuch 5% oder 10% FCS

PBS (pH 7,2)	<ul style="list-style-type: none"> • NaCl 8 g • KCl 0,2 g • Na₂PO₂ 1,424 g <p>ad 1000 ml H₂O</p>
PonceauS	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1% Ponceau • 3% Essigsäure
RIPA-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mM Tris pH = 8 • 150 mM NaCl • 1% NP-40 • 0,5% Na-deoxycholat • 0,1% SDS
4 x Sammelgelpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 M Tris • 0,4 % SDS
Stripping-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 62,5mM Tris pH 6,8 • 2% SDS
TBS	<ul style="list-style-type: none"> • 7,7 mM Tris pH 7,5 • 150 mM NaCl
Transferpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 12 mM Tris-Base • 96 mM Glycin

4 x Trenngelpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 1,5 M Tris • 0,4 % SDS
--------------------	---

3.1.6 Antikörper

Antikörper	Bestellnummer	Inkubation
<i>GAPDH, Mouse Anti-Human, Novus</i>	NBP2-27103	1:10.000 in 5% BSA in TBS-T, rollend 1,5 Std. bei RT oder bei 4 °C über Nacht
<i>Mcl-1, Mouse Anti-Human, BD Biosciences</i>	559027	1:300 in 1% Milchpulver in TBS-T, rollend 2 Std. bei RT oder bei 4°C über Nacht
<i>Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2), Rabbit Anti-Human, Cell Signaling</i>	#9101	1:800 in 5% BSA in TBS-T, rollend bei 4°C über Nacht
<i>p44/42 MAPK (ERK1/2), Rabbit Anti-Human, Cell Signaling</i>	#9102	1:800 in 5% BSA in TBS-T, rollend bei 4°C über Nacht
<i>Phospho-p38 MAPK, Rabbit Anti-Human, Cell Signaling</i>	#9211	1:800 in 5% BSA in TBS-T, rollend bei 4°C über Nacht
<i>p38 MAPK, Rabbit Anti-Human, Cell Signaling</i>	#9212	1:800 in 5% BSA in TBS-T, rollend bei 4°C über Nacht
<i>Polyclonal Goat Anti-Rabbit-HRP Antibody, Dako</i>	P 0448	1:1.000 in TBS-T, rollend 1,5 Std. bei RT, dunkel

<i>Polyclonal Goat Anti-Mouse- HRP Antibody, Dako</i>	P 0447	1:1.000 in TBS-T, rollend 1,5 Std. bei RT, dunkel
---	--------	--

3.1.7 Software

Software	Verwendungszweck
<i>Cell Quest Pro</i> , BD Biosciences	Durchflusszytometrie
Excel, Microsoft	Auswertung der Daten
<i>GraphPad Prism 5</i>	Statistische Analyse und graphische Darstellung der Daten
<i>Quantity One 4.6.5</i> , BioRad	Detektion und Quantifizierung der Western Blots
Wallac 1420, Perkin Elmer	Bestimmung von ROS und cfDNA im Viktor ³
<i>Work Out 2.0</i> , Perkin Elmer	Bestimmung der Proteinkonzentration im Viktor ³

3.2 Methoden

3.2.1 Auswahl der Probanden und Probengewinnung

Als Probanden für die Versuche wurden intensivpflichtige Patienten nach schwerem Trauma (ISS > 16, *Injury severity score*) ausgewählt. Der ISS der 6 Frauen und 4 Männer betrug im Mittel 41,2 (19 - 57), das Alter der Patienten lag bei durchschnittlich 45,7 Jahren

(30 - 78). Als Kontrolle wurden gesunde freiwillige volljährige Probanden ausgewählt. Alle Patienten bzw. ihre gesetzlichen Vertreter wurden vor der Blutentnahme entsprechend aufgeklärt und willigten in die Teilnahme an dem Projekt ein. Patienten mit führendem Schädel-Hirn-Trauma sowie minderjährige Patienten wurden ausgeschlossen. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Referenz-Nummer 4947).

Um Proben zu gewinnen wurde Blut an Tag 1 oder 2 nach Trauma aus dem arteriellen Zugang der Patienten entnommen. Als Kontrolle dienten PMN aus dem venös entnommenen Blut freiwilliger gesunder Probanden. Die Proben wurden in heparinisierten Röhrchen aufgefangen und anschließend zügig verarbeitet.

3.2.2 Isolation einer reinen Population humaner PMN

Die Isolation humaner PMN erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisiertem Vollblut. Dazu wurden 5 ml Percoll Separating Solution (Biochrom) mit 3,4 ml 0,9% NaCl in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gemischt (Dichte 1,086 g/ml) und vorsichtig mit ca. 5 ml Vollblut überschichtet. Anschließend wurde der Gradient für 30 min bei 2000 rpm und RT (Raumtemperatur) ohne Bremse zentrifugiert. Es bildete sich nun ein Pellet, das sowohl die Erythrozyten als auch die Granulozyten enthielt (Abb. 1). Der Überstand, bestehend aus Plasma und mononukleären Zellen sowie dem Percoll-Gemisch, wurde abgenommen und verworfen. Es folgte die Lyse der Erythrozyten mit 50 ml Amoniumchloridlösung (Lysis-Solution) für ca. 10 min bei 4°C auf Eis und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm. Der Überstand wurde abgeschüttet, es verblieb das Granulozyten-Pellet. Die Granulozyten wurden in ca. 10 ml PBS resuspendiert und anschließend auf 50 ml PBS aufgefüllt. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation bei 1500 rpm wurde der Überstand abgeschüttet und das Pellet in ca. 5 ml PBS resuspendiert.

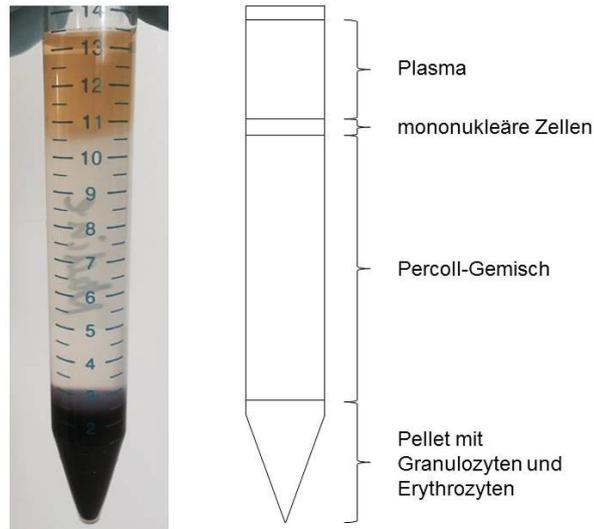


Abb. 1 Dichtegradientenzentrifugation. Nach Schichten der Blutprobe (ca. 5 ml) auf ein Gemisch aus 5 ml Percoll Separating Solution und 3,4 ml NaCl (0,9%) wurde der Gradient für 30 min bei 2000 rpm zentrifugiert. In der oberen Phase befanden sich das Plasma und die mononukleären Zellen, das Pellet enthielt sowohl Granulozyten als auch Erythrozyten. rpm=Umdrehungen pro Minute

3.2.3 Vitalfärbung und Bestimmung der Zellzahl

Die Überprüfung der Zellviabilität und die Bestimmung der Granulozytendichte wurde mittels Trypanblaufärbung (10 µl Probe und 30 µl Trypanblau, 1:4) und Auszählung in der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Trypanblau ist ein polyanionischer Farbstoff, der bei lebender Zelle und intakter Zellmembran nicht in der Lage ist, in das Zellinnere zu gelangen. Zeigen sich in der lichtmikroskopischen Überprüfung unmittelbar nach Zugabe von Trypanblau zu den PMN eine intrazelluläre Blaufärbung, so ist davon auszugehen, dass die PMN nicht lebensfähig sind. Lebensfähige PMN erscheinen vor dem blauen Hintergrund weiß.

Die Neubauer-Zählkammer zeigt unter dem Lichtmikroskop auf dem Objektträger Linien, die vier Großquadrate bilden. Diese Großquadrate sind in je 16 Kleinquadrate unterteilt. Die Kammer wurde zunächst durch vorsichtiges aufpressen des zugehörigen plangeschliffenen Deckgläschens vorbereitet. Wenn nach Anbringen des Deckgläschens die Newtonschen Interferenzringe auf den seitlichen Stegen sichtbar wurden, war die Kammer korrekt vorbereitet und die Aufnahme des definierten Probenvolumens über die so ermöglichte Kapillarwirkung gewährleistet. Die mit Trypanblau verdünnte Probe wurde bis zur vollständigen Füllung in die Kammer pipettiert. Anschließend wurde die Viabilität

der PMN wie oben beschrieben überprüft und die Anzahl der PMN in je vier Kleinquadraten von jedem der vier Großquadrate ausgezählt. Die Zelldichte der Probe wurde nach der folgenden Formel errechnet:

$$\text{Anzahl lebender PMN in } 4 \times 4 \text{ Kleinquadraten} \times 4 \text{ (Verdünnung)} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)} = \text{Anzahl lebender PMN / ml}$$

3.2.4 Hyperbare Oxygenierung (HBO)

Die Zellen wurden nach Isolation und Bestimmung der Zellzahl in RPMI 1640 Medium (Biochrome) mit 1% P / S (Penicillin / Streptomycin) und je nach Versuch 5 oder 10% FCS (*fetal calf serum*) resuspendiert. Die Zelldichte war hierbei vom jeweiligen Versuch abhängig und betrug entweder 2×10^6 oder $2,5 \times 10^6$ Zellen / ml. Anschließend wurden die Zellen auf je zwei 24- bzw. 48-Well-Platten ausgesät. Eine dieser Platten wurde für 2 h einer hyperbaren Sauerstoffbehandlung mit einem Druck von 2 bar in der HAUX-TESTKOM 200/2 HBO-Kammer (Abb. 2) ausgesetzt, die andere parallel neben der Kammer unter konstanten Raumluftbedingungen als Kontrolle bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt.



Abb. 2 HAUX-TESTKOM 200/2 HBO-Kammer. Die Zellen wurden für 2 h einer Sauerstoffüberdruckbehandlung mit 2 bar in der HBO-Kammer ausgesetzt, eine parallel neben der Kammer aufbewahrte Platte diente als Raumluftkontrolle. HBO = hyperbarer Sauerstoff

3.2.5 Bestimmung der Produktion von *Neutrophil extracellular traps*

Die Bestimmung der Menge freigesetzter NETs in den Überständen erfolgte nach Stimulation der PMN mit PMA (20 nM). PMA ist ein Struktur analogon des intrazellulären Signalmoleküls Diacylglycerin (DAG), aktiviert als solches die Proteinkinase C (PKC) und beeinflusst so auch die nachgeschalteten Prozesse. Nach auf die Stimulation folgender Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurde die Produktion von NETs mittels photometrischer Messung der Fluoreszenzaktivität nach Zugabe von Picogreen dsDNA (Molecular Probes) aus den Überständen der abzentrifugierten PMN bestimmt. Dieser Farbstoff bindet an die doppelsträngige *cell free DNA* (cfDNA) in den Überständen, woraufhin sich ein grün-fluoreszierender Komplex bildet. Die Fluoreszenz dieses Komplexes übersteigt die Fluoreszenz ungebundenen Picogreens um mehr als das Tausendfache und steigt proportional zu der in der Probe vorhandenen Menge cfDNA an. Die Überstände wurden gründlich auf dem Vortexmischer aufgemischt und bei 11.500 rpm für zwei min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben sowie der dsDNA-Standard (Sigma, 0 µg / ml – 2 µg / ml) aus Kalbsthymus (Sigma) zu je 50 µl / Well auf eine schwarze 96-Well-Microplatte aufgebracht (vier Wells pro Probe bzw. Standard) und je zwei Wells pro Probe und Standard mit 150 µl PBS bzw. 150 µl 1:1000 mit PBS verdünntem *Picogreen* versetzt. Es folgte die sofortige Messung der Fluoreszenzaktivität im Photometer. Die Moleküle werden bei dieser Methode zunächst bei einer Extinktion (Ex.) von 485 nm energetisch angeregt und damit auf ein höheres Energielevel gebracht. Die Rückkehr auf das ursprüngliche Energielevel findet über ein Zwischenlevel statt, so dass eine Emissionsstrahlung (Em.) entsteht. Diese konnte bei 530 nm im Victor³ *Multilabel Reader* (Perkin Elmer) gemessen werden. Nach der Messung wurde die Konzentration der freigesetzten DNA mit Hilfe des dsDNA-Standardgraphes aus Kalbsthymus bestimmt.

3.2.6 Bestimmung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies

Um die Produktion von intrazellulärem ROS zu bestimmen wurden die PMN nach der HBO zunächst mit PMA (10 nM) stimuliert. Die Messung der Produktion von intrazellulärem ROS wurde sofort bzw. nach an die HBO anschließender dreistündiger Inkubation (37°C, 5% CO₂) mittels Fluoreszenzbestimmung nach Zugabe von Dihydrorhodamin123 (DHR) durchgeführt. DHR ist ein ungeladener, nicht-

fluoreszierender, nicht-toxischer ROS-Indikator, der passiv durch die Zellmembran diffundieren kann und sich in den Mitochondrien anreichert. Durch ROS wird das DHR zu kationischem grün-fluoreszierendem Rhodamin123 oxidiert. Um die nach Stimulation mit PMA induzierte ROS-Produktion zu quantifizieren, wurde die Fluoreszenzaktivität von Rhodamin123 im Victor³ *Multilabel Reader* (Perkin Elmer) gemessen. Hierzu wurden die entstandenen Rhodamin123-Moleküle zunächst mittels Bestrahlung mit Licht energetisch angeregt, woraufhin sie ein höheres Energieniveau erreichten. Als Reaktion kam es während der Rückkehr auf das Ausgangslevel zur Abgabe einer fluoreszierenden Emissionsstrahlung. Diese Emission wurde anschließend bei 485 nm detektiert. Je höher die Anzahl der ROS-Moleküle war, umso mehr DHR konnte zu Rhodamin123 umgewandelt werden und umso größer war auch die gemessene Fluoreszenz der entsprechenden Probe.

3.2.7 Bestimmung der Chemotaxis

Die Chemotaxis der PMN wurde nach Stimulation mit IL-8 (25 ng, Interleukin 8) bestimmt. Nach der HBO wurden die PMN auf Transwells (Porengröße 3 µm) pipettiert, die in die Wells einer mit der Stimulanz bzw. dem Kontrollmedium versehenen 24-Well-Platten installiert waren, und für 30 min inkubiert (37°C, 5% CO₂). Die Transwells wurden entfernt und die Inhalte der Wells in FACS-Röhrchen überführt. Das Zellpellet wurde nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1500 rpm und Abkippen der Überstände in 200 µl PBS resuspendiert. Der Inhalt der Röhrchen wurde mit 20 µl Count Bright Beads (Invitrogen) versetzt und auf dem Vortexmischer gemischt. Anschließend wurde die Anzahl der Beads und der PMN auf 10.000 Ereignisse durchflusszytometrisch im FACScalibur (BD Biosciences) mittels Cell Quest Pro bestimmt. Sowohl die PMN als auch die Beads werden dabei einzeln über eine Mikrokanalküvette in eine Messzelle eingezogen und in dieser fokussiert mit einem Laser bestrahlt. Das dabei entstehende Streulicht ist charakteristisch für eine bestimmte Zellpopulation und dient der Analyse der in der Passage befindlichen Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (Beugung des Lichts im flachen Winkel) gibt Auskunft über das Volumen der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (Abstrahlung im 90° Winkel) ist von Granularität, Form und Größe des Zellkerns sowie von der Anzahl intrazellulärer Vesikel abhängig. Da Granulozyten eine raue Oberfläche haben und viele Vesikel enthalten, kommt es während der Passage durch die Messzelle beispielsweise zu einer großen Menge seitwärts gestreuten Lichts. Mit Hilfe dieser Methode ließ sich auch der Anteil der Beads

auf 10.000 Gesamtereignisse bestimmen und die Anzahl der migrierten PMN aus dem gemessenen Ergebnis berechnen.

3.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Nach Aufnahme der Zellpellets in RIPA-Puffer mit Complete und folgender mechanischer Lyse durch Sonifizierung (zehn Stöße) mit dem Ultraschallgerät UP50H wurden die Proben 1:6 mit PBS verdünnt. Anschließend wurden je zwei Wells einer 96-Well-Platte mit dem Standard (in einer Konzentration von 0 – 2 µg / µl) bzw. der zu messenden Probe versehen. Mittels Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo) konnte nun die Proteinkonzentration nach Herstellerangaben bestimmt werden. Jedes zu messende Well wurde mit 200 µl *BCA Working Agent* versehen. Hierbei wird Cu^{2+} durch das Protein in alkalischem Medium zu Cu^+ reduziert, welches in einem zweiten Schritt mit Biochinonsäure reagiert und mit dieser einen wasserlöslichen farbigen Komplex bildet. Dessen mit steigender Proteinkonzentration steigende Absorption kann bei 562 nm photometrisch im Victor³ bestimmt werden. Bei dieser Methode werden die Proben mit einer definierten Menge Licht bestrahlt. Die Energie wird von den Molekülen absorbiert und versetzt sie kurzzeitig auf ein höheres Energielevel. Durch Messung der nicht absorbierten Menge Lichts kann die absorbierte Menge errechnet werden. Je mehr Licht absorbiert wird, umso größer ist auch die Proteinkonzentration. Anhand des Standardgraphes des parallel gemessenen Standards bovines Albumins konnte so unter Berücksichtigung der Verdünnung die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

3.2.9 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für das SDS-PAGE-Verfahren wurden 10% ige diskontinuierliche Acrylamidgele mit je 15 Wells gegossen und verwendet (Tab. 1). Diese bestehen aus einem grobporigen Sammelgel, in dem die Proteine zunächst zu einer scharfen Bande konzentriert werden, und einem feinporigen Trenngel, in dem die größenspezifische Auftrennung der Proteine stattfindet. Die Gele wurden in das Mini-PROTEAN Tetra Cell-System (BioRad) installiert (Abb. 3). Das System wurde daraufhin mit Laufpuffer aufgefüllt und die Kämme aus den Gelen entfernt. Es folgte das Spülen der Wells um eventuelle Gelpartikel zu entfernen.

Tabelle 1 Zusammensetzung der Gelkomponenten eines für die SDS-PAGE verwendeten diskontinuierlichen Gels (10%)

Gelkomponente	Zusammensetzung
Sammelgel	<ul style="list-style-type: none"> • H₂O 3 ml • 30% Acrylamid 650 µl • 4 x Sammelgelpuffer 1,25 ml • TEMED 10 µl • 10% APS 25 µl
Trenngel 10%	<ul style="list-style-type: none"> • H₂O 3,125 ml • 30% Acrylamid 2,5 ml • 4 x Trenngelpuffer 1,875 ml • TEMED 10 µl • 10% APS 25 µl

Je 20 µg der aufzutrennenden Proben wurden mit 20% igem β-Mercaptoethanol in Lämmli-Puffer versetzt und anschließend gevortext, kurz bei 13.300 rpm zentrifugiert und bei 95°C für 7 min denaturiert. Das im Laemmli-Puffer sowie in Trenn- und Sammelgel und im Laufpuffer enthaltene SDS (*sodium dodecylsulfate*, Natriumdodecylsulfat) sorgt als anionische Detergenz für eine negative Gesamtladung aller Proteine. Durch diese Überdeckung der Eigenladung und die Reduktion von Disulfidbrücken durch das β-Mercaptoethanol sowie die Lösung der Wasserstoffbrücken durch das Erhitzen und der damit verbundenen Auftrennung der Sekundär- und Tertiärstrukturen war die Kettenlänge der Proteine nun proportional zu ihrem Molekulargewicht. Die Proben wurden in die Taschen des Sammelgels aufgetragen, ebenso der Roti-Mark-Proteinmarker. Damit sich die Proteine in diesem grobporigen Gel sammeln, wurde der Gellauf zunächst bei 60 V gestartet. Die anionischen Proteine wanderten im Gel in Richtung der Anode. Nachdem die Proteine das Sammelgel passiert hatten, folgte der Eintritt in das feinporige Trenngel, in

dem die Proteine größenabhängig bei 120 V aufgetrennt wurden. Kleine Proteine durchwanderten das Trenngel deutlich schneller als Proteine mit einem hohen Molekulargewicht.

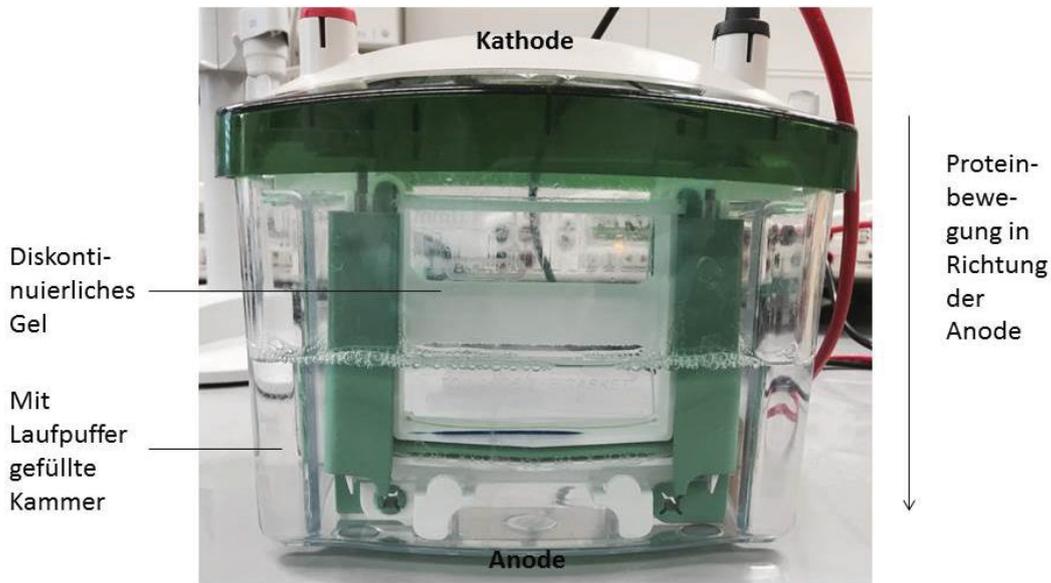


Abb. 3 Mini-PROTEAN Tetra Cell-System (BioRad). Die anionischen Proteine wurden in die Wells des grobporigen Sammelgels aufgetragen und wanderten bei 60 V in Richtung der Anode in das feinporige Trenngel. Hier wurden sie bei 120 V aufgetrennt, je kleiner das Molekulargewicht des Proteins war umso schneller durchwanderte es das Trenngel.

3.2.10 Western Blotting

Auf die SDS-PAGE folgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran via *Semi-Dry Blotting* im Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad). Die Membran und das Gel wurden vor dem Blotting mit dem Transferpuffer getränkt. In dem System wurde das Gel auf die Membran geschichtet, über und unter Gel und Membran befand sich jeweils ein in Transferpuffer getränktes Blatt Filterpapier. Luftblasen wurden vorsichtig mit dem Handroller entfernt. Der Transfer fand bei 25 V statt, wobei die Spannung senkrecht zum Gel angebracht wurde. Die anionischen Proteine wanderten von dem der Kathode näheren Gel auf die der Anode näheren Membran. Auf der Oberfläche der Membran blieben die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Durch das dem Transferpuffer zugesetzten Methanol wurden die Proteine zusätzlich auf der Membran fixiert. Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen wurde die Membran sofort

im Anschluss mit PonceauS gefärbt. Dieser anionische, hydrophile Diazofarbstoff färbt alle auf der Membran haftenden Proteine an. Je mehr Protein sich auf der Membran befindet umso intensiver ist die Färbung der entsprechenden Bande. Nach Überprüfen der Membran wurde der Farbstoff mit destilliertem Wasser und PBS von der Membran gewaschen.

3.2.11 Immunoblotting

Die spezifische Detektion der Proteine erfolgte mittels Zugabe von Erst- und Zweitantikörper und anschließender Bestimmung der Chemilumineszenz. Die Membran wurde in einen 50 ml Falcon gegeben und nach Protokoll des Herstellers des verwendeten Antikörpers für eine Stunde rollend bei RT geblockt. Nicht besetzte Proteinbindungsstellen der Membran wurden so durch für die folgende Detektion irrelevante Proteine (entfettete Trockenmilch, Rinderserumalbumin) besetzt um unspezifische Antikörperbindungen in diesen Bereichen zu verhindern. Antikörperspezifisch wurde die Membran im nächsten Schritt entweder sofort oder nach drei Waschschrritten in TBS-T mit dem Erstantikörper inkubiert. Dieser ist spezifisch gegen das zu detektierende Protein gerichtet und wurde nach Herstellerangabe mit trockenmilch- oder rinderalbuminhaltigem TBS-T verdünnt. Die Inkubationszeit war variabel (je nach Antikörper 1,5 – 2 h bei RT, alternativ bei 4°C über Nacht). Der Erstantikörper bindet zwar spezifisch an das zu detektierende Protein, ist allerdings ohne Zugabe eines weiteren Antikörpers nicht sichtbar zu machen. Die Membran wurde nach der Erstantikörperinkubation dreimal mit TBS-T gewaschen, um schwache unspezifische Bindungen zu eliminieren und alle Reste der erstantikörperhaltigen Lösung zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelten und 1:1000 in TBS-T verdünnten sekundären Antikörper (*Goat Anti-Rabbit*, *Goat Anti-Mouse*) sowie einem gegen den Proteinmarker gerichteten Antikörper bei RT dunkel für 1,5 h inkubiert. Der sekundäre Antikörper stammt von einer anderen Spezies ab als der Erstantikörper. Er bindet an konstante Bereiche des Erstantikörpers und verstärkt das Signal zusätzlich dadurch, dass mehrere Moleküle des sekundären Antikörpers an ein Molekül des Erstantikörpers binden können. Die gekoppelte Meerrettich-Peroxidase ist für die spätere Detektion von zentraler Bedeutung. Nach 1,5 h Inkubation wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen, bis alle Reste der Lösung mit dem sekundären Antikörper entfernt waren.

Die Antikörperbindung wurde im ChemiDoc XRS-System (BioRad) erfasst. Die Membran wurde dazu in eine luminolhaltige Lösung eingelegt (*ECL Western Blotting Substrate*, BioRad). Das Luminol wurde in Gegenwart von Wasserstoffperoxid in einer durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysierten Reaktion oxidiert. Dies führte zu einer Emission von Licht (Chemilumineszenz), welches durch die im ChemiDoc XRS-System (BioRad) enthaltene CCD-Kamera detektiert wurde. Die Emission war umso intensiver, je größer die Proteinmenge war. Die detektierten Banden wurden anschließend mit der Quantity One 4.6.5 (BioRad) Software quantifiziert.

Um die Proteinladung der Membran zu überprüfen wurde stichprobenartig die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) detektiert. Sie diente als *Housekeeping*-Enzym außerdem der Quantifizierung von Mcl-1. Die GAPDH ist dafür besonders geeignet, da sie konstitutiv exprimiert wird und als Teil eines Basis-Stoffwechselweges von den meisten Signalwegen und intrazellulären Veränderungen und externen Stimuli unbeeinflusst bleibt.

3.2.12 Blot-Stripping

Zum Nachweis weiterer Proteine auf der bereits detektierten Membran wurde die vorhandene Antikörperbindung mittels Blot-Stripping gelöst. Dazu wurden 40 ml des SDS-haltigen Stripping-Puffers mit β -Mercaptoethanol (100 mM) versetzt. Die Membran wurde für 20 min bei 60°C im Schüttelwasserbad in dieser Lösung inkubiert und die Antikörperbindungen gelöst. Der Stripping-Puffer wurde abgeschüttet und die Membran unter dem Abzug zunächst intensiv mit PBS und im Folgenden mit TBS-T gewaschen. Nachdem alle Rückstände der zu Stripping benötigten Substanzen entfernt waren, wurde die Membran erneut wie oben beschrieben geblockt und zur spezifischen Detektion eines weiteren Proteins vorbereitet. Für jede Membran wurde höchstens ein Stripping durchgeführt.

3.2.13 Statistik

Die Auswertung der Daten wurde mit Excel (Microsoft) durchgeführt. Für die graphische Darstellung und die statistische Analyse der Daten wurde GraphPad Prism 5 verwendet.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels *one-way analysis of variance* (1-way ANOVA) und *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*, angegeben sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung (SEM). Als signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ angesehen. Die Anzahl der jeweils durchgeführten gleichartigen Versuche wurde als „n“ angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Effekt der HBO auf die Freisetzung von *cell free DNA* (cfDNA)

Die gesteigerte Produktion von NETs ist für die gewebsschädigenden Folgen der Immunantwort nach schwerem Trauma mitverantwortlich. Um den Effekt der HBO auf die Produktion von NETs zu bestimmen, wurde die Menge freigesetzter cfDNA in den Überständen der PMN bestimmt.

Die Konzentration der cfDNA in den Überständen der PMN der Kontrollprobanden und der Patienten stieg sowohl nach der HBO als auch nach Inkubation bei Raumluftbedingungen (RT) als Folge der Stimulation mit PMA signifikant an. Während die Menge freigesetzter cfDNA nach Stimulation der PMN der gesunder Kontrollprobanden (Abb. 1 A) nach HBO signifikant geringer war als die DNA-Menge, die durch die Kontroll-PMN (RT) freigesetzt wurde, zeigte sich durch die stimulierten PMN der Patienten (Abb. 1 B) zwar auch eine im Vergleich zu den Kontroll-PMN verringerte Menge freigesetzter DNA nach HBO, dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant.

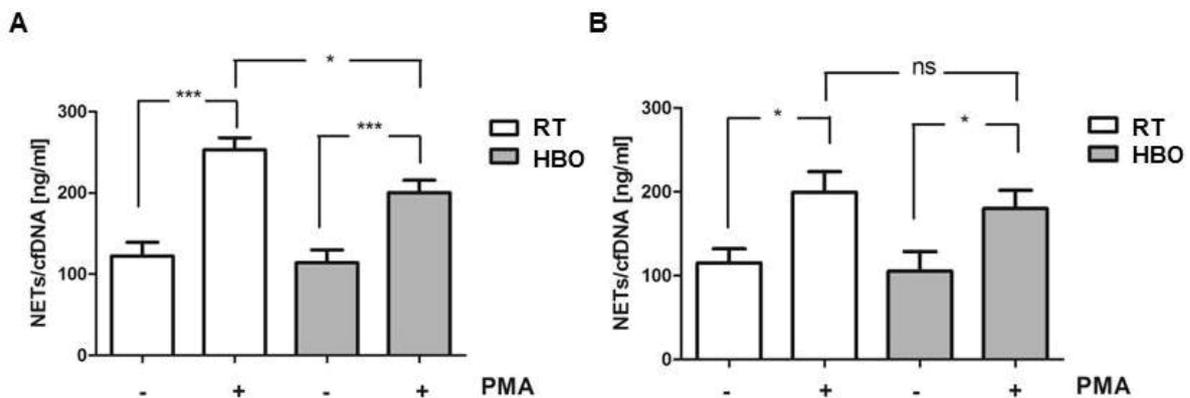


Abb. 1 Frühe Effekt der HBO auf die Freisetzung von cfDNA. 2×10^6 PMN / ml gesunder Probanden (A; n = 17) bzw. schwer traumatisierter Patienten (B; n = 7) wurden in Medium (RPMI1640 mit 10% FCS und 1% P / S) resuspendiert und für 2 h bei 2 bar in der HBO-Kammer bzw. unter Raumluftbedingungen (RT) neben der Kammer inkubiert. Anschließend wurden die PMN mit PMA (20 nM) stimuliert und bei 37°C (5% CO₂) inkubiert. Nach 3 h wurden die PMN abzentrifugiert und die Menge freigesetzter cfDNA in den Überständen mittels photometrischer Fluoreszenzbestimmung mit der Picogreen-Methode gemessen. *p < 0,05; ***p < 0,001, ns = nicht signifikant

Um einen zeitversetzten Effekt der HBO zu überprüfen wurden die PMN von gesunden Probanden ausgesät und der HBO exponiert. Anschließend wurden die PMN bei 37°C (5% CO₂) für 14 h inkubiert (Abb.2).

Im Anschluss wurden die PMN vorsichtig bei 800 rpm abzentrifugiert, in frischem Medium (RPMI 1640) mit 1% P / S und 10% FCS resuspendiert und mit PMA (20 nM) stimuliert. Nach weiteren 3 h Inkubation wurden die PMN abzentrifugiert und die Konzentration der cfDNA in den Überständen mittels Bestimmung der Fluoreszenz nach Zugabe von Picogreen gemessen. Sowohl nach HBO als auch nach paralleler Inkubation bei RT war der Anstieg der cfDNA-Freisetzung nach Stimulation mit PMA signifikant. Ein Effekt der HBO auf die Freisetzung der cfDNA war zeitversetzt nicht nachweisbar

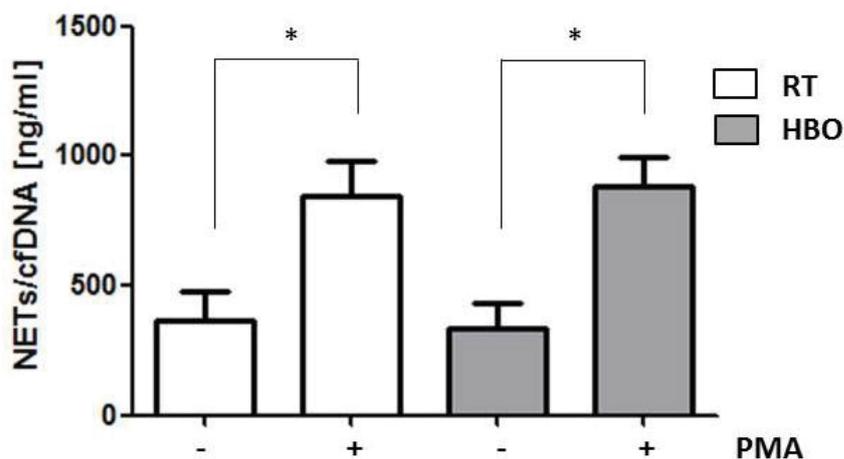


Abb. 2 Später Effekt der HBO auf die Freisetzung von cfDNA. 2×10^6 PMN / ml gesunder Probanden (n = 3) wurden in Medium (RPMI1640 mit 10% FCS und 1% P / S) resuspendiert und für 2 h bei 2 bar in der HBO-Kammer bzw. als Raumluftkontrolle (RT) neben der Kammer inkubiert. Anschließend wurden die PMN bei 37°C (5% CO₂) inkubiert. Nach 14 h wurden die PMN mit PMA (20 nM) stimuliert und für weitere 3 h inkubiert. Die PMN wurden abzentrifugiert und die Konzentration der cfDNA in den Überständen mittels photometrischer Fluoreszenzbestimmung mit der Picogreen-Methode gemessen. *p < 0,05

4.2 Effekt der HBO auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Die Bedeutung der HBO für die Produktion von ROS in den sofort nach der HBO mit PMA stimulierten PMN wurde mittels Messung der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von DHR überprüft.

Die ROS-Produktion in den PMN der Kontrollprobanden stieg sowohl nach HBO als auch nach Inkubation bei RT nach Stimulation mit PMA signifikant an (Abb. 3 A). Zwischen der gemessenen ROS-Produktion durch die HBO-exponierten PMN und der ROS-Produktion durch die RT-Kontrollen gab es nach Stimulation keine deutlichen Unterschiede. Auch die Bestimmung der ROS-Produktion nach Stimulation mit PMA in den PMN polytraumatisierter Patienten (Abb. 3 B) ließ keinen Effekt durch die HBO

erkennen. Es zeigte sich jedoch ein Unterschied in der ROS-Produktion von PMN gesunder Probanden im Vergleich zu den PMN der Patienten nach schwerem Trauma. In der Gruppe der Patienten war eine niedrigere ROS-Produktion nach Stimulation mit PMA messbar.

Um einen zeitversetzten Effekt der HBO zu überprüfen wurden die PMN über 3 h mit PMA stimuliert. Die gemessene ROS-Produktion in den HBO-exponierten Zellen der Kontrollprobanden (Abb. 3 C) war nach Stimulation mit PMA signifikant niedriger als die in den PMN der Raumluftkontrolle. Auch in den PMN der polytraumatisierten Patienten (Abb. 3 D) ließ sich nach der HBO-Exposition eine signifikante Reduktion der ROS-Produktion nach Stimulation mit PMA im Vergleich zu den Raumluftkontrollen feststellen. Es zeigte sich auch hier eine geringere ROS-Produktion in den PMN der Patienten im Vergleich zu den PMN gesunder Probanden.

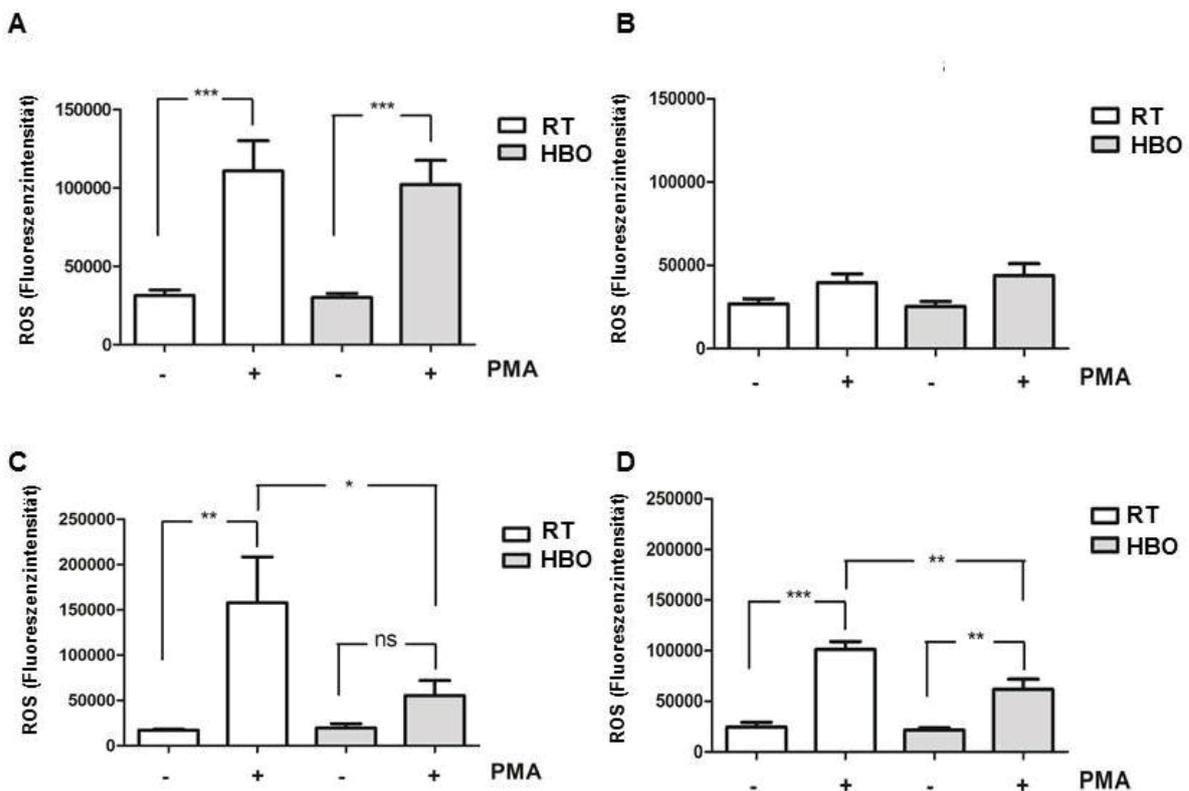


Abb. 3 Effekt der HBO auf die ROS-Produktion. Unmittelbar nach HBO wurde die Produktion von ROS durch die PMN gesunder Probanden (A; n=11) und schwer traumatisierter Patienten (B; n=8) gemessen. 2×10^6 PMN / ml wurden in Medium (RPMI 1640 mit 5% FCS und 1% P / S) resuspendiert, für 2 h bei 2 bar in der HBO bzw. als Raumluftkontrolle (RT) inkubiert und mit PMA (10 nM) stimuliert. Die ROS-Produktion wurde durch Zugabe von DHR (20 μ M) mittels photometrischer Bestimmung der Fluoreszenzintensität gemessen. In einem zweiten Ansatz wurden die PMN gesunder Probanden (C, n=5) und schwer traumatisierter Patienten (D, n=4) wie oben beschrieben ausgesät und in der HBO bzw. bei RT inkubiert und die ROS-Produktion 3 h nach Stimulation mit PMA photometrisch bestimmt. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

4.3 Effekt der HBO auf die Chemotaxis

Aktivierte PMN verlassen die Blutzirkulation und wandern dem chemotaktischen Gradienten folgend in das Gewebe aus. Ob auch ein Effekt der HBO auf die Chemotaxis der PMN nach Stimulation mit IL-8 besteht wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Sowohl die PMN der gesunden Kontrollprobanden (Abb. 4 A) als auch die PMN der polytraumatisierten Patienten (Abb. 4 B) zeigten nach Stimulation mit IL-8 eine erhöhte Migration durch die in den Wells platzierten Transwells. Es ließ sich jedoch kein Effekt der HBO auf die Chemotaxis der PMN im Vergleich zu den RT-Kontrollen feststellen.

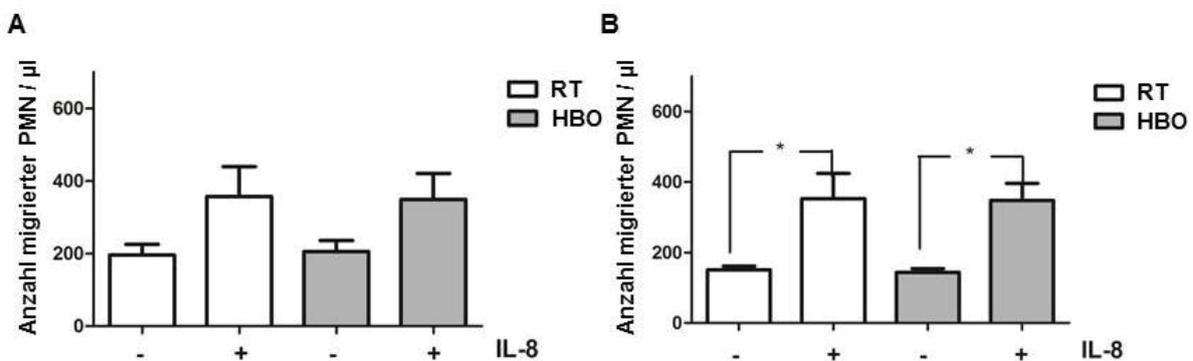


Abb. 4 Effekt der HBO auf die Chemotaxis der PMN. 2×10^6 PMN / ml gesunder Probanden (A, n=6) bzw. schwer traumatisierter Patienten (B, n=3) wurden in Medium (RPMI 1640 mit 5% FCS und 1% P / S) resuspendiert und für 2 h bei 2 bar in der HBO bzw. unter Raumlufbedingungen (RT) inkubiert. Die Anzahl der durch die Transwells migrierten PMN nach Stimulation mit IL-8 (25 ng / ml) und 30 minütiger Inkubation wurde mittels Count Bright Beads im Durchflusszytometer bestimmt. *p < 0,05

4.4 Effekt der HBO auf die Phosphorylierung der p38 MAPK

Der p38 MAPK Signalweg reguliert als Teil einer Kette von Kinasen in PMN verschiedene Prozesse. Wird er in Gang gesetzt führt dies zur Phosphorylierung der Zielproteine wie der NOX und damit unter anderem zu einer gesteigerten Abwehrleistung der PMN. Um zu überprüfen ob aus der HBO eine Beeinträchtigung der Aktivierung der p38 MAPK resultiert, wurde die Phosphorylierung der Kinase mittels Western-Blot quantifiziert.

Die Phosphorylierung der p38 MAPK in den PMN gesunder Probanden (Abb. 5 A) stieg bereits 1 h nach Stimulation mit PMA sowohl in den RT-Kontrollen als auch in den HBO-exponierten PMN im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikant an. Die Phosphorylierung der p38 MAPK in den stimulierten PMN 3 h nach HBO war signifikant geringer als in den PMN der RT-Kontrollen. Auch in den PMN schwer traumatisierter

Patienten (Abb. 5 B) war bereits nach 1 h ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung der p38 MAPK nach Stimulation mit PMA zu beobachten. Nach 3 h war die Phosphorylierung der p38 MAPK in den HBO-exponierten Zellen etwas schwächer. Ähnlich wie in den PMN von gesunden Probanden konnte auch in den Patienten-PMN 3 h nach HBO eine signifikante Abnahme der Phospho-p38 MAPK im Vergleich zu den RT-Kontrollen verzeichnet werden (Abb. 5 B).

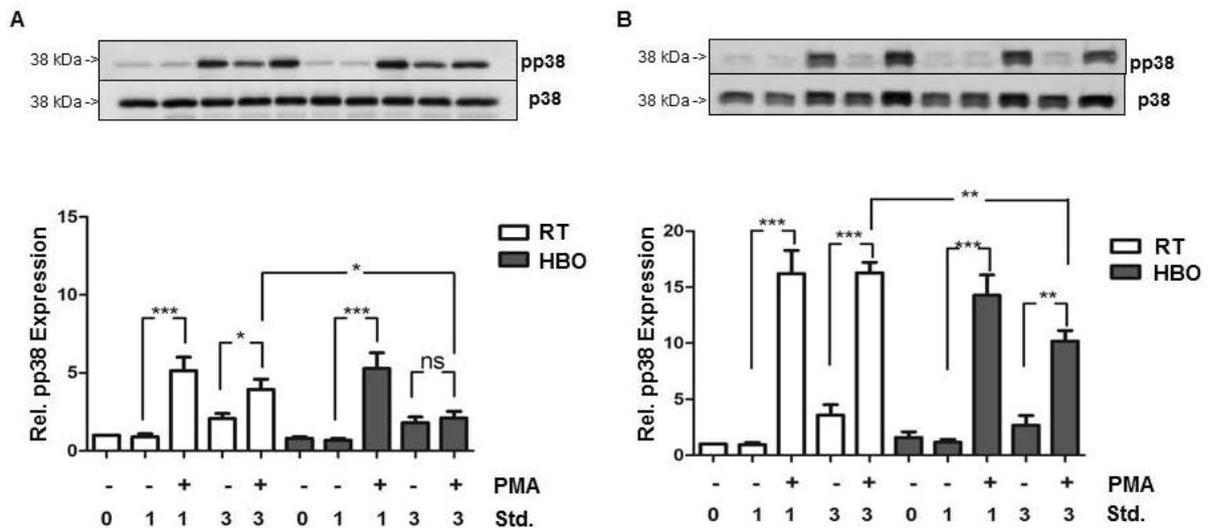


Abb. 5 Effekt der HBO auf die Phosphorylierung der p38 MAPK. Die PMN gesunder Probanden (A, n = 6) sowie schwer traumatisierter Patienten (B, n = 5) wurden mit einer Zelldichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen / ml in RPMI 1640 mit 1% P / S und 10% FCS resuspendiert und für 2 h bei 2 bar in der HBO-Kammer bzw. unter Raumluftbedingungen (RT) inkubiert. Die PMN wurden mit PMA (20 nM) stimuliert und die Aktivierung der p38 MAPK nach 1 und 3 h mittels Western Blot untersucht. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ns = nicht signifikant

4.5 Effekt der HBO auf die Phosphorylierung der ERK MAPK

Wie die p38 MAPK ist auch die ERK MAPK als Teil einer Kinasenkaskade durch die Phosphorylierung von Zielproteinen in viele Prozesse der PMN involviert. Dazu gehört auch die Steigerung der Abwehrleistung der PMN. Ob sich die Phosphorylierung der ERK MAPK nach Stimulation mit PMA durch die HBO beeinträchtigt zeigt wurde mittels Western Blot Methode überprüft.

Sowohl in den HBO-exponierten als auch in den bei RT inkubierten PMN der Kontrollprobanden (Abb. 6 A) konnte ein signifikanter Anstieg der phosphorylierten ERK MAPK 1 h nach Stimulation mit PMA nachgewiesen werden. Nach 3 Stunden Stimulation mit PMA war die Menge der phosphorylierten ERK MAPK im Vergleich zu der nach 1 h gewonnenen stimulierten Probe abgefallen. Als Effekt der HBO zeigte sich in den PMN

gesunder Probanden zwischen den nach 1 und 3 h gewonnenen stimulierten Proben eine etwas geringere Phosphorylierung der ERK MAPK im Vergleich zur RT-Kontrolle, der nicht signifikant war. In den PMN der schwer traumatisierten Patienten (Abb. 6 B) war als Reaktion auf die Stimulation mit PMA nach 1 h sowohl nach HBO als auch nach Inkubation bei RT ein signifikanter Anstieg der Menge phosphorylierter ERK MAPK nachweisbar. Auch 3 h nach Stimulation mit PMA war die phosphorylierte Form der ERK MAPK noch signifikant gegenüber der unstimulierten Probe erhöht, wenn auch insgesamt weniger ausgeprägt als nach 1 h. Zwischen den HBO-exponierten PMN und den RT-Kontrollen der Patienten zeigte sich eine Tendenz die für einen Effekt der HBO spricht, dieser war allerdings nicht signifikant.

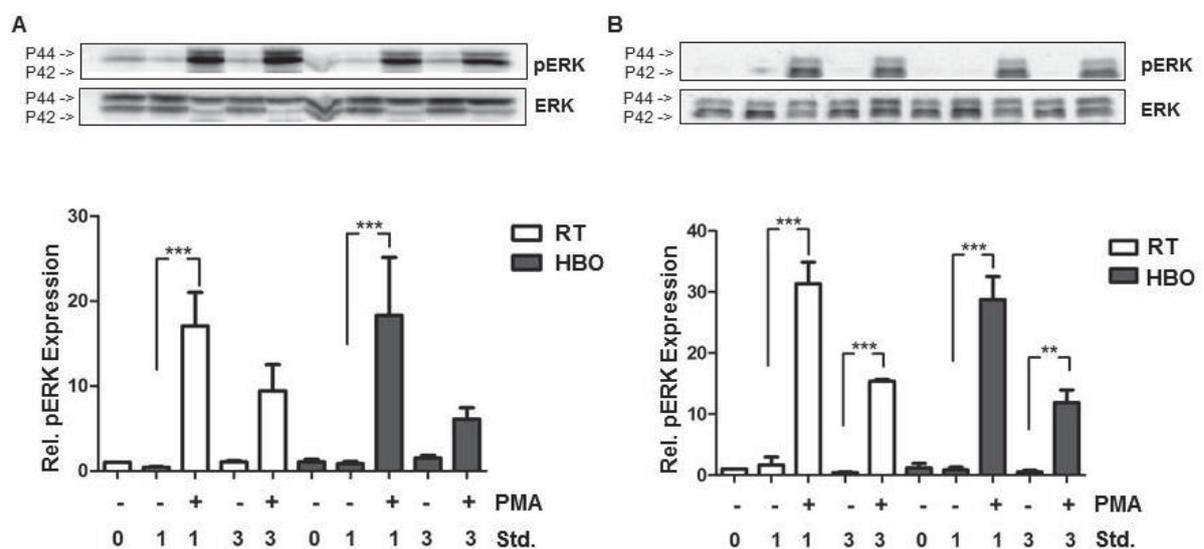


Abb. 6 Effekt der HBO auf die Phosphorylierung der ERK MAPK. Die PMN gesunder Probanden (A, n = 6) und schwer traumatisierter Patienten (B, n = 5) wurden mit einer Zelldichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen / ml in RPMI 1640 mit 1% P / S und 10% FCS resuspendiert und in der HBO bzw. unter Raumluftbedingungen (RT) inkubiert, anschließend mit PMA (20 nM) stimuliert und die Aktivierung der ERK MAPK nach 1 und 3 h im Western Blot untersucht. ***p < 0,001; **p < 0,01

4.6 Effekt der HBO auf die Expression von Mcl-1

Das Mcl-1 Protein ist als antiapoptotische Komponente der Apoptoseregulation für das Überleben der PMN von Bedeutung. Ob es durch die HBO zu Veränderungen der Mcl-1 Expression in PMN kommt wurde mittels Western Blot untersucht.

In den PMN der Kontrollprobanden (Abb. 7 A) war 3 h nach Stimulation mit PMA sowohl nach HBO als auch nach Inkubation bei RT eine deutliche Abnahme der Expression von Mcl-1 nachweisbar. Zwischen der Mcl-1 Expression der HBO-exponierten PMN und den

RT-Kontrollen gab es keine deutlichen Unterschiede. Ein ähnlicher Effekt der 3-stündigen Stimulation mit PMA zeigte sich auch in den PMN der schwer traumatisierten Patienten (Abb. 7 B). Auch in den Patienten-PMN war eine deutliche Abnahme von Mcl-1 nach 3 h Stimulation mit PMA nachweisbar, es ließen sich jedoch keine Effekte der HBO-Exposition im Vergleich zu den RT-Kontrollen nachweisen.

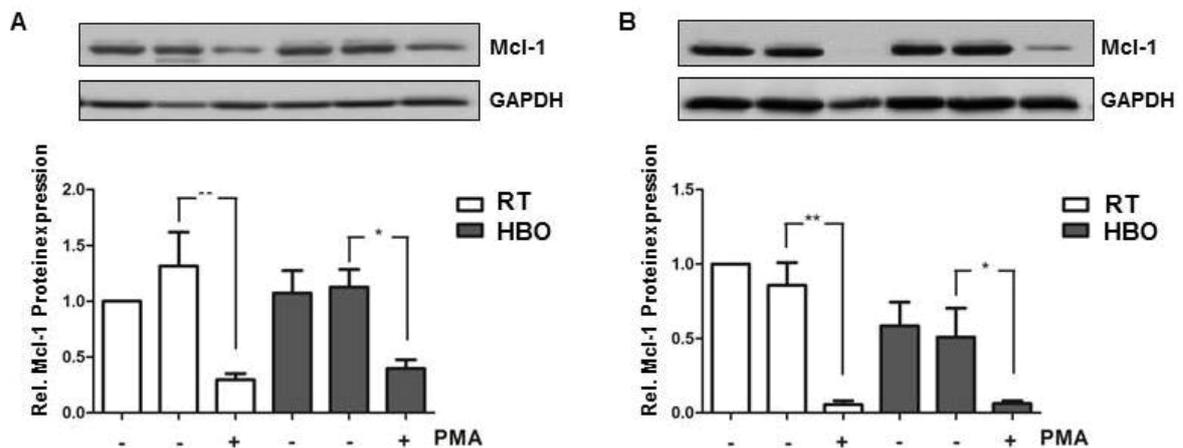


Abb. 7 Frühe Effekte der HBO auf die Expression von Mcl-1. Die PMN gesunder Probanden (A, n = 7) und schwer traumatisierter Patienten (B, n = 5) wurden mit einer Zelldichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen / ml in RPMI 1640 mit 1% P / S und 10% FCS für 2 h bei 2 bar in der HBO bzw. unter Raumluftbedingungen (RT) inkubiert. Die PMN wurden mit PMA (20 nM) stimuliert und die Konzentration des Mcl-1-Proteins im Verhältnis zur GAPDH nach 3 h mittels Western Blot bestimmt. **p < 0,01; *p < 0,05

Die Expression von Mcl-1 der 18 h nach Stimulation gewonnenen PMN konnte nicht gegen die GAPDH quantifiziert werden, da deren Expression durch die 18-stündige Stimulation mit PMA beeinträchtigt war. Die Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf die Membran mit dem Mcl-1 Antikörper detektiert untereinander verglichen.

Die Expression von Mcl-1 durch die PMN gesunder Probanden (Abb. 8 A) war 18 h nach Stimulation mit PMA sowohl nach HBO-Exposition als auch nach Inkubation bei RT deutlich erniedrigt. In den PMN polytraumatisierter Patienten (Abb. 8 B) zeigte sich eine ähnliche Tendenz nach Inkubation bei RT. Die der HBO-exponierten PMN zeigten keinen Effekt der Stimulation mit PMA auf die Expression von Mcl-1 nach 18 h.

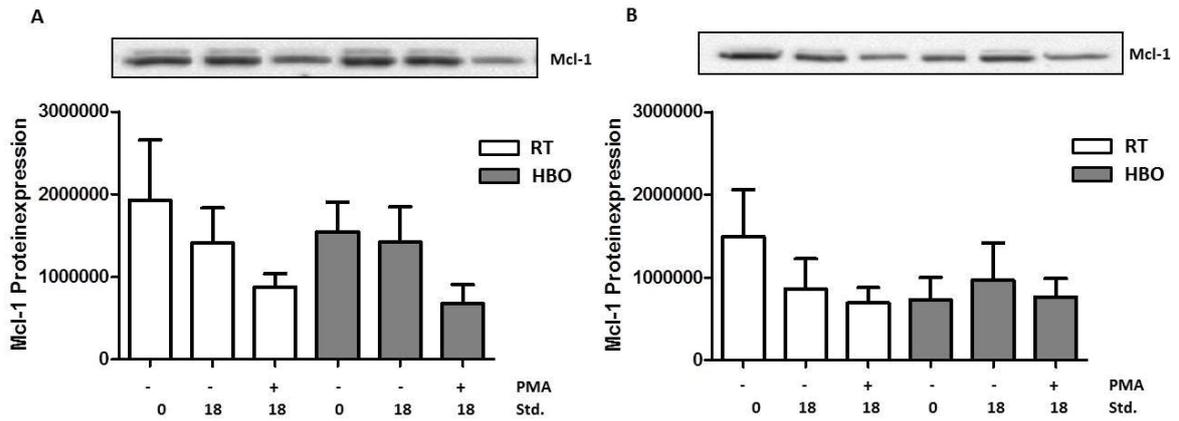


Abb. 8 Späte Effekte der HBO auf die Expression von Mcl-1. Die PMN gesunder Probanden (A, n = 7) und schwer traumatisierter Patienten (B, n = 5) wurden mit einer Zelldichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen / ml in RPMI 1640 mit 1% P / S und 10% FCS resuspendiert und für 2 h bei 2 bar in der HBO bzw. unter Raumluftbedingungen (RT) inkubiert. Die PMN wurden mit PMA (20 nM) stimuliert und die Konzentration des Mcl-1-Proteins nach 18 h im Western Blot Verfahren bestimmt.

5 Diskussion

5.1 Stimulierbarkeit der polymorphnukleären Granulozyten mit *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*

Für die Versuche der Studie wurden die PMN mit dem Diacylglycerin-Struktur analogon PMA stimuliert. Dieses aktiviert die Abwehrprozesse innerhalb der PMN über einen Proteinkinase C (PKC) abhängigen Weg (Wolfson et al. 1985) (Gray et al. 2013). Eine künstliche Stimulation der PMN mit PMA führte sowohl in der PMN gesunder Probanden auch in den PMN traumatisierter Patienten zu einer gesteigerten Phosphorylierung der p38 und der ERK MAPK sowie zu einer erhöhten Produktion von ROS und einer vermehrten Freisetzung von NETs. Die Versuche haben gezeigt, dass die durch PMA erreichbare Steigerung der Aktivität in den PMN gesunder Probanden stärker ausgeprägt ist als in den Patienten-PMN. Dieses Ergebnis liefert Hinweise auf eine verringerte Stimulierbarkeit der PMN durch PMA nach schwerem Trauma.

Im Blut der Patienten befinden sich an Tag 1 und 2 nach Trauma reife PMN sowie überalterte PMN, die beim Gesunden nach spätestens 24 h, bei Patienten als Folge eines schweren Traumas allerdings deutlich verzögert apoptotisch zugrunde gehen. Zusätzlich werden vermehrt unreife stabkernige PMN rekrutiert (Köller et al. 2001). Diese noch nicht vollständig ausgereiften PMN haben eine geringere funktionale Abwehrkapazität im Vergleich zu den segmentkernigen reifen PMN und reagieren schwächer auf Stimulation (Taneja et al. 2008). Dies betrifft unter anderem die Chemotaxis sowie die Fähigkeit, im Rahmen des *respiratory burst* Superoxidanionen zu produzieren und Pathogene abzuwehren (Glasser & Fiederlein 1987). Diese vom Gesunden abweichende Konstellation der Reifestadien der PMN im peripheren Blut von Patienten nach schwerem Trauma könnte die reduzierte Reaktion der PMN auf die Stimulation mit PMA in den Versuchen erklären. Während im Organismus die Gesamtanzahl der zirkulierenden PMN nach schwerem Trauma deutlich ansteigt, wurde für die Versuche der Studie stets die gleiche Zelldichte zugrunde gelegt. Dieses führt dazu, dass der bei steigendem Anteil der unreifen und überalterten PMN nach Trauma die Anzahl reifer PMN zwar in den Versuchen, nicht jedoch im Organismus reduziert ist. Es ist also anzunehmen, dass die Effekte der HBO im traumatisierten Organismus eine noch größere Relevanz haben als bereits in den durchgeführten Versuchen gezeigt werden konnte. Unterstützt wird dies durch eine Studie von Gris et al., die bei Ratten Verletzungen im Bereich des Rückenmarks herbeiführten, um die immunologisch bedingten systemischen Folgen in Hinsicht auf durch PMN-

vermittelte Organschäden zu überprüfen. Es zeigte sich, dass 24 h nach Verletzung des Rückenmarks der Anteil der PMN insgesamt und besonders der Anteil der unreifen PMN signifikant erhöht war (Gris et al. 2008).

Im Rahmen des Traumas erfährt der Organismus einen *first hit*, der sich auf die Aktivität der PMN auswirkt. Es kommt zum *Priming*, das die PMN in einen Zustand erhöhter Erregung versetzt (Ogura et al. 1999). Die reifen PMN verlassen nach dem *Priming* die Zirkulation und kumulieren im Gewebe (Biffel et al. 1999). Die damit bereits erhöhte Abwehrbereitschaft sowie der zunehmend geringere Anteil von voll funktionsfähigen PMN in der Zirkulation sind weitere Gründe dafür, dass in den aus arteriellem Blut an Tag 1 oder 2 nach Trauma gewonnenen PMN der Patienten durch PMA ein im Vergleich zum Gesunden geringeres Ausmaß der Aktivität erreichbar ist. Auch dürfte es durch das *Priming* bereits zu einer erhöhten Grundaktivität insbesondere der PKC kommen, die als Zielstruktur von PMA in die Signalkaskade vieler im Rahmen der Studie untersuchten Prozesse involviert ist. So zeigte die tierexperimentelle Studie von Gris et al., dass 2 h nach Trauma noch eine verstärkte Reaktion der zirkulierenden PMN auf die Stimulation mit PMA im Vergleich zu denen unverletzter Ratten festzustellen war, diese im Verlauf von 4 bis 24 h jedoch bereits deutlich reduziert war (Gris et al. 2008).

5.2 Effekte der hyperbaren Oxygenierung auf die PMN-Aktivität

Die HBO hat verschiedene Konsequenzen für die Abwehrleistung der PMN sowohl gesunder Probanden als auch polytraumatisierter Patienten. Im Rahmen der Studie konnte gezeigt werden, dass die HBO die Abwehrmechanismen der PMN auf verschiedenen Ebenen beeinträchtigt. Im Besonderen betroffen sind sowohl die in die Signaltransduktion involvierte p38 MAPK als auch die NADPH-Oxidase (NOX) und die daraus resultierende Produktion von ROS. Die Stimulation der PMN mit PMA führte sowohl zu einer gesteigerten Phosphorylierung der p38 als auch der ERK MAPK. Dass sich die Effekte der HBO deutlicher in der Aktivität der p38 MAPK und weniger ausgeprägt der ERK MAPK manifestieren zeigt, dass Veränderungen durch die HBO nicht bereits auf Ebene der vorgeschalteten PKC, sondern auf Ebene der nachgeschalteten MAPK eintreten. Zu diesem Ergebnis kamen auch Niu et al., die eine geringere Aktivität auf Ebene der MAPK nach HBO in degenerierten Zellen humaner discs intervertebrales nachweisen konnten (Niu et al. 2013). Ebenso konnten Zhao et al. eine Reduktion der Phosphorylierung der p38 MAPK

nach HBO in hippokampalen Zellen im Rahmen einer tierexperimentellen Alzheimerstudie mit Ratten nachweisen (Zhao et al. 2017).

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die für die organschädigenden Folgen nach schwerem Trauma verantwortlichen Prozesse durch die Exposition in der HBO-Kammer zum Teil deutlich vermindert werden. So resultiert aus einer reduzierten Aktivität der p38 MAPK auch eine verminderte Aktivität der NOX und damit der ROS-Produktion. Da die NOX sowohl durch die p38 MAPK als auch durch die ERK MAPK aktiviert wird, ist von einem Effekt der HBO auf die ROS-Produktion auszugehen, der die Aktivität der NOX auch direkt beeinträchtigt. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Studie von Ostrowski et al. unterstützt, in der eine verringerte Aktivität der NOX als Effekt der HBO in Zellen der Großhirnrinde nach subarachnoidaler Blutung nachgewiesen werden konnte (Ostrowski et al. 2006). Zhou et al. beschreiben zwar eine insgesamt gesteigerte ROS-Produktion nach HBO in *Human umbilical vein endothelial cells*, diese lässt sich jedoch nicht auf eine Veränderung der NOX-Aktivität zurückführen (Zhou et al. 2018). Aufgrund der erhobenen Daten lässt sich nicht sicher differenzieren, in welchem Ausmaß die verminderte ROS-Produktion auf eine primäre Wirkung der HBO auf die NOX beziehungsweise auf eine verringerte Aktivierung der NOX durch die p38 MAPK zurückzuführen ist. Wahrscheinlich ist eine Kombination von Effekten der HBO, die beide Enzyme betreffen.

Die Stimulation der PMN mit PMA führte bereits nach 1 h zu einem starken Anstieg der Aktivität der MAPK sowie der NOX sowohl in den Kontrollen als auch in den HBO-exponierten PMN. Die inhibitorischen Effekte der HBO auf die Enzymaktivität ließen sich erst verzögert nach dreistündiger Inkubation der stimulierten PMN nachweisen. Es zeigte sich also, dass die Exposition nicht die initiale Aktivierbarkeit der Enzyme beeinflusst, die Enzymaktivität jedoch nicht im gleichen Ausmaß aufrecht gehalten werden kann wie in den nicht exponierten PMN. Dies betrifft sowohl die Aktivität der MAPK als auch der NOX. Kalns et al. beschreiben eine Abnahme der ROS-Produktion in PMN als Folge der HBO nach Stimulation mit Zymosan, allerdings nicht nach Stimulation mit PMA. Diese Ergebnisse stammen aus einer Messung 2 h nach Stimulation der PMN und weisen ebenfalls auf einen inhibitorischen Effekt der HBO auf die ROS-Produktion hin, der die starke PMA-vermittelte Aktivierung nicht sofort beeinträchtigt (Kalns et al. 2002). Auch Zhang et al. konnten im Wundgewebe von Ratten eine verringerte ROS-Produktion nach HBO nachweisen (Zhang & Gould 2013). Im Widerspruch zu diesem Ergebnis

beschreiben Labrouche et al. eine Verstärkung des *respiratory burst* nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* in Folge der HBO (Labrouche et al. 1999). Diese Ergebnisse stammen aus einer *in vivo* Studie mit gesunden Tauchern, der letzte Abnahmezeitpunkt liegt 135 min nach der HBO-Exposition. Auch Almzaiel et al. konnten in einer *in vitro* Studie eine erhöhte ROS-Produktion nach HBO nachweisen. Für die Versuche dieser Studie wurden allerdings keine PMN sondern zu *neutrophil-like cells* differenzierte HL-60 Zellen verwendet. Der letzte Messzeitpunkt lag hier 45 min nach Beginn der Stimulation mit PMA (Almzaiel et al. 2013). Jüttner et al. konnten in einer *in vivo* Studie mit gesunden Probanden keinen Effekt der HBO auf den *respiratory burst* 20 min nach Stimulation mit *Escherichia coli* oder Tumornekrosefaktor α (TNF α) und *N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine* (fMLP) feststellen (Jüttner et al. 2003). Dieses sehr unterschiedliche Bild in der Literatur bezüglich der Auswirkung der HBO auf die ROS-Produktion liegt vermutlich in den verschiedenen Studiendesigns, Expositionsschemata und Stimulantien begründet. Insgesamt liegen die betrachteten Zeitpunkte relativ nah an der HBO-Exposition, so dass verzögerte Effekte der HBO auf die ROS-Produktion auch durch diese Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

Essentiell ist die ROS-Produktion für die Induktion der NETose. Trotz der Effekte der HBO auf die ROS-Produktion war kein deutlicher Effekt auf die NETose nach Trauma nachweisbar. Eine Erklärung könnte in einer frühen Induktion der NETose als Reaktion auf die Stimulation mit PMA liegen. Die PMN der Patienten sind bereits im Organismus im Rahmen des *first hits* stimulierenden Prozessen ausgesetzt gewesen, die die Induktion der NETose begünstigen. Zusätzlich war die Reduktion der ROS-Produktion durch die HBO zeitverzögert erst nach dreistündiger Inkubation der stimulierten PMN feststellbar. Resultiert der primäre Anstieg der ROS-Produktion in den PMN als Reaktion auf die Stimulation mit PMA bereits in der Induktion der NETose, so wird dieser Prozess trotz der im Folgenden verminderten ROS-Produktion initiiert. Dies wird von den Ergebnissen einer Studie von Fuchs et al. unterstützt, in der bereits 60 min nach Stimulation mit PMA NETose-bedingte Veränderungen der Kernmorphologie nachgewiesen werden konnten (Fuchs et al. 2007). Eine weitere Ursache könnte ein für die NETose-Induktion benötigter ROS-Schwellenwert darstellen, der durch das *Priming* der PMN herabgesetzt wird. Die HBO nach dem angewendeten Schema kann die ROS-Produktion zwar beeinträchtigen, es kommt jedoch auch nach HBO-Exposition noch zu einem, wenn auch geringerem, Anstieg der ROS-Konzentration in den PMN. Befindet sich die Schwelle der für die Induktion der NETose benötigten ROS-Konzentration in den vorstimulierten PMN der traumatisierten

Patienten unterhalb der bisher erreichten reduzierten Konzentration, so wird die Freisetzung von NETs auch nach der HBO fortgesetzt. Als zur Apoptose alternative Form des Zelluntergangs ist die NETose auf antiapoptotische Prozesse angewiesen. Diese werden über Signalwege vermittelt, in die die ERK MAPK entscheidend involviert ist. Auch dieses Enzym zeigte sich in den PMN der Gesunden deutlicher von der HBO beeinträchtigt als in den PMN der traumatisierten Patienten, weshalb die HBO die NETose durch die PMN Gesunder stärker beeinträchtigen dürfte als die der Patienten. Vermittelt wird dieser antiapoptotische Effekt auch über eine Stabilisierung des Mcl-1-Proteins durch die ERK MAPK (Derouet et al. 2004).

Die Quantifizierung des Mcl-1-Proteins erfolgte im Rahmen der Studie im Western-Blot Verfahren. Zur Bestimmung der Mcl-1-Produktion in den PMA-stimulierten PMN nach 3 h wurde die Expression von Mcl-1 im Verhältnis zur GAPDH als *Housekeeping*-Protein bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression des Mcl-1-Proteins nach 18 h gemessen. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich jedoch eine Beeinträchtigung der Konzentration der GAPDH durch die Stimulation mit PMA. Bei der Interpretation der zu diesem Zeitpunkt erhobenen Werte muss berücksichtigt werden, dass die Proben nur untereinander verglichen wurden.

Nach 3 h im Anschluss an die Stimulation mit PMA zeigte sich in allen Proben eine deutlich verringerte Konzentration des Mcl-1-Proteins in den PMN. Nach 18 h war dieser Effekt durch die Stimulation weniger ausgeprägt. Durch die starke Aktivierung der MAPK als kurzfristige Reaktion auf die Stimulation mit PMA kommt es zu einer stark gesteigerten Phosphorylierung vieler nachgeschalteter Proteine. Eines dieser Proteine ist das Mcl-1-Protein (Leuenroth et al. 2000). Der starke Abfall der Mcl-1-Konzentration in den PMN nach Stimulation mit PMA spricht für eine negative Regulation als Folge der starken Aktivität der PKC sowie der nachgeschalteten Kinasen. Ein Einfluss der PKC auf die Stabilität des Mcl-1-Proteins wurde bereits beschrieben, eine Hemmung dieser Kinase resultierte in einer Stabilisation des Proteins (Masuoka et al. 2009). Hingegen ist bei Aktivierung der ERK MAPK eine erhöhte Stabilisation des Mcl-1-Proteins beobachtet worden (Domina et al. 2004) (Derouet et al. 2004). Zu diesem Erkenntnis kamen auch Hakkim et al., die zusätzlich zeigten, dass die Aktivierung der ERK MAPK auch die NETose begünstigt und folgerten, dass so die Apoptose zugunsten der NETose verzögert wird (Hakkim et al. 2011). Andererseits wird ein verringernder Einfluss von ROS auf die Konzentration des Mcl-1-Proteins über eine Hemmung des Akt-Signalweges beschrieben (Min et al. 2014). Dies könnte bedeuten, dass es die durch PMA-initiierte ROS-Produktion

zu einer Reduktion der Mcl-1-Konzentration über den proteasomalen Abbauweg in den stimulierten PMN kommt. Pashevin et al. konnten zusätzlich zeigen, dass eine Inhibition des Proteasoms zu einer geringeren Produktion von PMA-induzierten NETs führt (Pashevin et al. 2015). Derouet et al. beobachteten einen beschleunigten proteasomalen Umsatz von Mcl-1 als Folge einer Hyperphosphorylierung (Derouet et al. 2004). Durch die starke Aktivierung der PMN mit PMA kann ein solcher Umsatz von Mcl-1 bereits 3 h nach Stimulation erreicht worden sein. Moulding et al. hingegen beschreiben eine gesteigerte Produktion von Mcl-1 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene nach Stimulation mit PMA, allerdings wurden für diese Versuche zu Monozyten differenzierende U937 Zellen verwendet (Moulding et al. 2000). Da die ERK MAPK die Stabilität des Mcl-1-Proteins beeinflusst, ist ein proapoptotischer Effekt der HBO über eine Inhibition der Phosphorylierung durch die ERK MAPK denkbar. Zhang et al. konnten zeigen, dass die Aktivität der ERK MAPK jedoch zusätzlich durch die erhöhte Produktion von intrazellulären ROS gesenkt wird. Gleichzeitig vermitteln diese intrazellulären ROS proapoptotische Signale (Zhang et al. 2003). So wäre auch eine geringere Apoptoserate nach HBO durch die verminderte ROS-Produktion in Erwägung zu ziehen. Nach 18 h war jedoch keine Veränderung der Apoptoserate durch die HBO feststellbar (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe). Die ERK MAPK zeigte sich in den Versuchen zwar nicht so deutlich von der HBO beeinträchtigt wie die p38 MAPK, jedoch ließen sich auch tendenzielle inhibitorische Effekte bereits nach einmaliger Exposition erkennen. Hier muss berücksichtigt werden, dass es zu einer Inhibition der ERK MAPK durch den Anstieg von intrazellulären ROS kommen kann (Zhang et al. 2003). Dieser inhibitorische Einfluss ist nach HBO durch die geringere ROS-Produktion weniger stark ausgeprägt und könnte somit Effekte der HBO teilweise maskieren. Auch beschreiben verschiedene Studien bereits Effekte der HBO auf die ERK MAPK und die Apoptose. In Zellen der disci intervertebrales ließ sich sowohl eine verminderte Aktivierung der ERK MAPK als auch ein antiapoptotischer Effekt der HBO nachweisen (Niu et al. 2013). In HL-60 und Jurkat T-Zellen war die Apoptoserate als Resultat der HBO erhöht (Weber et al. 2009) (Ganguly et al. 2002). Zu diesem Ergebnis kamen auch Almzaiel et al. in einer Studie mit zu *neutrophil-like cells* differenzierten HL-60 Zellen (Almzaiel et al. 2013). Zhang et al. zeigten, dass die Aktivierung der ERK MAPK im Wundgewebe von Ratten nach HBO geringer ausgeprägt war als in einer nicht HBO-exponierten Kontrollgruppe (Zhang & Gould 2013). Es handelt sich bei diesen Studien um Versuche mit unterschiedlichen Zelltypen, auch die Expositionsschemata und die Behandlungsdrücke unterscheiden sich

innerhalb der unterschiedlichen Studien zu den Effekten der HBO voneinander. In der klinischen Anwendung werden unterschiedliche Schemata der HBO-Exposition je nach Indikation angewendet. Häufig werden die Patienten wiederholt mit der HBO behandelt. Auch beträgt die Dauer einer einzelnen Exposition in der HBO von 140 min bis zu über 300 min (Wiese et al. 2006). Im Rahmen der für diese Arbeit durchgeführten Versuche wurden die PMN einmalig für 2 h der HBO exponiert. Die bereits durch dieses Expositionsschema erreichbaren Veränderungen der Immunantwort legen die Vermutung nahe, dass bei wiederholter Exposition der PMN weitergehende Effekte sowohl auf die bereits deutlich veränderten Parameter als auch auf die Aktivität der ERK MAPK und die Apoptose und NETose erzielt werden können.

Ein von der HBO-Exposition nach dem angewandten Schema unbeeinträchtigter Parameter ist die Chemotaxis. Die HBO-exponierten PMN zeigten nach 30 minütiger Inkubation eine unverändert ausgeprägte Fähigkeit zu Migration. Im Widerspruch dazu beschreiben Labrousche et al. eine reduzierte fMLP-induzierte Chemotaxis, allerdings wurde diese erst 135 min nach Ablauf der HBO bestimmt. Sofort nach HBO konnte auch in diesen Versuchen kein signifikanter Effekt der HBO auf die Chemotaxis festgestellt werden. Auch konnte in dieser Studie eine verringerte Expression des CD 11 b-Proteins nach HBO nachgewiesen werden, was für eine reduzierte Fähigkeit zur Adhäsion an das Endothel spricht (Labrousche et al. 1999). Dies legt auch eine Studie von Kalns et al. nahe, in der nach HBO eine verringerte MAC-1-vermittelte Adhäsion der PMN an mit Fibrinogen beschichtetes Glas gezeigt werden konnte (Kalns et al. 2002). Ebenfalls zeigt eine Studie von Oyaizu et al. eine durchflusszytometrisch bestimmte geringere Konzentration von CD 11 b-positiven Zellen 6 und 24 Stunden nach HBO in Blutproben von Ratten nach muskulärem Trauma (Oyaizu et al. 2018). Da auch andere Parameter erst zeitverzögert von der HBO beeinträchtigt waren und der Messzeitpunkt mit 30 min nach HBO zeitnah an der Exposition war, kann auch unter Berücksichtigung der Resultate anderer Arbeitsgruppen ein Effekt auf die Chemotaxis zu einem späteren Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Die Extravasation der PMN *in vivo* beruht auf komplexen Wechselwirkungen der PMN mit dem Endothel. Die an diesen Prozessen beteiligten Strukturen und Mediatoren könnten weitere Ziele der HBO darstellen und bleiben zu untersuchen.

Sind die PMN erst in das Gewebe ausgewandert, werden die verschiedenen Abwehrmechanismen initiiert. Dies dient dem Schutz des Organismus, kann für schwer traumatisierte Patienten jedoch in der Schädigung lebenswichtiger Organe sowohl auf

direktem Weg über eine erhöhte Abwehrleistung als auch auf indirektem Weg über das Rekrutieren weiterer PMN und der Schädigung des Endothels resultieren. Durch die HBO konnte bereits nach einmaliger Exposition für 2 h bei 2 bar Effekte auf die PMN der polytraumatisierten Patienten erreicht werden, die für den Organismus im Falle eines drohenden SIRS immunsuppressive und organprotektive Folgen haben dürften. Als Effekt der HBO war die Fähigkeit der PMN, anhaltend auf den aktivierenden Stimulus PMA zu antworten, deutlich reduziert. Im Organismus erfahren die PMN durch das Trauma ein *Priming* im Rahmen des *first hits* und eine entsprechende weitere Aktivierung im Rahmen eines endogenen oder exogenen *second hits*. Die Reduktion der Aktivität der PMN durch die HBO verringert das Risiko der daraus resultierenden überschießenden Reaktion. Entsprechende Ergebnisse konnten auch durch Tai et al. dargestellt werden, die eine Suppression der Immunantwort und der PMN-Aktivität nach HBO in Ratten mit Verletzungen des Spinalkanals nachweisen konnten (Tai et al. 2010). Ebenso wiesen Yldirim et al. in einer Studie mit Ratten eine im Verlauf zunehmend verringerte posttraumatische Inflammation nach HBO nach (Yıldırım et al. 2014). Cuzzocrea et al. zeigten im Rahmen einer Studie eine verringerte Zymosan-induzierte PMN-vermittelte inflammatorische Reaktion in Ratten nach HBO. Zymosan führte in den Ratten zu einer Peritonitis sowie zu multiplen Organschäden, die Exposition in der HBO-Kammer hatte hier immunsuppressive und organprotektive Effekte und konnte die Mortalität im Vergleich zur nicht exponierten Gruppe senken (Cuzzocrea et al. 2000). Büren et al. konnten hingegen keinen kurzfristigen antiinflammatorischen Effekt der HBO nach Osteitis im Rahmen der Frakturheilung bei Mäusen zeigen (Büren et al. 2018).

Die im Verlauf verringerte Aktivierung der p38 MAPK sowie der ROS-Produktion in den Versuchen bedeuten *in vivo* eine verminderte Schädigung der Organe durch die verschiedenen Komponenten der Immunantwort. Polytraumatisierte Patienten könnten so vor den teils fatalen Folgen eines SIRS bewahrt werden. Gleichzeitig legt die HBO die PMN-vermittelte Immunantwort nicht komplett lahm. Der Körper des Patienten ist also auch nach der Exposition in der Lage, sich zu einem gewissen Maß gegen Pathogene zu wehren. Die gedämpfte Immunantwort muss also nicht in einer absoluten Schutzlosigkeit des Patienten gegenüber Infektionen resultieren. Zusätzlich zu den direkt durch die Abwehrmechanismen der PMN vermittelten Folgen kann die verbesserte Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff eine hypoxisch bedingte Vasodilatation reduzieren und somit in einer geringeren Durchblutung und damit auch Leukozytenpassage bei ausreichender Oxygenierung resultieren. So konnten Zhang et al. eine verminderte PMN-Dichte und

Inflammation sowie eine verbesserte Wundheilung in ischämischen Wunden nach HBO-Therapie beobachten (Zhang et al. 2008). Auch konnte in der Therapie von traumatischen Verletzungen des Rückenmarks ein verbessertes neurologisches *outcome* durch HBO beobachtet werden (Asamoto et al. 2000). Eine Reduktion der Organschäden lässt sich auch aus einer Studie von Bektas et al. herleiten. Hier zeigte sich, dass es nach HBO zu einer tendenziell geringeren sepsisinduzierten Leberschädigung in Ratten kommt, die unter anderem auf eine Reduktion des oxidativen Stresses zurückzuführen ist (Bektas et al. 2019).

Zu beachten bleibt sicher, dass die klinische Umsetzung der hyperbaren Oxygenierung polytraumatisierter Patienten einen hohen logistischen Aufwand bedeutet. Die Patienten sind auf die intensivmedizinische Versorgung in einem Zentrum angewiesen, in dem auch eine Therapie in einer HBO-Kammer möglich ist. Auch müssen die Überwachung des Patienten während des Aufenthaltes in der Kammer sowie ein zeitnahes Eingreifen im Notfall möglich sein. Dies ist mit entsprechender Technik und gut geschultem Personal in interdisziplinärer Zusammenarbeit durchführbar (Wiese et al. 2006), bedarf aber einer guten Planung in einem spezialisierten Zentrum.

5.3 Ausblick

Die PMN wurden in der HBO-Kammer im Rahmen der Studie einmalig für 2 h exponiert. In der klinischen Anwendung werden je nach Indikation unterschiedlich lange, teilweise wiederholte HBO-Expositionen durchgeführt (Wiese et al. 2006). Es zeigten sich bereits nach einmaliger Behandlung der PMN in der HBO-Kammer potentiell organprotektive Effekte auf die PMN sowohl der Gesunden als auch der polytraumatisierten Patienten. Dies wirft die Frage auf, ob die Exposition nach einem veränderten Schema mit wiederholter Inkubation in der HBO-Kammer möglicherweise weitergehende positive Effekte auch auf die Freisetzung von NETs und die Aktivierung der ERK MAPK insbesondere in den PMN der Patienten nach schwerem Trauma hat. Da die Aktivierung der ERK MAPK die Stabilität des Mcl-1 Proteins zumindest nach Stimulation mit GM-CSF beeinflusst (Derouet et al. 2004), könnte auch ein Effekt auf die Konzentration des Mcl-1-Proteins und somit auf die Apoptose der PMN folgen. Ziel sollte sein, eine Suppression der Immunantwort in einem Ausmaß zu erreichen, das zwar die

organschädigenden Prozesse im Rahmen des SIRS unterdrückt, den Patienten jedoch nicht völlig schutzlos gegenüber Infektionen lässt.

Da viele Effekte der HBO zeitverzögert einsetzen, kann auch ein Effekt auf die Chemotaxis im weiteren Verlauf bislang nicht ausgeschlossen werden. Verschiedene Veröffentlichungen beschreiben einen Effekt der HBO auf die Expression der Adhäsionsproteine, die den Kontakt der PMN mit dem Endothel vermitteln (Kalns et al. 2002) (Labrousse et al. 1999). Da ein Effekt auf die direkte Chemotaxis der PMN nach schwerem Trauma im Rahmen der Studie 30 min nach HBO nicht nachweisbar war, bleibt zu überprüfen, ob möglicherweise im weiteren Verlauf ein Effekt auf die Expression der für die Adhäsion und Extravasion benötigten Proteine besteht und die Migration in durch schwere Traumata geschädigte Gewebe auf diesem Weg reduziert werden kann. Auch ein Effekt der HBO auf die für die Extravasion erforderliche endotheliale Proteinexpression ist denkbar und bleibt zu überprüfen.

Im einem nächsten Schritt wäre eine weitergehende Untersuchung der Effekte der HBO im *in vivo*-Modell interessant. Einige Konsequenzen der Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff könnten im Organismus durch zusätzliche Effekte wie eine Vasokonstriktion durch das erhöhte Sauerstoffangebot oder die Beeinträchtigung der Wechselwirkungen mit dem Endothel weitergehend positiv beeinflusst werden.

6 Literaturverzeichnis

- Akgul, C., Moulding, D. a & Edwards, S.W., 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS letters*, 487(3), pp.318–322.
- Albelda, S.M., Smith, C.W. & Ward, P. a, 1994. Adhesion molecules and inflammatory injury. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8(8), pp.504–512.
- Allan, L. a et al., 2003. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nature cell biology*, 5(7), pp.647–654.
- Almzaiel, A.J. et al., 2013. Effects of hyperbaric oxygen treatment on antimicrobial function and apoptosis of differentiated HL-60 (neutrophil-like) cells. *Life Sciences*, 93(2-3), pp.125–131. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.06.003>.
- Alvarado-Kristensson, M. et al., 2004. p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils. *The Journal of experimental medicine*, 199(4), pp.449–458.
- Asamoto, S. et al., 2000. Hyperbaric oxygen (HBO) therapy for acute traumatic cervical spinal cord injury. *Spinal cord*, 38(9), pp.538–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035474>.
- Bektas, A., Ulusoy, M. & Refik Mas, M., 2019. Do Late Phase Hyperbaric and Normobaric Oxygen Therapies have Effect on Liver Damage? An Experimental Sepsis Model. *General Medicine: Open Access*, 07(01), pp.1–6.
- El Benna, J. et al., 1996. Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Archives of biochemistry and biophysics*, 334(2), pp.395–400.
- Biffi, W.L. et al., 2001. Neutrophil apoptosis is delayed by trauma patients' plasma via a mechanism involving proinflammatory phospholipids and protein kinase C. *Surgical infections*, 2(4), pp.289–293; discussion 294–295.
- Biffi, W.L. et al., 1999. Neutrophils are primed for cytotoxicity and resist apoptosis in injured patients at risk for multiple organ failure. *Surgery*, 126(2), pp.198–202.
- Block, L.H., Lüthy, R. & Siegenthaler, W., 1980. Oxidativer Metabolismus von Phagozyten: Physikochemische Grundlagen und klinische Relevanz. *Klinische Wochenschrift, Springer Verlag*, 58, pp.1271–1281.
- Bone, R. et al., 1992. accplscm consensus conference for Sepsis and Organ Failure and. *Chest*, 101, pp.1644–1655.
- Briegel, J. & Möhnle, P., 2013. Internationale Leitlinien der Surviving Sepsis Campaign: Update 2012. *Anaesthesist*, 62(4), pp.304–309.

- Brinkmann, V. et al., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), pp.1532–1535.
- Büren, C. et al., 2018. Effect of hyperbaric oxygen therapy (HBO) on implant-associated osteitis in a femur fracture model in mice. *PLoS ONE*, 13(1), pp.1–17.
- Clark, R. a, 1999. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *The Journal of infectious diseases*, 179 Suppl (Suppl 2), pp.S309–S317.
- Colotta, F. et al., 1992. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, 80(8), pp.2012–2020.
- Cuzzocrea, S. et al., 2000. Role of hyperbaric oxygen exposure in reduction of lipid peroxidation and in multiple organ failure induced by zymosan administration in the rat. *Shock (Augusta, Ga.)*, 13(3), pp.197–203.
- Dahlgren, C. & Karlsson, A., 1999. Respiratory burst in human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*, 232(1-2), pp.3–14.
- Derouet, M. et al., 2004. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), pp.26915–26921.
- Domina, A.M. et al., 2004. MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene*, 23(31), pp.5301–5315. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=15241487&retmode=ref&cmd=prlinks\papers2://publication/doi/10.1038/sj.onc.1207692>.
- Dunham, C.M. et al., 1995. Post-traumatic multiple organ dysfunction syndrome — infection is an uncommon antecedent risk factor. *Injury*, 26(6), pp.373–378.
- Faurschou, M. & Borregaard, N., 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 5(14), pp.1317–1327.
- Frey, G. et al., 1998. Hyperbare Oxygenation. *Der Anaesthetist*, 47(4), pp.269–289.
- Fröhlich, M. et al., 2014. Epidemiology and risk factors of multiple-organ failure after multiple trauma: An analysis of 31,154 patients from the TraumaRegister DGU. *The journal of trauma and acute care surgery*, 76(4), pp.921–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662853>.
- Fuchs, T. a. et al., 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 176(2), pp.231–241.
- Ganguly, B.J. et al., 2002. Hyperbaric oxygen enhances apoptosis in hematopoietic cells. *Apoptosis*, 7(6), pp.499–510.
- Glasser, L. & Fiederlein, R.L., 1987. Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood*, 69(3), pp.937–944.

- Gray, R.D. et al., 2013. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps. *Journal of inflammation (London, England)*, 10(1), p.12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3643828&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Greenlee-Wacker, M.C. et al., 2014. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils prevents macrophage efferocytosis and induces programmed necrosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(10), pp.4709–17. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/192/10/4709.full>.
- Grimberg-Peters, D. et al., 2016. Hyperbaric oxygen reduces production of reactive oxygen species in neutrophils from polytraumatized patients yielding in the inhibition of p38 MAP kinase and downstream pathways. *PLoS ONE*, 11(8), pp.1–14.
- Gris, D., Hamilton, E.F. & Weaver, L.C., 2008. The systemic inflammatory response after spinal cord injury damages lungs and kidneys. *Experimental Neurology*, 211(1), pp.259–270. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488608000605>.
- Hakim, A. et al., 2011. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature chemical biology*, 7(2), pp.75–77. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.496>.
- Hazzalin, C. a. et al., 1996. p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Current Biology*, 6(8), pp.1028–1031.
- Hietbrink, F. et al., 2006. Trauma: the role of the innate immune system. *World journal of emergency surgery : WJES*, 1, p.15.
- Imperatore, F. et al., 2006. Hyperbaric oxygen therapy prevents coagulation disorders in an experimental model of multiple organ failure syndrome. *Intensive Care Medicine*, 32(11), pp.1881–1888.
- Jüttner, B. et al., 2003. Lack of toxic side effects in neutrophils following hyperbaric oxygen. *Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc*, 30(4), pp.305–311.
- Kalns, J. et al., 2002. Hyperbaric oxygen exposure temporarily reduces Mac-1 mediated functions of human neutrophils. *Immunology Letters*, 83(2), pp.125–131.
- Keel, M. & Trentz, O., 2005. Pathophysiology of polytrauma. *Injury*, 36(6), pp.691–709.
- Keesler, G. a et al., 1998. Purification and activation of recombinant p38 isoforms alpha, beta, gamma, and delta. *Protein expression and purification*, 14(2), pp.221–228.
- Kemmer, A. & Bühren, V., 2004. Value of hyperbaric oxygen therapy (HBOT) in trauma surgery. *Trauma und Berufskrankheit*, 6(S03), pp.368–373.

- Kettritz, R. et al., 1998. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils. *Kidney international*, 53(1), pp.84–91.
- Köller, M., Wick, M. & Muhr, G., 2001. Decreased leukotriene release from neutrophils after severe trauma: Role of immature cells. *Inflammation*, 25(1), pp.53–59.
- Krump, E. et al., 1997. Chemotactic peptide N-formyl-Met-Leu-Phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2), pp.937–944.
- Labrousche, S. et al., 1999. Influence of hyperbaric oxygen on leukocyte functions and haemostasis in normal volunteer divers. *Thrombosis Research*, 96(4), pp.309–315.
- Lefering, R., 2008. Severe trauma. *Notfall + Rettungsmedizin*, 11(6), pp.373–376.
- Lenz, A., Franklin, G. a. & Cheadle, W.G., 2007. Systemic inflammation after trauma. *Injury*, 38(12), pp.1336–1345.
- Leuenroth, S.J. et al., 2000. Suppression of PMN apoptosis by hypoxia is dependent on Mcl-1 and MAPK activity. *Surgery*, 128(2), pp.171–177.
- Lin, S.-S. et al., 2014. Effects of hyperbaric oxygen on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *BMC musculoskeletal disorders*, 15(1), p.56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3938030&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lloyds, D., Brindle, N.P. & Hallett, M.B., 1995. Priming of human neutrophils by tumour necrosis factor-alpha and substance P is associated with tyrosine phosphorylation. *Immunology*, 84(2), pp.220–226.
- Ma, a. C. & Kubes, P., 2008. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6(3), pp.415–420.
- Mannick, J. a, Rodrick, M.L. & Lederer, J. a, 2001. The immunologic response to injury. *Journal of the American College of Surgeons*, 193(3), pp.237–244.
- Martin, J. et al., 2010. Evidence and consensus-based German guidelines for the management of analgesia, sedation and delirium in intensive care--short version. *German medical science : GMS e-journal*, 8.
- Masuoka, H.C. et al., 2009. Mcl-1 degradation during hepatocyte lipoapoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44), pp.30039–30048.
- Matsunami, T. et al., 2011. Enhancement of reactive oxygen species and induction of apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 4(3), pp.255–266.
- Mccracken, J.M. & Allen, L.H., 2014. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *Journal of Cell death*, 7, pp.15–23.

- Min, K. et al., 2014. Antipsychotic agent thioridazine sensitizes renal carcinoma Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated inhibition of Akt signaling and downregulation of Mcl-1 and c-FLIP(L). *Cell death & disease*, 5(2), p.e1063. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3944252&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Moulding, D. a et al., 2000. Apoptosis is rapidly triggered by antisense depletion of MCL-1 in differentiating U937 cells. *Blood*, 96(5), pp.1756–1763.
- Niu, C.C. et al., 2011. Beneficial effects of hyperbaric oxygen on human degenerated intervertebral disk cells via suppression of IL-1?? and p38 MAPK signal. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(1), pp.14–19.
- Niu, C.C. et al., 2013. Hyperbaric oxygen treatment suppresses MAPK signaling and mitochondrial apoptotic pathway in degenerated human intervertebral disc cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 31(2), pp.204–209.
- Ogura, Hiroshi MD; Tanaka, Hiroshi MD; Koh, Taichin BS; Hashiguchi, Naoyuki MD; Kuwagata, Yasuyuki MD; Hosotsubo, Hideo BS; Shimazu, Takeshi MD; Sugimoto, H.M., 1999. Priming , Second-Hit Priming , and Apoptosis in Leukocytes from Trauma Patients. *The Jurnal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 46(5), pp.774–783.
- Ostrowski, R.P., Tang, J. & Zhang, J.H., 2006. Hyperbaric oxygen suppresses NADPH oxidase in a rat subarachnoid hemorrhage model. *Stroke*, 37(5), pp.1314–1318.
- Oyaizu, T. et al., 2018. Hyperbaric oxygen reduces inflammation, oxygenates injured muscle, and regenerates skeletal muscle via macrophage and satellite cell activation. *Scientific Reports*, 8(1), pp.1–12.
- Papayannopoulos, V. & Zychlinsky, A., 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology*, 30(11), pp.513–521.
- Pashevin, D.O. et al., 2015. Proteasome inhibition diminishes the formation of neutrophil extracellular traps and prevents the death of cardiomyocytes in coculture with activated neutrophils during anoxia-reoxygenation. *Pathobiology*, 82(6), pp.290–298.
- Powner, D.J. et al., 2007. Stable adhesion and migration of human neutrophils requires phospholipase D-mediated activation of the integrin CD11b/CD18. *Molecular Immunology*, 44(12), pp.3211–3221.
- Saito, K. et al., 1991. Suppressive effect of hyperbaric oxygenation on immune responses of normal and autoimmune mice. *Clinical and experimental immunology*, 86(2), pp.322–327.
- Shih, H.C., Huang, M.S. & Lee, C.H., 2010. Polymorphonuclear cell priming associated with NF- κ B activation in patients with severe injury is partially dependent on macrophage migration inhibitory factor. *Journal of the American College of Surgeons*, 211(6), pp.791–797. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2010.07.028>.

- Stolk, J. et al., 1994. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 11(1), pp.95–102.
- Tai, P.-A. et al., 2010. Attenuating Experimental Spinal Cord Injury by Hyperbaric Oxygen: Stimulating Production of Vasculoendothelial and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Growth Factors and Interleukin-10. *Journal of Neurotrauma*, 27(6), pp.1121–1127. Available at: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/neu.2009.1162>.
- Taneja, R. et al., 2008. Immature Circulating Neutrophils in Sepsis Have Impaired Phagocytosis and Calcium Signaling. *Shock*, 30(6), pp.618–622. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-200812000-00002>.
- Tompach, P.C., Lew, D. & Stoll, J.L., 1997. Cell response to hyperbaric oxygen treatment. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 26(2), pp.82–86.
- Tsukamoto, T., Chanthaphavong, R.S. & Pape, H.C., 2010. Current theories on the pathophysiology of multiple organ failure after trauma. *Injury*, 41(1), pp.21–26.
- Waydhas, C. & Nast-Kolb, D., 1999. Intensivbehandlung beim polytraumatisierten patienten. *Unfallchirurg*, 102(6), pp.474–491.
- Waydhas, C., Seekamp, A. & Sturm, J. a., 2006. Intensivmedizin aus sicht des Unfallchirurgen. *Chirurg*, 77(8), pp.682–686.
- Weber, S.U. et al., 2009. Hyperbaric oxygen induces apoptosis via a mitochondrial mechanism. *Apoptosis*, 14(1), pp.97–107.
- Wiese, S. et al., 2006. Hyperbare sauerstofftherapie. Notfall- und intensivmedizinische besonderheiten. *Anaesthesist*, 55(6), pp.693–705.
- Wolfson, M. et al., 1985. Phorbol myristate acetate mediates redistribution of protein kinase C in human neutrophils: potential role in the activation of the respiratory burst enzyme. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 135(3), pp.2057–2062.
- Yamamori, T. et al., 2000. Roles of p38 MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Letters*, 467(2-3), pp.253–258.
- Yıldırım, A.O. et al., 2014. Effectiveness of hyperbaric oxygen and ozone applications in tissue healing in generated soft tissue trauma model in rats: an experimental study. *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 20(3), pp.167–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24936837>.
- Zhang, B. et al., 2003. Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis. Cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), pp.28443–28454.

- Zhang, Q. et al., 2008. Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model. *The Journal of investigative dermatology*, 128(8), pp.2102–2012. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337831>.
- Zhang, Q. & Gould, L.J., 2013. Hyperbaric Oxygen Reduces Matrix Metalloproteinases in Ischemic Wounds through a Redox-Dependent Mechanism. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(1), pp.237–246. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/jid.2013.301>.
- Zhao, B. et al., 2017. Hyperbaric oxygen pretreatment improves cognition and reduces hippocampal damage via p38 mitogen-activated protein kinase in a rat model. *Yonsei Medical Journal*, 58(1), pp.131–138.
- Zhou, Q. et al., 2018. A novel approach to estimate ROS origination by hyperbaric oxygen exposure, targeted probes and specific inhibitors. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(5), pp.1800–1808.

7 Danksagung

Ich danke allen Patientinnen und Patienten und den gesunden Kontrollprobandinnen und -probanden, die sich für die Teilnahme an der Studie bereiterklärt und diese möglich gemacht haben. Ich bedanke mich besonders bei PD Dr. Adnana Paunel-Görgülü für die Vergabe des Themas sowie für stete Ansprechbarkeit und Unterstützung in allen für die Durchführung und Erstellung dieser Dissertation erforderlichen Belangen. Dr. med. Carina Büren danke ich für die Vorarbeiten sowie den kontinuierlichen Kontakt in die unfallchirurgische Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und die Auswahl und Aufklärung der Studienpatienten. Jutta Schneider, Samira Sehgrouchni und Christa Wilkens danke ich für ihren Rat und ihre Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten. Auch danke ich dem gesamten Team des Forschungslabors der unfallchirurgischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die schöne Zeit im Labor. Christa Grimberg und Christine Schmidbauer danke ich für das geduldige Korrekturlesen der ungewohnten Materie sowie ihre Unterstützung. Sandra Seifert danke ich für das Korrekturlesen und den regen Gedankenaustausch. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Mann Dominik Peters für seine große Unterstützung bei all meinen Plänen und seine in dieser Hinsicht scheinbar unendliche Geduld.