

Aus der
Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik,
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie Tübingen

**Einfluss von N-Acetylcystein auf
Granulo- und Monozyten
während Frakturheilung bei alten Patienten mit
Bruch der langen Röhrenknochen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Radermacher, Martin Sebastian

2018

Dekan: Professor Dr. Ingo B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Andreas K. Nüssler

2. Berichterstatter: Professorin Dr. Dorothea Alexander-Friedrich

Tag der Disputation: 10. Januar 2018

Meiner geliebten Helene.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	8
2 Material und Methoden	17
2.1 Verwendete Materialien.....	17
2.2 Spendergruppen, Blutserum- und Zellmaterial.....	19
2.3 Kultivierung von humanen myeloischen Progenitorblutzelllinien der natürlichen Immunabwehr	20
2.3.1 HL-60-Zelllinie.....	20
2.3.2 THP-1-Zelllinie	21
2.4 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau	22
2.5 Granulo-/Monozytenisolierung mittels Percoll-Dichtemedium bei Dichte-zentrifugation.....	22
2.6 Anfärbung der Blutzellen mittels Pappenheim Färbung	24
2.7 Analyse der Zellviabilität in Zellkultur mittels Fluoreszenzmessung.....	24
2.7.1 Identifizierung optimierter Zellzahl für die Analyse der Zellviabilität	25
2.7.2 Analyse der Zellviabilität der HL-60- bzw. THP-1-Zellen unter NAC.....	25
2.7.3 Identifizierung optimaler Milieukonzentration von H ₂ O ₂ zur oxidativen Stressinduktion bei HL-60-/THP-1-Zellen (Teil 1).....	26
2.7.4 Analyse der Zellviabilität der aus Spendervollblut isolierten Granulo- /Monozyten ohne/mit NAC ohne/mit H ₂ O ₂	27
2.8 Analyse von ROS in Zellkultur mittels Fluoreszenzmessung	28
2.8.1 Identifizierung optimierter Zellzahl und Messzeitpunkt für Analyse intrazellulärer ROS-Produktion.....	29
2.8.2 Identifizierung optimaler Milieukonzentration von H ₂ O ₂ zur oxidativen Stressinduktion bei HL-60-/THP-1-Zellen (Teil 2).....	29
2.8.3 Analyse intrazellulärer ROS der aus Spendervollblut isolierten Granulo- /Monozyten ohne/mit NAC ohne/mit H ₂ O ₂	29
2.9 „Griess“-Methode zur Analyse organischer Stickstoffkonzentration im Blutserum	30
2.10 „Lowry“-Proteinkonzentrationsbestimmung	32
2.11 Analyse des intrazellulären GSH-Gehaltes von HL-60- bzw. THP-1-Zellen	34
2.12 Sandwich-Immunoassay (ELISA) zur Messung pro-/antiinflammatorischer Botenstoffspiegel im Blutserum.....	36
2.13 Sandwich-Immunoassay basiertes Kit zur Messung intrazellulärer Zellsignalkaskadenproteinspiegel	40
2.14 Statistische Auswertung und graphische Darstellung	45

3 Ergebnisse	46
3.1 Einfluss des Alters auf humane Granulo-/Monozyten und den Spiegel an RNS im Organismus	46
3.1.1 Erhöhung pro-/antiinflammatorischer monozytärer Grundaktivität	46
3.1.2 Geringere apoptotische Grundaktivität der Granulozyten/Monozyten älterer Spender bei Gesundheit	49
3.1.3 Höheres Zellüberleben von Granulo-/Monozyten älterer Spender	53
3.1.4 Geringste intrazelluläre ROS-Spiegel bei Granulo-/Monozyten alter gesunder Spender	54
3.1.5 Erhöhte systemische RNS im Alter	55
3.2 Einfluss des Alters auf humane Granulo-/Monozyten im Umgang mit künstlichem oxidativem Stress	55
3.2.1 Mögliche Steigerung einer Gegenregulation apoptotischer Prozesse der Zellen gesunder Spender im Alter	56
3.2.2 Höhere Überlebensrate der Zellen gesunder Spender im Alter	58
3.2.3 Altersunabhängige Steigerung zellulärer ROS-Produktion bei Fraktur	59
3.3 Einfluss von NAC auf humane Granulo-/Monozyten alter Menschen	60
3.3.1 Erhöhung des intrazellulären Glutathionspiegels oxidativ ungestresster HL-60-/THP-1-Progenitorzellen	61
3.3.2 Proapoptotischer Einfluss bei Gesundheit, antiapoptischer bei Fraktur	63
3.3.3 Gesundheitsunabhängig antiapoptotischer Einfluss bei oxidativem Stress	65
3.3.4 Gesteigerte Überlebensrate bei Fraktur	67
3.3.5 Erhöhung intrazellulärer ROS bei Gesunden	69
4 Diskussion.....	71
4.1 Einfluss des Alters auf humane Granulo-/Monozyten und den Spiegel an RNS im Organismus	71
4.2 Einfluss des Alters auf humane Granulo-/Monozyten im Umgang mit künstlichem oxidativem Stress	77
4.3 Einfluss von NAC auf humane Granulo-/Monozyten alter Menschen	81
4.4 Schlussfolgerung aus der Arbeit	87
5 Ausblick.....	90
6 Zusammenfassung.....	92
7 Literaturverzeichnis.....	93
8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	101
Danksagung	102
Lebenslauf.....	103

Appendix.....	I
1 Versuchsvorbereitende Vorarbeiten und versuchsspezifische Lösungen	I
1.1 Details Kapitel 2.5: Granulo-/Monozytenisolierung mittels Percoll-Dichtemedium bei Dichtezentrifugation	I
1.2 Details Kapitel 2.7.1: Identifizierung optimierter Zellzahl für Analyse der mitochondrialen Umsatzaktivität	II
1.3 Details Kapitel 2.7.2: Analyse der Zellviabilität der HL-60- bzw. THP-1-Zellen unter NAC.....	IV
1.4 Details Kapitel 2.7.3: Identifizierung optimaler Milieukonzentration von H ₂ O ₂ zur oxidativen Stressinduktion (Teil 1).....	IV
1.5 Details Kapitel 2.7.4: Analyse der Zellviabilität der aus Spendervollblut isolierten Granulo-/Monozyten ohne/mit NAC ohne/mit H ₂ O ₂	VIII
1.6 Details Kapitel 2.8.1: Identifizierung optimierter Zellzahl und Messzeitpunkt für Analyse intrazellulärer ROS-Produktion.....	IX
1.7 Details Kapitel 2.8.2: Identifizierung optimaler Milieukonzentration von H ₂ O ₂ zur oxidativen Stressinduktion bei HL-60-/THP-1-Zellen (Teil 2)	XI
1.8 Details Kapitel 2.8.3: Analyse intrazellulärer ROS der aus Spendervollblut isolierten Granulo-/Monozyten ohne/mit NAC ohne/mit H ₂ O ₂	XIII
1.9 Details Kapitel 2.11: Analyse des intrazellulären Gesamt-GSH-Gehaltes von HL-60- bzw. THP-1-Zellen.....	XIII
2 Einfluss NAC auf HL-60- und THP-1-Progenitorzellen.....	XIII
2.1 Analyse Dosis-Wirkungsspektrums von NAC auf mitochondriale Umsatzaktivität ...	XIV
2.2 Einfluss NAC-Applikation prä, co und post Induktion von oxidativem Stress bzgl. mitochondrialer Umsatzaktivität und intrazellulärer ROS-Produktion.....	XVIII
2.2.1 Ergebnis: Einfluss NAC auf Zellviabilität bei oxidativem Stress.....	XX
2.2.2 Ergebnis: Einfluss NAC auf zelluläre ROS-Produktionsrate bei oxidativem Stress	XXII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	17
Tabelle 2: Verwendete Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	18
Tabelle 4: Übersicht Spendergruppen	20
Tabelle 5: Verwendete Anwendungslösungen Kapitel 2.5.....	23
Tabelle 6: Plattenbelegung der 96-Well-Platte Kapitel 2.6.1	26
Tabelle 7: Plattenbelegung der 96-Well-Platte Kapitel 2.7.4/2.8.3	27
Tabelle 8: Verwendete Stamm- und Anwendungslösungen Kapitel 2.9.....	31
Tabelle 9: BSA Standardreihe Kapitel 2.10.....	33
Tabelle 10: Verwendete Stamm- oder Anwendungslösungen Kapitel 2.10	33
Tabelle 11: Verwendete Stamm- oder Anwendungslösungen Kapitel 2.11	34
Tabelle 12: Verwendete Stamm- oder Anwendungslösungen Kapitel 2.12	37
Tabelle 13: Fängerantikörper Stammlösungen Kapitel 2.12	37
Tabelle 14: Fängerantikörper Anwendungslösungen Kapitel 2.12	37
Tabelle 15: Detektionsantikörper Stammlösungen Kapitel 2.12	38
Tabelle 16: Detektionsantikörper Anwendungslösungen Kapitel 2.12	38
Tabelle 17: Standard Stammlösungen Kapitel 2.12	38
Tabelle 18: Standard Anwendungslösungen und Standardreihen Kapitel 2.12.....	39
Tabelle 19: Verwendete Stamm- oder Anwendungslösungen Kapitel 2.13	41
Tabelle 20: Analytierte Kaskadenproteine des verwendeten Antibody Array Kits.....	42
Tabelle 21: Funktionsübersicht untersuchter intrazellulärer Kaskadenproteine.....	50
Tabelle 22: Herstellung verschiedenprozentiger Percollösungen (bei RT).....	I
Tabelle 23: Plattenbelegung der 96-Well-Platte Kapitel 2.7.1	III
Tabelle 24: Plattenbelegung der 96-Well-Platte Kapitel 2.7.3	VI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Todesursachen in Abhängigkeit zum Einkommenslevel eines Landes	8
Abbildung 2: Einfluss Lebensalter auf Knochendichte und Frakturrisiko	9
Abbildung 3: Einfluss von NAC auf Synthese- und Nutzungswege für GSH	13
Abbildung 4: Mikroskopische Überprüfung der Reinheit isolierter Granulo-/Monozyten.	24
Abbildung 5: Fotografie und Belegungsplan des verwendeten Antibody Array Kits	43
Abbildung 6: Alters-/gesundheitsabhängige Botenstoffspiegel typisch für eine M1-Differenzierung	48
Abbildung 7: Alters-/gesundheitsabhängige Botenstoffspiegel typisch für eine M2-Differenzierung	49
Abbildung 8: Alters-/gesundheitsabhängige intrazelluläre Konzentration verschiedener Signalkaskadenproteinen in Granulo-/Monozyten.....	52
Abbildung 9: Alters-/gesundheitsabhängige mitochondriale Umsatzaktivität als Hinweis auf die Viabilität von Granulo-/Monozyten.....	53
Abbildung 10: Alters-/gesundheitsabhängige intrazelluläre ROS Spiegel in Granulo-/Monozyten	54
Abbildung 11: Alters-/gesundheitsabhängige Nitrat-/Nitritkonzentration in Blutseren	55
Abbildung 12: Einfluss H ₂ O ₂ auf die intrazelluläre Konzentration verschiedener Signalkaskadenproteine in Granulo-/Monozyten in Abhängigkeit zum Alter/Gesundheitszustand der Spender	58
Abbildung 13: Einfluss von H ₂ O ₂ auf die mitochondriale Umsatzaktivität als Hinweis auf die Viabilität von Granulo-/Monozyten in Abhängigkeit zum Alter/Gesundheitszustand der Spender	59
Abbildung 14: Einfluss von H ₂ O ₂ auf die intrazelluläre ROS-Produktionsraten von Granulo-/Monozyten in Abhängigkeit zum Alter/Gesundheitszustand der Spender.....	60
Abbildung 15: Einfluss von NAC auf die intrazelluläre ROS-Produktionsrate H ₂ O ₂ -gestresster HL-60-/THP-1-Zellen	61
Abbildung 16: Einfluss von NAC auf den intrazellulären Glutathionspiegel in HL-60- bzw. THP-1-Zellen	62
Abbildung 17: Einfluss von NAC auf die intrazelluläre Konzentration verschiedener Signalkaskadenproteine in Granulo-/Monozyten in Abhängigkeit zum Alter/Gesundheitszustand der Spender	65
Abbildung 18: Einfluss von NAC auf die intrazelluläre Konzentration verschiedener Signalkaskadenproteine in Granulo-/Monozyten in Abhängigkeit zum Alter/Gesundheitszustand der Spender unter oxidativem Stress.....	67

Abbildung 19: Alters-/gesundheitsabhängiger Einfluss von NAC auf die mitochondriale Umsatzaktivität als Hinweis auf die Viabilität von oxidativ un-/gestressten Granulo-/Monozyten	68
Abbildung 20: Alters-/gesundheitsabhängiger Einfluss von NAC auf die intrazellulären ROS-Produktionsraten von oxidativ un-/gestressten Granulo-/Monozyten	70
Abbildung 21: Negative prooxidative Wirkung von NAC bei neutrophilen Granulozyten eines gesunden Organismus	83
Abbildung 22: Positive antioxidative Wirkung von NAC bei neutrophilen Granulozyten eines erkrankten Organismus	84
Abbildung 23: Granulo-/Monozytenisolation aus Spendervollblut	II
Abbildung 24: Mitochondriale Aktivität verschiedener HL-60-Zellzahlen nach 30 min ...	IV
Abbildung 25: Dosis-Wirkungsspektrum H ₂ O ₂ auf mitochondriale Aktivität von THP-1-/HL-60-Progenitorzellen nach 1 und 2 Stunden.....	VII
Abbildung 26: Fotografie einer 96-Well-Platte in Belegung nach <i>Tabelle 7</i>	VIII
Abbildung 27: ROS-Produktionsmenge verschiedener HL-60-Zellzahlen in 0,03%-igem H ₂ O ₂ -Milieu	X
Abbildung 28: ROS-Produktionsraten von HL-60-Progenitorzellen in differentem H ₂ O ₂ -Milieu nach 20 min.....	XIII
Abbildung 29: Dosis-Wirkungsspektrum NAC auf mitochondriale Aktivität von HL-60-/THP-1-Zellen	XV
Abbildung 30: Mitochondriale Aktivität von HL-60-/THP-1-Progenitorzellen unter NAC im Verlauf einer Woche.....	XVII
Abbildung 31: Flussdiagramm Versuchsablauf NAC-Applikation prä, co und post Induktion von oxidativem Stress.....	XIX
Abbildung 32: Einfluss von NAC auf mitochondriale Umsatzaktivität oxidativ un-/gestresster HL-60-/THP-1-Zellen	XXI
Abbildung 33: Einfluss NAC auf die mitochondriale Aktivität zweimalig mit H ₂ O ₂ gestresster HL-60-Zellen	XXII
Abbildung 34: Einfluss von NAC auf intrazelluläre ROS-Produktionsmenge H ₂ O ₂ -gestresster HL-60-/THP-1-Zellen	XXIII

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	NaF	Natriumfluorid
BSA	Bovine Serum Albumin	Na-K-Tartrat	Natriumkaliumtartrat
BGU	Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik	NaOH	Natriumhydroxid
CuSO ₄	Kupfersulfat	NaNO ₂	Natriumnitrit
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
DCFH-DA	Dichlorodihydrofluoresceindiacetat	NET	Neutrophil Extracellular Traps
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser	NF- κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
DMSO	Dimethylsulfoxid	NO	Stickstoffmonoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure	NR	Nitratreduktase
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung	O ₂ ⁻	Superoxidanion
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoesäure)	ONOO ⁻	Peroxyinitrit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	p38 MAPK	Protein 38 Mitogen-Activated Protein Kinases
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	p53	Protein 53
ECL	Enhanced chemiluminescence	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
FADNa ₂	Flavin Adenin Dinukleotid	RA	Rezeptorantagonist
FCS	Fetal Calf Serum	RNS	Reaktive Nitrogen Species
Chk1/-2	Checkpoint kinase 1 bzw. 2	ROS	Reactive Oxygen Species
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor	RT	Raumtemperatur
GPx	Glutathionperoxidase	SAPK/JNK	stress-activated phospho-kinases/c-Jun N-terminal kinases
GR	Glutathionreduktase	Smad2	Sma (small body size (Fadenwurm-Protein) + Mad (mothers against decapentaplegic (Fruchtfliegen-Protein)
GSH	Glutathion (reduziert)	TAK1	Transforming growth factor b-activated kinase 1
GSSG	Glutathion-Disulfid (oxidiert)	THP-1	Humane Monozytenleukämie-Zelllinie (von Tsuchiya et al. 1980 (5))
HCl	Salzsäure	TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
(h)IL	(Humanes) Interleukin	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
HIV	Human Immunodeficiency Virus	UV	Ultraviolett
HRP	Horseradish peroxidase		
HSP27	Heat shock protein 27		
HL-60	Menschliche Promyelozytenleukämie-Zelllinie (von Gallagher et al. 1979 (4))		
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid		
IFN- γ	Interferon gamma		
I κ B α	Inhibitor of NF- κ B alpha		
KNO ₃	Kaliumnitrat		
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenorthosphat		
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenorthosphat		
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting		
M1-/M2-	Makrophagenuntergruppe 1 bzw. 2		
MPP	Metaphosphorsäure		
NAC	N-Acetyl-L-cystein		
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)		
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat		
NADPH	Nicotinamadenindinucleotidphosphat		

1 Einleitung

Wirtschaftlich gut entwickelte Länder bringen durch fortschrittliche hygienische und medizinische Versorgungsstrukturen eine längere Lebenserwartung ihrer Bevölkerung mit sich. Diese ist mit Verzögerung ebenfalls in Ländern geringer und mittlerer wirtschaftlicher Entwicklung zu erwarten (1). Während in wenigen Jahren der Weltbevölkerungsanteil von unter 5-Jährigen und über 65-Jährigen vergleichbar bei jeweils ca. 8% liegen wird, wird sich dieser der über 65-Jährigen 2050 voraussichtlich

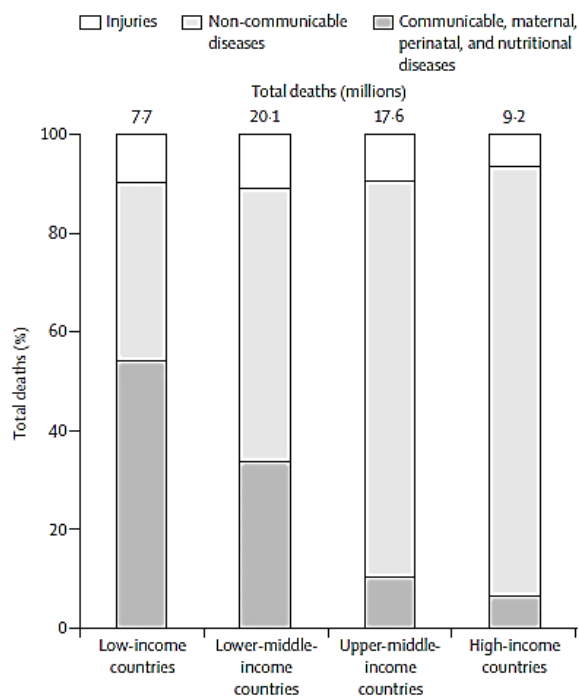


Abbildung 1: Todesursachen in Abhängigkeit zum Einkommenslevel eines Landes
(modifiziert nach Jamison et al. 2013(1))

verdoppelt, jener der unter 5-Jährigen auf ca. 6% verringert haben. Die Finanzierung einer zunehmend höheren Zahl an alten Menschen muss folglich durch eine zunehmend geringeren Zahl an jungen Menschen getragen werden (6). Mit dem Alter des Menschen steigt dessen Risiko einer Multimorbidität, weshalb unsere modernen „vergreisenden“ Gesellschaften zunehmend mit gesundheitsökonomischen Herausforderungen konfrontiert werden (7). Ein Ausdruck dieser Entwicklung ist die in den letzten Jahrzehnten zunehmend ins Interesse gerückte Erforschung alters-

bedingter organsystemischer Veränderungen. Das Verstehen der komplikationsanfälligen kostenintensiven Multimorbidität im Alter soll Schlüssel zur Entwicklung sinnvoller kostenlimitierender neuer Therapieansätze sein. Zukünftig soll diese zunehmende demographische Herausforderung hierdurch bewältigt und eine gute Lebensqualität im Alter gewährleistet werden (8). Stellen in armen Ländern mit kürzerer Lebenserwartung noch immer die übertragbaren Infektionserkrankungen die vorherrschende Todesursache dar, so sieht sich eine wohlhabende Gesellschaft mit neuen Todesursachen konfrontiert (vgl. Abb. 1) (1): Wohlstand bringt eine höhere Lebenserwartung aber auch einen ungesünderen Lebenswandel verbunden mit nicht übertragbaren, chronischen Erkrankungen (Malignomerkrankungen, Herzinsuffizienz,

Diabetes, chronische Atemwegserkrankungen, chronische Heilungsstörungen etc.) mit sich (9-11). Neben diesen Erkrankungen stellt auch der Alterungsprozess an sich eine hohe gesundheitspolitische Herausforderung dar.

Beispiel einer solchen kostenintensiven Herausforderung im Zuge der demographischen Alterung in den nächsten Jahrzehnten könnte die sich drastisch erhöhende Anzahl an Oberschenkelfrakturen sein, da es altersbedingt zu einer höheren Sturzneigung kommt und die Knochenstruktur altersbedingt instabiler wird (vgl. Abb. 2) (6, 8, 12, 13). Nach

einer Oberschenkelfraktur wiederum kommt es bei alten Menschen trotz verbesserter medizinischer Möglichkeiten unverändert zu einer hohen postoperativen Komplikationsrate (z.B. Pneumonien, Harnwegsinfekte, Wundheilungsstörungen und Sepsen), welche nicht selten mit einer hohen Mortalität einhergeht (14-17). Das Outcome eines großen Knochentraumas ist im Alter

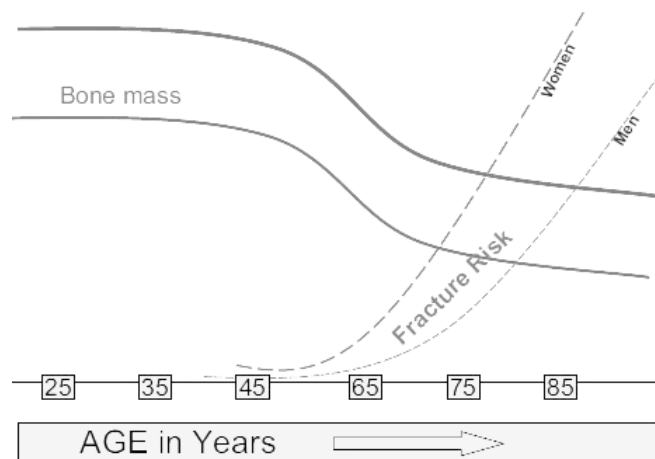


Abbildung 2: Einfluss Lebensalter auf Knochendichte und Frakturrisiko
(modifiziert nach Valsamis et al. 2006(2))

deutlich schlechter als in jungen Jahren verbunden mit verlängerten Klinikaufenthalten, einer erschwerten Rekonvaleszenz und einer Verringerung der Lebensqualität (17). Ursächlich ist neben einer langsameren Knochenheilung aufgrund gealterter Knochenmarksstammzellen und Knochenzellen eine altersbedingte Dysregulation sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunabwehr (15, 18). Diese sogenannten Immunoseneszenz, welche bisher nur bedingt erforscht ist, führt zu einer verminderten Abwehrfunktion des Organismus im Alter (19-21). Während das Immungeschehen bei alten Menschen im Sinne des „Inflammaging“ bereits basal bei Abwesenheit einer Erkrankung aktiviert ist, kann es im Falle schwerer Erkrankungen nur inadäquat gesteigert werden verbunden mit den klinisch relevanten problematischen Heilungsverläufen (22, 23).

In einem solchen Heilungsprozess bildet die schnelle angeborene Immunabwehr die erste „Verteidigungslinie“ gegen unerwünschte Pathogene und die erste

Koordinationsseinheit einer effektiven Immunantwort, was die Aktivierung der verzögert eintretenden erlernten adäquateren Immunabwehr mit einschließt (24, 25).

Die im Blut zirkulierenden Granulozyten stellen eine der wichtigsten Immunzellen der angeborenen unspezifischen aber schnellen Immunabwehr dar und werden nach Frakturgeschehen innerhalb von Minuten an den Ort des Traumas rekrutiert (18, 26). Durch das „Inflaminging“ kommt es altersbedingt bei größerem Infekt zu einer inadäquaten Produktionssteigerung der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark (27, 28). Im Alter können diese außerdem ihre Wirkung aufgrund eines schlechteren Übertritts aus der Blutbahn in das betroffene Gewebe nicht adäquat am Wirkort entfalten (29). Neben geringerer Immunzellproduktion und geringerer Erreichbarkeit des erkrankten Gewebes wird außerdem eine schlechtere Signaltransduktion der immunkommunikativen Botenstoffe für eine höhere Infektanfälligkeit bzw. komplikationsreichere Heilungsverläufe im Alter verantwortlich gemacht (20).

Die im Blut zirkulierenden Monozyten dienen dem Organismus sowohl als Phagozyten der angeborenen Immunabwehr zur Zerstörung körperfremder Strukturen als auch als antigenpräsentierende Aktivatoren der erworbenen adaptiven Immunabwehr (30). Neben einer ersten Verteidigungslinie sind sie als Regulatoren einer angemessenen pro- bzw. antiinflammatorischen Balance für einen geregelten Heilungsprozess unabdingbar (31). Lange schon nimmt man in der Forschung an, dass es zwei Arten von Makrophagenuntergruppen gibt, welche sich aus diesen im Blut zirkulierenden Monozyten entwickeln können: proinflammatorische M1- und antiinflammatorische M2-Makrophagen (31, 32). Während die klassischen proinflammatorischen M1-Makrophagen für die Aktivierung der T-1-Helferzellen (zelluläre Immunantwort), die Zerstörung intrazellulärer Pathogene, die Typ-I-Allergie (vom Sofort-Typ) sowie die Unterdrückung von Tumoren verantwortlich gemacht werden, obliegt in diesem vereinfachten Model den antiinflammatorischen alternativen M2-Makrophagen die Koordinierung der T-2-Helferzellenaktivierung (humorale Immunantwort), der Parasitenabwehr, u.a. der Typ-II-Allergie (Zytotoxischer Typ), von Immunregulationsmechanismen sowie der tumorbegünstigenden Matrixreposition (33). Eine Arbeitsgruppe unseres Instituts vermutete anhand von Zytokinanalysen in Blutseren eine tendenzielle Verschiebung der Makrophagenaktivierung älterer Spender

von der antiinflammatorischen M2- hin zu einer proinflammatorischen M1-Aktivierung, was eine neue Komponente der Inflammaging-Theorie sein könnte (22).

In dieser Arbeit wird diesem Hinweis auf eine mögliche altersbedingte Veränderung des Zusammenspiels zwischen Immunsystem und Knochenheilung anhand weiterer makrophagensubtypenspezifischer Zytokinanalysen weiter nachgegangen. Hierbei ist zu bedenken, dass eine solche Zuteilung der Monozytendifferenzierung in pro- bzw. antiinflammatorischer Makrophagensubpopulationen in jüngster Zeit kritisch diskutiert wird und neu bewertet werden muss (34). Während sich im Zusammenhang zur ineffizienteren akuten angeborenen Immunabwehr altersbedingt bei neutrophilen Granulozyten neben qualitativen auch vor allem quantitative Einbußen ergeben, ist die Monozytenanzahl altersbedingt sogar physiologisch erhöht und die Defizienz vor allem mit einer qualitativ verminderten Funktionsfähigkeit der aus ihnen differenzierten Makrophagen zu erklären (35).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind freie Radikale, wie beispielsweise das Superoxidanion (O_2^-) oder Substanzen, die sich leicht in Radikale umwandeln können wie beispielsweise H_2O_2 , welche sich bei unzureichendem antioxidativem Abbau zelltoxisch auswirken können und für pathologische Veränderungen wie Arteriosklerose, Diabetes, Krebs, Neurodegeneration und Alterung an sich verantwortlich gemacht werden (36). ROS sind jedoch nicht nur als schädigend, sondern in angemessener Konzentration auch als für einige physiologische Prozesse unabdingbar zu betrachten. So spielen ROS u.a. bei einigen zellulären Signaltransduktionen, bei der Abtötung von Pathogenen und bei der Apoptose eine wichtige Rolle (37). Außerdem können sowohl ROS wie auch Antioxidanzien einen tiefgreifende Einfluss auf die Expression von Genen haben (38).

Im Falle eines Frakturgeschehens steigen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bei jungen wie alten Menschen physiologisch im Zuge des Heilungsprozesses an (39-42). Bei alten Menschen besteht jedoch im Unterschied zu jungen bereits basal ein erhöhter Spiegel an hochreaktiven oxidativen und nitrosativen Radikalen (43-45). Die intrazelluläre Akkumulation an freien hochreaktiven Radikalen, welche die zelluläre Homöostase durch Schädigung von DNA und anderen Zellkomponenten stören, werden bereits seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts auch für den Alterungsprozess an sich verantwortlich gemacht (44, 45). Die weitere Steigerung dieses Stresslevels während

der Frakturheilung könnte im Alter Ursache der schlechteren Wund- und Knochenheilung sowie der höheren Infektionsanfälligkeit bis hin zu einem letalen Ausgang sein, da sowohl Knochen- und Bindegewebszellen als auch die Immunzellen stressbedingt Schaden nehmen könnten (46). So könnte eine gezielte Reduktion der Stressstimuli nach Fraktur insbesondere beim alten Menschen für die Entwicklung neuer, kausaler Therapie-Strategien zur Unterstützung der körpereigenen Regeneration sowie Senkung der postoperativen Komplikationsrate von großer Bedeutung sein.

Um sich gegen oxidative und nitrosative reaktionsfreudige und somit zellschädliche Radikale zu schützen, besitzen die Zellen des Menschen zahlreiche antioxidative Abwehrmechanismen, welche in der Lage sind, oxidative Radikale abzubauen. Das wichtigste bekannte zelluläre Antioxidans neben antioxidativen Proteinen ist das Tripeptid Glutathion (GSH), bestehend aus L-Glutaminsäure, L-Cystein und Glycin, welches in zwei Schritten intrazellulär im Zellplasma synthetisiert wird. Hierbei ist der erste L-Cystein bindende Schritt durch die γ -Glutamyl-Cystein-Ligase aufgrund der limitierten Menge intrazellulären L-Cysteins der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Biosynthese (47, 48). Die antioxidative Eigenschaft verdankt das reduzierte GSH seiner freien Thiolgruppe, da diese ein Elektron auf die ROS bzw. reaktive Stickstoffspezies übertragen und diese dadurch unschädlich machen kann. Dabei verbinden sich jeweils zwei oxidierte Glutathionmoleküle über eine Disulfidbrücke zu einem Glutathion-Disulfid (GSSG) (49). Während die Glutathion-Peroxidase hierbei die Oxidation von GSH zu GSSG bei gleichzeitiger Reduktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um zwei Wasserstoffmoleküle katalysiert, katalysiert wiederum Glutathionreduktase unter Verbrauch eines Moleküls Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) die umgekehrte Reaktion (50). Das intrazelluläre Glutathion-System ist schematisch in *Abbildung 3* abgebildet. Physiologisch liegt bei Homöostase des Glutathion-Systems Glutathion intrazellulär i.d.R. zu 90% im reduzierten und nur etwa zu 10% im oxidierten Zustand vor. Dieses Gleichgewicht wird im Falle oxidativen bzw. nitrosativen Stresses zugunsten der oxidierten Disulfid-Form aufgehoben. GSSG kann folglich als Indikator oxidativen bzw. nitrosativen Stresses dienen (51).

Wichtigste intrinsische Quelle der ROS scheint die Elektronentransportkette im Zuge des Sauerstoffmetabolismus, welcher beispielsweise während eines Heilungsprozesses

erhöht ist, in der mitochondrialen Membran zu sein (50, 52). Zum Abbau der anfallenden Radikale ist die Zelle daher in der Lage, das im Zellplasma produzierte Antioxidans GSH in die Mitochondrien, dem Ort mit hoher ROS-Konzentration, zu bringen (53). Auch extrinsisch können Umwelteinflüsse wie z.B. UV-Strahlung zu einer intrazellulären Erhöhung von ROS führen (54).

Neben den ROS sind auch reaktive Stickstoffspezies (RNS) an pathophysiologischen Prozessen beteiligt und werden beispielsweise u.a. für neurologische, inflammatorische, Stoffwechsel- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen mitverantwortlich gemacht (55, 56). RNS sind jedoch auch an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt (37). So spielen RNS u.a. eine wichtige Rolle im Neurotransmittersystem, bei der Blutdruckmodulation, bei antiinflammatorischen aber auch apoptotischen Prozessen sowie bei Wund- und Knochenheilungsprozessen (57-62). Zu den RNS zählen Stickstoffmonoxid (NO), welches u.a. als schnell gebildeter Transmitter in Heilungsprozessen fungiert, und dessen Folgeprodukt Peroxynitrit (ONOO⁻), welches u.a. in der Lage ist, die Gluthationreduktase im Gluthation-System zu inaktivieren und dadurch einen apoptotischen Prozess der Zelle auszulösen (51, 60, 63).

N-Acetyl-L-cystein (NAC) ist ein nicht-verschreibungspflichtiges Medikament, dessen schleimlösende Wirkung bereits seit den 1960er Jahren bekannt ist, als es erstmals erfolgreichen therapeutischen Einsatz zur Behandlung von Mukoviszidosepatienten fand

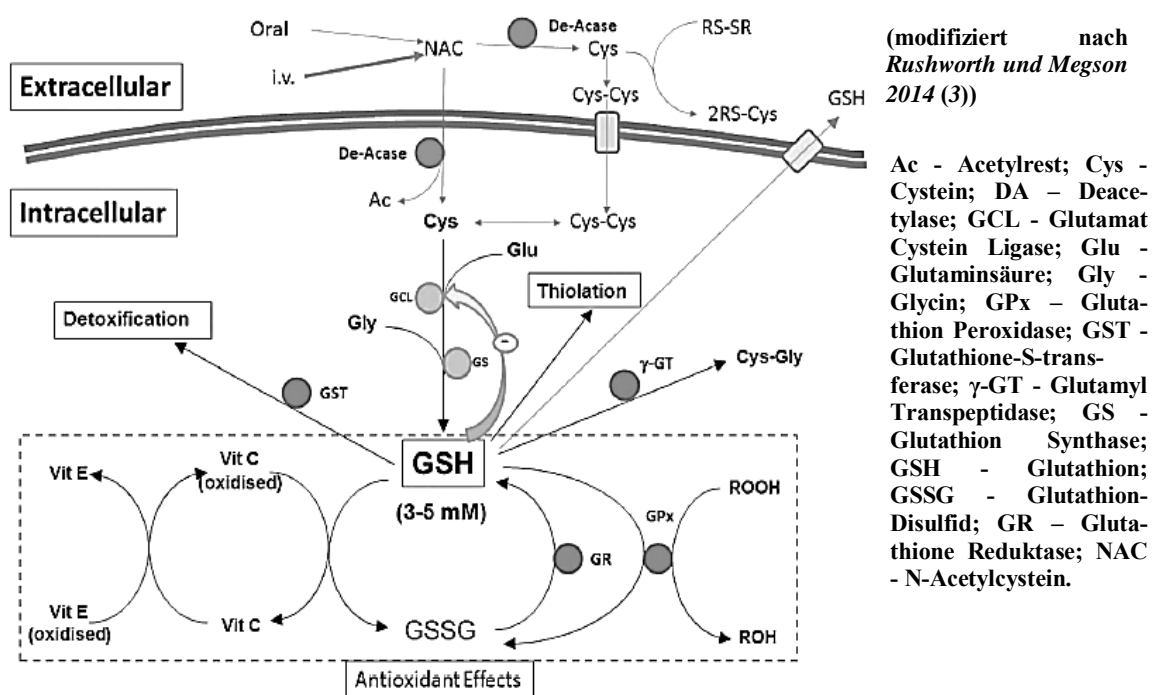


Abbildung 3: Einfluss von NAC auf Synthese- und Nutzungswege für GSH

(64). Dieser Wirkstoff hat sich mittlerweile in Europa als vielverschriebenes Mukolytikum etabliert, obwohl aufgrund des bekannten hohen First-Pass-Effektes Zweifel an seiner Wirksamkeit bei oraler Einnahme im Zielorgan Lunge bestehen (65, 66). Seit Mitte der 1970er Jahren hat sich NAC außerdem therapeutisch bei der Behandlung von Acetaminophenüberdosierungen (Paracetamol) zur Minimierung von Leberschäden bewährt (67). In jüngerer Zeit berichten eine Vielzahl von Studien von seiner möglichen antioxidativen Wirkung, um beispielsweise Organschäden nach schweren operativen Eingriffen zu reduzieren (68-71). Vorarbeiten unseres Instituts konnten diese antioxidative schützende Wirkung bereits *in vitro* anhand von mit Zigarettenrauch behandelten primären humanen Osteoblasten zeigen (72).

Als Wirkmechanismus nimmt die Literatur u.a. an, dass die zelluläre antioxidative Kapazität im zelleigenen antioxidativen Glutathionreduktasemechanismus mithilfe von NAC gesteigert werden kann (73). Wie in *Abbildung 3* schematisch dargestellt könnte NAC in die Zelle eintreten und so den zelleigenen antioxidativen Glutathionreduktasemechanismus durch Auffüllen des Cystein-Pools, dem wie bereits oben beschrieben limitierenden Faktor der GSH-Produktion, länger effizient halten (74). Die Radikale könnte das synthetische Antioxidans NAC zudem direkt durch seine Thiolgruppe unschädlich machen (38).

Zur Bedingungsoptimierung der Versuche mit Spenderproben hinsichtlich eingesetzter Zellzahlen, der Inkubationszeitpunkte, NAC- bzw. H₂O₂-Konzentrationen etc. sind die gut kultivierbaren HL-60 bzw. THP-1-Progenitorzelllinien verwendet worden, die laut Literatur typische Eigenschaften der zu untersuchenden Granulo- bzw. Monozyten aufweisen (4, 5). Zur Untersuchung der Spenderproben wurden mithilfe dieser Zelllinien die Versuchssettings zur Bestimmung der zellulären Überlebensraten sowie der intrazellulären ROS-Spiegel erstellt. Außerdem wurde an diesen Zelllinien stellvertretend für die humanen Granulo-/Monozyten überprüft, ob NAC intrazellulären Einfluss auf das antioxidative GSH-System dieser Zellen nimmt. Details dieser Vorversuche sind im Appendix aufgeführt.

Die Thesen dieser Dissertationsarbeit sind im Rahmen einer langjährig angesetzten Studie zur Untersuchung des „Einflusses des Alters auf die Knochenregeneration“ seitens des Siegfried Weller Institutes an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen aufgestellt worden.

In dieser Dissertationsarbeit wird das Zusammenspiel der granulo- bzw. monozytären akuten Immunabwehr während des Heilungsprozesses langer Röhrenknochen hinsichtlich altersphysiologischer Veränderungen erforscht. Ziel ist die Entwicklung eines kostengünstigen, nebenwirkungsarmen und breit einsetzbaren therapeutischen Behandlungsweges, um das schlechtere Outcome alter Menschen nach größerem Knochen trauma zu verbessern (3, 75). In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die antioxidative Eigenschaft des NAC dazu genutzt werden kann, humane Granulo- und Monozyten vor heilungsbedingt vermehrt entstehenden oxidativen Radikalen zu schützen (3, 67). Indem diese dann der altersbedingt ohnehin ineffizienteren angeborenen Immunabwehr länger zur Verfügung stehen und diese stärken, könnte das posttraumatische Outcome und somit die Lebensqualität der Betroffenen verbessert und mit den Komplikationen auch die Höhe der Kosten im Gesundheitssystem gesenkt werden (44, 45, 50).

Hypothese und Fragestellungen der Arbeit

Diese experimentell durchgeführte Arbeit untersucht *in vitro* folgende Hypothese:

NAC übt einen positiven zellprotektiven Einfluss auf Granulo- und Monozyten alter Menschen nach Bruch eines langen Röhrenknochens aus.

Zunächst werden mögliche altersphysiologische Veränderungen der granulo- bzw. monozytären akuten Immunabwehr anhand folgender Fragestellung untersucht: **Wie beeinflusst das Alter humane Granulo-/Monozyten und den Spiegel an RNS im Organismus?** Es wird anhand des Makrophagendifferenzierungsverhaltens untersucht, ob sich die im Heilungsprozess aber auch bei Gesundheit wichtige Balance von Antiinflammation und Proinflammation seitens des monozytären Immunverhaltens altersphysiologisch im Sinne des „Inflammaging“ hin zu einer proinflammatorischen Aktivität verschiebt. Mögliche altersphysiologische Veränderungen der Granulo-/Monozyten werden hinsichtlich intrazellulärer pro- bzw. antiapoptotischer Prozesse, ihrer zellulären Überlebensfähigkeit *in vitro*, sowie anfallender intrazellulärer ROS-Spiegel überprüft. So könnten Granulo-/Monozyten alter Spender aufgrund eines altersphysiologisch erhöhten Grundstresslevels über effizientere Abbaumechanismen von ROS verfügen als junge Spender. Um über die oxidative Komponente hinaus auch einen Einblick in mögliche alters-/gesundheitsabhängige Unterschiede der nitrosativen systemischen Radikalspiegel zu erhalten, werden außerdem die organischen

Stickstoffkonzentrationen in den entsprechenden Spenderblutseren photometrisch gemessen. So wird überprüft, ob sich die Theorie radikalbedingter Alterung auch bzgl. der RNS anwenden lässt.

Um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, wie die isolierten Granulo-/Monozyten alters-/gesundheitsabhängig mit akutem oxidativem Stress umgehen und diesen bewältigen können, werden diese *in vitro* mit H₂O₂ oxidativ gestresst und unter folgender Fragestellung untersucht: **Wie beeinflusst das Alter humane Granulo-/Monozyten im Umgang mit künstlichem oxidativem Stress *in vitro*?** Dazu werden ebenfalls intrazelluläre pro- bzw. antiapoptotische Prozesse, zelluläre Überlebensraten, sowie anfallende intrazelluläre ROS Spiegel unter H₂O₂ Einfluss überprüft.

An den aus Spenderblut isolierten Granulo-/Monozyten wird schließlich der Hypothese dieser Arbeit hinsichtlich folgender Fragestellung nachgegangen: **Wie beeinflusst NAC Granulo- und Monozyten alter Menschen *in vitro*?** Durch Überprüfung der intrazellulären Spiegel charakteristischer pro- bzw. antiapoptotische Signalkaskadenproteine wird hierbei ein möglicher antiapoptotischer Einfluss von NAC überprüft. Mithilfe der mitochondrialen Umsatzaktivität der Zellen werden außerdem Rückschlüsse auf eine mögliche Steigerung der Überlebensrate unter NAC gezogen. Mittels indirektem Fluoreszenzmessverfahren wird zudem eine mögliche Senkung der intrazellulärer ROS Spiegel dieser Zellen unter NAC untersucht. Und um zu testen, ob die untersuchten Zellen unter Einfluss von NAC auch akuten oxidativen Stress besser bewältigen können, werden diese zusätzlich künstlich mit H₂O₂ gestresst.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Gerätename	Hersteller	Artikelnummer
Abzug	<i>Secuflow</i>	<i>Waldner</i>	
Analysenwaage	<i>Kern ABJ</i>	<i>Kern & Sohn GmbH</i>	<i>WB1140084</i>
Chemilumineszenz-Analysekamera	<i>ChemoCam</i>	<i>Intas science imaging</i>	
CO ₂ -Inkubator (37°C, 5% CO ₂)	<i>C 150</i>	<i>Binder</i>	<i>9040-0078</i>
Digitalmikroskop	<i>EVOS-fl-91-AF-4301</i>	<i>AMG Peglab Biosysteme GmbH</i>	
Gefrierschrank (-20°C)		<i>Liebherr</i>	<i>7081896-04</i>
Gefrierschrank (-80°C)	<i>Forma 900 Series</i>	<i>ThermoScientific</i>	<i>827860-2521</i>
Kühlschrank/Gefrier- Kombi (+4°C/ -20°C)		<i>Liebherr</i>	<i>7081896-04</i>
Magnetrührer	<i>RH B 2</i>	<i>IKA</i>	<i>06.050357</i>
Mega Zentrifuge	<i>Heraeus Megafuge 40R</i>	<i>ThermoScientific</i>	<i>75004518</i>
Plate Reader	<i>FLUOstar® Omega</i>	<i>BMG-Labtech</i>	<i>0415B0001E</i>
pH-Meter	<i>FiveEasy FE20</i>	<i>Mettler Toledo AG</i>	<i>1232315296</i>
Sterile Werkbank	<i>Safe 2020</i>	<i>ThermoScientific</i>	<i>51026934</i>
Umkehrmikroskop	<i>Primo Vert</i>	<i>Carl Zeiss Mikroimaging GmbH</i>	<i>415510-1101-000</i>
Vortex		<i>Corning</i>	<i>S1101243</i>
Wippschüttler	<i>DRS-12</i>	<i>LTF Labortechnik GmbH & Co. KG</i>	<i>11DE090 und 11DE243</i>
Waage	<i>Kern PCB</i>	<i>Kern & Sohn GmbH</i>	<i>WD110036863</i>
Wasserbad	<i>AL25</i>	<i>Lauda</i>	<i>LCB0727</i>
Zentrifuge	<i>Heraeus Fresco 17 Centrifuge</i>	<i>Thermoscientific</i>	<i>41250019</i>

Tabelle 2: Verwendete Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer	Bemerkung
Butterfly Blutentnahmesystem	<i>Sarstedt</i>	<i>85.1638.235</i>	<i>21G Safety-Multifly®</i>
Deckglas	<i>Carl Roth</i>	<i>VWR 631-0124</i>	
EDTA-Monovetten®	<i>Sarstedt</i>	<i>02.1066.001</i>	<i>9 ml</i>
Elektrische Pipettierhilfe	<i>HS</i>	<i>HS08348</i>	
ELISA-Well-Platte	<i>Greiner bio-one</i>	<i>655061</i>	<i>96-Well</i>
0,2 ml Eppendorfgefäße	<i>Carl Roth</i>	<i>CH88.1, CH89.1, CH90.1</i>	<i>Verschiedene Farben</i>
0,5 ml Eppendorfgefäß	<i>Sarstedt</i>	<i>72.699</i>	
1,5 ml Eppendorfgefäß	<i>Carl Roth</i>	<i>4182.1, 4189.1, 4190.1, 4204.1, 4209.1</i>	<i>Verschiedene Farben</i>
Falkonreaktionsgefäße	<i>Greiner bio-one</i> <i>Sarstedt</i>	<i>188271</i> <i>62.547.004</i>	<i>15 ml</i> <i>50 ml</i>
Mehrkanalpipette	<i>Corning</i>		<i>10-50 µl, 20-200 µl</i> <i>50-300 µl</i>
Human IL-1RA Mini ELISA Development Kit	<i>PeptoTech®</i>	<i>900-M474</i>	
Human IL-4 Mini ELISA Development Kit	<i>PeptoTech®</i>	<i>900-M14</i>	
Human IL-6 Mini ELISA Development Kit	<i>PeptoTech®</i>	<i>900-M16</i>	
Human IL-12 Mini ELISA Development Kit	<i>PeptoTech®</i>	<i>900-M96</i>	
Human IL-13 Mini ELISA Development Kit	<i>PeptoTech®</i>	<i>900-K23</i>	
Mehrkanalpipettierwanne	<i>NeoLab</i>	<i>7-2125</i>	

Neubauerzählkammer	<i>Carl Roth</i>	<i>T728.1</i>	
Objektträger	<i>NeoLab</i>	<i>2-2436</i>	
Parafilm	<i>Carl Roth</i>	<i>H666.1</i>	100 m
Pasteurglaspipette	<i>Carl Roth</i>	<i>4522.1</i>	
PathScan® Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kit	<i>Cell Signaling Technology</i>	<i>12856S</i>	
Peleusball	<i>Carl Roth</i>	<i>0251.1</i>	
Pipette	<i>Corning</i>		2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl
Pipettenspitzen	<i>Biozym Scientific GmbH</i>	<i>720011</i>	10 µl
	<i>Sorenson</i>	<i>37650</i>	10 µl
	<i>Sarstedt</i>	<i>70760</i>	100 µl
	<i>Ratiolab</i>	<i>2100610</i>	1000 µl
Serumröhrchen	<i>Sarstedt</i>	<i>01.1601</i>	7,5 ml
Spritze	<i>BBraun</i>	<i>4606108V</i>	10 ml
		<i>4606205V</i>	20 ml
Sterilfilter	<i>Millipore Ireland Ltd.</i>	<i>SLGPO33RS</i>	Porengröße 0,22 µm
Stripette	<i>Corning</i>	<i>CLS4487</i>	5 ml
		<i>CLS4488</i>	10 ml
		<i>CLS4489</i>	25 ml
		<i>CLS4500</i>	50 ml
Well-Platten	<i>Becton Dickinson</i>	<i>353046</i>	6 Wells
	<i>Greiner bio-one</i>	<i>655180</i>	96 Wells (flach)
0,5 ml Zentrifugenfiltergefäß	<i>Carl Roth</i>	<i>XH83.1</i>	≤ 40 kDa Proteingröße
Zellkulturflaschen	<i>Greiner bio-one</i>	<i>660025</i>	T25
	<i>Corning</i>	<i>430641</i>	T75
	<i>Greiner bio-one</i>	<i>660175</i>	T175

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
4-Aminophenylsulfon	<i>Sigma Aldrich</i>	<i>A74807-100G</i>
Bovines Serum Albumin	<i>Carl Roth</i>	<i>8076.4</i>
Desoxycholsäure	<i>Carl Roth</i>	<i>3484.1</i>
Dichlorodihydrofluoresceindiacetat	<i>Sigma Aldrich</i>	<i>35847-100MG</i>
Dikaliumhydrogenorthosphat	<i>Carl Roth</i>	<i>T875.1</i>
Dimethylsulfoxid	<i>Sigma Aldrich</i>	<i>D8418-500ML</i>
	<i>Carl Roth</i>	<i>4720.2</i>
5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoesäure)	<i>Carl Roth</i>	<i>6334.1</i>
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	<i>PAA</i>	<i>H15-002</i>
	<i>Biochrom AG</i>	<i>L182-01</i>
doppelt destilliertes Wasser	<i>Carl Roth</i>	<i>3175.1</i>
(N-1-naphtyl-) Ethylendiaminhydrochlorid	<i>Carl Roth</i>	<i>4342.1</i>
Ethylendiamintetraessigsäure	<i>Carl Roth</i>	<i>8043.2</i>
Fetal Calf Serum (FCS)	<i>Gibco Lot.</i>	<i>41F3122K</i>
Flavin Adenin Dinucleotid	<i>Sigma Aldrich</i>	<i>F8384-100MG</i>
Folins Reagenz	<i>Sigma</i>	<i>F9252</i>
Giemsa Lösung	<i>Carl Roth</i>	<i>T862.1</i>
Glutathion (reduziert)	<i>Carl Roth</i>	<i>6382.1</i>
Glutathionreduktase	<i>Sigma</i>	<i>G3664</i>
Kaliumdihydrogenorthosphat	<i>Carl Roth</i>	<i>3904.2</i>
Kaliumnitrat	<i>Sigma Aldrich</i>	<i>221295-500G-D</i>
Kupfersulfat	<i>Carl Roth</i>	<i>P024.1</i>
Leupeptin	<i>Carl Roth</i>	<i>CN33.2</i>
Luminol	<i>Carl Roth</i>	<i>4203.1</i>
May-Grünwald Lösung	<i>Carl Roth</i>	<i>T863.1</i>
Metaphosphorsäure	<i>Sigma</i>	<i>239275</i>
Methanol	<i>VWR</i>	<i>20847.307</i>
	<i>Carl Roth</i>	<i>8388.5</i>
N-Acetylcystein	<i>Carl Roth</i>	<i>4126.2</i>
Natriumcarbonat	<i>Carl Roth</i>	<i>P028.1</i>

Natriumchlorid	<i>Carl Roth</i>	<i>HN00.3</i>
Natriumfluorid	<i>Carl Roth</i>	<i>P756.1</i>
Natriumhydroxid	<i>Carl Roth</i>	<i>T135.1</i>
Natriumkaliumtartrat	<i>Sigma</i>	<i>S2377</i>
Natriumnitrit	<i>Sigma Aldrich</i>	<i>S2252-500G-D</i>
Natriumorthovanadat	<i>Sigma Aldrich</i>	<i>S6508-10G</i>
Nicotinamidadeninucleotidphosphat	<i>Carl Roth</i>	<i>AE14.1</i>
Nitratreduktase	<i>Sigma Aldrich</i>	<i>N7265-5UN</i>
p-Coumarsäure	<i>Carl Roth</i>	<i>9908.1</i>
Penicillin/Streptomycin	<i>PAA</i>	<i>P11-010</i>
Pepstatin A	<i>Sigma Aldrich</i>	<i>P4265-5MG</i>
Percoll (100%, Dichte 1,130 g/ml)	<i>GE Healthcare</i>	<i>17-0891-01</i>
Phenylmethylsulfonylfluorid	<i>Carl Roth</i>	<i>6367.1</i>
Resazurin	<i>Aldrich</i>	<i>199303</i>
RPMI1640 mit L-Glutamin (Leukozyten-Zellkulturmedium)	<i>Sigma Aldrich</i>	<i>R8758-500ML</i>
Salzsäure 2 M	<i>Carl Roth</i>	<i>T134.1</i>
Tergitol Lösung	<i>Sigma Aldrich</i>	<i>NP40S-100ML</i>
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Base	<i>Carl Roth</i>	<i>4855.0</i> <i>AE15.1</i>
Trypanblau 0,5%	<i>Carl Roth</i>	<i>CN76.1</i>
Tween-20	<i>Carl Roth</i>	<i>9127.1</i>
2-Vinylpyridin	<i>Sigma</i>	<i>G3664</i>
Wasserstoffperoxid 30%	<i>Roth</i>	<i>CP26.5</i>

2.2 Spendergruppen, Blutserum- und Zellmaterial

Die Blutentnahmen sind im Rahmen einer langjährig angesetzten Studie zur Untersuchung der „Mechanismen der Knochenregeneration – Einfluss des Alters auf die Knochenregeneration“ seitens des Siegfried Weller Institutes an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik (BGU) Tübingen erfolgt, welche von der Ethikkommission am 06.08.2012 bewilligt worden ist (*Prj.-Nr.: 363/2012BO2*). Die Probanden sind von ärztlicher Seite über die Studie aufgeklärt worden, haben Informationsblätter und ein Beratungsgespräch zur Klärung aller offener Fragen erhalten. Die Einwilligung zur Blutentnahme ist bei allen Spendern freiwillig und schriftlich erfolgt. Die verwendeten venösen Vollblutspenden stammen von Patienten im Rahmen ihres stationären Aufenthaltes in der BGU Tübingen und von privaten Spendern (im Zeitraum 25.04. bis 28.08.2014 abgenommen, Serumüberstand bei -80°C in 1,5 ml Eppendorfgefäßen gelagert). Das Blut wurde aus peripheren Venen von den nicht verwandten erwachsenen Spendern über einen 21G Safety-Multifly® entnommen. Zur Gewinnung des Blutserums ist das Vollblut in 7,5 ml-Serumröhrchen gesammelt, mit 1000 G 10 min bei 22°C mit einer Mega Zentrifuge zentrifugiert und der Serumüberstand in 1,5 ml Eppendorfgefäßen portioniert bei -80°C eingefroren worden. Das für die Experimente mit humanen Granulo-/Monozyten benötigte Vollblut wurde in 9-ml-EDTA-Monovetten® gesammelt und mittels Dichtegradientenzentrifugation

(siehe Kapitel 2.5) vom venösem Vollblut isoliert. Voraussetzung des kranken Spenderklientels ist deren Zustand nach Bruch eines oder mehrerer langer Röhrenknochen. Die Kriterien der insgesamt 40 Spender sind in *Tabelle 4* aufgeführt:

Tabelle 4: Übersicht Spendergruppen

	Jung (18 – 35 a)				Alt (>64 a)			
	Spender	Geschlecht	Alter	Fraktur	Spender	Geschlecht	Alter	Fraktur
Gesund	1		26 a	Keine	1		73 a	Keine
	2		22 a	Keine	2		66 a	Keine
	3		33 a	Keine	3		66 a	Keine
	4		24 a	Keine	4		73 a	Keine
	5		24 a	Keine	5		73 a	Keine
	6		27 a	Keine	6		75 a	Keine
	7		30 a	Keine	7		88 a	Keine
	8		32 a	Keine	8		72 a	Keine
	9		24 a	Keine	9		77 a	Keine
	10		25 a	Keine	10		84 a	Keine
Fraktur	1		19 a	Tibia	1		89 a	Humerus
	2		23 a	Tibia, Femur	2		73 a	Femur
	3		22 a	Handwurzel, Radius	3		76 a	Humerus
	4		23 a	Humerus, Radius	4		89 a	Femur
	5		19 a	Tibia	5		71 a	Femur
	6		28 a	Radius	6		84 a	Femur
	7		27 a	Tibia	7		77 a	Femur
	8		20 a	Radius	8		84 a	Femur
	9		33 a	Tibia	9		64 a	Humerus
	10		22 a	Radius	10		73 a	Humerus

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten, die zum Zeitpunkt der Studienteilnahme jünger als 18 oder zwischen 35 und 65 Lebensjahren gewesen, unter einer akuten oder chronischen Infektion (Hepatitis C, HIV etc.) bzw. einer aktiven Neoplasie gelitten, unter Einnahme von Antibiotika gestanden sowie nicht selbst geschäftsfähig gewesen sind. Die akuten bzw. chronischen Infektionen sowie aktiven Neoplasien sind hierbei anamnestisch und nicht durch eine zusätzliche serologische Untersuchung erfasst worden.

2.3 Kultivierung von humanen myeloischen Progenitorblutzelllinien der natürlichen Immunabwehr

Versuchsspezifische Lösung:

„**Medium++**“ (=Zellkulturmedium) (unter steriler Bedingung) (4, 5, 76):

500 ml RPMI1640 + 50 ml FCS + 5 ml Penicillin/Streptomycin

2.3.1 HL-60-Zelllinie

Die verwendete HL-60-Zelllinie ist eine humane Leukämiezelllinie, welche ursprünglich 1979 von *Gallagher et al.* aus dem Blut einer an akuter Promyelozytenleukämie erkrankten Patientin kultiviert worden ist. Diese Zelllinie

zeichnet sich dadurch aus, dass sie sich gut kultivieren lässt und überwiegend Eigenschaften neutrophiler Promyelozyten besitzt (4). Daher ist diese HL-60-Zelllinie bei der Erstellung des Versuchssettings zur Untersuchung der aus Spenderblut isolierten humanen (neutrophilen) Granulozyten als Stellvertreter dieser Spenderzellen eingesetzt worden.

2.3.2 THP-1-Zelllinie

Die verwendete THP-1-Zelllinie ist ebenfalls eine humane Leukämiezelllinie, welche ursprünglich 1980 von *Tsuchiya et al.* aus dem Blut eines an akuter Monozytenleukämie erkrankten Jungen kultiviert worden ist. Diese Zelllinie zeichnet sich dadurch aus, dass sie sich gut kultivieren lässt und typische Eigenschaften humaner Monozyten über einen langen Zeitraum beibehält (5). Daher ist diese THP-1-Zelllinie bei der Erstellung des Versuchssettings zur Untersuchung der aus Spenderblut isolierten humanen Monozyten als Stellvertreter dieser Spenderzellen eingesetzt worden. Da im Verlauf dieser experimentellen Arbeit aus isoliertechnischen Gründen (s.u.) keine getrennte Betrachtungsweise der gespendeten Granulo- bzw. Monozyten gelungen ist, hat die getrennte Betrachtung der HL-60- bzw. THP-1-Zelllinien dazu gedient, mögliche grobe Abweichung im Verhalten bei der Erstellung der Versuchsbedingungen auszuschließen. Zur Anzucht der HL-60- bzw. THP-1-Zellen (*DSMZ-Nr.: ACC 3 (HL-60), ACC 16 (THP-1)*) werden diese tiefgefroren gelagerten Zellen tropfenweise mittels insgesamt 5 ml 37°C warmem „Medium++“ aufgetaut und über Nacht in einer T25-Zellkulturflasche in Dunkelheit bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert. Beide Zelllinien werden nun auf je drei T175-Zellkulturflaschen in 30 ml „Medium++“ verteilt und weiter im Inkubator kultiviert. Das „Medium++“ wird zweimal die Woche folgendermaßen steril gewechselt (5): Unter der sterilen Werkbank werden die Zellkulturflaschen mit den nichtadhärenten Zellen geschwenkt und 29 ml Zell-Medium-Gemisch für die jeweiligen Experimente eines Tages (s.u.) mittels 50 ml Stripette in ein 50 ml Falkongefäß gegeben. Dann werden 29 ml frisches auf 37°C erwärmtes steriles „Medium ++“ hinzugegeben und die Zellen im Inkubator weiter kultiviert. Die Kontamination von Bakterien wird vor jeder Verwendung der Zellen mithilfe eines Umkehrmikroskops ausgeschlossen.

2.4 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau

Methodenspezifische Lösung (77):

Trypanblau Anwendungslösung:

0,75 ml Trypanblau + 2,25 ml DPBS (Gesamtkonzentration 0,125%)

Zur Normierung der Experimente mit lebenden Blutzellen sind testspezifisch festgelegte Zellkonzentrationen verwendet worden. Dazu sind die lebenden Zellen mittels Trypanblau, einem an DNA bindenden anionischen Farbstoff, gezählt worden (77):

Von der mit dem Vortex gemischten Suspension der nichtadhärenten Zellen werden 10 μ l entnommen und mit 10 μ l Trypanblau Anwendungslösung 1:1 verdünnt, mit dem Vortex gemischt und auf eine zuvor mit 70%-igem Ethanol gereinigte Neubauerzählkammer mit Deckglas gegeben. Intakte lebende Zellen mit für das Trypanblau undurchlässiger Membran heben sich vom blaufarbigem Hintergrund hell ab. Tote Zellen erscheinen hingegen dunkelblau, da diese den blauen anionischen Farbstoff aufgrund ihrer defekten Zellmembran aufnehmen und dieser an ihren Zellkernen bindet. Mittels Umkehrmikroskop werden die Zellen bei einer 10-fachen Vergrößerung jeweils in 4 Großquadraten (mit je 16 Kleinquadraten) gezählt und der aus der Zellzahl gebildete Mittelwert mit dem Verdünnungsfaktor 2 sowie dem Zählkammerfaktor 10^4 multipliziert. Die hierbei ermittelte Zellzahl bezieht sich auf eine Zellzahl pro $10^3 \mu$ l Medium.

2.5 Granulo-/Monozytenisolierung mittels Percoll-Dichtemedium bei Dichtezentrifugation

In der Literatur finden sich zahlreiche Methoden, die eine Isolierung von Zellen mittels Dichtezentrifugation durch Verwendung verschiedener Dichtegradientenmedien wie beispielsweise Percoll (kolloidales Siliziumdioxid) (78-81) oder Ficoll (Polysucrose) beschreiben (82-84). Das entsprechende Dichtegradientenmedium besitzt eine bestimmte Dichte (z.B. 1,09 g/ml) und dient bei der Zentrifugation als Barriere, durch welchen Zellen höherer Dichte (Erythrozytendichte 1,09 – 1,1 g/ml) Fliehkraft bedingt hindurchgedrückt werden, während Zellen geringerer Dichte (Monozytendichte 1,04 – 1,06, Lymphozytendichte 1,06 – 1,08, Neutrophilendichte 1,08 – 1,09 g/ml) daran gehindert und somit isoliert werden (81). Im Versuch, die Granulozyten in einem zweiten Dichtezentrifugationsschritt von den Monozyten weiter zu trennen, gelang eine nur unsaubere Trennung beider Zellarten. Daher konnten diese beiden Zellarten nicht

getrennt voneinander untersucht werden. Das aus dem Spendervollblut isolierte Zellgemisch von Granulo- und Monozyten wird in dieser Arbeit zusammenfassend als „Granulo-/Monozyten“ bezeichnet. Die ebenfalls dichtebedingt in diesem Zellgemisch in geringer Zahl vorhandenen Lymphozyten können vernachlässigt werden, da alle Blutproben zeitnah durchschnittlich 5 Tage nach Trauma bzw. Operation entnommen worden sind, weshalb von einer vornehmlich akuten Immunabwehraktivität ausgegangen werden kann (60). In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse als maßgeblich durch das Verhalten der neutrophilen Granulozyten bedingt angenommen, da diese den Anteil der Monozyten z.T. deutlich übertreffen (85-87). Das verwendete Filtermedium Percoll hat bei einer Raumtemperatur von 20 – 22°C seine für diesen Versuch optimale Dichteigenschaft (78, 81).

Um die Granulo-/Monozyten mit bestmöglicher Reinheit bei bestmöglicher Ergiebigkeit der Zellzahl aus dem Vollblut zu isolieren, sind zunächst zur Optimierung der Dichte des verwendeten Percolls verschiedene Konzentrationen dessen ausgetestet worden (Details siehe Appendix). Die Herstellung der Dichtemedien ist in Modifikation einer in *Munteanu und Dinu 2004* beschriebenen Methodik erfolgt (81). Eine optimale Isolierung der Granulo-/Monozyten aus Spendervollblut gelingt bei Verwendung eines 66%-igen Percollmediums. Für die Isolierung der Zellen aus den insgesamt 40 Vollblutproben sind steril 500 ml 66%-iges Percollmedium hergestellt und bei 4°C in einer Glasflasche gelagert worden. Bei Bedarf sind steril nach gründlichem Schwenken der Flasche je 10 ml in 15-ml-Falkonröhrchen stripettiert und abschließend auf RT gebracht worden. Die Durchführung der Zellisolation aus Spendervollblut ist unten beschrieben. Die oberhalb des Percolls befindlichen Zellphase nach Zentrifugation ist durch Aspiration mittels gläserner Pasteurpipette und Peleusball entnommen worden.

Methodenspezifische Lösungen (81):

Tabelle 5: Verwendete Anwendungslösungen Kapitel 2.5

Anwendungslösungen	Bestandteile	Masse/Volumen
DPBS Lösung (10-fach) (steril, gelagert bei 4°C)	DPBS Pulver ddH ₂ O	4,77 g 50 ml
66%-ige Percolllösung	100%-ige Percolllösung DPBS Lösung (10-fach) ddH ₂ O	6,6 ml 1,0 ml 2,4 ml

Durchführung:

Das je Spender in 9-ml-EDTA-Röhrchen gesammelte Blut wird gut gemischt. Auf die in einem 15-ml-Falkonröhrchen befindliche 66%-ige gut gemischten Percolllösung wird

jeweils vorsichtig mithilfe eines Peleusballs und einer 5-ml-Stripette 4 ml Vollblut gegeben, damit sich Percolllösung und Blut nicht vermischen. Zentrifugiert wird 25 min mit 1000 G bei 22°C und langsamer Be- und Entschleunigung (ohne Bremse) mithilfe der Mega Zentrifuge.

2.6 Anfärbung der Blutzellen mittels Pappenheim Färbung

Die Pappenheim Färbung wird wie in *Binder et al. 2012* beschrieben durchgeführt (88). Ein Tropfen des mikroskopisch zu untersuchenden Zellgemischs wird dazu auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas ausgestrichen. Zur Permeabilisierung und Fixierung wird darauf Methanol pipettiert. Nach 10-minütiger Einwirkzeit folgt eine 7 minütige Färbung mit einer 1:1 mit ddH₂O verdünnten May-Grünwald Lösung, welche dann abtropfen und für 10 s trocken gelassen wird. Es folgt eine 20-minütige Färbung mit einer 1:20 mit ddH₂O verdünnten Giemsa Lösung (0,5 ml Giemsa + 9,5 ml ddH₂O). Anschließend folgen drei Waschschrte in ddH₂O. Der erste für 10 s, die beiden folgenden je für 4 min. In *Abbildung 4* sind exemplarisch die nach Trocknung mittels Digitalmikroskop in 40-facher Vergrößerung aufgenommenen Präparate in den Zuständen nach Isolierung mit 72%-igem (*Abbildung 4a*) bzw. 66%-igem Percoll-Filtermedium (*Abbildung 4b*) zu sehen.

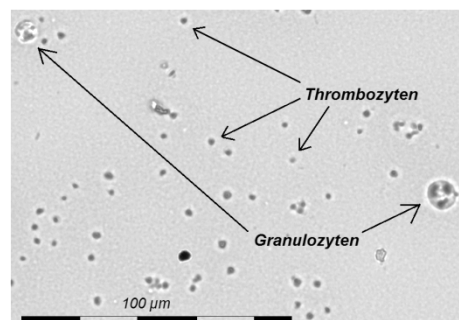
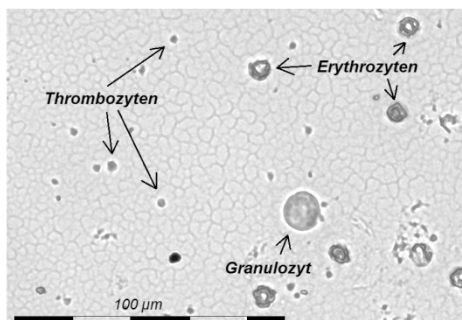


Abbildung 4a:

Abbildung 4b:

Abbildung 4a/b: Mikroskopische Überprüfung der Reinheit isolierter Granulo-/Monozyten

Fotografische Mikroskopaufnahme isolierter Granulo-/Monozyten (Pappenheim Färbung, Aufnahme mit Digitalmikroskop EVOSFI in 40-facher Vergrößerung) nach Dichtezentrifugation mit 72%-igem Percoll-Dichtegradientenmedium (a) und 66%-igem Percoll-Dichtegradientenmedium (b). Während sich unter 66% Percoll neben Granulozyten und Thrombozyten keinerlei Erythrozyten finden lassen, sind diese unter 72% noch reichlich vorhanden (kleinere Zellen mit hellem Zentrum).

2.7 Analyse der Zellviabilität in Zellkultur mittels Fluoreszenzmessung

Laut *O'Brien et al. 2000* ist die zelluläre Reduktionrate von blauem nichtfluoreszenten Resazurin hin zu pinkfarbenem fluoreszenten Resorufin ein guter Parameter, um mittels

spektrophotometrischer Messung Rückschlüsse auf die Menge mitochondrial aktiver Zellen ziehen zu können. Daraus lässt sich dann eine mögliche Aussage zur Toxizität eines auf diese Zellen wirkenden Stoffes ableiten. Resazurin selbst ist hierbei nicht-toxisch (89). In dieser Dissertation dient die Messung des Resazurinumsatzes sowohl bei den HL-60- und THP-1-Zelllinien als auch bei den aus Spendervollblut isolierten humanen Granulo- bzw. Monozyten dazu, Rückschlüsse auf deren Überlebensrate unter bestimmten Bedingungen ziehen zu können.

Zunächst wird in der Durchführung auf die Vorversuche mit den HL-60- bzw. THP-1-Zellen eingegangen (Details siehe Appendix), dann folgt die Durchführungsdarstellung der Versuche mit humanen Granulo- bzw. Monozyten:

Methodenspezifische Lösung:

Resazurin Stammlösung: 5 mg Resazurin + 20 ml DPBS

(10 ml Aliquots bei -20°C dunkel gelagert und bei Bedarf im Wasserbad aufgetaut)

2.7.1 Identifizierung optimierter Zellzahl für die Analyse der Zellviabilität

Um einen möglichen Einfluss von NAC auf die Immunzellen bezüglich dessen Auswirkung auf die zelluläre Überlebensrate optimal messen zu können, muss deren Resazurinumsatz und somit das Fluoreszenzsignal von Resorufin deutlich messbar sein. Mittels einer Zellzahl-Verdünnungsreihe wird eine für die Resazurinmessung optimalen Zellzahl von 64000 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte ermittelt (Details siehe Appendix).

2.7.2 Analyse der Zellviabilität der HL-60- bzw. THP-1-Zellen unter NAC

(Details zur Herstellung versuchsspezifischer Lösungen siehe Appendix)

Durchführung:

Die jeweils steril aus den Kulturflaschen entnommenen 29 ml werden in drei 50-ml-Falkonröhrchen mit 600 G 10 min bei 22°C zentrifugiert. Es werden dann je 30 ml an frischem „Medium++“ dazugegeben und dieses mit dem Vortex gut gemischt. Nach Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau werden 7.500.000 HL-60- bzw. THP-1-Zellen in 5 ml „Medium++“ in einem 15-ml-Falkonröhrchen gelöst und mit dem Vortex gemischt. In einer 96-Well-Platte werden nach Belegungsschema aus *Tabelle 6* 50 µl NAC-Lösungen pro Well mit insgesamt 12 Bedingungen (500 mM, 250 mM, 125 mM, 62,5 mM, 31,25 mM, 15,63 mM, 7,81 mM, 3,91 mM, 1,95 mM, 0,98 mM, 0,49 mM

und 0 mM NAC in „Medium++“) mit einer Mehrkanalpipette aus einer Mehrkanalpipettierwanne verteilt. Danach werden pro Well weiter nach Belegungsschema aus *Tabelle 6* 50 µl Zellsuspension (=64.000 Zellen/Well) der HL-60-/ THP-1-Zellen bzw. 50 µl reines „Medium++“ ohne Zellen (als Leerwert) mit einer Mehrkanalpipette hinzupipettiert, wird die Platte mit Deckel geschlossen und vorsichtig horizontal geschwenkt. Dadurch erhält man pro Well jeweils die Hälfte der eingesetzten NAC-Milieukonzentration (z.B. 500 mM => 250 mM NAC).

Tabelle 6: Plattenbelegung der 96-Well-Platte Kapitel 2.6.1

500	250	125	62,5	31,25	0	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49
500	250	125	62,5	31,25	0	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49
500	250	125	62,5	31,25	0	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49
500	250	125	62,5	31,25	0	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49
500	250	125	62,5	31,25	0	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49
500	250	125	62,5	31,25	0	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49
500	250	125	62,5	31,25	0	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49
500	250	125	62,5	31,25	0	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49

Jeweils 50 µl der NAC-Lösungen in [mM] (500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81, 3,91, 1,95, 0,98, 0,49 und 0 (= „Medium++“)). Dazu jeweils 50 µl Zellsuspension THP-1-Zellen (hellgrau) und HL-60-Zellen (dunkelgrau) bzw. 50 µl reines „Medium++“ als Leerwert (weiß).

Nach 23,5- bzw. 47,5-stündiger Inkubation (zwei Platten) im Dunkeln bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator werden mittels Mehrkanalpipette pro Well 10 µl Resazurin Stammlösung hinzugegeben, wird die Platte vorsichtig geschwenkt und die Fluoreszenz nach weiteren 30 min Inkubation im Inkubator mittels Plate Reader bei ex/em 530/560 nm gemessen. Nachdem der Toxizitätsbereich von NAC durch die zuvor beschriebene Testung herausgefunden worden ist, wird nun die Wirkung einer NAC 1:2 Serieellenerdünnung ausgehend von 2 mM NAC nach 1, 2, 4 und 7 Tagen überprüft (Details zur Herstellung verwendeter Lösungen siehe Appendix). Die Durchführung entspricht hierbei dem bereits beschriebenen Prozedere. Die 30-minütige Inkubationen von Resazurin startet entsprechend nach 23,5-, 47,5-, 95,5- und 167,5-stündiger Inkubation im Dunkeln bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator.

Zur Testung der Replizierbarkeit sind alle Versuche dreimalig durchgeführt worden.

Die Auswertung ist am Ende dieses Kapitels beschrieben.

2.7.3 Identifizierung optimaler Milieukonzentration von H₂O₂ zur oxidativen Stressinduktion bei HL-60-/THP-1-Zellen (Teil 1)

In dieser Dissertation soll Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als Induktor von künstlichem oxidativen Stress dienen (36). Hierfür muss eine Konzentration an H₂O₂ gewählt werden, dessen Toxizitätsgrad eine Zellüberlebensrate garantiert, bei welchem mögliche

antioxidative Effekte von NAC gut messbar bleiben. Dazu sollte die Zellüberlebensrate nach 2 h möglichst noch über 50% liegen. Mittels Resazurin wurde der Einfluss verschiedener H₂O₂-Konzentrationen (0,6%, 0,3%, 0,15%, 0,075%, 0,0375%, 0,019%, 0,009% und 0% H₂O₂ in „Medium++“) hinsichtlich des Zellüberlebens von HL-60-/THP-1-Zellen nach 1 h und nach 2 h überprüft und eine optimale oxidative Stressung in 0,03%-igem H₂O₂-Milieu erreicht (Details siehe Appendix).

2.7.4 Analyse der Zellviabilität der aus Spendervollblut isolierten Granulo-/Monozyten ohne/mit NAC ohne/mit H₂O₂ (89)

(Details zur Herstellung versuchsspezifischer Lösungen siehe Appendix)

Durchführung:

Nach Zellisolierung mittels Dichtezentrifugation und Zellzahlbestimmung mittels Trypanblaumethode werden 2.560.000 Zellen in 4000 µl „Medium++“ in einem 15-ml-Falkonröhrchen gelöst und mit dem Vortex gemischt. In einer 96-Well-Platte werden nach Belegungsschema aus *Tabelle 7* 50 µl Stammlösungen pro Well mit insgesamt 6 Bedingungen (3,0 mM, 1,5 mM und 0,0 mM NAC ohne/mit jeweils 0,06% H₂O₂ in „Medium++“) mit einer Mehrkanalpipette verteilt. Danach werden pro Well weiter nach Belegungsschema aus *Tabelle 7* 100 µl Zellsuspension (= 64.000 Zellen/Well) des entsprechenden Spenders bzw. 100 µl reines „Medium++“ ohne Zellen (als Leerwert) mit einer Mehrkanalpipette hinzupipettiert, wird die Platte mit Deckel geschlossen und vorsichtig horizontal geschwenkt. Dadurch erhält man pro Well jeweils ein Drittel der eingesetzten NAC- bzw. H₂O₂-Milieukonzentration (z.B. 3,0 mM => 1,0 mM NAC und

Tabelle 7: Plattenbelegung der 96-Well-Platte Kapitel 2.7.4/2.8.3

3-	3-	3-	3-	3-	3-	3+	3+	3+	3+	3+	3+
1,5-	1,5-	1,5-	1,5-	1,5-	1,5-	1,5+	1,5+	1,5+	1,5+	1,5+	1,5+
0-	0-	0-	0-	0-	0-	0+	0+	0+	0+	0+	0+
3-	3-	3-	3-	3-	3-	3+	3+	3+	3+	3+	3+
1,5-	1,5-	1,5-	1,5-	1,5-	1,5-	1,5+	1,5+	1,5+	1,5+	1,5+	1,5+
0-	0-	0-	0-	0-	0-	0+	0+	0+	0+	0+	0+

Jeweils 50 µl 3-mM-NAC-Lösung ohne H₂O₂ (3-), 1,5-mM-NAC-Lösung ohne H₂O₂ (1,5-), 0,0-mM-NAC-Lösung ohne H₂O₂ (0-), 3-mM-NAC mit 0,06%-H₂O₂ (3+), 1,5-mM-NAC mit 0,06%-H₂O₂ (1,5+) und 0,0-mM-NAC mit 0,06%-H₂O₂ (0+). Dazu jeweils 100 µl Zellsuspension Spender 1 (hellgrau) und Spender 2 (dunkelgrau) bzw. 100 µl reines „Medium++“(Kapitel 2.7.4)/100 µl reines DPBS (Kapitel 2.8.3) als Leerwert (weiß) (Unbesetzte Wells durchgestrichen).

0,06% => 0,02% H₂O₂). Nach 60 min Inkubation im Dunkeln bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator wird mittels Mehrkanalpipette pro Well 15 µl Resazurin Stammlösung hinzugegeben, wird die Platte vorsichtig geschwenkt und die Fluoreszenz nach weiteren

30 min Inkubation im Inkubator mittels Plate Reader bei ex/em 530/560 nm gemessen. Je Spendergruppen werden 10 Spender getestet. Wie in 2.1 zu lesen bestehen die vier Gruppen aus jungen und aus alten Spendern jeweils ohne/mit Fraktur eines langen Röhrenknochens.

Auswertung:

Die gemessene Fluoreszenz wird proportional zur Anzahl lebender Zellen nach den entsprechenden Inkubationszeiten angenommen. In *Excel Microsoft 2010* werden die gemittelten Leerwerte (Duplikate) jeweils von den gemittelten Probenwerten (Quadruplikate) abgezogen. Bei der prozentualen Normierung dienen jeweils die Werte unter 0,0 mM NAC und ohne H₂O₂ Stress (= unbehandelte Zellen) als 100% Bezug. Zur vergleichenden Darstellung der Spendergruppen dient abschließend bei den HL-60-/THP-1-Zellen die unbehandelte Zellgruppe nach 24 h bei den humanen Granulo-/Monozyten die junge gesunde Gruppe unter 0,0 mM NAC und ohne H₂O₂ Stress als 100% Bezug.

2.8 Analyse von ROS in Zellkultur mittels Fluoreszenzmessung (90)

Zur Detektion der intrazellulären ROS kam in dieser Arbeit 2'-7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCFH-DA), ein sensitiver wenn auch unspezifischer Marker, zum Einsatz, um intrazelluläre ROS nachzuweisen. Dieses Molekül kann aufgrund seiner zwei Acetatgruppen gut in die Zelle gelangen, von welchen es intrazellulär dann durch Deacetylasen getrennt wird. Das entstandene nichtfluoreszente 2'-7'-Dichlorfluorescein (DCFH) kann wiederum durch intrazelluläre ROS in fluoreszentes 2'-7'-Dichlorfluorescein (DCF) umgewandelt werden und ist somit ein relativ spezifischer Indikator für den intrazellulären Radikalspiegel. Die Fluoreszenz ist bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm messbar (90). In dieser Dissertation wird die DCF-Fluoreszenzmessung zur Ermittlung intrazellulären oxidativen Stresses sowohl bei den HL-60- bzw. THP-1-Zellen wie auch bei den aus Spendervollblut isolierten Granulo-/Monozyten angewandt. Zunächst wird in der Durchführung auf die Versuche mit den HL-60- bzw. THP-1-Zellen eingegangen, dann folgt die Durchführungsdarstellung der Versuche mit humanen Granulo-/Monozyten:

Methodenspezifische Lösung (91-93):

DCFH-DA Stammlösung (20 mM): 100 mg DCFH-DA + 10,26 ml DMSO

(20- μ l-Aliquots bei -20°C dunkel gelagert)

Versuchsspezifische Lösung:

„**Medium+**“ **Zellmedium ohne FCS** (unter steriler Bedingung) (4, 5, 76):

500 ml RPMI1640 + 5 ml Penicillin/Streptomycin

(bei +4°C dunkel gelagert und bei Bedarf auf +37°C aufgewärmt und steril entnommen)

2.8.1 Identifizierung optimierter Zellzahl und Messzeitpunkt für Analyse intrazellulärer ROS-Produktion

Mittels Zellzahl-Verdünnungsreihe wird eine für diese Messmethode optimalen Zellzahl von 2000 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte ermittelt, bei der die Fluoreszenzentwicklung zwischen zu geringer und sättigungsbedingter Verfälschung der gemessenen Fluoreszenzentwicklung liegt. Außerdem stellt sich der Messzeitpunkt nach 20-minütiger H₂O₂-Inkubation als optimal heraus, da die Fluoreszenzintensität deutlich messbar und gegen diese bei nächsthöherer bzw. -tieferer Zellzahl signifikant abgrenzbar ist (Details siehe Appendix).

2.8.2 Identifizierung optimaler Milieukonzentration von H₂O₂ zur oxidativen Stressinduktion bei HL-60-/THP-1-Zellen (Teil 2)

Wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben konnte eine optimale oxidative Stressinduktion bei HL-60-/THP-1-Zellen in einem 0,03%-igem H₂O₂-Milieu ermittelt werden. Die Überprüfung der messbaren Fluoreszenzintensitäten von DCF unter verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen zeigte bei dieser Konzentration ein deutlich messbares Fluoreszenzsignal ebenfalls bei einem optimalen Messzeitpunkt nach 20 min (Details in Appendix).

2.8.3 Analyse intrazellulärer ROS der aus Spendervollblut isolierten Granulo-/Monozyten ohne/mit NAC ohne/mit H₂O₂ (90)

(Details zur Herstellung versuchsspezifischer Lösungen siehe Appendix)

Durchführung (91-94):

Nach Zellisolierung mittels Dichtezentrifugation und Zellzahlbestimmung mittels Trypanblaumethode werden 80.000 Zellen in 4000 μ l FCS-freien „Medium+“ in einem 15-ml-Falkonröhrchen mit 2,5 μ l DCFH-DA Stammlösung versetzt und gut mit dem Vortex gemischt. Dann inkubiert die Lösung im geöffneten Falkonröhrchen für 30 min

bei Dunkelheit, 37°C und 5% CO₂ im Inkubator. Zur Beendigung der Inkubation wird das Röhrchen mittels Mega Zentrifuge mit 600 G bei 22°C 10 min zentrifugiert und das Pellet nach Absaugen des Überstandes mit 15 ml DPBS mithilfe des Vortex gewaschen. Es folgt eine weitere Zentrifugation unter 600 G bei 22°C und Absaugung des Überstandes und eine Resuspension in 4000 µl DPBS. In einer 96-Well-Platte werden nach Belegungsschema aus *Tabelle 7* aus Kapitel 2.7.4 50 µl Stammlösungen pro Well mit insgesamt 6 Bedingungen (3,0 mM, 1,5 mM und 0,0 mM NAC ohne/mit jeweils 0,06% H₂O₂ in DPBS) mit einer Mehrkanalpipette verteilt. Danach werden pro Well weiter nach Belegungsschema aus *Tabelle 7* aus Kapitel 2.7.4 100 µl Zellsuspension (=2000 Zellen/Well) des entsprechenden Spenders bzw. 100 µl reines DPBS ohne Zellen mit einer Mehrkanalpipette hinzupipettiert, wird die Platte mit Deckel geschlossen und vorsichtig horizontal geschwenkt. Dadurch erhält man pro Well jeweils ein Drittel der eingesetzten NAC- bzw. H₂O₂-Milieukonzentration (z.B. 3,0 mM => 1,0 mM NAC und 0,06% => 0,02% H₂O₂). Nach 20 min Inkubation im Dunkeln bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator wird die Fluoreszenz bei ex/em = 485/520 nm mittels Plate Reader gemessen. Zur Vermeidung möglicher Messfehler aus Gründen der Lichtempfindlichkeit von DCFH-DA wird bei gesamter Durchführung möglichst unter dunklen Lichtverhältnissen gearbeitet. Je Spendergruppen werden 10 Spender getestet. Wie in 2.1 zu lesen bestehen die vier Gruppen aus jungen und aus alten Spendern jeweils ohne/mit Fraktur eines langen Röhrenknochens.

Auswertung:

Die gemessene Fluoreszenz wird direkt proportional zu der im Well enthaltenen Menge der innerhalb von 20 min intrazellulär gebildeten ROS angenommen. In *Excel Microsoft 2010* werden die gemittelten Leerwerte jeweils von den Quadruplikaten abgezogen. Bei der prozentualen Normierung dienen jeweils die Werte unter 0,0 mM NAC und 0,02% H₂O₂ als 100% Bezug, da unter diesen die höchste Produktion an ROS zu erwarten ist. Zur vergleichenden Darstellung der Spendergruppen dient die junge gesunde Gruppe unter 0,0 mM NAC und 0,02% H₂O₂ als 100% Bezug.

2.9 „Griess“-Methode zur Analyse organischer Stickstoffkonzentration im Blutserum

In dieser Arbeit werden zur Analyse möglicher alters- sowie krankheitsbedingter Veränderungen der systemischen nitrosativen Stresslevel (RNS) die im Blutserum

befindlichen Nitrit- bzw. Nitratanteile mittels der in *Moshage et al. 1995* beschriebenen „Griess“-Methode ermittelt (95). Diese Methode zur Nitrit-/Nitratbestimmung ist erstmals bereits 1858 vom Chemiker *Peter Griess* beschrieben worden (96-98). Da der u.a. als Signalmolekül schnell gebildete wichtige Vertreter der RNS Stickstoffmonoxid (NO) eine äußerst kurze Halbwertszeit besitzt, dienen die im Blutserum befindlichen und mittels „Griess“-Methode messbaren Konzentrationen der stabilen Metabolite Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) als Index für ehemals vorhandenes NO (99). Das Prinzip der „Griess“-Methode ist die Derivatisierung des in der Probe enthaltenen Nitrits (bzw. zuvor in Nitrit umgewandelten Nitrats) zu einem pinken Azofarbstoff durch eine Diazotisierung mit einem Sulfonamid („Griess I“) unter sauren Verhältnissen und einer anschließenden Kupplungsreaktion mit N-(1-naphtyl)-ethylendiaminhydrochlorid („Griess II“). Im Spektrophotometer (Plate Reader) wird die Extinktion dieses entstandene Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 550 nm gegen den Leerwert gemessen (95).

Methodenspezifische Lösungen (Alle Reagenzien auf Eis):

Tabelle 8: Verwendete Stamm- und Anwendungslösungen Kapitel 2.9

Stamm- und Anwendungslösungen	Bestandteile	Masse/Volumen
Lösung A (FAD Na_2) (dunkel 6-8 Wo. bei 4°C stabil)	FAD Na_2 ddH ₂ O	1,8 mg 20 ml
Lösung B (NADPH) (frisch vor Versuch)	NADPH ddH ₂ O	5,4 mg 2 ml
Lösung C (NR (5 U/ml)) (ca. 6 Wochen bei 4°C stabil)	NR ddH ₂ O	33,3 mg 2 ml
Standardlösung NaNO_2 (8 mM)	NaNO_2 ddH ₂ O	27,5 mg 50 ml
NaNO_2 Lösung (80 μM) => 1:2 Verdünnungsreihe mit ddH ₂ O 8-malig bis herunter 0,3 μM (alle Lösungen 4 Wochen bei 4°C stabil)	Standardlösung NaNO_2 (8 mM) ddH ₂ O	100 μl 9,9 ml
Standardlösung KNO_3 (8 mM)	KNO_3 ddH ₂ O	40 mg 50 ml
KNO_3 Lösung (80 μM) => 1:2 Verdünnungsreihe mit ddH ₂ O 8-malig bis herunter 0,3 μM (alle Lösungen 4 Wochen bei 4°C stabil)	Standardlösung KNO_3 (8 mM) ddH ₂ O	100 μl 9,9 ml
Griess I (4 Wochen bei 4°C stabil)	4-Aminophenylsulfon HCl	80 mg 20 ml
Griess II (4 Wochen bei 4°C stabil)	Ethylendiaminhydrochlorid ddH ₂ O	20 mg 20 ml

Durchführung:

Die Blutseren der insgesamt 40 Spender (je 10 jung/alt, ohne/mit Knochenfraktur) tauen auf Eis auf, werden mit dem Vortex gut gemischt, 1:5 mit ddH₂O verdünnt (je 100 μl Serum + 400 μl ddH₂O) in 0,5-ml-Zentrifugengefäße pipettiert und Proteinen ≤ 40 kDa durch 60-minütige Zentrifugation bei 4°C mit 14.000 g entfernt. Da durch Griess-

Methode nur Nitrit nachweisbar ist muss das Nitrat zuvor in Nitrit umgewandelt werden:

Zu je 450 μl KNO_3 Standardlösung (40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,6 μM und 0,3 μM) werden je 22,5 μl Lösung A, je 22,5 μl Lösung B und je 22,5 μl Lösung C gegeben und mit dem Vortex gemischt. Für den Leerwert werden 300 μl ddH₂O mit 15 μl Lösung A, je 15 μl Lösung B und je 15 μl Lösung C mit dem Vortex gemischt. Je Spenderprobe werden 75 μl Serumfiltrat mit je 75 μl ddH₂O, je 7,5 μl Lösung A, je 7,5 μl Lösung B und je 7,5 μl Lösung C mit dem Vortex gemischt. Alle Lösungen werden in den beschrifteten 0,5-ml-Eppendorfgefäß für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator zusätzlich mit Alufolie abgedunkelt inkubiert. Bei Raumtemperatur (RT) werden in eine 96-Well-Platte je Standardreihen-, Leerwert- und Spenderprobenlösung 150 μl pro Well in Duplikaten pipettiert. Mittels Mehrkanalpipette werden nun pro Well 75 μl Griess I sowie 75 μl Griess II hinzugegeben und durch vorsichtiges horizontales Schwenken auf der Laborbank gut gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 550 nm gegen den Leerwert gemessen.

Auswertung:

Die Standardproben werden in *Excel Microsoft 2010* gegen die Extinktion aufgetragen, nachdem zuvor gemittelter Leerwert abgezogen wurde und die Duplikate gemittelt wurden. Die dann ermittelte Geradengleichung wird nach x aufgelöst, somit die Nitrit+Nitrat-Gesamtkonzentration der Proben in μM anhand gemessener gemittelter Extinktion abzüglich Leerwert bestimmt und mit dem Verdünnungsfaktor von insgesamt 10 multipliziert. Nach durchgeführter Normierung mittels „Lowry“-Proteinbestimmung lässt sich der Gesamtgehalt an Nitrit+Nitrat pro Protein in pmol/mg angeben.

2.10 „Lowry“-Proteinkonzentrationsbestimmung

Eines der häufigst angewandten und somit zitierten Verfahren zur Proteinbestimmung ist die Anfang der 1950er Jahre entwickelte und veröffentlichte Methode von Oliver Lowry (100). Diese dient in dieser Dissertation zu Normierungs- und Dosierungszwecken der experimentellen Versuche. In einer ersten Biuret-Reaktion gehen die Peptidbindungen der zu bestimmenden Proteine einen Komplex mit Kupfer

ein. Dieser Komplex verändert dann in einer zweiten Reaktion durch Reduktion die gelbe Farbe zugegebenen Folin-Reagenz in eine blaue, welche dann bei einer Wellenlänge von 750 nm photometrisch gemessen werden kann.

Methodenspezifische Lösungen:

10 µg/µl BSA Stammlösung: 50 mg BSA + 5 ml ddH₂O

Folgende BSA Standardreihe wurde in absteigender Konzentration hergestellt und entweder direkt verwendet oder bei -20°C eingefroren:

Tabelle 9: BSA Standardreihe Kapitel 2.10

BSA Konzentration	10 µg/µl	8 µg/µl	6 µg/µl	4 µg/µl	2 µg/µl	1 µg/µl	0 µg/µl
10 µg/µl BSA Stammlösung	1000 µl	800 µl	600 µl	400 µl	200 µl	100 µl	0 µl
ddH ₂ O	0 µl	200 µl	400 µl	600 µl	800 µl	900 µl	1000 µl

Tabelle 10: Verwendete Stamm- oder Anwendungslösungen Kapitel 2.10

Stamm- oder Anwendungslösungen	Bestandteile	Masse/Volumen
2%-ige Na-K-Tartrat Stammlösung (bei RT in einer braunen Flasche aufbewahrt)	Na-K-Tartrat ddH ₂ O	2 g 100 ml
1%-ige CuSO ₄ Stammlösung (bei RT in einer braunen Flasche aufbewahrt)	CuSO ₄ ddH ₂ O	1 g 100 ml
2%-ige Na ₂ CO ₃ Stammlösung (bei RT aufbewahrt)	Na ₂ CO ₃ ddH ₂ O 2 M NaOH	20 g 950 ml 50 ml
Lösung A (mit Na ₂ CO ₃ Stammlösung frisch vor dem Versuch auf 27 ml gebracht)	Na-K-Tartrat Stammlösung CuSO ₄ Stammlösung	270 µl 270 µl
Lösung B (frisch vor dem Versuch vorbereitet)	Folins Reagenz (33%) ddH ₂ O	2000 µl 4000 µl

Durchführung:

In Triplikaten werden in eine 96-Well-Messplatte je 2 µl der Standards bzw. der zu bestimmenden Proben (die zu untersuchenden Blutseren zuvor 1:10 verdünnt, je 20 µl + 180 µl PBS) hineinpipettiert und anschließend 150 µl von Lösung A hinzugegeben. Nach einer Inkubation auf dem Schwenkinkubator von 10 min werden jeweils 30 µl von Lösung B hinzugegeben und diese nach 120 min bei 750 nm Absorption mittels Plate Reader gemessen.

Auswertung:

Die Standardproben werden in *Excel Microsoft 2010* gegen die Absorption aufgetragen, nachdem zuvor gemittelter Leerwert abgezogen und die Triplikate gemittelt wurden. Die dann ermittelte Geradengleichung wird nach x aufgelöst und somit die Proteinkonzentrationen der Proben in µg/µl anhand gemessener gemittelter Absorption

abzüglich Leerwert bestimmt (und im Falle einer vorherigen Verdünnung mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert).

2.11 Analyse des intrazellulären GSH-Gehaltes von HL-60- bzw. THP-1-Zellen

Um einen möglichen intrazellulären Einfluss des N-Acetylcysteins (NAC) auf den zelleigenen antioxidativen Gluthationstoffwechsel zu überprüfen soll in dieser Methode der intrazelluläre Gesamtspiegel von GSH und GSSG bestimmt werden. Durch Auffüllen des Cystein-Pools könnte NAC diesen intrazellulären Gesamtspiegel anheben (73, 74). Dazu werden in dieser Analyse der Einfluss des NAC sowohl auf HL-60- als auch auf THP-1-Zellen betrachtet.

Der antioxidative Schutz der Zelle wird durch 90%-iges intrazelluläres Vorliegen des reduzierten GSH gewährleistet. Hierzu wird u.a. die oxidierte GSSG-Form mit Hilfe der Glutathionreduktase (GR) unter Nicotinamidadeninucleotidphosphat-Verbrauch (NADPH) wieder zu GSH recycled (50, 51).

Zur Bestimmung der intrazellulären Gesamtspiegel des reduzierten und oxidierten GSH ist das von *Rahman et al. 2006* beschriebenen Verfahren verwendet worden (101): Hierbei reagiert das intrazelluläre reduzierte GSH mit 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) unter Freisetzung von fluoreszente 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) zu GS-TNB. Die Rate an spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm im Plate Reader gemessenem TNB ist hierbei proportional des reduzierten GSH. Da das oxidierte GSSG durch ein Recycling-Assay mittels GR und NADPH vor der TNB-Messung auch zu GSH reduziert worden ist, stellt das gemessene GSH den Gesamtspiegel von intrazellulärem GSH und GSSG dar.

Methodenspezifische Lösungen:

Tabelle 11: Verwendete Stamm- oder Anwendungslösungen Kapitel 2.11

Stamm- oder Anwendungslösungen	Bestandteile	Masse/Volumen
Lösung A (gelagert bei 4°C)	KH ₂ PO ₄ ddH ₂ O	6,8 g 500 ml
Lösung B (gelagert bei 4°C)	K ₂ HPO ₄ ddH ₂ O	8,5 g 500 ml
0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (KPE) (frisch vor dem Versuch angesetzt)	Lösung A Lösung B	8000 µl 42000 µl
GSH- Stammlösung (1 mg/ml) (in 1-ml-Aliquots bei -20°C gelagert)	GSH KPE	14 mg 14 ml
GSH-Anwendungslösung (10 µg/ml) (frisch vor Versuch)	GSH- Stammlösung KPE	10 µl 990 µl
Standardkurve: Höchste Standardkonzentration (26,2 nmol/ml)	GSH-Anwendungslösung KPE	800 µl 200 µl

1:2 Verdünnungsreihe (13,2, 6,6, 3,3 nmol/ml,...bis 0,2 nmol/ml)	Nächsthöhere Konz. KPE	800 µl 200 µl
1:1 GR-DTNB-Mischlösung (kurz vor Messung gemischt)	GR DTNB	3500 µl 3500 µl
GR-Lösung (frisch vor Versuch)	500-units/ml-GR KPE	23 µl 3500 µl
DTNB-Lösung (vor Versuch, lichtgeschützt, auf Eis)	DTNB KPE	2,35 mg 3500 µl
NADPH-Lösung (vor Versuch, lichtgeschützt, auf Eis)	NADPH KPE	4,7 mg 7000 µl
MPP-Lösung (bei 4°C gelagert)	MPP KPE	0,3 g 10 ml

(Details zur Herstellung versuchsspezifischer Lösungen siehe Appendix)

Durchführung (für HL-60- bzw THP-1-Zellen analog):

Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Trypan Blau werden 2×10^6 Zellen pro 1,5-ml-Eppendorfgefäß bei 600 G und 22°C für 10 min zentrifugiert und in je 1000 µl Lösung mit je drei verschiedenen NAC-Konzentrationen (0,0 mM, 0,5 mM und 1,0 mM in „Medium++“) resuspendiert (pro NAC-Bedingung und Zellart (HL-60, THP-1) ein Eppendorfgefäß für 2-h-Messung und 24-h-Messung => insg. 4 Eppendorfgefäße je NAC-Bedingung). Die beschrifteten geöffneten Eppendorfgefäße werden zur Inkubation für die 2-h-Messung 1 h 55 min für die 24-h-Messung 23 h 55 min in den CO₂-Inkubator (37°C, 5% CO₂, dunkel) gestellt. Zum Beenden der Inkubation sowie Lysierung der Zellen (jeweils nach 2 bzw. 24 h) werden die Eppendorfgefäße 5 min mit 1000 G bei 4°C zentrifugiert, wird der Überstand mittels Pipette entfernt, das Pellet in 200 µl MPP-Lösung resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Nach Auftauen werden die Eppendorfgefäße nochmals 10 min mit 12.000 g bei 4°C zentrifugiert. Aus jedem Eppendorfgefäß werden für die Messung des Gesamtspiegels von intrazellulärem GSH und GSSG 40 µl Überstand benötigt. Der restliche Überstand (ca. 120 µl) wird zu Normierungszwecken mittels „Lowry“-Proteinkonzentrationsbestimmung in beschriftete 1,5-ml-Eppendorfgefäße bei -20°C eingefroren. Zur Neutralisierung der Reste der MPP-Lösung werden die 40 µl Überstand in einem jeweilig beschrifteten 0,5-ml-Eppendorfgefäß mit 80 µl Lösung B gemischt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert (bei der Kalkulation wird diese 1:3 Verdünnung mit einberechnet). Auf eine 96-Well-Platte werden nun je Sample, je Standard und je Leerwert (KPE) 3x20 µl (Triplikate) pipettiert. Dann werden mit einer Mehrkanalpipette je Well 120 µl GR-DTNB-Mischlösung hinzugegeben und nach 30 s je Well 60 µl NADPH-Lösung hinzugegeben. Abschließend misst der Plate Reader unmittelbar alle 30 s die Absorption bei einer Wellenlänge von 412 nm.

Auswertung:

Mithilfe von *Excel Microsoft 2010* wird die Linearität der Produktbildung geprüft. Die Werte der 5. Messung nach 2 min werden ausgewertet. Zur Erstellung einer Geradengleichung wird aus den Triplikatwerten der Standardreihe jeweils der Mittelwert berechnet und nach Abzug des Leerwerts werden die Konzentrationen der Standardreihe gegen die Absorption aufgetragen. Die dadurch erhaltene Geradengleichung wird nach x aufgelöst und für y werden nun die für die Proben gemessenen Absorptionen jeweils abzüglich des Leerwerts eingesetzt. Man erhält somit den Gesamtgehalt von intrazellulärem GSH und GSSG in nmol/ml. Nach durchgeführter Normierung mittels „Lowry“-Proteinbestimmung lässt sich der Gesamtgehalt von intrazellulärem GSH und GSSG pro Protein in nmol/mg angeben.

2.12 Sandwich-Immunoassay (ELISA) zur Messung pro-/antiinflammatorischer Botenstoffspiegel im Blutserum

Zum besseren Verständnis einer möglichen alters- und gesundheitsbedingten Veränderung einer Makrophagensubtypaktivierung sind in dieser Arbeit die für eine klassische proinflammatorische M1- bzw. alternative antiinflammatorische M2-Makrophagenpolarisierung charakteristischen Botenstoffe in den Blutseren der 40 Spender (je 10 jung/alt, ohne/mit Knochenfraktur) bestimmt worden (31, 32, 102). Dazu sind ergänzend zu den bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe des Instituts bestimmten für eine M1-Makrophagenaktivierung charakteristischen Markern TNF- α , IFN- γ , und GM-CSF die Marker IL-6 und IL-12 sowie ergänzend zu den für eine M2-Makrophagenaktivierung charakteristischen Markern IL-10 die Marker IL-1RA, IL-4 und IL-13 bestimmt worden (32, 102). Das ELISA-Verfahren wird im Durchführungsteil erläutert.

Die Methode ist nach den Protokollen des Herstellers *PeptoTech*® modifiziert durchgeführt worden (103-105). Die Modifikation besteht in der Nutzung einer selbst hergestellten chemilumineszenten ECL-Lösung anstelle des von *PeptoTech*® angebotenen photometrisch nutzbaren ABTS-Flüssigsubstrates (2,2'-(Azino-di-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (106). Das nachfolgende Durchführungsprotokoll bezieht sich auf alle 5 detektierten Botenstoffe. Für die Detektion eines Botenstoffes ist für alle 40 Spender und entsprechender Standardreihe eine ELISA-96-Well-Platte benutzt worden:

Methodenspezifische Lösungen (steril mit Sterilfilter, Volumen pro 96-Well-Platte):

Tabelle 12: Verwendete Stamm- oder Anwendungslösungen Kapitel 2.12

Stamm- oder Anwendungslösungen	Bestandteile	Masse/ Volumen
Waschpuffer (0,05% Tween-20)	DPBS Tween-20	600 ml 300 µl
Verdünnungslösung (VL) (0,1% BSA)	Waschpuffer BSA	50 ml 50 mg
Blockierungspuffers (1% BSA)	DPBS BSA	30 ml 0,3 g
TRIS Puffer (pH 8,5) (100 mM TRIS) (mit HCl auf pH 8,5, dann mit ddH ₂ O auf 1000 ml Endvolumen bringen)	TRIS ddH ₂ O	12,1 g 800 ml
Luminol Stammlösung (LSt) (250 mM Luminol) (200-µl-Aliquots -20°C dunkel gelagert)	Luminol DMSO	0,88 g 20 ml
p-Cumarsäure Stammlösung (CSt) (90 mM p-Cumarsäure) (90-µl-Aliquots -20°C dunkel gelagert)	Cumarsäure DMSO	0,15 g 10 ml
ECL-Lösung (1,25 mM Luminol, 0,2 mM Cumarsäure, 0,03% H ₂ O ₂) (frisch vor Verwendung)	TRIS LSt CSt 30% H ₂ O ₂	10 ml 50 µl 22 µl 10 µl
Avidin-HRP Konjugatlösung (1:2000) (unmittelbar vor Verwendung, aus <i>PeproTech®-Kit</i> , 2 Jahre -20°C haltbar)	Avidin-HRP Konjugatlösung VL	5,5 µl 11 ml

Tabelle 13: Fängerantikörper Stammlösungen Kapitel 2.12

Fängerantikörper Stammlösungen (FSt) (aus jeweiligem <i>PeproTech®-Kit</i>)	Bestandteile	Masse/ Volumen
Humanes IL-1RA (100 µg/ml, 25-µl-Aliquots bei 2-8°C 2 Wochen haltbar) (Antigenaffinitätsgereinigtes anti-hIL-1RA vom Kaninchen + 0,5 mg D-Mannitol)	anti-hIL-1RA ddH ₂ O	11 µg 110 µl
Humanes IL-4 (100 µg/ml, 25-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (Antigenaffinitätsgereinigtes anti-hIL-4 vom Kaninchen + 0,5 mg D-Mannitol)	anti-hIL-4 ddH ₂ O	11 µg 110 µl
Humanes IL-6 (100 µg/ml, 50-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (Antigenaffinitätsgereinigtes anti-hIL-6 von der Ziege + 0,5 mg D-Mannitol)	anti-hIL-6 ddH ₂ O	21 µg 210 µl
Humanes IL-12 (100 µg/ml, 50-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (Antigenaffinitätsgereinigtes anti-hIL-12 von der Ziege + 0,5 mg D-Mannitol)	anti-hIL-12 ddH ₂ O	11 µg 110 µl
Humanes IL-13 (100 µg/ml, 50-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (Antigenaffinitätsgereinigtes anti-hIL-13 vom Kaninchen + 2,5 mg D-Mannitol)	anti-hIL-13 ddH ₂ O	100 µg 1000 µl

Tabelle 14: Fängerantikörper Anwendungslösungen Kapitel 2.12

Fängerantikörper Anwendungslösungen (unmittelbar vor Verwendung)	Bestandteile	Masse/ Volumen
Humanes IL-1RA (0,5 µg/ml)	FSt VL	25 µl 5000 µl
Humanes IL-4 (0,5 µg/ml)	FSt VL	25 µl 5000 µl
Humanes IL-6 (1 µg/ml)	FSt VL	50 µl 5000 µl
Humanes IL-12 (1 µg/ml)	FSt VL	50 µl 5000 µl
Humanes IL-13 (1 µg/ml)	FSt VL	50 µl 5000 µl

Tabelle 15: Detektionsantikörper Stammlösungen Kapitel 2.12

Detektionsantikörper Stammlösungen (DS) (aus jeweiligem PeproTech®-Kit)	Bestandteile	Masse/ Volumen
Humanes IL-1RA (100 µg/ml, 25-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (biotinyliertes Antigenaffinitätsgereinigtes anti-hIL-1RA vom Kaninchen + 0,5 mg D-Mannitol)	anti-hIL-1RA ddH ₂ O	11 µg 110 µl
Humanes IL-4 (100 µg/ml, 25-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (biotinyliertes Antigenaffinitäts-gereinigtes anti-hIL-4 vom Kaninchen + 0,5 mg D-Mannitol)	anti-hIL-4 ddH ₂ O	11 µg 110 µl
Humanes IL-6 (100 µg/ml, 25-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (biotinyliertes Antigenaffinitätsgereinigtes anti-hIL-6 von der Ziege + 0,5 mg D-Mannitol)	anti-hIL-6 ddH ₂ O	21 µg 210 µl
Humanes IL-12 (100 µg/ml, 25-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (biotinyliertes Antigen-affinitätsgereinigtes anti-hIL-12 von der Ziege + 0,5 mg D-Mannitol)	anti-hIL-12 ddH ₂ O	11 µg 110 µl
Humanes IL-13 (100 µg/ml, 12,5-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (biotinyliertes Antigen-affinitätsgereinigtes anti-hIL-13 vom Kaninchen + 2,5 mg D-Mannitol)	anti-hIL-13 ddH ₂ O	25 µg 250 µl

Tabelle 16: Detektionsantikörper Anwendungslösungen Kapitel 2.12

Detektionsantikörper Anwendungslösungen (unmittelbar vor Verwendung)	Bestandteile	Masse/ Volumen
Humanes IL-1RA (0,5 µg/ml)	DSt VL	25 µl 5000 µl
Humanes IL-4 (0,5 µg/ml)	DSt VL	25 µl 5000 µl
Humanes IL-6 (0,5 µg/ml)	DSt VL	25 µl 5000 µl
Humanes IL-12 (0,5 µg/ml)	DSt VL	25 µl 5000 µl
Humanes IL-13 (0,25 µg/ml)	DSt VL	12,5 µl 5000 µl

Tabelle 17: Standard Stammlösungen Kapitel 2.12

Standard Stammlösungen (SSt) (aus jeweiligem PeproTech®-Kit)	Bestandteile	Masse/ Volumen
Humanes IL-1RA (1 µg/ml, 25-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (rekombinantes hIL-1RA + 2,2 mg BSA + 11 mg D-Mannitol)	hIL-1RA ddH ₂ O	1 µg 1000 µl
Humanes IL-4 (1 µg/ml, 25-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (rekombinantes hIL-4 + 2,2 mg BSA + 11 mg D-Mannitol)	hIL-4 ddH ₂ O	1 µg 1000 µl
Humanes IL-6 (1 µg/ml, 25-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (rekombinantes hIL-6 + 2,2 mg BSA + 11 mg D-Mannitol)	hIL-6 ddH ₂ O	1 µg 1000 µl
Humanes IL-12 (1 µg/ml, 25-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (rekombinantes hIL-12 + 2,2 mg BSA + 11 mg D-Mannitol)	hIL-12 ddH ₂ O	1 µg 1000 µl
Humanes IL-13 (1 µg/ml, 12,5-µl-Aliquots bei 2 - 8°C 2 Wochen haltbar) (rekombinantes hIL-13 2,2 mg BSA + 11 mg D-Mannitol)	hIL-13 ddH ₂ O	1 µg 1000 µl

Tabelle 18: Standard Anwendungslösungen und Standardreihen Kapitel 2.12

Standard Anwendungslösungen (unmittelbar vor Verwendung)	Bestandteile	Masse/ Volumen
Humanes IL-1RA (1,5 ng/ml) => 1:2 Verdünnungsreihe mit VL 6-malig bis herunter 0,023 ng/ml	SSt VL	0,45 µl 299,55 µl
Humanes IL-4 (1 ng/ml) => 1:2 Verdünnungsreihe mit VL 6-malig bis herunter 0,015 ng/ml	SSt VL	0,3 µl 299,7 µl
Humanes IL-6 (1,5 ng/ml) => 1:2 Verdünnungsreihe mit VL 6-malig bis herunter 0,023 ng/ml	SSt VL	0,45 µl 299,55 µl
Humanes IL-12 (2 ng/ml) => 1:2 Verdünnungsreihe mit VL 6-malig bis herunter 0,031 ng/ml	SSt VL	0,6 µl 299,4 µl
Humanes IL-13 (4 ng/ml) => 1:2 Verdünnungsreihe mit VL 6-malig bis herunter 0,063 ng/ml	SSt VL	1,2 µl 298,8 µl

Durchführung (bei RT):

Zur Detektion oben genannter Botenstoffspiegel im Blutserum kommt das Sandwich-ELISA Verfahren zum Einsatz. Spezielle gut bindenden ELISA-96-Well-Platten werden hierbei zunächst mit spezifischen Fängerantikörpern beschichtet. Hierzu werden 100 µl der Fängerantikörper-Anwendungslösung pro Well über Nacht in mit Parafilm versiegelter Platte auf einem Wippschüttler inkubiert. Nach vorsichtigem Ausklopfen der Wells werden diese in 4 Waschschritten jeweils mit 300 µl Waschpuffer pro Well mithilfe einer elektronischen Mehrkanalpipette gewaschen und nach letztem Schritt wiederum vorsichtig ausgeklopft. An diesen spezifischen Fängerantikörper können die zu detektierenden in der Probe befindlichen Botenstoffmoleküle als Antigen binden. Zur Verhinderung falsch positiver Reaktionen müssen unspezifische Bindungsstellen geblockt werden, um die Bindung unspezifischer Antigene daran zu verhindern. Hierzu werden 300 µl Blockierungspuffer pro Well zugegeben und die 1-stündige Inkubation auf dem Wippschüttler wird abermalig in 4 Waschschritten wie oben beschrieben beendet. Nun werden die zu detektierenden Antigene hinzugegeben: Zur Erstellung einer Kalibrationskurve wird auf die präparierte Platte nun die Standardreihe (in Duplikaten pro Konzentration à 50 µl pro Well) pipettiert (als Leerwert 50 µl reine VL pro Well). Außerdem werden nun die Serumprobenlösungen (in Duplikaten pro Spender à 10 µl + 40 µl VL pro Well => 1:50 verdünnt) auf dieselbe Platte pipettiert. Nach 2-stündiger Inkubation auf dem Wippschüttler folgen abermalig 4 Waschschriffe wie oben beschrieben. Um die Menge der zu detektierenden Antigene messen zu können, müssen sog. Detektionsantikörper hinzugegeben werden, welche als sekundäre Antikörper spezifisch an diese Antigene binden können. Die Menge des zu detektierenden Antigens korreliert mit der entsprechenden Menge des sekundären Antikörpers. Hierzu wird die entsprechende Detektionsantikörper-Anwendungslösung hinzugegeben (50 µl pro Well,

2-stündige Inkubation auf dem Wippschüttler, beendet durch 4-maliges Waschen). Durch Chemilumineszenz wird die Menge der sekundären Antikörper messbar, indem der hinzugegebene Farbstoff Luminol durch enzymatische Spaltung fluoreszent aktiviert wird. Als Enzym dient die in der hinzugegebene Avidin-HRP-Konjugatlösung befindliche Meerrettichperoxidase (50 µl pro Well, 30-minütige Inkubation, beendet durch 4-maliges Waschen). Der Farbstoff Luminol befindet sich in der ECL-Lösung, welche während des letzten Waschschrilles (maximal 30 min stabil) frisch hergestellt wird und mithilfe der elektrischen Mehrkanalpipette in jedes Well gegeben wird (100 µl pro Well). Die Lumineszenzintensitäten werden abschließend unmittelbar im Plate Reader („ELISA“-Programm mit Emission: 2500, 3000, 3500 und Gain: 2500) gemessen. Sie sind proportional zur Menge des gebundenen Zielmoleküls. Mittels erstellter Kalibrationskurve kann abschließend dann die Konzentration des nachzuweisenden Antigens, in diesem Falle des Botenstoffes, errechnet werden (107).

Auswertung:

Mithilfe von *Excel Microsoft 2010* wird die Linearität der Produktbildung geprüft. Die Werte der ersten Messung bei 0 s werden ausgewertet. Zur Erstellung einer Geradengleichung wird aus den Duplikatwerten der Standardreihe jeweils der Mittelwert berechnet und nach Abzug des Leerwerts werden die Konzentrationen der Standardreihe gegen die Lumineszenz aufgetragen. Die dadurch erhaltene Geradengleichung wird nach x aufgelöst und für y werden nun die für die Proben gemessenen Lumineszenzwerte jeweils abzüglich des Leerwerts eingesetzt. Man erhält somit die Serumspiegel des entsprechenden Botenstoffes in ng/ml. Da die verwendeten Blutseren bereits bei der „Lowry“-Proteinbestimmung 1:10 verdünnt und bei diesem Verfahren abermals 1:50 verdünnt worden sind, wird dieser entsprechend mit 500 multipliziert, um die tatsächlichen Serumkonzentrationen zu erhalten. Nach durchgeführter Normierung mittels „Lowry“-Proteinbestimmung lassen sich die Serumlevel der entsprechenden Botenstoffe in ng/ml Protein angeben.

2.13 Sandwich-Immunoassay basiertes Kit zur Messung intrazellulärer Zellsignalkaskadenproteinspiegel

Anhand der intrazellulären Spiegel einiger für Zellstress bzw. Anti- und Proapoptose typischer intrazellulärer Signalkaskadenproteine soll das Reaktionsverhalten der aus dem Vollblut der 40 Spender (je 10 jung/alt, ohne/mit Knochenfraktur) isolierten

Granulo-/Monozyten auf induzierten oxidativen Stress sowie ein möglicher antioxidativer protektiver Einfluss von NAC untersucht werden. Dazu werden die Zellen nach 50-minütiger Inkubation ohne/mit H_2O_2 und/oder ohne/mit NAC lysiert

Dazu wird ein Radioimmunfällungs (RIPA) Lysepuffer hergestellt (*Tabelle 19*) (*108*).

Tabelle 19: Verwendete Stamm- oder Anwendungslösungen Kapitel 2.13

Stamm- oder Anwendungslösungen	Bestandteile	Masse/Volumen
Pepstatin A Lösung (10- μ l-Aliquots bei -20°C)	Pepstatin A Methanol	1 mg 2 ml
Leupeptin Lösung (5- μ l-Aliquots bei -20°C, einmalig verwendbar)	Leupeptin ddH ₂ O	2,5 mg 1 ml
PMSF Lösung (10- μ l-Aliquots bei -20°C)	PMSF DMSO	87,1 mg 1 ml
NaF Lösung (5- μ l-Aliquots bei -20°C, einmalig verwendbar)	NaF ddH ₂ O	102 mg 1 ml
Na ₃ VO ₄ Lösung (mittels HCl-Koch-Abkühlzyklen auf pH 9 einstellen, haltbar bei -20°C bis gelbliche Färbung auftritt)	Na ₃ VO ₄ ddH ₂ O	90 mg 1 ml
RIPA Stammlösung (in 50 ml ddH ₂ O lösen, auf pH 7,6 einstellen, mit ddH ₂ O auf insgesamt 100 ml bringen) (50-ml-Aliquots bei -20°C)	TRIS Base NaCl Tergitol Lsg. DOC EDTA	0,121 g 0,58 g 500 μ l 0,3 g 0,372 g
RIPA Lysepuffer (auf Eis, zeitnah vor Zellysierung die Reagenzien in fester Reihenfolge zugeben)	RIPA Stammlösung <u>Proteaseninhibition:</u> Pepstatin A Lösung Leupeptin Lösung PMSF Lösung <u>Phosphataseninhibition:</u> NaF Lösung Na ₃ VO ₄ Lösung	1400 μ l 2,8 μ l 2,8 μ l 2,8 μ l 2,8 μ l 2,8 μ l 2,8 μ l

(Volumenangaben beziehen sich auf ein Experiment mit vier Spendern)

Die intrazellulären Signalkaskadenproteinspiegel werden mithilfe des „PathScan® Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kit“ (*Cell Signaling Technology*) gemessen. Alle Informationen zu diesem Kit sind dem Data Sheet des Herstellers entnommen (*109*). Das Kit funktioniert wie ein Sandwich-Immunoassay und besteht aus zwei „Slides“ (siehe *Abb. 5a*) zur gleichzeitigen Detektion von jeweils 19 an Stressantwort und Apoptose beteiligten Signalmolekülen pro Antikörperfeld. Folgende 12 dieser 19 Signalmoleküle sind in dieser Arbeit von besonderem Interesse gewesen und in *Tabelle 20* ihren in der Literatur beschriebenen zellregulatorischen Funktionen nach geordnet abgebildet.

Für das im Kit genutzte Sandwich-Immunoassay-Verfahren sind zielspezifische Fängerantikörper in Duplikaten auf einen mit Nitrozellulose beschichteten Glasträger aufgebracht. Der Belegungsplan dieser Duplikate im jeweiligen Antikörperfeld ist in *Abbildung 5b* zu sehen. Jeder Glasträger trägt 16 solcher Antikörperfelder. In den

insgesamt 32 Antikörperfeldern beider Glasträger können insgesamt folglich 1216 chemilumineszente Datenpunkte generiert werden. Nach Zugabe der verschiedenen Zelllysatsproben binden an die Fängerantikörper die zu detektierenden Antigene. Spezifisch binden an diese wiederum hinzugegebene biotinylierter Detektions-Antikörper. Die Konzentration dieser sekundären Antikörper wird auch hier durch Chemilumineszenz messbar, indem der anschließend hinzugegebene Farbstoff Luminol (im *LumiGLO*® Reagenz) durch enzymatische Spaltung des ebenfalls hinzugegebenen Enzyms Meerrettich-Peroxidase (*HRP-linked Streptavidin*) fluoreszent aktiviert wird.

Tabelle 20: Analyierte Kaskadenproteine des verwendeten Antibody Array Kits

Nr.:	Signalkaskadenprotein	Modifikation (109)
PRO-apoptotische intrazelluläre Mediatoren		
12	Caspase-3 (110)	gespalten an Asp175 => aktiviert
13	Caspase-7 (110)	gespalten an Asp198 => aktiviert

Kontextabhängig PRO-apoptotische intrazelluläre Mediatoren		
15	Chk1 (111)	phosphoryliert an Ser345 => aktiviert
16	Chk2 (111)	phosphoryliert an Thr68 => aktiviert
8	p53 (112)	phosphoryliert an Ser15 => aktiviert
10	SAPK/JNK (113)	phosphoryliert an Thr183/Tyr185 => aktiviert
7	Smad2 (114)	phosphoryliert an Ser465/467 => aktiviert
19	TAK1 (115)	phosphoryliert an Ser412

ANTI-apoptotische intrazelluläre Mediatoren		
4	Akt (116)	phosphoryliert an Ser473 => aktiviert
20	Survivin (117)	Gesamtkonzentration

Stresslevelabhängig ANTI-apoptotische intrazelluläre Mediatoren		
6	HSP27 (118)	phosphoryliert an Ser82 => aktiviert
14	I κ B α (119, 120)	(120, 121) Gesamtkonzentration
9	p38 MAPK (122-124)	phosphoryliert an Thr180/Tyr182 => aktiviert

Analysierte Intrazelluläre Mediatoren des „PathScan® Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kit´s“ (*Cell Signaling Technology 12856S*) ihrer zellregulatorischen Funktionen nach geordnet (Referenznummern in Klammern): Die für das Zellüberleben ungünstigen, Apoptose regulierenden Proteine sind „dunkelgrau“, die für das Überleben günstigen, Antiapoptose regulierenden „hellgrau“ hinterlegt. „Kontextabhängig PRO-apoptotisch“ bedeutet, dass diese Mediatoren stresslevel- bzw. mediatorlevelabhängig entweder regulatorisch oder apoptotisch wirken können. Die „hellgraue“ Hinterlegung zeigt zellprotektive und die „dunkelgraue“ zellbelastende Regulationen an. Diese Funktionseinteilung dient einer besseren Übersicht und hat nicht den Anspruch, der tatsächlichen Funktionskomplexität der aufgeführten Mediatoren im Organismus vollständig gerecht zu werden. Die Nummern unter „Nr.“ beziehen sich auf die in *Abbildung 5b* abgebildeten Belegungsplätze in den Antikörperfeldern Unter „Modifikation“ ist beschrieben, ob die Proteine in ihrer aktivierten Form oder in ihrer Gesamtkonzentration gemessen worden ist. Hierzu ist ggf. aufgeführt, an welcher/n Aminosäure/n die untersuchten Proteine durch welchen Vorgang aktiviert wurden. Asp - Asparaginsäure; Ser - Serin; Thr - Threonin; Tyr - Tyrosin.

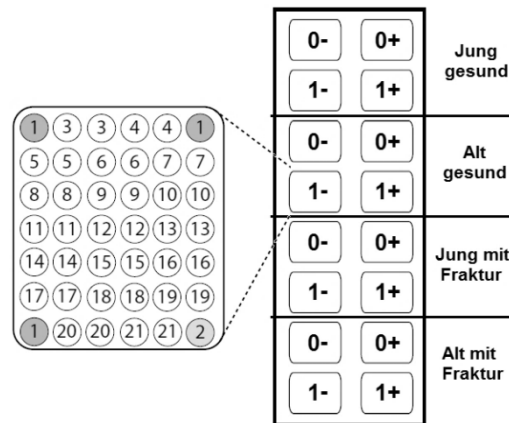


Abbildung 5a:

Abbildung 5b:

Abbildung 5a/b: Fotografie und Belegungsplan des verwendeten Antibody Array Kits

Fotografie eines zusammengebauten „PathScan® Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kit's" (*Cell Signaling Technology 12856S*) mit seinen 16 Antikörperkammern (a), welche jeweils mit zielspezifischen Fängerantikörpern von 19 an Stressantwort und Apoptose beteiligten intrazellulären Signalmolekülen in Duplikat-Form bestückt sind (b) (modifizierte Abbildung aus dem Data Sheet des Herstellers (109)). Die Zellen der 4 Spendergruppen „Jung gesund“, „Alt gesund“, „Jung mit Fraktur“ und „Alt mit Fraktur“ sind jeweils nach 50-minütiger Inkubation von 4 verschiedenen Bedingungen lysiert worden: 1. ohne NAC ohne H_2O_2 (0-), 2. ohne 1,0 mM NAC mit 0,03% H_2O_2 (0+), 3. mit 1 mM NAC ohne H_2O_2 (1-) und 4. mit 1 mM NAC mit 0,03% H_2O_2 (1+) (b). Pro Spendergruppe und Slide sind die jeweiligen Zelllysate von 5 Spendern in gleichen Konzentrationsanteilen mithilfe der „Lowry“-Proteinbestimmung gepoolt worden.

Durchführung:

Zunächst müssen die Proben nach Inkubation mit entsprechender Bedingung lysiert werden und bis zur Analyse gelagert werden (Lagerung bei $-80^\circ C$):

Die aus dem Vollblut der 40 Spender (je 10 jung/alt, ohne/mit Knochenfraktur) isolierten in 15-ml-Falkonröhrchen befindlichen Granulo-/Monozyten, welche nach den Experimenten aus Kapitel 2.7 und 2.8 verbleibend sind, werden nach guter Durchmischung mit dem Vortex in vier 1,5-ml-Eppendorfgefäße je Spender pipettiert und mit 600 G bei $22^\circ C$ 10 min lang zentrifugiert. Die vier Pellets je Spender werden danach je in 1 ml der vier verschiedenen Lösungen in Tabelle resuspendiert:

1. „Medium++“ (vgl. Kapitel 2.3)
2. 1,0-mM-NAC-Lösung: 4 ml 3,0-mM-NAC-Lösung (vgl. Kapitel 2.7) + 8 ml „Medium++“
3. 0,0-mM-NAC mit 0,03%- H_2O_2 : 5 ml „Medium++“ + 5 μl 30% H_2O_2
4. 1,0-mM-NAC mit 0,03%- H_2O_2 : 5 ml 1-mM-NAC-Lösung + 5 μl 30% H_2O_2

(Volumen reicht für ein Experiment mit vier Spendern)

Für 50 min inkubieren die Zellen nun im geöffneten Eppendorfgefäß im Inkubator bei $37^\circ C$, 5% CO_2 in Dunkelheit und werden dann mit 600 G bei $4^\circ C$ 10 min lang

zentrifugiert. Die Pellets werden in 75 µl RIPA Lysepuffer resuspendiert, gut mit dem Vortex gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach abschließender 10-minütiger Zentrifugation mit 14.000 g bei 4°C werden die Überstände in beschriftete Eppendorfgläser gegeben und bis zur Analyse der Signalmoleküle bei -80°C eingefroren. Anhand der mittels „Lowry“-Methode ermittelten Proteinkonzentrationen werden je Slide die Proteinlysate von 5 Spendern pro Spendergruppe (jung/alt ohne/mit Bruch eines langen Röhrenknochens) zu gleichen Anteilen gepoolt, sodass mit den beiden Slides alle 10 Spender der entsprechenden Spendergruppe berücksichtigt werden können. Die verwendeten Lösungen und Materialien sind alle Bestandteil des Array-Kit Sets der Firma *Cell Signaling Technology* und im folgenden Abschnitt *kursiv* in Originalbezeichnung des Herstellers aufgeführt. Diese Bezeichnungen sowie das Durchführungsprozedere sind dem Protokoll des Herstellers entnommen (109):

Glasträger und *Array Blocking Buffer* werden auf Raumtemperatur (RT) gebracht und ein *1X Array Wash Buffer* (1,5 ml *20X Array Wash Buffer* + 28,5 ml ddH₂O (*Carl Roth 3175.1*)) wird ebenfalls bei RT hergestellt. Auf Eis werden 1250 µl *1X Detection Antibody Cocktail* (125 µl *10X Detection Antibody Cocktail* + 1125 µl *Array Diluent Buffer*) und 1250 µl *1X HRP-linked Streptavidin* (125 µl *10X HRP-linked Streptavidin* + 1125 µl *Array Diluent Buffer*) hergestellt. Zur dichten Trennung der 16 Antikörperfelder werden das Vielkammerelement aus Plastik und der Glasträger wie in *Abbildung 4a* zu sehen mittels Eisenklammern dicht aneinander fixiert, sodass die Fängerantikörperpunkte jeweils auf dem Grund einer Kammer nach Oben zeigen. Während des nachfolgenden weiteren Prozederes ist diese Antikörperbeschichtung ununterbrochen feucht gehalten worden: Nach Pipettieren von 100 µl *Array Blocking Buffer* in jede Kammer und Versiegelung des Kits mit dem mitgelieferten Versiegelungsstreifen folgt bei RT eine 15-minütige Inkubation auf einem Wippschüttler. Der *Array Blocking Buffer* wird dann sanft auf Papiertüchern ausgeklopft. Nach Belegungsschema aus *Abbildung 4b* folgt anschließend über Nacht die Inkubation von 75 µl Zelllysatlösung pro Kammer versiegelt auf Eis (Kühlakkus in einer Eisbox) auf dem Wippschüttler. Am Folgetag erfolgt dann eine viermalige Waschung mit 100 µl *1X Array Wash Buffer* pro Kammer, indem die zugegebene Lösung jeweils 5 min auf dem Wippschüttler inkubiert und danach jeweils sanft ausgeklopft wird. Es folgt eine einstündige Inkubation von 75 µl *1X Detection Antibody*

Cocktail pro Kammer versiegelt bei RT auf dem Wippschüttler. Nach 4 x 5-minütiger Waschung wie oben beschrieben folgt eine 30-minütige Inkubation von 75 µl *1X HRP-linked Streptavidin* pro Kammer versiegelt bei RT auf dem Wippschüttler, welche dann durch abermaliger 4 x 5-minütiger Waschung wie oben beendet wird. Nach Entfernung des Vielkammerelements aus Plastik wird der Glasträger noch einmal zügig in einem Plastikbehälter mit ca. 10 ml *1X Array Wash Buffer* gewaschen. Kurz vor der Chemilumineszenzmessung werden LumiGLO® Reagenz und Peroxide Reagenz kombiniert (9 ml ddH₂O + 0,5 ml *20X LumiGLO® Reagent A #7003* + 0,5 ml *20X Peroxide Reagent B #7003*), auf den Glasträger gegeben und die entstehenden 1344 Chemilumineszenzpunkte (1216 Datenpunkte (Duplikate), 96 Positivkontrollpunkte (Triplikate) und 32 Negativkontrollpunkte) werden in 5 Belichtungszeiten alle 5 s mit der digitalen Chemilumineszenz-Analysekamera *ChemoCam* (Dunkelkammer) aufgenommen.

Auswertung:

Die Chemilumineszenzpunkte der zwei Array Kits werden in der Analysesoftware *ImageJ* manuell für alle 5 Belichtungszeiten markiert, in ihrer Intensität von dieser Software analysiert und in Grauwerte transferiert. In *Excel Microsoft 2010* werden die Duplikate der Datenpunkte eines jeweiligen Antikörperfeldes gemittelt und anhand der gemittelten Triplikate der Positivkontrollpunkte desselben Feldes als 100% Bezug normiert. Abschließend werden die Daten der 5 Belichtungszeiten gemittelt und unter den jeweiligen Spendergruppen (je 10 jung/alt, ohne/mit Knochenfraktur) den Bedingungen ohne/mit H₂O₂ und/oder ohne/mit NAC zugeordnet. Die Nachweisgrenze, ab welcher die Signalmessungen als verwertbar angenommen werden, liegt bei gerundet 10% der Positivkontrolle als Normierungsfaktor und ist mithilfe folgender Formel errechnet worden (Mittelwert aller Blindwerte (y_{blank}) = 6,04; Standardabweichung aller Blindwerte (σ_{blank}) = 1,41): $y_{\text{dl}} = y_{\text{blank}} + 3 * \sigma_{\text{blank}}$ (125). Alle Daten unterhalb dieser Grenze können nicht verwertet werden, da bereits kleine Schwankungen zu falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnissen führen.

2.14 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Aufgrund der kleinen Probengröße (drei separat kultivierte HL-60- bzw. THP-1-Zellkulturen (je N=3) und 40 Spenderproben (N=40)) ist keine Normalverteilung

anzunehmen. Die statistische Auswertung der mit der Software *Excel 2010 (Microsoft)* errechneten Werte ist mithilfe der Software *GraphPadPrism 5 (Graphpad Software, Inc.)* daher mittels *Kruskal-Wallis Test* als H-Test und anschließend mittels *Dunn's Multiple comparison Test* als Post-hoc-Test erfolgt (126, 127). Als Signifikanzlimit ist die Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gewählt worden. Die Daten werden immer als Mittelwert \pm Standardfehler präsentiert.

Alle graphischen Darstellungen der Ergebnisse dieser Dissertation sind ebenfalls mit der Software *GraphPadPrism 5* erstellt worden.

3 Ergebnisse

Bei der Literaturrecherche zu dieser Arbeit fiel auf, dass zur Erforschung möglicher altersphysiologischer immunologischer Unterschiede zwar junge mit alten Spendergruppen vergleichend diskutiert werden, bei den Experimenten hierzu jedoch teilweise jung und alt bzw. gesund und krank getrennt voneinander untersucht wurden. Zur direkten Vergleichbarkeit möglicher altersbedingter Veränderungen der zellulären bzw. intrazellulären Reaktion von Granulo-/Monozyten bei Aktivierung der akuten Immunabwehr untersuchte diese Arbeit jung und alt sowie gesund und krank in gemeinsamen und nicht in getrennten Experimenten.

3.1 Einfluss des Alters auf humane Granulo-/Monozyten und den Spiegel an RNS im Organismus

Bevor der Einfluss oxidativen Stresses bzw. des NAC näher untersucht wird, gibt dieses Kapitel zunächst Einblick in mögliche alters- bzw. gesundheitsabhängige Unterschiede der akuten angeborene Immunabwehr an sich. Die dazu untersuchten Blutserven bzw. Granulo-/Monozyten entstammen jungen/alten Spendern ohne/mit Bruch eines langen Röhrenknochens.

3.1.1 Erhöhung pro-/antiinflammatorischer monozytärer Grundaktivität

Wie in *Mantovani et al. 2004* und *Biswas et al. 2010* als ein vereinfachtes Model beschrieben sind bestimmte Botenstoffe und Rezeptoren charakteristisch für eine M1- bzw. eine M2-Makrophagenpolarisierung (32, 102). Auf die Funktionen klassischer proinflammatorischer M1-Makrophagen und alternativer antiinflammatorischer M2-Makrophagen wird im Diskussionsteil genauer eingegangen (31). Basierend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe des Instituts, welche anhand von Zytokinanalysen in

Blutseren eine tendenzielle Verschiebung der Makrophagenaktivierung älterer Spender von der antiinflammatorischen M2- hin zu einer proinflammatorischen M1-Aktivierung als Ausdruck einer neuen Komponente der Inflammaging-Theorie annehm, wurden weitere makrophagensubgruppentypische Botenstoffe in den Blutseren von jungen und alten Spendern wie in Material und Methoden beschrieben mittels ELISA gemessen und vergleichend analysiert (22).

Charakteristisch für eine proinflammatorische M1-Polarisierung waren hierbei wie in *Mantovani et al. 2004* beschrieben u.a. die hier betrachteten Mediatoren IL-6, IL-12, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α (*Abb. 6a-e*) (32). Die Grundspiegel dieser Botenstoffe lagen bei den Kontrollgruppen alter Spender im Vergleich zu denen junger Spender bei allen untersuchten Mediatoren signifikant höher vor (IL-6 (**p<0,01), IL-12 (*p<0,05), GM-CSF (**p<0,001), IFN- γ (**p<0,01) und TNF- α (**p<0,001)). Verglichen zur jeweiligen Kontrollgruppe lagen die Level von IL-6, IL-12 und TNF- α junger wie alter Spender bei Frakturgeschehen erhöht vor (jung: IL-6 und IL-12 (je ***p<0,001) sowie TNF- α (**p<0,01); alt: IL-6 (**p<0,001), IL-12 (**p<0,01) und TNF- α (tendenziell)). Bezüglich GM-CSF und INF- γ zeigten sich hingegen altersabhängige Unterschiede: Während die Seren junger Spender Fraktur bedingt ebenfalls erhöhte Spiegel dieser Botenstoffe aufwiesen (GM-CSF (*p<0,05), INF- γ (tendenziell) und TNF- α (**p<0,001)), waren die Spiegel alter Spender bei Fraktur im Falle von GM-CSF und INF- γ sogar tendenziell niedriger.

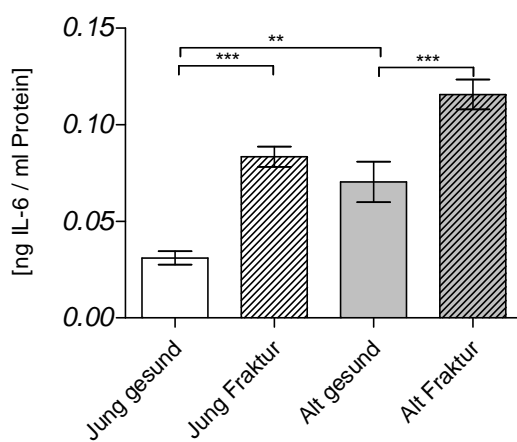


Abbildung 6a: Blutserumkonzentration von IL-6

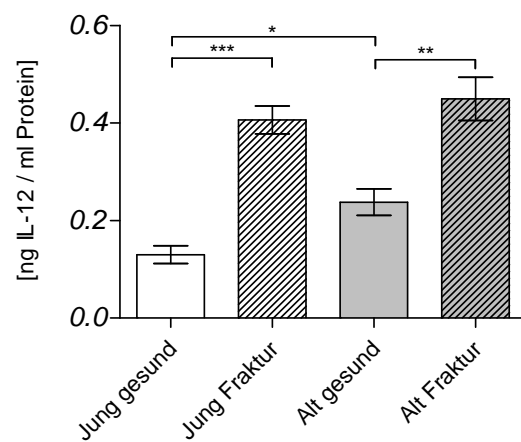


Abbildung 6b: Blutserumkonzentration von IL-12

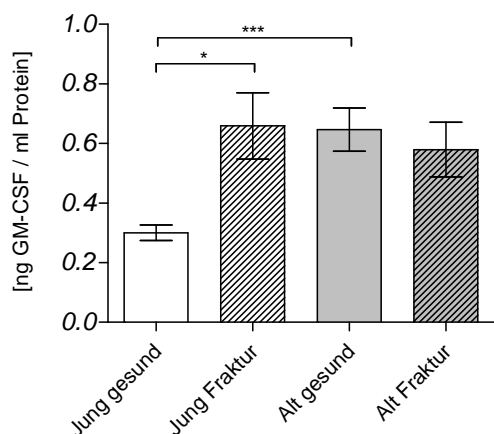


Abbildung 6c: Blutserumkonzentration von GM-CSF

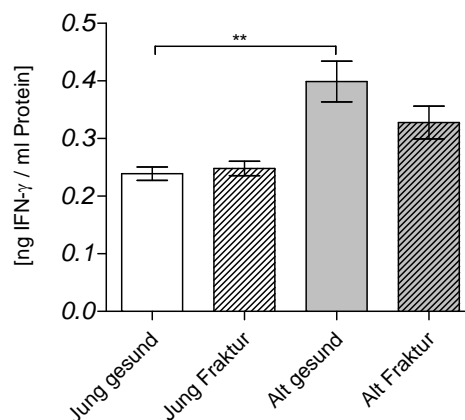


Abbildung 6d: Blutserumkonzentration von IFN-gamma

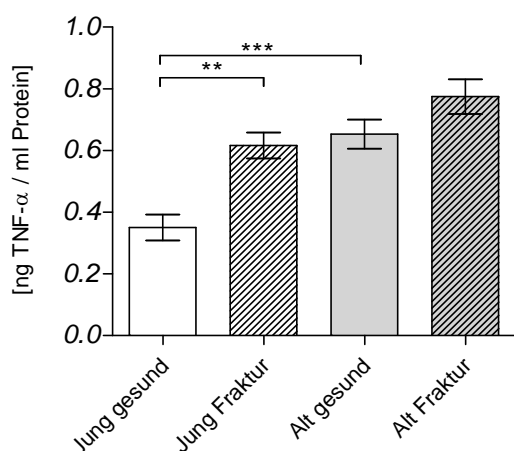


Abbildung 6e: Blutserumkonzentration von TNF-alpha

Abbildung 6a-e: Alters-/gesundheitsabhängige Botenstoffspiegel typisch für eine M1-Differenzierung

Blutserumkonzentrationen der für eine proinflammatorische M1-Differenzierung typischen Botenstoffe IL-6, IL-12, GM-CSF, IFN-gamma und TNF-alpha im Blutserum von jungen/alten Spendern ohne/mit Fraktur mittels ELISA-Verfahren gemessen und anhand „Lowry“-Proteinbestimmung normiert. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; *p<0,05, **p<0,01 und *** p < 0.001. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler von je 10 Probanden je Spendergruppe angegeben (N=40, n=2).

Für eine antiinflammatorische M2-Polarisierung waren wie in *Mantovani et al. 2004* beschrieben u.a. die hier betrachteten Mediatoren IL-1RA, IL-4, IL-10 und IL-13 charakteristisch (*Abb. 7a-d*) (32). Junge und alte Spender mit Fraktur wiesen auch hier verglichen mit den jeweiligen Kontrollgruppen signifikant höhere Mediatorenspiegel an IL-1 RA, IL-4 und IL-13 auf (jung: IL-1 RA, IL-4 und IL-13 (je ***p<0,001); alt: IL-1 RA (*p<0,05), IL-4 (***p<0,001) und IL-13 (*p<0,05)). IL-10 als typischer direkt antiinflammatorisch wirkender Botenstoff hingegen war verglichen mit der jeweiligen gesunden Kontrollgruppe sowohl bei jungen (signifikant mit **p<0,01) als auch alten Spendern (tendenziell) Fraktur bedingt herunterreguliert (128). Die alte Kontrollgruppe zeigte hierbei im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe basal höhere Spiegel an IL-1RA (mit *p<0,05), IL-4 (mit **p<0,01), IL-10 (tendenziell) und IL-13 (mit ***p<0,001).

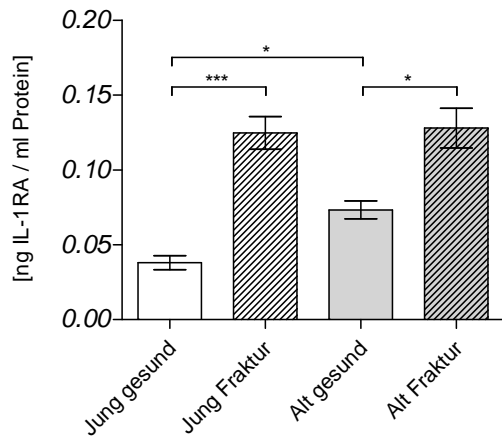


Abbildung 7a: Blutserumkonzentration von IL-1RA

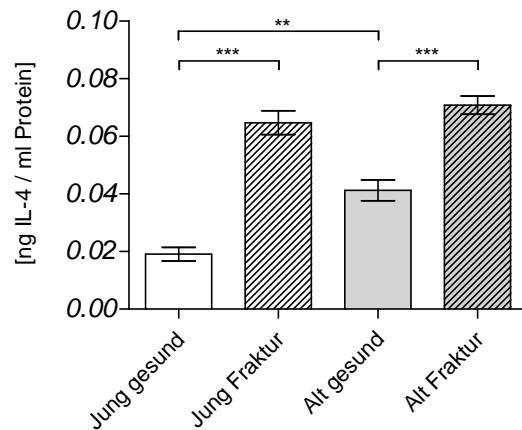


Abbildung 7b: Blutserumkonzentration von IL-4

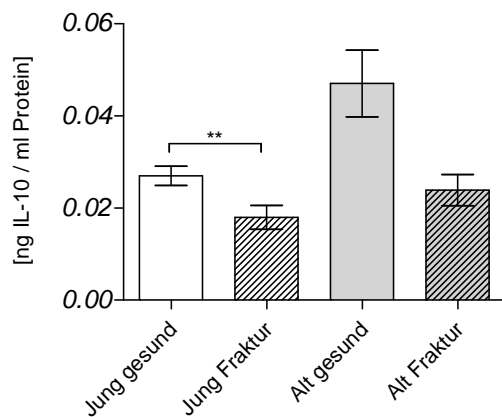


Abbildung 7c: Blutserumkonzentration von IL-10

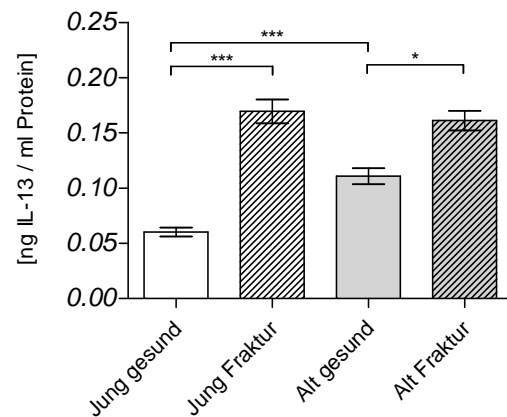


Abbildung 7d: Blutserumkonzentration von IL-13

Abbildung 7a-d: Alters-/gesundheitsabhängige Botenstoffspiegel typisch für eine M2-Differenzierung

Blutserumkonzentrationen der für eine antiinflammatorische M2-Differenzierung typischen Botenstoffe IL-1RA (Rezeptorantagonist), IL-4, IL-10 und IL-13 im Blutserum von jungen/alten Spendern ohne/mit Fraktur mittels ELISA-Verfahren gemessen und anhand „Lowry“-Proteinbestimmung normiert. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je 10 Probanden je Spendergruppe angegeben (N=40, n=2).

3.1.2 Geringere apoptotische Grundaktivität der Granulozyten/Monozyten älterer Spender bei Gesundheit

Um Einblick in mögliche alters-/gesundheitsabhängige Unterschiede ihrer intrazellulären Regulationsmechanismen zu erhalten, wurden die aus Spendervollblut isolierten Granulo-/Monozyten isoliert, lysiert, zu gleichen Anteilen gepoolt und mittels Sandwich-Immunoassay-Verfahren in Form eines Array Kits (*Cell Signaling Technology*) hinsichtlich der in *Tabelle 21* gelisteten intrazellulären Signalkaskadenproteine untersucht. Die Referenzen in dieser Tabelle beziehen sich auch auf die Beschreibungen der Mediatoren im Fließtext und sind zukünftig nicht zusätzlich

Tabelle 21: Funktionsübersicht untersuchter intrazellulärer Kaskadenproteine

Signalkaskadenprotein (Modifikation (109))	Regulatorische Funktion	
PRO-apoptotische intrazelluläre Mediatoren		
Caspase-3 (gespalten an Asp175 => aktiviert)	APOPTOTISCHE Effektorcaspase (110)	
Caspase-7 (gespalten an Asp198 => aktiviert)	APOPTOTISCHE Effektorcaspase (110)	
Kontextabhängig PRO-apoptotische intrazelluläre Mediatoren		
Chk1 (phosphoryliert an Ser345 => aktiviert)	DNA-Zerstörungskontrolle: Chromatin Remodelling, Kombinationspartner Chk2	oder: APOPTOSE (111)
Chk2 (phosphoryliert an Thr68 => aktiviert)	DNA-Zerstörungskontrolle: zerstörungsinduzierte Transkription, DNA-Reparatur	oder: APOPTOSE (111)
p53 (phosphoryliert an Ser15 => aktiviert)	basales p53 und geringer Zellstress => antioxidativer Schutz, Reparatur und Zellüberleben (Wächter des Genoms)	oder: hoch akkumuliertes p53/hohes Zellstress => APOPTOSE (112)
SAPK/JNK (phosphoryliert an Thr183/Tyr185 => aktiviert)	proinflammatorische Zytokine => stressaktivierter Signalweg	p53 abhängig APOPTOSE (113)
Smad2 (phosphoryliert an Ser465/467 => aktiviert)	TGF- β -Signal in Zellkern leitend => Zelldifferenzierung	oder: TGF- β -bedingt APOPTOSE (114)
TAK1 (phosphoryliert an Ser412)	Neutrophilen: hemmt das Zellwachstum, hemmt die proinflammatorische Zytokinausschüttung (IL-6, IL-1 β and TNF- α) und die Produktion von ROS (115)	hemmt NF- κ B (115) = Zellüberlebensfaktor (121), hemmt p38 MAPK (115) => APOPTOSE (123)
ANTI-apoptotische intrazelluläre Mediatoren		
Akt (phosphoryliert an Ser473 => aktiviert)	ANTI-Apoptose (116, 129)	
Survivin (Gesamtkonzentration)	ANTI-Apoptose (117)	
Stresslevelabhängig ANTI-apoptotische intrazelluläre Mediatoren		
HSP27 (phosphoryliert an Ser82 => aktiviert)	Regulation einer erhöhten Widerstandskraft gegen äußere Umwelteinflüsse (118)	
I κ B α (Gesamtkonzentration)	Chronische ROS-Belastung: Hemmt NF- κ B und somit Caspase unabhängige Apoptose (119)	Ohne chron. ROS: Hemmt NF- κ B und somit Zellüberlebensfaktor (121)
p38 MAPK (phosphoryliert an Thr180/Tyr182 => aktiviert)	Monozyten/Makrophagen: Überleben (122), Neutrophilen: Hemmung Apoptose (123), ROS-abhängige NET-Bildung (124)	
TAK1 (phosphoryliert an Ser412)	Makrophagen: steigert p38 MAPK => Überleben (122)	

Intrazelluläre Mediatoren ihrer zellregulatorischen Funktionen nach geordnet: Die für das Zellüberleben ungünstigen, Apoptose regulierenden Proteine sind „dunkelgrau“, die für das Überleben günstigen, Antiapoptose regulierenden „hellgrau“ und die zellregulatorischen „weiß“ hinterlegt. „Kontextabhängig PRO-apoptotisch“ bedeutet, dass diese Mediatoren stresslevel- bzw. mediatorlevelabhängig entweder regulatorisch oder apoptotisch wirken können. Die „hellgraue“ Hinterlegung zeigt zellprotektive und die „dunkelgraue“ zellbelastende Regulationen an. Diese Funktionseinteilung dient einer besseren Übersicht und hat nicht den Anspruch, der tatsächlichen Funktionskomplexität der aufgeführten Mediatoren im Organismus vollständig gerecht zu werden. Unter „Modifikation“ ist beschrieben, ob die Proteine in ihrer aktivierten Form oder in ihrer Gesamtkonzentration gemessen worden ist. Hierzu ist ggf. aufgeführt, an welcher/n Aminosäure/n die untersuchten Proteine durch welchen Vorgang aktiviert wurden. Asp - Asparaginsäure; Ser - Serin; Thr - Threonin; Tyr - Tyrosin.

darin aufgeführt. Als Normierungsfaktor dienten bei allen folgenden Ergebnissen der Signalkaskadenproteinanalysen die entsprechenden Positivkontrollen des Kits. Die analysierten Kaskadenproteine liegen in ihrer Gesamtmenge oder in ihrer aktivierten Form sei es durch Spaltung, sei es durch Phosphorylierung vor (vgl. Tabelle 21). Im

Fließtext wird nicht gesondert auf die Art ihrer Aktivierung hingewiesen. Im Ergebnisteil sind nur diese Signalkaskadenproteine aufgeführt, deren Proteinspiegel zumindest in einer Spendergruppe oberhalb der errechneten Nachweisgrenze von 10% des Normierungsfaktors lagen.

Bei der vergleichenden Analyse der Kaskadenproteine von **jungen und alten gesunden Spendern** fiel auf, dass die Granulo-/Monozyten im Alter einen deutlich geringeren Spiegel an den proapoptotischen Caspase-3 und Caspase-7 (jeweils signifikant mit $***p < 0,001$) (*Abb. 8a*) sowie an den kontextabhängig proapoptotischen SAPK/JNK, Smad2 (jeweils signifikant mit $***p < 0,001$) und TAK1 (nichtsignifikant) (*Abb. 8b*) aufwiesen. Caspase-7 und SAPK/JNK lagen dabei bei der alten gesunden Spendergruppe unterhalb der errechneten Nachweisgrenze. Verglichen mit den jungen gesunden Spendern zeigte sich bei den alten gesunden ein signifikant geringere Spiegel des NF- κ B hemmenden I κ B α ($*p < 0,05$, alt gesund unterhalb der Nachweisgrenze) (*Abb. 8c*). Hierbei ist die Rolle des NF- κ B bei einer in der Literatur beschriebenen chronischen erhöhten ROS im Alter hinsichtlich eines pro- bzw. antiapoptotischen Einflusses zu diskutieren (*45, 119, 121*). Weiter lagen das an der zellulären Widerstandskraft gegen stressbedingte äußere Einflüsse beteiligte HSP27 lediglich bei den jungen Gesunden oberhalb der Nachweisgrenze. Bei allen Spendergruppen lagen Akt, Survivin, Chk1, Chk2, p53 und p38 MAPK allesamt unter der Nachweisgrenze, waren daher nicht verwertbar und sind nicht dargestellt.

Verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe zeigten sich bei **jungen Menschen mit Fraktur** generell bei allen untersuchten Signalkaskadenproteinen niedrigere intrazelluläre Proteinspiegel (die proapoptotischen Caspase-3 und -7 (je $*p < 0,05$) (*Abb. 8a*); die kontextabhängig proapoptotischen SAPK/JNK ($***p < 0,001$), Smad2 ($***p < 0,001$) und TAK1 ($***p < 0,001$) (*Abb. 8b*); die stresslevelabhängig antiapoptotischen HSP27 ($**p < 0,01$) und I κ B α ($***p < 0,001$). Bis auf Caspase-3 und TAK1 lagen dabei alle anderen Proteinkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Die proapoptotischen Kaskadenproteine scheinen unter allen Spendern am deutlichsten herunterreguliert.

Verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich **bei alten Menschen mit Fraktur** hingegen keine generelle Erniedrigung der Mediatorspiegel. Denn hierbei lagen einige typisch/potenziell proapoptotische Mediatoren (Caspase-3 signifikant mit

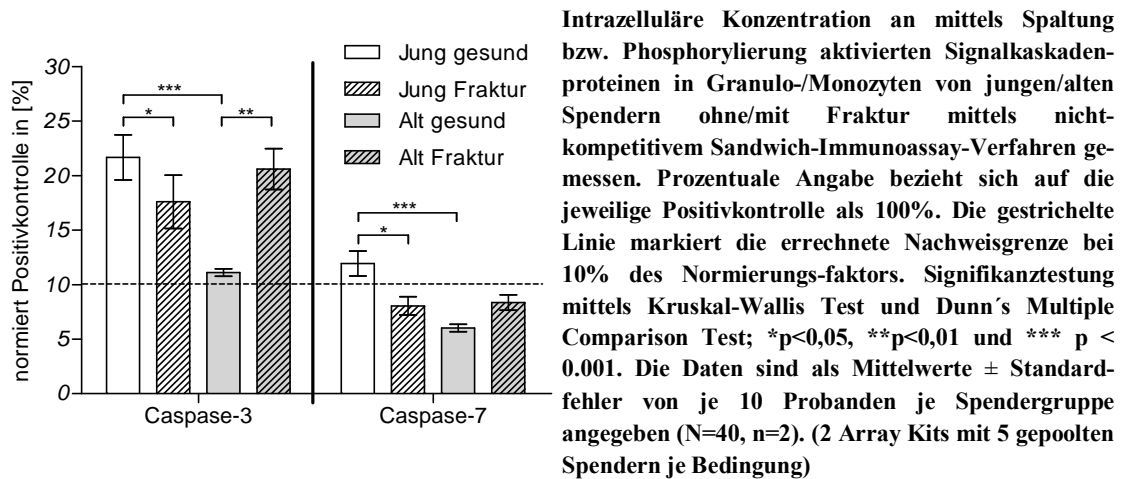


Abbildung 8a: Intrazelluläre Konzentration der PRO-apoptotischen Caspase-3 (gespalten) und Caspase-7 (gespalten)

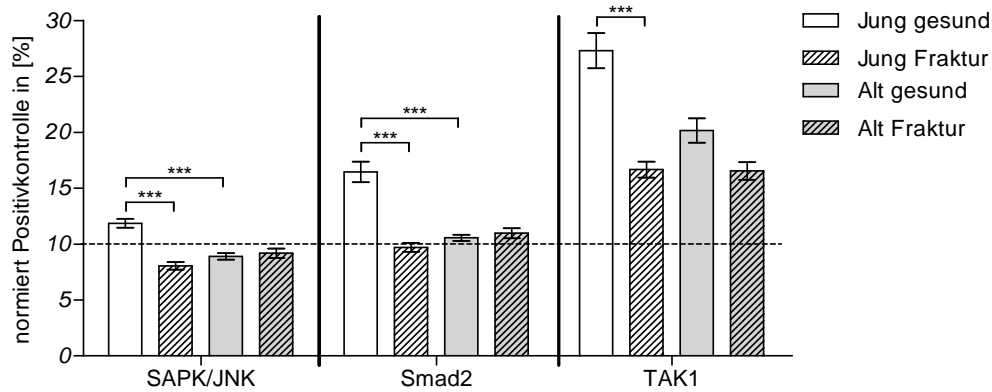


Abbildung 8b: Intrazelluläre Konzentration der kontextabhängig PRO-apoptotischen SAPK/JNK (phosphoryliert), Smad2 (phosphoryliert) und TAK1 (phosphoryliert)

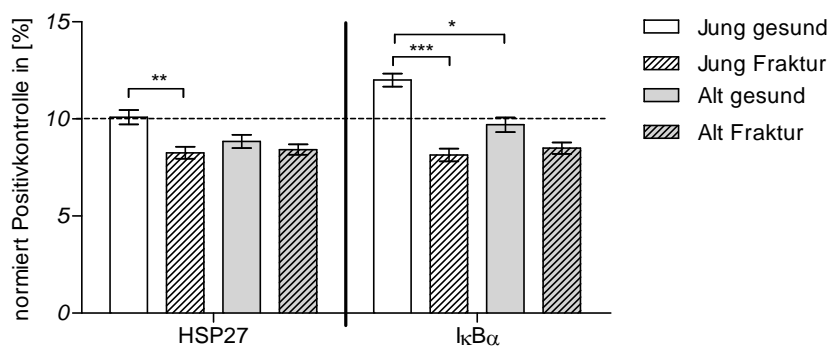


Abbildung 8c: Intrazelluläre Konzentration der stresslevelabhängig ANTI-apoptotischen HSP27 (phosphoryliert) und IκBα (insgesamt)

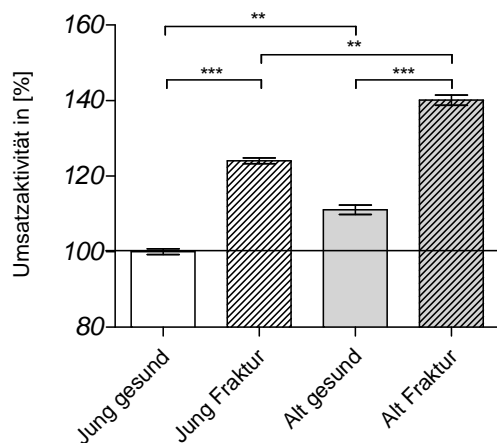
Abbildung 8a-c: Alters-/gesundheitsabhängige intrazelluläre Konzentration verschiedener Signalkaskadenproteinen in Granulo-/Monozyten

** $p < 0,01$ und Caspase-7, SAPK/JNK sowie Smad2 tendenziell (*Abb. 8a/b*)) erhöht vor. Alle anderen untersuchten Proteinspiegel (TAK1, HSP27 und I κ B α) waren im Alter entsprechend der jungen Spendergruppe im Zustand nach Fraktur tendenziell erniedrigt (*Abb. 8b/c*). Der intrazelluläre Proteinspiegel unterschied sich hierbei jedoch anders als bei den jungen Spendern im Alter z.T. kaum bzw. in deutlich geringerem Maße vom gesunden Zustand. Oberhalb der errechneten Nachweisgrenze lagen lediglich die Proteinkonzentrationen von Caspase-3, Smad2 und TAK1.

3.1.3 Höheres Zellüberleben von Granulo-/Monozyten älterer Spender

Wie in Material und Methoden beschrieben wurden die mitochondrialen Reduktionsraten von Resazurin zu fluoreszente Resorufin 90 Minuten nach Aussaat jeweils gleicher Zellzahlen je Spendergruppe (jung/alt; ohne/mit Fraktur) gemessen, um Rückschlüsse auf eine mögliche alters- bzw. gesundheitsabhängig unterschiedliche Überlebensfähigkeit getesteter Granulo-/Monozyten in diesem Zeitraum ziehen zu können.

In *Abbildung 9* sind die Reduktionsraten der von den vier verschiedenen Spendergruppen stammenden Granulo-/Monozyten vergleichend dargestellt.



Mitochondriale Umsatzaktivität der Granulo-/Monozyten von jungen/alten Spendern ohne/mit Fraktur 90 min nach Aussaat von 64000 Zellen/Well anhand gemessenen fluoreszenten Resorufins. Zellzählung mittels Trypanblau. Junge gesunde Kontrollzellgruppe dient als 100%-Bezug. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je 10 Probanden je Spendergruppe angegeben (N=40, n=4).

Abbildung 9: Alters-/gesundheitsabhängige mitochondriale Umsatzaktivität als Hinweis auf die Viabilität von Granulo-/Monozyten

Der zelluläre Resazurinumsatz junger Gesunder lag im Mittel 11% signifikant unter dem alter Gesunder (** $p < 0,01$) was in Korrelation des in 3.1.2 gezeigten höhere antiapoptotische Verhalten dieser Zellen stehen könnte. Sowohl die Zellen junger mit im Mittel 24% als auch die alter Spender mit im Mittel 29% wiesen bei Frakturgeschehen ein signifikant höheres Level zellulärer Redoxleistung auf als diese

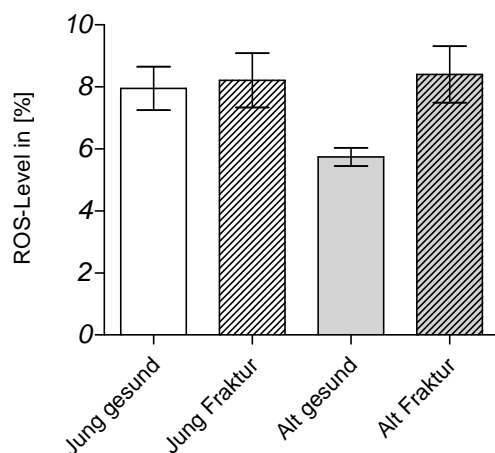
der entsprechenden Kontrollgruppe (jeweils mit $***p < 0,001$). Auch hier ließe sich im Falle der jungen Spender ein Zusammenhang mit den in 3.1.2 festgestellten möglichen antiapoptotischen intrazellulären Mechanismen herstellen. Eine erhöhte Redoxleistung als Parameter für erhöhte Zellviabilität bei alten Spendern mit Fraktur unterstreicht die in 3.1.2 festgestellte proapoptotische intrazelluläre Tendenz dieser Spendergruppe jedoch nicht.

3.1.4 Geringste intrazelluläre ROS-Spiegel bei Granulo-/Monozyten alter gesunder Spender

Abbildung 10 zeigt vergleichend die mithilfe von fluoreszente DCF gemessenen basalen intrazellulären ROS Spiegel der von den unterschiedlichen Spendergruppen (jung/alt; ohne/mit Fraktur) stammenden Granulo-/Monozyten ohne zusätzlichen künstlich induzierten oxidativen Stress durch H_2O_2 . Dadurch sollen mögliche alters- bzw. gesundheitsabhängiger Unterschiede hinsichtlich der basalen intrazellulären Konzentrationen an zelltoxischen ROS detektiert werden.

Ohne zusätzlicher oxidativen Stressinduktion zeigten sich erwartungsgemäß verglichen mit den in 3.2.3 künstlich oxidativ gestressten Zellen nur sehr geringe intrazelluläre Konzentrationen an ROS. Daher ließen sich auch keine signifikanten Höhenunterschiede dieser zwischen den verschiedenen Spendergruppen feststellen.

Bei jungen und alten Spendern mit Fraktur lagen die ROS Spiegel tendenziell höher als bei den jeweiligen gesunden Kontrollgruppen, wobei die Differenz unter den beiden alten Spendergruppen von im Mittel 2% deutlicher war. Die geringste zelluläre ROS-Produktionsrate konnte bei der alten gesunden Spendergruppe festgestellt werden.



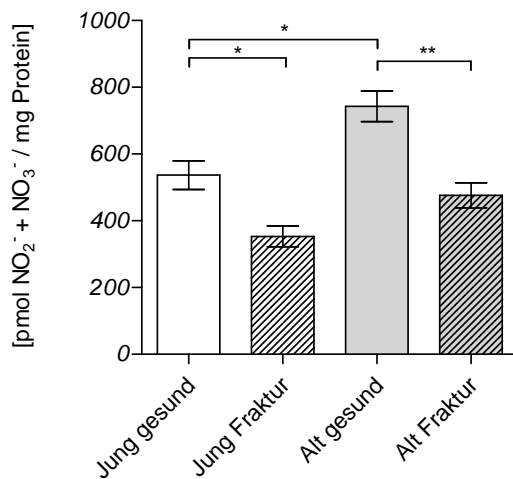
Intrazelluläre Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies in Granulo-/Monozyten von jungen/alten Spendern ohne/mit Fraktur 50 min nach Aussaat von 2000 Zellen/Well anhand gemessenen fluoreszenten DCF-Level. Zellzählung mittels Trypanblau. Junge gesunde künstlich mit H_2O_2 gestresste Kontrollzellgruppe dient als 100%-Bezug (vgl. Kapitel 3.2.3). Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je 10 Probanden je Spendergruppe angegeben (N=40, n=4).

Abbildung 10: Alters-/gesundheitsabhängige intrazelluläre ROS Spiegel in Granulo-/Monozyten

3.1.5 Erhöhte systemische RNS im Alter

Abbildung 11 zeigt die mittels „Griess“-Methode ermittelten Nitrat-/Nitritkonzentration in den Blutseren der verschiedenen Spender (jung/alt; ohne/mit Fraktur) als mögliche Parameter alters-/gesundheitsabhängig differenter nitrosativer Stressgeschehen.

Bei alten Gesunden zeigte sich hierbei eine signifikant höhere Konzentration des Nitrat-/Nitritspiegels als bei jungen Gesunden (mit $*p < 0,05$). Sowohl bei jungen (mit $*p < 0,05$) als auch bei alten (mit $**p < 0,01$) Spendern zeigte sich bei Frakturgeschehen eine verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe signifikant geringere Blutserumkonzentration der möglichen nitrosativen Stressmarker NO_2^- und NO_3^- .



Nitrit- und Nitratkonzentration in Blutseren junger/alter Spender ohne/mit Fraktur mittels „Griess“-Methode gemessen und anhand „Lowry“-Proteinbestimmung normiert. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn’s Multiple Comparison Test; $*p < 0,05$ und $**p < 0,01$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je 10 Probanden je Spendergruppe angegeben (N=40, n=2).

Abbildung 11: Alters-/gesundheitsabhängige Nitrat-/Nitritkonzentration in Blutseren

3.2 Einfluss des Alters auf humane Granulo-/Monozyten im Umgang mit künstlichem oxidativem Stress

Zur Überprüfung des Umgangs der Granulo-/Monozyten von jungen/alten Spendern ohne/mit Knochenfraktur mit oxidativem Stress wurden diese künstlich *in vitro* gestresst. Dazu diente ein Zellmilieu mit 0,03%-igem H_2O_2 -Anteil, welcher in Vorversuchen an den HL-60- und THP-1-Progenitorzelllinien als optimal getestet wurde, um einen versuchstauglichen Grad an Zelltoxizität zu generieren. So wirkte diese toxische H_2O_2 -Konzentration nicht unmittelbar tödlich auf die Zellen und konnte als oxidativer Stressor dieser genutzt werden. Durch diese einheitliche künstliche Stressung sollte herausgefunden werden, ob und wie die je nach Spendergruppe immunologisch und altersbedingt unterschiedlich vorbelasteten Zellen diesen bewältigen konnten.

3.2.1 Mögliche Steigerung einer Gegenregulation apoptotischer Prozesse der Zellen gesunder Spender im Alter

Anhand der aus 3.1.2 bereits bekannten und dort in *Tabelle 21* erläuterten für PRO-Apoptose, ANTI-apoptose bzw. Zellstress typischen Signalkaskadenproteine untersucht dieses Kapitel mögliche alters-/gesundheitsabhängige Unterschiede der intrazellulären Zellprogramme untersuchter Granulo-/Monozyten in der Reaktion auf künstlich induzierten oxidativen zelltoxischen Stress.

Die betrachteten Immunzellen wurden dazu wie in Material und Methoden beschrieben 50 min lang in 0,03%-igem H₂O₂-Milieu gestresst. Zur Normierung der Ergebnisse dienten hierbei die entsprechenden Positivkontrollen des Sandwich-Immunoassay-Kits. Generell betrachtet zeigten sich unter künstlich induziertem oxidativen Stress kaum signifikante Veränderungen der betrachteten intrazellulären Mediatoren (*Abb. 12*).

Während eine Fraktur (vgl. auch 3.1.2) zu einer geringeren apoptotischen Aktivität der Granulo-/Monozyten junger Spender zu führen schien, schien ein akuter oxidativer Stress bei Zellen **junger Gesunder** tendenziell ein proapoptotisches intrazelluläres Verhalten zu bewirken (die typisch/potenziell proapoptotischen Caspase-3/-7, Smad2 hierbei unter H₂O₂ tendenziell erhöht (*Abb. 12a/b*); die potenziell antiapoptotischen IκBα unter H₂O₂ tendenziell erniedrigt (*Abb. 12c*)). Bis auf Smad2 lagen alle weiteren untersuchten kontextabhängig proapoptotischen Mediatoren (SAPK/JNK und TAK1) unter H₂O₂ tendenziell niedriger vor (*Abb. 12b*). Weiter lagen das an der zellulären Widerstandskraft gegen stressbedingte äußere Einflüsse beteiligte HSP27 unter H₂O₂ tendenziell niedriger und die u.a. Apoptose hemmende proinflammatorische p38 MAPK kaum verändert vor.

Wie bereits im ungestressten Zustand verglichen mit der jungen gesunden Kontrollgruppe in 3.1.2 festgestellt, zeigten die betrachteten Immunzellen **junger Spender mit Fraktur** unter oxidativer Stressung abermals eine weitere Herunterregulierung typisch proapoptotischer Signalkaskadenproteine (Caspase-3 und -7 (*Abb. 12a*)). Auffällig waren unter H₂O₂ die signifikanten Anstiege des u.a. potenziell antiapoptotischen IκBα (*p<0,01) und des u.a. apoptosehemmenden Mediators p38 MAPK (**p<0,001) (*Abb. 12d*). Die stressregulierenden SAPK/JNK, Smad2 und HSP27 zeigten sich unter H₂O₂ tendenziell erhöht (*Abb. 12b/c*). Das potenziell apoptotische TAK1 zeigte sich tendenziell erhöht (*Abb. 12b*).

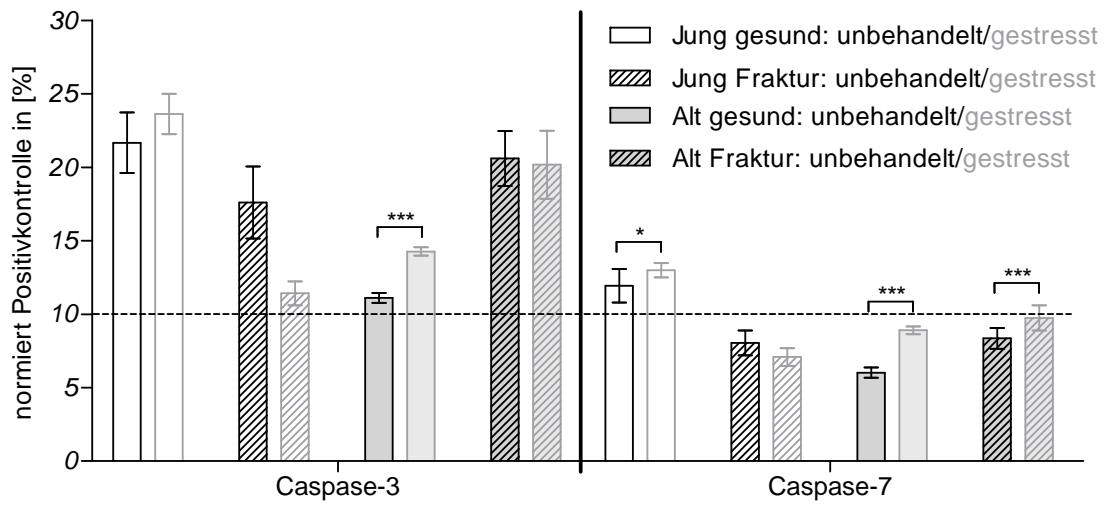


Abbildung 12a: Intrazelluläre Konzentration der PRO-apoptotischen Caspase-3 (gespalten) und Caspase-7 (gespalten)

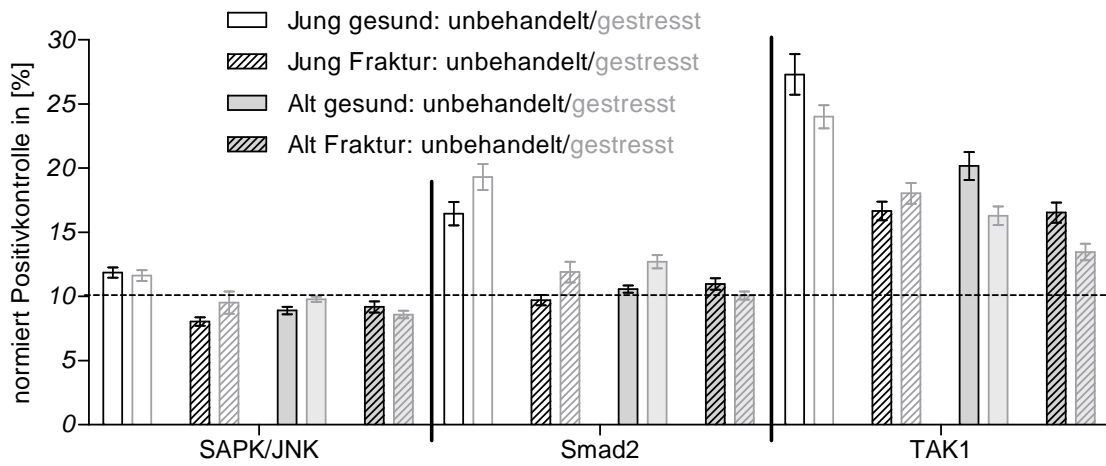


Abbildung 12b: Intrazelluläre Konzentration der kontextabhängig PRO-apoptotischen SAPK/JNK (phosphoryliert), Smad2 (phosphoryliert) und TAK1 (phosphoryliert)

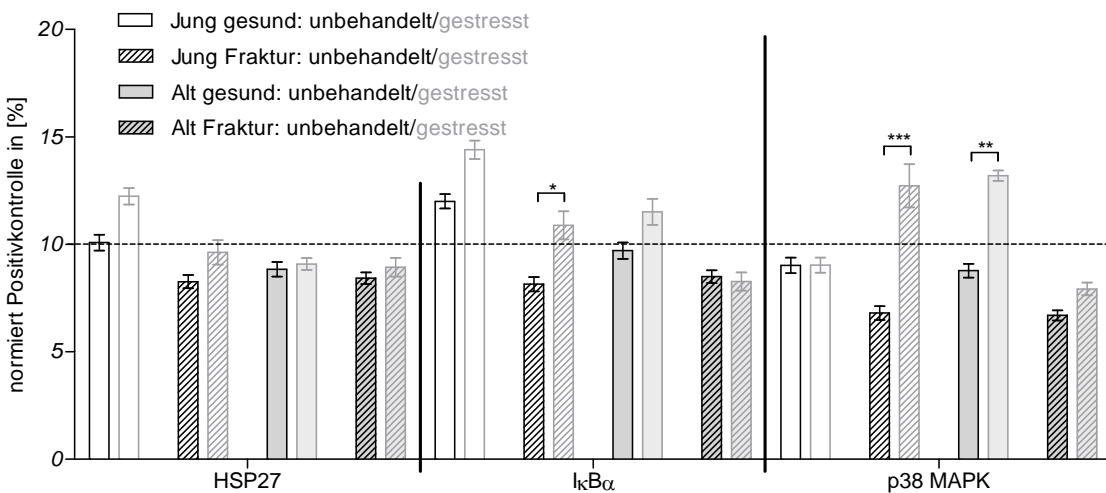


Abbildung 12c: Intrazelluläre Konzentration der stresslevelabhängig ANTI-apoptotischen HSP27 (phosphoryliert), IκBα (insgesamt) und p38-MAPK (phosphoryliert)

Abbildung 12a-c: Einfluss H₂O₂ auf die intrazelluläre Konzentration verschiedener Signalkaskadenproteine in Granulo-/Monozyten in Abhängigkeit zum Alter/Gesundheitszustand der Spender

Einfluss von künstlich induziertem oxidativen Stress (50 min mit H₂O₂) auf die intrazelluläre Konzentration an mittels Spaltung bzw. Phosphorylierung aktivierten Signalkaskadenproteinen in Granulo-/Monozyten von jungen/alten Spendern ohne/mit Fraktur mittels nicht-kompetitivem Sandwich-Immunoassay-Verfahren gemessen. Prozentuale Angabe bezieht sich auf die jeweilige Positivkontrolle als 100 %. Die gestrichelte Linie markiert die errechnete Nachweisgrenze bei 10% des Normierungsfaktors. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; *p<0,05, **p<0,01 und *** p < 0.001. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler von je 10 Probanden je Spendergruppe angegeben (N=40, n=2). (2 Array Kits (Cell Signaling Technology Array Kit Nr.: #12856) mit 5 gepoolten Spendern je Bedingung)

Die Zellen **alter gesunder Spender** zeigten unter H₂O₂ eine ähnliche intrazelluläre Heraufregulierung eines proapoptotischen Zellprogramms wie es im ungestressten Zustand bei Fraktur verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe der Fall war (vgl. 3.1.2). Einen auffälligen Unterschied bildeten hierbei allerdings die unter H₂O₂ deutlich heraufregulierten Spiegel der zellstressregulatorischen potenziell antiapoptotischen Mediatoren IκBα und p38 MAPK (signifikant mit **p<0,01), wie es unter Fraktur nicht der Fall war (*Abb. 12c*). Im Detail zeigten sich erhöhte intrazelluläre Spiegel der typisch proapoptotischen Mediatoren Caspase-3 und -7 (*Abb. 12a*) sowie der kontextabhängig proapoptotischen Mediatoren SAPK/JNK und Smad2 (*Abb. 12b*). Das potenziell apoptotische TAK1 hingegen lag unter H₂O₂ erhöht vor (*Abb. 12b*). Wie bei den jungen Spendern mit Fraktur lagen neben IκBα und p38 MAPK auch das zellstressregulatorische HSP27 unter H₂O₂ erhöht vor.

Auch bei den Zellen **alter Spender mit Fraktur** bewirkte die oxidative Stressung eine proapoptotische Zellregulierung. Unter H₂O₂ stieg der Spiegel der typisch proapoptotischen Caspase-7 bei kaum verändertem Caspase-3-Spiegel (*Abb. 12a*). Im Gegensatz zu den unter H₂O₂ gestiegenen Konzentrationen von SAPK/JNK, Smad2 und IκBα bei den gesunden Alten sank diese bei denen mit Fraktur unter H₂O₂. Die potenziell apoptotische TAK1 sank unter H₂O₂ (*Abb. 12a*). Vergleichbar der gesunden Kontrollgruppe lagen HSP27 und p38 MAPK in höherer Konzentration vor (*Abb. 12c*).

3.2.2 Höhere Überlebensrate der Zellen gesunder Spender im Alter

Dieses Kapitel untersucht mögliche alters-/gesundheitsabhängige Unterschiede der mitochondrialen Umsatzaktivität untersuchter Granulo-/Monozyten unter künstlich induziertem oxidativen Stress mit H₂O₂. Das soll dazu dienen, Rückschlüsse auf deren oxidative Belastbarkeit hinsichtlich ihrer Überlebensrate in Abhängigkeit zu Alter und Gesundheitszustand ihrer Spender ziehen zu können.

Nach insgesamt 90-minütiger oxidativer Stressung der Granulo-/Monozyten aller Spendergruppen in 0,03%-igem H_2O_2 -Milieu zeigten diese Zellen anhand gemessenen umgesetzten fluoreszenten Resorufins erwartungsgemäß deutlich geringere mitochondriale Umsatzaktivitäten als die entsprechenden unbehandelten Gruppen (signifikant bei allen vier Spendergruppen mit je $***p < 0,001$) (Abb. 13).

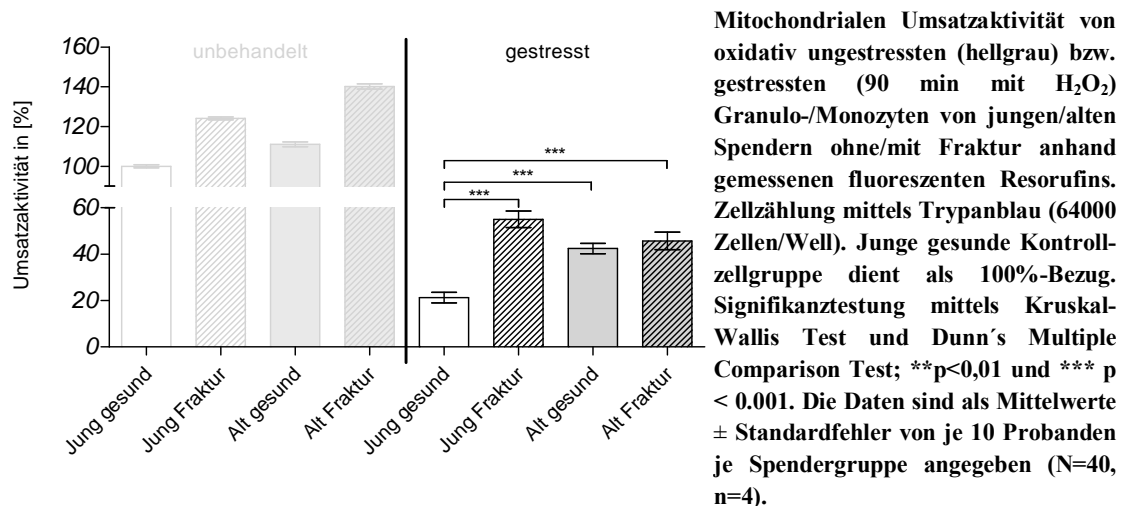


Abbildung 13: Einfluss von H_2O_2 auf die mitochondriale Umsatzaktivität als Hinweis auf die Viabilität von Granulo-/Monozyten in Abhängigkeit zum Alter/Gesundheitszustand der Spender

Dies sprach für eine deutlich geringere Überlebensrate dieser Zellen unter H_2O_2 . Die betrachteten Immunzellen junger Gesunder erbrachten signifikant die geringste zelluläre Reduktionsleistung als Hinweis auf die geringste Überlebensrate (bzgl. „Junge Fraktur“, „Alt gesund“ sowie „Alte Fraktur“ jeweils mit $***p < 0,001$). Die untersuchten Zellen von jungen Spendern mit Fraktur leisteten unter H_2O_2 die höchste Reduktionsrate aller Spendergruppen (bzgl. „Jung gesund“ im Mittel 34% ($***p < 0,001$), bzgl. „Alten gesund“ im Mittel 13% und bzgl. „Alt Fraktur“ im Mittel 9% höher). Verglichen mit der alten Kontrollgruppe wiesen die Zellen alter Spender mit Fraktur unter H_2O_2 nur eine geringfügig höhere Reduktionsleistung auf. Unter oxidativem Stress schienen die Zellen alter gesunder signifikant besser zu überleben als diese junger gesunder Spender.

3.2.3 Altersunabhängige Steigerung zellulärer ROS-Produktion bei Fraktur

Dieses Kapitel untersucht mögliche alters-/gesundheitsabhängige Unterschiede der intrazellulären antioxidative Potenz untersuchter Granulo-/Monozyten unter künstlich induziertem oxidativen Stress mit H_2O_2 .

Die Zellen wurden dazu wie in Material und Methoden beschrieben 30 min mit DCFH-DA Stammlösung inkubiert und weitere 20 min in 0,03%-igem H_2O_2 -Milieu oxidativ

gestresst. Anhand der fluoreszenten DCF-Level konnten die intrazellulär in dieser Zeit entstandenen Raten an ROS gemessen werden. Als Ursache einer niedrig gemessenen intrazellulären ROS-Rate einer Spendergruppe wurden hierbei potente antioxidative Zellmechanismen angenommen und umgekehrt.

Die Zellen junger wie alter durch Fraktur vorbelasteter Spender produzierten in dieser Zeit ein signifikant im Schnitt 13% höheres Level (jeweils $***p < 0,001$) an ROS als diese der jeweiligen gesunden Kontrollgruppe (Abb. 14). Hierbei zeigten sich bei den jungen geringfügig höhere Level als bei den entsprechenden alten Spendergruppen.

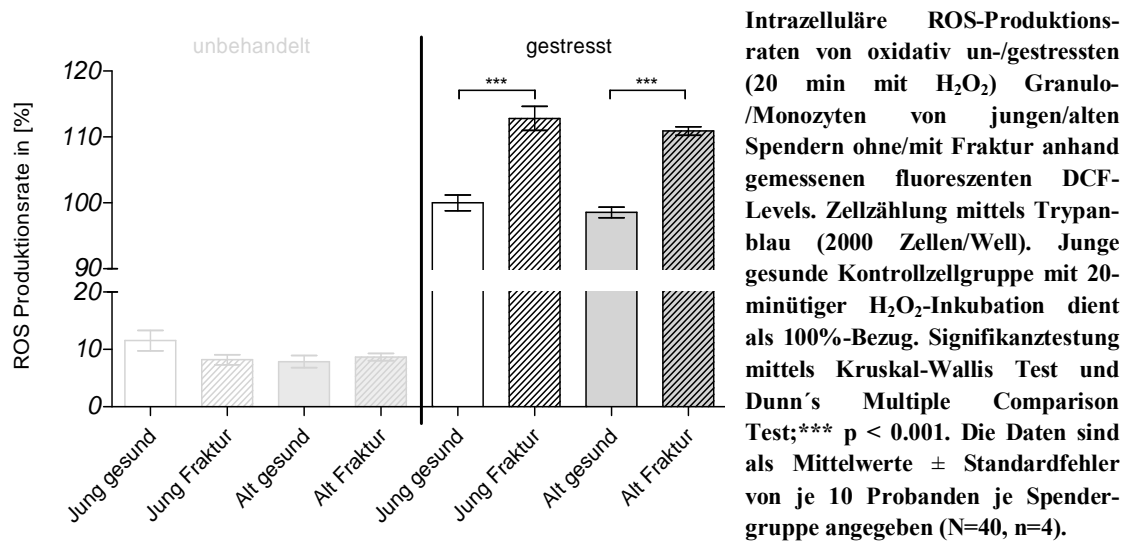


Abbildung 14: Einfluss von H₂O₂ auf die intrazelluläre ROS-Produktionsraten von Granulo-/Monozyten in Abhängigkeit zum Alter/Gesundheitszustand der Spender

3.3 Einfluss von NAC auf humane Granulo-/Monozyten alter Menschen

In auf dieser Dissertationsarbeit aufbauenden klinischen Studien soll als Fernziel der Einsatz von NAC hinsichtlich eines durch eine unterstützte akuten Immunabwehr verbessertes Outcomes alter Menschen im Knochenheilungsprozess untersucht werden.

Dieses Kapitel 3.3 untersucht gemäß der Fragestellung dieser Dissertation, ob sich NAC in seinem antioxidativen Charakter protektiv auf Granulo- und Monozyten alter Menschen mit Bruch der langen Röhrenknochen auswirkt, den Einfluss dieses Medikamentes auf diese Immunzellen *in vitro*. Zum einen wurde dieser Einfluss im Zustand fehlender weiterer künstlicher oxidativer Stressbedingungen, zum anderen im Zustand zusätzlicher künstlicher oxidativer Stressbedingungen in 0,03%-igem H₂O₂-Milieu untersucht.

3.3.1 Erhöhung des intrazellulären Glutathionspiegels oxidativ ungestresster HL-60-/THP-1-Progenitorzellen

Die in der Literatur beschriebene **direkte antioxidative Wirkung** des synthetischen Antioxidans NAC auf das als oxidativen Stressor verwendete H_2O_2 könnte mitverantwortlich für die gefundene signifikante Herunterregulation der zellulären ROS-Produktion untersuchter HL-60-/THP-1-Progenitorzellen bei Co-Inkubation von NAC zusammen mit H_2O_2 sein (Abb. 15) (38).

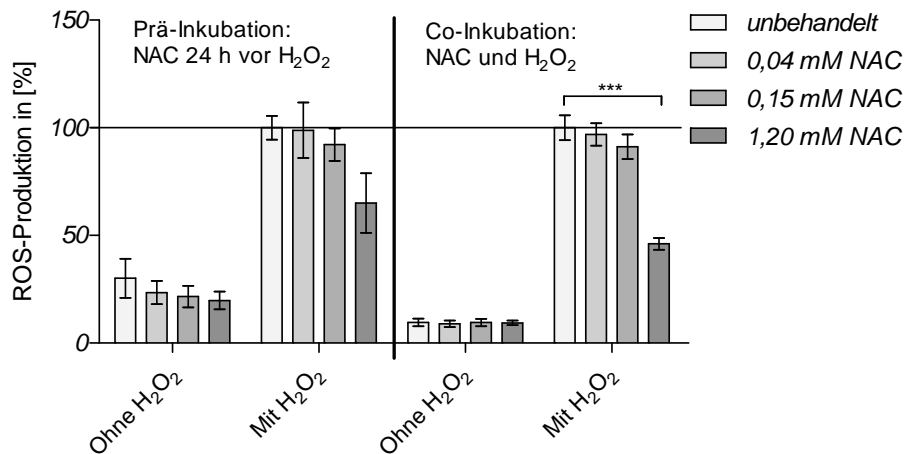


Abbildung 15a: Einfluss von NAC auf die intrazelluläre ROS-Produktionsrate H_2O_2 -gestresster HL-60-Zellen

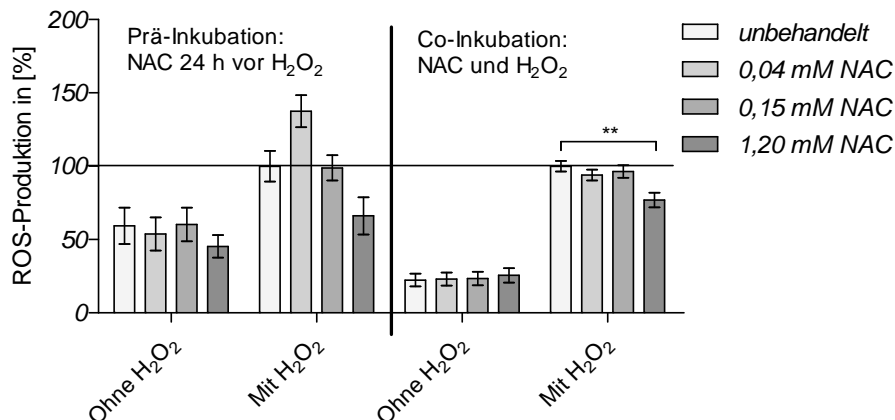


Abbildung 15b: Einfluss von NAC auf die intrazelluläre ROS-Produktionsrate H_2O_2 -gestresster THP-1-Zellen

Abbildung 15a/b: Einfluss von NAC auf die intrazelluläre ROS-Produktionsrate H_2O_2 -gestresster HL-60-/THP-1-Zellen

Intrazelluläre ROS-Produktionsmenge oxidativ gestresster HL-60- bzw. THP-1-Zellen anhand gemessenen fluoreszenten DCF-Levels unter 0,0, 0,04, 0,15 und 1,2 mM NAC 24 h vor sowie zusammen mit der oxidativen Stressung in 0,03%-igem H_2O_2 -Milieu. Zellzählung mittels Trypanblau. Mit oxidativ gestresste Zellgruppe ohne NAC dient als 100%-Bezug. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ (ROS-Produktion unter 1,2 mM im Vergleich zur Kontrolle). Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je drei separat kultivierten HL-60- bzw. THP-1-Zelllinien pro Bedingung angegeben (N=3, n=4).

Denn im Gegensatz zu einem nichtsignifikanten Einfluss von 1,2 mM NAC bei Prä-Inkubation 24 h vor oxidativer Stressung in 0,02%-igem H_2O_2 -Milieu bewirkte die Co-Inkubation von NAC zusammen mit der H_2O_2 -Stressung bei den HL-60- (Abb. 15a) wie auch den THP-1-Zellen (Abb. 15b) eine signifikante Herunterregulierung der intrazellulär anfallenden ROS. Die verwendeten NAC-Konzentrationen entsprechen der errechneten systemischen Blutkonzentration bei Gabe von 1200 mg NAC unter verschiedenen Applikationsformen (oral => 0,04 mM, intravenös => 0,15 mM und maximaler aber unrealistischer Serumpeak ohne First-Pass-Effekt => 1,2 mM) (130-133).

Stellvertretend für die zu untersuchenden humanen Granulo-/Monozyten wird in diesem Kapitel nun wie in Material und Methoden beschrieben mithilfe der HL-60- bzw THP-1-Zellen der bereits in der Literatur beschriebene **intrazelluläre Einfluss** von NAC auf den zelleigenen antioxidativen Glutathionreduktasemechanismus überprüft (74, 134). Cystein ist ein aktiver Metabolit von NAC, einem wichtigen Baustein intrazellulär hergestellten Glutathions (γ -glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH) (47, 135). Sowohl bei den HL-60- (Abb. 16a) wie auch bei den THP-1-Zellen (Abb. 16b) zeigte sich zwei Stunden nach Gabe von 1,0 mM NAC ein verglichen mit dem jeweiligen unbehandelten

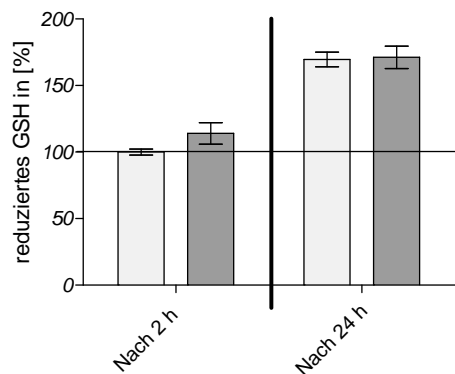


Abbildung 16a: Einfluss von NAC auf den GSH-Spiegel von HL-60-Zellen

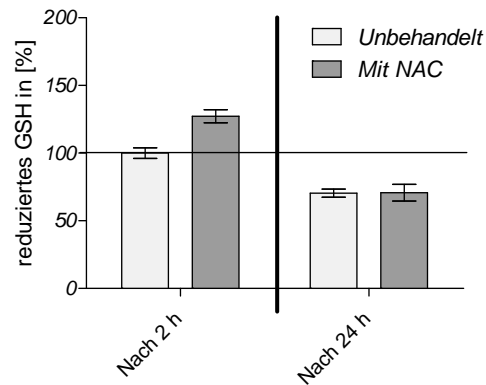


Abbildung 16b: Einfluss von NAC auf den GSH-Spiegel von THP-1-Zellen

Abbildung 16a/b: Einfluss von NAC auf den intrazellulären Glutathionspiegel in HL-60- bzw. THP-1-Zellen

Intrazellulärer Glutathionspiegel von HL-60- bzw. THP-1-Zellen anhand gemessener fluoreszenter Thionitrobenzoesäure (TNB) jeweils 2 und 24 h nach Inkubation mit 0,00 und 1,00 mM NAC. Anhand „Lowry“-Proteinbestimmung normiert. Kontrollzell-gruppe ohne NAC-Behandlung dient als 100%-Bezug. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; **p<0,01. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je drei separat kultivierten HL-60- bzw. THP-1-Zelllinien pro Bedingung angegeben. (N=3, n=3)

Zustand tendenziell höherer intrazellulärer Spiegel an reduziertem GSH. Nach weiteren 22 Stunden stiegen die GSH-Spiegel der HL-60-Zellen unter allen getesteten

Bedingungen um durchschnittlich ca. 50% weiter, während diese der THP-1-Zellen im Durchschnitt sanken (geringere Teilungsrate dieser monozytären Zelllinie). Der anfängliche Anstieg der intrazellulären Glutathionspiegel beider Zellarten unter 1 mM NAC schien sich nach einem Tag wieder zurückgebildet zu haben.

3.3.2 Proapoptotischer Einfluss bei Gesundheit, antiapoptischer bei Fraktur

Zur Überprüfung eines möglichen zellprotektiven Einflusses von NAC auf die untersuchten Granulo-/Monozyten in Abhängigkeit zu Alter und Gesundheitszustand der Spender wurde der Einfluss von 1 mM NAC auf deren intrazellulären Spiegel der in Kapitel 3.1.2 in *Tabelle 21* erläuterten für Apoptose bzw. Zellstress typischen intrazellulären Signalkaskadenproteine untersucht.

Die Granulo-/Monozyten **junger gesunder Spender** zeigten unter 1 mM NAC tendenziell niedrigere Spiegel der typisch proapoptotischen Caspasen-3 und -7 (unterhalb der Nachweisgrenze) (*Abb. 17a*) aber auch der potentiell proapoptotischen Kaskadenproteine SAPK/JNK, Smad2 und TAK1 (*Abb. 17b*). Die potentiell antiapoptotischen HSP27 und I κ B α (**p<0,01) lagen jedoch ebenfalls unter NAC erniedrigt vor (jeweils unterhalb der Nachweisgrenze) (*Abb. 17c*).

Verglichen mit der jungen gesunden lag bei der **jungen erkrankten Spendergruppe** unter NAC eine deutlichere Herunterregulierung der typisch proapoptotischen Caspase-3 (*Abb. 17a*) vor. Die Rolle der heraufregulierten potenziell proapoptotischen Kaskadenproteine SAPK/JNK (**p<0,001), Smad2 (**p<0,001) und TAK1 (**p<0,01) unter NAC (jeweils oberhalb der Nachweisgrenze) (*Abb. 17b*) muss in diesem Zusammenhang diskutiert werden. Das zellschützende HSP27 (**p<0,001) sowie der potenziell antiapoptotische I κ B α (**p<0,001) (jeweils oberhalb der Nachweisgrenze) (*Abb. 17c*) lagen unter NAC im Sinne eines antiapoptotischen Prozesses wiederum erhöht vor.

Bei **alten gesunden** zeigten sich unter NAC höherer Spiegel der potenziell/typisch proapoptotischen Mediatoren Caspase-3, SAPK/JNK (oberhalb der Nachweisgrenze, *p<0,05), Smad2 und TAK1 (*Abb. 17a/b*)). Neben dieser proapoptotischen Tendenz lag jedoch auch der Spiegel des potenziell antiapoptotischen I κ B α erhöht vor (oberhalb der Nachweisgrenze) (*Abb. 17c*).

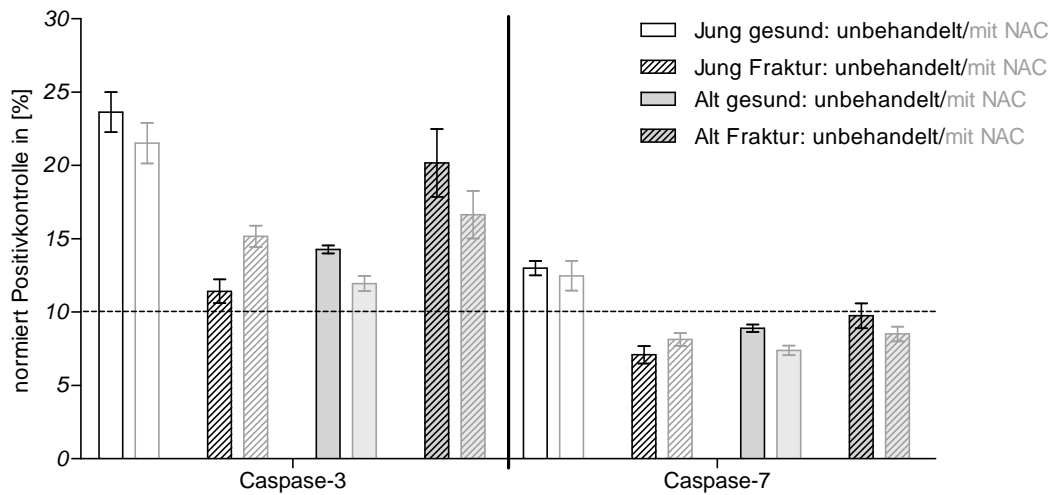


Abbildung 17a: Intrazelluläre Konzentration der PRO-apoptischen Caspase-3 (gespalten) und Caspase-7 (gespalten)

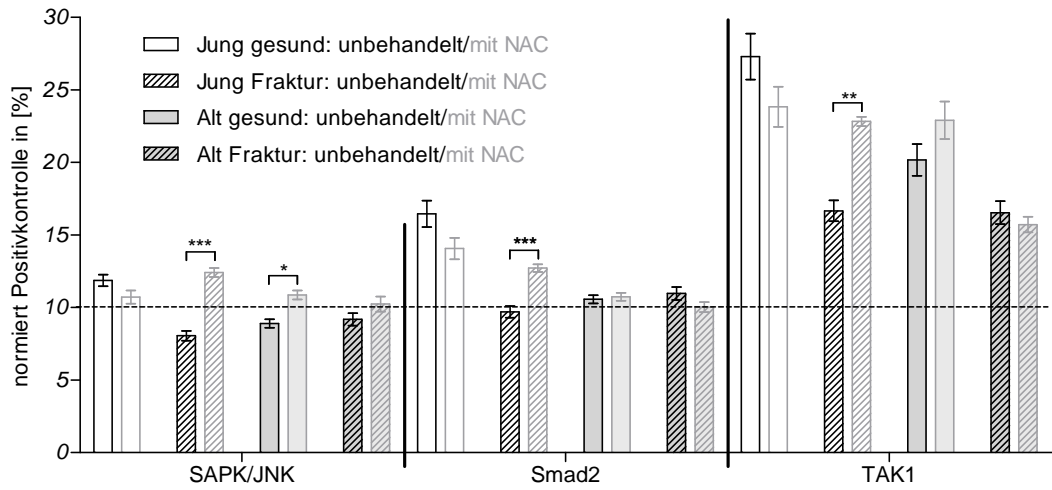


Abbildung 17b: Intrazelluläre Konzentration der kontextabhängig PRO-apoptischen SAPK/JNK (phosphoryliert), Smad2 (phosphoryliert) und TAK1 (phosphoryliert)

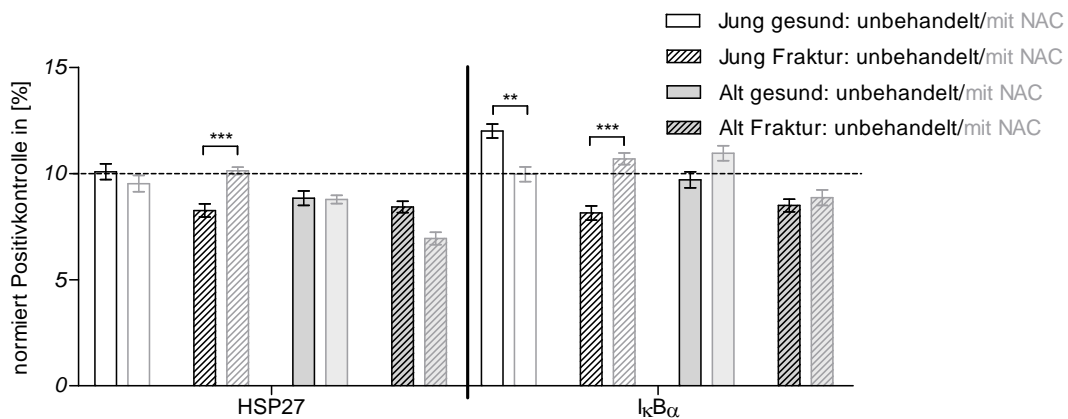


Abbildung 17c: Intrazelluläre Konzentration der stresslevelabhängig ANTI-apoptischen HSP27 (phosphoryliert) und IκBα (insgesamt)

Abbildung 17a-c: Einfluss von NAC auf die intrazelluläre Konzentration verschiedener Signalkaskadenproteine in Granulo-/Monozyten in Abhängigkeit zum Alter/Gesundheitszustand der Spender

Einfluss von 1 mM NAC (50 min Inkubation) auf die intrazelluläre Konzentration an Signalkaskadenproteinen in Granulo-/Monozyten von jungen/alten Spendern ohne/mit Fraktur mittels nicht-kompetitivem Sandwich-Immunoassay-Verfahren gemessen. Prozentuale Angabe bezieht sich auf die jeweilige Positivkontrolle als 100%. Die gestrichelte Linie markiert die errechnete Nachweisgrenze bei 10% des Normierungsfaktors. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0.001$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je 10 Probanden je Spendergruppe angegeben (N=40, n=2). (2 Array Kits (*Cell Signaling Technology Nr.: #12856*) mit 5 gepoolten Spendern je Bedingung)

Die untersuchten Zellen **alter Spender mit Fraktur** zeigten unter Einfluss von 1 mM NAC geringfügig niedrigere Spiegel der potenziell/typisch proapoptotischen Kaskadenproteine Caspase-3, Smad2 und TAK1 (*Abb. 17a/b*). Die potenziell proapoptotische SAPK/JNK lag unter NAC leicht erhöht oberhalb der Nachweisgrenze vor (*Abb. 17b*).

3.3.3 Gesundheitsunabhängig antiapoptotischer Einfluss bei oxidativem Stress

Auch dieses Kapitel untersucht einen möglichen zellprotektiven Einfluss von NAC auf die untersuchten Granulo-/Monozyten ebenfalls anhand einiger für Apoptose bzw. Zellstress typischer intrazellulärer Signalkaskadenproteine (vgl. *Tabelle 21* aus Kapitel 3.1.2). Im Gegensatz zu vorherigem Kapitel wurden die Zellen hierbei jedoch zusätzlich zur NAC-Inkubation 50 min mit H_2O_2 oxidativ gestresst. Im Speziellen soll hierdurch überprüft werden, ob und wie die Granulo-/Monozyten in Abhängigkeit zu Alter und Gesundheitszustand der Spender dieses Antioxidans nutzen können.

Auch unter oxidativer Stressung zeigten sich nicht die gewünschten klaren Ergebnisse bzgl. eines pro-/antiapoptotischen intrazellulären Einflusses von NAC auf untersuchte Granulo-/Monozyten.

Hinsichtlich einer antiapoptotischen Tendenz wiesen die oxidativ gestressten Zellen **junger gesunder Spender** unter NAC geringere Spiegel der potenziell/typisch proapoptotischen Mediatoren Caspase-3, Caspase-7 (unterhalb der Nachweisgrenze), SAPK/JNK, Smad2 und TAK1 (*Abb. 18a/b*) bei höherem Spiegel der u.a. antiapoptotischen p38 MAPK (*Abb. 18c*) auf. Hinsichtlich einer proapoptotischen Tendenz zeigten die oxidativ gestressten Zellen unter NAC jedoch auch erniedrigte Spiegel der potenziell antiapoptotischen Mediatoren HSP27 und $I\kappa B\alpha$ (*Abb. 18c*).

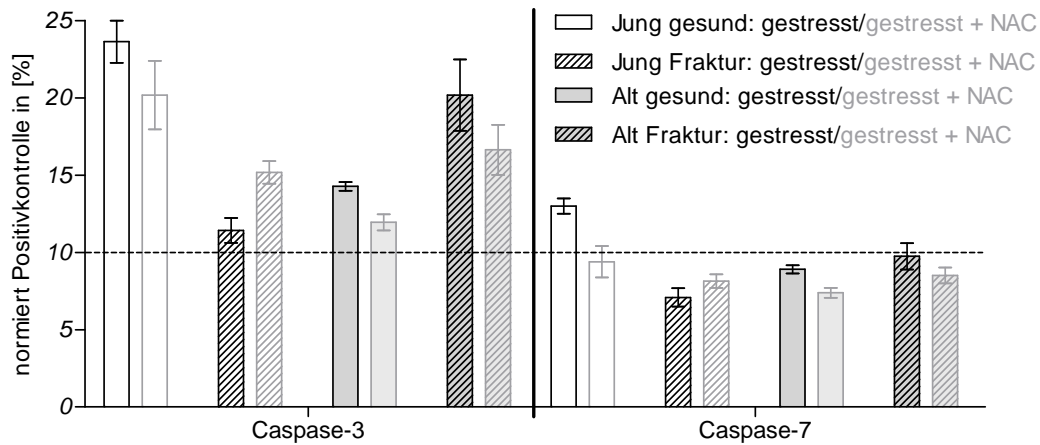


Abbildung 18a: Intrazelluläre Konzentration der PRO-apoptotischen Caspase-3 (gespalten) und Caspase-7 (gespalten) unter oxidativem Stress

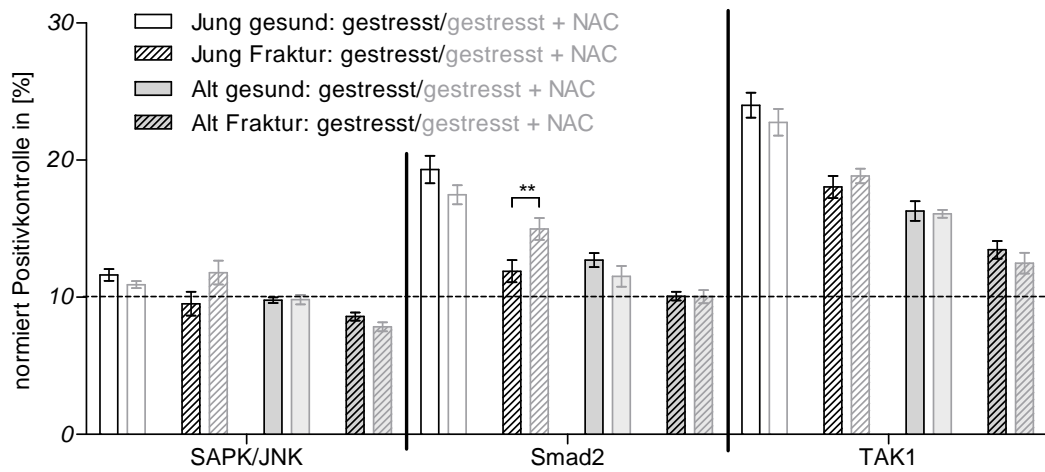


Abbildung 18b: Intrazelluläre Konzentration der kontextabhängig PRO-apoptotischen SAPK/JNK (phosphoryliert), Smad2 (phosphoryliert) und TAK1 (phosphoryliert) unter oxidativem Stress

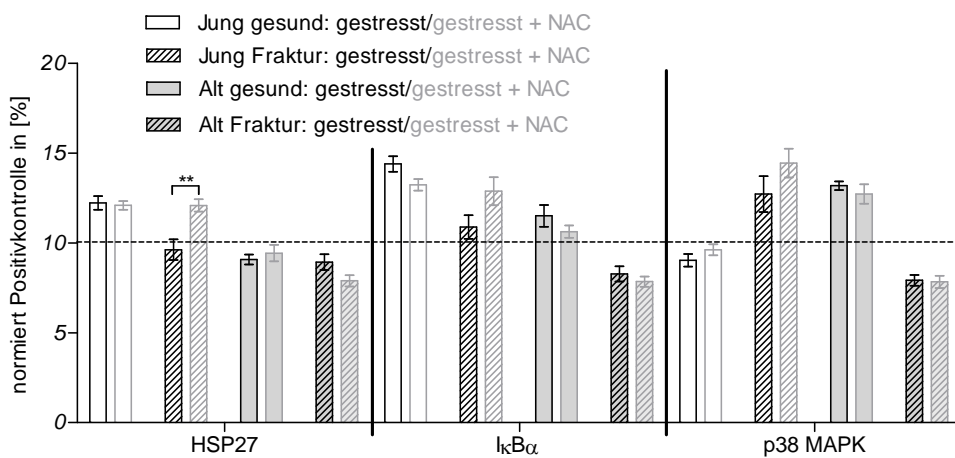


Abbildung 18c: Intrazelluläre Konzentration der stresslevelabhängig ANTI-apoptotischen HSP27 (phosphoryliert), IκBα (insgesamt) und p38 MAPK (phosphoryliert) unter oxidativem Stress

Abbildung 18a-c: Einfluss von NAC auf die intrazelluläre Konzentration verschiedener Signalkaskadenproteine in Granulo-/Monozyten in Abhängigkeit zum Alter/Gesundheitszustand der Spender unter oxidativem Stress

Einfluss von NAC auf die intrazelluläre Konzentration an Signalkaskadenproteinen in oxidativ gestressten Granulo-/Monozyten von jungen/alten Spendern ohne/mit Fraktur mittels nicht-kompetitivem Sandwich-Immunoassay-Verfahren gemessen (50-minütige Co-inkubation 1 mM NAC in 0,03%-igem H₂O₂-Milieu). Prozentuale Angabe bezieht sich auf die jeweilige Positivkontrolle als 100%. Die gestrichelte Linie markiert die errechnete Nachweisgrenze bei 10% des Normierungsfaktors. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; *p<0,05, **p<0,01 und * p < 0.001. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler von je 10 Probanden je Spendergruppe angegeben (N=40, n=2). (2 Array Kits (Cell Signaling Technology Nr.: #12856) mit 5 gepoolten Spendern je Bedingung)**

Die oxidativ gestressten Zellen **junger Spender mit Fraktur** zeigten unter NAC im Gesamten ein erhöhtes Level aller betrachteten Signalkaskadenproteine, woraus sich auch hier keine klaren Tendenzen hinsichtlich eines zellulären Apoptoseverhaltens ableiten ließen (Abb. 18a-c). Mit jeweils **p<0,01 waren hierbei die stressregulatorischen Proteine Smad 2 und HSP27 signifikant erhöht.

Hinsichtlich einer antiapoptotischen Tendenz wiesen die oxidativ gestressten Zellen **alter gesunder Spender** unter NAC geringere Spiegel der potenziell/typisch proapoptotischen Mediatoren Caspase-3, Smad2 und TAK1 (Abb. 18a/b) auf. Hinsichtlich einer proapoptotischen Tendenz zeigten die oxidativ gestressten Zellen unter NAC jedoch auch leicht niedrigere Spiegel der potenziell antiapoptotischen Mediatoren IκBα und p38 MAPK (Abb. 18c).

Unter NAC wiesen die oxidativ gestressten Granulo-/Monozyten **alter Spender mit Fraktur** hinsichtlich der für Pro- bzw. Antiapoptose typischen Signalkaskadenproteinen eine antiapoptotische Tendenz auf. So zeigten sich unter NAC niedrigerer Spiegel der typisch/potenziell proapoptotischen Mediatoren Caspase-3 (Abb. 18a), SAPK/JNK, Smad2 und TAK1 (Abb. 18b) auf. Im Sinne einer proapoptotischen Tendenz fielen jedoch unter NAC auch ein verringertes zellprotektiv wirkendes HSP27 sowie verringerte Spiegel der potenziell antiapoptotischen Mediatoren IκBα und p38 MAPK (Abb. 18c) auf.

3.3.4 Gesteigerte Überlebensrate bei Fraktur

Abbildung 19 zeigt den Einfluss einer 90-minütigen Inkubation mit 0,5 mM bzw. 1 mM NAC auf die mitochondriale Umsatzaktivität als Hinweis auf die Überlebensrate untersuchter isolierter Granulo-/Monozyten von jungen/alten Spendern ohne/mit Fraktur. Diese befanden sich zum einen im oxidativ ungestressten zum andern im

oxidativ gestressten Zustand (in 0,03%-igem H_2O_2 -Milieu). Diese Umsatzaktivität wurde wie in Material und Methoden beschrieben mithilfe der Rate an reduziertem Resazurin gemessen.

Gesamt betrachtet ließ sich bei fehlender zusätzlicher oxidativer Stressung bei beiden Altersgruppen unter 0,5 mM NAC ein vergleichbarer positiver Einfluss auf die zellulären Überlebensraten feststellen. Unter 1 mM NAC zeigte sich jedoch bei den Zellen alter gesunder Spender im Gegensatz zu allen andern Spendergruppen ein negativer Einfluss auf das zelluläre Überleben. Die herabgesetzte Überlebensrate unter 1 mM NAC könnte in einem möglichen Zusammenhang mit dem in Kapitel 3.4.1 gefundenen Hinweis auf eine proapoptischen intrazelluläre Aktivität der Zellen alter gesunder Spender unter dieser NAC-Konzentration stehen. Während diesbezüglich die Reduktionsraten bei jungen und alten erkrankten Spendern korrelierend mit den verwendeten NAC-Konzentrationen von 0,5 mM und 1 mM anstiegen, zeigte sich außerdem bei der gesunden jungen Spendergruppe unter 1 mM ein geringerer Anstieg der Überlebensraten als unter der geringeren Konzentration von 0,5 mM.

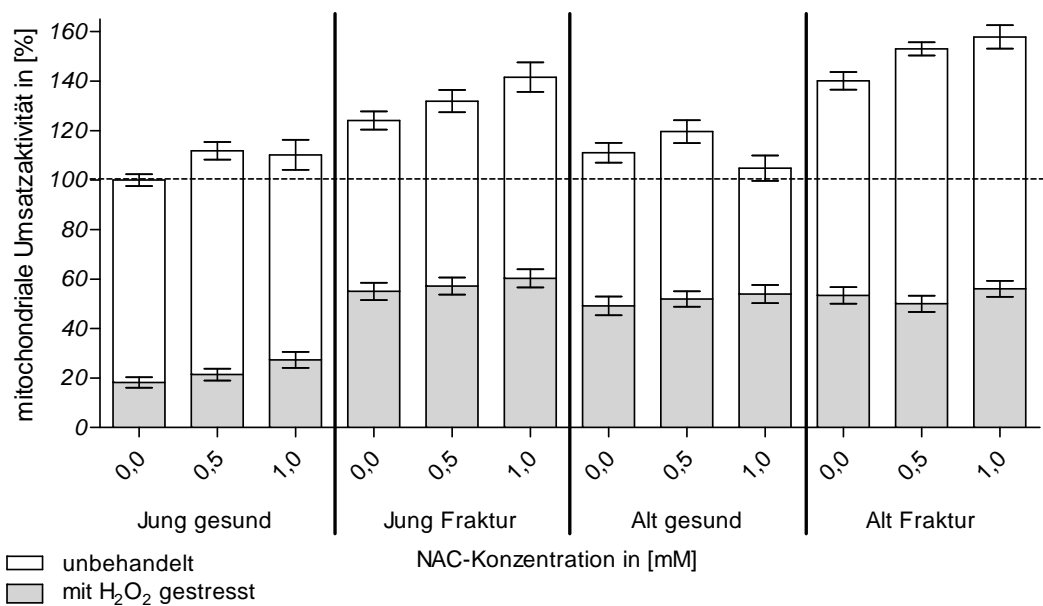


Abbildung 19: Alters-/gesundheitsabhängiger Einfluss von NAC auf die mitochondriale Umsatzaktivität als Hinweis auf die Viabilität von oxidativ un-/gestressten Granulo-/Monozyten

Einfluss von NAC auf die mitochondriale Umsatzaktivität von oxidativ un-/gestressten Granulo-/Monozyten von jungen/alten Spendern ohne/mit Fraktur anhand gemessenen fluoreszenten Resorufins (90 minütige Co-inkubation von 0,5 und 1 mM NAC in 0,03%-igem H_2O_2 -Milieu). Zellzählung mittels Trypanblau (64000 Zellen/Well). Junge gesunde Kontroll-zellgruppe dient als 100%-Bezug. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; keine Signifikanzen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je 10 Probanden je Spendergruppe angegeben (N=40, n=4).

Der künstlich induzierte oxidative Stress senkte als Hinweis auf ein toxisitätsbedingtes zelluläres Sterben erwartungsgemäß bei allen Spendergruppen die mitochondrialen Reduktionsraten von Resazurin. Bis auf die Zellen alter Spender mit Fraktur zeigte die Zellen aller anderen Spender einen mit der NAC-Konzentration korrelierenden nichtsignifikanten Anstieg ihrer Überlebensraten. Denn unter 0,5 mM NAC zeigten die Zellen alter Spender mit Fraktur eine verglichen mit dem unbehandelten Zustand geringere mitochondriale Umsatzaktivität.

Gesamt betrachtet zeigten die Zellen junger gesunder Spender unter allen Bedingungen eine verglichen mit allen anderen Spendergruppen deutlich geringere zelluläre Reduktionsleistung (vgl. Kapitel 3.1.3).

3.3.5 Erhöhung intrazellulärer ROS bei Gesunden

Abbildung 20 zeigt den Einfluss einer 20-minütigen Inkubation von 0,5 mM bzw. 1 mM NAC auf die Produktionsraten zelltoxischer ROS seitens der von den vier verschiedenen Spendergruppen stammenden Granulo-/Monozyten. Diese befanden sich zum einen im oxidativ ungestressten zum andern im oxidativ gestressten Zustand. Dazu wurden diese wie in Material und Methoden beschrieben 30 min mit DCFH-DA Stammlösung inkubiert und weitere 20 min in 0,02%-igem H₂O₂-Milieu oxidativ gestresst. Anhand der fluoreszenten DCF-Level konnten die intrazellulär in dieser Zeit entstandenen Raten an ROS gemessen werden.

Wie zu erwarten, lag der Gesamtspiegel zellulär produzierter ROS unter H₂O₂ erwartungsgemäß deutlich höher als im ungestressten Zustand. Gesamt betrachtet zeigte sich bezüglich der zellulären ROS-Produktionsrate ein der in vorherigem Kapitel beschriebenen mitochondrialen Umsatzaktivität als Hinweis auf das Zellüberleben komplementär entgegengesetztes zelluläres Verhaltensmuster: Während sich unter oxidativer Stressung mit steigender Höhe zugegebener NAC-Konzentration ein tendenzieller Anstieg der zellulären Überlebensraten zeigte, zeigte sich bei allen Spendergruppen ein Abfall der intrazellulären ROS-Produktionsraten. So bewirkte die Gabe von 0,5 mM NAC bei den gesunden Spendergruppen eine Reduktion der ROS-Produktionsraten von im Schnitt 13% (jung nichtsignifikant, alt signifikant mit ***p<0,001), bei den erkrankten Spendergruppen von im Schnitt 17% (jeweils mit ***p<0,001). Die Gabe von 1 mM NAC bewirkte bei den gesunden Spendergruppen eine signifikante Reduktion von im Schnitt 27% (jeweils mit ***p<0,001), bei den

erkrankten Spendergruppen von im Schnitt 37% (jeweils mit *** $p < 0,001$). Die ROS-Produktionsraten der Zellen beider junger lagen unter allen NAC-Konzentrationen tendenziell höher vor als bei den entsprechenden alten Spendergruppen.

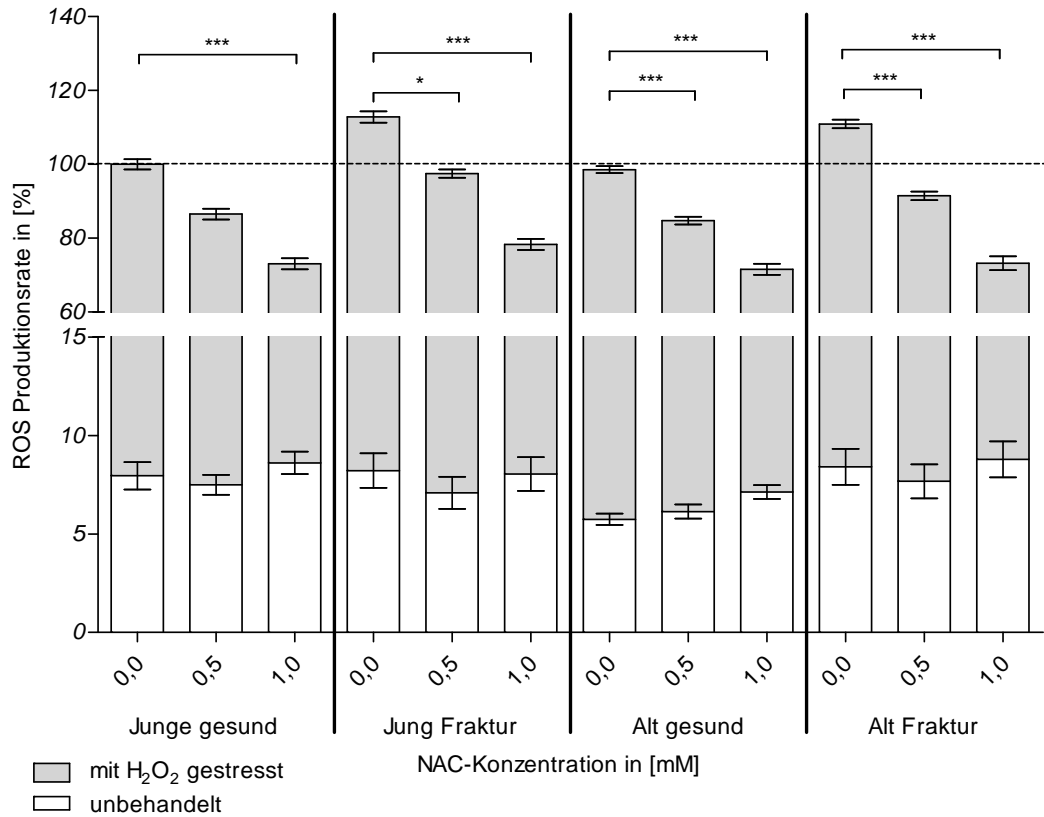


Abbildung 20: Alters-/gesundheitsabhängiger Einfluss von NAC auf die intrazellulären ROS-Produktionsraten von oxidativ un-/gestressten Granulo-/Monozyten

Einfluss von NAC auf die intrazellulären ROS-Produktionsraten von oxidativ un-/gestressten Granulo-/Monozyten von jungen/alten Spendern ohne/mit Fraktur anhand gemessenen fluoreszenten DCF-Levels (20 minütige Co-inkubation von 0,5 und 1 mM NAC in 0,03%-igem H₂O₂-Milieu). Zellzählung mittels Trypanblau (2000 Zellen/Well). Junge gesunde Kontrollzellgruppe mit 20-minütiger H₂O₂-Inkubation dient als 100%-Bezug. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je 10 Probanden je Spendergruppe angegeben (N=40, n=4).

Ohne künstlich induziertem oxidativen Stress zeigten sich erwartungsgemäß deutlich niedrigere intrazelluläre ROS-Raten bei entsprechend geringem Einfluss von NAC. Die Zellen alter gesunder Spender zeigte in Korrelation mit der eingesetzten NAC-Konzentration einen Anstieg intrazellulär anfallender ROS. Das könnte mit dem in 3.3.2 gefundenen tendenziell apoptotischen Zellprogramm bei geringerer Überlebensrate unter NAC zusammenhängen. Verglichen mit dem unbehandelten Zustand zeigten sich bei allen anderen Spendergruppen unter 0,5 mM NAC tendenziell geringere intrazelluläre ROS-Level und unter 1 mM NAC kaum Veränderungen.

4 Diskussion

4.1 Einfluss des Alters auf humane Granulo-/Monozyten und den Spiegel an RNS im Organismus

Im Sinne der in der Einleitung erläuterten „Inflammaging“-Theorie ging diese Arbeit der Hypothese nach, dass die akute Immunabwehr im Alter nicht nur basal aktiver ist, sondern darüber hinaus eine Gewichtung von antiinflammatorischen hin zu proinflammatorischen Prozessen erfährt. Diese Gewichtung wurde hinsichtlich des monozytären Differenzierungsverhaltens anhand von Botenstoffen im Blutserum überprüft, welche für eine proinflammatorische M1-Makrophagenaktivierung bzw. für eine antiinflammatorische M2-Makrophagenaktivierung typisch sind.

Tatsächlich zeigte sich altersbedingt hinsichtlich der untersuchten Botenstoffe eine deutlich höhere inflammatorische Aktivität. Eine altersbedingte Akzentuierung der monozytären Differenzierung hin zu einer proinflammatorischen M1-Makrophagenaktivierung konnte jedoch nicht wie erhofft gefunden werden, da bei alten Spendern im Sinne der in der Literatur beschriebenen pro- bzw. antiinflammatorischen Balance sowohl die M1-typischen wie auch die M2-typischen Zytokinkonzentrationen erhöht vorlagen (31).

Im Sinne des „Inflammaging“, des dauerhaft bestehenden basal erhöhten Entzündungsgeschehens im Alter, lagen die Serumkonzentrationen der für eine proinflammatorische M1-Polarisierung typische Mediatoren IL-6, IL-12, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α bereits bei gesunden Alten signifikant höher als in jungen Jahren vor (22, 32, 102). IL-6 wird in der Literatur als eine Art Altersmarker mit beispielsweise damit verbundener schlechter Impfantwort angesehen (136). Das im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe Fraktur bedingt signifikant höhere Level an IL-6 und IL-12 bei jungen wie alten Spendern lässt sich mit hochregulierten proinflammatorischen Prozessen der Heilung begründen (137). Hier scheint ein Frakturgeschehen im Alter zwar eine verglichen mit jungen Spendern geringeren Hochregulation zu bewirken, ein Anpassungsproblem bzgl. der im Knochenheilungsprozess notwendigen Inflammationsaktivierung scheint hier aber nicht zu existieren. Der anders als beispielsweise in *Kim et al. 2011* beschrieben deutlich höhere und nicht niedrigere Spiegel an GM-CSF im Alter ließe sich gut dadurch erklären, dass die Neutrophilen und Monozyten alter Menschen eine geringere Signaltransduktion dieses zellstimulierenden Faktors aufweisen als diese junger

Menschen (20, 138, 139). Um trotzdem einen Effekt bewirken zu können, könnte der Serumspiegel dieses Botenstoffes deshalb deutlich erhöht sein. Für den alten Organismus scheint es jedoch bei Fraktur problematisch zu werden; hier zeigte sich anders als bei den IL-6 und IL-12 keine Steigerung dieses Granulo-/Monozyten stimulierenden Faktors. Auch die Botenstoffkonzentrationen von TNF- α und INF- γ zeigten unter Fraktur anders als bei den jungen Spendern ebenfalls kaum eine Veränderung. Diese inadäquate Anpassung der Zellkommunikation, wie sie in der Literatur als wichtiger Bestandteil der altersbedingten Immunineffizienz diskutiert wird, könnte in diesem Falle den schlechteren Heilungsverlauf alter Menschen bei Fraktur begünstigen (23).

Diese inadäquate Anpassung der proinflammatorischen Immunkomponente an das Frakturgeschehen zeigte sich bei keinem der untersuchten antiinflammatorischen Zytokinen IL-1RA, IL-4, IL-10 und IL-13, die laut *Mantovani et al. 2004* an einer antiinflammatorischen M2-Makrophagenaktivierung beteiligt sind (32). Ein im Falle eines Überwiegen einer mit M2-Polarisierung einhergehenden zytotoxische Typ-II-Reaktion bei Fraktur könnte den alten Organismus durch das Abtöten körpereigener Zellen zusätzlich belasten (140). *Castle et al.* beobachteten in diesem Zusammenhang bereits 1997 hinsichtlich des IL-10 bzw. IL-12 eine verstärkte Typ-II-Immunantwort bei gestörter Hochregulation einer Typ-I-Antwort bei schwachen älteren Pflegeheimbewohnern (141). So könnte diese mit dem Alter und mit chronischen Erkrankungen assoziierte Typ-II-Gewichtung auch Tumorgeschehen begünstigen (23). Bei Fraktur lagen bei jung und alt inflammatorisch bedingt als inflammationsdämpfende Mediatoren die Spiegel an IL-1RA, IL-4 und IL-13 erhöht vor (31, 128). IL-10 als unmittelbar antiinflammatorischer Botenstoff zum Schutz vor inflammatorisch bedingtem Gewebsabbau hingegen wies bei jungen mit Fraktur eine signifikant, bei alten mit Fraktur eine tendenziell geringere Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Im Sinne des „Inflammaging“ wiesen auch die M2-aktivierenden Botenstoffen im Serum alter „gesunder“ Spender einen höheren Spiegel auf als im Serum junger Gesunder (IL-1 RA tendenziell und IL-4, IL-10 und IL-13 signifikant). „Immunoneszenz“-bedingt könnte bei „gesunden“ Alten aufgrund des chronischen aktiveren Inflammationsgeschehen eine größere Gefahr für eine überschießende Immunantwort bestehen, was möglicherweise u.a. durch eine im Vergleich zur jungen

Kontrollgruppe signifikant höhere Konzentration an IL-10 verhindert werden soll (142, 143). Bei einem Heilungsgeschehen sollte die Balance zwischen überschießendem und unzureichendem Inflammationsgeschehen gehalten werden (31). Die bereits bei einer Anzahl von 10 Spendern gefundene inadäquatere proinflammatorische Immunregulierung bei Fraktur im Alter könnte u.a. Ursache eines erhöhten Komplikationsrisikos im Heilungsverlauf (Lungenentzündung, Sepsis etc.) sein (15). Die in der Literatur beschriebene geringere Signaltransduktion von Zytokinen bei Granulo-/Monozyten alter Spender könnten diese Inadäquanz zusätzlich potenzieren (20). Hinsichtlich einer proinflammatorischen M1- bzw. antiinflammatorischen M2-Makrophagenaktivierung wie in Vorarbeiten angenommen hat sich in dieser Arbeit jedoch kein klares altersabhängiges Polarisierungsmuster gezeigt. Dieses anschauliche Polarisierungsmodell in M1- und M2-Makrophagen wird laut *Xue et al. 2014* ohnehin der Komplexität der scheinbar um einiges individueller umgebungsabhängig programmierten Monozyten und Makrophagen nicht gerecht (34). Ein Kollege von *Mantovani, Martinez*, bestätigte im gleichen Jahr 2014 die Notwendigkeit einer Neubewertung dieser Theorie und sieht die Gründe dieser unzureichenden Theorie in der zu „*in vitro*“-lastigen Forschung in diesem Gebiet, welche der Komplexität der Umgebungsfaktoren bei der Differenzierung der Monozyten nicht hinreichend gerecht wird (144).

Bei der Untersuchung möglicher alters-/gesundheitsabhängiger Unterschiede des zellulären Verhaltens der Granulozyten fielen unter den untersuchten intrazellulären pro- bzw. antiapoptotischen Mediatoren bei allen Spendergruppen hohe Konzentrationen der gespaltenen Caspasen-3 und -7 auf. Diese Erhöhung proapoptotischer Kaskadenproteine könnte Ausdruck ihrer geringen Lebensdauer von wenigen Tagen *in vivo* sein (26). Bei Infekt steigern diese Zellen physiologisch u.a. durch systemisch erhöhte Spiegel antiapoptotisch wirkender Botenstoffe wie dem G-CSF ihre Halblebenszeit, um der akuten Immunabwehr des Organismus länger und somit effizienter zur Verfügung zu stehen (145, 146). Dementsprechend wiesen die Granulozyten der Spender mit Fraktur *in vitro* 90 min nach Aussaat eine höhere Überlebensrate auf als jene der gesunden Spender (im Mittel 24% höher bei den jungen, 29% höher bei den alten Spendern mit Fraktur). Während sich hinsichtlich der Überlebensrate hierbei kein altersabhängiger Unterschied zeigte, zeigte sich dieser jedoch auf intrazellulärer Ebene. So wiesen die Zellen alter Spender im Sinne der

Immunoseneszenztheorie ein deutlich proapoptotischeres Zellprogramm unter Fraktur auf als diese junger Spender (20). Ursächlich hierfür könnte die in der Literatur beschriebene altersbedingt gestörte Signaltransduktion antiapoptotisch wirkender Botenstoffe sein, die als Ursache einer inadäquaten Steigerung der Überlebenszeit von Granulozyten bei Infekt im Alter diskutiert wird (27, 147, 148). Bei gesunden Alten hingegen scheint interessanterweise eine geringere apoptotische Zellprogrammierung vorzuliegen als bei jungen Gesunden. So zeigten die Zellen der alten verglichen mit denen der jungen Spender signifikant niedrigere Spiegel der pro-apoptotischen Caspase-3 und -7 (110). Außerdem scheint der Zellüberlebensfaktor NF- κ B bei der alten gesunden geringer gehemmt zu sein als bei der jungen gesunden Vergleichsgruppe, während das Zellprogramm zur Steigerung der Widerstandskraft gegen stressbedingte äußere Einflüsse bei alten im Vergleich zu den jungen aktiver scheint (118, 121). Korrelierend hierzu überlebten deutlich mehr Zellen alter gesunder als junger gesunder Spender *in vitro*. Der „gesunde“ alte Organismus könnte durch initial „robustere“ Granulozyten versuchen, einen drohenden relativen Immunzellmangel bei Infekt anfänglich abmildern bzw. kleineren Infekten im Sinne des „Inflammaging“ besser zu begegnen (22). Dieses bei alten gesunden gefundene überlebensstärkere Verhalten der Granulozyten könnte außerdem u.a. erklären, warum Granulozyten im Alter bei Gesundheit in z.T. höherer Anzahl in der Blutbahn vorliegen als bei jungen gesunden Menschen, obwohl die Produktionsraten dieser im Knochenmark bei fehlendem Infektgeschehen vergleichbar sind (19, 28). Neben Überlebenssteigerung durch geringere apoptotische Aktivität im Alter, könnte der gefundene geringste Spiegel an intrazellulären ROS bei alten gesunden Spendern Ausdruck eines potenteren antioxidativen Enzymsystems untersuchter Zellen sein. Denn aufgrund der chronisch höheren systemischen Radikalspiegel im Alter könnte dieses weiter ausgebaut sein als es in den Zellen junger Menschen vonnöten wäre (43-45). Ein Problem ergibt sich bei eintretendem Infektionsgeschehen, da das Knochenmark alter Menschen die Produktionsrate der Granulozyten aufgrund gestörter Signaltransduktion stimulierender Botenstoffe nicht adäquat steigern kann (27, 28). In Kombination mit der gefundenen höheren Proapoptose dieser Zellen im Alter bei Fraktur könnte dies eine Erklärung des altersbedingt schlechteren Outcomes nach Knochenbruch sein. Eine weitere Gefährdung des Heilungsverlaufes könnte u.a. eine inadäquate Drosselung der granulozytären ROS-

Produktion bei Fraktur sein. *Chaves et al. 2009* diskutiert bzgl. neutrophiler Granulozyten eine altersphysiologische Veränderung bei den ROS senkenden Drosselungsmechanismen: So ist der systemische Botenstoff IL-10 lediglich bei Menschen bis zu einem Alter von ca. 50 Lebensjahren in der Lage, die ROS-Produktion der Neutrophilen zu drosseln, während dieser aber aufgrund eines anderen p38 MAPK abhängigen Mechanismus keine hemmende Wirkung auf die ROS-Produktion älterer Menschen zu haben scheint (149). Bei den beiden jungen Spendergruppen wurden hingegen nahezu unveränderte bzw. nur geringfügig höhere intrazellulären ROS-Level unter Fraktur gemessen, was an einer wirksamen IL-10 vermittelten Drosselung der ROS-Produktion liegen könnte. Die Fraktur bedingt sowohl geringfügig bei der jungen als auch in deutlicherem Maße bei der alten Spendergruppe höhere intrazelluläre ROS-Spiegel als möglicher Ausdruck der Aktivierung der Granulozyten. ROS und RNS gelten als Marker für aktivierte Neutrophile, da sie *intrazellulär* als Botenstoffe zur Modulation von Phagozytose, Sekretion, Genexpression und Apoptose dieser Zellen sowie *extrazellulär* als Botenstoffe beispielsweise zur Angiogenese im Heilungsprozess fungieren (39-41). *Intrazellulär* dienen ROS den Neutrophilen außerdem zur Abtötung phagozytierter Pathogene durch sogenanntes „oxidative burst“, welches diesen Zellen im Alter jedoch verbunden mit einer ineffizienteren angeborenen Immunabwehr vermindert möglich scheint (42). Trotzdem fand sich bei alten Spendern mit Fraktur der höchste Spiegel an ROS. Das oben beschriebene Fehlen der ROS-hemmenden Wirkung von IL-10 auf die Neutrophilen, welche in der Literatur in Zusammenhang mit den altersbedingten Heilungsstörungen gebracht wird, könnte hierbei ursächlich sein (149). Denn vermehrt entstehende ROS bei Fraktur im Alter könnten wiederum durch Ansammlung zytotoxischer oxidativer Radikaler chronische Wundheilungsverläufe und das Altern an sich begünstigen (39, 58, 150). Neben der in dieser Arbeit erfolgten Messung *intrazellulär* befindlicher ROS mittels DCFH-DA wäre auch die Messung des *extrazellulären* ROS-Level im Zellmilieu beispielsweise mittels Cytochrom C interessant, um herauszufinden, ob die inadäquate ROS Drosselung auch extrazelluläre Auswirkungen hat (151). Ein zu hoher *extrazellulärer* ROS-Spiegel könnte die in der Literatur diskutierte feine Balance zwischen der positiven (Debridement, Desinfektion und Stimulation von Gewebe) und schädlichen Wirkungen (Gewebszerstörung) von ROS bei der Wundheilung stören (46, 152).

Im Sinne der Theorie einer radikalbedingten Alterung zeigte sich bzgl. des systemischen Level an RNS in den Blutseren der Spender eine altersbedingt signifikant höhere Konzentration des Nitrat-/Nitritspiegels als bei jungen Gesunden (43-45). Hierbei sollte die im Alter übliche regelmäßige Einnahme von stickstoffhaltigen Medikamenten (wie u.a. manche Antihypertensiva) als mögliche Teilursache eines höheren nitrosativen Stresses im Alter nicht außer Acht gelassen werden (153). Ursache für die verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe wider Erwarten signifikant geringere *systemische* Blutserumkonzentration an NO_2^- und NO_3^- sowohl bei jungen als auch bei alten Spendern mit Fraktur könnte paradoxerweise der *lokal* im Heilungsgebiet erhöhte Bedarf an Stickstoff und ein damit einhergehender höherer Spiegel anfallender nitrosativer Radikale sein. In der Literatur werden NO und respektive NO_3^- als unerlässliche Mediatoren im Wundheilungsprozess beschrieben, welche an Prozessen der Kollagenbildung, der Zellproliferation und Wundkontraktion beteiligt sind (154, 155). Zu Beginn einer Wundheilung dienen hierbei u.a. eingewanderte Entzündungszellen, vor allem Makrophagen, als Lieferanten des kurzlebigen, lokal wirksamen Mediators NO (60). Die Literatur berichtet sowohl einen schlechteren Wund- als auch einen schlechteren Frakturheilungsverlauf bei Hemmung der lokalen NO-Produktion (59, 156). Die geringer gemessene systemische Blutserumkonzentration an NO_2^- und NO_3^- bei Fraktur könnte folglich - als Ausdruck möglicher Anpassung an die bedarfsbedingt höheren Level an Stickstoffradikalen - einem protektiv hochgefahrenen Radikal entschärfenden Mechanismus geschuldet sein. Zur Untersuchung dieser These müsste eine Möglichkeit gefunden werden die RNS-reduzierende systemischen Leistungsfähigkeit von im Heilungsprozess befindlichen mit dieser von gesunden Probanden vergleichen zu können. In dieser Arbeit fanden sich diesbezüglich bereits hinsichtlich oxidativer Radikale mögliche Hinweise auf einen hochgefahrenen Radikal entschärfenden Mechanismus untersuchter Immunzellen bei Fraktur (s.u.). Interessant wäre hierbei im Falle einer Radikalentschärfung seitens der Blutzellen, ob die gefundenen Fraktur bedingt niedrigeren systemischen NO_2^- -/ NO_3^- -Level mit Nähe zum Wundgebiet ansteigen. Die Untersuchung des Wundgewebes hinsichtlich nitrosativ veränderter Proteine wie dem Nitrotyrosin z.B. mittels Western-blot-Verfahren könnte dann Aufschluss darüber geben, ob sich ein mögliches nitrosatives Stressgeschehen lokal auf das Wundgebiet beschränkt (157). Die

therapeutischen Ansätze zur Senkung freier Radikale und möglicher Verbesserung des Heilungsverlaufes könnten sich dann entsprechend auf eine lokale Anwendungsform beschränken. Da die Ergebnisse mithilfe der Proteinkonzentrationsspiegel normiert worden sind, ist nicht von einer beispielsweise infusionstherapeutisch bedingten Verfälschung der $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ -Level durch Verdünnung auszugehen, zumal die postoperativen eingesetzten Infusionen zur Volumensubstitution i.d.R. keine Proteine enthalten. Eine therapeutisch bzw. operativ bedingte Veränderung der RNS durch Änderung der Blutzusammensetzung darf jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

4.2 Einfluss des Alters auf humane Granulo-/Monozyten im Umgang mit künstlichem oxidativem Stress

Bevor ein möglicher protektiver antioxidativer Einfluss von NAC auf künstlich oxidativ gestresste Granulo-/Monozyten in 4.3 diskutiert wird, werden in diesem Kapitel mögliche alters- bzw. gesundheitsabhängige Unterschiede dieser Zellen im Umgang mit und der Bewältigung von künstlich induziertem oxidativen Stress mit H_2O_2 diskutiert. Anhand ihrer pro-/antiapoptotischen intrazellulären Kaskadenproteine, ihrer Zellviabilität und ihrer ROS-Produktion wird hier untersucht, ob und ggf. wie nachteilig sich der Faktor Alter auf die Effizienz der angeborenen Immunabwehr unter einer oxidativen Belastung beispielsweise im Zuge eines Heilungsprozesses auswirkt (39-42). Während sich das künstlich induzierte H_2O_2 wie erwartet dem gefundenen proapoptotischen Zellprogrammierung nach zu urteilen zytotoxisch auf die untersuchten Immunzellen junger gesunder Spender auszuwirken schien, schien es wider Erwarten bei den Zellen junger Spender mit Fraktur eine auf Widerstandskraft und Zellüberleben abzielende intrazelluläre Zellprogrammierung zu aktivieren. So wiesen die Zellen der gesunden jungen Spender unter H_2O_2 die geringste Überlebensrate auf, während die Zellen junger Spender mit Fraktur die höchste Überlebensrate aller Spendergruppen aufwiesen. Laut Literatur schädigt das reaktionsfreudige Molekül H_2O_2 die zelluläre DNA und kann dadurch eine kontrollierte Apoptose in Gang setzen (158). Neben einer kontrollierten Apoptose wird außerdem ein Spontanod der Neutrophilen durch Herunterregulierung des antiapoptotischen Akt unter ROS diskutiert (129, 158-160). Scheinbar verfügen die inflammatorisch vorbelasteten aktivierten Granulozyten bei Fraktur über Mechanismen, die ihnen eine bessere Bewältigung oxidativer Radikale ermöglicht (160). Um ihrer Aufgabe im Abtöten von Pathogenen auf der einen sowie

der Aktivierung der erworbenen Immunabwehr auf der anderen Seite gerecht zu werden, steigern aktivierte neutrophile Granulozyten wie bereits beschrieben ihre Produktion von ROS (161). Bei der Analyse der intrazellulär unter H_2O_2 entstandenen ROS-Level wurden bei jungen wie alten Spendern diese effizienteren Mechanismen zur ROS-Produktion der aktivierten Granulozyten im Zustand nach Fraktur deutlich. Denn altersunabhängig lagen die ROS-Level unter Fraktur signifikant höher vor als im gesunden Zustand. Um sich also selbst vor den schädigenden ROS schützen zu können, müssten diese folglich über effektive zelleigene antioxidative Schutzmechanismen verfügen, welche wiederum bei nicht aktivierten Zellen nur gering ausgeprägt sind. In der Literatur wird diesbezüglich beispielsweise eine erhöhte Apoptose neutrophiler Granulozyten durch den zelleigenen „oxidative burst“ bei Verlust des zelleigenen antioxidativen GSH durch Chloramine beschrieben (162). Neben den erniedrigten typisch proapoptotischen Caspasen-3 und -7 fand sich unter H_2O_2 auch ein erhöhtes HSP27, welches u.a. für eine Steigerung zellulärer Selbstschutzmechanismen verantwortlich gemacht wird (118). Außerdem könnten die u.a. Apoptose hemmende p38 MAPK sowie der signifikant erhöhte Inhibitor von NF- κ B I κ B α hierbei auf diese insgesamt antiapoptotische intrazelluläre Konstellation hinweisen (119, 123). Denn im Zusammenhang mit einer chronischen H_2O_2 -Stressung wurde das hinlänglich als antiapoptotisch bekannte Protein NF- κ B in der Literatur neuerdings als Caspase-unabhängig proapoptotisch beschrieben (119, 120). Eine Hemmung dessen mittels I κ B α könnte als Benefit für die aus dem oxidativ gestressten Organismus stammenden Zellen gewertet werden. Die Zellen junger Spender mit Fraktur schienen sich also gesamt betrachtet vor dem sie umgebende zytotoxischen Milieu schützen zu können, indem sie sowohl Caspase-abhängig als auch Caspase-unabhängig antiapoptotisch reagieren - ein Hinweis auf eine Effizienzsteigerung der angeborenen Immunabwehr im erkrankten jungen Organismus. Vergleichbar der jungen gesunden fand sich auch bei der alten gesunden Spendergruppe der Hinweis auf eine proapoptotische Zellprogrammierung unter H_2O_2 . Auch diese Zellen schienen, da sie inaktiv und unvorbereitet aus einem gesunden Organismus stammten, empfindlich auf die oxidative Belastung zu reagieren. Neben erhöhten apoptotischen Caspasen unter H_2O_2 zeigten diese Zellen jedoch anders als jene junger gesunder Spender eine zusätzliche Erhöhung der oben beschriebenen Mediatoren HSP27, p38 MAPK und I κ B α . Die basal antiapoptotisch programmierten

Zellen könnten bei plötzlichem Stressgeschehen dadurch versuchen, die Widerstandskraft gegen die ROS zu steigern und dem ausgelösten proapoptotischen Caspaseweg mittels Caspase-unabhängiger antiapoptotischer Stressregulation zu begegnen (119). Dieses könnte u.a. Erklärung für das gefundene bessere Überleben der Zellen alter gesunder verglichen mit denen junger gesunder Spender unter H_2O_2 sein. Außerdem könnte die in 4.1 diskutierte antiapoptotische „Ausgangssituation“ einen begünstigenden Effekt auf die Viabilität der Zellen gesunder alter Spender haben. Anders als bei den jungen Spendern mit Fraktur zeigten die Zellen alter Spender mit Fraktur unter H_2O_2 ein proapoptotisches Verhalten ohne zusätzlicher Caspase-unabhängiger antiapoptotischer Zellregulation, wie es bei der gesunden Kontrollgruppe der Fall war. Im Alter scheinen die aktivierten Granulozyten anders als in jungen Jahren eine nur unzureichende Schutzfunktion gegenüber ROS zu haben - ein Hinweis auf einen Effizienzverlust der angeborenen Immunabwehr im erkrankten alten Organismus. Die unter H_2O_2 gefundenen vergleichbaren Überlebensraten der Zellen alter Spender ohne und mit Fraktur könnten auf das bereits in 4.1 diskutierte inadäquate Anpassungsvermögen der Zellen bei Frakturgeschehen beruhen, die u.a. auf eine altersphysiologisch schlechteren Signaltransduktion antiapoptotischer Signale zurückzuführen sind (139).

Wie oben bereits erwähnt lagen die intrazellulär unter H_2O_2 entstandenen ROS-Level in den untersuchten Zellen altersunabhängig unter Fraktur signifikant höher vor als im gesunden Zustand, was möglicherweise Ausdruck ihrer frakturbedingten Aktivierung sein könnte. Hierbei stellt sich die Frage, ob und wie sich die Immunzellen des gesunden Organismus auf beispielsweise enzymatischer Ebene an ein eintretendes Infektgeschehen mit längerer oxidativer Belastung adaptieren. Bezüglich chronischer Wundheilungsverläufe ist diese Frage bisher nur unzureichend beantwortet (150). Könnte sich eine Adaption beispielsweise in Form einer intrazellulären Heraufregulierung der ROS-bildenden Enzymsysteme wie u.a. dem NADPH-Oxidase-Komplex der bereits in der Blutbahn patrouillierenden Neutrophilen gestalten oder gar durch Austausch dieser Zellen mit neu gebildeten hinsichtlich des „oxidative burst“ von vorne herein potenter ausgestatteten Artgenossen (163)? Eine höheres Vermögen der Neutrophilen zu „oxidativem burst“ wird mit einem inflammationsdämpfenden Zytokin senkenden und proapoptotischen Effekt auf diese Zellen in Verbindung gebracht, was

dem Verhindern einer überschießenden Inflammationsreaktion beispielsweise diesbezüglich im Falle eines plötzlichen Knochenbruchgeschehens entgegen käme (158). Aufgrund des altersbedingt schlechteren Produktionsvermögens des Knochenmarks an Granulo-/Monozyten bei Infekt könnte hierbei die Gewichtung im Alter auf einer Anpassung der bereits bestehenden Zellen auf das Infektausmaß liegen. Demgegenüber könnten die bei Gesundheit aufgrund fehlender Aktivierung ineffizienteren Zellen in jungen Jahren durch Apoptose zugrunde gehen und durch neugebildete aktivierte effizientere Zellen bei Infekt ersetzt werden (27). Dies könnte ein weiterer Erklärungsansatz der festgestellten geringeren zellulären Überlebensrate der Zellen junger Gesunder unter H_2O_2 sein. Die Literatur beschreibt eine altersbedingte geringere Abtötungsleistung der Neutrophilen mittels „oxidative burst“ im Alter (42). Tatsächlich zeigten sich bei beiden alten Spendergruppen tendenziell geringere intrazelluläre ROS-Level als bei den entsprechenden jungen Spendergruppen nach 20-minütiger Inkubation dieser mit H_2O_2 . In diesem Zusammenhang könnte die in *Keshari et al. 2013* beschriebene p38 MAPKinase abhängige NET-Bildung (neutrophil extracellular traps = „neutrophile extrazelluläre Fallen“) interessant sein (124). Bei Neutrophilen wurde beobachtet, dass diese in der Lage sind aus Proteinen und Chromatin ihrer DNA extrazelluläre Fasern, die sog. NET's, zu bilden, um Pathogene abfangen und abtöten zu können (164). Diesbezüglich fiel unter dem Einfluss von H_2O_2 nur bei den Zellen junger gesunder Spender eine fehlende Hochregulierung der p38 MAPK auf, während diese bei den Zellen aller anderen Spendergruppen signifikant stattfand. Bekannt ist, dass neutrophile Granulozyten H_2O_2 -abhängig NET's bilden und Bakterien wiederum in der Lage sind diese NET-Bildung durch H_2O_2 -Abbau zu vermeiden (165). Bzgl. der Zellen untersuchter alter Spender könnte das bedeuten, dass deren *intrazellulär* impotenteres Abtötungsvermögen mittels ROS durch das Modellieren extrazellulärer NET's in ROS-reichem *extrazellulären* Umgebungsmilieu kompensiert wird (35). Dieses könnte auch u.a. Ursache der gesteigerten Thromboseanfälligkeit im Heilungsverlauf älterer Patienten sein, wie sie in *Fuchs et al. 2012* mit NET in Zusammenhang gebracht wird (166, 167). Eine Untersuchung der Neutrophilen alter Menschen hinsichtlich ihres NET-Bildungsverhaltens in einem ROS-reicherem Millieu wie beispielsweise einer Wunde könnte diesen Sachverhalt genauer

untersuchen. Auch im Zusammenhang mit der Krebsassoziierten Thrombose werden die NET's diskutiert (168).

4.3 Einfluss von NAC auf humane Granulo-/Monozyten alter Menschen

In diesem Kapitel werden nun abschließend die Ergebnisse zur Hypothese dieser Dissertation diskutiert. Untersucht wurde, ob das kostengünstige und nebenwirkungsarme Medikament NAC durch seinen antioxidativen Charakter in der Lage ist, Granulo-/Monozyten alter Menschen mit Bruch eines langen Röhrenknochens zu schützen. Denn diese Zellen der akuten Immunabwehr sind bei einem solchen größeren Inflammationsgeschehen einer hohen oxidativen Belastung ausgesetzt (44, 45, 50). In diesem Falle könnte der Einsatz von NAC möglicherweise das komplikationsreiche Outcome alter Menschen jenseits des 64. Lebensjahres nach größerem Knochentrauma verringern (75). Die Idee hinter der Verwendung des NAC liegt in der Minimierung der schädlichen Auswirkungen oxidativen Stresses durch den Aufbau einer zellulären antioxidativen Kapazität (73). Tritt NAC in die Zelle ein, so soll es den zelleigenen antioxidativen Glutathionreduktasemechanismus durch Auffüllen des Cystein-Pools, dem limitierenden Faktor der GSH-Produktion, länger effizient erhalten (74). Zudem soll die synthetische Antioxidantie NAC mit seiner Thiolgruppe direkt Radikale unschädlich machen (38). Hierbei muss bedacht werden, dass diese reaktionsfreudige Thiolgruppe auch unter Umständen einen negativen prooxidativen Effekt in sich bergen kann (169). Bei Leberzellen wurde als weiterer möglicher Wirkmechanismus von NAC außerdem eine durch Hochregulation von H₂O₂-abbauenden Katalasen erreichte Hemmung der zellulären ROS-Produktion beschrieben (170).

Im Sinne eines Aufbaus einer zellulären antioxidativen Kapazität zeigte sich bei den untersuchten HL-60/THP-1-Zellen eine tendenzielle Erhöhung des intrazellulären antioxidativen GSH-Spiegels nach 2-stündiger Inkubation mit 1 mM NAC. Nach Ablauf eines Tages schien dieser in der Literatur bereits beschriebene erhöhende Einfluss auf die zelleigene Antioxidantie GSH jedoch nicht mehr zu bestehen (47, 134, 135). Laut *Baudouin-Cornu et al. 2012* beträgt die Halbwertszeit von GSH 90 min, eine mögliche Erklärung für das annähernd einheitliche Level an GSH 24 h später (47). In *Xu et al. 2009* wird zudem ein lediglich kurzzeitiger antioxidativer Effekt des NAC von 2-3 h auf neutrophile Granulozyten beschrieben (159). Der durchschnittlich 50% höhere intrazelluläre GSH-Spiegel der HL-60-Zellen nach einem Tag könnte der höheren

Zellzahl der sich teilenden Zellen nach 24 h geschuldet sein. Bei den THP-1-Zellen ist zwar eine langsamere Zellteilungsrate bekannt, diese erklärt jedoch nicht den durchschnittlich geringeren GSH-Spiegel der THP-1-Zellen nach einem Tag. Dieses geringere intrazelluläre Level nach 24 h könnte jedoch u.a. Ausdruck eines geringeren Produktionsvermögens an zellschützendem GSH seitens der THP-1-Zellen sein. Das könnte u.a. die in Vorversuchen verglichen mit den HL-60-Zellen festgestellte geringere Toleranz dieser Zellen gegenüber H_2O_2 erklären. In Vorversuchen mit oxidativ ungestressten HL-60-/THP-1-Zellen bewirkte die Gabe von NAC nach 24 h einen Anstieg intrazellulärer ROS Spiegel. Dieses könnte Hinweis auf einen prooxidativen Charakter des NAC bei fehlendem Bedarf dieser Antioxidantie sein, wie er bereits in *Finn et al. 2012* bzgl. leukämischer Zellen beschrieben wird (171).

Nachfolgend werden nun mögliche alters- bzw. gesundheitsabhängige Unterschiede des Einflusses von NAC auf die aus dem Spendervollblut isolierten Granulo-/Monozyten *in vitro* hinsichtlich ihres intrazellulären pro-/antiapoptotischen Verhaltens, ihrer Zellviabilität und ihrer ROS-Produktion diskutiert. Hierbei befanden sich diese Zellen einmal im oxidativ ungestressten zum anderen im künstlich mit H_2O_2 oxidativ gestressten Zustand. Die vier Spendergruppen (jung/alt, ohne/mit Fraktur) wurden hierbei jeweils für sich betrachtet:

Junge gesunde Spender: Im H_2O_2 -freiem Milieu schien die höhere Konzentration von 1 mM NAC eine geringere Steigerung der zellulären Überlebensrate zu bewirken als die niedrigere Konzentration von 0,5 mM. Bei der Analyse der intrazellulären Signalkaskadenproteinlevel ließen sich hierbei keine klaren Schlüsse bezüglich pro- bzw. antiapoptotischer Veränderungen unter NAC ziehen. Denn unter NAC lagen nicht nur die Level typischer proapoptotischer Caspasen sondern auch alle anderen betrachteten Kaskadenproteinlevel bei nahezu unverändertem Survivinspiegel signifikant niedriger vor. Bei fehlendem oxidativem Stress zeigte sich die ohnehin schon geringe intrazelluläre ROS-Produktionrate unter 1 mM NAC geringfügig erhöht, was Ausdruck eines prooxidativen Charakters von NAC bei fehlendem Bedarf sein könnte (169, 171). Die gefundene geringere Steigerung der Überlebensrate unter 1 mM NAC könnte folglich möglicherweise auf einen prooxidativen Charakter dessen beruhen. Anders zeigte sich der Einfluss der geringeren NAC-Konzentration von 0,5 mM. Hierunter zeigte sich sowohl eine höhere Überlebensrate wie auch ein leicht

geringeres intrazelluläres ROS-Level als Hinweis auf einen möglichen positiven antioxidativen NAC-Einfluss. Wie in *Abbildung 21* dargestellt könnte eine zu hohe Dosis an NAC also bei einer ungestressten Zelle aus gesundem Organismus zu einer

Neutrophiler Granulozyt bei Gesundheit

Aufgabe: Patrouillieren

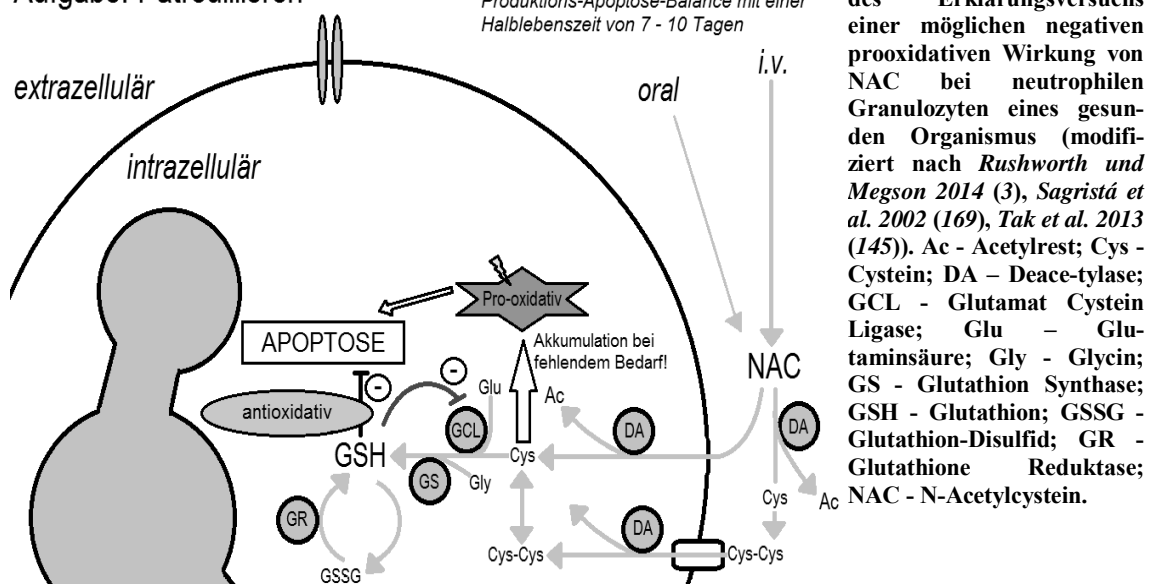


Abbildung 21: Negative prooxidative Wirkung von NAC bei neutrophilen Granulozyten eines gesunden Organismus

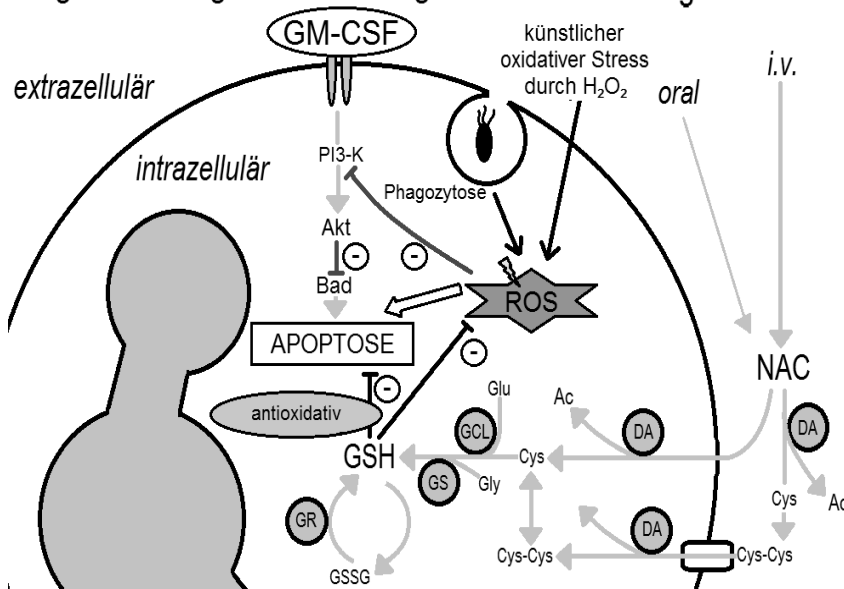
Übersättigung des Bedarfs bei einer Überforderung eines geringer ausgereiften intrazellulären antioxidativen Glutathionstoffwechsels und somit zu einer Ansammlung nicht benötigten reaktionsfreudigen Cysteins in den untersuchten Zellen führen. Der daraus resultierende „Mehrstress“ dieser Zellen könnte einen geringeren protektiven Effekt von 1 mM NAC mit sich bringen. Im Gegensatz zu den alten gesunden Spendern jedoch zeigte sich bei den Zellen junger Gesunder dennoch eine gesteigerte zelluläre Überlebensrate unter 1 mM NAC. Die geringere Dosis von 0,5 mM wirkte sich hingegen bei jung und alt überlebenssteigernd aus, was auf einen bei dieser geringeren Dosis voll antioxidativ genutzten Charakter beruhen könnte (169).

Bei einem höheren Bedarf an einer antioxidativen Kapazität unter künstlicher H₂O₂-Stressung zeigte sich diesbezüglich auch unter der höheren Dosis von 1 mM NAC neben einer höheren Überlebensrate auch ein signifikant geringes Level intrazellulärer ROS als Hinweis auf einen bedarfsbedingt antioxidativen Charakter. Ein Mehr an antioxidativer Kapazität könnte also auch ein Mehr an antioxidativ protektivem Effekt mit sich bringen (73). Als Hinweis auf einen antiapoptotischen Einfluss des NAC lagen die typisch proapoptotischen Caspasen unter 1 mM NAC deutlich herunterreguliert vor.

Junge Spender mit Fraktur: Da die Zellen der jungen Spender mit Knochenbruch hinsichtlich einer signifikant gesteigerten Überlebensrate im Gegensatz zu denen der gesunden Kontrollgruppe auch schon bereits ohne zusätzlicher oxidativer Stressung unter 1 mM NAC noch mehr als unter der halben Dosis dessen zu profitieren schienen, könnte dieses auf einen Mehrbedarf einer antioxidativen Kapazität durch ein bei Infektgeschehen von vorne herein höher vorhandenes intrazelluläres ROS-Level hinweisen (39, 73). Vergleichend dazu soll an dieser Stelle noch einmal auf das Ergebnis in 3.1.4 hingewiesen sein, welches unter Fraktur tendenziell höhere intrazelluläre ROS-Spiegel zeigt. Das zelluläre Glutathion-antioxidationssystem scheint durch NAC einen „Nachschub“ an GSH zu erhalten und diese oxidativ höhere Belastung dadurch bewältigen zu können (3). *Abbildung 22* stellt diese Möglichkeit vereinfacht dar.

Neutrophiler Granulozyt bei Infekt

Aufgabe: Pathogenelementierung + Immunaktivierung



Schematisierte Darstellung des Erklärungsversuchs einer möglichen positiven antioxidativen Wirkung von NAC bei neutrophilen Granulozyten eines erkrankten Organismus (modifiziert nach Harbort et al. 2015 (158), Klein et al. 2000 (172), Rushworth und Megson 2014 (3), Sagristá et al. 2002 (169), Xu et al. 2010 (159)). Ac - Acetylrest; Akt - Proteinkinase B; Bad - Bel-2-assoziierter Todespromotor; Cys - Cystein; DA - Deacetylase; GCL - Glutamat Cystein Ligase; Glu - Glutaminsäure; Gly - Glycin; GM-CSF - Granulozyten/Makrophagen Kolonie Stimulationsfaktor; GS - Glutathion Synthase; GSH - Glutathion; GSSG - Glutathion-Disulfid; GR - Glutathion Reduktase; H₂O₂ - Wasserstoffperoxid; NAC - N-Acetylcystein; PI3-K - Phosphoinositid-3-Kinase; ROS - Reaktive Sauerstoffspezies.

Abbildung 22: Positive antioxidative Wirkung von NAC bei neutrophilen Granulozyten eines erkrankten Organismus

Eine solche oxidative Entschärfung könnte die angeborene Immunabwehr durch eine Lebensverlängerung der dann länger zur Verfügung stehenden Immunzellen, wie sie der Organismus bekannterweise an sich schon durch antiapoptische Mechanismen bei Infekt bewirkt, stärken (20, 139, 173). In der Literatur wird bei größerem

Infektgeschehen eine gestörte Balance zwischen der Produktion von Granulozyten und deren Abbau beispielsweise durch Makrophagen angenommen. Dadurch sammeln sich sowohl deren Zellreste als auch deren zytotoxischer Inhalt wie ROS nach Apoptose bzw. sekundärer Nekrose dieser massiv im Gewebe an und können ein chronisches Inflammationsgeschehen wie auch Heilungsstörungen auslösen (86, 174). Ein möglicher antioxidativer Effekt von NAC könnte während der Hinauszögerung der Apoptose also auch die Herunterregulierung ihrer schädlichen ROS-Beladung bewirken. Unter 1 mM NAC zeigte sich bei den Granulo-/Monozyten junger Spender mit Fraktur ein antiapoptotisches Zellprogramm, was mit der gefundenen signifikant höheren Überlebensrate gut korrelierte. Wie bei den jungen Gesunden schien 1 mM NAC die ohnehin geringe intrazelluläre ROS-Produktionrate hierbei kaum zu beeinflussen. Diese lag verglichen mit der unbehandelten Bedingung im Mittel jedoch geringfügig niedriger vor. Unter H₂O₂-Stressung schien 1 mM NAC *in vitro* ebenfalls den gewünschten antioxidativen Effekt zu bewirken, da die Zellen hochsignifikant geringere Mengen an ROS produzieren, was mit der gefundenen tendenziellen Steigerung der Überlebensrate assoziiert sein könnte. *In vivo* könnte ein längeres Überleben der Granulo-/Monozyten in einem ROS-reicheren Milieu beispielsweise eines Wundheilungsgebietes einer effizienteren Immunabwehr zugute kommen (41). Die Messung der intrazellulären Signalkaskadenproteinlevel ließ keine klaren Schlüsse bezüglich pro- bzw. antiapoptotischer Veränderungen zu, da alle Level unter NAC erhöht waren.

Alte gesunde Spender: Die Theorie einer prooxidativen Eigenschaft des NAC bei fehlendem Bedarf an zusätzlicher antioxidativer Kapazität im gesunden Organismus, wie sie bereits oben bei den jungen gesunden Spendern diskutiert und in *Abbildung 21* dargestellt wird, könnte auch hier im oxidativ ungestresstem Zustand zum Tragen kommen. Im Gegensatz zu den Granulo-/Monozyten der jungen Gesunden schienen diese Zellen durch den möglicherweise prooxidativen Einfluss des 1 mM NAC bei einem „Zuviel“ an intrazellulärem Cystein sogar Schaden zu nehmen. Denn verglichen mit der Kontrolle zeigte sich nach 90 min immerhin eine im Mittel 7% geringere Zellviabilität. Der gefundene verglichen mit der Kontrolle sogar signifikant höhere intrazelluläre ROS-Spiegel nach 50 min könnte diese These unterstreichen. In der Literatur wurde ein bedingungsabhängig pro- bzw. antioxidativer Charakter von NAC im Kontext einer Leukämiebehandlung bereits beschrieben: Während NAC bei einer

geringen Dosis des verwendeten Zytostatikums einen prooxidativen Einfluss auf die verwendete B-Zelllinie nahm, beeinflusste es diese bei hoher Dosis des zelltoxischen Chemotherapeutikums antioxidativ (171). Interessanterweise schien die geringere NAC-Dosis von 0,5 mM in dieser Arbeit den antioxidativen Bedarf untersuchter Granulo-/Monozyten zu decken und nicht zu übersättigen. Denn unter dieser Konzentration zeigte sich eine gesteigerte Überlebensrate. Die Wirkung des NAC könnte den Zellen also ROS-Level-abhängig zum Nutzen oder zum Schaden gereichen.

Unter zusätzlicher H₂O₂-Stressung schien dann neben 0,5 mM auch 1 mM NAC in seiner antioxidativen Wirkung benötigt und sich auf die Granulo-/Monozyten antiapoptotisch auszuwirken. Hier zeigte sich eine Verringerung der intrazellulären Produktion zytotoxischer ROS sowie eine tendenziell höhere Überlebensrate bei signifikanter Verringerung der Spiegel proapoptotischer Caspasen.

Alte Spender mit Fraktur: In dieser Dissertationsarbeit sollte ein möglicher Nutzen einer NAC-Behandlung für diese alte Spendergruppe hinsichtlich eines Schutzes ihrer akuten angeborenen Immunabwehr untersucht werden. Durch eine effizientere angeborene Immunabwehr soll dadurch in der Klinik das im Alter bekannte schlechtere Outcome verbessert werden (75). Im Gegensatz zu den aus den gesunden alten Organismen stammenden Granulo-/Monozyten schienen diese der erkrankten alten Spendergruppe hinsichtlich der gefundenen gesteigerten Überlebensrate bereits ohne zusätzlicher künstlicher Stressung mit H₂O₂ tatsächlich von 1 mM NAC zu profitieren. Es zeigte sich also im Alter ein mit den beiden jungen Spendergruppen vergleichbares Phänomen. Auch in diesem Fall könnte der Mehrbedarf einer antioxidativen Kapazität durch das bei Infektgeschehen erhöhte intrazelluläre ROS-Level, wie in 3.1.4 tendenziell gemessen, eine mögliche Erklärung dafür sein (39). Wie in *Abbildung 22* dargestellt schien auch hierbei das zelluläre Glutathionantioxidationssystem mithilfe des NAC eine höhere oxidative Belastung entschärfen zu können (3). Durch eine Lebensverlängerung von Innen könnte der aufgrund einer schlechteren Transduktion antiapoptotischer Signale geringeren zellulären Lebensverlängerung von Außen entgegengewirkt werden (20). Außerdem könnte indirekt auch hier durch Hinauszögerung der Apoptose der Neutrophilen eine zu hohe Konzentration der ROS- bzw. RNS im heilenden Gewebe herunterreguliert werden, indem die übermäßige Ansammlung ROS-reichen Inhalts untergegangener Neutrophilen verringert würde (86). In der Forschung wurde bei

Mäusen die verglichen mit jungen Tieren gefundene höhere Anzahl an Gewebsmakrophagen im Heilungsgebiet alter Tiere als ein möglicher Kompensationsmechanismus der schlechteren Gewebsheilung im Alter dieser gedeutet (174). Im Falle einer Übertragbarkeit dieser Theorie auf den Menschen, hätten die Makrophagen, welche in dieser Arbeit nicht gesondert betrachtet wurden, durch einen antiapoptischen Effekt außerdem mehr Zeit und somit Kapazität für die Phagozytose untergegangener Neutrophilen. Im Einzelnen ließ sich auf intrazellulärer Ebene bei den Granulo-/Monozyten unter 1 mM NAC eine nichtsignifikante Herunterregulierung typisch proapoptischer Signalkaskadenproteine feststellen. Diese geringere intrazelluläre apoptotische Aktivität könnte vergleichbar der jungen erkrankten Spendergruppe die gefundene erhöhte Überlebensrate bedingen. Bzgl. der ohnehin geringen intrazelluläre ROS-Produktionrate konnte ohne künstlicher oxidativer Stressung der Zellen kein deutlicher antioxidativer Einfluss des NAC auf diese festgestellt werden.

Anders bei oxidativer Stressung mit H₂O₂, bei der sich unter 1 mM NAC ebenfalls entsprechend der jungen erkrankten Spendergruppe der gewünschte hochsignifikante antioxidative ROS senkende Effekt einstellte. Diese könnte auch bei der alten erkrankten Spendergruppe Ursache der gefundenen Steigerung der zellulären Überlebensrate sein. Die signifikant geringeren proapoptischen Caspasen korrelierten gut mit dieser erhöhten Viabilität. Ob sich eine möglicherweise direkte bzw. indirekte antioxidative Wirkung von NAC auch lokal in dem ROS- bzw. RNS-reicheren Heilungsgebiet *in vivo* durch eine Überlebensverlängerung sowohl der Neutrophilen als auch der Makrophagen positiv auf die Heilung und die immunologische Effizienz der angeborenen Immunabwehr auswirken kann, müsste durch Analysen des Gewebes aus dem Heilungsgebiet überprüft werden (175).

4.4 Schlussfolgerung aus der Arbeit

Diese Arbeit untersuchte hinsichtlich der akuten Immunabwehr u.a. mögliche Ursachen des schlechten Outcomes alter Menschen nach Bruch eines langen Röhrenknochen (17). Die Analyse monozytärer anti- bzw. proinflammatorischer Botenstoffe im Blutserum zeigte, dass das im Alter bereits basal bei Gesundheit im Sinne des Inflammaging erhöhte Inflammationsgeschehen zwar im Gleichgewicht zwischen Anti- und

Proinflammation zu stehen scheint, dass jedoch bei Fraktur eine nur noch geringe und somit inadäquate Steigerung der Immunaktivität möglich scheint (22).

Bei der Untersuchung der aus Spenderblut isolierten Granulo-/Monozyten zeigten sich deutliche alters- bzw. gesundheitsabhängige Verhaltensunterschiede. Aus dem *in vitro* bei Gesundheit gefundenen verlängerten Überlebensraten dieser Zellen alter gegenüber dieser junger Spender bei verringertem apoptotischen Verhalten und höherer Toleranz oxidativen Stresses könnte geschlossen werden, dass diese im Alter wohlmöglich aufgrund von Inflammaging und chronisch erhöhter Radikalspiegel bei Gesundheit widerstandsfähiger sind als in jungen Jahren (22, 43-45). Bekannt ist ein geringeres Produktionsvermögen an neutrophilen Granulozyten im Alter, obwohl die Zahl dieser im Blut jedoch z.T. dennoch höher ist als in jungen Jahren (19, 27, 28). So könnte die Effizienz der akuten Immunabwehr in jungen Jahren durch ein hohes Produktionsvermögen dieser gewährleistet sein, während im Alter ein bekanntermaßen geringeres Produktionsvermögen durch Lebensverlängerung der Zellen kompensiert und das bei eintretendem Infekt entstehende Problem der geringeren Produktionssteigerung dadurch abgemildert wird (27, 28). Bei Fraktur hingegen konnte lediglich bei den Zellen junger Spender eine deutlich bessere Toleranz oxidativen Stresses, eine deutliche Steigerung der Überlebensrate und ein signifikant geringeres Apoptoseverhalten beobachtet werden, wohingegen diese im Alter zwar auch längere Überlebensraten aufwiesen, jedoch hierbei ein gesteigertes apoptotisches Verhalten zeigten. Es ist diesbezüglich bekannt, dass der Organismus bei Infekt in der Lage ist, die Überlebenszeit von Granulozyten bei Inflammationsgeschehen zu steigern, und dass die dazu nötige antiapoptotische Signaltransduktion im Alter deutlich schlechter funktioniert (20, 145, 146). Im Alter können Neutrophile außerdem nicht mehr angemessene Spiegel an ROS zu Kommunikationszwecken bzw. zum Abtöten von Pathogenen produzieren, möglicherweise assoziiert mit altersbedingt ineffizienteren antioxidativen Zellsystemen (42, 160). So produzierten die Zellen alter unter H_2O_2 tendenziell weniger intrazelluläre ROS als diese junger Spender und zeigten bei Fraktur eine kaum gesteigerte Toleranz gegenüber oxidativen Stresses. Bei Gesundheit könnten die Alten diese geringere ROS-Produktionsfähigkeit durch die Fähigkeit, p38-MAPK-abhängig extrazellulären Fangnetzen (NET) aus Proteinen und und DNA-Bausteinen zur Tötung von Pathogene bilden zu können, kompensieren (124). NET's werden in

Abhängigkeit zu oxidativem Stress gebildet (165). Als einzige Spendergruppe zeigte die junge gesunder keine zelluläre p38-MAPK-Erhöhung unter H_2O_2 , ein mögliches Zeichen, dass sich die Fähigkeit zur NET-Bildung erst bei größerem Infekt ausbildet, während sie im Alter bei chronisch erhöhten Radikalspiegeln von vorneherein funktioniert. Hinsichtlich nitrosativer Radikalspiegel fanden sich in den Blutseren gesunder Spender deutliche Hinweise auf höhere nitrosative Radikalspiegel im Alter (44, 176). Als möglicher Ausdruck einer Adaption an einen lokal im Heilungsgebiet bestehenden erhöhten Stickstoffbedarf bei Wund- und Knochenheilung durch ein hochgefahrenes Radikal entschärfendes System zeigten sich bei Fraktur altersunabhängig **geringere** Level systemischer nitrosativer Radikale (154, 155). Das *intrazellulär* in den untersuchten Granulo-/Monozyten gefundene tendenziell **höhere** ROS-Level bei Frakturgeschehen hingegen könnte Ausdruck der frakturbedingten Zellaktivierung sein (39-42).

NAC scheint in Abhängigkeit zum Gesundheitszustand der Spendergruppe und zur Dosis dieser Substanz einen pro- oder einen antioxidativen Einfluss auf die Granulo-/Monozyten zu haben, wie es bereits ebenfalls in der Literatur bzgl. Leukämiezellen diskutiert wird (171). Während eine Dosis von 1 mM NAC hinsichtlich der Überlebensraten bei jungen gesunden nur geringfügig zu nutzen, bei alten hingegen sogar zellschädigend zu wirken scheint, scheinen die Zellen bei Fraktur hingegen altersunabhängig einen protektiven antioxidativen Nutzen dieser Dosis zu ziehen. Ursache dieses Nutzens könnte ein ausgereifteres antioxidatives Zellsystem sowie ein höherer Spiegel zu entschärfender ROS bei Fraktur sein verbunden mit einem höheren Bedarf an dieser antioxidativ supportiven Substanz. Hinweis auf ausgereifere antioxidative Zellsysteme bei Fraktur könnten die altersunabhängig geringer gemessenen intrazellulären ROS-Spiegel unter künstlicher H_2O_2 -Stressung geben.

Im Sinne der Hypothese dieser Dissertation schienen die Granulo-/Monozyten alter Spender bei Fraktur und somit bei bestehendem Bedarf an antioxidativen Substanzen einen zellprotektiven Nutzen aus NAC ziehen zu können.

5 Ausblick

In dieser Arbeit zeigte sich altersunabhängig durch die Gabe von 1 mM NAC *in vitro* ein überlebenssteigernder Effekt auf die analysierten Granulo-/Monozyten der Spender mit Fraktur. Der Heilungsprozess eines Knochens ist mit einer Erhöhung der systemischen zelltoxischen ROS verbunden (50). Das Antioxidans NAC schien die Zellen nicht nur indirekt durch Unterstützung des zelleigenen antioxidativen Gluthationstoffwechsels zu schützen, sondern schien auch durch direkte antioxidative Wirkung von zusätzlichem antioxidativen Nutzen zu sein. So könnte in der Praxis beispielsweise während einer Operation die Applikation von NAC durch eine Dauerinfusion zum einen sinnvoll sein, um dem bekannten First-Pass-Effekt von NAC entgegenzuwirken, zum anderen, um eine hohe systemische Konzentration und somit auch die direkte antioxidative Wirkung des NAC zu gewährleisten (65, 66). In den Vorversuchen zeigte sich bezüglich einer direkten antioxidativen Wirkung von NAC ein deutlicherer antioxidativer Einfluss dessen bei Co-inkubation mit dem oxidativen Stressor H₂O₂ als es bei Präinkubation 24 h vor der oxidativen Stressung der Fall war.

Die Gabe von NAC schien jedoch in Abhängigkeit zum Gesundheitszustand der Spendergruppe und zur Dosis dieser Substanz neben einem anti- auch einen prooxidativen Einfluss auf die untersuchten Granulo-/Monozyten zu haben. Daher folgt nun bezüglich eines klinischen Nutzens von NAC hinsichtlich einer Verbesserung des Outcomes alter Menschen nach Bruch der langen Röhrenknochen eine Nutzen-Risiko-Abschätzung: Wie sich in dieser Arbeit bei den untersuchten Granulo-/Monozyten beider gesunder Spendergruppen zeigte, schien NAC *in vitro* bei fehlendem Bedarf dosisabhängig zelltoxisch zu wirken. Der gleiche Wirkstoff bewirkte also in Abhängigkeit seiner Dosis das, was man eigentlich durch diesen vermeiden wollte. Doch auch bei einer erfolgreichen Senkung *intra-* bzw. *extrazellulärer* Radikale durch NAC bei Fraktur kann nicht per se von einem Nutzen dieses Wirkstoffes ausgegangen werden. Denn ein erfolgreicher Heilungsprozess erfordert eine feine Balance zwischen den positiven und schädlichen Wirkungen von ROS: Ein Zuwenig an ROS hätte durch zu geringer desinfizierender, debridementierender und koordinierender Wirkung einen schlechten Heilungsverlauf zur Folge, wie es auch bei einem Zuviel durch Schädigung des Gewebstromas der Fall wäre (46). Unter „koordinierenden Wirkungen“ der potenten ROS fallen u.a. die Koordinierungen der im Heilungsverlauf wichtigen

Zellablösung oder der Bildung einer Zytoskelettarchitektur (152). Der Einsatz des antioxidativen NAC käme folglich bei einem Zuviel an ROS einem verbesserten Heilungsverlauf zugute, während es hingegen den reibungslosen Heilungsverlauf bei optimal geregelten ROS-Verhältnissen gefährden könnte. In der Praxis hieße dies', dass es von Nutzen wäre, einen Parameter für den Grad der oxidativen Belastung erkrankter Patienten zu finden, an welchem sich die Dosis des antioxidativ wirksamen NAC orientieren könnte. Hinsichtlich einer möglichen dosisabhängigen Schädlichkeit von Antioxidantien könnte vergleichend zum Einsatz von NAC außerdem die Reaktion erkrankter Körper auf andere antioxidativen Substanzen untersucht werden. Dadurch könnten eventuell mögliche bedingungsabhängige Risiken dieser bisher als nebenwirkungsarm gepriesenen und gerne verwendeten Substanzen aufgedeckt werden. Abschließend darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass sich in dieser Arbeit *in vitro* Hinweise auf einen möglichen Nutzen von NAC bzgl. einer verbesserten akuten Immunabwehr alter Menschen nach Bruch eines langen Röhrenknochens fanden. Daher sollte diese kostengünstige Substanz in klinischen Studien weiter hinsichtlich eines verbesserten Outcomes betroffener alter Patienten getestet werden.

Generell betrachtet sollte bei der Erforschung des Immunsystems alter Menschen bedacht werden, dass veränderte immunologische Verhaltensweisen des Organismus sei es auf humoraler, sei es auf zellulärer Ebene zunächst nicht unbedingt Ausdruck einer Schwäche an sich, sondern besser Ausdruck einer Strategieänderungen des Immunsystems aufgrund altersbedingt entstandener Schwächen sein könnte. Das Altern darf nicht als Krankheit, sondern sollte als physiologischer Prozess verstanden werden. Neben beeinflussbarer immunfördernder Verhaltensweisen wie beispielsweise einer ausgewogenen vitaminreichen Ernährung oder einer regelmäßigen körperlichen Ertüchtigung im Alltag bestimmen unbeeinflussbare Faktoren die Leistungsfähigkeit unserer immunologischen Abwehr. So sind Outcome eines größeren immunbelastenden Prozesses, Häufigkeit auftretender Infekte, aber letztendlich auch Erreichbarkeit der Höhe eines bestimmten Lebensalters eines Menschen an sich vor allem individuell abhängig vom körperlich vorhandenen Immuntyp, welcher gerade bei zunehmendem Alter entscheidend an Bedeutung gewinnt (177).

6 Zusammenfassung

Eine altersbedingte Zunahme kostenintensiverer Erkrankungsverläufe stellt unsere westliche, demographisch alternde Gesellschaft vor eine wachsende finanzielle Herausforderung und macht eine Entwicklung neuer kostensenkender Behandlungsstrategien unabdingbar. Vor diesem Hintergrund erforscht diese Dissertation einen kostengünstigen Behandlungsweg, um das immunbedingt komplikationsreiche und dadurch kostenintensive Outcome alter Menschen nach Fraktur eines langen Röhrenknochens zu verbessern. Mithilfe des nebenwirkungsarmen Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) soll hierbei die granulo- bzw. monozytäre akute Immunabwehr gestärkt werden, indem sie durch Unterstützung des zelleigenen antioxidativen Gluthationstoffwechsels vor der heilungsbedingt erhöhten oxidativen Belastung geschützt wird. Zur Untersuchung des Einflusses von NAC auf Granulo-/Monozyten *in vitro*, wurden diese mittels Dichtezentrifugation aus insgesamt 40 Spenderblutproben (jeweils 10 junge/alte Spender ohne/mit Fraktur eines langen Röhrenknochens) isoliert, photometrisch deren Überlebensverhalten und intrazelluläre Spiegel an zelltoxischen oxidativen Sauerstoffspezies (ROS) untersucht sowie mittels Immunoassay deren apoptotisches Verhalten analysiert. NAC schien sich auf diese in Abhängigkeit zum zellulären antioxidativen Bedarf sowohl positiv anti- wie auch negativ prooxidativ auszuwirken: Während sie bei Fraktur möglicherweise aufgrund ausgereifter zelleigener antioxidativer Mechanismen von NAC zu profitieren schienen, schienen sie bei Gesundheit Schaden zu nehmen. Bei fehlendem Bedarf könnte NAC möglicherweise als schädliches Prooxidans intrazellulär akkumulieren. Bei der Untersuchung möglicher altersphysiologischer Veränderungen der granulo-/monozytären Immunabwehr schienen die Granulo-/Monozyten im Alter bei Gesundheit widerstandsfähiger, bei Fraktur jedoch anfälliger auf oxidative Stressoren zu reagieren als in jungen Jahren. Ursache könnte die zelluläre Adaption an das im Sinne des „Inflammaging“ im Alter bereits basal aktivere Entzündungsgeschehen und höhere Radikalspiegel sein, während altersbedingt nur eine inadäquate Anpassung an die hohe immunologische Herausforderung einer Fraktur gelingt. Die Analyse monozytärer Botenstoffe mittels Immunoassay zeigte im Alter eine ebensolche höhere inflammatorische Grundaktivität mit einer nur inadäquaten Steigerung bei Fraktur. Im Sinne einer radikalbedingten systemischen Grundbelastung zeigten sich photometrisch bei alten bereits basal höhere nitrosative Radikalspiegel als bei jungen Spendern.

7 Literaturverzeichnis

1. Jamison, D. T., Summers, L. H., Alleyne, G., Arrow, K. J., Berkley, S., Binagwaho, A., Bustreo, F., Evans, D., Feachem, R. G., Frenk, J., Ghosh, G., Goldie, S. J., Guo, Y., Gupta, S., Horton, R., Kruk, M. E., Mahmoud, A., Mohohlo, L. K., Ncube, M., Pablos-Mendez, A., Reddy, K. S., Saxenian, H., Soucat, A., Ulltveit-Moe, K. H., and Yamey, G. (2013) Global health 2035: a world converging within a generation, *Lancet (London, England)* 382, 1898-1955.
2. Valsamis, H. A., Arora, S. K., Labban, B., and McFarlane, S. I. (2006) Antiepileptic drugs and bone metabolism, *Nutrition & metabolism* 3, 36.
3. Rushworth, G. F., and Megson, I. L. (2014) Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits, *Pharmacology & therapeutics* 141, 150-159.
4. Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., and Gallo, R. (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia, *Blood* 54 (3), 713-733.
5. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *International journal of cancer. Journal international du cancer* 26 (2), 171-176.
6. National Institute on Aging, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services (2011) Global Health and Ageing, *NIH Publication 11-7737*, 1-26.
7. Cassel, D. (2001) Demographischer Wandel - Folgen für die Gesetzliche Krankenversicherung, *Wirtschaftsdienst* 81 (2), 87-91.
8. Osterkamp, R. (2005) [Population developments in Germany until 2050], *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 76, 10-18.
9. Oni, T., and Unwin, N. (2015) Why the communicable/non-communicable disease dichotomy is problematic for public health control strategies: implications of multimorbidity for health systems in an era of health transition, *International health* 7 (6), 390-399.
10. Boutayeb, A. (2006) The double burden of communicable and non-communicable diseases in developing countries, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100, 191-199.
11. Beaglehole, R., Bonita, R., Horton, R., Adams, C., Alleyne, G., Asaria, P., Baugh, V., Bekedam, H., Billo, N., Casswell, S., Cecchini, M., Colagiuri, R., Colagiuri, S., Collins, T., Ebrahim, S., Engelgau, M., Galea, G., Gaziano, T., Geneau, R., Haines, A., Hospedales, J., Jha, P., Keeling, A., Leeder, S., Lincoln, P., McKee, M., Mackay, J., Magnusson, R., Moodie, R., Mwatsama, M., Nishtar, S., Norrving, B., Patterson, D., Piot, P., Ralston, J., Rani, M., Reddy, K. S., Sassi, F., Sheron, N., Stuckler, D., Suh, I., Torode, J., Varghese, C., and Watt, J. (2011) Priority actions for the non-communicable disease crisis, *Lancet (London, England)* 377 (9775), 1438-1447.
12. Ambrose, A. F., Paul, G., and Hausdorff, J. M. (2013) Risk factors for falls among older adults: a review of the literature, *Maturitas* 75, 51-61.
13. White, S. C., Atchison, K. A., Gornbein, J. A., Nattiv, A., Paganini-Hill, A., Service, S. K., and Yoon, D. C. (2005) Change in mandibular trabecular pattern and hip fracture rate in elderly women, *Dento maxillo facial radiology* 34 (3), 168-174.
14. Roberts, S. E., and Goldacre, M. J. (2003) Time trends and demography of mortality after fractured neck of femur in an English population, 1968-98: database study, *Bmj* 327 (7418), 771-775.
15. Smektala, R., Ohmann, C., Paeck, S., Neuhaus, E., Rieger, M., Schwabe, W., Debold, P., Deimling, A., Jonas, M., Hupe, K., Bucker-Nott, H. J., Giani, G., Szucs, T. D., and Pientka, L. (2005) [On the prognosis of hip fractures. Assessment of mortality after hip fractures by analyzing overlapping segments of longitudinal data], *Der Unfallchirurg* 108, 927-928, 930-937.
16. Kanis, J. A., Oden, A., McCloskey, E. V., Johansson, H., Wahl, D. A., and Cooper, C. (2012) A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide, *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 23 (9), 2239-2256.
17. Krishnan, M., Beck, S., Havelock, W., Eeles, E., Hubbard, R. E., and Johansen, A. (2014) Predicting outcome after hip fracture: using a frailty index to integrate comprehensive geriatric assessment results, *Age and ageing* 43 (1), 122-126.
18. Gruber, R., Koch, H., Doll, B. A., Tegtmeier, F., Einhorn, T. A., and Hollinger, J. O. (2006) Fracture healing in the elderly patient, *Experimental gerontology* 41 (11), 1080-1093.
19. Lord, J. M., Butcher, S., Killampali, V., Lascelles, D., and Salmon, M. (2001) Neutrophil ageing and immunosenescence, *Mechanisms of ageing and development* 122 (14), 1521-1535.
20. Panda, A., Arjona, A., Sapey, E., Bai, F., Fikrig, E., Montgomery, R. R., Lord, J. M., and Shaw, A. C. (2009) Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age, *Trends in immunology* 30 (7), 325-333.

21. Agarwal, S., and Busse, P. J. (2010) Innate and adaptive immunosenescence, *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 104 (3), 183-190; quiz 190-182, 210.
22. Goto, M. (2008) Inflammaging (inflammation + aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory?, *Bioscience trends* 2 (6), 218-230.
23. Castle, S. C. (2000) Clinical relevance of age-related immune dysfunction, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 31 (2), 578-585.
24. Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system, *Science* 327 (5963), 291-295.
25. Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015) Control of adaptive immunity by the innate immune system, *Nature immunology* 16 (4), 343-353.
26. Kolaczkowska, E., and Kubes, P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation, *Nature reviews. Immunology* 13, 159-175.
27. Chatta, G. S., Andrews, R. G., Rodger, E., Schrag, M., Hammond, W. P., and Dale, D. C. (1993) Hematopoietic progenitors and aging: alterations in granulocytic precursors and responsiveness to recombinant human G-CSF, GM-CSF, and IL-3, *Journal of gerontology* 48 (5), M207-212.
28. Angelis, P., Scharf, S., and Christophidis, N. (1997) Effects of age on neutrophil function and its relevance to bacterial infections in the elderly, *Journal of clinical & laboratory immunology* 49 (1), 33-40.
29. Gosain, A., and DiPietro, L. A. (2004) Aging and wound healing, *World journal of surgery* 28, 321-326.
30. Auffray, C., Sieweke, M. H., and Geissmann, F. (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells, *Annual review of immunology* 27, 669-692.
31. Devaraj, S., and Jialal, I. (2011) C-reactive protein polarizes human macrophages to an M1 phenotype and inhibits transformation to the M2 phenotype, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31 (6), 1397-1402.
32. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends in immunology* 25, 677-686.
33. Mills, C. D. (2012) M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease, *Critical reviews in immunology* 32 (6), 463-488.
34. Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T. D., Emde, M., Schmidleithner, L., Ganesan, H., Nino-Castro, A., Mallmann, M. R., Labzin, L., Theis, H., Kraut, M., Beyer, M., Latz, E., Freeman, T. C., Ulas, T., and Schultze, J. L. (2014) Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation, *Immunity* 40 (2), 274-288.
35. Shaw, A. C., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A., and Lord, J. M. (2010) Aging of the innate immune system, *Current opinion in immunology* 22 (4), 507-513.
36. Ray, P. D., Huang, B. W., and Tsuji, Y. (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cellular signalling* 24 (5), 981-990.
37. Pourova, J., Kottova, M., Voprsalova, M., and Pour, M. (2010) Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes, *Acta physiologica (Oxford, England)* 198 (1), 15-35.
38. Zafarullaha, M., Lia, W. Q., Sylvestera, J., and M., A. (2003) Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions, *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 6-20.
39. Kovalenko, E. I., Boyko, A. A., Semenov, V. F., Lutsenko, G. V., Grechikhina, M. V., Kanevskiy, L. M., Azhikina, T. L., Telford, W. G., and Sapozhnikov, A. M. (2014) ROS production, intracellular HSP70 levels and their relationship in human neutrophils: effects of age, *Oncotarget* 5 (23), 11800-11812.
40. Fialkow, L., Wang, Y., and Downey, G. P. (2007) Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function, *Free radical biology & medicine* 42, 153-164.
41. Roy, S., Khanna, S., Nallu, K., Hunt, T. K., and Sen, C. K. (2006) Dermal wound healing is subject to redox control, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 13, 211-220.
42. Moroni, F., Di Paolo, M. L., Rigo, A., Cipriano, C., Giacconi, R., Recchioni, R., Marcheselli, F., Malavolta, M., and Mocchegiani, E. (2005) Interrelationship among neutrophil efficiency, inflammation, antioxidant activity and zinc pool in very old age, *Biogerontology* 6, 271-281.
43. Fusi, J., Guidotti, E., Innocenti, A., Tocchini, L., Ricciardi, E., Rossi, M., Galetta, F., Santoro, G., and Franzoni, F. (2015) Regular physical activity prevents nitrosative stress caused by ageing in elderly athletes, *The Journal of Sport and Anatomy* 1, 2-7.
44. Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *Journal of gerontology* 11 (3), 298-300.
45. Biesalski, H. K. (2002) Free radical theory of aging, *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 5 (1), 5-10.
46. Bryan, N., Ahswin, H., Smart, N., Bayon, Y., Wohlert, S., and Hunt, J. A. (2012) Reactive oxygen species (ROS)--a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing, *European cells & materials* 24, 249-265.

47. Baudouin-Cornu, P., Lagniel, G., Kumar, C., Huang, M. E., and Labarre, J. (2012) Glutathione degradation is a key determinant of glutathione homeostasis, *The Journal of biological chemistry* 287 (7), 4552-4561.
48. McPherson, R. A., and Hardy, G. (2012) Cysteine: the Fun-Ke nutraceutical, *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 28 (3), 336-337.
49. Aquilano, K., Baldelli, S., and Ciriolo, M. R. (2014) Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant, *Frontiers in pharmacology* 5, 196.
50. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The international journal of biochemistry & cell biology* 39 (1), 44-84.
51. Taverne, Y. J., Bogers, A. J., Duncker, D. J., and Merkus, D. (2013) Reactive oxygen species and the cardiovascular system, *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, 1-15.
52. Cadenas, E., and Davies, K. J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free radical biology & medicine* 29 (3-4), 222-230.
53. Fernández-Checa, J. C., Kaplowitz, N., García-Ruiz, C., Colell, A., Miranda, M., Mari, M., Ardite, E., and Morales, A. (1997) GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect, *The American journal of physiology* 273, G7-17.
54. Zastrow, L., Groth, N., Klein, F., Kockott, D., Lademann, J., and Ferrero, L. (2009) [UV, visible and infrared light. Which wavelengths produce oxidative stress in human skin?], *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 60 (4), 310-317.
55. Uppu, R. M., Nossaman, B. D., Greco, A. J., Fokin, A., Murthy, S. N., Fonseca, V. A., and Kadowitz, P. J. (2007) Cardiovascular effects of peroxynitrite, *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 34 (9), 933-937.
56. Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M., and Cayota, A. (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems, *Free radical biology & medicine* 30 (5), 463-488.
57. Bauer, G. (2000) Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis, *Anticancer research* 20 (6b), 4115-4139.
58. Oliveira, B. F., Nogueira-Machado, J. A., and Chaves, M. M. (2010) The role of oxidative stress in the aging process, *TheScientificWorldJournal* 10, 1121-1128.
59. Diwan, A. D., Wang, M. X., Jang, D., Zhu, W., and Murrell, G. A. (2000) Nitric oxide modulates fracture healing, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 15 (2), 342-351.
60. Witte, M. B., and Barbul, A. (2002) Role of nitric oxide in wound repair, *American journal of surgery* 183 (4), 406-412.
61. Ricart-Jane, D., Llobera, M., and Lopez-Tejero, M. D. (2002) Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method, *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 6 (2), 178-185.
62. Marshall, H. E., and Stamler, J. S. (2002) Nitrosative stress-induced apoptosis through inhibition of NF-kappa B, *The Journal of biological chemistry* 277 (37), 34223-34228.
63. Radi, R. (2009) Peroxynitrite and reactive nitrogen species: the contribution of ABB in two decades of research, *Archives of biochemistry and biophysics* 484 (2), 111-113.
64. Hurst, G. A., Shaw, P. B., and LeMaistre, C. A. (1967) Laboratory and clinical evaluation of the mucolytic properties of acetylcysteine, *The American review of respiratory disease* 96 (5), 962-970.
65. Kelly, G. S. (1998) Clinical applications of N-acetylcysteine, *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 3 (2), 114-127.
66. Poole, P., Black, P. N., and Cates, C. J. (2012) Mucolytic agents for chronic bronchitis or chronic obstructive pulmonary disease, *The Cochrane database of systematic reviews* 8, Cd001287.
67. Prescott, L. F., Illingworth, R. N., Critchley, J. A., Stewart, M. J., Adam, R. D., and Proudfoot, A. T. (1979) Intravenous N-acetylcystine: the treatment of choice for paracetamol poisoning, *British medical journal* 2 (6198), 1097-1100.
68. Hynninen, M. S., Niemi, T. T., Poyhia, R., Raininko, E. I., Salmenpera, M. T., Lepantalo, M. J., Railo, M. J., and Tallgren, M. K. (2006) N-acetylcysteine for the prevention of kidney injury in abdominal aortic surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Anesthesia and analgesia* 102, 1638-1645.
69. Mahmoud, K. M., and Ammar, A. S. (2011) Effect of N-acetylcysteine on cardiac injury and oxidative stress after abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial, *Acta Anaesthesiol Scand* 55, 1015-1021.
70. Molnar, Z., Szakmany, T., and Koszegi, T. (2003) Prophylactic N-acetylcysteine decreases serum CRP but not PCT levels and microalbuminuria following major abdominal surgery. A prospective, randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical trial, *Intensive care medicine* 29, 749-755.
71. Szakmany, T., Toth, I., Marton, S., and Molnar, Z. (2002) [Effect of prophylactic N-acetylcysteine on postoperative organ dysfunction and inflammatory markers after major abdominal surgery for cancer. Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial], *Magy Seb* 55, 369-374.

72. Ehnert, S., Döbele, S., Braun, K. F., Burkhardt, B., Hofmann, V., Hausmann, M., Egaña, J. T., Stöckle, U., Freude, T., and Nussler, A. K. (2012) N-Acetylcysteine and flavonoid rich diet: The protective effect of 15 different antioxidants on cigarette smoke-damaged primary human osteoblasts, *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3, 1129-1139.
73. Bagchi, D., Bagchi, M., Ray, S. D., Stohs, S. J., Kuszynski, C. A., Pruess, H. G., and Joshi, S. S. (2000) Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention, *Toxicology* 148, 187-197.
74. Atkuri, K. R., Mantovani, J. J., Herzenberg, L. A., and Herzenberg, L. A. (2007) N-Acetylcysteine - a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency, *Current opinion in pharmacology* 7 (4), 355-359.
75. Simunovic, N., Devereaux, P. J., Sprague, S., Guyatt, G. H., Schemitsch, E., Debeer, J., and Bhandari, M. (2010) Effect of early surgery after hip fracture on mortality and complications: systematic review and meta-analysis, *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 182 (15), 1609-1616.
76. Yang, M., Li, C. W., and Yang, J. (2002) Cell docking and on-chip monitoring of cellular reactions with a controlled concentration gradient on a microfluidic device, *Analytical chemistry* 74 (16), 3991-4001.
77. Strober, W. (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability, *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.] Appendix 3, A.3B.1-A.3B.2.*
78. Jepsen, L. V., and Skottun, T. (1982) A rapid one-step method for the isolation of human granulocytes from whole blood, *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 42 (3), 235-238.
79. Segal, A. W., Fortunato, A., and Herd, T. (1980) A rapid single centrifugation step method for the separation of erythrocytes, granulocytes and mononuclear cells on continuous density gradients of Percoll, *Journal of immunological methods* 32 (3), 209-214.
80. Giudicelli, J., Philip, P. J., Delque, P., and Sudaka, P. (1982) A single-step centrifugation method for separation of granulocytes and mononuclear cells from blood using discontinuous density gradient of Percoll, *Journal of immunological methods* 54 (1), 43-46.
81. Munteanu, L. S., and Dinu, A. (2004) Fractionation of granulocytes from whole human blood by centrifugation. Practical hints. , *Romanian Journal of Biophysics* 14 (1-4), 53-58.
82. English, D., and Andersen, B. R. (1974) Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque, *Journal of immunological methods* 5 (3), 249-252.
83. Eggleton, P., Gargan, R., and Fisher, D. (1989) Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers, *Journal of immunological methods* 121 (1), 105-113.
84. Dorko, K., Freeswick, P. D., Bartoli, F., Cicalese, L., Bardsley, B. A., Tzakis, A., and Nussler, A. K. (1994) A new technique for isolating and culturing human hepatocytes from whole or split livers not used for transplantation, *Cell transplantation* 3 (5), 387-395.
85. Mayadas, T. N., Cullere, X., and Lowell, C. A. (2014) The multifaceted functions of neutrophils, *Annual review of pathology* 9, 181-218.
86. Bratton, D. L., and Henson, P. M. (2011) Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins, *Trends in immunology* 32, 350-357.
87. Zhou, L., Somasundaram, R., Nederhof, R. F., Dijkstra, G., Faber, K. N., Peppelenbosch, M. P., and Fuhler, G. M. (2012) Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies, *Clinical and vaccine immunology : CVI* 19 (7), 1065-1074.
88. Binder, T., Diem, H., Fuchs, R., Gutensohn, K., and Nebe, T. (2012) [Pappenheim Stain: Description of a hematological standard stain – history, chemistry, procedure, artifacts and problem solutions], *The Journal of Laboratory Medicine* 36(5), 293-309.
89. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *European journal of biochemistry / FEBS* 267 (17), 5421-5426.
90. Tarpey, M. M., Wink, D. A., and Grisham, M. B. (2004) Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 286 (3), R431-444.
91. Smith, J. A., and Weidemann, M. J. (1993) Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry, *Journal of immunological methods* 162 (2), 261-268.
92. Gao, F., Yi, J., Yuan, J. Q., Shi, G. Y., and Tang, X. M. (2004) The cell cycle related apoptotic susceptibility to arsenic trioxide is associated with the level of reactive oxygen species, *Cell research* 14 (1), 81-85.
93. Du, J. H., Zhang, H. D., Ma, Z. J., and Ji, K. M. (2010) Artesunate induces oncosis-like cell death in vitro and has antitumor activity against pancreatic cancer xenografts in vivo, *Cancer chemotherapy and pharmacology* 65 (5), 895-902.
94. Joshi, G., Perluigi, M., Sultana, R., Agrippino, R., Calabrese, V., and Butterfield, D. A. (2006) In vivo protection of synaptosomes by ferulic acid ethyl ester (FAEE) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane)dihydrochloride (AAPH) or Fe(2+)/H(2)O(2): insight into mechanisms of

- neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders, *Neurochemistry international* 48 (4), 318-327.
95. Moshage, H., Kok, B., Huizenga, J. R., and Jansen, P. L. (1995) Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation, *Clinical chemistry* 41 (6 Pt 1), 892-896.
96. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids, *Analytical biochemistry* 126 (1), 131-138.
97. Griess, P. (1858) Vorläufige Notiz über die Einwirkung von salpêtriger Säure auf Amidinitro- und Aminotrophenylsäure, *Annalen der Chemie und Pharmacie Bd. 106*, 123-125.
98. Nussler, A. K., Glanemann, M., Schirmeier, A., Liu, L., and Nussler, N. C. (2006) Fluorometric measurement of nitrite/nitrate by 2,3-diaminonaphthalene, *Nature protocols* 1, 2223-2226.
99. Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., and Fein, H. (2003) Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay, *Sensors* 3, 276-284.
100. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent., *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.
101. Rahman, I., Kode, A., and Biswas, S. K. (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method, *Nature protocols* 1 (6), 3159-3165.
102. Biswas, S. K., and Mantovani, A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm, *Nature immunology* 11 (10), 889-896.
103. PeproTech®. Human IL-4 Mini ABTS ELISA Development Kit # 900-M14, in <https://www.peprotech.com/Lists/PTCoA/900-M14%20Lot%200413014-M.pdf?id=18087>, 21.03.2016, 16:56 Uhr.
104. PeproTech®. Human IL-12 Mini ABTS ELISA Development Kit # 900-M96, in <https://www.peprotech.com/Lists/PTCoA/900-M96%20Lot%200413096-M.pdf?id=18165> 21.03.2016, 17:05 Uhr.
105. PeproTech®. Human IL-13 Mini ABTS ELISA Development Kit # 900-K23, in <https://www.peprotech.com/Lists/PTCoA/900-K23%20Lot%200906023.pdf?id=17986> 21.03.2016, 17:10 Uhr.
106. Haan, C., and Behrmann, I. (2007) A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background, *Journal of immunological methods* 318 (1-2), 11-19.
107. Lequin, R. M. (2005) Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Clinical chemistry* 51 (12), 2415-2418.
108. Abcam®. WESTERN BLOTTING (WB) - A BEGINNER'S GUIDE in http://download.bioon.com.cn/upload/month_0909/20090903_7cec9bb624d78a84edd7yK95a7ocVrHn.attach.pdf, 17.03.2016, 17:15 Uhr.
109. Cell Signaling Technology, I. (2013) PathScan® Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kit # 12856 in <http://media.cellsignal.com/pdf/12856.pdf>, 16.03.2016, 18:00 Uhr.
110. Boatright, K. M., and Salvesen, G. S. (2003) Mechanisms of caspase activation, *Current opinion in cell biology* 15 (6), 725-731.
111. Bartek, J., and Lukas, J. (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer, *Cancer cell* 3 (5), 421-429.
112. Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., and Vousden, K. H. (2015) p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill, *Nature reviews. Molecular cell biology* 16 (7), 393-405.
113. Karin, M., and Gallagher, E. (2005) From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance, *IUBMB life* 57 (4/5), 283-295.
114. Yang, J., Wahdan-Alaswad, R., and Danielpour, D. (2009) Critical role of Smad2 in tumor suppression and transforming growth factor-beta-induced apoptosis of prostate epithelial cells, *Cancer research* 69 (6), 2185-2190.
115. Ajibade, A. A., Wang, H. Y., and Wang, R. F. (2013) Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling, *Trends in immunology* 34, 307-316.
116. Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream, *Cell* 129 (7), 1261-1274.
117. Salvesen, G. S., and Duckett, C. S. (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door, *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (6), 401-410.
118. Qi, Z., Shen, L., Zhou, H., Jiang, Y., Lan, L., Luo, L., and Yin, Z. (2014) Phosphorylation of heat shock protein 27 antagonizes TNF-alpha induced HeLa cell apoptosis via regulating TAK1 ubiquitination and activation of p38 and ERK signaling, *Cellular signalling* 26 (7), 1616-1625.
119. Ho, J. Q., Asagiri, M., Hoffmann, A., and Ghosh, G. (2011) NF-kappaB potentiates caspase independent hydrogen peroxide induced cell death, *PLoS one* 6 (2), 1-9.
120. Jacobs, M. D., and Harrison, S. C. (1998) Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex, *Cell* 95 (6), 749-758.

121. Papa, S., Bubici, C., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Kuntzen, C., Knabb, J. R., Dean, K., and Franzoso, G. (2006) The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease, *Cell death and differentiation* 13 (5), 712-729.
122. Wang, Y., Zeigler, M. M., Lam, G. K., Hunter, M. G., Eubank, T. D., Khramtsov, V. V., Tridandapani, S., Sen, C. K., and Marsh, C. B. (2007) The role of the NADPH oxidase complex, p38 MAPK, and Akt in regulating human monocyte/macrophage survival, *American journal of respiratory cell and molecular biology* 36 (1), 68-77.
123. Alvarado-Kristensson, M., Melander, F., Leandersson, K., Ronnstrand, L., Wernstedt, C., and Andersson, T. (2004) p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils, *The Journal of experimental medicine* 199 (4), 449-458.
124. Keshari, R. S., Verma, A., Barthwal, M. K., and Dikshit, M. (2013) Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils, *Journal of cellular biochemistry* 114, 532-540.
125. Geiss, S., and Einax, J. W. (2001) Comparison of detection limits in environmental analysis--is it possible? An approach on quality assurance in the lower working range by verification, *Fresenius' journal of analytical chemistry* 370, 673-678.
126. Kruskal, W. H., Wallis, W. A. (1952) Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis., *Journal of the American Statistical Association* 47, 583-621.
127. Dunn, O. J. (1961) Multiple Comparisons Among Means., *Journal of the American Statistical Association* 56, 52-64.
128. Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., and Akdis, C. A. (2011) Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases, *The Journal of allergy and clinical immunology* 127 (3), 701-721.
129. Luo, H. R., Hattori, H., Hossain, M. A., Hester, L., Huang, Y., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Nagata, E., and Snyder, S. H. (2003) Akt as a mediator of cell death, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (20), 11712-11717.
130. Aitio, M. L. (2006) N-acetylcysteine - passe-partout or much ado about nothing?, *British journal of clinical pharmacology* 61 (1), 5-15.
131. Ratiopharm-GmbH. (2014) NAC-ratiopharm® 200 mg Brausetabletten, NAC-ratiopharm® 600 mg Brausetabletten, in <http://www.fachinfo.de/suche/fi/010690> 24.03.2016, 10:28 Uhr, p Fachinformation, Fachinfo-Service® (Rote Liste).
132. Carl-Roth-GmbH. Spezifikation N-Acetyl-L-cystein > 98%, in https://www.carlroth.com/downloads/spez/de/4/SPEZ_4126_DE.pdf 24.03.2016, 10:30 Uhr, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe.
133. Allegra, L., Sasso, M. D., Bovio, C., Massoni, C., Fonti, E., and Braga, P. C. (2002) Human Neutrophil Oxidative Bursts and their in vitro Modulation by Different N-Acetylcysteine Concentrations, *Arzneimittelforschung* 52, 669-676.
134. Li, Y., Wei, G., and Chen, J. (2004) Glutathione: a review on biotechnological production, *Applied microbiology and biotechnology* 66 (3), 233-242.
135. Burgunder, J. M., Varriale, A., and Lauterburg, B. H. (1989) Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration, *European journal of clinical pharmacology* 36 (2), 127-131.
136. Ershler, W. B., and Keller, E. T. (2000) Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty, *Annual review of medicine* 51, 245-270.
137. Arican, O., Aral, M., Sasmaz, S., and Ciragil, P. (2005) Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity, *Mediators of inflammation* 2005 (5), 273-279.
138. Kim, H. O., Kim, H. S., Youn, J. C., Shin, E. C., and Park, S. (2011) Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays, *Journal of translational medicine* 9 (113), 1-7.
139. Fulop, T., Larbi, A., Douziech, N., Fortin, C., Guerard, K. P., Lesur, O., Khalil, A., and Dupuis, G. (2004) Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging, *Aging cell* 3, 217-226.
140. Hughes, R., Qian, B. Z., Rowan, C., Muthana, M., Keklikoglou, I., Olson, O. C., Tazzyman, S., Danson, S., Addison, C., Clemons, M., Gonzalez-Angulo, A. M., Joyce, J. A., De Palma, M., Pollard, J. W., and Lewis, C. E. (2015) Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy, *Cancer research* 75 (17), 3479-3491.
141. Castle, S., Uyemura, K., Wong, W., Modlin, R., and Effros, R. (1997) Evidence of enhanced type 2 immune response and impaired upregulation of a type 1 response in frail elderly nursing home residents, *Mechanisms of ageing and development* 94, 7-16.
142. Lio, D., Scola, L., Crivello, A., Colonna-Romano, G., Candore, G., Bonafè, M., Cavallone, L., Franceschi, C., and Caruso, C. (2002) Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity, *Genes and immunity* 3 (1), 30-33.

143. Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., and Hymowitz, S. G. (2011) Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease, *Annual review of immunology* 29, 71-109.
144. Martinez, F. O., and Gordon, S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, *F1000prime reports* 6 (13), 1-13.
145. Tak, T., Tesselaar, K., Pillay, J., Borghans, J. A., and Koenderman, L. (2013) What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited, *Journal of leukocyte biology* 94, 595-601.
146. Basu, S., Hodgson, G., Katz, M., and Dunn, A. R. (2002) Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation, *Blood* 100 (3), 854-861.
147. Sakamoto, C., Suzuki, K., Hato, F., Akahori, M., Hasegawa, T., Hino, M., and Kitagawa, S. (2003) Antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and cyclic AMP on human neutrophils: protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent mechanisms and the role of the Janus kinase-STAT pathway, *International journal of hematology* 77 (1), 60-70.
148. Tortorella, C., Simone, O., Piazzolla, G., Stella, I., and Antonaci, S. (2007) Age-related impairment of GM-CSF-induced signalling in neutrophils: role of SHP-1 and SOCS proteins, *Ageing research reviews* 6 (2), 81-93.
149. Chaves, M. M., Costa, D. C., de Oliveira, B. F., Rocha, M. I., and Nogueira-Machado, J. A. (2009) Role PKA and p38 MAPK on ROS production in neutrophil age-related: Lack of IL-10 effect in older subjects, *Mechanisms of ageing and development* 130, 588-591.
150. Schäfer, M., and Werner, S. (2008) Oxidative stress in normal and impaired wound repair, *Pharmacological research* 58 (2), 165-171.
151. Caldefie-Chezet, F., Walrand, S., Moinard, C., Tridon, A., Chassagne, J., and Vasson, M. P. (2002) Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 319 (1), 9-17.
152. Muliyl, S., and Narasimha, M. (2014) Mitochondrial ROS regulates cytoskeletal and mitochondrial remodeling to tune cell and tissue dynamics in a model for wound healing, *Developmental cell* 28 (3), 239-252.
153. Fan, Q., Chen, L., Cheng, S., Li, F., Lau, W. B., Wang le, F., and Liu, J. H. (2014) Aging aggravates nitrate-mediated ROS/RNS changes, *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014, 1-7.
154. Urtasun, R., Conde de la Rosa, L., and Nieto, N. (2008) Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response, *Clinics in liver disease* 12 (4), 769-790, viii.
155. Schwentker, A., Vodovotz, Y., Weller, R., and Billiar, T. R. (2002) Nitric oxide and wound repair: role of cytokines?, *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 7 (1), 1-10.
156. Schäffer, M. R., Tantry, U., Gross, S. S., Wasserburg, H. L., and Barbul, A. (1996) Nitric oxide regulates wound healing, *The Journal of surgical research* 63 (1), 237-240.
157. Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., and Milzani, A. (2005) Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics, *Mass spectrometry reviews* 24, 55-99.
158. Harbort, C. J., Soeiro-Pereira, P. V., von Bernuth, H., Kaindl, A. M., Costa-Carvalho, B. T., Condino-Neto, A., Reichenbach, J., Roesler, J., Zychlinsky, A., and Amulic, B. (2015) Neutrophil oxidative burst activates ATM to regulate cytokine production and apoptosis, *Blood* 126 (26), 2842-2851.
159. Xu, Y., Loison, F., and Luo, H. R. (2010) Neutrophil spontaneous death is mediated by down-regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3Kgamma, ROS, and actin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2950-2955.
160. El Kebir, D., and Filep, J. G. (2013) Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through beta2 Integrins, *Frontiers in immunology* 4 (60), 1-15.
161. Winterbourn, C. C., Kettle, A. J., and Hampton, M. B. (2016) Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function, *Annual review of biochemistry* 85, 765-792.
162. Melley, D. D., Evans, T. W., and Quinlan, G. J. (2005) Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome, *Clinical science (London, England : 1979)* 108, 413-424.
163. Lee, W. L., Harrison, R. E., and Grinstein, S. (2003) Phagocytosis by neutrophils, *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5 (14), 1299-1306.
164. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science* 303, 1532-1535.
165. Papayannopoulos, V., and Zychlinsky, A. (2009) NETs: a new strategy for using old weapons, *Trends in immunology* 30, 513-521.
166. Fuchs, T. A., Brill, A., and Wagner, D. D. (2012) Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32, 1777-1783.

167. Roche, J. J., Wenn, R. T., Sahota, O., and Moran, C. G. (2005) Effect of comorbidities and postoperative complications on mortality after hip fracture in elderly people: prospective observational cohort study, *Bmj* 331 (7529), 1-5.
168. Demers, M., Krause, D. S., Schatzberg, D., Martinod, K., Voorhees, J. R., Fuchs, T. A., Scadden, D. T., and Wagner, D. D. (2012) Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (32), 13076-13081.
169. Sagristá, M. L., García, A. F., De Madariaga, M. A., and Mora, M. (2002) Antioxidant and Pro-oxidant Effect of the Thiolic Compounds N-acetyl-l-cysteine and Glutathione against Free Radical-induced Lipid Peroxidation, *Free Radical Research* 36 (3), 329-340.
170. Oh, S. H., and Lim, S. C. (2006) A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation, *Toxicology and applied pharmacology* 212 (3), 212-223.
171. Finn, N. A., and Kemp, M. L. (2012) Pro-oxidant and antioxidant effects of N-acetylcysteine regulate doxorubicin-induced NF-kappa B activity in leukemic cells, *Molecular bioSystems* 8, 650-662.
172. Klein, J. B., Rane, M. J., Scherzer, J. A., Coxon, P. Y., Kettritz, R., Mathiesen, J. M., Buridi, A., and McLeish, K. R. (2000) Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Delays Neutrophil Constitutive Apoptosis Through Phosphoinositide 3-Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways, *The Journal of Immunology* 164, 4286-4291.
173. Solaroglu, I., Tsubokawa, T., Cahill, J., and Zhang, J. H. (2006) Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat, *Neuroscience* 143 (4), 965-974.
174. Swift, M. E., Burns, A. L., Gray, K. L., and DiPietro, L. A. (2001) Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury, *The Journal of investigative dermatology* 117 (5), 1027-1035.
175. Sanmun, D., Witas, E., Jitkaew, S., Tyurina, Y. Y., Kagan, V. E., Ahlin, A., Palmblad, J., and Fadeel, B. (2009) Involvement of a functional NADPH oxidase in neutrophils and macrophages during programmed cell clearance: implications for chronic granulomatous disease, *American journal of physiology. Cell physiology* 297 (3), C621-631.
176. Martins Chaves, M., Rocha-Vieira, E., Pereira dos Reis, A., de Lima e Silva, R., Gerzstein, N. C., and Nogueira-Machado, J. A. (2000) Increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocytosing granulocytes related to age, *Mechanisms of ageing and development* 119 (1/2), 1-8.
177. Balistreri, C. R., Candore, G., Accardi, G., Bova, M., Buffà, S., Bulati, M., Forte, G. I., Listi, F., Martorana, A., Palmeri, M., Pellicano, M., Vaccarino, L., Scola, L., Lio, D., and Colonna-Romano, G. (2012) Genetics of longevity. data from the studies on Sicilian centenarians, *Immunity and Ageing* 9 (1), 1-10.
178. Allegra, L., Dal Sasso, M., Bovio, C., Massoni, C., Fonti, E., and Braga, P. C. (2002) Human neutrophil oxidative bursts and their in vitro modulation by different N-acetylcysteine concentrations, *Arzneimittelforschung* 52 (9), 669-676.
179. Fitri, L. E., Sardjono, T. W., Simamora, D., Sumarno, R. P., and Setyawati, S. K. (2011) High dose of N-acetylcysteine increase H2O2 and MDA levels and decrease GSH level of HUVECs exposed with malaria serum, *Tropical biomedicine* 28 (1), 7-15.
180. Kelly, K. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H., and Levin, E. D. (1998) Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems, *Environmental health perspectives* 106 (7), 375-384.
181. Hommel, A., Ulander, K., Bjorkelund, K. B., Norrman, P. O., Wingstrand, H., and Thorngren, K. G. (2008) Influence of optimised treatment of people with hip fracture on time to operation, length of hospital stay, reoperations and mortality within 1 year, *Injury* 39 (10), 1164-1174.

8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Siegfried Weller Institut für Unfallmedizinische Forschung an der Klinik für Unfallchirurgie der Eberhard-Karls-Universität, Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Andreas K. Nüssler im Rahmen eines Stipendium-programmes des IZKF-Promotionskollegs der Universität Tübingen in Verbindung mit einem Freisemester durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Andreas K. Nüssler, Doktorvater und Institutsleiter sowie Dr. Sabrina Ehnert, meiner persönlichen Supervisorin.

Die ärztlichen Aufklärungsgespräche der Patienten zur Blutentnahme im Rahmen der durch die Ethikkommission bewilligten Studie (*Prj.-Nr. 363/2012BO2*) erfolgten durch Dr. med. Christoph Ihle. Die Einwilligung der Probanden erfolgte durch Ausfüllen einer Einwilligungserklärung mit Unterschrift. Die Blutentnahmen erfolgten ebenfalls durch Herrn Dr. med. Ihle sowie durch mich selbst.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Sabrina Ehnert, Patrysia Lacorte und Bianca Braun von mir eigenständig sowie mit Unterstützung durch Dr. Sabrina Ehnert durchgeführt. Die HL-60- und THP-1-Zelllinien wurden von Patrysia Lacorte angezüchtet und von mir eigenständig weiter kultiviert. Methoden zur ELISA-Analyse der im Blutserum befindlichen Zytokine GM-CSF, IFN- γ , Il-10, TNF- α wurden unter Dr. Sabrina Ehnert im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe durchgeführt, die Proteinkonzentrationsanalyse zur Normierung der daraus resultierenden Ergebnisse erfolgte durch mich.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Sabrina Ehnert durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Prof. Dr. Marlies Knipper im Rahmen des IZKF- Stipendiumprogrammes und Dr. Sabrina Ehnert verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Cand. med. Martin Radermacher

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Andreas Nüssler, der mir dieses mir persönlich medizinisch sehr wichtige gerontologische Forschungsthema vorschlug, mir eine erfolgreiche Teilnahme am IZKF-Promotionskolleg-Stipendium der Eberhard Karls Universität Tübingen ermöglichte, mir mit seinen fachlichen Erfahrungen und Ratschlägen zur Seite stand und auch für meine private Situation im Laufe der Dissertationsarbeit aufmunterndes Verständnis und Ratschläge in seiner Erfahrung als Familienvater entgegenbrachte. Herzlichen Dank auch an meine Betreuerin Dr. Sabrina Ehnert, welche auch in kniffligen Fragen stets eine gute Antwort parat hatte. Durch ihren großen Erfahrungsschatz mit medizinischen Doktoranten konnte sie mich zu einer zielführenden strukturierten Arbeitsweise ermahnen und verstand es bestens, mich bei Sorgen und Versagensängsten zu beruhigen. Anfangs als Neuling in der Forschung in allen Belangen sei es in Software, sei es in Hardware, sei es in Literaturrecherche etc. unbedarft, förderte sie meine Fertigkeiten, Fähigkeiten und Interessen in der Forschung, wovon ich sicherlich ein Berufsleben lang profitieren werde. Vielen Dank natürlich auch den ständigen und zeitweiligen Mitarbeitern des Institutes, die mich tatkräftig in fachlichen aber auch persönlichen Belangen gerne und bereitwillig unterstützten. Weiterer Dank gilt den exzellenten Betreuern des IZKF-Promotionskollegs Prof. Dr. Marlies Knipper und Dr. Inka Montero, welche mir ein sehr interessantes Forschungsjahr ermöglichten und mir bereitwillig mit Verständnis, Rat und Tat zur Seite standen. Herzlichen Dank an Dr. med. Christoph Ihle, welcher stets darum bemüht war, mich bei der Beschaffung der Spenderproben zu unterstützen und mich durch seine sonnige herzliche Art bei meinem Tun unterstützte. Ich danke allen Spendern, welche mit ihren Blutspenden bereitwillig ihren Beitrag an meiner Dissertationsarbeit leisteten.

Der Abschluss meiner Dissertationsarbeit wäre trotz aller genannten wunderbaren Menschen jedoch nicht möglich gewesen, wenn mir meine geliebte Helene als wundervolle Mutter unseres kleinen Sohnes und ihre liebe Familie nicht geduldig den Rücken dafür freigehalten hätte. Dafür danke ich ihr und ihrer lieben Familie von ganzem Herzen und dafür, dass sie mich stets ermutigt und gestärkt haben. Herzlichsten Dank außerdem an meine Großmutter Anni und meine Eltern, die stets an mich geglaubt haben und mir mein Medizinstudium finanziell ermöglicht haben.

Lebenslauf**Name:** Martin Sebastian Radermacher**Geburtsdatum:** 29.11.1986**Geburtsort:** München**Familienstand:** ledig (verlobt)**Kinder:** 1 Sohn**Schulbildung:** 1993 - 1997: Grundschule Trierweiler
1997 - 2006: Friedrich-Wilhelm-Gymnasium, Trier
In 2006: Abitur**Praktika:** In 2007: 2-monatiges Krankenpflegepraktikum im Klinikum Mutterhaus der Borromäerinnen gGmbH in Trier
In 2007: 1-monatiges Altenpflegepraktikum in der Seniorenresidenz Trierweiler**Ausbildungen:** In 2006: 3-monatige Ausbildung zum Rettungssanitäter im Rahmen eines Freiwilligen Sozialen Jahres (FSJ) bei der Berufsfeuerwehr Trier (2006-2007)
2008 - 2011: 3-jährige Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger am Diakoniekrankenhaus Freiburg i. Brsg.**Studium:** 2011 - 2017: Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
14.03.2013: Erfolgreiches Physikum M1, schriftlich/mündlich
WS 2013/14 - SoSe 2014 : 1-jähriges Stipendium des IZKF-Promotionskollegs der Eberhard Karls Universität Tübingen im Zuge einer experimentellen medizinischen Dissertationsarbeit
13.10.2016: Erfolgreiches Staatsexamen M2, schriftlich
WS 2016/17 - SoSe 2017: Praktisches Jahr im Klinikum am Steinberg Reutlingen sowie in der hausärztlichen Versorgung
01.12.2017: Erfolgreiches Staatsexamen M3, mündlich/praktisch
10.01.2018: Erfolgreiche Promotionsverteidigung**Beruf:** 06.12.2017: Approbation als Arzt

Appendix

1 Versuchsvorbereitende Vorarbeiten und versuchsspezifische Lösungen

Zur Entwicklung der Versuchssettings und optimalen Versuchsbedingungen mit den zu untersuchenden aus Spendervollblut isolierten humanen Granulo-/Monozyten wurden in Vorarbeiten HL-60-/THP-1-Progenitorzellen verwendet, welche sich gut kultivieren lassen und in ihrem Phänotyp mit den humanen Granulo- bzw. Monozyten vergleichbar sind (4, 5). Nachfolgend sind Details zu den Vorarbeiten zur Entwicklung der Versuchssettings sowie zu verwendeten versuchsspezifischen Lösungen aufgeführt:

1.1 Details Kapitel 2.5: Granulo-/Monozytenisolierung mittels Percoll-Dichtemedium bei Dichtezentrifugation

Um die Granulo-/Monozyten mit bestmöglicher Reinheit bei bestmöglicher Ergiebigkeit der Zellzahl aus dem Vollblut zu isolieren, sind zur Optimierung der Dichte des verwendeten Percolls verschiedene Konzentrationen dessen ausgetestet worden:

Methodenspezifische Lösungen:

(10-fache) DPBS Lösung: 4,77 g DPBS Pulver + 50 ml ddH₂O (steril, Lagerung 4°C)

Tabelle 22: Herstellung verschiedenprozentiger Percollösungen (bei RT)

Percolllösung	100% Percoll	DPBS Lösung	ddH ₂ O
72% Percoll	7,2 ml	1,0 ml	1,8 ml
70% Percoll	7,0 ml	1,0 ml	2,0 ml
68% Percoll	6,8 ml	1,0 ml	2,2 ml
66% Percoll	6,6 ml	1,0 ml	2,4 ml
64% Percoll	6,4 ml	1,0 ml	2,6 ml

Durchführung:

Insgesamt wird 27 ml Blut in drei 9-ml-EDTA-Röhrchen gesammelt und gut gemischt. Auf die in je einem 15-ml-Falkonröhrchen befindlichen verschiedenprozentigen gut gemischten Percollösungen wird jeweils vorsichtig mithilfe eines Pelusballs und einer 5-ml-Stripette 4 ml Vollblut gegeben, damit sich Percolllösung und Blut nicht vermischen. Das Ergebnisse nach einer 25 minütigen Zentrifugation mit 1000 G bei 22°C und langsamer Be- und Entschleunigung (ohne Bremse) mithilfe der Mega Zentrifuge ist auf *Abbildung 23a* und *b* zu sehen. Bereits makroskopisch sind ab einer Percollkonzentration von 66% keine roten Erythrozyten in der Granulo-/Monozytenphase zu sehen.

Zur Überprüfung der Reinheit der jeweiligen Granulo-/Monozytenphasen sind diese nach Pappenheim Färbung mikroskopisch auf Abwesenheit rotfarbener Erythrozyten hin untersucht worden (siehe *Abb. 4* Kapitel 2.6): Mikroskopisch lassen sich in der Zellphase bei Verwendung einer 68%-igen Percollösung neben Granulo- und seltenen Monozyten noch ganz vereinzelt Erythrozyten feststellen. Bei Verwendung einer 66%-igen Percollösung lassen sich keine Erythrozyten mehr in der Granulo-/Monozytenphase detektieren. Bei verwendetem 64% Filtermedium resultiert eine deutlich schmalere und somit schlechter zu entnehmende Granulo-/Monozytenphase. Daher ist in dieser Arbeit zur Isolierung der Granulo-/Monozyten aus Spendervollblut ein 66%-iges Percollmedium zum Einsatz gekommen.

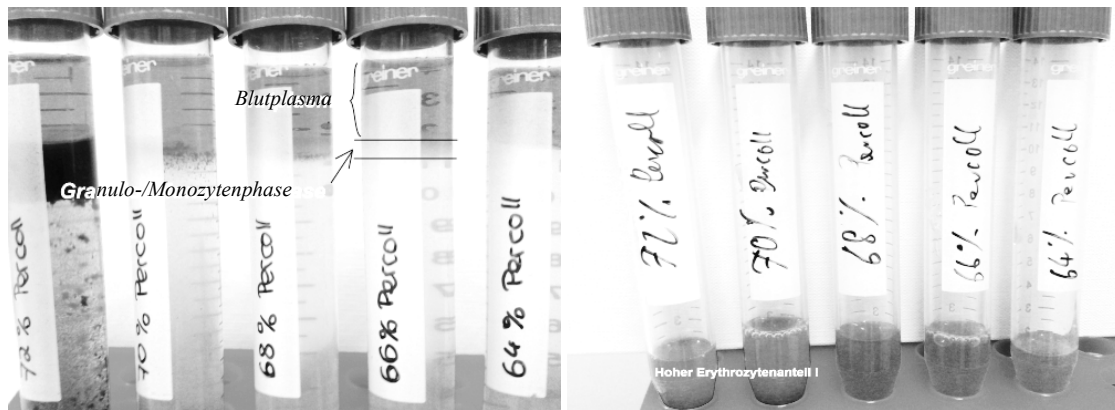


Abbildung 23a:

Abbildung 23b:

Abbildung 23a/b: Granulo-/Monozytenisolation aus Spendervollblut

Fotografie von 15-ml-Falkonröhrchen nach Granulo-/Monozytenisolation aus Vollblut mittels 64, 66, 68, 70 und 72%-igen Percoll-Dichtegradientenmedien nach 25-minütiger Zentrifugation mit 1000 G bei 22°C (a), Makroskopischer Reinheitsgrad des in ein neues Falkongefäß übertragenen Granulo-/Monozytenisolats anhand der Abwesenheit rotfarbener Erythrozyten (b).

1.2 Details Kapitel 2.7.1: Identifizierung optimierter Zellzahl für Analyse der mitochondrialen Umsatzaktivität

Die zur Versuchsoptimierung der photometrischen Messung mitochondrialer Umsatzaktivität ermittelte bei allen Folgeversuchen verwendete optimale Zellzahl von 64000 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurde folgendermaßen ermittelt:

Aus drei separaten Zellkulturen werden je eine Zellzahl-Verdünnungsreihe hergestellt. Die jeweils steril aus den drei Kulturflaschen entnommenen in drei 50-ml-Falkonröhrchen befindlichen 29 ml an Zellkultur werden dazu mit 600 G 10 min bei 22°C zentrifugiert und die Zellpellets dann jeweils in 30 ml frischem „Medium++“

resuspendiert (mit dem Vortex gut gemischt). Nach Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau wird mittels „Medium++“ aus den drei Zellreihen jeweils die Zielmenge von $1,28 \times 10^6$ Zellen/1000 μl gebildet (\Rightarrow 64.000 Zellen/50 μl).

1:2 Zellzahl-Verdünnungsreihe ausgehend von $1,28 \times 10^6$ Zellen/1000 μl :

je 500 μl Zell-Lösung (höhere Zellkonz.) + 500 μl „Medium++“ \Rightarrow 64×10^4 , 32×10^4 ; 16×10^4 , 8×10^4 , 4×10^4 und 2×10^4 Zellen/ml

Durchführung:

In eine 96-Well-Platte werden zunächst nach Belegungsschema aus *Tabelle 23* 50 μl „Medium++“ pro Well vorgelegt. Mit einer Mehrkanalpipette werden dann aus einer Mehrkanalpipettierwanne weitere 50 μl pro Well der insgesamt 8 Zellkonzentrationen (64000, 32000, 16000, 8000, 4000, 2000, 1000 und 0 (= „Medium++“) Zellen/Well) in Quadruplikate je Zellreihe verteilt. Mittels Mehrkanalpipette werden pro Well 15 μl Resazurin Stammlösung hinzugegeben, wird die Platte vorsichtig geschwenkt und die Fluoreszenz nach weiteren 30 min Inkubation im Inkubator mittels Plate Reader bei ex/em 530/560 nm gemessen.

Tabelle 23: Plattenbelegung der 96-Well-Platte Kapitel 2.7.1

64000	64000	64000	64000	64000	64000	64000	64000	64000	64000	64000	64000
32000	32000	32000	32000	32000	32000	32000	32000	32000	32000	32000	32000
16000	16000	16000	16000	16000	16000	16000	16000	16000	16000	16000	16000
8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000
4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Jeweils 50 μl „Medium++“ und dazu jeweils 50 μl Zell-Lösung in [Zellen/Well] (64000, 32000, 16000, 8000, 4000, 2000, 1000 und 0 (= „Medium++“)). Drei verschiedene Zellreihen (dunkel-, mittel-, hellgrau) bzw. 50 μl reines „Medium++“ als Leerwert (weiß).

Ergebnis:

Bei der Messung der von unterschiedlichen Zellzahlen pro Well umgesetzten Resorufinspiegel zeigte sich ein deutlich messbarer Umsatz bei einer Zellzahl von 64000 Zellen pro Well (*Abb. 24*). Diese Zellzahl pro Well wurde daher bei allen Resazurinmessungen der Folgeversuche verwendet, da die Höhe ihres Umsatzes eine gute Beurteilung des Einflusses von NAC zuließ.

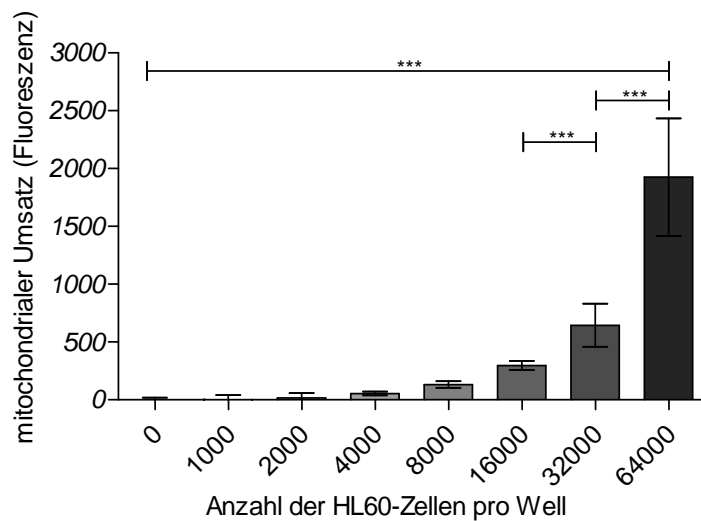


Abbildung 24: Mitochondriale Aktivität verschiedener HL-60-Zellzahlen nach 30 min

Mitochondriale Aktivität verschiedener HL-60-Zellzahlen nach 30 min anhand photometrisch gemessenen umgesetzten fluoreszenten Resorufins. Zellzählung mittels Trypanblau. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; *** $p < 0.001$ (Resorufinproduktion von 32000 HL-60-Zellen/Well im Vergleich zur Kontrolle, zu einer Anzahl von 16000 Zellen/Well sowie einer Anzahl von 64000 Zellen/Well). Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von je drei separat kultivierten HL-60- bzw. THP-1-Zelllinien pro Bedingung angegeben. (N=3, n=4).

1.3 Details Kapitel 2.7.2: Analyse der Zellviabilität der HL-60- bzw. THP-1-Zellen unter NAC

Versuchsspezifische Lösungen:

20 ml 0,5-M-NAC Stammlösung (molare Masse NAC: 163 g/mol (*Carl Roth*)) (132):

$$(M_{\text{NAC}} = c_{\text{NAC}} \times M_{\text{NAC}} \times V \Leftrightarrow m_{\text{NAC}} = 0,5 \text{ mol/l} \times 163 \text{ g/mol} \times 0,02 \text{ l})$$

1,63 g NAC in 20 ml „Medium+++“ (3 Aliquots à 4 ml bei -20°C gelagert)

NAC 1:2 Verdünnungsreihe ausgehend von 500 mM NAC:

je 3 ml NAC (höhere Konz.) + 3 ml „Medium+++“ \Rightarrow 250 mM, 125 mM, 62,5 mM, 31,25 mM, 15,63 mM, 7,81 mM, 3,91 mM, 1,95 mM, 0,98 mM und 0,49 mM

NAC 1:2 Verdünnungsreihe ausgehend von 2 mM NAC:

je 3 ml NAC (höhere Konz.) + 3 ml „Medium+++“ \Rightarrow 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,063 mM und 0,031 mM

1.4 Details Kapitel 2.7.3: Identifizierung optimaler Milieukonzentration von H₂O₂ zur oxidativen Stressinduktion (Teil 1)

Mittels Resazurin wurde der Einfluss verschiedener H₂O₂-Konzentrationen hinsichtlich des Zellüberlebens von HL-60-/THP-1-Zellen nach 1 h und nach 2 h überprüft.

Lösungen:

0,6% H₂O₂-Lösung: 60 µl 30% H₂O₂ + 2940 µl „Medium++“

H₂O₂ 1:2 Verdünnungsreihe ausgehend von 0,6% H₂O₂:

je 1,5 ml H₂O₂ (höhere Konz.) + 1,5 ml „Medium++“ => 0,3%, 0,15%, 0,075%, 0,0375%, 0,019% und 0,009%

Durchführung:

Die jeweils steril aus den Kulturflaschen entnommenen 29 ml werden in drei 50-ml-Falkonröhrchen mit 600 G 10 min bei 22°C zentrifugiert. Es werden dann je 30 ml frisches „Medium++“ dazugegeben und dieses mit dem Vortex gut gemischt. Nach Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau werden 7.500.000 HL-60- bzw. THP-1-Zellen in 5000 µl „Medium++“ in einem 15-ml-Falkonröhrchen gelöst und mit dem Vortex gemischt. In einer 96-Well-Platte werden nach Belegungsschema aus *Tabelle 24* 50 µl H₂O₂-Lösungen pro Well mit insgesamt 8 Bedingungen (0,6%, 0,3%, 0,15%, 0,075%, 0,0375%, 0,019%, 0,009% und 0 (= „Medium++“) % H₂O₂) mit einer Mehrkanalpipette aus einer Mehrkanal-pipettierwanne verteilt. Danach werden pro Well weiter nach Belegungsschema aus *Tabelle 24* 50 µl Zellsuspension (=75.000 Zellen/Well) der HL-60-/ THP-1-Zellen bzw. 50 µl reines „Medium++“ ohne Zellen (als Leerwert) mit einer Mehrkanalpipette hinzupipettiert, wird die Platte mit Deckel geschlossen und vorsichtig horizontal geschwenkt. Dadurch erhält man pro Well jeweils die Hälfte der eingesetzten H₂O₂-Milieukonzentration (z.B. 0,6% => 0,3% H₂O₂). Nach 0,5- bzw. 1,5-stündiger Inkubation (zwei Platten) im Dunkeln bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator werden mittels Mehrkanalpipette pro Well 15 µl Resazurin Stammlösung hinzugegeben, wird die Platte vorsichtig geschwenkt und die Fluoreszenz nach weiteren 30 min Inkubation im Inkubator mittels Plate Reader bei ex/em 530/560 nm gemessen. Zur Testung der Replizierbarkeit sind alle Versuche dreimalig durchgeführt worden.

Die Auswertung entspricht dem Prinzip aus 2.6, wobei bei der prozentualen Normierung jeweils die Werte der H₂O₂ unbehandelten Zellen als 100% Bezug dienen. Die in dieser Arbeit angegebenen H₂O₂- Konzentrationen beschreiben den jeweiligen prozentualen Anteil von H₂O₂ am Medium, in denen sich die Zellen befinden. Dazu wurde eine 30%-ige H₂O₂-Lösung mit dem versuchsentsprechenden Zellmedium verdünnt.

Tabelle 24: Plattenbelegung der 96-Well-Platte Kapitel 2.7.3

0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,0375	0,0375	0,0375	0,0375	0,0375	0,0375	0,0375	0,0375	0,0375	0,0375	0,0375	0,0375
0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019
0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009

Jeweils 50 µl der H₂O₂-Lösungen in [%] (0,6, 0,3, 0,15, 0,075, 0,0375, 0,019, 0,009 und 0 (= „Medium++“)). Dazu jeweils 50 µl Zellsuspension THP-1-Zellen (hellgrau) und HL-60-Zellen (dunkelgrau) bzw. 50 µl reines „Medium++“ als Leerwert (weiß).

Ergebnis:

Nach einer H₂O₂-Inkubationszeit von einer Stunde bei einer H₂O₂-Konzentration von 0,02% sank die durchschnittliche mitochondriale Reduktionsleistungsrate der THP-1-Zellen auf 68% und die der HL-60-Zelle auf 87% (*Abb. 25a/b*). Nach einer weiteren Stunde bei einer H₂O₂-Konzentration von 0,02% sank die durchschnittliche mitochondriale Reduktionsleistungsrate der THP-1-Zellen auf 60% und die der HL-60-Zelle auf 67%. Bei einer H₂O₂-Konzentration von 0,04% befand sich die Reduktionsleistung nach dieser Zeit im Durchschnitt bei den THP-1-Zellen noch geringer bei 42% und bei den HL-60-Zellen unverändert bei 67%. Alle höheren H₂O₂-Konzentrationen brachten die mitochondriale Reduktionsleistungsrate weit unter 50% und somit in einen für weitere Versuche unbrauchbaren Bereich, um mögliche protektive Effekte von NAC nachvollziehen zu können.

Bei allen nun nachfolgenden Versuchen wurde basierend auf diese Toxizitätstestung eine H₂O₂-Milieukonzentration von 0,03% gewählt, um die aus mitochondrialer Reduktionsleistung geschlossene Überlebensrate wie für weitere Versuche angestrebt über 50% zu halten.

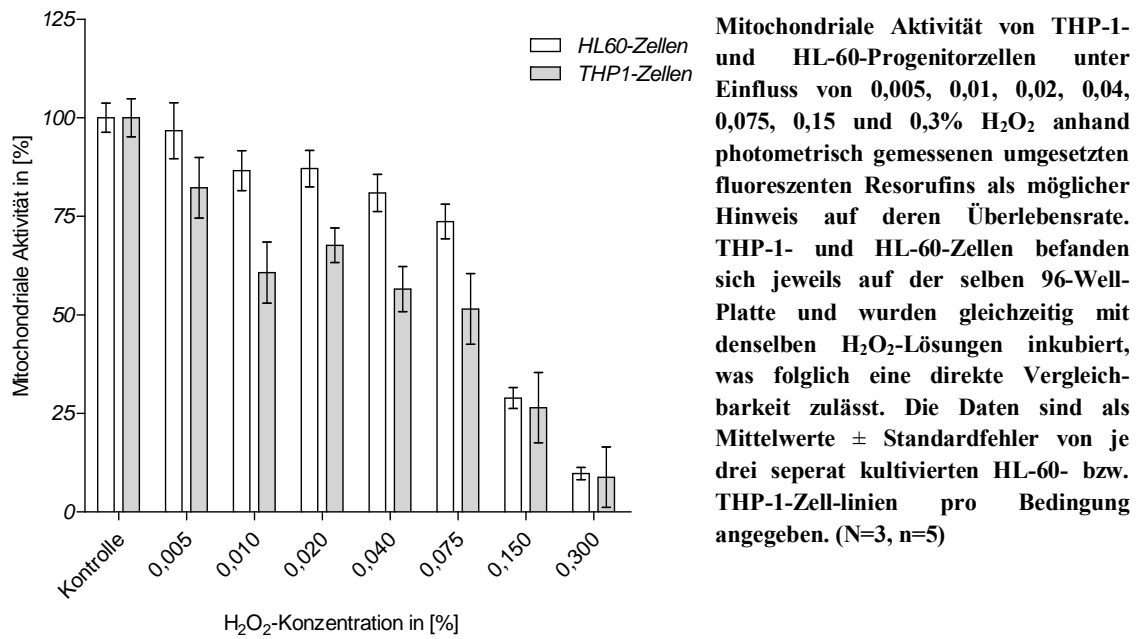


Abbildung 25a: Dosis-Wirkungsspektrum H₂O₂ auf mitochondriale Aktivität von THP-1-/HL-60-Progenitorzellen nach 1 Stunde

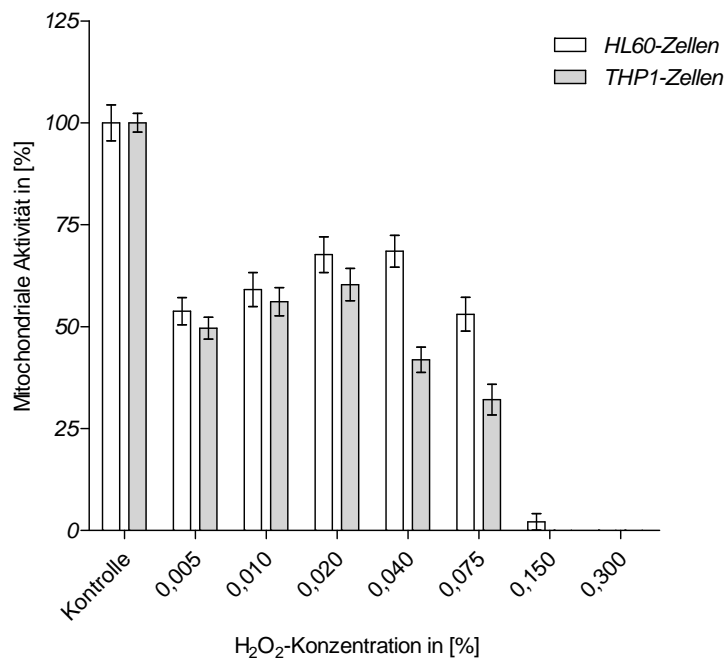


Abbildung 25b: Dosis-Wirkungsspektrum H₂O₂ auf mitochondriale Aktivität von THP-1-/HL-60-Progenitorzellen nach 2 Stunden

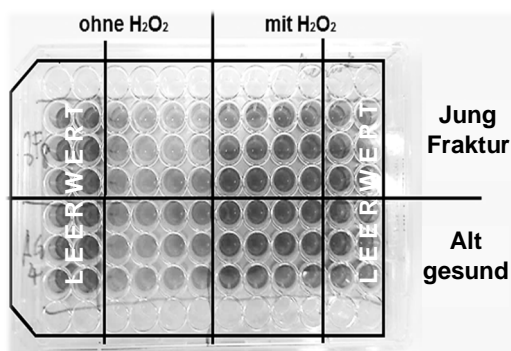
Abbildung 25a/b: Dosis-Wirkungsspektrum H₂O₂ auf mitochondriale Aktivität von THP-1-/HL-60-Progenitorzellen nach 1 und 2 Stunden

1.5 Details Kapitel 2.7.4: Analyse der Zellviabilität der aus Spendervollblut isolierten Granulo-/Monozyten ohne/mit NAC ohne/mit H₂O₂

Stammlösungen mit insg. 6 Bedingungen (Volumen reicht für 2 Spender):

3,0-mM-NAC-Lösung:	8 mg NAC + 20 ml „Medium++“ (s. Kapitel 2.2)
1,5-mM-NAC-Lösung:	6 ml 3,0-mM-NAC-Lösung + 6 ml „Medium++“
0,0-mM-NAC-Lösung:	12 ml „Medium++“
3,0-mM-NAC mit 0,06%-H ₂ O ₂ :	7 ml 3,0-mM-NAC-Lösung + 21 µl 30% H ₂ O ₂
1,5-mM-NAC mit 0,06%-H ₂ O ₂ :	6 ml 1,5-mM-NAC-Lösung + 18 µl 30% H ₂ O ₂
0,0-mM-NAC mit 0,06%-H ₂ O ₂ :	12 ml „Medium++“ + 36 µl 30% H ₂ O ₂

Abbildung 26 zeigt eine 24 h nach Inkubationsbeginn fotografierte 96-Well-Platte in der Belegung nach *Tabelle 7*, Kapitel 2.7.4. Da die schwarz-weiß Abbildung keine Unterscheidung der Farbnuancen ermöglicht, folgende Beschreibung: Während das von den Zellen zu rosa- bzw. pinkfarbenen/fluoreszenten Resorufin umgesetzte ursprünglich blaufarbene/nichtfluoreszente Resazurin tags zuvor nur mittels Plate Reader detektierbar gewesen ist, ist dieser Umsatz nach 24 h auch mit bloßem Auge erkennbar. Der Leerwert ist wie zu erwarten jeweils unverändert blaufarben geblieben (mittelgrau, rechts und links auf der Platte). Die ungestressten Zellen beider Spendergruppen setzten das Resazurin vollständig rosafarben um (hellgrau in der Abbildung). Der Grad an pinkfarbenen Umsatz (dunkelgrau in der Abbildung) kann als korrelierend mit der Zahl überlebender Zellen beurteilt werden. Hierbei fällt auf, dass Zellen junger Spender mit Fraktur einen höheren Grad pinkfarbenen Farbstoffes gebildet haben (helleres Dunkelgrau) als diese alter gesunder Spender (dunkleres Dunkelgrau), ein möglicher Hinweis auf einer bessere Resistenz gegenüber oxidativem Stress.



Auf der abgebildeten Platte, welche 24 h nach Inkubationsbeginn fotografiert wurde, befinden sich in Belegung nach *Tabelle 7* neben Granulo-/Monozyten junger Spender mit Fraktur diese alter gesunder Spender. Das blaufarbene/nichtfluoreszente Resazurin ist von den ungestressten Zellen zu rosafarbenem/fluoreszentem Resorufin (hellgrau) umgesetzt worden, während der Leerwert erwartungsgemäß unverändert blaufarben bleibt (mittelgrau). Der Grad an pinkfarbenem Umsatz der gestressten Zellen kann als korrelierend mit der Zahl überlebender Zellen beurteilt werden.

Abbildung 26: Fotografie einer 96-Well-Platte in Belegung nach *Tabelle 7*

1.6 Details Kapitel 2.8.1: Identifizierung optimierter Zellzahl und Messzeitpunkt für Analyse intrazellulärer ROS-Produktion

Von NAC ist bereits bekannt, dass es einige Zellarten bei der Verringerung der Entstehung von zelltoxischem intrazellulärem ROS unterstützt (74). Zur Untersuchung einer möglichen antioxidativen Wirkung von NAC auf die isolierten Immunzellen ist der Einfluss von NAC auf deren zelluläre Produktionsrate an ROS mittels DCFH-DA-Fluoreszenzmessmethode überprüft worden. Um nun einen solchen antioxidativen Effekt ersichtlich machen zu können, musste zunächst eine für die Versuche sinnvolle Immunezellzahl pro Well gefunden werden, bei der sich die produzierte Rate an ROS und somit die Stärke des Fluoreszenzsignals von DCF signifikant von der Kontrollgruppe abhob bei geeignetem Abstand zum Sättigungsbereich dieser DCFH-DA-Fluoreszenzmessmethode:

Lösungen:

1:2 Zellzahl-Verdünnungsreihe ausgehend von $1,28 \times 10^6$ Zellen/1000 μ l:

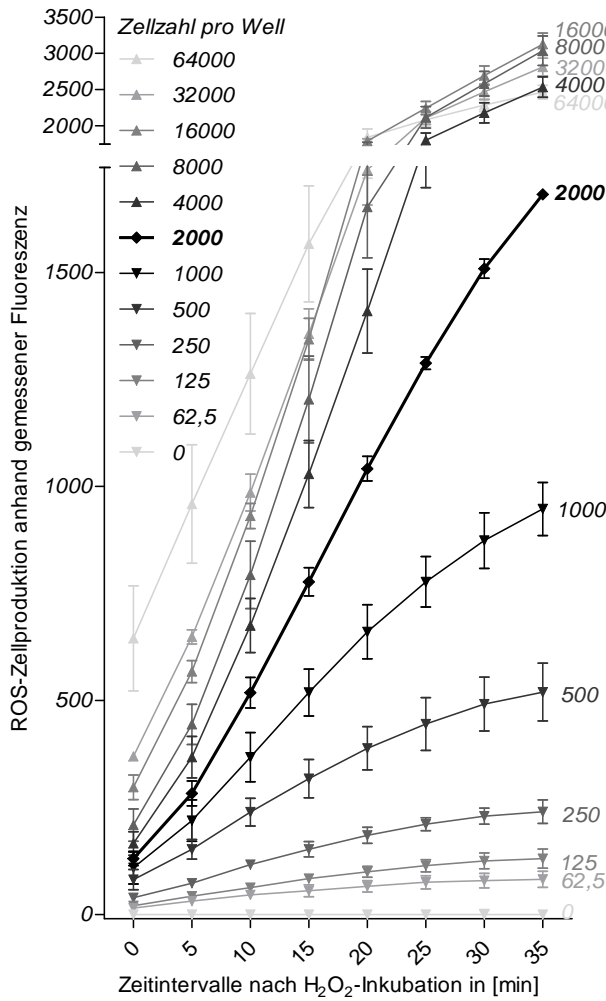
je 500 μ l Zell-Lösung (höhere Zellkonz.) + 500 μ l DPBS \Rightarrow 64×10^4 , 32×10^4 ; 16×10^4 , 8×10^4 , 4×10^4 und 2×10^4 Zellen/ml

0,06% H_2O_2 -Lösung: 6 μ l 30% H_2O_2 + 2994 μ l DPBS

Durchführung:

In gleicher Weise wie in 1.6 werden $1,28 \times 10^6$ HL-60-Zellen mit DCFH-DA Anwendungslösung (10 μ M) 30 min inkubiert und gewaschen. Anstelle von 4 ml wird das Zellpellet jedoch danach in 1 ml DPBS resuspendiert (\Rightarrow 64.000 Zellen/50 μ l pro Well).

In eine 96-Well-Platte werden zunächst aus einer Mehrkanalpipettierwanne 50 μ l pro Well der insgesamt 8 Zellkonzentrationen (64000, 32000, 16000, 8000, 4000, 2000, 1000 und 0 (= DPBS) HL-60-Zellen/Well) in Quadruplikate je Zellreihe verteilt. Mit einer Mehrkanalpipette werden dann pro Well 50 μ l der 0,06% hinzugegeben (dadurch 0,06% \Rightarrow 0,03% H_2O_2) und wird die Platte vorsichtig geschwenkt. In 5-minütigen Intervallen wird nun unmittelbar die Fluoreszenz bei ex/em = 485/520 nm mittels Plate Reader gemessen. Zur Vermeidung möglicher Messfehler aus Gründen der Lichtempfindlichkeit von DCFH-DA wird bei gesamter Durchführung möglichst unter dunklen Lichtverhältnissen gearbeitet.



ROS-Produktionsmenge verschiedener HL-60-Zellzahlen (0, 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16000, 32000 und 64000 Zellen/Well) in 0,03%-igem H₂O₂-Milieu. Zellzählung mittels Trypanblau. Die Kinetikmessung der ROS-Produktionslevel im 5-Minuten-Intervall anhand photometrisch gemessener fluoreszenter DCF-Level zeigt sich nach 20 min am optimalsten, da der Sättigungsbereich noch nicht erreicht ist (a). Bei einer Zellzahl der HL-60-Zellen von 2000 pro Well (schwarzer Balken) zeigt sich der optimalste Anstieg mit signifikantem Abstand zu doppelter bzw. halber Nachbarzellzahl (b). Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; *** p < 0.001 (ROS-Produktion von 2000 HL-60-Zellen/Well im Vergleich zur Kontrolle, zu einer Anzahl von 1000 Zellen/Well sowie einer Anzahl von 2000 Zellen/Well). Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung von je drei separat kultivierten HL-60-Zelllinien pro Bedingung angegeben. (N=3, n=3)

Abbildung 27a: ROS-Produktionsmenge verschiedener HL-60-Zellzahlen in H₂O₂ im Zeitverlauf von 35 min

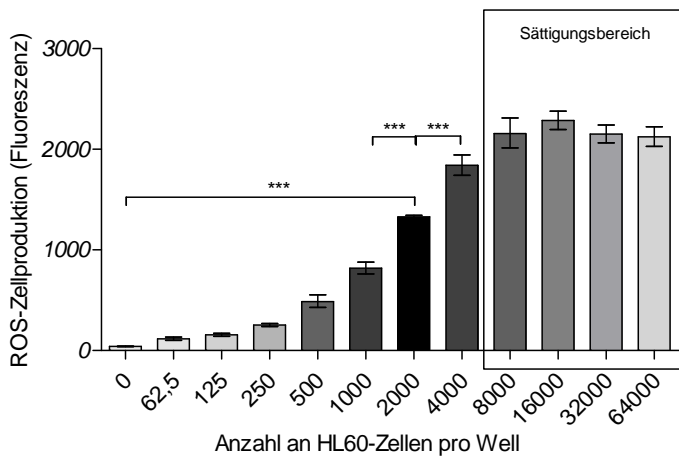


Abbildung 27b: ROS-Produktionsmenge verschiedener HL-60-Zellzahlen in H₂O₂ nach 20 min

Abbildung 27a/b: ROS-Produktionsmenge verschiedener HL-60-Zellzahlen in 0,03%-igem H₂O₂-Milieu

Auswertung:

Die gemessene Fluoreszenz wird direkt proportional zu der im Well enthaltenen Menge der intrazellulär gebildeten ROS angenommen. In *Excel Microsoft 2010* werden die gemittelten Leerwerte jeweils von den Quadruplikaten der Proben abgezogen und in der graphischen Darstellung und statistischen Auswertung mittels der Software *GraphPadPrism* werden Messzeitpunkt auf der X- und Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse der verschiedenen Zellzahlen gegeneinander aufgetragen. Die Fluoreszenzentwicklung über die Zeit liegt bei einer Anzahl von 2000 HL-60-Zellen/Well gut im Mittelfeld zwischen zu geringer und sättigungsbedingt verfälschter gemessener Fluoreszenzentwicklung. Nach 20 min (5. Intervall) ist im sigmoidalen Verlauf der Fluoreszenzentwicklung über die Zeit der Wendepunkt zu verzeichnen. (*Abb. 27a*). Dieser Messzeitpunkt nach einer 20-minütigen Inkubation in 0,03 %-igem H₂O₂-Umgebungsmilieu ist optimal, da die Fluoreszenzintensität deutlich messbar und gegen diese bei nächsthöhere bzw. -tiefere Zellzahl signifikant abgrenzbar ist (*Abb. 27b*).

1.7 Details Kapitel 2.8.2: Identifizierung optimaler Milieukonzentration von H₂O₂ zur oxidativen Stressinduktion bei HL-60-/THP-1-Zellen (Teil 2)

Hier soll nun überprüft werden, ob und in welchem Zeitintervall diese Zellen unter dieser H₂O₂-Konzentration ein deutlich messbares Fluoreszenzsignal bei der Messung des intrazellulären ROS-Anteils entwickeln:

Lösungen (91-94):

DCFH-DA Anwendungslösung (10 µM): 45 µl DSt + 9 ml „Medium+“

0,06% H₂O₂-Lösung: 6 µl 30% H₂O₂ + 2994 µl DPBS

H₂O₂ 1:2 Verdünnungsreihe ausgehend von 0,06% H₂O₂:

je 1,5 ml H₂O₂ (höhere Konz.) + 1,5 ml DPBS => 0,03%, 0,015%, 0,0075%, 0,00375%, 0,0019% und 0,0009%

Durchführung (91-94):

Nach Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau werden $1,28 \times 10^6$ HL-60-Zellen in einem 15-ml-Falkonröhrchen mit 600 G 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Entfernung des FCS-haltigen Überstandes, Resuspension in 8 ml DCFH-DA Anwendungslösung (10 µM) und Mischung mit dem Vortex inkubiert das DCFH-DA

für 30 min im Inkubator bei geöffnetem Gefäß. Zur Beendigung der Inkubation wird wie oben zentrifugiert, der Überstand entfernt, 13 ml DPBS dazugegeben, gut gemischt, abermals zentrifugiert und in 4 ml DPBS resuspendiert. Eine 96-Well-Platte wird entsprechend *Tabelle 24* aus Appendix-Kapitel 1.4 ohne THP-1-Zellen (hellgrau) und anstelle des „Medium++“ mit DPBS als Trägersubstanz der H₂O₂-Lösungen bzw. HL-60-Zell-Lösungen belegt, wobei hierbei die 1:2 Verdünnungsreihe der H₂O₂-Konzentration nicht von 0,6% sondern von 0,06% ausgeht. Zuerst werden anders als in 2.6.2 die 50 µl Zell-Lösungen pro Well ausgebracht und danach je Well 50 µl der entsprechenden H₂O₂-Lösungen (dadurch z.B. 0,06% => 0,03% H₂O₂) hinzupipettiert. In 5-minütigen Intervallen wird nun unmittelbar die Fluoreszenz bei ex/em = 485/520 nm mittels Plate Reader gemessen. Zur Vermeidung möglicher Messfehler aus Gründen der Lichtempfindlichkeit von DCFH-DA wird bei gesamter Durchführung möglichst unter dunklen Lichtverhältnissen gearbeitet.

Auswertung:

Die gemessene Fluoreszenz wird direkt proportional zu der im Well enthaltenen Menge der intrazellulär gebildeten ROS angenommen. In *Excel Microsoft 2010* werden die gemittelten Leerwerte jeweils von den Quadruplikaten der Proben abgezogen und in der graphischen Darstellung und statistischen Auswertung mittels der Software *GraphPadPrism* werden H₂O₂-Konzentration auf der X- und Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse gegeneinander aufgetragen. Nach 20 min (5. Intervall) ist die gemessene Fluoreszenzintensität der HL-60-Zellen in 0,03%-igen H₂O₂-Milieu deutlich messbar und von dieser unter nächsthöherer bzw. -tieferer Konzentrationsbedingung signifikant abgrenzbar.

Ergebnis:

Bei einer H₂O₂-Milieukonzentration von 0,03% grenzte sich der gut messbare Messwert zellulär umgesetzten ROS signifikant von dem unter halber bzw. doppelter Konzentration entstandenen Level ab (*Abb. 28*). Aufgrund schnellerer Kultivierbarkeit der HL-60-Zellen gegenüber der THP-1-Zellen wurde bis zur Entwicklung komplexer Versuchssettings von der zusätzlichen Testung des Verhaltens der THP-1-Zellen abgesehen.

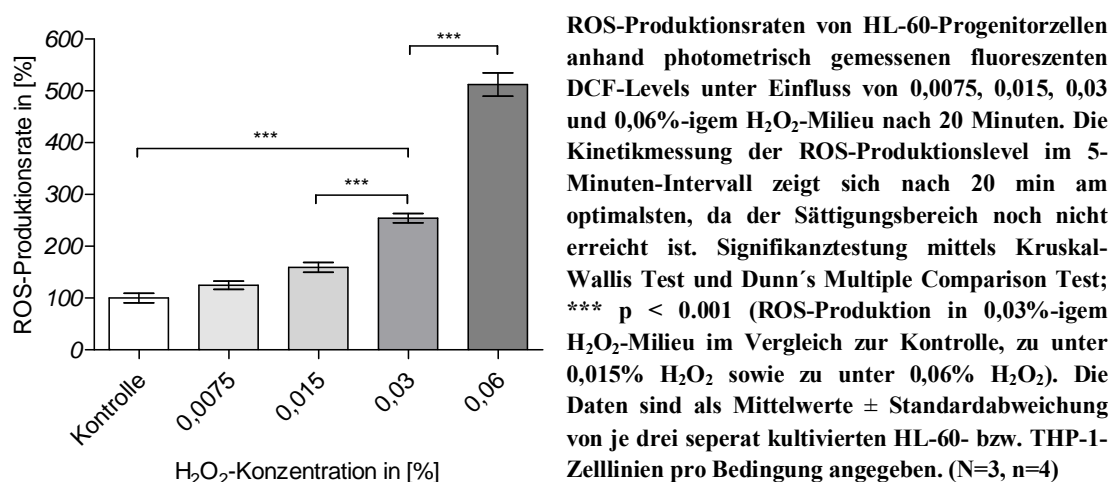


Abbildung 28: ROS-Produktionsraten von HL-60-Progenitorzellen in differentem H₂O₂-Milieu nach 20 min

1.8 Details Kapitel 2.8.3: Analyse intrazellulärer ROS der aus Spendervollblut isolierten Granulo-/Monozyten ohne/mit NAC ohne/mit H₂O₂

Stammlösungen mit insg. 6 Bedingungen (Volumen reicht für 2 Spender):

3,0-mM-NAC-Lösung:	8 mg NAC + 20 ml DPBS
1,5-mM-NAC-Lösung:	6 ml 3,0-mM-NAC-Lösung + 6 ml DPBS
0,0-mM-NAC-Lösung:	12 ml DPBS
3,0-mM-NAC mit 0,06%-H ₂ O ₂ :	7 ml 3,0-mM-NAC-Lösung + 21 µl 30% H ₂ O ₂
1,5-mM-NAC mit 0,06%-H ₂ O ₂ :	6 ml 1,5-mM-NAC-Lösung + 18 µl 30% H ₂ O ₂
0,0-mM-NAC mit 0,06%-H ₂ O ₂ :	12 ml DPBS + 36 µl 30% H ₂ O ₂

1.9 Details Kapitel 2.11: Analyse des intrazellulären Gesamt-GSH-Gehaltes von HL-60- bzw. THP-1-Zellen

Versuchsspezifische Lösungen:

NAC-„Medium++“-Lösung (0,0 mM, 0,5 mM bzw. 1,0 mM in „Medium++“):

1,0 mM-NAC-Lösung: 0,005 g NAC + 30675 µl „Medium++“

0,5 mM-NAC-Lösung: 2500 µl 1,0 mM-NAC-Lösung + 2500 µl „Medium++“

0,0 mM-NAC-Lösung: pures „Medium++“

2 Einfluss NAC auf HL-60- und THP-1-Progenitorzellen

Alles in allem stellte sich die Verwendung der HL-60- und THP-1-Zelllinien zur Entwicklung eines reibungslosen Versuchsetting der zu untersuchenden aus Spendervollblut isolierten humanen Granulo-/Monozyten als sinnvoll heraus. Die Tatsache, dass diese sich in ihrem Vermögen zur Replizierbarkeit grundsätzlich von

den ausdifferenzierten Spenderzellen unterscheiden, kann aufgrund des kurzen Versuchszeitraums von Stunden vernachlässigt werden. So stellten sich die an diesen Progenitorzelllinien gefundenen Dosen von 0,5 mM und 1 mM NAC sowie eine Coinkubation von NAC bei zusätzlicher künstlicher oxidativer Stressung in Umgebungsmilieu mit 0,03%-igen Anteil an H₂O₂ auch bei den Spenderzellen als optimal heraus, um im Sinne der Fragestellung dieser Arbeit den Einfluss dieses Medikamentes auf diese Zellen gut zeigen zu können. Isoliertechnisch ließen sich die humanen Granulo- und Monozyten zwar nicht getrennt betrachten, der deutlich höhere Anteil der neutrophilen Granulozyten konnte in der Diskussion der Ergebnisse jedoch in Berücksichtigung der Blutentnahmezeitpunkte nach Trauma als maßgeblich betrachtet werden. Daher konnte auch die in den Vorversuchen festgestellte verglichen mit den HL-60-Zellen als Stellvertreter der Neutrophilen tendenziell empfindlichere Reaktion der THP-1-Zellen als Stellvertreter der Monozyten auf einwirkende Einflüsse in den Hauptversuchen mit den Spenderzellen vernachlässigt werden. Es ergaben sich Hinweise auf den in der Literatur beschriebenen GSH-steigernden intrazellulären Einfluss von NAC sowohl auf die HL-60- wie auch auf die THP-1-Zellen, was u.a. auch die gefundenen Hinweise auf einen antioxidativen Einfluss dieses Medikamentes auf untersuchte humane Granulo-/Monozyten erklären könnte (74).

2.1 Analyse Dosis-Wirkungsspektrums von NAC auf mitochondriale Umsatzaktivität

Zur Ermittlung einer für die Versuche mit humanen Granulo-/Monozyten zu verwendenden optimalen NAC-Konzentration wurde das Dosis-Wirkungsspektrum von NAC auf die mitochondriale Umsatzaktivität von HL-60-/THP-1-Zellen als Hinweis auf deren Zellviabilität hin untersucht. Zur Feststellung einer möglichen pH-Wert bedingten Toxizität von NAC auf diese Zellen wurden diese zunächst mit einer relativ hohen NAC-Konzentration von maximal 250 mM inkubiert. Weitere NAC-Konzentrationsmilieus wurden im Sinne einer 1:2 Verdünnungsreihe bis minimal 0,25 mM geschaffen um die grobe Toxizitätsgrenze herauszufinden. Der mitochondriale Reduktionsumsatz wurde hierbei wie in Kapitel 2.6 beschrieben photometrisch bestimmt. Beide Zellarten wiesen in einem Umgebungsmilieu mit einer NAC-Konzentration von > 30 mM keine mitochondriale Umsatzaktivität auf (*Abb. 29*).

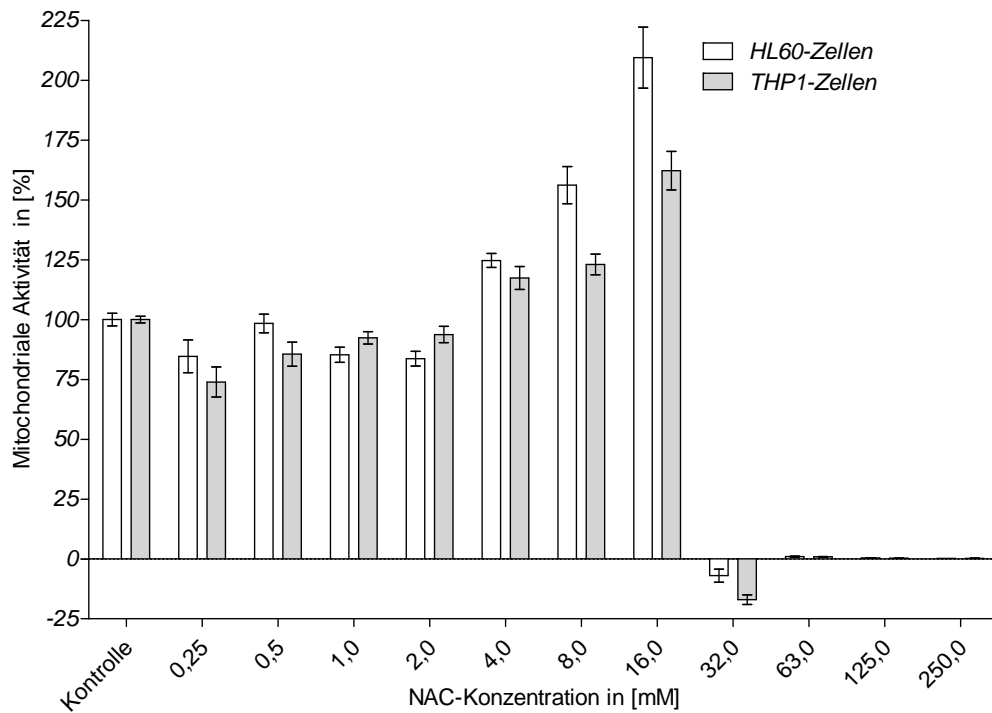


Abbildung 29a: Dosis-Wirkungsspektrum NAC auf mitochondriale Aktivität von HL-60-/THP-1-Zellen nach 1 Tag

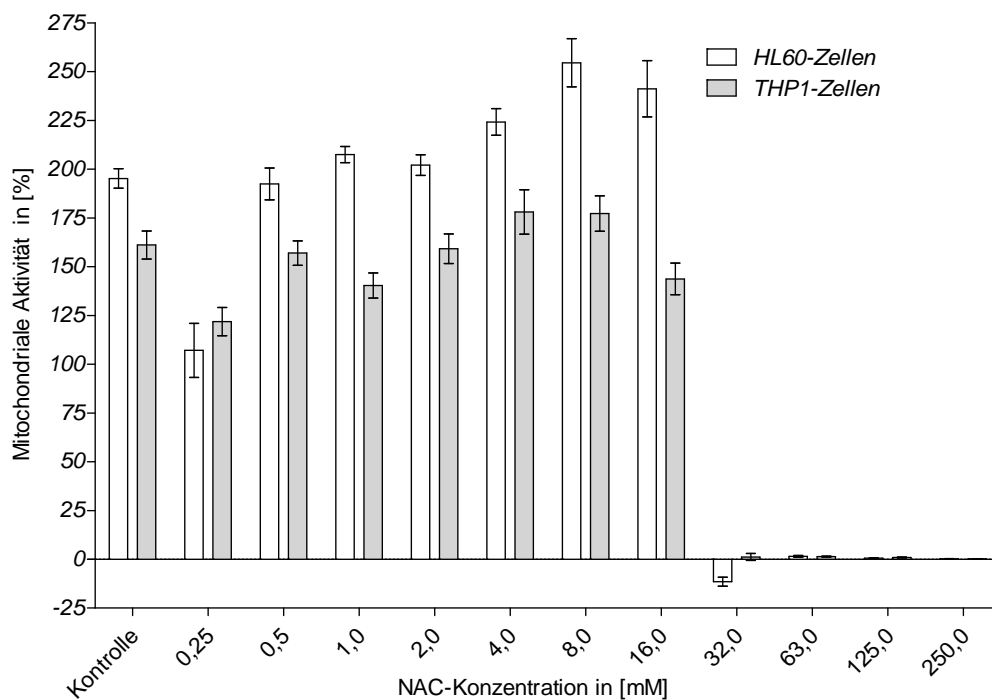


Abbildung 29b: Dosis-Wirkungsspektrum NAC auf mitochondriale Aktivität von HL-60-/THP-1-Zellen nach 2 Tagen

Abbildung 29a/b: Dosis-Wirkungsspektrum NAC auf mitochondriale Aktivität von HL-60-/THP-1-Zellen

Mitochondriale Aktivität von HL-60- und THP-1-Progenitorzellen anhand gemessenen umgesetzten fluoreszenten Resorufins als möglicher Hinweis auf deren Überlebensrate. Aufgrund ihrer Replizierbarkeit

als Progenitorzellen ist aufgrund ihrer höheren Zellzahl die im Vergleich zu Tag 1 höhere Stoffwechselrate an Tag 2 erklärbar. Die Stoffwechselleistung von THP-1-Zellen an Tag 2 fällt möglicherweise geringer aus, da sie sich wie in *Tsuchiya et al. 1980/Gallagher et al. 1979* beschrieben und wie anhand von Zellzählungen im Laufe der Kultivierung der Zellen bestätigt langsamer replizieren als die HL-60-Zellen (4, 5). Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je drei separat kultivierten HL-60- bzw. THP-1-Zelllinien pro Bedingung angegeben. (N=3, n=3)

Während die mitochondriale Reduktionsleistung beider Zellarten nach 24 h unter 16 mM NAC verglichen mit der Kontrollgruppe klar höher lag, zeigte sich nach 48 h verglichen mit der Kontrollgruppe bei den HL-60-Zellen eine kaum höhere bei den THP-1-Zellen sogar eine geringere Reduktionsrate. Die Differenz der Reduktionsleistungen beider Zelltypen von Kontrollgruppe zu den restlichen NAC-Konzentrationsbedingungen zeigte sich hingegen nach 48 h verglichen mit denen am Vortag kaum verändert. NAC schien außerdem ab einer Konzentration von 4 mM bei beiden Zellarten nach 24 h insgesamt eine höhere mitochondriale Umsatzaktivität zu bewirken, wobei hierbei diese der THP-1-Zellen bei 4 – 16 mM geringer als bei den HL-60-Zellen ausfiel.

Herstellerangaben in der „Roten Liste 2014“ empfehlen eine maximale Tagesdosis von 600 mg NAC, während wie in *Aitio 2006* beschrieben in Studien auch Dosen von bis zu 18 g täglich zum Einsatz kamen (130, 131). Eine einmalige orale Gabe von 600 mg NAC führt laut *Allegra et al. 2002* im menschlichen Organismus nach First-Pass-Effekt der Leber zu einem Blutserumpeak von 16 $\mu\text{mol/l}$ was bei einer molaren Masse von 163,2 g/mol (Herstellerangaben Firma *Carl Roth*) einer NAC-Konzentration von 0,016 mM entspräche (132, 178). Bei einer doppelten oralen Dosis von 1200 mg lässt sich auf gleiche Weise die Konzentration von 0,035 mM errechnen. Nun wurde in weiteren Versuchen über sieben Tage der Einfluss von NAC in einer 1:2 Konzentrationsverdünnungsreihe von 1 mM bis hinunter zu 0,016 mM auf beide Zelltypen getestet. Dieser Konzentrationsbereich deckte den wie oben beschrieben maximal erreichbaren Blutserumpeak von 0,016 mM bei oraler NAC-Einnahme von 600 mg bis hin zum maximal erreichbaren Serumkonzentrationsspiegel von 1 mM NAC (angenommene 6 Litern Gesamtblutvolumen) bei intravenöser Gabe von 1200 mg NAC ab.

Überprüft wurde die mitochondriale Umsatzaktivität der HL-60-/THP-1-Zellen jeweils nach einem, zwei, vier und sieben Tagen. Im Zeitraum von sieben Tagen zeigte sich kein nennenswerter negativer Einfluss von NAC auf die Zellviabilität (*Abb. 30*).

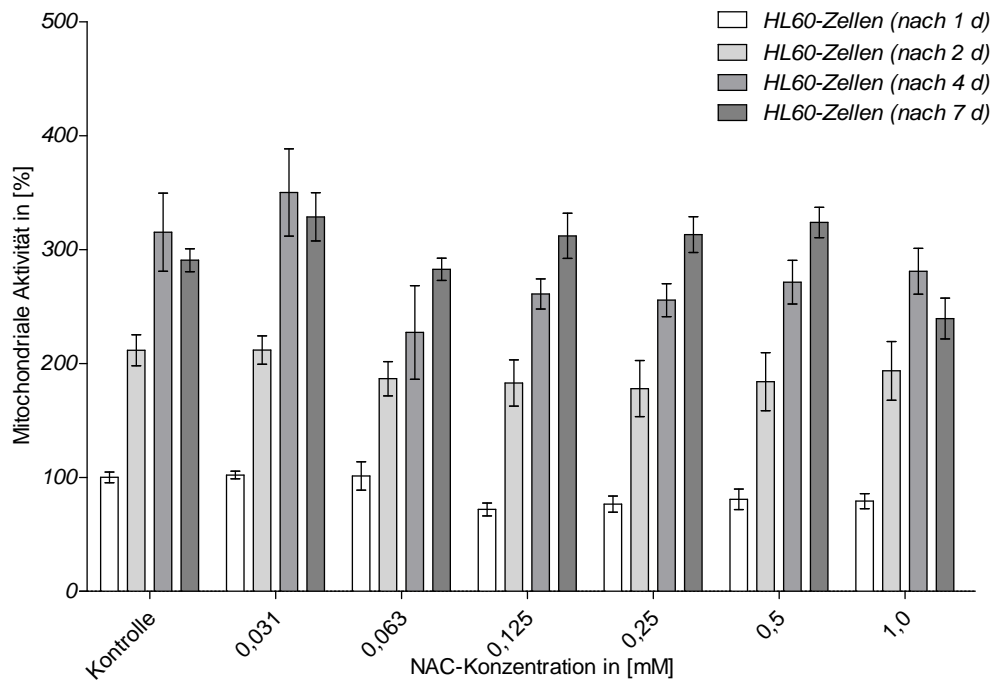


Abbildung 30a: Mitochondriale Aktivität von HL-60-Progenitorzellen unter NAC im Verlauf einer Woche

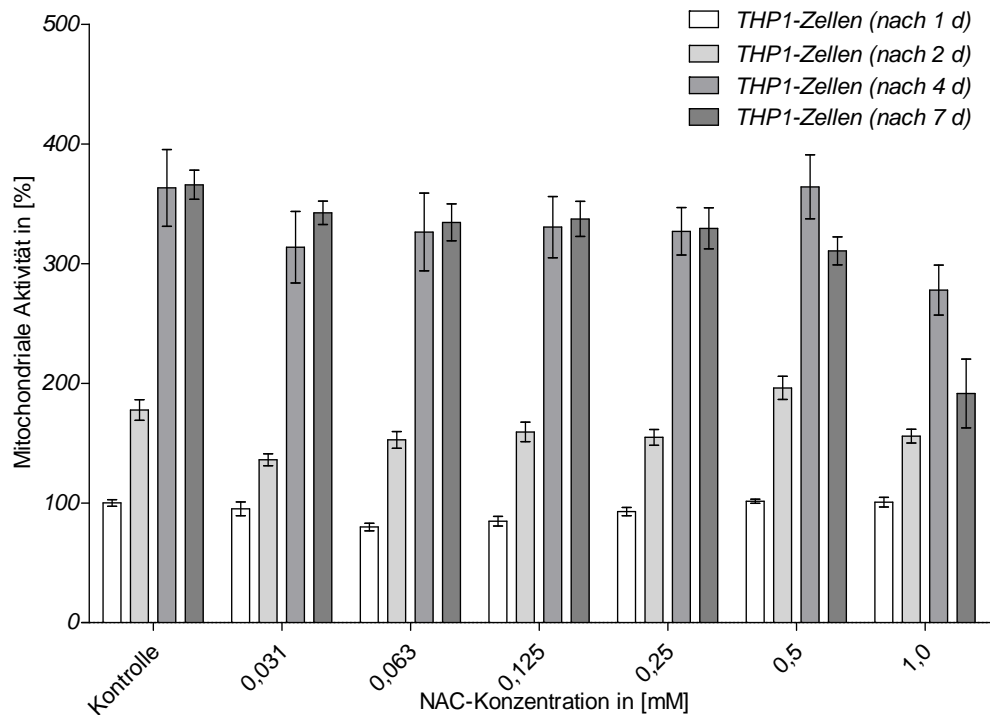


Abbildung 30b: Mitochondriale Aktivität von THP-1-Progenitorzellen unter NAC im Verlauf einer Woche

Abbildung 30a/b: Mitochondriale Aktivität von HL-60-/THP-1-Progenitorzellen unter NAC im Verlauf einer Woche

Mitochondriale Aktivität von HL-60- und THP-1-Progenitorzellen unter Einfluss von 0,031, 0,063, 0,125, 0,25, 0,5 und 1,0 mM NAC anhand photometrisch gemessenen umgesetzten fluoreszenten Resorufins als möglicher Hinweis auf deren Überlebensrate. Die große Varianz des Stoffwechselumsatzes und somit der

Überlebensrate der THP-1- und HL-60-Zellen nach 7 Tagen unter 1,0 mM NAC könnte aus einem Randeffekt durch Verdunstung auf der 96-Well-Platte resultiert sein, wie er an Tag vier noch nicht so deutlich zu beobachten ist. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je drei separat kultivierten HL-60- bzw. THP-1-Zelllinien pro Bedingung angegeben. (N=3, n=3)

Dieser wichtige Erkenntnisgewinn war Voraussetzung, um auszuschließen, dass NAC an sich schon beispielsweise einen wie in *Fitri et al. 2011* beschriebenen prooxidativen und somit möglichen toxischen Charakter bei betrachteten Immunzellen aufwies (179). In einem nächsten Schritt wurde die Wirkung des oxidativen Radikals H_2O_2 auf diese Zellen untersucht, da dieses als wichtiger Faktor bei der zellulären Produktion zelltoxischer reaktiver Sauerstoffspezies im menschlichen Organismus in den weiteren Versuchen als aggressiver oxidativer Stressor dienen sollte (180). Ein möglicher versuchsbedingter Randeffekt durch Verdunstung auf die HL-60- bzw. THP-1-Zellen wird in der Legende zur *Abbildung 29* näher erläutert. Da folgende Versuche mit den Spenderzellen keinen Zeitraum von sieben Tagen in Anspruch nehmen sollte, konnte dieser Effekt vernachlässigt werden.

2.2 Einfluss NAC-Applikation prä, co und post Induktion von oxidativem Stress bzgl. mitochondrialer Umsatzaktivität und intrazellulärer ROS-Produktion

Entsprechend einer Simulation verschiedener möglicher NAC-Gabezeitpunkte in der Klinik (in diesem Falle: 2 h nach Bruch des Knochens bei Patientenaufnahme, 24 h vor operativer Knochenreposition sowie während des Operationsgeschehens) soll im folgenden komplexen Versuchsablauf der Einfluss von NAC prä, co und post künstlicher Induktion von oxidativem Stress (H_2O_2) *in vitro* bzgl. mitochondrialer Umsatzaktivität und intrazellulärer ROS-Produktion der getesteten HL-60- und THP-1-Zellen überprüft werden. Dazu kommen die in Material- und Methoden beschriebenen Resazurin- bzw. DCFH-DA-Verfahren zum Einsatz. Für die Simulation zweimaligen oxidativen Stressgeschehens im Zuge von Trauma und Operation werden die Zellen zweimalig mit H_2O_2 gestresst. Das Prozedere ist für HL-60- sowie THP-1-Zellen analog durchgeführt worden.

Durchführung:

Abbildung 31 zeigt vereinfacht zur Veranschaulichung den durchgeführten Versuchsaufbau in Form eines Flussdiagramms.

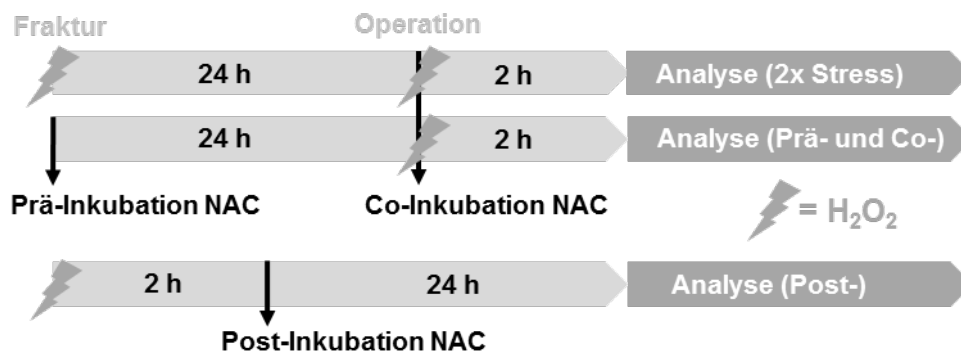


Abbildung 31: Flussdiagramm Versuchsablauf NAC-Applikation prä, co und post Induktion von oxidativem Stress

Versuchsablauf einer Simulation verschiedener möglicher NAC-Gabezeitpunkte bzgl. Knochenfraktur- bzw. Operationsgeschehen in der Klinik: Zur Simulation der mit den Traumata „Fraktur“ und „Operation“ verbundenen Erhöhung systemischer oxidativer Belastung der Immunzellen akuter Immunabwehr sind HL-60- und THP-1-Zellen in 0,03%-igem H_2O_2 -Milieu künstlich oxidativ gestresst worden. In einem komplexen Versuchsablauf wurde der Einfluss von NAC prä, co und post künstlicher Induktion dieses künstlichen oxidativen Stresses *in vitro* bzgl. mitochondrialer Umsatzaktivität und intrazellulärer ROS-Produktion auf HL-60- und THP-1-Zellen überprüft.

Bei einigen Versuchen mussten die 96-Well-Platten zentrifugiert werden. Dazu wurden 96-Well-Platten mit V-förmigen anstelle von flachen Wellböden genutzt, um den Überstand nach Zentrifugation abpipettieren zu können. Bei der Programmwahl der Plate Reader Messung wurde diese andere Wellform berücksichtigt („v-förmig“, „bottom optic“). Zur Vermeidung möglicher Messfehler aus Gründen der Lichtempfindlichkeit von DCFH-DA wurden die Versuche zur ROS-Bestimmung unter dunklen Lichtverhältnissen durchgeführt. Die Zellzahlen sind mittels Trypanblau-Methode bestimmt worden (2000 Zellen/Well für ROS-Messungen und 64.000 Zellen/Well für Resazurin-Messungen). Zur Überprüfung der Replizierbarkeit sind alle Versuche dreimalig durchgeführt worden.

Auswertung:

Die gemessene Fluoreszenz wurde direkt proportional zu der im Well enthaltenen Menge des mitochondrialen Umsatzes an Resazurin als Marker für das Zellüberleben bzw. der intrazellulär gebildeten ROS angenommen. In *Excel Microsoft 2010* wurden die gemittelten Leerwerte jeweils von den gemittelten Probenwerten abgezogen. Bei der prozentualen Normierung der mitochondrialen Umsatzaktivität dienten jeweils die Werte unter 0,0 mM NAC und ohne H_2O_2 Stressung (= unbehandelte Zellen) als 100% Bezug. Bei der prozentualen Normierung der intrazellulären ROS-Produktion dienten jeweils die Werte unter 0,0 mM NAC und in 0,03%-igem H_2O_2 -Milieu als 100% Bezug, da unter diesen die höchste Produktion an ROS zu erwarten war.

2.2.1 Ergebnis: Einfluss NAC auf Zellviabilität bei oxidativem Stress

Um folgende Analysen zu verstehen wird hier kurz die Idee hinter den verschiedenen Zeitpunkten der oxidativen Stressung der Zellen im Bezug auf den Behandlungszeitpunkt mit NAC beschrieben:

Kommt der Patient nach Knochenbruchgeschehen in die Notaufnahme, kann im Rahmen einer klinischen Wirksamkeitsstudie frühestens bei Aufnahme erstmalig 600 mg bzw. 1200 mg NAC zur Testung oral bzw. intravenös verabreicht werden. In diesem präklinischen Versuch wurde dieser klinische Sachverhalt simuliert: Nach Stopp einer zweistündigen Inkubation in 0,03%-igen H₂O₂-Milieu (= oxidativer Stress als Simulation des Bruchs eines langen Röhrenknochens während der Zeit eines lange andauernden Anfahrtsweges zur Klinik) wurden die HL-60-Zellen (= stellvertretend für humane Granulozyten) bzw. die THP-1-Zellen (= stellvertretend für humane Monozyten/Makrophagen) mit 1200 mg NAC behandelt (entsprechend folgender hier aufgeführten Applikationsformen: oral => 0,04 mM, intravenös => 0,15 mM und maximaler aber unrealistischer Serumpeak => 1,2 mM). In der Klinik ist also nach Fraktur nur eine Post-Inkubation mit NAC möglich (im Versuch 2 h nach H₂O₂-Stressung). Hierbei bewirkte keine der eingesetzten NAC-Konzentrationen eine verglichen mit der unbehandelten Bedingung höhere mitochondriale Aktivität der HL-60-Zellen (*Abb. 32a*) bzw. THP-1-Zellen (*Abb. 32b*) nach einem Tag. Ein möglicher Hinweis auf einen positiven Effekt auf das Zellüberleben durch Post-Inkubation mit NAC bietet sich folglich nicht.

Muss besagter Patient nun zur Reposition der Fraktur operiert werden, stellt dies' ein zweites Stressgeschehen dar. Diesem könnte zur antioxidativen Protektion der akuten Immunabwehr hypothetisch sowohl prophylaktisch vor (= Prä-Inkubation mit NAC 24 h vor H₂O₂-Gabe im Versuch), als auch therapeutisch während der Operation (= Co-Inkubation mit NAC und H₂O₂ im Versuch) beispielsweise in Form einer i.v. Infusion entgegnet werden. Auch bei Prä- und Co-Inkubation mit NAC zeigte sich verglichen mit der unbehandelten Bedingung nach einem Tag keine höhere mitochondriale Umsatzaktivität als möglicher Hinweis auf einen positiven Effekt auf das Überleben der HL-60- (*Abb. 32a*) bzw. THP-1-Zellen (*Abb. 32b*).

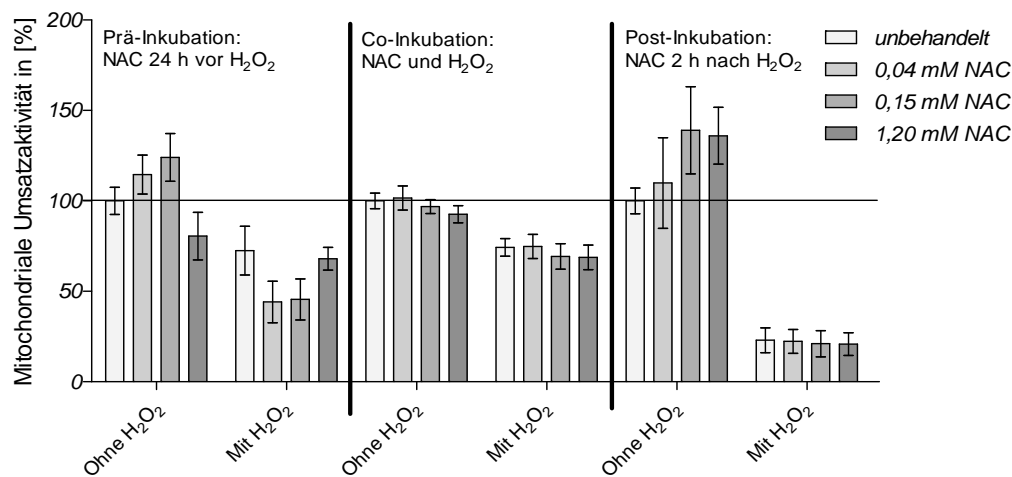


Abbildung 32a: Einfluss von NAC auf mitochondriale Umsatzaktivität oxidativ un-/gestresster HL-60-Zellen

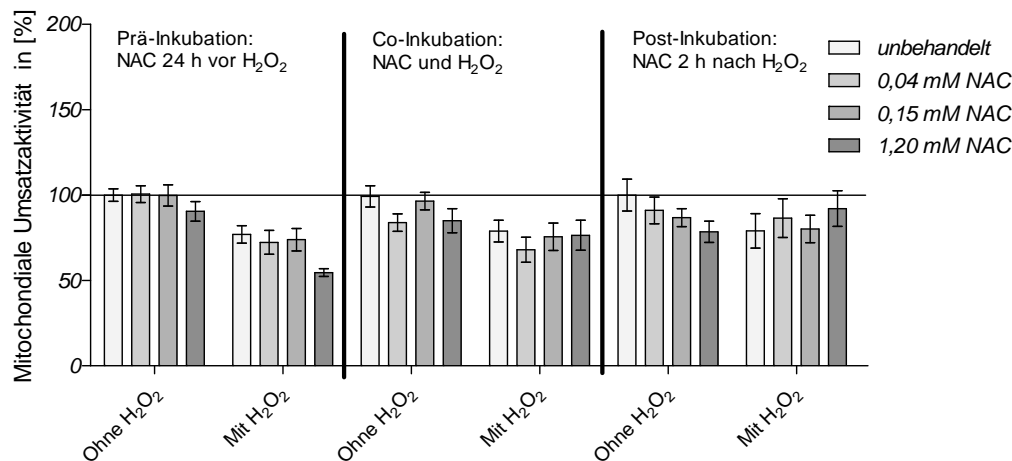


Abbildung 32b: Einfluss NAC auf mitochondriale Umsatzaktivität oxidativ un-/gestresster THP-1-Zellen

Abbildung 32a/b: Einfluss von NAC auf mitochondriale Umsatzaktivität oxidativ un-/gestresster HL-60-/THP-1-Zellen

Mitochondriale Umsatzaktivität anhand photometrisch gemessenen fluoreszenten Resorufins als möglicher Hinweis auf die Überlebensraten untersuchter HL-60- bzw. THP-1-Zellen unter 0,0, 0,04, 0,15 und 1,2 mM NAC 24 h vor, zusammen mit sowie 2 h nach oxidativer Stressung in 0,03%-igem H₂O₂-Milieu. Zellzählung mittels Trypanblau. Unbehandelte ungestresste Kontrollzellgruppe dient als 100%-Bezug. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je drei separat kultivierten HL-60- bzw. THP-1-Zelllinien pro Bedingung angegeben (N=3, n=4).

Die *in vitro* Simulation sowohl eines Fraktur- als auch eines Operationsgeschehens innerhalb eines Versuchssettings gestaltete sich sehr kompliziert und führte aufgrund häufiger Wasch- und Resuspensionsschritten zu Ergebnissen, die nicht zufriedenstellend waren. Simuliert werden sollte hier eine 24 h nach Knochenbruch erfolgende Operation, da wenn möglich eine frühzeitige Operation nach Trauma ein besseres Outcome für den Patienten mit sich bringt (181). Im Falle dieses präklinischen Versuches hieß dies: 24 Stunden nach Stopp der ersten erfolgte eine

zweite Inkubation mit H_2O_2 . Während dieser zweiten Inkubation erfolgte eine Co-Behandlung mit den hier aufgeführten 0,04, 0,15 und 1,2 mM NAC (= Simulation Behandlung während OP). Bei der Überprüfung der Überlebensrate lagen keine verwertbaren Ergebnisse vor, da 24 h nach erstmaliger Stressung mit H_2O_2 kein Resazurinumsatz mehr messbar war (Abb. 33), was auf den Untergang der oxidativ gestressten Zellen schließen ließ. Von dieser Versuchskonstellation wurde aufgrund dieser Fehleranfälligkeit bei der Untersuchung der THP-1-Zellen sowie der Immunzellen aus Spenderblut abgesehen. Die ROS-Produktion unter diesen Versuchsbedingungen wurde ebenfalls aufgrund der Fehleranfälligkeit nicht durchgeführt.

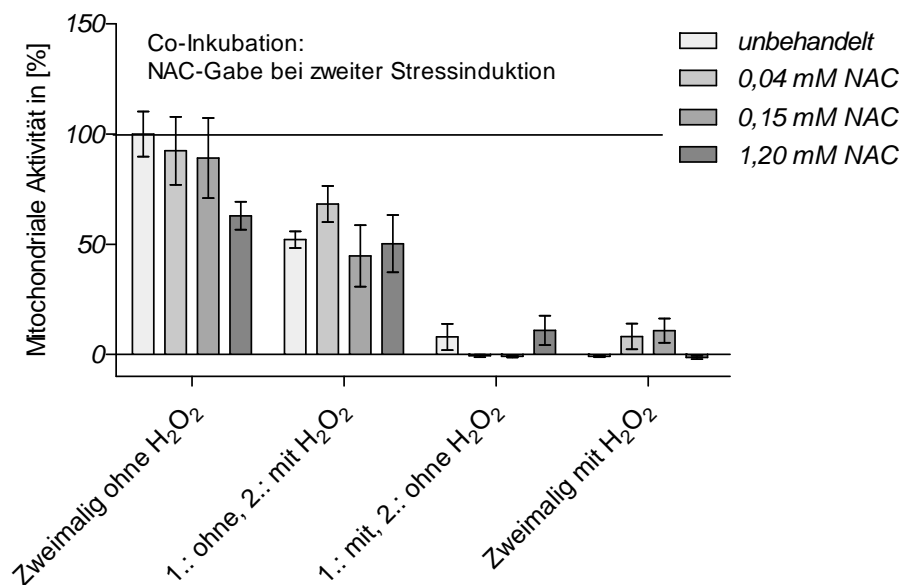
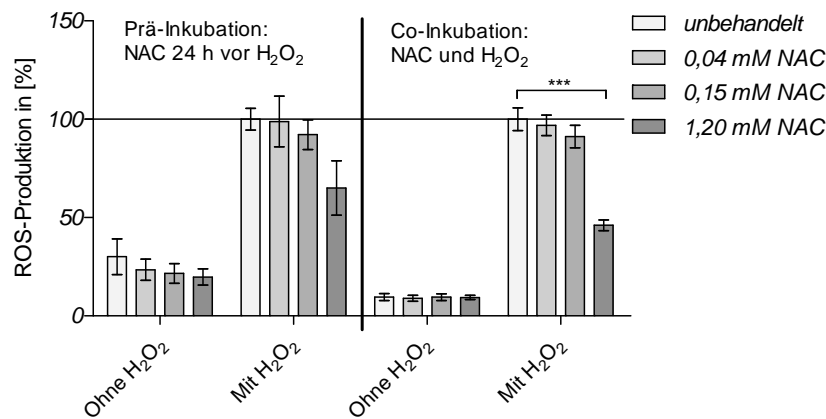
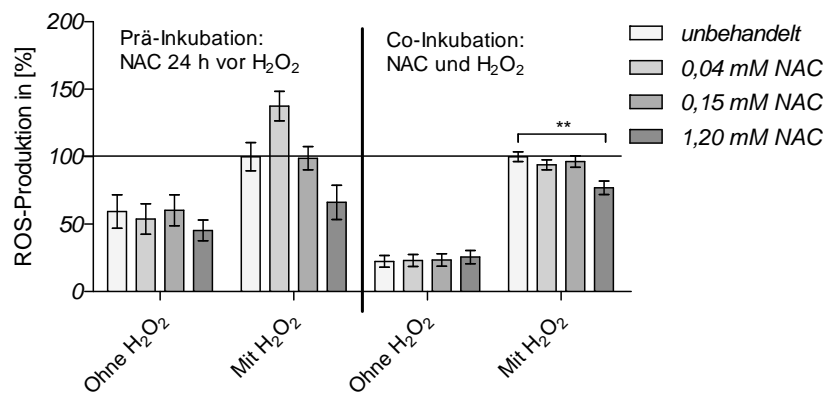


Abbildung 33: Einfluss NAC auf die mitochondriale Aktivität zweimalig mit H_2O_2 gestresster HL-60-Zellen

Mitochondriale Umsatzaktivität anhand photometrisch gemessenen fluoreszenten Resorufins als möglicher Hinweis auf die Überlebensraten untersuchter HL-60- bzw. THP-1-Zellen unter 0,0, 0,04, 0,15 und 1,2 mM NAC. Zellzählung mittels Trypanblau. H_2O_2 -Inkubationen am 1. Tag wurden nach 30 min durch PBS-Waschung beendet. NAC wurde am 2. Tag nach 24 h hinzugegeben. Unbehandelte ungestresste Kontrollzellgruppe dient als 100%-Bezug. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je drei separat kultivierten HL-60- bzw. THP-1-Zelllinien pro Bedingung angegeben (N=3, n=2).

2.2.2 Ergebnis: Einfluss NAC auf zelluläre ROS-Produktionsrate bei oxidativem Stress

Das Verhalten der Zellen hinsichtlich ihrer ROS-Produktion als akute Reaktion auf den künstlich induzierten oxidativen Stressor H_2O_2 zeigte hingegen eine Herunterregulierung des zelltoxischen ROS-Spiegels unter NAC (Abb. 34a/b). Hierbei bewirkte eine Co-Inkubation von 1,2 mM NAC sowohl bei den HL-60-Zellen (***) $p < 0,001$) wie auch bei den THP-1-Zellen (* $p < 0,05$) eine signifikante Regulierung

Abbildung 34a: Einfluss von NAC auf intrazelluläre ROS-Produktionsmenge H₂O₂-gestresster HL-60-ZellenAbbildung 34b: Einfluss von NAC auf intrazelluläre ROS-Produktionsmenge H₂O₂-gestresster THP-1-ZellenAbbildung 34a/b: Einfluss von NAC auf intrazelluläre ROS-Produktionsmenge H₂O₂-gestresster HL-60-/THP-1-Zellen

Intrazelluläre ROS-Produktionsmenge oxidativ gestresster HL-60- bzw. THP-1-Zellen anhand gemessenen fluoreszenten DCF-Levelns unter 0,0, 0,04, 0,15 und 1,2 mM NAC 24 h vor sowie zusammen mit der oxidativen Stressung in 0,03%-igem H₂O₂-Milieu. Zellzählung mittels Trypanblau. Mit oxidativ gestresste Zellgruppe ohne NAC dient als 100%-Bezug. Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test; **p<0,01 und *** p < 0.001 (ROS-Produktion unter 1,2 mM im Vergleich zur Kontrolle). Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler von je drei separat kultivierten HL-60- bzw. THP-1-Zelllinien pro Bedingung angegeben (N=3, n=4).

der zellulären ROS-Produktionsrate nach unten. Diese Herunterregulierung zeigte sich auch nach Prä-Inkubation, hierbei jedoch nur tendenziell. Außerdem ließ sich bei den prä-inkubierten oxidativ ungestressten HL-60-/THP-1-Zellen nach 24 h ein verglichen mit den co-inkubierten Zellen höheres intrazelluläres ROS-Level feststellen, welches tendenziell mit steigender NAC-Konzentration geringer ausfiel. Die Post-Inkubation mit NAC konnte methodisch bedingt nicht überprüft werden.

Da lediglich die Co-Inkubation von NAC bei H₂O₂-Stressung eine signifikante Herunterregulierung der zellulären ROS-Produktion seitens der HL-60- bzw. der THP-1-Zellen bewirkte und bezüglich der Messung der mitochondrialen Umsatzaktivität

verwertbare Ergebnisse erbrachte, wurde dieser Inkubationszeitpunkt auch in den folgenden Versuchssettings mit den aus Spenderblut isolierten humanen Granulo-/Monozyten genutzt.