

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung
(Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**VERGLEICHENDE ANALYSE DES EINFLUSSES VON
HYPEROXIE UND PHYSISCHER BELASTUNG AUF DIE
EXPRESSION VON INFLAMMATORISCHEN UND
ANTI-OXIDATIVEN FAKTOREN IN PERIPHEREN
MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Roshanak Sharghi

aus **Minsk**

Kiel **2019**

1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. Susanne Sebens Institut für Experimentelle Tumorforschung
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Alexander Art Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin
Tag der mündlichen Prüfung:	16.09.2020
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	26.03.2020
	gez.: Prof. Dr. Johann Roider Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

Für meine Mutter, der ich alles verdanke

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Vorbemerkung	VII
1 Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung von Sauerstoff für den menschlichen Körper	1
1.2 Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies unter hyperbarer Hyperoxie	2
1.3 Wirkungen von hyperbarer Hyperoxie auf periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs)	4
1.4 Einfluss von physischer Belastung auf den Körper und PBMCs	6
1.5 Zu analysierende Faktoren	7
1.6 Fragestellung dieser Arbeit	9
2 Materialien	10
2.1 Geräte und Zubehör	10
2.1.1 Inkubatoren	10
2.1.2 Messgeräte	10
2.1.3 Pipetten	10
2.1.4 Weitere Geräte	10
2.1.5 Zentrifugen	10
2.2 Reagenzien	11
2.3 Kits	11
2.4 Verbrauchsmaterialien	11
2.5 Verwendete Primer	11
2.6 Probandengut	12
2.7 Computerprogramme	13
3 Methoden	14
3.1 Isolierung von PBMCs	14
3.2 Exposition von PBMCs in der Experimentaldruckkammer	14

3.3 Isolierung der RNA.....	14
3.4 Reverse Transkription.....	15
3.5 Echtzeit Polymerasekettenreaktion (Realtime PCR)	16
3.6 Statistische Auswertung.....	17
4 Ergebnisse.....	18
4.1 Genexpression von Markern für oxidativen Stress in PBMCs	18
4.2 Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen in PBMCs.....	20
4.3 Genexpression von entzündungshemmenden Zytokinen in PBMCs.....	23
4.4 Genexpression von Markern für oxidativen Stress in PBMCs nach Exposition gegenüber HBO bzw. AA und 18 stündiger Erholungsphase	25
4.5 Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen in PBMCs nach Exposition gegenüber HBO bzw. AA und 18 stündiger Erholung.....	26
4.6 Genexpression von entzündungshemmenden Zytokinen in PBMCs nach Exposition gegenüber HBO bzw. AA und 18 stündiger Erholung.....	28
5 Diskussion	29
6 Zusammenfassung	36
7 Literaturverzeichnis	38
Danksagung	49
Publikationsverzeichnis	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehungs- und Abbauewege von ROS. Modifiziert nach ERICKSON, 2011, S.906.....	3
Abbildung 2: Genexpression von Markern für oxidativen Stress in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern basal und nach Exposition gegenüber 4 bar O ₂ (HBO) für 4 Stunden	19
Abbildung 3: Basale Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern. Basale Genexpression der angegebenen Gene in PBMCs direkt nach der Isolierung	21
Abbildung 4: Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern nach Exposition gegenüber 4 bar O ₂ (HBO) für 4 Stunden	22
Abbildung 5: Genexpression von entzündungshemmenden Zytokinen in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern basal und nach Exposition gegenüber 4 bar O ₂ (HBO) für 4 Stunden.....	24
Abbildung 6: Genexpression von Markern für oxidativen Stress in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern nach Exposition gegenüber HBO bzw. AA und 18-stündiger Erholung.....	25
Abbildung 7: Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern nach Exposition gegenüber HBO bzw. AA und 18-stündiger Erholung	27
Abbildung 8: Genexpression von entzündungshemmenden Zytokinen in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern nach Exposition gegenüber HBO bzw. AA und 18-stündiger Erholung.....	28

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pro- und anti-inflammatorische Faktoren, die in dieser Studie untersucht wurden, und ihre wichtigsten Eigenschaften	7
---	---

Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>ambient air</i> (Umgebungsluft)
Apaf-1	Apoptose Protease-aktivierender Faktor- 1
ata	Technische Atmosphäre
atm	Physikalische Atmosphäre
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Maß-Index
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CH	Schweiz
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct-Wert	<i>cycle of threshold</i> -Wert
CYP	Cytochrom P450
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DE	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	Und andere (Latein: <i>et alii</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HBO	Hyperbare Oxygenierung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O	Wasser
HO-1	Hämoxygenase-1
HO·	Hydroxyl-Radikal
Hsp72	Heat shock 70 kDa protein 1
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-1β	Interleukin-1beta
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
kg	Kilogramm

kPa	Kilopascal
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
min	Minute
NADPH-Oxidase	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat Oxidase
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NQO1	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{·-}	Superoxidanion
ONOO	Peroxinitrit
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PBMC	Mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TGF-β1	Transforming Growth Factor-beta1
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
UK	Vereinigtes Königreich
U/µl	Einheiten/Mikroliter
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VO ₂ max	Maximale Sauerstoffaufnahme
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

Tillmans, F., **Sharghi, R.**, Noy, T., Kähler, W., Klapa, S., Sartisohn, S., Sebens, S., & Koch, A. (2019). Effect of hyperoxia on the immune status of oxygen divers and endurance athletes. *Free Radical Research*, 53(5):522-534.

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Sauerstoff für den menschlichen Körper

Sauerstoff gehört zum dritthäufigsten Element in unserem Universum. Somit ist er für den menschlichen Körper lebensnotwendig. Er ist ein Bestandteil aller wichtigen Stoffwechselfvorgänge im Körper sowie der Zell- und Organfunktionen. Wichtige Moleküle wie Proteine, Kohlenhydrate, Fette sowie auch Knochen und Zähne enthalten Sauerstoff. Entdeckt wurde Sauerstoff erstmals im Jahr 1771 von Carl Wilhelm Scheele, einem pharmazeutischen Chemiker. Etwa zeitgleich, aber unabhängig von Scheele, entdeckte der englische Naturwissenschaftler und Philosoph Joseph Priestley das Element Sauerstoff, von dem er 1774 berichtete. Beide teilten ihre Entdeckung Antoine Laurent de Lavoisier, einem französischen Chemiker, mit, der die Experimente von Scheele und Priestley wiederholte und letztendlich dem geruchslosen Gas den Namen „Sauerstoff“ gab. Anfang des 20. Jahrhunderts fand er in der Anästhesiologie Verwendung (Heffner 2013; Severinghaus 2002; Vincent, Taccone & He 2017). Heutzutage spielt Sauerstoff in der klinischen Medizin eine bedeutende Rolle. So wird er zur Narkoseeinleitung verwendet, um einen Vorrat an Sauerstoff im Körper zu schaffen oder auch in der Sauerstofftherapie, um bestimmte Erkrankungen zu behandeln (Sjöberg & Singer 2013).

Für eine optimale Sauerstoffversorgung des Körpers gelangt zunächst der über die Atmung aufgenommene Sauerstoff in die Lunge, bindet dort an das Hämoglobinmolekül und wird weiter in die Zellen transportiert (Dunn, Mythen & Grocott 2016). Pro Minute wird im Körper des Menschen etwa 0,4 Liter Sauerstoff umgesetzt (Müller 2001). In der Zelle wiederum durchläuft der Sauerstoff mehrfache biochemische Reaktionen (Atmungskette), bei der unter anderem auch das Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) als Produkt entsteht, welches ein wichtiger Energieträger des menschlichen Organismus ist (Ontology 2007). Der menschliche Körper ist sogar in der Lage, seine Produktion von Hämoglobin zu erhöhen, z.B. durch einen dauerhaften Aufenthalt in Höhenregionen. Diesen Effekt nutzen viele Leistungssportler, um ihre Leistungsfähigkeit zu verbessern (Prommer & Schmidt 2009). Die Frage, was mit dem Körper passiert, wenn er zu hohen,

unphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen oder extremer körperlicher Aktivität ausgesetzt wird, ist nach wie vor unzureichend beantwortet.

1.2 Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies unter hyperbarer Hyperoxie

Es ist bekannt, dass Taucher oder Patienten während einer HBO-Therapie (hyperbare Oxygenierung) und auch während der Anästhesie sehr hohen Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt sind. Teilweise befindet sich der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) zwischen ($pO_2 > 21$ kPa) bis hin zu extremeren Werten von 280-300 kPa (Kähler et al. 2016). HBO ist unter anderem auch dafür verantwortlich, die Sauerstofflöslichkeit im Blut zu erhöhen, sodass das Gewebe mit mehr Sauerstoff versorgt werden kann (Vince et al. 2011; Weber et al. 2009).

Der größte Teil des Sauerstoffs (ca. 90%) wird während der Atmungskette in den Mitochondrien verbraucht (Udilova 1999). Dort wird über mehrere Proteinkomplexe Sauerstoff (O_2) zu Wasser (H_2O) reduziert. Nichtsdestotrotz können im Komplex I und Komplex III der Mitochondrien Nebenreaktionen während der Atmungskette entstehen. Hierbei können die freigesetzten Elektronen fehlerhaft auf den molekularen Sauerstoff transportiert werden und den Sauerstoff in ein Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) reduzieren, was zu den reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: ROS = reactive oxygen species) gehört (Bereiter-Hahn & Brandt 2007; Eliades, Matsuura & Ravid 2012; Turrens 2003). Da viele ROS ungepaarte Elektronen enthalten, werden sie auch als freie Radikale bezeichnet. Diese Radikale sind in der Lage, einem Molekül ein Elektron zuzuführen oder es ihm wegzunehmen. Beide Prozesse führen dazu, dass das Molekül selbst radikalisch wird (Baudler 2001; Halliwell 1989).

Die freien Radikale werden einmal in reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species: ROS) oder in reaktive Stickstoffverbindungen (reactive nitrogen species: RNS) unterteilt (Niess et al. 2002). Wichtige ROS-Verbindungen sind Superoxid- ($O_2^{\cdot-}$) und Hydroxylradikale (HO^{\cdot}) sowie nichtradikale Spezies, z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Zu den reaktiven RNS-Verbindungen, die ebenfalls unter Hyperoxie entstehen, gehören Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) und Peroxynitrit ($ONOO^-$) (Kähler et al. 2016; Niess et al. 2002; Trachootham et al. 2008).

Laut Literatur sollen 1-5% der transportierten Elektronen in der Atmungskette zur Entstehung von ROS beitragen (Bereiter-Hahn & Jendrach, 2009). Jedoch kamen St-

Pierre, Buckingham, Roebuck & Brand (2002) zu der Erkenntnis, dass der Gesamtanteil der Elektronen, die ROS bilden, nur 0,15 % beträgt, was deutlich geringer ist als der ursprünglich angenommene Wert. Das deutet darauf hin, dass die Mitochondrien nicht die einzige Quelle der ROS-Produktion sind.

Es wird zwischen endogenen und exogenen Quellen der ROS- bzw. RNS-Bildung unterschieden. Zu den exogenen Faktoren gehören Röntgenstrahlung, UV-Strahlung, Schwermetalle und andere Umweltgifte. Weitere endogene Quellen neben den Mitochondrien sind Cytochrom P450 (CYP), Xanthinoxidase, NADPH-Oxidase und Peroxisomen (Gosslau & Rensing 2002; Trachootham et al. 2008; Yavari et al. 2015).

Normalerweise entstehen in eukaryotischen Zellen unter physiologischen Bedingungen geringe Mengen von ROS, die aber von bestimmten Schutzsystemen der Zelle, den sogenannten *Scavenger-Systemen*, beseitigt werden. Dazu gehören die Superoxiddismutase, die Peroxidase und das Glutathionsystem (Marengo et al. 2016).

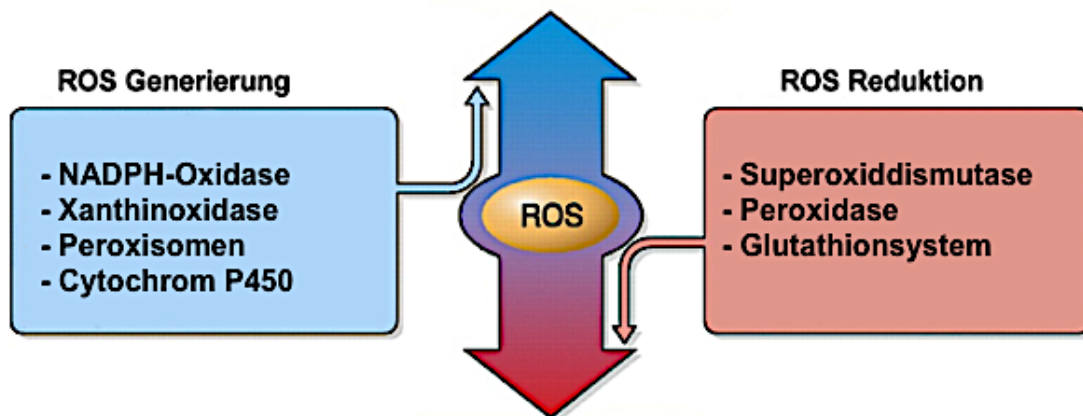


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehungs- und Abbauewege von ROS. Modifiziert nach ERICKSON, 2011, S.906.

Wenn es allerdings zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung und der Eliminierung von ROS durch die anti-oxidativen Schutzsysteme kommt, entsteht oxidativer Stress (Poulsen, Prieme & Loft 1998). Das ist immer dann der Fall, wenn die Redox-Homöostase gestört ist (Trachootham et al. 2008). Bekannt ist, dass unter hyperbarer Oxygenierung viel ROS freigesetzt werden (Narkowicz, Vial & McCartney 1993). Ein moderater Anstieg von ROS begünstigt in der Regel die Zellproliferation

und das Überleben von Zellen (Trachootham et al. 2008). Jedoch führt ein übermäßiger Anstieg von ROS zum Zelltod, in dem sich H_2O_2 , was in den Mitochondrien gebildet wird, mit Eisen und Kupfer verbindet und sich in das reaktive Hydroxylradikal ($HO\cdot$) umwandelt. Schließlich greift das Hydroxylradikal wichtige Biomoleküle, wie Proteine, Kohlenhydrate, Fette und die DNA an und führt letzten Endes zum Zelltod (Gosslau & Rensing 2002).

1.3 Wirkungen von hyperbarer Hyperoxie auf periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs)

Wie bereits erwähnt, entstehen erhöhte ROS-Spiegel unter anderem unter künstlichen Bedingungen, wie in der HBO-Therapie, Notfallmedizin oder beim Tauchen. Besonders militärische O_2 -Taucher sind davon betroffen, weil sie mit Sauerstoff-angereicherten Gasgemischen als Atemgas tauchen und erhöhten Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt sind (Kähler et al. 2016). Welche positiven und negativen Effekte hyperbare Hyperoxie auf die Funktion des Körpers und die von Immunzellen haben können, werden hier kurz erläutert.

In der HBO Therapie wird der Patient mit 100% Sauerstoff und einem Druck von über 1 physikalischer Atmosphäre (atm) behandelt. Dabei kann HBO bei der Heilung vieler Krankheiten behilflich sein, z.B. bei Luftembolien, chronischen Wunden, Geschwüren und Gasbrand (Godman et al. 2010; Lahat et al. 1995). Es ist sogar in der Lage, die Kollagenproduktion zu stimulieren, um so eine bessere Wundheilung zu gewährleisten. Die Untersuchungen zeigen auch, dass HBO, Hämoxigenase-1 (HO-1), ein anti-oxidativ wirkendes Enzym, was die Zellen vor oxidativem Stress schützt, induziert (Godman et al. 2010). In der Studie von Ferrer et al., (2007) wurde beobachtet, dass es sowohl bei Tauchgängen in 40 m Tiefe als auch bei trockener HBO-Exposition, zu einer erhöhten Expression von HO-1 kommt. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass unmittelbar nach dem Tauchen in 50 m Tiefe für 35 min. die Expression des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) in den neutrophilen Granulozyten erhöht ist und es nach einer dreistündigen Erholungsphase zu einer Erhöhung von weiteren Zytokinen wie IL-10, IL-8 und IL-1 β kommt (Sureda et al. 2014). IL-6 ist durch seine pro- und anti-inflammatorische Wirkkomponente ein wichtiges Zytokin zur Aktivierung und Regulierung der Akute-Phase-Reaktion sowie der Stimulierung der Lymphozyten (Jones 2005; Xing et al. 1998). Im Gegensatz dazu hemmt das anti-inflammatorische

Zytokin IL-10 die Aktivierung von T-Lymphozyten und begrenzt die Anzahl der pro-inflammatorischen Zytokine. Somit schützt es den Körper davor, sich selbst durch eine übermäßige Entzündungsreaktion zu zerstören (Grütz 2005; Moore et al. 2001). Neben den physiologischen Effekten der hyperbaren Hyperoxie sind auch negative Einflüsse bekannt. So konnte nachgewiesen werden, dass hohe Sauerstoffpartialdrücke wie z.B. beim Tauchen schädlich für das Lungengewebe und das zentrale Nervensystem (ZNS) sein können. Expositionen gegenüber pO_2 über 1,4 technischer Atmosphäre (ata) können schon zu neurologischen Beschwerden führen und bei einem pO_2 über 0,5 ata kommt es in der Lunge zur Fibrose. Zu dieser Erkenntnis kam erstmals im Jahr 1899 der Pathologe James Lorrain Smith, in dem er bei seinen Versuchen kleine Tiere, wie Mäuse und Lerchen hohen Sauerstoffdrücken aussetzte. Die meisten Tiere starben aufgrund der ZNS Toxizität oder Lungenentzündung (Wingelaar, van Ooij & van Hulst 2017). Jedoch hat eine weitere Studie, in der Taucher über 8-12 Tage beobachtet wurden, gezeigt, dass es zu keinerlei Verringerung der Lungenfunktion kam. Es konnte lediglich eine Kurzsichtigkeit bei einigen Tauchern festgestellt werden, die sich nach der Exposition gegenüber des erhöhten Sauerstoffpartialdrucks auflöste (Fock, Harris & Slade 2013). Hinweise deuten auch darauf hin, dass hyperbarer Sauerstoff in Lymphozyten, Apoptose, also programmierten Zelltod, verursachen kann. Die Apoptose setzt schon bei 2-3 ata ein. Dieser Wert wird ebenfalls in der HBO Therapie erreicht (Weber et al. 2009). Bei der Apoptose werden sterbende Zellen durch Phagozytose durch Immunzellen entfernt, ohne eine Entzündung im Gewebe auszulösen (Hug 2000).

Die Apoptose wird folgendermaßen ausgelöst: Aufgrund der erhöhten ROS-Bildung in den Mitochondrien, die während hyperbarer Hyperoxie entsteht, wird die Permeabilität in der mitochondrialen Membran erhöht. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c in das Zytoplasma. Durch die Bindung von Cytochrom c mit dem apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Faktor Apaf-1) und der Anwesenheit von Desoxyadenosintri-phosphat (dATP) entsteht ein Komplex, der als Apoptosom bezeichnet wird. Das wiederum aktiviert die Caspase-Kaskade und führt letzten Endes zum Zelltod (Turrens 2003).

1.4 Einfluss von physischer Belastung auf den Körper und PBMCs

Nicht nur unter hyperbarer Hyperoxie kann oxidativer Stress entstehen, sondern auch unter physischer Belastung. 1978 wurde erstmals über oxidativen Stress, der bei körperlicher Aktivität entsteht, berichtet (Powers & Jackson 2008). Eine weitere Studie im Jahr 1982 konnte zeigen, dass hauptsächlich kontrahierende Muskeln ROS produzieren und somit zu Schäden im Gewebe führen (Davies et al. 1982). Auch Hoppeler (1986) stellte fest, dass intensive körperliche Belastung zu Strukturschäden in den Muskeln führt.

ROS/RNS können sowohl in ruhenden als auch in kontrahierenden Muskeln erzeugt werden. Niedrige Spiegel sind wichtig, um die Kontraktilität aufrechtzuerhalten, während bei gesteigerter Zunahme die Muskeln erschöpfen (Powers & Jackson 2008).

Obwohl frühere Studien über die negativen Auswirkungen der ROS-Produktion in den Muskeln berichteten, wird in neueren Studien deutlich, dass ROS- und RNS-Produktion für die Muskeladaptation während körperlicher Aktivität notwendig sind (Jackson 2008; Powers, Nelson & Hudson 2011; Powers, Talbert & Adihetty 2011). Ebenso demonstriert die Studie von Busquets-Cortés et al. (2017), dass regelmäßiges Training sowohl einen positiven Einfluss auf die mitochondriale Biogenese hat als auch die Fähigkeit von Mitochondrien in PBMCs, die Zellen vor oxidativem Stress zu schützen, verbessert. Außerdem fördert körperliche Aktivität die Zunahme von Zytokinen wie IL-6, IL-10, IL-1 β und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Peake et al. 2015). Während IL-6, IL-1 β und TNF- α zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören, gilt IL-10 als ein entzündungshemmendes Zytokin (Hildebrand, Pape & Krettek 2005). IL-6 ist häufig nach dem körperlichen Training erhöht und stimuliert die Produktion von entzündungshemmenden Zytokinen wie IL-10 (Petersen & Pedersen 2005; Zaldivar et al. 2006).

Es ist bekannt, dass körperliches Training gesundheitsfördernde Effekte haben kann. Demnach konnte in einer Studie, bei der neun Brustkrebs-Patientinnen in der Nachsorge und neun gesunde Kontrollpersonen an einem Halbmarathon teilnahmen, anti-inflammatorische Effekte durch Sport verzeichnet werden (Zimmer et al. 2016). Weitere Studien bestätigen die Aussage, dass bei gut trainierten Probanden eine intensive Ausdauerübung weder zu Apoptose in den Lymphozyten noch zu DNA-Schäden führt (Mooren, Lechtermann & Völker 2004; Peters et al. 2006).

Regelmäßige körperliche Aktivität kann also die Bildung von ROS/RNS reduzieren und DNA Schäden in den Zellen minimieren (Niess et al. 2002).

1.5 Zu analysierende Faktoren

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, können hyperbare Hyperoxie sowie physische Belastungen sowohl positive als auch negative Wirkungen auf den Körper haben. Bisher wurde jedoch noch nicht vergleichend untersucht, ob oxidativer Stress während physischer Belastung bzw. hyperbarer Hyperoxie die Expression von anti-inflammatorischen (entzündungshemmenden) oder pro-inflammatorischen (entzündungsfördernden) Zytokinen sowie anti-oxidativen Stressmarkern in PBMCs verändert.

Deswegen sollen folgende Gene in den PBMCs genauer analysiert werden: TGF- β 1, NQO1, HO-1, IL-1 β , IL-12, IL-6, IL-10, IFN- γ .

In der nachfolgenden **Tabelle 1** werden die untersuchten Faktoren und ihre wichtigsten Eigenschaften kurz zusammengefasst:

Tabelle 1 : Pro-und anti-inflammatorische Faktoren, die in dieser Studie untersucht wurden, und ihre wichtigsten Eigenschaften

Die in der **Tabelle 1** aufgeführten Informationen sind folgenden Publikationen entnommen: (Borish & Steinke 2003; Dinarello 2005; Dinkova-Kostova & Talalay 2010; Dulak et al. 2008; Grütz 2005; Jones 2005; Ross et al. 2000; Schroder et al. 2004; Xing et al. 1998).

Gene	Eigenschaften
HO-1	<ul style="list-style-type: none"> - fördert die Gefäßneubildung - anti-oxidativ - anti-apoptotisch - anti-inflammatorisch
IFN- γ	<ul style="list-style-type: none"> - anti-mikrobiell - anti-Tumor-Eigenschaften - stimuliert die Antigenpräsentation und Zytokinproduktion - pro-inflammatorisch

IL-1β	<ul style="list-style-type: none"> - aktiviert T-Lymphozyten - stimuliert die Synthese von Akute-Phase-Proteine - anti-apoptotisch - pro-inflammatorisch
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> - stimuliert Lymphozyten - aktiviert und reguliert Akute-Phase-Proteine - hat pro- und anti-inflammatorische Wirkkomponenten
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> - hemmt die Produktion von IL-1β und IFN-γ - hemmt die Aktivierung von T-Lymphozyten - begrenzt die Anzahl proinflammatorischer Zytokine - steigert die B-Zell- Differenzierung - anti-inflammatorisch
IL-12	<ul style="list-style-type: none"> - induziert Proliferation und Zytokinproduktion von NK-Zellen - fördert die Proliferation von T-Helferzellen - pro-inflammatorisch
NQO1	<ul style="list-style-type: none"> - anti-oxidative Wirkung - zytoprotektiv - fängt Superoxid ab
TGF-β1	<ul style="list-style-type: none"> - fördert die Wundheilung - inhibiert B-Lymphozyten, T-Helferzellen und zytotoxische Lymphozyten und fördert die Entstehung von regulatorischen T-Zellen - anti-inflammatorisch

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Ziel dieser Untersuchung war es zu untersuchen, wie der menschliche Körper auf erhöhte Sauerstoffpartialdrücke (Hyperoxie) im Vergleich zu extremer physischer Belastung reagiert und ob es dabei zu einer Schädigung oder eher Anpassung der Immunzellen kommt. Hierzu wurden PBMCs von folgenden Probandengruppen isoliert und entweder direkt untersucht oder experimentell erhöhten Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt:

1. **Kontrollgruppe** (gesunde Marine-Soldaten, die mäßig oder wenig Sport betreiben)
2. **Athleten** (selbsternannte Amateursportler mit hoher sportlicher Aktivität)
3. **Kampfschwimmer** (aktive O₂-Taucher der deutschen Marine)

Die isolierten PBMCs wurden entweder unbehandelt belassen (native Zellen) oder für 4 Stunden in eine Experimentaldruckkammer bei 4 bar Sauerstoffpartialdruck bzw. parallel unter normalen Sauerstoffbedingungen inkubiert. Nach der Exposition wurden die PBMCs entweder direkt aufgearbeitet oder für eine Erholungszeit von 18 Stunden in einen Inkubator unter Umgebungsdruck gestellt. Von den unterschiedlich behandelten PBMCs wurde anschließend RNA isoliert und die Expression pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren sowie anti-oxidativer Marker, die für eine oxidative Stressantwort indikativ sind, mittels RT-qPCR analysiert. Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Zeichnen sich PBMCs der unterschiedlichen Gruppen per se (=basal) durch unterschiedliche Expressionslevel der verschiedenen pro- und anti-inflammatorischen Zytokine und anti-oxidativen Marker aus?
2. Wie wirkt sich die Exposition der PBMCs gegenüber erhöhten Sauerstoffpartialdrücken auf die Expressionslevel der verschiedenen pro- und anti-inflammatorischen Zytokine und anti-oxidativen Marker aus?
3. Wie wirkt sich die Exposition der PBMCs gegenüber erhöhten Sauerstoffpartialdrücken nach 18 stündiger Erholung auf die Expressionslevel der verschiedenen pro- und anti-inflammatorischen Zytokine und anti-oxidativen Marker aus?

2 Materialien

2.1 Geräte und Zubehör

2.1.1 Inkubatoren

Inkubator	Hersteller
QBA1 Blockthermostat	Grant, Cambridge, UK

2.1.2 Messgeräte

Messgerät	Hersteller
Infinite® 200 PRO, Mikroplatten-Reader	Tecan, Crailsheim, DE
LightCycler® 480 II	Roche, Basel, CH
NanoQuant Platte	Tecan, Crailsheim, DE

2.1.3 Pipetten

Pipette	Hersteller
Finnpipette F1 0.2-2 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 1-10 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 2-20 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 20-200 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 100-1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

2.1.4 Weitere Geräte

Weitere Geräte	Hersteller
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
HERAfreeze Basic freezer (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
VORTEX GENIUS 3 Vortex-Mischer	IKA-Werke, Staufen, DE

2.1.5 Zentrifugen

Zentrifuge	Hersteller
Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, DE
Sprout mini centrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA

2.2 Reagenzien

Reagenzie	Hersteller
Ethanol 70%, reinst	Merck Millipore, Darmstadt, DE
LightCycler®480 SYBR Green I Master	Roche, Basel, CH

2.3 Kits

Kit	Hersteller
peqGOLD Total RNA Kit	PeqLab, Erlangen, DE
RevertAid First Strand cDNA Synthese Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

2.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
0,1-10 µl, 10- 200 µl, 100-1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
1,5 ml, 2 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg, DE
96-Well PCR Platte, weiß	Roche, Basel, CH
LightCycler 480 Sealing Foil	Roche, Basel, CH
Micro-Touch Nitril Handschuhe	Ansell, München, DE

2.5 Verwendete Primer

Gen	Primer	Annealing temp.	Bezugsquelle
GAPDH	FW: TCC ATG ACA ACT TTG GTA TCG TGG RV: GAC GCC TGC TTC ACC ACC TTC T	58°C	Eurofins, Ebersberg, DE
HO-1	FW: TCC GAT GGG TCC TTA CAC TC RV: TAA GGA AGC CAG CCA AGA G	55°C	Biometra, Göttingen, DE
IFN-γ	FW: TCC CAT GGG TTG TGT GTT TA RV: AAG CAC CAG GCA TGA AAT CT	58°C	RealTime Primers via Biomol, Hamburg, DE

IL-1β	FW: TTC GAC ACA TGG GAT AAC GA RV: TCT TTC AAC ACG CAG GAC AG	58°C	RealTime Primers via Biomol, Hamburg, DE
IL-6	FW: ATG CAA TAA CCA CCC CTG AC RV: GAG GTG CCC ATG CTA CAT TT	58°C	RealTime Primers via Biomol, Hamburg, DE
IL-10	FW: AAG CCT GAC CAC GCT TTC TA RV: ATG AAG TGG TTG GGG AAT GA	58°C	RealTime Primers via Biomol, Hamburg, DE
IL-12	FW: TTA TGA TGG CCC TGT GCC TTA G RV: AGG AAG CAT TCA GAT AGC TCA TC	55°C	Biometra, Göttingen, DE
NQO1	FW: AAA AGA AGC TGG AAG CCG CA RV: AGG ATT TGA ATT CGG GCG TA	58°C	RealTime Primers via Biomol, Hamburg, DE
TGF-β1	FW: CGT GGA GCT GTA CCA GAA ATA RV: TCC GGT GAC ATC AAA AGA TAA	58°C	RealTime Primers via Biomol, Hamburg, DE

2.6 Probandengut

Im Rahmen der Untersuchung des Schiffahrtmedizinischen Institutes der Marine in Kronshagen nahmen 50 gesunde männliche Probanden im Alter zwischen 20 und 40 Jahren mit einem Body-Maß-Index (BMI) von 18,5 - 28,7 (mittlerer BMI lag bei 24,3) an der Studie teil. Jedem Probanden wurden zur Gewinnung von PBMCs venöse EDTA-Blutproben mit 27 ml Vollblut entnommen. Die Probanden wurden jeweils nach ihrer körperlichen Aktivität und Sauerstoff-Exposition in drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe bestand aus aktiven Kampfschwimmern (O₂-Taucher) der Deutschen Marine während einer anstrengenden Wassertrainingsphase. Die Athletengruppe bestand aus selbst erklärten Amateursportlern, die die Spiroergometrie absolviert hatten und folgende altersabhängige maximale Sauerstoffaufnahme (VO₂max) Kriterien erfüllen mussten (\leq 20 Jahre: 51,0 mL O₂ /min/kg | 21-30 Jahre: > 46,5 mL O₂ /min/kg | 31- 40 Jahre: > 45,0 mL O₂ /min/kg | \geq 41 Jahre: 43,8 mL O₂/min/kg). Die Kontrollgruppe bestand aus gesunden Marine-Soldaten, die die oben genannten VO₂max-Anforderungen nicht erfüllten, aber ihre jährliche medizinische Untersuchung bestanden.

Die Studie wurde seitens der Ethikkommission des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) gemäß der WMA-Deklaration von Helsinki genehmigt

(Ethikvotumnummer A120/13). Alle Probanden gaben zur Durchführung der Studie ihr schriftliches Einverständnis ab.

2.7 Computerprogramme

Computerprogramm	Hersteller
i-control™ Microplate Reader Software	Tecan, Crailsheim, DE
LightCycler480 Software	Roche, Basel, CH
Mendeley Desktop 1.19.2	Mendeley Ltd., London, UK
Microsoft Excel für Mac 14.1.4	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft Word für Mac 14.1.4	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
SigmaPlot 12.5	Systat Software Inc., Chicago, USA
Tecan Infinite 200Pro	Tecan, Crailsheim, DE

3 Methoden

3.1 Isolierung von PBMCs

Die Isolierung von PBMCs erfolgte im Schiffahrtmedizinischen Institutes der Marine in Kronshagen. Dafür wurden von allen Probanden venöse EDTA-Blutproben (27 ml) entnommen und durch einen Ficollgradienten getrennt (Zentrifuge: 35 Minuten 1400 UpM bei 20°C). Danach wurden die PBMCs mit einer sterilen Pasteurpipette geerntet und in 15 ml Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) suspendiert und zweimal gewaschen (Zentrifuge: 10 Minuten, 1600 UpM bei 4°C). Anschließend wurden die Zellen in RPMI 1640-Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Zur Lebensfähigkeitsuntersuchung wurde eine Probe der Zellen mit 0,4% Trypanblau-Färbelösung (Verdünnung 4:1) inkubiert und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Der Prozentsatz an lebensfähigen Zellen wurde während aller Experimente und Kultivierung berechnet und überwacht.

3.2 Exposition von PBMCs in der Experimentaldruckkammer

Wie die Isolierung der PBMCs erfolgte die Exposition der PBMCs in der Experimental- bzw. Kontrollkammer des Schiffahrtmedizinischen Institutes der Marine in Kronshagen. Die PBMCs wurden dafür in RPMI 1640-Zellkulturmedium mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml resuspendiert und auf 24-Well-Kulturplatten mit 2 ml Zellsuspension pro Well übertragen. Eine Platte wurde in eine Experimentaldruckkammer gebracht, wo unter hyperbaren Bedingungen die Zellkulturen für 4 Stunden 4,0 bar O₂ ausgesetzt wurden. Die andere Platte (Kontrollplatte) wurde in eine Nebenkammer der Umgebungsluft (AA) ausgesetzt. Die Temperatur während der Experimente betrug 37°C. Anschließend wurden beide Platten aus beiden Kammern für eine Erholungszeit von 18 Stunden in einen befeuchteten Inkubator (Luft, 37°C, 5% CO₂) unter Umgebungsdruck gestellt.

3.3 Isolierung der RNA

Die RNA Isolierung erfolgte im Institut für Experimentelle Tumorforschung in Kiel nach dem Protokoll des *peqGOLD Total RNA Kit*. Zuerst wurden die isolierten PBMCs ($1,2 \times 10^6$ Zellen) der verschiedenen Gruppen in 300 µl *Lysis Buffer T* lysiert. Das Lysat wurde dann auf die *DNA Removing Column*, die in einem 2 ml Röhrchen

steckten, pipettiert. Diese wurden dann bei 11200 UpM für eine Minute zentrifugiert, um die RNA im Durchfluss zu sammeln. Die Säule wurde anschließend entsorgt. Zum Säulendurchfluss wurde dann 300 µl Ethanol (70%) dazugegeben und vorsichtig auf dem Vortexer gemischt. Anschließend wurden die *PerfectBind Column* auf ein 2 ml Röhrchen gesteckt und das gesamte Volumen wurde auf die *PerfectBind Column* verteilt und für eine Minute bei 10200 UpM zentrifugiert.

Die *PerfectBind Column* mit der enthaltenen RNA wurde auf ein neues 2 ml Röhrchen gesteckt und mit 500 µl *RNA Wash Buffer I* gewaschen und eine Minute bei 10200 UpM zentrifugiert. Es wurde dann erneut mit 600 µl *RNA Wash Buffer II* gewaschen und wie zuvor für 1 Minute bei 10200 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule nochmals 2 Minuten bei 11000 UpM trocken zentrifugiert. Für die Elution der RNA wurden 40 µl RNase freies Wasser dazugegeben, eine Minute stehen gelassen und schließlich 1 Minute bei 7200 UpM zentrifugiert. Zur Quantifizierung der RNA wurde ein Spektrophotometer Tecan Infinite 200Pro in Kombination mit einer NanoQuant-Plattenapplikation benutzt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei – 80° C gelagert.

3.4 Reverse Transkription

Bei der Umschreibung der RNA in cDNA wurde das *RevertAid First Strand- cDNA Synthese Kit* verwendet. Dafür wurde 30-90 ng RNA mit 1 µl Oligo (dT) Primer und nukleasefreiem Wasser vermischt, um so ein Gesamtvolumen von 12,5 µl zu erreichen. Danach wurde die Lösung bei 65°C 5 Minuten inkubiert, auf Eis abgekühlt und anschließend für 1 Minute bei 12000 UpM zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge dazu gegeben:

4 µl *Reaction Buffer*

0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)

2 µl 10 mM dNTP Mix

1 µl *RevertAid M-MLV Reverse Transcriptase* (200 U/µl)

Nach dem Mischen und Zentrifugieren für 1 Minute bei 12000 UpM wurde die Mixtur bei 42 °C für 60 Minuten und anschließend bei 70 °C für 5 Minuten inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt.

3.5 Echtzeit Polymerasekettenreaktion (Realtime PCR)

Um die Genexpression in PBMCs zu analysieren, wurde eine Realtime-PCR durchgeführt. Dazu wurde in der Realtime PCR zur Quantifizierung der PCR-Produkte der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Dieser Farbstoff ist in der Lage, sich an doppelsträngige DNA zu binden. Durch die DNA-Bindung wird die Fluoreszenz um das 20- bis 100-fache erhöht. Das heißt, je mehr DNA eines Gens in der Probe gebildet wird, desto höher steigt das Fluoreszenzsignal, bis anschließend die Fluoreszenz eines Produktes den Schwellenwert (Ct-Wert) überschreitet. Als Referenzgen, auf das die Expression des Gens von Interesse normalisiert wird, wurde in dieser Arbeit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, weil es in allen Proben gleichermaßen transkribiert vorliegt.

Für die Durchführung der PCR wurde die zuvor hergestellte cDNA mit destilliertem Wasser in einem Verhältnis 1:5 vermischt. 2,5 µl der cDNA Lösung wurden dann in eine weiße 96-Well-PCR-Platte in Doppelwerten pipettiert. Dann wurden jeweils 7,5 µl Mastermix/Well entsprechend der verwendeten Primer zugegeben:

Mastermix pro Well mit Primern für **HO-1, IL-12:**

5 µl Light Cycler Sybr Green I Master

0,0375 µl F Primer (Vorwärtsprimer)

0,0375 µl R Primer (Rückwärtsprimer)

2,425 µl H₂O

= 7,5 µl /Well

Mastermix pro Well mit Primern für **IL-6, IL-1β, IL-10, IFN-γ, NQO1:**

5 µl Light Cycler Sybr Green I Master

1 µl Primer (1:50)

1,5 µl H₂O

= 7,5 µl /Well

Mastermix pro Well mit Primern für **GAPDH, TGF-β1:**

5 µl Light Cycler Sybr Green I Master

1 µl Primer F

1 µl Primer R

0,5 µl H₂O

= 7,5 µl /Well

Die verwendeten Primer und die Annealingtemperaturen sind in **Kapitel 2.5** aufgeführt. Anschließend wurde die Platte mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und zwei Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert. Die PCR wurde in einem Light Cycler 480 II mit bis zu 50 Amplifikationszyklen und anschließender Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die PCR erfolgte nach folgendem Temperaturprofil: Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für 5 Minuten, Primer-Annealing für die Gene HO-1 und IL-12 bei 55°C für 20 Sekunden, für die restlichen Gene bei 58°C für 20 Sekunden und für NQO1 ebenfalls bei 58°C aber für 45 Sekunden. Zum Abschluss erfolgte die Primer-Elongation für 30 Sekunden bei 72°C. Zur Auswertung wurden die LightCycler480 Software und Microsoft Excel benutzt. Die qPCR-Ergebnisse wurden mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet, bei der die Zyklusschwelle (Ct) auf 4,99 eingestellt wurde. Zur relativen Quantifizierung wurde der Mittelwert der Duplikate berechnet und der Ct-Wert des Gens von Interesse auf den Ct-Wert des Haushaltsgens GAPDH bezogen.

3.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SigmaPlot 12.5 benutzt. Auf normalverteilte Daten wurde der Shapiro-Wilk-Test angewendet. Nicht-parametrische Daten wurden mittels Kruskal-Wallis-Einweg-ANOVA im Rangtest analysiert. Statistische Signifikanzen wurden durch die Dunn's Methode nachgewiesen. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Genexpression von Markern für oxidativen Stress in PBMCs

Zuallererst wurde untersucht, ob die Genexpression von oxidativen Stressmarkern in PBMCs von Athleten, Kampfschwimmern und der Kontrollgruppe verschieden ist. Zu diesem Zweck wurde die Expression von HO-1 und NQO1 mittels RT-qPCR in PBMCs direkt nach der Isolierung (basale Expression) sowie nach 4 stündiger Exposition gegenüber hyperbarer Hyperoxie (HBO) bzw. als Kontrolle gegenüber Umgebungsluft (AA) untersucht. Dabei zeigte sich, dass PBMCs von Kampfschwimmern die niedrigste basale Expression von HO-1 (0,104 im Vergleich zu 0,209 bei der Kontrollgruppe und 0,219 bei Athleten) zeigten, aber die höchste basale Expression von NQO1 (0,00439 verglichen mit 0,000186 bei der Kontrollgruppe und 0,0000928 bei Athleten) aufwiesen (**Abb.2A**). Darüber hinaus beeinflusste die 4 stündige Exposition gegenüber HBO die HO-1 Genexpression in PBMCs von Kontrollprobanden und Athleten fast gar nicht und führte sogar zu einer leicht reduzierten Expression bei Kampfschwimmern (0,797-fache Expression von AA) (**Abb.2B**). Im Gegensatz dazu war die Expression von NQO1 nach HBO-Exposition in PBMCs aller Gruppen erhöht und die Athleten zeigten die stärkste Induktion (3,347-fach), während die Kampfschwimmer die schwächste Induktion (1,127-fach) verglichen mit der Exposition gegenüber AA zeigten (**Abb.2B**). Insgesamt wird an den Daten deutlich, dass in PBMCs von Kampfschwimmern die basale Expression von HO-1 am niedrigsten, die von NQO1 jedoch am höchsten ist im Vergleich zu Kontrollpersonen und Athleten. Auf die Behandlung mit HBO reagierte am stärksten die Athletengruppe mit einer Erhöhung der HO-1 und NQO1 Expression.

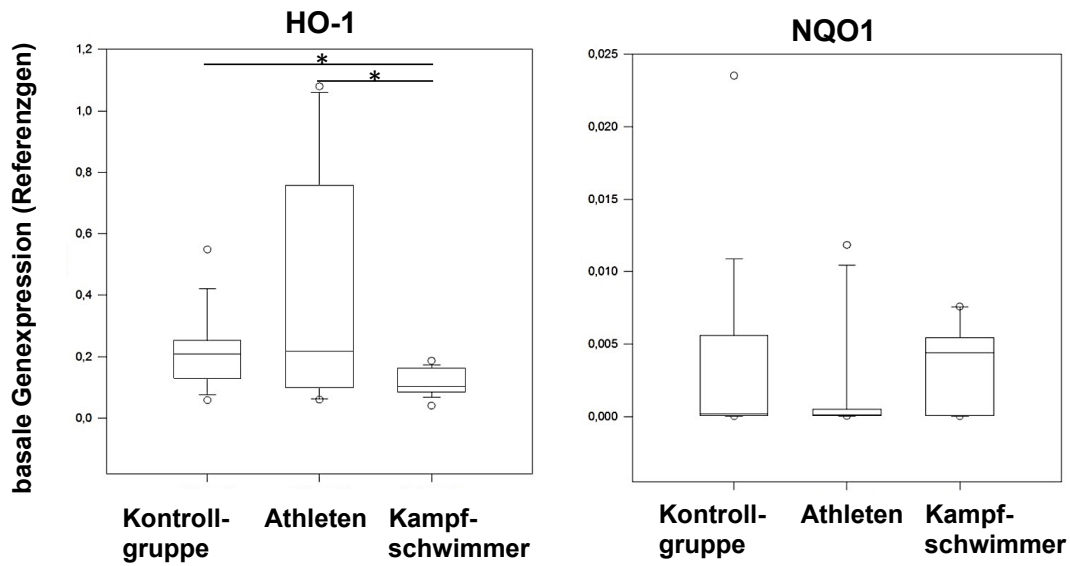
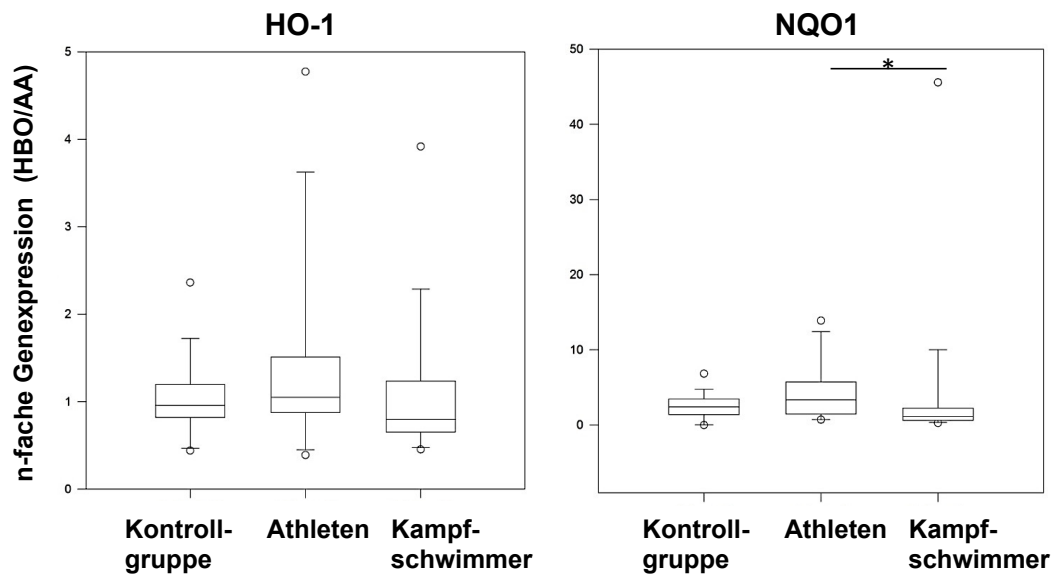
A**B**

Abbildung 2: Genexpression von Markern für oxidativen Stress in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern basal und nach Exposition gegenüber 4 bar O₂ (HBO) für 4 Stunden. RNA wurde aus Kontrollprobanden (n=18), Athleten (n=15) und Kampfschwimmern (n=17) isoliert und mittels RT-qPCR auf die Expression von HO-1 und NQO1 analysiert. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet und die Expression jedes Gens von Interesse auf die des Referenzgens normalisiert. **A)** Basale Genexpression von HO-1 und NQO1 in PBMCs direkt nach Isolierung. **B)** n-fache Genexpression nach Einwirkung von 4 bar O₂ für 4 Stunden (HBO) normalisiert auf AA (HBO/AA). Die Daten präsentieren die Medianwerte mit Quartilen (Q 0,75 als obere und Q 0,25 als untere Abweichung). * = P < 0,05.

4.2 Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen in PBMCs

Weiterhin wurden die PBMCs von der Kontrollgruppe, Athleten und den Kampfschwimmern hinsichtlich der Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-12 und IFN- γ , die alle für die T-Zell-vermittelte Immunität wichtig sind, charakterisiert. Im Gegensatz zu IL-1 β , welches am stärksten in PBMCs von der Kontrollgruppe exprimiert war (0,0533 verglichen mit 0,0226 bei Athleten und 0,0220 bei Kampfschwimmern), zeigten die Kampfschwimmer die höchsten basalen Expressionsniveaus von IL-6, IL-12 und IFN- γ verglichen mit den PBMCs aus den anderen beiden Gruppen (**Abb.3**).

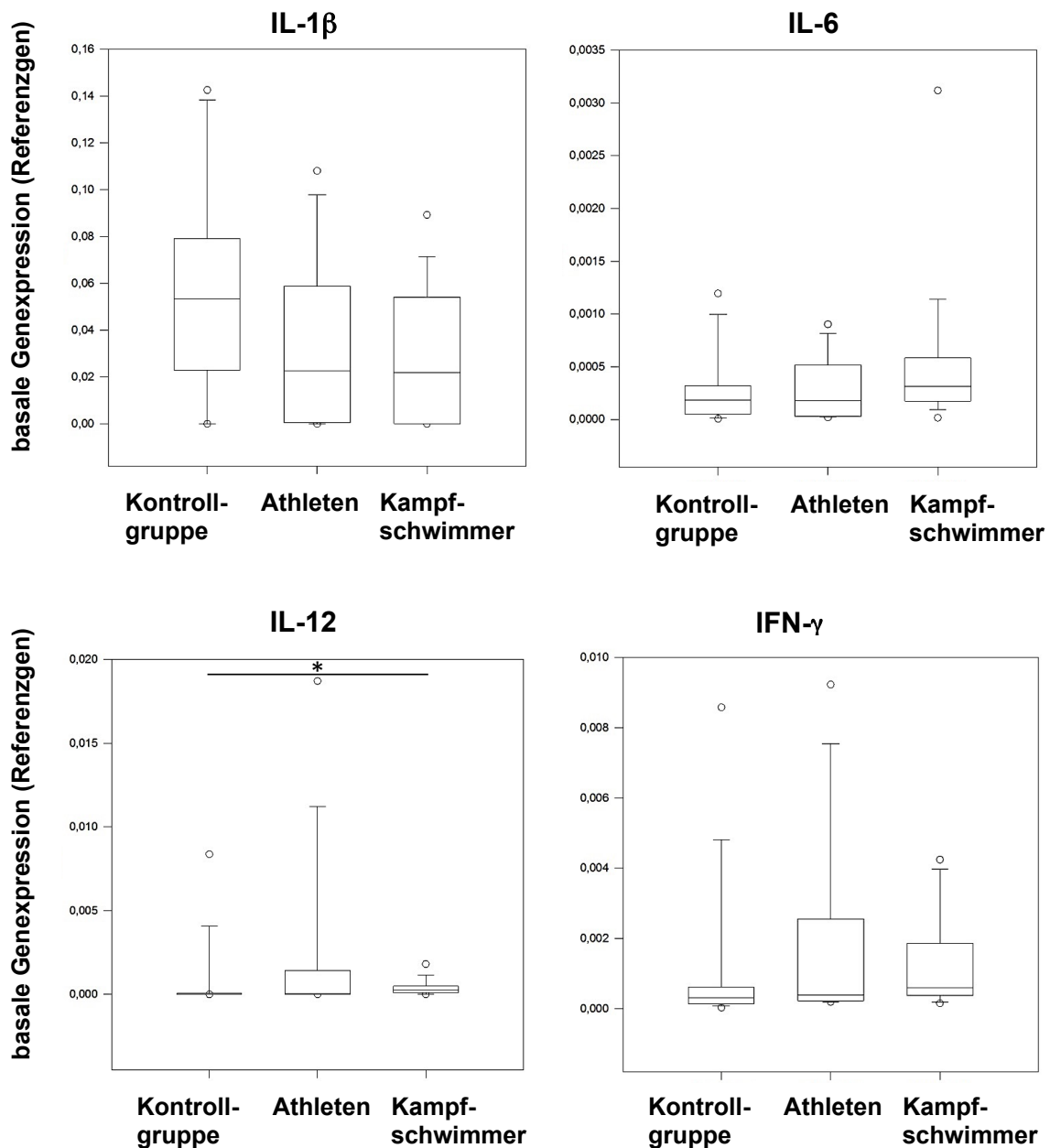


Abbildung 3: Basale Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern. Basale Genexpression der angegebenen Gene in PBMCs direkt nach der Isolierung. RNA wurde aus PBMCs von Kontrollpersonen (n=18), Athleten (n=15) und Kampfschwimmern (n=17) isoliert und mittels RT-qPCR auf die Expression von IL-1 β , IL-6, IL-12 und IFN- γ analysiert. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet und die Expression jedes Gens von Interesse auf die des Referenzgens normalisiert. Die Daten repräsentieren die Medianwerte mit Quartilen (Q0,75 als obere, Q0,25 als untere Abweichung). * = P <0,05.

PBMCs aus allen Gruppen reagierten auf HBO mit einer Hochregulierung von pro-inflammatorischen Zytokinen mit Ausnahme von IL-12, das bei den Kontrollprobanden kaum beeinflusst wurde (0,9-fach verglichen mit AA), bei den Athleten (0,5-fach verglichen mit AA) und bei den Kampfschwimmern (0,73-fach verglichen mit AA) sogar herunterreguliert war (**Abb.4**). PBMCs von Kampfschwimmern zeigten die stärkste HBO-vermittelte Hochregulierung von IL-6 und IL-1 β , während IFN- γ nach HBO in PMBCs von Kontrollpersonen am meisten hochreguliert wurde (**Abb.4**). Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass PBMCs von Kampfschwimmern eine höhere Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen im Vergleich zu Athleten und Kontrollpersonen aufweisen. Nach HBO-Behandlung war in den PBMCs aller drei Gruppen eine erhöhte Expression von IL-1 β , IL-6 und IFN- γ im Vergleich zu AA-Bedingungen zu detektieren.

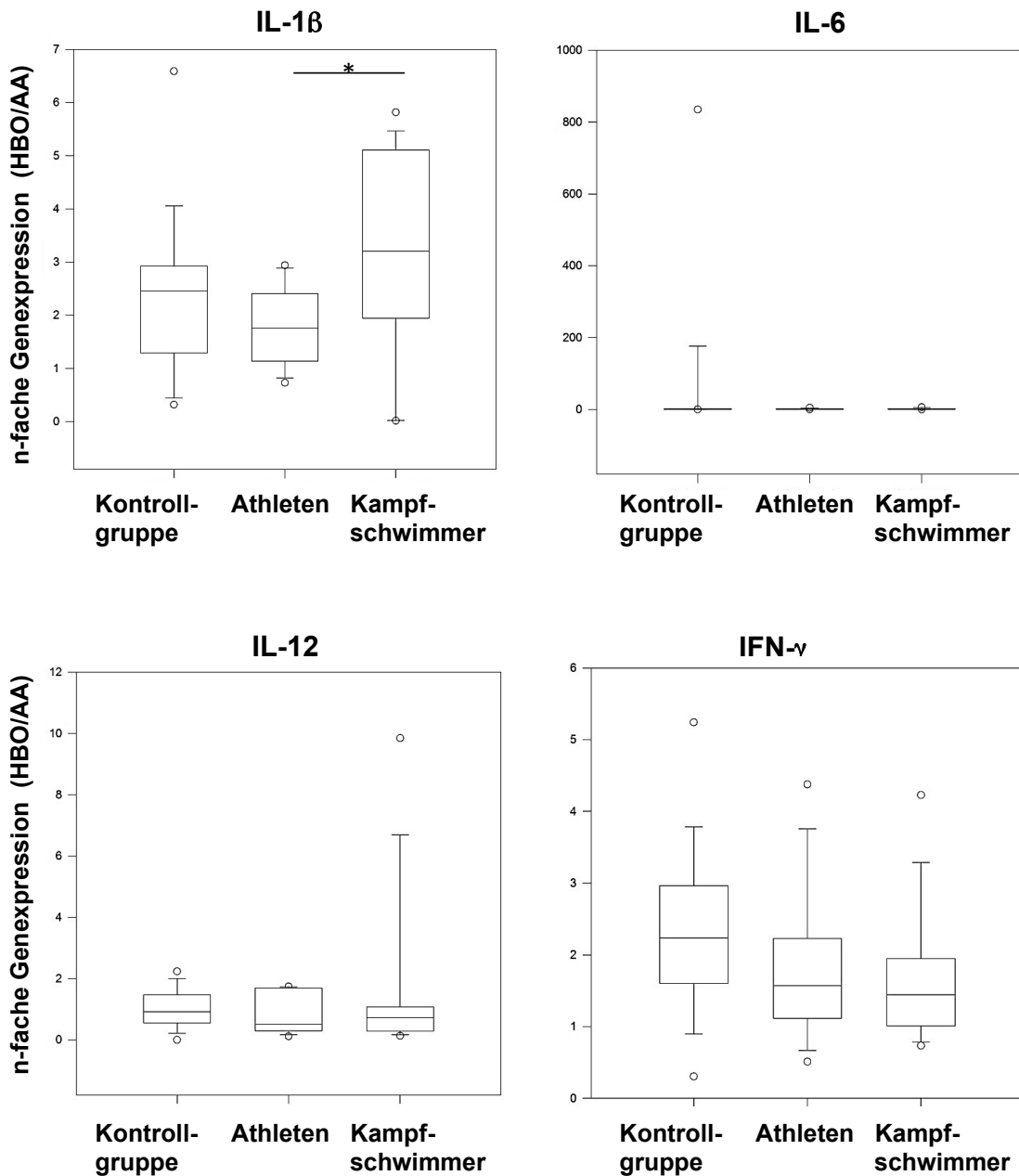


Abbildung 4: Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern nach Exposition gegenüber 4 bar O₂ (HBO) für 4 Stunden. RNA wurde aus PBMCs von Kontrollpersonen (n=18), Athleten (n=15) und Kampfschwimmern (n=17) isoliert und nach 4 stündiger Exposition gegenüber 4 bar O₂ (HBO) oder gegenüber Umgebungsluft (AA) mittels RT-qPCR auf die Expression von IL-1 β , IL-6, IL-12 und IFN- γ analysiert. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet und die Expression jedes Gens von Interesse wurde auf die des Referenzgens normalisiert. Dann wurde die Genexpression von HBO-behandelten PBMCs auf die von AA-behandelten normalisiert und als n-fache Genexpression von HBO/AA dargestellt. Die Daten repräsentieren die Medianwerte mit Quartilen (Q_{0,75} als obere, Q_{0,25} als untere Abweichung). * = P < 0,05.

4.3 Genexpression von entzündungshemmenden Zytokinen in PBMCs

Anschließend wurde die Expression von zwei wichtigen entzündungshemmenden Zytokinen, IL-10 und TGF- β 1, in PBMCs aus allen drei Gruppen analysiert. Während es keinen Unterschied im basalen Expressionsniveau von IL-10 gab, war die TGF- β 1 Expression in beiden Gruppen mit einer höheren körperlichen Aktivität deutlich reduziert. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (0,0537) war die TGF- β 1 Expression bei PBMCs von Athleten um etwa 40% (0,0327) und bei Kampfschwimmern (0,00706) sogar um 85% verringert (**Abb.5a**). Interessanterweise beeinträchtigte die Exposition gegenüber HBO für vier Stunden die Expression beider Gene in keiner der drei Gruppen (**Abb.5b**), was darauf hindeutet, dass die signifikant niedrigeren Basalmengen von TGF- β 1 in PBMCs von Kampfschwimmern eher die Folge einer Langzeit-Exposition gegenüber HBO sind.

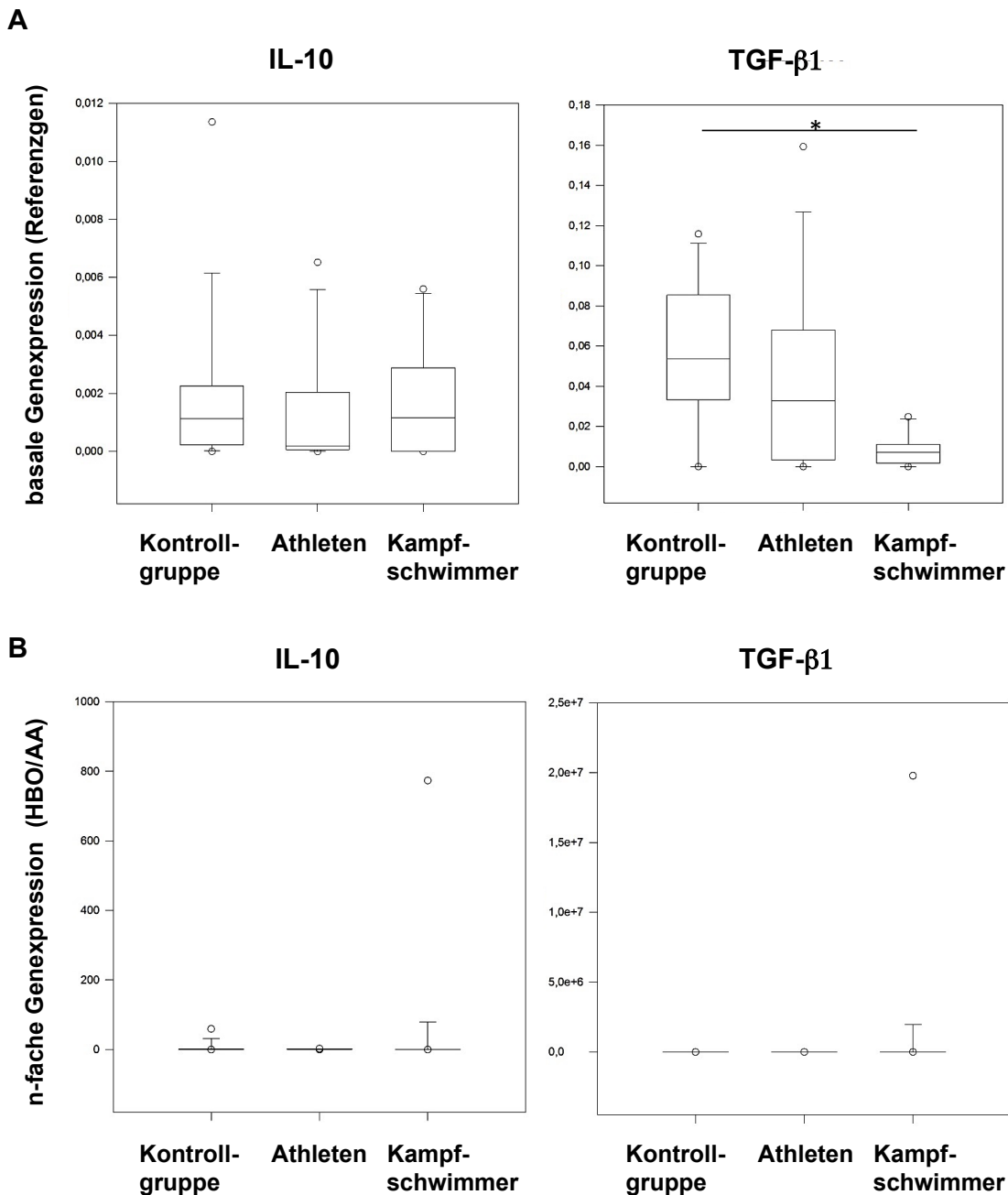


Abbildung 5: Genexpression von entzündungshemmenden Zytokinen in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern basal und nach Exposition gegenüber 4 bar O₂ (HBO) für 4 Stunden. RNA wurde aus PBMC von Kontrollpersonen (n = 18), Athleten (n = 15) und Kampfschwimmern (n = 17) isoliert und mittels RT-qPCR auf die Expression von IL-10 und TGF-β1 analysiert. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet, und die Expression jedes Gens von Interesse wurde auf die des Referenzgens normalisiert. **A)** Basale Genexpression der angegebenen Gene in PBMCs direkt nach der Isolierung. **B)** Genexpression nach Exposition gegenüber 4 bar O₂ (HBO) für 4 Stunden normalisiert auf AA. Die Daten repräsentieren die Medianwerte mit Quartilen (Q0,75 als obere, Q0,25 als untere Abweichung). * = P < 0,05.

4.4 Genexpression von Markern für oxidativen Stress in PBMCs nach Exposition gegenüber HBO bzw. AA und 18 stündiger Erholungsphase

Um zu überprüfen, ob sich die einmalige Exposition gegenüber HBO auch noch nach einer Erholungsphase auf die Genexpression in PBMCs auswirkt, wurde die Genexpression von anti-oxidativen Faktoren nach 18 stündiger Erholung bei Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass PBMCs von Kampfschwimmern die höchste Expression von HO-1 (1,526-fach verglichen mit AA) nach 18 Stunden aufwiesen, während die Expression von NQO1 nach 18 stündiger Erholung keine Veränderung zeigte (**Abb.6**). Im Vergleich zu den Daten nach 4 stündiger Exposition gegenüber HBO wird deutlich, dass es nach 18 stündiger Erholung zu einer Herunterregulierung der Genexpression von NQO1 in allen drei Gruppen und bei HO-1 hingegen zu einer deutlichen Aufregulierung kam.

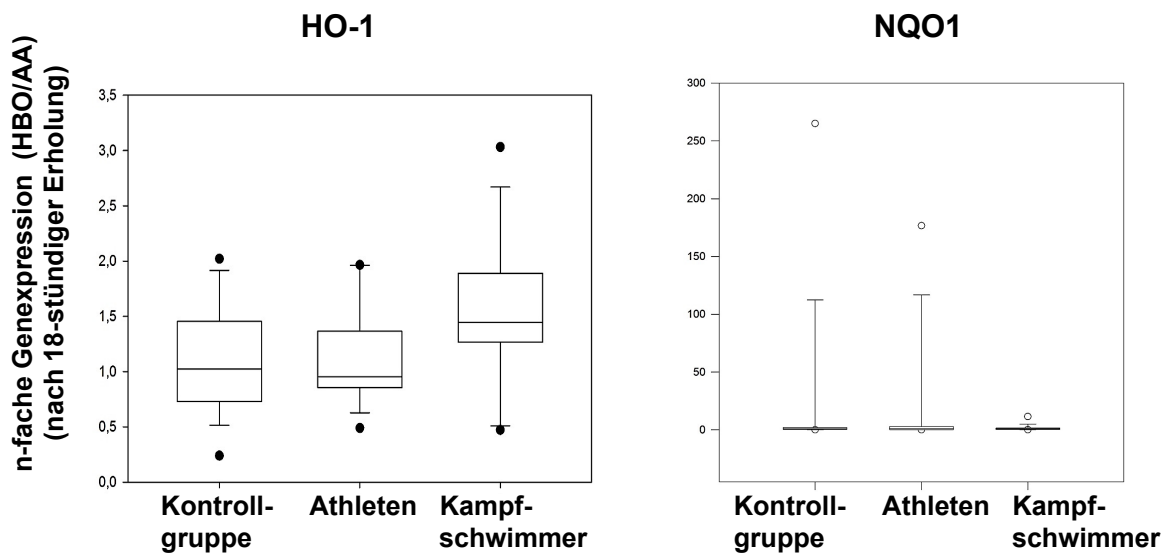


Abbildung 6: Genexpression von Markern für oxidativen Stress in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern nach Exposition gegenüber HBO bzw. AA und 18-stündiger Erholung. RNA wurde aus Kontrollpersonen (n=18), Athleten (n=15) und Kampfschwimmern (n=17) isoliert und nach 4 stündiger Exposition gegenüber 4 bar O₂ (HBO) bzw. Umgebungsluft (AA) sowie nach 18 stündiger Erholungsphase mittels RT-qPCR auf die Expression von HO-1 und NQO1 analysiert. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet und die Expression jedes Gens von Interesse auf die des Referenzgens normalisiert. Danach wurde die Expression der HBO exponierten PBMCs auf die Expression der AA exponierten PBMCs normalisiert und die Daten als n-fache Genexpression (HBO/AA) dargestellt. Die Daten sind entweder als Mediane mit Quartilen (Q 0,75 als obere und Q 0,25 als untere Abweichung) oder als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt.

4.5 Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen in PBMCs nach Exposition gegenüber HBO bzw. AA und 18 stündiger Erholung

Ebenso wurde die Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen in PBMCs nach 18 stündiger Erholung bei den drei Gruppen untersucht. Allgemein kam es nach 18 stündiger Erholung zu einer Herunterregulierung der Expression der hier untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine in PBMCs aller Gruppen verglichen mit der Expression nach 4 stündiger Exposition gegenüber HBO. PBMCs von Kontrollpersonen zeigten dabei die höchste Expression von IL-6 (0,876-fach von AA) und IL-12 (0,642-fach von AA), während IL-1 β (1,190-fach von AA) nach 18 Stunden in PBMCs von Kampfschwimmern und IFN- γ (0,936-fach von AA) in PBMCs von Athleten am höchsten war (**Abb 7**). Anhand der Daten lässt sich sagen, dass es nach 18 stündiger Erholung generell zu einer Herunterregulierung der Expression der untersuchten pro-inflammatorischen Gene kam verglichen mit der 4 stündigen Exposition gegenüber HBO.

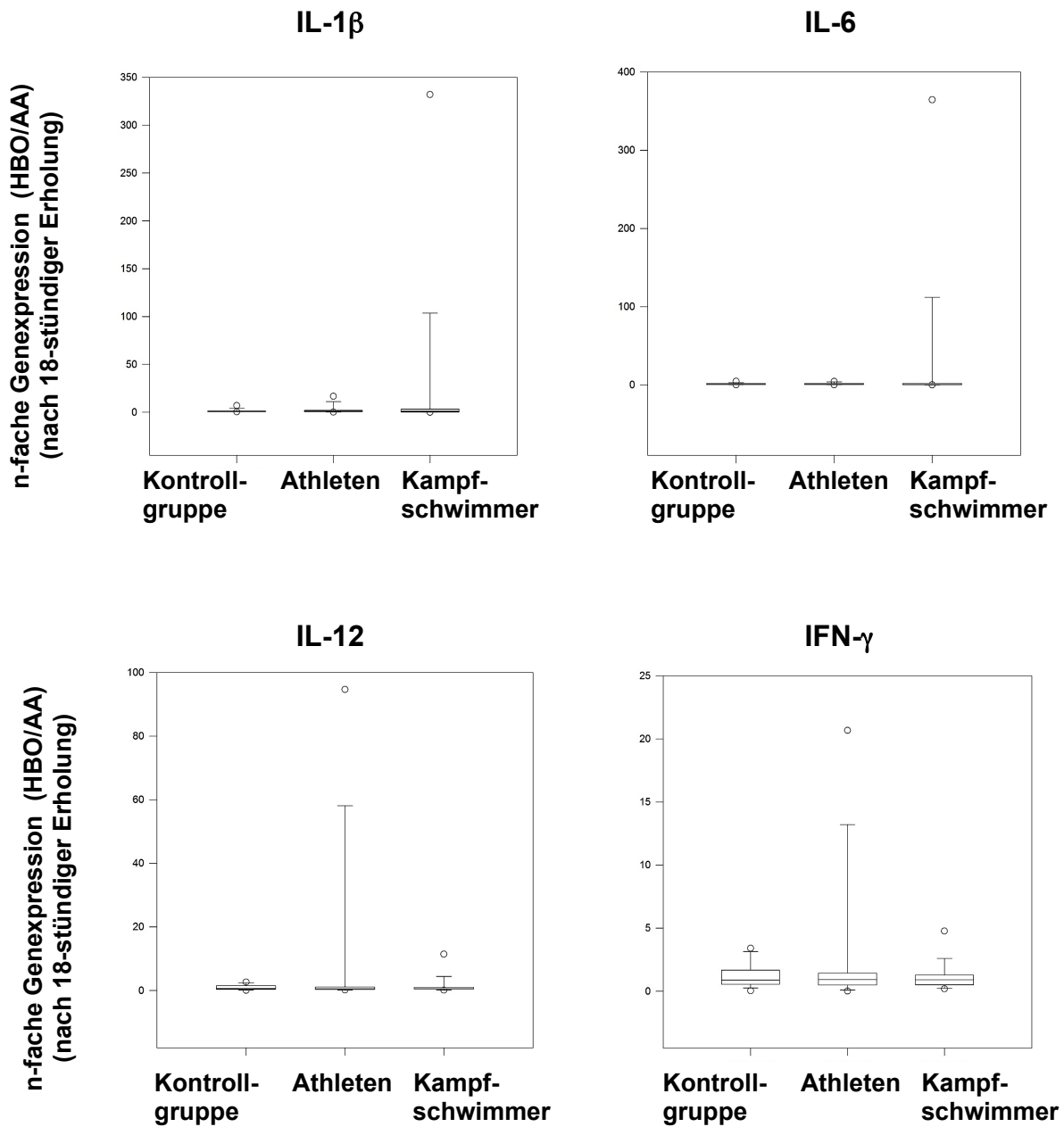


Abbildung 7: Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern nach Exposition gegenüber HBO bzw. AA und 18-stündiger Erholung. RNA wurde aus PBMCs von Kontrollpersonen (n=18), Athleten (n=15) und Kampfschwimmern (n=17) isoliert und nach 4 stündiger Exposition gegenüber 4 bar O₂ (HBO) bzw. Umgebungsluft (AA) sowie nach 18 stündiger Erholungsphase mittels RT-qPCR auf die Expression von IL-1 β , IL-6, IL-12 und IFN- γ analysiert. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet und die Expression jedes Gens von Interesse auf die des Referenzgens normalisiert. Danach wurde die Expression der HBO exponierten PBMCs auf die Expression der AA exponierten PBMCs normalisiert und die Daten als n-fache Genexpression (HBO/AA) dargestellt. Die Daten repräsentieren die Medianwerte mit Quartilen (Q0,75 als obere, Q0,25 als untere Abweichung).

4.6 Genexpression von entzündungshemmenden Zytokinen in PBMCs nach Exposition gegenüber HBO bzw. AA und 18 stündiger Erholung

Zum Schluss wurde noch die Expression der zwei anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β 1 in PBMCs der drei Gruppen nach 18 stündiger Erholung nach HBO-Exposition untersucht. Dabei ließ sich folgendes feststellen: Im Vergleich zu der Expression nach 4 stündiger HBO Exposition ohne Erholung kam es zu einer leichten Aufregulierung der TGF- β 1 Expression in allen drei Gruppen, während die IL-10 Expression nach 18 Stunden nur bei den Kampfschwimmern erhöht war. PBMCs von Kampfschwimmern zeigten die höchste Expression von IL-10 (1,26-fach von AA), wohingegen die höchste Expression von TGF- β 1 bei den Athleten zu verzeichnen war (1,17-fach von AA) (**Abb 8**). Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass es nach der 18 stündiger Erholung im Vergleich zur 4 stündigen HBO-Exposition zu einer Aufregulierung von TGF- β 1 kommt und bei den Kampfschwimmern darüber hinaus zu einer höheren Expression von IL-10.

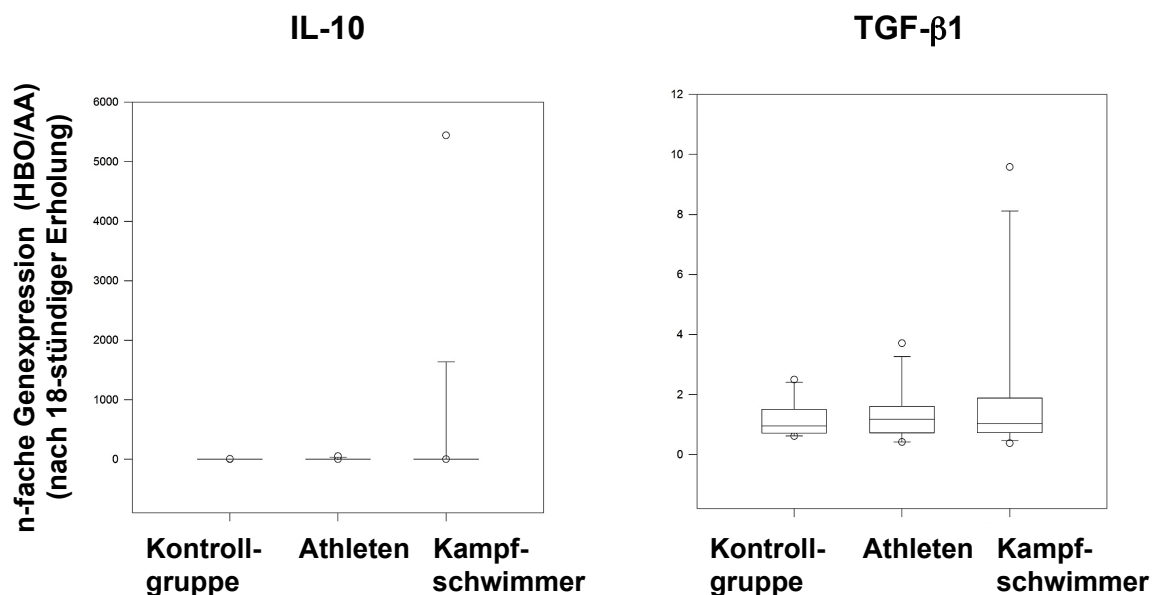


Abbildung 8: Genexpression von entzündungshemmenden Zytokinen in PBMCs von Kontrollpersonen, Athleten und Kampfschwimmern nach Exposition gegenüber HBO bzw. AA und 18-stündiger Erholung. RNA wurde aus PBMC von Kontrollpersonen (n = 18), Athleten (n = 15) und Kampfschwimmern (n = 17) isoliert und nach 4 stündiger Exposition gegenüber 4 bar O₂ (HBO) bzw. Umgebungsluft (AA) sowie nach 18 stündiger Erholungsphase mittels RT-qPCR für die Expression von IL-10 und TGF- β 1 analysiert. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet und die Expression jedes Gens von Interesse auf die des Referenzgens normalisiert. Danach wurde die Expression der HBO exponierten PBMCs auf die Expression der AA exponierten PBMCs normalisiert und die Daten als n-fache Genexpression (HBO/AA) dargestellt. Die Daten repräsentieren die Medianwerte mit Quartilen (Q0,75 als obere, Q0.25 als untere Abweichung).

5 Diskussion

In vielen Studien wurde bereits gezeigt, dass regelmäßige körperliche Aktivität einen positiven Effekt auf den Immunstatus hat (McTiernan 2008; Shanely et al. 2013). Die während der körperlichen Aktivität entstandenen Mengen an ROS können in geringen Mengen Zellschäden im Gewebe reparieren. Außerdem sind sie imstande, anti-oxidative Systeme wie die Superoxiddismutase und das Glutathionsystem im Körper zu aktivieren, um so oxidativem Stress und Entzündungen entgegenzuwirken (Knez, Jenkins & Coombes 2007; Miyazaki et al. 2001).

Allerdings führt zu intensives Training zu einer Reduktion der anti-oxidativen Faktoren im Körper. Somit sind die Schutzsysteme nicht mehr in der Lage, ROS vernünftig aus dem Körper zu eliminieren. Dadurch erhöht sich der Anteil an ROS, was letzten Endes zu DNA Schäden und damit verbundenen Erkrankungen wie z.B. Krebs oder kardiovaskulären Erkrankungen führt (Davison, Hughes, & Bell, 2005; Knez, Jenkins, & Coombes, 2007; Turner, Hodges, Bosch, & Aldred, 2011; Wu, Chiou, Chang, & Wu, 2004). Insgesamt deuten diese Studien darauf hin, dass sich mäßiges Training positiv auf die Gesundheit auswirkt (McTiernan 2008; Shanely et al. 2013; Simpson et al. 2015), während zu intensives Training, wie z.B. bei Leistungssportlern, eher das Gegenteil bewirkt und oxidativen Stress verursacht und sogar die Entstehung von Krankheiten begünstigt (Da et al. 2012; Lavieri, Rubartelli & Carta 2016). Auch HBO, wie sie bei Tauchern und Kampfschwimmern gegeben ist, führt zur vermehrten Bildung von ROS und dem damit verbundenen oxidativen Stress (Oter et al. 2005). Des Weiteren kann oxidativer Stress, verursacht durch eine HBO Exposition, zu Veränderungen des Immunstatus führen (Brenner, Shephard & Shek 1999). Interessanterweise zeigen aber auch Studien, dass bestimmte Zellen, wie z.B. die humane Lungenzelllinie A549, die HBO ausgesetzt waren, nach einer erneuten Exposition Adaptationsmechanismen entwickelten (Messier & Fisher 1990; Speit & Bonzheim 2003). So konnte gezeigt werden, dass HBO vermehrt HO-1 induziert, was wiederum zu einem besseren Schutz gegenüber oxidativen Stress bei weiteren HBO-Expositionen beiträgt (Speit et al. 2000; Speit & Bonzheim 2003). Der Grund hierfür soll sein, dass die vermehrte Induktion von HO-1 die Freisetzung von Ferritin begünstigt und so das freie Eisen für die Fenton Reaktion begrenzt. Durch die Fenton Reaktion wiederum kann das freie Eisen mit H_2O_2 reagieren und zu einem Hydroxylradikal werden. Ebenfalls ist das nach Hämabbau entstandene

Bilirubin ein wichtiger anti-oxidativer Faktor (Speit et al. 2000). Weitere Gründe für den Schutzmechanismus gegenüber oxidativen Stress könnten die Hochregulierung von anti-oxidativen Enzymen, wie der Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase sein (Ay et al. 2007) oder auch Hitzeschockproteine, die vor oxidativem Stress schützen und somit Zellschäden reduzieren, (Vince et al. 2011) sowie der Cytochrom c Oxidase Untereinheit V, die in der Lage ist, die Toleranz gegenüber Hyperoxie zu erhöhen (Li Campian et al. 2007).

Basierend auf diesen Befunden war Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen von HBO im Vergleich zu körperlichen Belastungen auf PBMCs besser zu verstehen. Dafür wurden PBMCs von Kampfschwimmern, die nicht nur einer erhöhten HBO Exposition, sondern auch einer intensiven körperlichen Belastung ausgesetzt sind und von Athleten, die regelmäßig Sport treiben, also mäßigem oxidativem Stress ausgesetzt sind, isoliert und mit denen von Kontrollpersonen, die keinen bis mäßigen Sport treiben, hinsichtlich der Expression von 1. anti-oxidativen Faktoren (HO-1, NQO1), 2. pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ) und 3. anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10, TGF- β 1) vergleichend untersucht. Die Expression dieser Marker wurde dabei zum einen direkt nach Isolation der Zellen (= basale Expression), nach 4 stündiger Exposition gegenüber HBO oder Umgebungsluft (AA) sowie nach 4 stündiger Exposition und anschließender 18 stündiger Erholungsphase untersucht. Bezüglich der anti-oxidativen Marker konnte festgestellt werden, dass PBMCs von Kampfschwimmern basal signifikant die niedrigste Expression von HO-1 hatten, aber die höchste Expression von NQO1 verglichen mit den PBMCs von Kontrollpersonen und Athleten. Das deutet darauf hin, dass durch Hyperoxie verursachter oxidativer Stress oder auch körperliche Aktivität die beiden anti-oxidativen Faktoren unterschiedlich beeinflusst. Nach der 4 stündigen Exposition gegenüber HBO gab es folgende Unterschiede bei den anti-oxidativen Markern: Während HBO keinen Einfluss auf die HO-1-Expression in PBMCs von Athleten und Kontrollpersonen hatte und lediglich zu einer leicht reduzierten Expression bei Kampfschwimmern führte, war die Expression von NQO1 nach HBO in PBMCs aller Gruppen signifikant erhöht. Bei den Athleten war die Induktion sogar am stärksten und bei Kampfschwimmern am schwächsten. Obwohl aus Studien bekannt ist, dass eine HBO Exposition zu einer vermehrten Expression von HO-1 und NQO1 führt (Chen et al. 2003; Godman et al. 2010), war dies in dieser Arbeit bei HO-1 in PBMCs von Kampfschwimmern und Athleten nicht der Fall. Der

Grund hierfür könnte sein, dass in dieser Arbeit die Gesamtpopulation der PBMCs untersucht wurde, während in den Studien von Godman et al. humane mikrovaskuläre Endothelzellen und in der Studie von Speit et al. nur Lymphozyten zur Untersuchung herangezogen wurden. Eine weitere Erklärung für die geringe Induktion von anti-oxidativen Faktoren könnte auch das Probandenkollektiv sein. Während in dieser Arbeit die sportliche Aktivität bei allen Probanden bekannt war, wurden in der Studie von Speit et al. nur 14 freiwillige ohne sportlichen Hintergrund untersucht.

Darüber hinaus gab es auch Unterschiede bezüglich der basalen Expression der pro-inflammatorischen Zytokine. Die PBMCs von Kampfschwimmern hatten diesbezüglich die höchste Expressionslevel von IL-6, IL-12 und IFN- γ . Nach der HBO Exposition kam es zu einer Aufregulierung der pro-inflammatorischen Zytokine in allen drei Gruppen (mit Ausnahme von IL-12), wobei die Expression von IL-6 und IL-1 β in PBMCs von Kampfschwimmern am höchsten war. In einer anderen Studie konnte festgestellt werden, dass IL-6 zur Induktion von Hsp72 (Heat shock 70 kDa protein 1) in den Skelettmuskeln führt. Dieses Hitzeschockprotein ist wiederum in der Lage, die Zellen vor oxidativem Stress zu schützen (Febbraio et al. 2002). Ob das auch ein Mechanismus ist, der in den PBMCs von Kampfschwimmern zu einem anti-oxidativen und schützenden Effekt führt, kann nur spekuliert werden.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass es bei den anti-inflammatorischen Zytokinen keinen Unterschied im basalen Expressionsniveau von IL-10 bei den PBMCs der drei untersuchten Gruppen gab. Dafür war die basale TGF- β 1 Expression in den PBMCs der Athleten und Kampfschwimmer deutlich niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach der vier stündigen Exposition gegenüber HBO wurde die Expression beider Gene in keiner der drei Gruppen beeinträchtigt. Die niedrigen Basalwerte von TGF- β 1 in PBMCs der Kampfschwimmer könnten entweder mit der Langzeitexposition gegenüber HBO zusammenhängen oder aber durch die körperliche Aktivität, da die TGF- β 1 Spiegel auch in den PBMCs der Athleten erniedrigt waren. IL-10 ist normalerweise dafür verantwortlich, die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine zu reduzieren (Hildebrand, Pape & Krettek 2005). In Übereinstimmung mit dieser Aussage zeigten die PBMCs der Kampfschwimmer basal die niedrigste IL-10 Expression, aber dafür die höchste Expression pro-inflammatorischer Zytokine. Folglich könnten diese Ergebnisse

darauf hindeuten, dass durch die chronische Exposition der Kampfschwimmer gegenüber HBO vermehrt entzündliche Mediatoren im Körper freigesetzt werden. Nach der 18 stündigen Erholung konnte eine Hochregulation von HO-1 in allen drei Gruppen im Vergleich zur 4 stündigen Exposition gegenüber HBO beobachtet werden, wobei die Expression in den PBMCs der Kampfschwimmer am höchsten war und die Expression von NQO1 in PBMCs aller Gruppen unverändert blieb. Ebenso kam es in den PMBCs aller Gruppen nach 18 Stunden zu einer Herunterregulierung der pro-inflammatorischen Zytokine verglichen mit den Werten nach 4 stündiger Exposition gegenüber HBO. In den PBMCs der Kampfschwimmer kam es zudem zu einer Aufregulation von IL-10 verglichen mit den Daten direkt nach der 4 stündigen Exposition gegenüber HBO. Die Expression von TGF- β 1 war nach 18 Stunden, im Vergleich zu den 4 Stunden Werten nach HBO, in allen drei Gruppen leicht erhöht, vor allem aber bei den Athleten. Generell kam es nach 18 stündiger Erholung zu einer Herunterregulierung sowohl der anti-oxidativen Faktoren als auch der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine, verglichen mit der Expression nach der 4 stündigen HBO Exposition, mit Ausnahme von HO-1, TGF- β 1, und IL-10, welche vor allem bei den Kampfschwimmern erhöht waren. Dies könnte darauf hinweisen, dass Kampfschwimmer sich langsamer vom oxidativen Stress erholen die Kontrollpersonen und Athleten, die die schnellste Erholung nach 18 Stunden zeigten. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse lässt sich sagen, dass die doppelte Belastung durch HBO in Kombination mit körperlicher Aktivität, eher zu einem pro-inflammatorischen Immunstatus führt als körperliche Aktivität allein. Somit können mit den Ergebnissen der Arbeit folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: Bei den unterschiedlich körperlich aktiven und HBO ausgesetzten Gruppen konnten schon basale Unterschiede in der Expression anti-oxidativer und inflammatorischer Markergene beobachtet werden. Bei den Kampfschwimmern war die Expression von NQO1, IL-6, IL-12, IFN- γ und IL-10 am höchsten, während bei den Athleten HO-1 am höchsten war und bei den Kontrollprobanden TGF- β 1 und IL-1 β . Nach 4 stündiger HBO Exposition allem kam es vor allem in den PBMCs der Kampfschwimmer zu einer starken Aufregulation der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 β . Die Expression von IFN- γ war hingegen nach HBO in PBMCs von Kontrollpersonen am höchsten. Bei den anti-oxidativen Faktoren zeigte vor allem die Expression von NQO1 bei den Athleten die stärkste Induktion nach der 4 stündigen HBO Exposition. Auf die entzündungshemmenden Zytokine hatte HBO keinen besonderen Einfluss.

Schließlich schienen sich die PBMCs der drei Gruppen auch unterschiedlich von HBO Exposition im Rahmen einer 18 stündigen Erholungsphase zu regenerieren: Pro-inflammatorische Zytokine sowie der anti-oxidative Faktor NQO1 wurden in allen drei Gruppen herunterreguliert. Hingegen kam es zu einer Aufregulation von HO-1, wobei in PBMCs der Kampfschwimmer die höchste Expression festgestellt werden konnte. Ferner kam es zu einer Aufregulation der entzündungshemmenden Zytokine TGF- β 1 und IL-10, wobei letztere nur bei Kampfschwimmern auftrat.

Die Studie von Ferrer et al. (2007) berichtete über erhöhte Expressionen von HO-1 in Lymphozyten sowohl nach Tauchgängen in 40 m Tiefe als auch nach trockener HBO-Exposition (Ferrer et al. 2007). Dieser Befund kann allerdings in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, denn sowohl basal als auch nach HBO Exposition war die Expression von HO-1 in PBMCs von Kampfschwimmern niedriger im Vergleich zu den anderen Gruppen. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Befunde könnte sein, dass in der Studie von Ferrer et al. gezielt Lymphozyten, in dieser Arbeit hingegen die Gesamtpopulation an PBMCs untersucht wurde. Die Studie von Sureda et al. (2014) konnte hingegen in Übereinstimmung mit dieser Arbeit zeigen, dass Tauchen zu einer erhöhten Expression der Zytokine IL-6, IL-10 und IL-1 β in den neutrophilen Granulozyten führt. Auch in den PBMCs der Kampfschwimmer kam es zu einer Zunahme der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 β nach HBO Exposition und nach 18 stündiger Erholung zu einer Zunahme von IL-10. IL-6 ist in der Lage, die Expression von IL-10 zu induzieren, um so ein entzündungshemmendes Milieu zu erschaffen (Petersen & Pedersen 2005), was erklären könnte, warum die IL-10 Expression erst nach der 18 stündigen Erholungsphase erhöht war.

Eine weitere *in vitro* Studie konnte feststellen, dass die Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β durch die HBO-Exposition gehemmt wird (Benson et al. 2003). Das steht in Widerspruch mit dieser Arbeit, in der nach HBO-Exposition sowohl bei den Athleten als auch bei den Kampfschwimmern eine Aufregulation von IL-1 β in den PBMCs nachgewiesen werden konnte. Die Diskrepanz der Befunde kann jedoch dadurch erklärt werden, dass die isolierten PBMCs in der o.g. Studie nur von gesunden Probanden ohne sportliche Aktivität und/oder dauerhafter Exposition gegenüber hohen Sauerstoffpartialdrücken entstammen.

Neben der PCR-basierten Analyse wurden in der Publikation von Tillmanns et al. (2019), in der Teile dieser Arbeit eingeflossen sind, noch weitere Untersuchungen mit den PBMCs durchgeführt, z.B. Comet Assay zur Beurteilung der DNA-

Fragmentierung und Durchflusszytometrie zur Charakterisierung der PBMC Population und zur Bestimmung von Apoptose. Die Ergebnisse des Comet-Assays zeigten, dass alle drei Gruppen nach HBO-Exposition ähnliche Level an DNA-Schäden aufwiesen, dass aber die Kampfschwimmer nach der 18 stündigen Erholungsphase eine höhere DNA-Fragmentierung aufwiesen als Athleten oder Kontrollpersonen. Das könnte auch der Grund dafür sein, warum sich Kampfschwimmer langsamer vom oxidativen Stress erholen als die Athleten. Die Analyse der Durchflusszytometrie ergab, dass Kampfschwimmer im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen einen höheren Anteil an CD4+CD25+ T-Zellen aufweisen, was in der Zusammenschau mit der höheren Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-12 auf einen pro-inflammatorischen Immunstatus in dieser Gruppe hindeutet (Tillmans et al. 2019).

In dieser Arbeit gab es auch einige Limitierungen. Dadurch, dass die Experimente und Analysen mit den isolierten PBMCs alle außerhalb des Körpers stattfanden, befanden sich die Zellen daher nicht mehr unter optimalen physiologischen Bedingungen, wobei versucht wurde, die Kulturbedingungen in der Druckkammer bzw. Nebenkammer so gut wie möglich an die menschlichen Verhältnisse anzupassen. So wurde für die PBMCs das RPMI 1640 Zellkulturmedium gewählt. Dieses Zellkulturmedium enthält neben wichtigen Wachstumsfaktoren wie Salze, Aminosäure und Glucose als Indikator für den pH-Wert Phenolrot. Durch die rote Farbe des Mediums bei pH-Wert 7,4 wird durch den Farbumschlag in den sauren oder basischen Bereich eine Mangelversorgung der Zellen angezeigt und kann vermieden werden (Boxberger 2007). Des Weiteren herrschte bei den Experimenten konstant eine Temperatur von 37°C, was in etwa der menschlichen Körpertemperatur entspricht, mit Schwankungen von 1,2 °C bei der Frau und 1,4 °C beim Mann (Boxberger 2007). Darüber hinaus könnte auch der Ernährungszustand der Probanden einen Einfluss auf die Expression und Freisetzung der verschiedenen Zytokinen oder anti-oxidativen Mediatoren haben. So liegen keine Informationen darüber vor, ob sich die Probanden mit anti-oxidativ reicheren Lebensmitteln ernährt haben bzw. Supplemente einnehmen. Es gibt zahlreiche Studien über den Effekt der Supplementierung mit anti-oxidativen Vitaminen gegenüber oxidativem Stress, wobei deren Ergebnisse widersprüchlich sind. Einige Studien berichten über einen positiven Effekt, wie die Steigerung der Leistungsbereitschaft und bessere Regeneration der Muskeln (Brisswalter & Louis 2014; Gauche et al. 2006), während andere Studien

das Gegenteil aufzeigen und keinen Einfluss durch die Supplementierung der Antioxidantien wie Vitamin E und C auf die Leistungsfähigkeit und Schutz gegen oxidativen Stress sehen (Bader et al. 2007; Powers et al. 2004).

In dieser Arbeit wurde nur PCR zur Bestimmung der Induktion von inflammatorischen und anti-oxidativen Faktoren benutzt. Weitere Studien mit ELISA wären sinnvoll, um die untersuchten Faktoren auch auf Proteinebene im Serum der Probanden nachzuweisen. Ferner wäre eine Analyse mit isolierten Zellpopulationen (CD4+, CD+ T Zellen, Monozyten, Granulozyten) sinnvoll, um gezielt den Einfluss von HBO auf die unterschiedlichen Zellpopulationen inkl. der Auswirkung auf ihre Effektorfunktion zu untersuchen.

Nichtsdestotrotz ist das die erste Studie, die vergleichend den Effekt von HBO, körperliche Aktivität sowie einer Kombination aus beiden Bedingungen auf PBMCs untersucht hat. Obwohl das Kollektiv eher klein war (50 Personen, die an der Studie teilnahmen) und eine Validierung an einem größeren Kollektiv sinnvoll wäre, ist eine Stärke der Studie in der Homogenität der Gruppen zu sehen, da der Aktivitätsstatus aller Probandengruppen sehr gut bekannt und innerhalb einer Gruppe sehr gut vergleichbar war.

Insgesamt lieferte diese Studie einen Einblick in die Wirkung von HBO und körperlicher Belastung auf PBMCs von Kampfschwimmern und Athleten im Vergleich zu körperlich weniger aktiven Kontrollpersonen. Die Ergebnisse zeigten bei den Kampfschwimmern in der Zusammenschau mit den anderen Befunden aus der Publikation (Tillmans et al. 2019), dass eine dauerhafte Exposition gegenüber oxidativen Stress (gegeben durch häufige Exposition gegenüber hohen Sauerstoffpartialdrücken in Kombination mit physischer Aktivität bei den Kampfschwimmern) mehr einen inflammatorischen Immunstatus fördert als die körperliche Aktivität allein bei Athleten. Weitere Forschungsaktivitäten sind auf diesem Gebiet notwendig, um das Verständnis über die Mechanismen, über die HBO bzw. körperliche Aktivität allein und in Kombination Einfluss nehmen auf den Immunstatus des Menschen, zu verbessern.

6 Zusammenfassung

Taucher sowie Patienten während einer hyperbaren Oxygenierung (HBO) und HBO-Therapie oder auch in der Anästhesiologie sind erhöhten Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt. Dadurch können erhöhte Mengen von freien Sauerstoff- und Stickstoffradikalen freigesetzt werden, die zu Zellschädigungen führen können. Ebenso können unter physischer Belastung, wie z.B. bei Leistungssportlern oder Athleten, freie Radikale entstehen.

Ziel dieser Studie war es daher vergleichend zu untersuchen, ob und wie sich die Exposition von HBO auf die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen sowie anti-oxidativen Faktoren in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) von Athleten und Kampfschwimmern im Vergleich zu körperlich weniger aktiven Kontrollpersonen auswirkt. Dafür wurden zunächst die PBMCs aus allen drei Probandengruppen direkt nach der Isolierung bezüglich ihrer Expressionslevel der oben genannten Faktoren untersucht (basale Expression). Weiterhin wurden die PBMCs in einer Druckkammer für vier Stunden 4 bar Sauerstoffpartialdruck oder in einer Kontrollkammer Umgebungsbedingungen ausgesetzt, um den Einfluss von HBO auf die PBMCs der drei Gruppen zu untersuchen. Die Expression der inflammatorischen und anti-oxidativen Faktoren wurde zudem noch nach einer Erholungszeit von 18 Stunden untersucht, um zu überprüfen, ob und wie schnell sich die PBMCs von der Exposition gegenüber erhöhten Sauerstoffpartialdrücken erholen.

Die Ergebnisse der Realtime-PCR-Analyse zeigen, dass es bereits basal signifikante Unterschiede bzgl. der Expressionslevel innerhalb der drei Gruppen gab. So war die basale Expression von NQO1, IL-6, IL-12, IFN- γ und IL-10 bei den Kampfschwimmern am höchsten, während Athleten die höchste basale Expression von HO-1 und die Kontrollprobanden die höchste Expression von TGF- β 1 und IL-1 β in den PBMCs aufwiesen. Nach vier stündiger Exposition gegenüber HBO kam es zu einer starken Aufregulation der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 β in den PBMCs der Kampfschwimmer. Die Expression von IFN- γ war nach HBO hingegen in PBMCs von Kontrollpersonen am höchsten. Die stärkste Expressionsänderung nach HBO zeigten die Athleten bei dem anti-oxidativen Faktor NQO1. Allerdings hatte HBO keinen besonderen Einfluss auf die Expression der entzündungshemmenden Zytokine gezeigt. Nach der 18 stündigen Erholungsphase konnte in den PBMCs aller

drei Gruppen eine verminderte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine sowie des anti-oxidativen Faktors NQO1 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu kam es zu einer Aufregulation von HO-1, die am stärksten in den PBMCs der Kampfschwimmer war. Ebenso kam es in den PBMCs dieser Gruppe zu einer Aufregulation der entzündungshemmenden Zytokine TGF- β 1 und IL-10.

Diese Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine Exposition gegenüber HBO in Kombination mit körperlicher Aktivität eher zu einem pro-inflammatorischen Status der PBMCs in den Kampfschwimmern führt als körperliche Aktivität (in den Athleten) allein. Im Rahmen einer Erholungsphase kann es jedoch über eine Erhöhung von anti-inflammatorischen Zytokine zu einer Dämpfung dieses pro-inflammatorischen Status kommen.

7 Literaturverzeichnis

- Ay, H., Topal, T., Uysal, B., Özler, M., Öter, S., Korkmaz, A. & Dündar, K. 2007, 'Time-dependent course of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects in rat lung and erythrocytes', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 34, no. 8, pp. 787–91.
- Bader, N., Bosy-Westphal, A., Koch, A., Rimbach, G., Weimann, A., Poulsen, H.E. & Müller, M.J. 2007, 'Effect of hyperbaric oxygen and vitamin C and E supplementation on biomarkers of oxidative stress in healthy men', *British Journal of Nutrition*, vol. 98, no. 4, pp. 826–33.
- Baudler, S. 2001, 'Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies: Charakterisierung zweier ROS-sensitiver Gene und ihre Rolle bei der Kontrolle des zellulären Wachstums'.
- Benson, R.M., Minter, L.M., Osborne, B.A. & Granowitz, E. V. 2003, 'Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages', *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 134, no. 1, pp. 57–62.
- Bereiter-Hahn, J. & Brandt, U. 2007, 'Störfall im Kraftwerk der Zelle', *Forschung Frankfurt*, vol. 2, pp. 82–5.
- Bereiter-Hahn, J. & Jendrach, M. 2009, 'Mitochondrien-Dynamik bei Stress und Altern', *Biospektrum*, no. 4, pp. 393–5.
- Borish, L.C. & Steinke, J.W. 2003, '2. Cytokines and chemokines', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 111, no. 2, pp. S460--S475.
- Boxberger, H.J. 2007, *Leitfaden für die Zell-und Gewebekultur (1 Ausg.)*, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Brenner, I., Shephard, R.J. & Shek, P.N. 1999, 'Immune function in hyperbaric environments, diving, and decompression.', *Undersea & hyperbaric medicine: journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc*, vol. 26, no. 1, pp. 27–39.
- Brisswalter, J. & Louis, J. 2014, 'Vitamin supplementation benefits in master athletes', *Sports Medicine*, vol. 44, no. 3, pp. 311–8.
- Busquets-Cortés, C., Capó, X., Martorell, M., Tur, J.A., Sureda, A. & Pons, A. 2017, 'Training and acute exercise modulates mitochondrial dynamics in football players' blood mononuclear cells', *European journal of applied physiology*, vol. 117, no. 10, pp. 1977–87.
- Chen, Y., Boal, J., Lubsen, J. & Nadi, S.N. 2003, *Effect of hyperbaric oxygen on antioxidant gene expression in C6 cells*.
- Da, D., Scheffer, L., Pinho, C.A., Leivas, M., Hoff, M., Acordi Da Silva, L., Benetti, M., Claudio, J., Moreira, F. & Pinho, R.A. 2012, 'Impact of ironman triathlon on oxidative stress parameters', *Brazilian Journal of Kinanthropometry and Human Performance*, vol. 14, no. 2, pp. 174–82.
- Davies, K.J.A., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A. & Packer, L. 1982, 'Free radicals and tissue damage produced by exercise', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 107, no. 4, pp. 1198–205.
- Davison, G.W., Hughes, C.M. & Bell, R.A. 2005, 'Exercise and mononuclear cell DNA damage: The effects of antioxidant supplementation', *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, vol. 15, no. 5, pp. 480–92.
- Dinarello, C.A. 2005, 'Blocking IL-1 in systemic inflammation', *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 201, no. 9, pp. 1355–9.

- Dinkova-Kostova, A.T. & Talalay, P. 2010, 'NAD (P) H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector', *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 501, no. 1, pp. 116–23.
- Dulak, J., Deshane, J., Jozkowicz, A. & Agarwal, A. 2008, 'Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis', *Circulation*, vol. 117, no. 2, pp. 231–41.
- Dunn, J.-O., Mythen, M.G. & Grocott, M.P. 2016, 'Physiology of oxygen transport', *Bja Education*, vol. 16, no. 10, pp. 341–8.
- Eliades, A., Matsuura, S. & Ravid, K. 2012, 'Oxidases and reactive oxygen species during hematopoiesis: a focus on megakaryocytes', *Journal of cellular physiology*, vol. 227, no. 10, pp. 3355–62.
- Febbraio, M.A., Steensberg, A., Fischer, C.P., Keller, C., Hiscock, N. & Pedersen, B.K. 2002, 'IL-6 activates HSP72 gene expression in human skeletal muscle', *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 296, no. 5, pp. 1264–6.
- Ferrer, M.D., Sureda, A., Batle, J.M., Tauler, P., Tur, J.A. & Pons, A. 2007, 'Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils', *Free radical research*, vol. 41, no. 3, pp. 274–81.
- Fock, A., Harris, R. & Slade, M. 2013, 'Oxygen exposure and toxicity in recreational technical divers', *Diving Hyperb. Med*, vol. 43, pp. 67–71.
- Gauche, E., Lepers, R., Rabita, G., Leveque, J.-M., Bishop, D., Brisswalter, J. & Hausswirth, C. 2006, 'Vitamin and mineral supplementation and neuromuscular recovery after a running race', *Medicine & Science in Sports & Exercise*, vol. 38, no. 12, pp. 2110–7.

- Godman, C.A., Chheda, K.P., Hightower, L.E., Perdrizet, G., Shin, D.-G. & Giardina, C. 2010, 'Hyperbaric oxygen induces a cytoprotective and angiogenic response in human microvascular endothelial cells', *Cell Stress and Chaperones*, vol. 15, no. 4, pp. 431–42.
- Gosslau, A. & Rensing, L. 2002, 'Oxidativer Stress, altersabhängige Zellschädigungen und anti-oxidative Mechanismen', *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*, vol. 35, no. 2, pp. 139–50.
- Grütz, G. 2005, 'New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression', *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 77, no. 1, pp. 3–15.
- Halliwell, B. 1989, 'Tell me about free radicals, doctor: a review', *Journal of the Royal Society of Medicine*, vol. 82, no. 12, pp. 747–52.
- Heffner, J.E. 2013, 'The story of oxygen', *Respiratory care*, vol. 58, no. 1, pp. 18–31.
- Hildebrand, F., Pape, H.-C. & Krettek, C. 2005, 'Die Bedeutung der Zytokine in der posttraumatischen Entzündungsreaktion', *Der Unfallchirurg*, vol. 108, no. 10, pp. 793–803.
- Hoppeler, H. 1986, 'Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle', *International journal of sports medicine*, vol. 7, no. 04, pp. 187–204.
- Hug, H. 2000, 'Apoptose: Die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz', *Biologie in Unserer Zeit*, vol. 30, no. 3, pp. 128–35.
- Jackson, M.J. 2008, 'Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function?', *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 44, no. 2, pp. 132–41.

- Jones, S.A. 2005, 'Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6', *The Journal of Immunology*, vol. 175, no. 6, pp. 3463–8.
- Kähler, W., Tillmans, F., Klapa, S., Koch, I., Last, J. & Koch, A. 2016, 'Oxidativer Stress durch hyperbare Hyperoxie und dessen Wirkung auf periphere mononukleäre Zellen (PBMC)--eine Übersicht über den aktuellen Forschungsstand am Schiffahrtmedizinischen Institut der Marine', *ANNOUNCEMENT CALL FOR ABSTRACTS*, vol. 60, p. 50.
- Knez, W.L., Jenkins, D.G. & Coombes, J.S. 2007, 'Oxidative stress in half and full Ironman triathletes', *Medicine and Science in Sports and Exercise*, vol. 39, no. 2, pp. 283–8.
- Lahat, N., Bitterman, H., Yaniv, N., Kinarty, A. & Bitterman, N. 1995, 'Exposure to hyperbaric oxygen induces tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) secretion from rat macrophages', *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 102, no. 3, pp. 655–9.
- Lavieri, R., Rubartelli, A. & Carta, S. 2016, 'Redox stress unbalances the inflammatory cytokine network: role in autoinflammatory patients and healthy subjects', *Journal of leukocyte biology*, vol. 99, no. 1, pp. 79–86.
- Li Campian, J., Gao, X., Qian, M. & Eaton, J.W. 2007, 'Cytochrome c oxidase activity and oxygen tolerance', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 17, pp. 12430–8.
- Marengo, B., Nitti, M., Furfaro, A.L., Colla, R., Ciucis, C. De, Marinari, U.M., Pronzato, M.A., Traverso, N. & Domenicotti, C. 2016, 'Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: crucial players in cancer growth and therapy', *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2016.
- McTiernan, A. 2008, 'Mechanisms linking physical activity with cancer', *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 3, p. 205.

- Messier, A.A. & Fisher, H.W. 1990, 'Sensitivity of cultured mammalian cells to oxidative stress: adaptation to repeated exposures of hyperbaric oxygen.', *Undersea biomedical research*, vol. 17, no. 4, pp. 305–22.
- Miyazaki, H., Oh-ishi, S., Ookawara, T., Kizaki, T., Toshinai, K., Ha, S., Haga, S., Ji, L.L. & Ohno, H. 2001, 'Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise', *European Journal of Applied Physiology*, vol. 84, no. 1–2, pp. 1–6.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L. & O'Garra, A. 2001, 'Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor', *Annual review of immunology*, vol. 19, no. 1, pp. 683–765.
- Mooren, F.C., Lechtermann, A. & Völker, K. 2004, 'Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status.', *Medicine and science in sports and exercise*, vol. 36, no. 9, pp. 1476–83.
- Müller, R. 2001, 'Atmung, Stoffwechsel und Blutkreislauf', *Praxis der Naturwissenschaften-Physik in der Schule*, vol. 50, no. 8, pp. 23–6.
- Narkowicz, C.K., Vial, J.H. & McCartney, P.W. 1993, 'Hyperbaric oxygen therapy increases free radical levels in the blood of humans', *Free radical research communications*, vol. 19, no. 2, pp. 71–80.
- Niess, A.M., Fehrenbach, E., Northoff, H. & Dickhuth, H.H. 2002, 'Freie Radikale und oxidativer Stress bei körperlicher Belastung und Trainingsanpassung-Eine aktuelle Übersicht', *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, vol. 12, pp. 345–53.
- Ontology, G. 2007, *The gene ontology*.
- Oter, S., Korkmaz, A., Topal, T., Ozcan, O., Sadir, S., Ozler, M., Ogur, R. & Bilgic, H. 2005, 'Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative

- parameters in rat lung, brain, and erythrocytes', *Clinical Biochemistry*, vol. 38, no. 8, pp. 706–11.
- Peake, J., Della Gatta, P., Suzuki, K. & Nieman, D. 2015, 'Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects', *Exercise immunology review*, vol. 21, pp. 8–25.
- Peters, E.M., Van Eden, M., Tyler, N., Ramautar, A. & Chuturgoon, A.A. 2006, 'Prolonged exercise does not cause lymphocyte DNA damage or increased apoptosis in well-trained endurance athletes', *European journal of applied physiology*, vol. 98, no. 2, pp. 124–31.
- Petersen, A.M.W. & Pedersen, B.K. 2005, 'The anti-inflammatory effect of exercise', *Journal of applied physiology*, vol. 98, no. 4, pp. 1154–62.
- Poulsen, H.E., Prieme, H. & Loft, S. 1998, 'Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion', *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 7, no. 1, pp. 9–16.
- Powers, S.K., Deruisseau, K.C., Quindry, J. & Hamilton, K.L. 2004, 'Dietary antioxidants and exercise', *Journal of sports sciences*, vol. 22, no. 1, pp. 81–94.
- Powers, S.K. & Jackson, M.J. 2008, 'Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production', *Physiological reviews*, vol. 88, no. 4, pp. 1243–76.
- Powers, S.K., Nelson, W.B. & Hudson, M.B. 2011, 'Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences', *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 51, no. 5, pp. 942–50.
- Powers, S.K., Talbert, E.E. & Adhietty, P.J. 2011, 'Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle', *Journal of Physiology*, vol.

589, no. 9, pp. 2129–38.

Prommer, N. & Schmidt, W. 2009, 'Hämoglobinmenge und Sport', *Dtsch. Z.*

Ross, D., Kepa, J.K., Winski, S.L., Beall, H.D., Anwar, A. & Siegel, D. 2000, 'NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms', *Chemico-biological interactions*, vol. 129, no. 1–2, pp. 77–97.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. & Hume, D.A. 2004, 'Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions', *Journal of leukocyte biology*, vol. 75, no. 2, pp. 163–89.

Severinghaus, J.W. 2002, 'Priestley, the furious free thinker of the enlightenment, and Scheele, the taciturn apothecary of Uppsala', *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, vol. 46, no. 1, pp. 2–9.

Shanely, R.A., Nieman, D.C., Henson, D.A., Jin, F., Knab, A.M. & Sha, W. 2013, 'Inflammation and oxidative stress are lower in physically fit and active adults', *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, vol. 23, no. 2, pp. 215–23.

Simpson, R.J., Kunz, H., Agha, N. & Graff, R. 2015, 'Exercise and the regulation of immune functions', *Progress in molecular biology and translational science*, vol. 135, Elsevier, pp. 355–80.

Sjöberg, F. & Singer, M. 2013, 'The medical use of oxygen: a time for critical reappraisal', *Journal of internal medicine*, vol. 274, no. 6, pp. 505–28.

Speit, G. & Bonzheim, I. 2003, 'Genotoxic and protective effects of hyperbaric oxygen in A549 lung cells', *Mutagenesis*, vol. 18, no. 6, pp. 545–8.

Speit, G., Dennog, C., Eichhorn, U., Rothfuss, a & Kaina, B. 2000, 'Induction of

heme oxygenase-1 and adaptive protection against the induction of DNA damage after hyperbaric oxygen treatment.’, *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 10, pp. 1795–9.

St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J. & Brand, M.D. 2002, ‘Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 47, pp. 44784–90.

Sureda, A., Batle, J.M., Capó, X., Martorell, M., Córdova, A., Tur, J.A. & Pons, A. 2014, ‘Scuba diving induces nitric oxide synthesis and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response in neutrophils’, *Physiological Genomics*, vol. 46, no. 17, pp. 647–54.

Tillmans, F., Sharghi, R., Noy, T., Kähler, W., Klapa, S., Sartisohn, S., Sebens, S. & Koch, A. 2019, ‘Effect of hyperoxia on the immune status of oxygen divers and endurance athletes’, *Free radical research*, pp. 1–13.

Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Valle, N.R.-D. & Huang, P. 2008, ‘Redox regulation of cell survival’, *Antioxidants & redox signaling*, vol. 10, no. 8, pp. 1343–74.

Turner, J.E., Hodges, N.J., Bosch, J.A. & Aldred, S. 2011, ‘Prolonged Depletion of Antioxidant Capacity after Ultraendurance Exercise’, *Medicine & Science in Sports & Exercise*, vol. 43, no. 9, pp. 1770–6.

Turrens, J.F. 2003, ‘Mitochondrial formation of reactive oxygen species’, *The Journal of physiology*, vol. 552, no. 2, pp. 335–44.

Udilova, N. 1999, ‘Vergleichende Untersuchungen von Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen in biologischen und Modellsystemen’, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.

- Vince, R. V, Midgley, A.W., Laden, G. & Madden, L.A. 2011, 'The effect of hyperbaric oxygen preconditioning on heat shock protein 72 expression following in vitro stress in human monocytes', *Cell Stress and Chaperones*, vol. 16, no. 3, pp. 339–43.
- Vincent, J.-L., Taccone, F.S. & He, X. 2017, 'Harmful effects of hyperoxia in postcardiac arrest, sepsis, traumatic brain injury, or stroke: the importance of individualized oxygen therapy in critically ill patients', *Canadian respiratory journal*, vol. 2017.
- Weber, S.U., Koch, A., Kankeleit, J., Schewe, J.-C., Siekmann, U., Stüber, F., Hoeft, A. & Schröder, S. 2009, 'Hyperbaric oxygen induces apoptosis via a mitochondrial mechanism', *Apoptosis*, vol. 14, no. 1, pp. 97–107.
- Wingelaar, T.T., van Ooij, P.-J.A.M. & van Hulst, R.A. 2017, 'Oxygen Toxicity and Special Operations Forces Diving: Hidden and Dangerous', *Frontiers in psychology*, vol. 8, p. 1263.
- Wu, L.L., Chiou, C.-C., Chang, P.-Y. & Wu, J.T. 2004, 'Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics', *Clinica chimica acta*, vol. 339, no. 1–2, pp. 1–9.
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X.F. & Achong, M.K. 1998, 'IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses', *Journal of Clinical Investigation*, vol. 101, no. 2, pp. 311–20.
- Yavari, A., Javadi, M., Mirmiran, P. & Bahadoran, Z. 2015, 'Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants', *Asian journal of sports medicine*, vol. 6, no. 1.
- Zaldivar, F., Wang-Rodriguez, J., Nemet, D., Schwindt, C., Galassetti, P., Mills, P.J., Wilson, L.D. & Cooper, D.M. 2006, 'Constitutive pro-and anti-inflammatory

cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes', *Journal of applied physiology*, vol. 100, no. 4, pp. 1124–33.

Zimmer, P., Baumann, F.T., Bloch, W., Zopf, E.M., Schulz, S., Latsch, J., Schollmayer, F., Shimabukuro-Vornhagen, A., von Bergwelt-Baildon, M. & Schenk, A. 2016, 'Impact of a half marathon on cellular immune system, pro-inflammatory cytokine levels, and recovery behavior of breast cancer patients in the aftercare compared to healthy controls', *European journal of haematology*, vol. 96, no. 2, pp. 152–9.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof.Dr.rer.nat Susanne Sebens für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und der Überlassung meines Themas. Für Ihre vorbildliche Betreuung, Ihren herausragenden Einsatz und ihre positive und motivierende Art, die mich begeistert hat.

Mein großer Dank gilt auch Frau Dagmar Leisner für die tolle Einarbeitung in Labormethoden und für Ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Durchführungen der Experimente.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Frauke Tillmans für ihre Hilfsbereitschaft und der fachlichen Unterstützung.

Ich bedanke mich bei allen Probanden, die ihre Zellen für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern und ganz besonders meiner Mutter, die mich immer in allen Lagen des Lebens motiviert hat und mir diesen Weg ermöglicht hat.

Publikationsverzeichnis

Publikation:

Tillmans, F., **Sharghi, R.**, Noy, T., Kähler, W., Klapa, S., Sartisohn, S., Sebens, S., & Koch, A. (2019). Effect of hyperoxia on the immune status of oxygen divers and endurance athletes. *Free Radical Research*, 53(5):522-534.

Kongressbeitrag:

Tillmans, F., Noy, T., **Sharghi, R.**, Kähler, W., Klapa, S., Sartisohn, S., Sebens, S., & Koch, A. (2018). Effect of hyperoxia on the immune status of endurance athletes and combat swimmers.

Vorgelegt auf dem Deutschen Olympischen Sportärztekongress 2018 in Hamburg