

Murine Scald Models Characterize the Role of Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in Severe Burns

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
an der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Moritz Richard Hans Lenz
aus
Hamburg

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Konrad Reinshagen

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Johannes Keller

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Johannes Keller

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Stefan Schneider

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Maike Frye

Datum der mündlichen Prüfung: 26.02.2026

Inhaltsverzeichnis

1. Darstellung der Publikation	4
1.1 Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund	4
1.2 Darstellung der Methodik	5
1.3 Ergebnisse	7
1.4 Diskussion und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen	9
2. Artikel.....	14
3. Zusammenfassung	45
3.1 Englisch	45
3.2 Deutsch	46
4. Literaturverzeichnis.....	47
5. Abkürzungsverzeichnis	53
6. Abbildungsverzeichnis	55
7. Tabellenverzeichnis.....	78
8. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation	81
9. Danksagung	82
10. Eidesstattliche Versicherung	83

1. Darstellung der Publikation

1.1 Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund

Trotz intensiver Forschungsbemühungen und bedeutenden Fortschritten in der Versorgung von Patientinnen und Patienten mit schweren Verbrennungen, gehen diese Verletzungen mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität einher (Smolle et al. 2017). Die noch nicht vollständig verstandenen lokalen und systemischen immunologischen Alterationen nach thermischen Verletzungen rückten zuletzt zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus (Gauglitz et al. 2008, Jeschke et al. 2011, Jeschke et al. 2020). Die unmittelbar nach dem Trauma initiierte Entzündungsreaktion ist einerseits ein essenzieller Bestandteil der physiologischen Kaskade der Wundheilung, kann andererseits aber auch bei schweren Verletzungen zu einer systemischen Hyperinflammation führen (Stanojic et al. 2018). Die meisten Todesfälle nach thermischen Verletzungen sind durch Infektionen verursacht, welche durch eine immunologische Dysfunktion im Sinne einer Immunsuppression begünstigt werden (O'Sullivan und O'Connor 1997). Die Erforschung der verbrennungsassoziierten immunologischen Veränderungen könnte dazu beitragen, vielversprechende neue Therapieansätze zu entwickeln, um die Prognose nach schweren thermischen Verletzungen zu verbessern.

Als Teil des angeborenen Immunsystems sind die Neutrophilen Granulozyten an der primären Abwehr von Pathogenen beteiligt. Diese Subpopulation der Leukozyten wird im Rahmen der Chemotaxis von proinflammatorischen Zytokinen aus der Blutbahn zum Ort der Inflammation rekrutiert (Michael und Vermeren 2019; Petri und Sanz 2018). Eine bedeutende Effektorfunktion der Neutrophilen ist die Bildung von Neutrophilen Extrazellulären Fallen (engl. *neutrophil extracellular traps*, NETs). Im Rahmen der Bildung der NETs (NETose), kommt es zu einem Ausstoßen von dekondensierten Chromatin-Fäden aus dem Zellkern in den Extrazellulärraum, welche Pathogene am Ort der Infektion binden. Weiterhin sorgen diese durch ihren Besatz mit zytotoxischen Proteinen wie der Myeloperoxidase (MPO) und der Neutrophilen Elastase (NE) für eine unmittelbare Destruktion der Erreger (Brinkmann et al. 2004). Eine überschießende Bildung kann allerdings auch negative Effekte haben. NETs scheinen beispielsweise eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung von postoperativen intraabdominellen Adhäsionen zu spielen (Lu et al. 2024). Weiterhin kann eine exzessive NETose akute thrombotische Mikroangiopathien auslösen (Jiménez-Alcazar et al. 2015). Die medikamentöse Degradierung der NETs beziehungsweise ein Knockout der Schlüsselenzyme der NETose führte zu einer Verbesserung der sekundären Wundheilung nach thermischen Verletzungen im Mausmodell (Heuer et al. 2021).

Um die komplexen immunologischen Vorgänge nach thermischen Verletzungen an einem funktionierenden Organismus zu erforschen, sind nach wie vor Tierversuche nötig (Masopust et al. 2017). Im Bereich der Verbrühungsforschung sind bereits einige Tiermodelle, insbesondere Mausmodelle, etabliert worden. Diese unterscheiden sich allerdings je nach Hypothese erheblich bezüglich der Temperatur des Wasserbades, der Größe der betroffenen Körperoberfläche (engl. *total body surface area*, TBSA) und der Expositionszeit (Abdullahi et al. 2014).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines murinen Verbrühungsmodells und die Charakterisierung der Rolle der NETs an der Pathophysiologie nach thermischen Verletzungen auf molekularer und biochemischer Ebene. Zur Vertiefung und als Grundlage für weitere mechanistische Studien wurden detaillierte Transkriptomanalysen durchgeführt (Elrod et al. 2023).

1.2 Darstellung der Methodik

Als experimentelles Modell für die Beantwortung der oben genannten Fragestellung diente ein standardisiertes murines Verbrühungsmodell mit einer Wassertemperatur von 98 °C, unterschiedlichen Expositionszeiten (4 s, 6 s, 7 s und 10 s) und zwei verschiedenen Beobachtungszeiträumen (24 h und 72 h) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne thermische Verletzung (Elrod et al. 2023). Eine entsprechende Genehmigung der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg lag vor (N065/2020). Im Vorfeld wurde, abgeleitet von Vorversuchen mit Mäusen mit thermischen Verletzungen, eine Power-Analyse zur Festlegung der optimalen Gruppengröße mit einem etablierten Software-Tool durchgeführt (Erdfelder et al. 2009). Die narkotisierten Wildtyp-Mäuse der Linie C57BL/6 wurden in einer 3D-gedruckten Kunststoffschale mit einer Öffnungsfläche von 2,5 cm x 5 cm mit dem enthaarten Rücken für die entsprechende Expositionszeit in das Wasserbad eingetaucht. Die Tiere wurden daraufhin in Isolation gehalten, um ein Manipulieren an den Wunden durch Artgenossen zu verhindern. Ansonsten erfolgte die Haltung der Tiere unter Standardbedingungen. Die prozentuale Zusammensetzung der Leukozyten zwischen Menschen und Mäusen unterscheidet sich erheblich (Mestas und Hughes 2004). Für eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse wurde die Reifung und Freisetzung von Granulozyten durch eine prä- und postinterventionelle Verabreichung von rekombinantem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (engl. *granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) stimuliert (Klinke et al. 2020, Tamura et al. 1987). Die Euthanasie erfolgte nach Ende des entsprechenden Beobachtungszeitraums durch eine zervikale Dislokation. Unmittelbar im Anschluss erfolgten die Entnahme und Asservierung von Plasma- und Gewebeproben (Wunde, Lunge, Leber, Milz) für die weiteren Analysen (Elrod et al. 2023).

Zur Quantifizierung der bakteriellen Translokation wurden Gewebeproben aus Wunde, Lunge und Leber homogenisiert und die resultierende Lösung auf Agar-Nährböden ausgestrichen. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (engl. *colony forming units*, CFU) wurde bestimmt und es erfolgte die Identifizierung der Spezies durch ein Matrix-Assistierte-Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeitanalyse-Massenspektrometer (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*, MALDI-TOF) (Elrod et al. 2023).

Die umfangreichen Transkriptom-Analysen von Proben aus Lunge und Leber wurden durch einen externen Dienstleister mit Hilfe der DNA-Nanoball-Sequenzierungsplattform (DNBSEQ) durchgeführt (Beijing Genomics Institute, Shenzhen, China). Der daraus resultierende Datensatz wurde nach Standardmethoden aufgereinigt (Chen et al. 2018) und mit einem Referenzgenom der Maus (GRCm39.104) abgeglichen (Dobin et al. 2013). Eine differenzielle Expression lag vor, wenn die Falscherkennungsrate (engl. *false discovery rate*, FDR) $\leq 0,1$ und der absolute $\log_2$ -fold-change ($|\log_2FC|$) ≥ 1 war (Love et al. 2014). Es erfolgte abschließend die Detektion überrepräsentierter Signalwege (Yu et al. 2012) mit Hilfe der vordefinierten Proteingruppen der Molecular Signatures Database (MSigDB) (Liberzon et al. 2015) und von Gene Ontology (GO) (Ashburner et al. 2000). Zur Sicherstellung der Transparenz erfolgte die Veröffentlichung der Rohdaten im Europäischen Nukleotidarchiv (ENA) unter der Projektnummer PRJEB57842 (Elrod et al. 2023).

Zur Quantifizierung der oxidativen Kapazität bzw. des oxidativen Stresses erfolgte die molekularbiologische Bestimmung der Glutathion-Peroxidase (GPx) und von Malondialdehyd (MDA) mit kommerziell erhältliche Assay-Kits. Die NETose-Marker NE und Nukleosomen, ein Komplex aus DNA und Histonen (Wargnies et al. 2025), sowie Desoxyribonuklease 1 (DNase1) wurden mit einem enzymatischen Immunabsorptionsverfahren (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) bestimmt. Die zirkulierende freie Desoxyribonukleinsäure (engl. *circulating free desoxyribonucleic acid*, cfDNA) wurde mit einem fluoreszenzbasierten Assay quantifiziert (Fuchs et al. 2012; Lenz et al. 2022). Die Bestimmung der Konzentration von Lipopolysaccharid (LPS) in Leberproben erfolgte ebenfalls mittels ELISA (Elrod et al. 2023).

Die Hämatoxylin- und Eosinfärbung (H&E) und die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (MG) erfolgte nach etablierten Standardprotokollen. Zur Analyse der Ausrichtung der dermalen Kollagenfasern wurde eine Picro-Sirius-Rot-Färbung (PSR) durchgeführt. Die Fotos der Proben wurden mittels ImageJ 1.53e (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) und dem validierten OrientationJ-Plug-in (Biomedical Imaging Group, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Schweiz) analysiert (Morrill et al. 2016). Es erfolgte eine verblindete semiquantitative Auswertung (Elrod et al. 2023).

Der Apoptose-Marker gespaltene Caspase 3 (engl. *cleaved caspase 3*, cC3) wurde immunhistochemisch dargestellt. Die NETose-Marker MPO und citrulliniertes Histon 3 (H3cit) wurden mit einer Immunfluoreszenz-Färbung (IF-Färbung) in Proben von Lunge, Leber und in der Wunde detektiert. Weiterhin wurden separate IF-Färbungen auf DNase1 und Desoxynuklease 1 like 3 (DNase1L3) durchgeführt. Als DNA-Gegenfärbung wurde eine 4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Lösung (DAPI) verwendet. Die Proben der genannten Färbungen wurden einer verblindeten semiquantitativen Auswertung unterzogen (Elrod et al. 2023)

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 9.4.1 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Zwei Gruppen wurden mit ungepaarten *t*-Tests und mehr als zwei Gruppen mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (engl. *one-way analysis of variance*, ANOVA) mit Dunnett-Korrektur verglichen (Elrod et al 2023).

1.3 Ergebnisse

Im ersten Versuchsteil widmeten wir uns der Optimierung der Expositionszeiten bei einer Beobachtungszeit von 72 h. Diesen Endpunkt erreichten alle Tiere der 4 s und 6 s Gruppen. Eine Exposition von 7 s führte zu einer Mortalität von 80 % nach 72 h. Dadurch konnte für diese Expositionszeit keine ausreichende Gruppengröße erreicht werden. Die Untersuchung der frühzeitig verstorbenen Tiere der 7 s Gruppe zeigte makro- und mikroskopische Nekrosen an Leber und Nieren (Abbildungen S7 und S8). In der 10 s Gruppe betrug die Mortalität bereits nach 9 h 100 %, sodass diese Expositionszeit im weiteren Verlauf der Versuche nicht fortgeführt wurde (Abbildung 1A) (Elrod et al. 2023).

Die histopathologische Aufarbeitung mittels H&E-Färbung zeigte eine Destruktion der Epidermis und der tieferliegenden Dermis, wobei das Ausmaß abhängig von der Expositionszeit war (Abbildung S1). Im dermalen weißen Fettgewebe (engl. *dermal white adipose tissue*, dWAT) zeigte sich immunhistochemisch eine Hochregulation des Apoptose-Markers cC3. Auch in der semiquantitativen Auswertung wurde eine signifikante Erhöhung bei den 4 s und 6 s Gruppen nachgewiesen (Abbildung S2). Die dermale Kollagenverteilung änderte sich signifikant durch die thermische Verletzung. Es kam zu einem veränderten Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III bei der 6 s Verbrühung und zu einem Verlust der parallelen Ausrichtung der Bindegewebsfasern (Abbildungen 2 und S3) (Elrod et al. 2023).

Der NETose-Marker cfDNA zeigte sich weder in der 4 s noch in der 6 s Gruppe signifikant verändert. Die DNase1 im Plasma war hingegen in beiden Gruppen signifikant erhöht. NE und Nukleosomen waren nur im 6 s Modell signifikant hochreguliert (Abbildung S4) (Elrod et al. 2023).

Bei der Untersuchung der Gewebeproben aus Lunge, Leber und Milz auf das Vorhandensein von oxidativem Stress zeigten sich ebenfalls signifikante Veränderungen. MDA war im 6 s Modell in Lunge und Leber signifikant erhöht. Ein Abfall von GPx, welcher eine Reduktion der oxidativen Kapazität und somit oxidativen Stress anzeigt, wurde nur bei der 4 s Gruppe in der Leber beobachtet (Abbildung S5) (Elrod et al. 2023).

In diesem Versuchsteil zeigte sich in der 6 s Gruppe eine signifikante Änderung der Konzentration von LPS in der Leber und eine bakterielle Translokation in Lunge und Leber nur in wenigen Individuen. Einige Wunden in den 4 s und 6 s Gruppen wiesen eine bakterielle Kontamination auf (Abbildung 3) (Elrod et al. 2023).

Die semiquantitative Auswertung der IF-Färbungen der Wunde (Abbildungen 4 und S6A) zeigte eine signifikante Hochregulation von H3cit, MPO (4 s und 6 s), DNase1 (4 s) und DNase1L3 (6 s). In der Leber (Abbildungen 4 und S6B) war MPO in beiden Gruppen erhöht, während sich eine Erhöhung von H3cit nur in der 6 s Gruppe zeigte. DNase1 zeigte sich in der 6 s Gruppe signifikant reduziert, die DNase1L3 in beiden Gruppen signifikant erhöht. Pulmonal zeigte sich eine signifikante Erhöhung von H3cit, MPO und DNase1L3 in beiden Gruppen. Die DNase1 war bei 6 s signifikant erniedrigt (Abbildungen 4 und S6C) (Elrod et al. 2023).

Wie bereits oben ausgeführt, konnte die 7 s Gruppe mit einer Beobachtungszeit von 72 h nicht ausgewertet werden, da diese insbesondere nach 24 h eine hohe Mortalität aufwies. Zur weiteren Charakterisierung des Verbrühungsmodells entschieden wir uns daher, eine weitere Gruppe mit einer Einwirkzeit von 7 s und einem Beobachtungszeitraum von 24 h zu ergänzen. In dieser Gruppe erreichten alle Tiere den Endzeitpunkt (Elrod et al. 2023).

Die histologischen bzw. immunhistochemischen Untersuchungen ergaben auch hier den Nachweis einer Destruktion der Hautschichten (Abbildung S9) und eine signifikant erhöhte apoptotische Aktivität (Abbildung 5). Weiterhin war das Verhältnis der Kollagenfasern und ihre Ausrichtung verändert (Abbildung 6). Die NET-assoziierten Marker H3cit, MPO, DNase1L3 und DNase1 waren in der IF-Färbung der Hautproben signifikant erhöht (Abbildung 10). Die Marker H3cit, MPO und DNase1L3 waren ebenfalls in der Leber (Abbildung 11) und in der Lunge (Abbildung 12) erhöht, wohingegen in beiden Organen die DNase1 signifikant erniedrigt war (Elrod et al. 2023).

Im Plasma der Tiere zeigten sich die NETose-Marker cfDNA, DNase1, NE und Nukleosomen signifikant erhöht (Abbildung 7). Ebenfalls kam es zu einem Anstieg des oxidativen Stresses (MDA) bzw. zu einem Abfall der oxidativen Kapazität (GPx) in Lungen- und Leberproben (Abbildung 8) sowie zu einem Anstieg des LPS-Spiegels in der Leber. Eine nachweisbare bakterielle Translokation in die Leber wurde allerdings nur in zwei Tieren bzw. in die Lunge bei einem Tier beobachtet (Abbildung 9) (Elrod et al. 2023). Hierbei

ist insbesondere der Nachweis von *Enterococcus gallinarum* bemerkenswert, da es sich hierbei um einen Keim der murinen Darmflora handelt (Nishio et al. 2021).

In der Transkriptomanalyse waren 16 % (Leber) bzw. 2 % (Lunge) der jeweils detektierten proteinkodierenden Boten-Ribonukleinsäure-Moleküle (engl.: *messenger ribonucleic acid*, mRNA) differentiell exprimiert (Tabelle S3, abrufbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1113948>). Die Clusteranalyse in der Leber erbrachte signifikante Veränderungen insbesondere in Stoffwechselprozessen und Prozessen der zellulären Stressreaktion wie die Aktivierung von Caspasen und die Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies. In der Lunge veränderten sich in erster Linie Signalwege der Immunabwehr und der Gewebestruktur (Elrod et al. 2023). Im Anhang befinden sich vollständige Listen der GO-Termini und MSigDB-Signalwege (Tabellen S4-S7, abrufbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1113948>).

1.4 Diskussion und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen

Zur Durchführung eines erfolgreichen Experiments ist die Auswahl eines geeigneten Modells unerlässlich. Forschungsfragen, die immunologische Themen berühren, machen den Einsatz von Tiermodellen in vielen Fällen nach wie vor unverzichtbar. Nichtsdestotrotz sollten Tierversuche möglichst ersetzt, reduziert oder verfeinert werden (engl. *replace, reduce, refine*, 3R) (Lewis 2019). Eine wesentliche Herausforderung bei der Etablierung der hier vorgestellten Studie war die Wahl der richtigen Einwirkzeit. Eine Exposition von 10 s führte zu einer nicht tolerablen Mortalität (Elrod et al. 2023). Diese Beobachtungen stehen in Kontrast zu Ergebnissen vorausgegangener Studien (Toliver-Kinsky et al. 2005; Finnerty et al. 2009). Hier wird die Bedeutung klar definierter und transparent kommunizierter Versuchsbedingungen deutlich. Wir erklären uns diese Diskrepanz durch die Verwendung jüngerer Mäuse mit dünnerem Unterhautfettgewebe, welches bei älteren Tieren zu einer gewissen Abschirmung gegen die thermische Energie führen könnte (Elrod et al. 2023). Auch beim 7 s Modell war die Mortalität nach 72 h zu hoch, um die Anforderungen an einen verantwortungsbewussten Einsatz von Versuchstieren zu erfüllen. Der Nachweis von Verletzungen von Niere und Leber in einigen der frühzeitig verstorbenen Individuen könnte die erhöhte Mortalität erklären. Es wurde daher eine verkürzte Beobachtungszeit von 24 h bei der 7 s Gruppe ergänzt.

Die vorliegende Studie konnte einen signifikanten Umbau der dermalen Kollagenfasern durch eine Verbrühung nachweisen (Elrod et al. 2023). Durch die Denaturierung der physiologischen helikalen Struktur (Wright und Humphrey 2002; Ye et al. 2019) kommt es zu einer irreversiblen Schrumpfung der Dermis mit einem Verlust der mechanischen und strukturellen Integrität der Haut. Es kommt zu einer unsystematischen Neuausrichtung der

Fasern (Theodossiou et al. 2002). Diese Prozesse scheinen eine Rolle bei der Initiation der Wundheilung zu spielen (Zhou et al. 2016).

Auf zellulärer Ebene bedingte die thermische Verletzung eine von der Einwirkungszeit abhängige erhöhte Apoptoserate in tieferen Hautschichten (Elrod et al. 2023). Da die Apoptose als aktiver Prozess einen funktionierenden Stoffwechsel voraussetzt, scheinen nur Zellen tieferer Hautschichten betroffen zu sein, die durch die thermische Energie nicht unmittelbar nekrotisieren (McNamara et al. 2010).

Neben den lokalen Auswirkungen untersuchten wir in der vorliegenden Studie auch die systemischen Auswirkungen einer großflächigen thermischen Verletzung, insbesondere in Hinblick auf das Auftreten von NETose. Die NET-assoziierten Marker zeigten sich im 6 s und 7 s Modell im Plasma und in der Wunde, Lunge und Leber signifikant erhöht (Elrod et al. 2023). Die Neutrophilen und die NETs sind bereits für ihre Rolle in der Pathophysiologie nach schweren Verletzungen und Verbrennungen bekannt. In der Ratte korreliert das Ausmaß der NETose mit der TBSA (Otagawa et al. 2018). Bei polytraumatisierten und schwerkranken Patientinnen und Patienten wird ein Anstieg der Sepsisrate und der Mortalität mit steigenden NETose-Markern beobachtet (Dinsdale et al. 2020; Jackson Chornenki et al. 2019; Nguyen et al. 2017). Es wird bereits an der Etablierung der NETose-Marker als diagnostische Laborparameter der Sepsis geforscht (Lenz et al. 2022; Zeng et al. 2025). Diese könnten in Zukunft auch in der Verbrennungsmedizin eine Rolle in der Diagnostik und Prognoseabschätzung spielen (Altrichter et al. 2010).

Als Gegenspieler der NETs gilt die DNase1, welche sich in unseren Experimenten im Plasma und in der Wunde erhöht zeigte (Elrod et al. 2023). Dieses Enzym degradiert freie DNA-Stränge und wird beispielsweise bei polytraumatisierten Patientinnen und Patienten kompensatorisch überexprimiert (Meng et al. 2012). Eine mögliche Erklärung für den Übertritt in den Kreislauf ist eine posttraumatische intestinale Schädigung, da das Enzym unter anderem im Verdauungstrakt exprimiert wird (Faries et al. 1998; Shimada et al. 1998). Interessanterweise zeigte sich die gewebsgebundene DNase1 in Lunge und Leber signifikant reduziert (Elrod et al. 2023). Störungen der Mikrozirkulation (Boneschansker et al. 2016; Dinsdale et al. 2020) und oxidativer Stress (Hansbrough et al. 1996) sind ein wesentlicher Auslöser von Organdysfunktion nach schweren thermischen Verletzungen. NETs gelten als thrombogen und können die Organperfusion massiv beeinträchtigen (Brill et al. 2012; Clark et al. 2007; Fuchs et al. 2010; Jiménez-Alcázar et al. 2017; Zhou et al. 2022). So könnte eine NET-induzierte Gefäßokklusion mit konsekutiver Organdysfunktion zu einer reduzierten lokalen Synthese der DNase1 in den untersuchten Organen führen.

Eine gefürchtete Komplikation in der Verbrennungsmedizin stellen bakterielle Infektionen dar (Epstein et al. 1992). Einerseits kann es zu einer Infektion der Wunde kommen, andererseits kann eine schockassoziierte ischämische Schädigung des Darmes zu einer

Durchwanderung von Darmbakterien in die Blutbahn mit konsekutiver Absiedelung in anderen Organen führen (Liu et al. 2021; Maejima et al. 1984). In unserer Studie gelang der direkte Nachweis einer bakteriellen Translokation in Leber und Lunge nur in wenigen Individuen, allerdings könnte der Anstieg von LPS in der Leber eine beginnende bakterielle Absiedelung anzeigen (Elrod et al. 2023). Hier könnte der Untersuchungszeitraum von 24 h beim 7 s Modell zu kurz gewesen sein, um die bakterielle Translokation nachzuweisen. Das einzige überlebende Individuum der 7 s Gruppe nach 72 h wies eine massive bakterielle Besiedlung der Leber auf, sodass dies eine gute Erklärung für die hohe Mortalität in dieser Gruppe darstellen könnte.

Die umfangreichen Transkriptomanalysen der Leber- und Lungenproben bestätigten die systemischen Auswirkungen der thermischen Verletzung. Es kam sowohl zu einer Überexpression der Akute-Phase-Proteine als auch von Metallothionein (Elrod et al. 2023). In der Literatur ist beschrieben, dass letzteres Protein maßgeblich an anti-inflammatorischen Prozessen nach thermischen Verletzungen durch die Reduktion des oxidativen Stresses beteiligt ist (Zhang et al. 2016). Weiterhin fanden sich bei der Transkriptomanalyse Hinweise auf einen posttraumatischen Hypermetabolismus (Elrod et al. 2023). Diese Ergebnisse decken sich mit den bereits beschriebenen metabolischen Adaptationen nach thermischen Traumata, wobei es sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen zu pathologischen Veränderungen der Gluconeogenese und des Blutzuckerspiegels kommt (Jeschke et al. 2020; Williams et al. 2009; Yu et al. 1999).

Die direkte Übertragbarkeit der Befunde auf die Pathophysiologie nach thermischen Verletzungen beim Menschen ist allerdings nur eingeschränkt möglich, da sich sowohl die Anatomie als auch die immunologischen Merkmale zwischen Menschen und Mäusen unterscheiden (Abdullahi et al. 2014). So ist beispielsweise die Zusammensetzung des peripheren Blutes und die Anzahl der Neutrophilen unterschiedlich. Um die Diskrepanz zu verringern, stimulierten wir in den Mäusen die Bildung von Granulozyten präinterventionell mit G-CSF (Elrod et al. 2023). Dennoch muss bei der Interpretation der Daten bedacht werden, dass sich die immunologische Reaktion von Mäusen und Menschen in einigen Aspekten unterscheidet (Tompkins 2015). Die genomischen Alterationen nach Verbrennungen korrelieren nur wenig zwischen Menschen und Mäusen (Seok et al. 2013). Nichtsdestotrotz kann die wissenschaftliche Bedeutung dieser Modelle in Bezug auf die Erforschung von komplexen Stoffwechsel- und Immunreaktionen nicht negiert werden. So konnte in einer Metaanalyse eine Translationalität der Ergebnisse zwischen Tiermodellen und späteren klinischen Studien in verschiedenen medizinischen Fachbereichen in 86 % der Fälle gezeigt werden. 50 % der vielversprechenden Therapieansätze aus Tierversuchen werden in klinischen Studien getestet und 5 % erreichen eine offizielle Zulassung (Ineichen et al. 2024). Auch wenn hier noch Ausbaupotenzial besteht, stellen

Tierversuche nach wie vor die Basis für die Entwicklung neuer Therapeutika dar. An Alternativen zum Tierversuch wird umfassend geforscht, jedoch konnte z. B. bei Organoiden diese Konkordanz zwischen Grundlagenforschung und klinischen Studien bisher nicht gezeigt werden (Poppelaars et al. 2025).

Um die Anforderungen an einen verantwortungsvollen Umgang mit Versuchstieren im Sinne der 3R zu erfüllen, weist die vorliegende Studie einige methodische Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten (Elrod et al. 2023). Zusätzliche Variationen bezüglich Wassertemperatur, Expositionszeit und Versuchsdauer sowie die Auswertung weiterer Organe und größerer Versuchsgruppen hätten die Aussagekraft erhöhen können. Auch hätte die zusätzliche laborchemische Messung etablierter Entzündungsparameter die Translationalität erhöhen können. Aufgrund von Bedenken der Ethikkommission und analog zu vielen bereits publizierten Studien mit murinen Verbrühungsmodellen verzichteten wir auf die postinterventionelle Applikation eines Wundverbandes (Bohannon et al. 2009; Bohanon et al. 2018; Heuer et al. 2021; Porter et al. 2016; Toliver-Kinsky et al. 2005). Eine histologische Studie an Mäusen zeigte jedoch, dass die Verwendung eines Wundverbandes die Inflammation der Wunde und die Narbenbildung positiv beeinflussen könnte (Zhang et al. 2015).

Mit der durchgeführten Studie konnten zwei Modelle für Verbrühungen bei Mäusen charakterisiert werden. Das 7 s Modell eignet sich insbesondere für Studien mit einem Fokus auf die frühe Phase der verbrennungsinduzierten Sepsis. Für spätere Phasen der Verbrennungspathologie ist das 6 s Modell geeignet. Bei beiden Modellen zeigt sich eine ausgeprägte NETose, die Induktion oxidativen Stresses und im geringeren Maße eine bakterielle Translokation.

Die Neutrophilen Granulozyten und die NETs scheinen eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie von schweren thermischen Verletzungen zu spielen und könnten vielversprechende Ansatzpunkte in der Diagnostik und Therapie darstellen. Hier sollten weiterführende Studien anknüpfen, um einerseits die immunologischen Veränderungen nach Verbrühungen besser zu verstehen und andererseits therapeutische Ansätze zu erforschen. Zur systematischen Untersuchung der kausalen Effekte der NETs wären weitere experimentelle Tiermodelle denkbar.

Durch die Nutzung kommerziell verfügbarer Knock-Out-Mauslinien könnte der Einfluss der NETs durch genetische Blockade von Schlüsselenzymen der NETose (Peptidyl-Arginin-Deiminase 4) oder die genetische Blockade der NET-Degradation (DNase1 und DNase1L3) untersucht werden. Als weiterführendes therapeutisches Modell wäre auch die Verabreichung von DNase-Präparaten ein vielversprechender Ansatz. Eine mögliche Hypothese wäre hier die positive Beeinflussung von Morbidität und Mortalität durch die genetisch reduzierte Bildung bzw. die medikamentös erhöhte Degradation von NETs zur

Vermeidung der NET-assoziierten Komplikationen wie Gefäßokklusionen und prolongierten Entzündungsreaktionen. Dieser Hypothese folgend würde eine Ausschaltung der NET-Degradation zu einer Zunahme dieser Komplikationen führen. Allerdings wäre es auch denkbar, dass die Ausschaltung der NETs zu einer unkontrollierten bakteriellen Infektion mit entsprechenden septischen Komplikationen führt, da die physiologische Aufgabe der primären Erregerabwehr gehemmt werden könnte. Aufgrund der begrenzten Übertragbarkeit durch die unterschiedliche dermale Anatomie von Nagern und Menschen, wäre in einem weiteren Schritt die Durchführung von Großtierversuchen, z. B. in einem porcinen Modell, denkbar (Abdullahi et al. 2014). Ein übergeordnetes Ziel, im Sinne eines translationalen Forschungsansatzes, könnte die Entwicklung eines lokal oder systemisch applizierten DNase-Präparates zur Reduktion der NET-assoziierten Komplikationen nach thermischen Verletzungen sein (Dölling et al. 2024). Ein als Mukolytikum zugelassenes DNase1-Präparat zur inhalativen Anwendung bei Zystischer Fibrose ist bereits länger in klinischer Anwendung (Yang und Montgomery 2021). Allerdings sind die Wirksamkeit und die pharmakologische Sicherheit von DNasen bei anderen Indikationen und in anderen Applikationsformen aktuell schwer abzuschätzen, sodass umfangreiche klinische Studien zur Erforschung dieses vielversprechenden Therapieansatzes erforderlich sind.

2. Artikel



OPEN ACCESS

EDITED BY
Michael V. Volin,
Midwestern University, United States

REVIEWED BY
Folke Bror Sjöberg,
Linköping University Hospital, Sweden
Nelleke Richters,
Dutch Cancer Society, Netherlands
Tejinder Kaur,
University of British Columbia, Canada

*CORRESPONDENCE
Julia Elrod
✉ julia.elrod@medma.uni-heidelberg.de

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
senior authorship

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 01 December 2022
ACCEPTED 25 January 2023
PUBLISHED 07 February 2023

CITATION
Elrod J, Lenz M, Kiwit A, Armbrust L,
Schönfeld L, Reinshagen K, Pagerols
Raluy L, Mohr C, Saygi C, Alawi M,
Rohde H, Herrmann M and Boettcher M
(2023) Murine scald models characterize
the role of neutrophils and neutrophil
extracellular traps in severe burns.
Front. Immunol. 14:1113948.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1113948

COPYRIGHT
© 2023 Elrod, Lenz, Kiwit, Armbrust,
Schönfeld, Reinshagen, Pagerols Raluy,
Mohr, Saygi, Alawi, Rohde, Herrmann and
Boettcher. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Murine scald models characterize the role of neutrophils and neutrophil extracellular traps in severe burns

Julia Elrod^{1,2*†}, Moritz Lenz^{2†}, Antonia Kiwit², Lina Armbrust²,
Lavinia Schönfeld², Konrad Reinshagen², Laia Pagerols Raluy²,
Christoph Mohr¹, Ceren Saygi³, Malik Alawi³, Holger Rohde⁴,
Martin Herrmann^{1,5,6†} and Michael Boettcher^{1,2†}

¹Department of Pediatric Surgery, University Medical Center Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany, ²Department of Pediatric Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ³Bioinformatics Core, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ⁴Institute of Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ⁵Department of Medicine 3, Friedrich Alexander University Erlangen-Nuremberg and Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen, Germany, ⁶Deutsches Zentrum Immuntherapie DZI, Friedrich Alexander University Erlangen-Nuremberg and Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen, Germany

Introduction: Severe burns cause unique pathophysiological alterations especially on the immune system. A murine scald model was optimized as a basis for the understanding of immunological reactions in response to heat induced injury. The understanding of the roles of neutrophil extracellular traps (NETs) and DNases will support the development of new surgical or pharmacological strategies for the therapy of severe burns.

Methods: We studied C57BL/6 mice (n=30) and employed four scalding protocols with varying exposure times to hot water. An additional scald group with a shorter observational time was generated to reduce mortality and study the very early phase of pathophysiology. At 24h or 72h, blood was drawn and tissue (wound, liver, lung, spleen) was analyzed for the presence of NETs, oxidative stress, apoptosis, bacterial translocation, and extracellular matrix re-organization. In addition, we analyzed the transcriptome from lung and liver tissues.

Results: Exposure to hot water for 7s led to significant systemic and local effects and caused considerable late mortality. Therefore, we used an observation time of 24h in this groups. To study later phases of burns (72h) an exposure time of 6s is optimal. Both conditions led to significant disorganization of collagen, increased oxidative stress, NET formation (by immunodetection of H3cit, NE, MPO), apoptosis (cC3) and alterations of the levels of DNase1 and DNase1L3. Transcriptome analysis revealed remarkable alterations in genes involved in acute phase signaling, cell cohesion, extracellular matrix organization, and immune response.

Conclusion: We identified two scald models that allow the analysis of early (24h) or late (72h) severe burn effects, thereby generating reproducible and standardized scald injuries. The study elucidated the important involvement of neutrophil activity and the role of NETs in burns. Extensive transcriptome analysis

characterized the acute phase and tissue remodeling pathways involved in the process of healing and may serve as crucial basis for future in-depth studies.

KEYWORDS

wound healing, burn, scald, extracellular DNA, sepsis, neutrophil extracellular traps (NETs), bacterial translocation

Introduction

As the number of thermal injuries has been decreasing worldwide for several decades, according to data from the Global Burden of Disease 2017 study, approximately 9 million burns occurred in 2017 (1). A relevant proportion of these arise in low- and middle-income countries (2, 3). Despite improvements in intensive care and surgical management, mortality of severe burns remains high (4). This is partly due to our limited understanding of the disease. The pathophysiology of thermal injury, including the systemic effects on the immune system is complex and depends on several factors, such as the size of the burn, indicated as the total body surface area (TBSA), the depth of the defect, and the extent of the inflammatory response (3, 5, 6). An inflammatory process is triggered immediately after the insult (3). This reaction can be beneficial to healing. On the other hand, it may lead to systemic inflammation which ultimately impairs wound healing (7). Thermal injury-induced immunosuppression is an important feature of the immunological dysfunction in burns. Its understanding is crucial, as approximately 3/4 of all burn related deaths can be attributed to infection (8).

Neutrophils represent the first line of innate immune defense against infectious pathogens. Amongst other effector functions, they fight a variety of microorganisms by the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) (9). Importantly, anti-NET therapy, either on a pharmacological or a genetical basis can improve primary and

secondary wound healing in mice (10). NETs consist of chromatin, decorated with cytotoxic proteins, such as neutrophil elastase (NE) and myeloperoxidase (MPO) (9).

Despite the development of modern techniques to replace animal models, they unfortunately remain indispensable up to now. They are required to study immunological reactions in response to heat induced injury and to develop new surgical or pharmacological strategies, such as immunomodulation. In the past, several models of heat-induced injury have been developed. Amongst others, the immersion into hot water in specifically constructed harnesses, allows the creation of scald injuries with reproducibly uniform depth and scope (11). Yet, a literature review revealed that authors use varying protocols to achieve third degree burns (12–15). The most common animals used for scald experiments are mice which are cost- and time-efficient (16). Mouse-based models enable answering detailed pathophysiological questions, since many transgenic mouse lines are available. Further species are rats, pigs, or rabbits (11). A review by Abdullahi et al. illustrated that the experimental protocols for full thickness scalds in mice vary regarding exposure time, temperature and TBSA depending on the experimental hypothesis (16). The TBSA ranges from 2.5 (17) to 35% (18), the length of exposure from 6 (19) to 45 s (20), and the water temperature from 54 (17) to 100°C (21–25). The use of a heat-resistant form with a defined area of exposed skin is an established method to induce a sharply defined, reproducible wound.

The aim of this paper is (I) to optimize the scald model in terms of exposure and observational time, (II) to elucidate the role of neutrophils and NETs in burns, (III) to characterize molecular and biochemical aspects in this process, and (IV) to perform extensive transcriptome analyses, as basis for future mechanistic studies in mice.

Materials and methods

Animal procedures

This study was performed with approval by the Authority for Justice and Consumer Protection Hamburg (N065/2020) in accordance with the German Animal Welfare Act. 30 eight-week-old male mice (C57BL/6) were included in the experiments. Animals were kept under constant standard conditions. The mice were randomly divided into five groups receiving following treatments:

- 1) Sham – no thermal injury (n=5)
- 2) 4 s scald at 98°C (n=5)

Abbreviations: 3R, Replacement, reduction, refinement; 4-PL, Four-parameter logistic curve fit; ANOVA, Analysis of variance; BSA, Bovine serum albumin; cC3, Cleaved caspase 3; cfDNA, Circulating free deoxyribonucleic acid; CFU, Colony forming units; COVID-19, Coronavirus disease 2019; DAB, 3,3'-Diaminobenzidine; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DNA, Deoxyribonucleic acid; DNase 1, Deoxyribonuclease 1; DNase 1L3, Deoxyribonuclease 1 like 3; dWAT, Dermal white adipose tissue; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; Em, Emission; ENA, European nucleotide archive; Ex, Excitation; FDR, False discovery rate; G-CSF, Granulocyte colony-stimulating factor; GO, Gene ontology; GPx, Glutathione peroxidase; H&E, Hematoxylin and eosin; H3Cit, Citrullinated histone H3; IHC, Immunohistochemical; Log2FC, Log2-transformed fold change; LPS, Lipopolysaccharide; MALDY-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight; MDA, Malondialdehyde; MG, Masson goldner trichrome staining; MPO, Myeloperoxidase; mRNA, Messenger ribonucleic acid; MSigDB, Molecular signatures database; NaCl, Sodium chloride; NE, Neutrophil elastase; NETs, Neutrophil extracellular traps; PBS, Phosphate buffered saline; PC, Panniculus carnosus; PCR, Polymerase chain reaction; PSR, Picro sirius red; RNA, Ribonucleic acid; RNase, Ribonuclease; ROS, Reactive oxygen species; SD, Standard deviation; TBSA, Total body surface area.

- 3) 6 s scald at 98°C (n=5)
- 4) 7 s scald at 98°C (n=13)
- 5) 10 s scald at 98°C (n=2)

Two days prior to intervention, tramadol was added to the drinking water (10 mg/ml) to ensure periinterventional analgesia.

Anesthesia was induced with 5% isoflurane (Baxter, Unterschleißheim, Germany) by facemask. Buprenorphine (0.1 mg/kg bodyweight) was applied for analgesia and 0.5 ml NaCl were applied i.p. for fluid resuscitation. The dorsum was shaved, treated with depilatory cream and 1 ml of NaCl was injected s.c. along the spinal column for protection of the spinal cord. To reduce the discrepancy between murine and human peripheral neutrophil count (26–28), animals were treated with recombinant G-CSF i.p. (250 µg/kg bodyweight – Granulocyte 34, Chugai Pharmaceuticals, Chuo, Japan) at 0 and 48 h. Anesthetized animals were then placed on their back in a plastic, heat-resistant device, with an opening of 2.5 cm x 5 cm, corresponding to 20–25% TBSA, based on the formula by Cheung et al. (29). Immersion in a 98°C hot water bath was performed for 4, 6, 7 or 10 s. Immediately afterwards, the exposed skin was cooled in a water bath (20°C). Sham group was subjected to all procedural steps, except scalding. Afterwards, all mice were closely monitored and kept in heated retainers. Mice were housed individually to avoid interindividual manipulation of the wounds, which were not covered by a dressing. An i.v. or i.p. fluid resuscitation was not performed due to concerns of the ethical committee; however, the mice were allowed to drink and eat *ad libitum* during the entire study period. After 24 h or 72 h, depending on the groups, mice were anaesthetized using isoflurane. Blood was collected *via* cardiac puncture. Finally, cervical dislocation was performed.

Sample preparation

Tissue samples were harvested under sterile conditions. Samples of lung, liver and burnt skin were punched out (3 mm diameter) and stored on ice in 1 ml phosphate buffered saline (PBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA) for microbiological analysis. Samples of liver, spleen and lung were aliquoted, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Additionally, lung and liver tissue and burnt skin was fixed in 4% paraformaldehyde (Morphisto, Offenbach am Main, Germany) for 24 h for histological evaluation. After embedding in paraffin, the samples were cut into 3 µm thick sections for staining. Blood samples were collected in EDTA tubes and centrifuged (2000 g, 21°C, 10 min.) within no more than one hour after collection. Plasma was stored at -80°C.

Bacterial translocation

Samples were homogenized in PBS (agitation speed 5500 min⁻¹, 3x30 s) using the Precellys Lysing Kit (Bertin Industries, Île-de-France, France). The resulting solution was diluted 1:5 and 1:100 with PBS. 50 µl of each sample were transferred on columbia agar + 5% sheep blood (COS), columbia agar CNA + 5% sheep blood agar plates (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) and pseudomonas isolation agar (BD, Heidelberg, Germany). After 48 hours of incubation at 37°C, the number of colony forming units (CFU) was

determined and multiplied by the respective dilution factors. Species were identified using MALDI-TOF-mass spectrometer (Bruker Daltonik MALDI Biotyper, Bruker, Billerica, MA, USA).

Transcriptome sequencing and statistics

Tissue samples (≥ 30 mg) of lung and liver of sham and 7 s scald (24 h) mice were collected, rinsed with RNase-free water, and flash frozen. RNA isolation and transcriptome analysis were outsourced to a commercial supplier (Beijing Genomics Institute, Shenzhen, China) (30). Briefly, mRNA molecules were purified using oligo(dT)-attached magnetic beads and incubated with fragmentation reagents. Afterward, mRNA fragments were converted into cDNA molecules, and amplified using polymerase chain reaction (PCR). Finally, DNA nanoball sequencing platform (DNBSEQ) was used for library sequencing. Sequence reads were processed with fastp 0.20.1 to remove sequences of sequencing adapters and low quality (Phred quality score < 15) sequences from the 3'-end of the sequence reads (31). Thereafter, reads were aligned to the mouse reference assembly (GRCm39.104) using STAR 2.7.9a (32). Differential expression was assessed with DESeq2 (33) and a gene was considered differentially expressed if the corresponding false discovery rate (FDR) was ≤ 0.1 and the absolute log2-transformed fold change (|log2FC|) was ≥ 1. Deviating data processing was performed for the analysis including the sham group since replicates were not available. Here the read counts were normalized with DESeq2 too, but only the 60% of protein coding genes with the highest sum of normalized counts across samples in the comparison were further investigated. The log2FC was then calculated between sham and each replicate individually and only the value of lowest fold change, and thus the most conservative estimate, was reported. The detection of overrepresented pathways was performed using clusterProfiler 4.05 (34) in combination with the Molecular Signatures Database (MSigDB) (35) and Gene Ontology (36). Top 5 up- and downregulated genes were tabularized with further information, like protein name and cellular function (37). All sequence data presented in this study have been submitted to the European Nucleotide Archive (ENA) and they are publicly available under accession PRJEB57842.

Glutathione peroxidase assay

GPx activity, a marker for antioxidative capacity (38), was measured in liver and lung tissue samples using a kit (Cayman-Chemical, Ann Arbor, MI, USA). 10 mg of each sample were homogenized in 500 µl lysis buffer using the TissueRuptor (Qiagen, Venlo, The Netherlands).

Malondialdehyde assay

To examine lipid peroxidation, MDA concentration (nmol/mg) in liver, lung and spleen was measured using the MDA assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as described previously (38). 10 mg of each sample were homogenized in 300 µl lysis buffer master mix using the TissueRuptor (Qiagen, Venlo, The Netherlands).

Lipopolysaccharide ELISA

A mouse LPS ELISA kit (Biomatik, Kitchener, Canada) was performed with liver samples, according to the official protocol.

Nucleosome ELISA

A cell death detection ELISA kit (Roche, Basel, Switzerland) was used to measure plasma concentration of nucleosome complexes. Statistical analysis was carried out by interpolation of a standard curve using a four-parameter logistic curve fit (4-PL), as described previously (39). For visualization a nondimensional scale was used.

Deoxyribonuclease 1 ELISA

The concentration of DNase1 (ng/ml), which is involved in degradation of NETs (9), was assessed by means of ELISA (MyBioSource, San Diego, CA, USA).

Neutrophil elastase ELISA

NE, a marker for neutrophil activation (40), was quantified using the ELANE ELISA kit (Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, USA).

Circulating free DNA assay

CfDNA was quantified on a fluorescence-based assay (39, 41). After serial dilution of a DNA standard, diluted samples (1:20) and standard curve specimens (range 0–2000 ng/ml) were placed on a 96-well microtiter plate in quadruples. Two wells each were incubated with a Sytox Orange solution. The remaining two wells each, were incubated with a dilution buffer (0.1% BSA, 2 mM EDTA in PBS) as a blank value. After 5 min. of incubation, fluorescence measurement (Ex: 544 nm, Em: 570 nm) was carried out.

Histological staining (H&E, MG)

For hematoxylin and eosin staining (H&E) and Masson Goldner Trichrome staining (MG) standardized staining protocols were used. Samples were analyzed and photographed using light microscopy at 20x and 40x magnification.

Picro sirius red staining and analysis of collagen composition and orientation

After a deparaffinization and rehydration process, skin tissue sections were stained using the picro sirius red stain kit (AB150681, Abcam, Cambridge, UK). Light microscopy with polarization filters (Olympus BX60 Microscope, Olympus, Shinjuku, Japan) was used to visualize collagen fibers in the connective tissue of the skin. Polarized

pictures were taken and exported to ImageJ 1.53e (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) for further analysis. Analysis was performed using the validated OrientationJ plug-in (Biomedical Imaging Group, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland) (42). Orientation of collagen fibers was analyzed based on their deviation from a horizontal line (-90° to $+90^\circ$). The composition of collagen fibers was scored semiquantitatively (0 = very little amount to 5 = maximum) by an independent, blinded investigator by means of polarized pictures.

Immunohistochemical staining (cC3)

IHC staining for cleaved caspase 3 (cC3) was performed using a fully automated staining machine (Ventana BenchMark XT, Roche, Basel, Switzerland). Sections were placed in cell conditioning solution (Roche, Basel, Switzerland) for one hour. An anti-mouse-cC3-antibody (AF835, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was applied at a concentration of 0.67 µg/ml. The UltraView universal DAB detection kit (Roche, Basel, Switzerland) was used.

Immunofluorescence staining (H3cit, MPO)

After deparaffinization and rehydration, an immunofluorescence double staining for myeloperoxidase (MPO) and citrullinated histone 3 (H3cit) was performed to visualize NETs. MaxBlock Autofluorescence Reducing Reagent (Max Vision Biosciences, Bothell, WA, USA) was applied. Next, slides were treated with Dako Target Retrieval Solution Citrate pH6 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) for 10 min. at 98°C, followed by 40 min. of cooling. A donkey block solution (BioGenex, Fremont, CA, USA) was used to reduce unspecific signals. A primary recombinant anti-mouse-H3cit-antibody (AB219406, Abcam, Cambridge, UK) and a goat-anti-mouse-MPO-antibody (AF3667, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) were diluted in buffer (DCS, Hamburg, Germany) to a concentration of 5.27 µg/ml and 10 µg/ml, respectively. Slices were incubated for 12 hours at 4°C. A goat-IgG-antibody (AB108C, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and a recombinant rabbit-IgG-antibody (AB172730, Abcam, Cambridge, UK) served as isotype controls. Next, Cy3 AffiniPure donkey-anti-goat-IgG (705-165-14, Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) and Alexa Fluor 647 AffiniPured Donkey-anti-rabbit-IgG (711-605-152, Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) were applied for 30 min. DNA was counterstained for 5 min. using a 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Slides were mounted with Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA).

Immunofluorescence staining (DNase1, DNase1L3)

A separate staining for DNase1 and DNase1L3 was performed using the protocol described above. As primary antibodies a DNase-1-polyclonal-antibody (BS-7651R, Bioss, Woburn, MA, USA) and a DNase-1L3-polyclonal-antibody (BS-7653R, Bioss, Woburn, MA, USA) were used in a concentration of 0.01 µg/ml. Rabbit-IgG

(AB37415, Abcam, Cambridge, UK) served as isotype control. As secondary antibody, a donkey-anti-rabbit-IgG Alexa Fluor 647 (AB150075, Abcam, Cambridge, UK) was used.

Semiquantitative evaluation of immunofluorescence and immunohistochemical staining (H3cit/MPO, DNase1, DNase1L3, cC3)

Immunofluorescence samples were analyzed using a fluorescence microscope (Zeiss Observer Z1, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany), immunohistochemical staining using a light microscope. Dyes were scored semiquantitatively by an independent, blinded observer.

Statistics

A pre-power study calculation was performed using G*Power 3.1 (43), deducted from previous trials regarding inflammation and NET formation. Data was analyzed using GraphPad Prism 9.4.1 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Unpaired *t*-tests were used for comparisons of two groups. Three groups were compared by ordinary one-way ANOVA with Dunnett's correction. The level of significance was set at 0.05. Differences of survival curves were analyzed using log-rank (Mantel-Cox) test.

Results

Determination of exposure time of scald

Survival: Probability of survival after 72 h as a function of exposure time to hot water is demonstrated in Figure 1. 5/5 animals (100%) reached the final endpoint in each of the 4 s, 6 s scald and sham group. In the 7 s scald group only 1/5 mice (20%) reached the

final time point of 72 h. In the 10 s scald group 2/2 mice (100%) died within 9 h. According to the 3R principles, this condition was discontinued.

Histopathology: Histological staining (Figure S1), revealed an exposure-time-dependent gradual destruction of epidermis and dermis and an infiltration of the dermal white adipose tissue (dWAT) by leucocytes and erythrocytes at 72 h. Full thickness scald, was reliably observed only at 6 s scald group. Macroscopically, a sharply delimited wound field was achieved (Figure 1B).

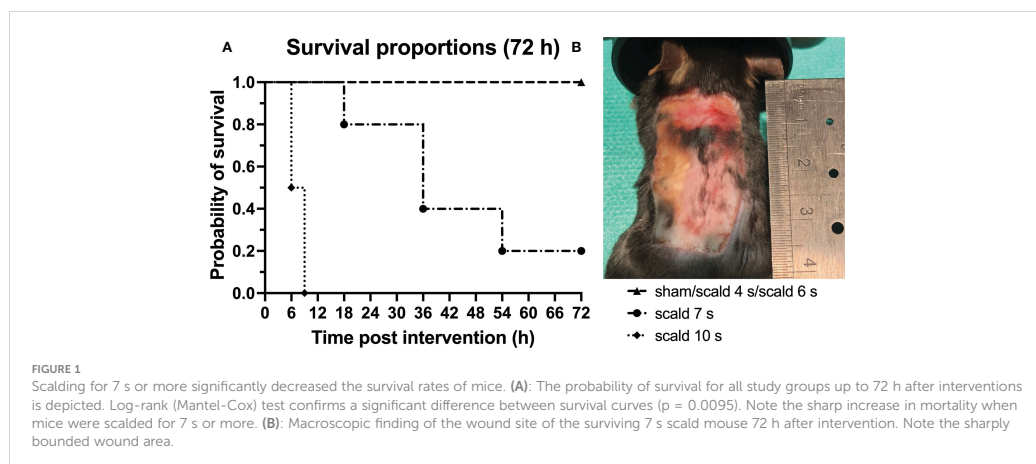
Apoptotic activity: Scald induced upregulation of cC3 was observed in the infiltrate of the dermis and dWAT as shown by IHC (Figure S2). Semiquantitative scoring revealed a significant upregulation in the 4 s group ($p = 0.0022$) and the 6 s group ($p = 0.0136$), compared to sham.

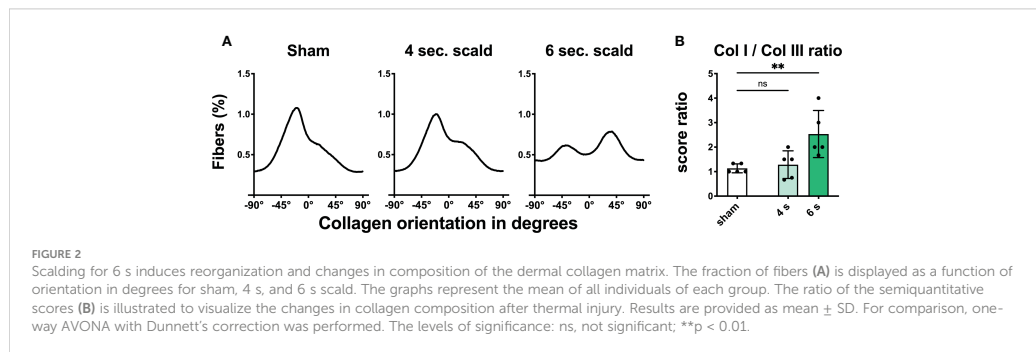
Dermal collagen distribution and orientation: Shrinking of the epidermis and dermis with densely packed collagen fibers was observed in polarized PSR stain (Figure 2, S3). The collagen I to collagen III ratio was significantly altered at 6 s scald compared to sham ($p = 0.0098$); moreover, fibers lost their parallel orientation.

Systemic markers of neutrophil activation: Level of cfDNA in plasma was not significantly altered in the 4 s ($p = 0.9783$) and 6 s scald model ($p = 0.8231$) compared to sham mice, whereas DNase1 was significantly elevated in 4 s ($p = 0.0001$) and 6 s scald ($p = 0.0153$). NE and nucleosome were significantly elevated in 6 s scald (NE: $p = 0.0042$; nucleosome: $p = 0.0217$), but not in 4 s scald (NE: $p = 0.8822$; nucleosome: $p = 0.9767$), see Figure S4.

Tissue oxidative stress: MDA was significantly elevated in the lung ($p = 0.0114$) and liver ($p = 0.0212$) in the 6 s scald model, but not in the spleen, nor at 4 s in any organ. GPx, a marker of oxidative capacity, was reduced in livers of 4 s scald at 72 h ($p = 0.0185$) only (Figure S5).

Bacterial translocation and lipopolysaccharide level: At 72 h, bacterial translocation to liver and lung was only observed in 3/5 mice of the 6 s scald group. Wound contamination was found in 2/5 (4 s) and 3/5 (6 s) mice, respectively. LPS level in the liver did not change after scalding (Figure 3).





Immunofluorescence staining: Elevated expression of H3cit and MPO was observed in the wound (Figure 4, S6A), especially in the dermis and dWAT, in 4 s (H3cit: $p = 0.0024$; MPO: $p = 0.0068$) and 6 s scald (H3cit: $p = 0.0081$; MPO: $p = 0.0044$) groups, whereas upregulation of DNase1L3 was only detected in 6 s scald ($p = 0.0105$) and finally DNase1 was only significantly upregulated in the 4 s scald group ($p = 0.0337$).

Regarding the liver (Figure 4, S6B), only the 6 s scald led to a significant upregulation of H3cit ($p = 0.0120$), whereas MPO was elevated in both intervention times (4 s: $p = 0.0071$; 6 s: $p = 0.0003$). DNase1L3 was significantly altered in 6 s scald compared to sham ($P = 0.0125$) and finally DNase1 expression was reduced after 6 s scald ($p = 0.0003$).

Regarding lung tissue (Figure 4, S6C), H3cit was significantly elevated in 4 s ($p = 0.0123$) and 6 s scald ($p = 0.0038$), so was MPO (4 s: $p = 0.0035$; 6 s: $p = 0.0001$) and DNase1L3 (4 s: $p = 0.0431$; 6 s: $p = 0.0005$). The latter was mainly located next to the endothelium of the pulmonary vessels. DNase1 signal was significantly lower in 6 s scald group compared to sham ($p < 0.0001$), but not in 4 s.

Internal organ damage after 7 s of exposure: Autopsy of mice, which needed to be sacrificed prematurely due to high distress, revealed macroscopically visual injuries of kidney and liver in 2/5 mice and histologic necrotic destruction of the renal and hepatic tissue (Figure S7–8).

In-depth analysis of alterations after 7 s of exposure

Survival: Due to the high late mortality (80%) of 7 s scald mice, a second cohort with an exposure time of 7 s, however with a shorter study observation time of 24 h, was added for further analysis. All mice (8/8) survived the observation time.

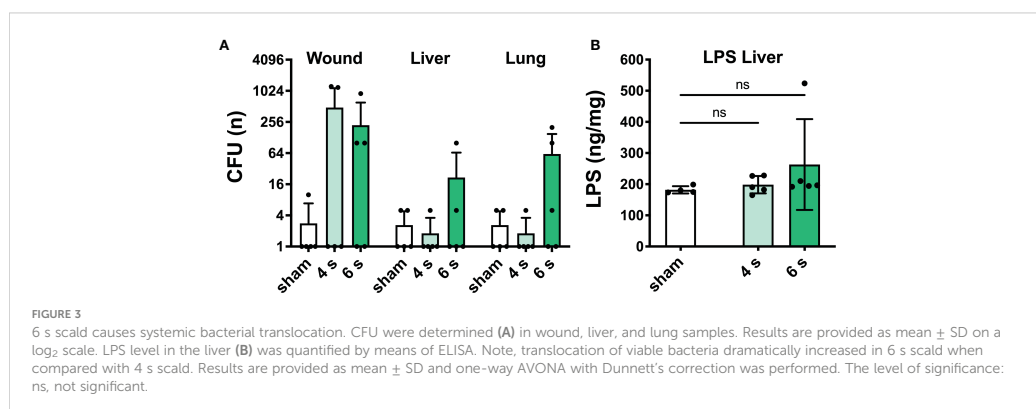
Histopathology: Again, a clear destruction and shrinking of the epidermis and dermis and leukocyte infiltration of the dermis and dWAT was observed (Figure S9).

Apoptotic activity: cC3 was significantly upregulated compared to sham ($p = 0.0008$). Positive cells were mainly located in the subcutaneous connective tissue (Figure 5).

Dermal collagen distribution and orientation: The ratio of collagen I to collagen III changed significantly in 7 s scald group ($p = 0.0041$) and fibers lost their parallel orientation (Figure 6).

Systemic markers of neutrophil activation: Levels of cfDNA ($p = 0.0224$), DNase1 ($p < 0.0001$), NE ($p = 0.0236$), and nucleosome ($p = 0.0158$) were significantly elevated compared to sham (Figure 7).

Tissue oxidative stress: Oxidative stress was significantly elevated in the liver and lung as indicated by the increase in MDA (liver: $p < 0.0001$; lung: $p = 0.0094$) and decrease in GPx (liver: $p = 0.0009$; lung: $p = 0.0020$). GPx cannot be quantified in the spleen due to the presence of erythrocytes (Figure 8).



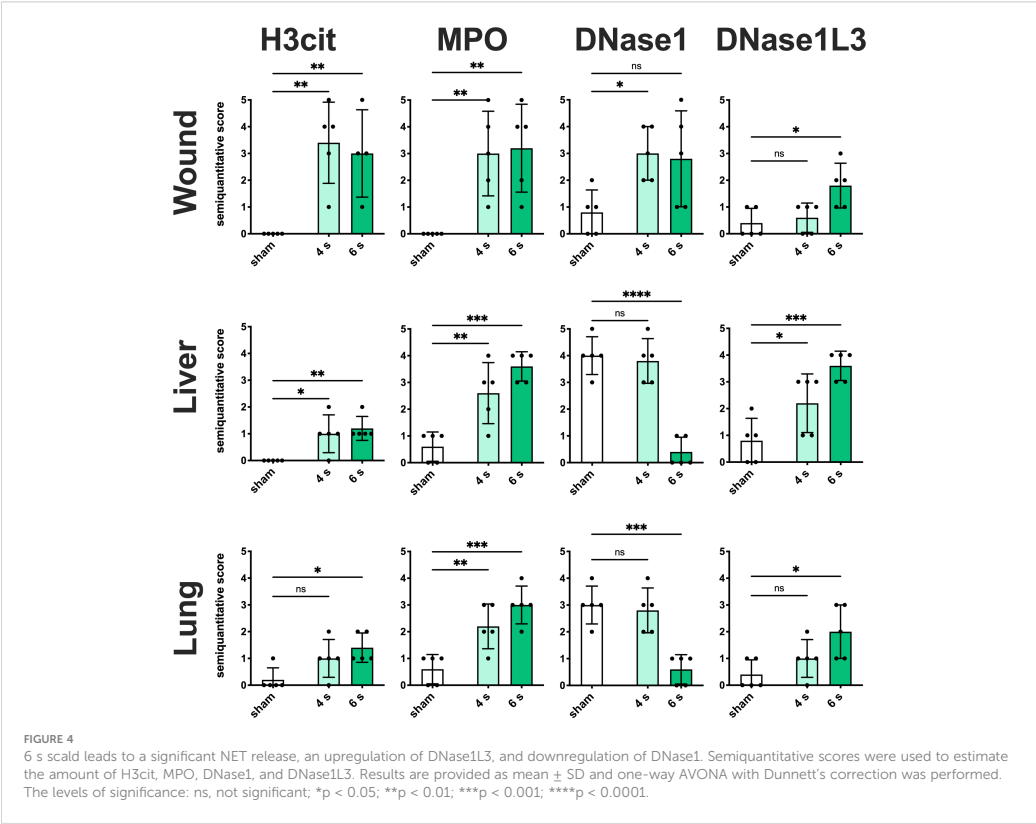


FIGURE 4
6 s scald leads to a significant NET release, an upregulation of DNase1L3, and downregulation of DNase1. Semiquantitative scores were used to estimate the amount of H3cit, MPO, DNase1, and DNase1L3. Results are provided as mean $\pm$ SD and one-way ANOVA with Dunnett's correction was performed. The levels of significance: ns, not significant; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001.

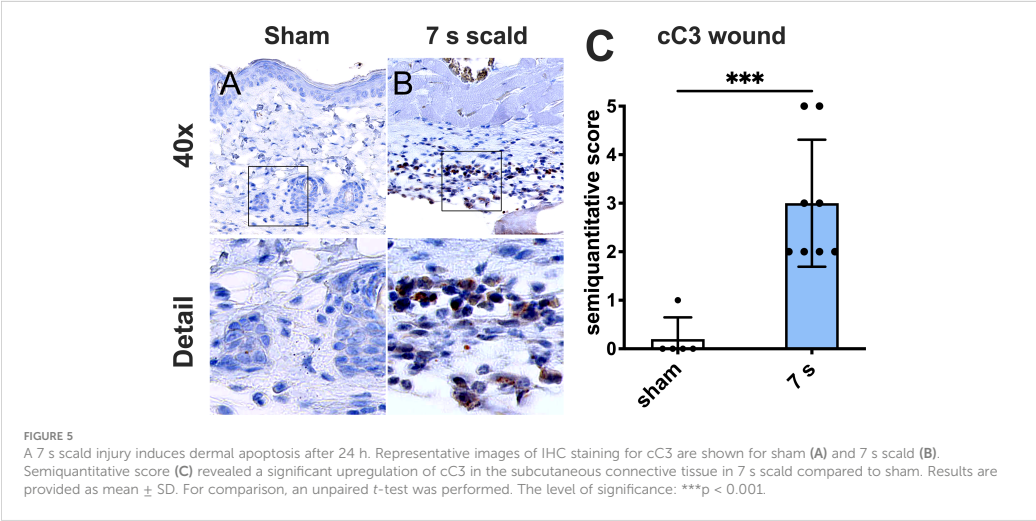


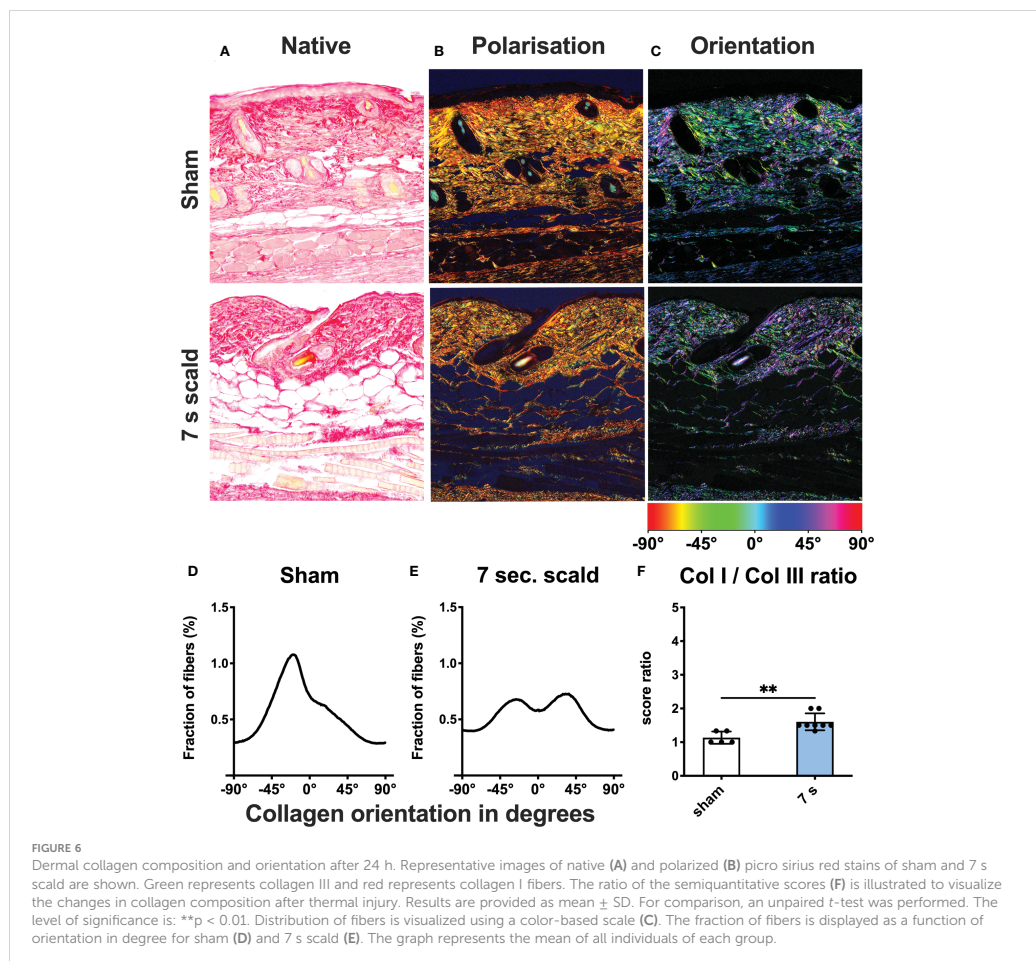
FIGURE 5
A 7 s scald injury induces dermal apoptosis after 24 h. Representative images of IHC staining for cC3 are shown for sham (A) and 7 s scald (B). Semiquantitative score (C) revealed a significant upregulation of cC3 in the subcutaneous connective tissue in 7 s scald compared to sham. Results are provided as mean $\pm$ SD. For comparison, an unpaired t -test was performed. The level of significance: *** p < 0.001.

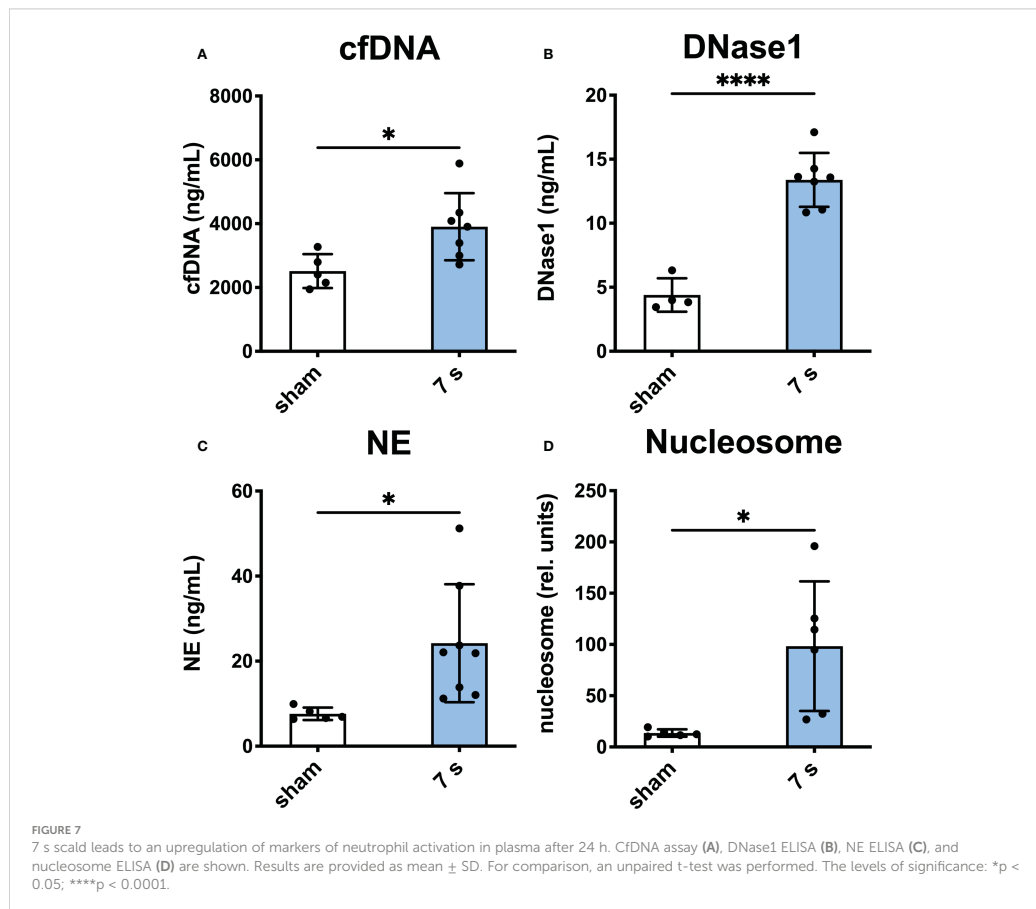
Bacterial translocation and lipopolysaccharide: Relevant translocation of bacteria was observed in the liver in 2/8 and the lung in 1/8 animals, respectively (Figure 9). *Enterococcus gallinarum*, a species of murine intestinal flora (44), was identified in two liver samples and one wound sample. All other detected species were considered as contamination. LPS was significantly elevated in the liver ($p = 0.0069$), but technically not quantifiable in other organs.

Immunofluorescence staining: H3cit ($p < 0.0001$) and MPO ($p = 0.0001$) were significantly upregulated in wounds (Figure 10). DNase1L3 was upregulated ($p = 0.0435$), mainly located in the dermis and dWAT. DNase1 was significantly elevated ($p = 0.0010$) and located mainly in the dermal immune infiltrate. In the liver and lung (Figures 11, 12), upregulation was found for H3cit (liver: $p = 0.0001$; lung: $p < 0.0001$), MPO (liver: $p = 0.0005$; lung: $p < 0.0001$), and DNase1L3 (liver: $p < 0.0001$; lung: $p < 0.0001$). In contrast, DNase1 was significantly downregulated in the liver ($p = 0.0002$) and lung ($p < 0.0001$).

Transcriptome sequencing: In liver samples, mRNA molecules coding for 8755 different proteins were investigated in the scald (7 s)

and the control group. 1382 (16%) of them were significantly up- or downregulated ($|\log_2FC| \geq 1$). In lung samples, 162/9554 detected genes (2%) were significantly up- or downregulated. Top 5 up- or downregulated genes are displayed for liver (Table S1) and lung (Table S2). The full table is attached in the Supplemental Materials (Table S3). Subsequently, an overrepresentation analysis was performed to identify GO terms (36) and molecular signature database pathways (MSigDB) (35) overrepresented in the differentially expressed genes. In liver tissue, mainly GO terms for metabolic processes, including lipid metabolic process (GO:0006629), cellular amino acid metabolic process (GO:0006520), and carbohydrate metabolic process (GO:0005975) were altered. Moreover, reduction of reactive oxygen species (ROS) and other cellular stress reactions, like peroxisome (GO:0005777), cell death (GO:0008219), and oxidoreductase activity (GO:0006629), were altered. A total of 80 MSigDB pathways were altered in liver samples, including fat, amino acid, and carbohydrate metabolism. Furthermore, other pathways, such as those involving activation of





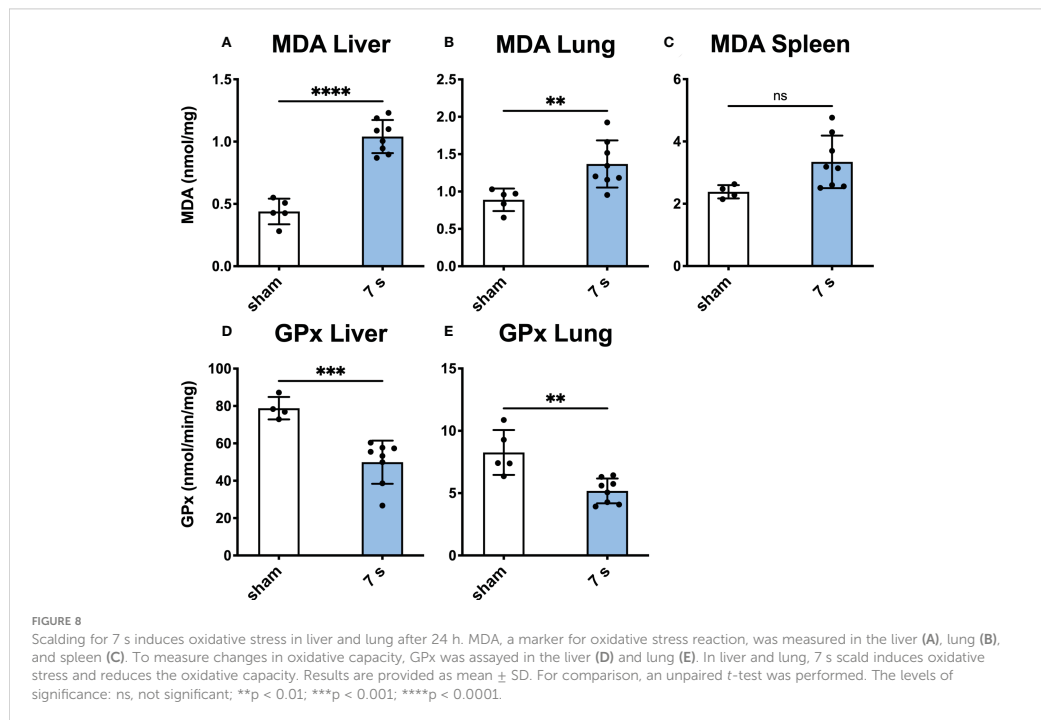
caspace (M26906), detoxification of ROS (M27244), and cell death signaling (M1983902) indicated relevant tissue damage. In the lung, morphological and tissue architectural changes were found. Furthermore, for example extracellular space (GO:0005615), cell adhesion (GO:0007155), and extracellular matrix (GO:0031012) were found to be significantly altered. For MSigDB, mainly immunity related terms were observed to be altered. For example, chemokine receptor binding (M625), chemokine signaling pathway (M39400), and interleukin-10 signaling (M27605) were upregulated. Full GO terms and MSigDB lists of lung and liver can be found in the [Supplemental Material \(Table S4-S7\)](#).

Discussion

The effects occurring within the first hours after burn injuries are complex. Wound healing includes overlapping phases. The brief hemostatic phase is followed by inflammatory, proliferative, and finally remodeling phases (45). Unfortunately, animal models are still essential to study these complex pathological conditions,

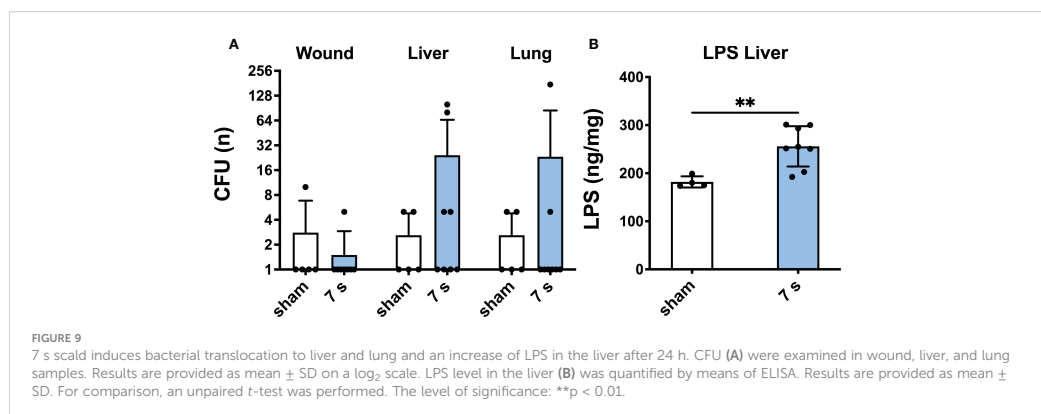
although much energy is being invested in exploring alternative methods. Animal models should be replaced, reduced, and refined whenever possible (3R principle) (46). The basis for a successful experiment is the selection of a suitable model. Large-scale scalding models are considered more reliable than contact burn models (47) and serve as a platform for the characterization of the immunological, microbiological, and pathohistological processes. Nevertheless, mice are not “little humans” and exhibit histological and immunological characteristics that differ from the human organism; this restricts the one-to-one translation of the results (16).

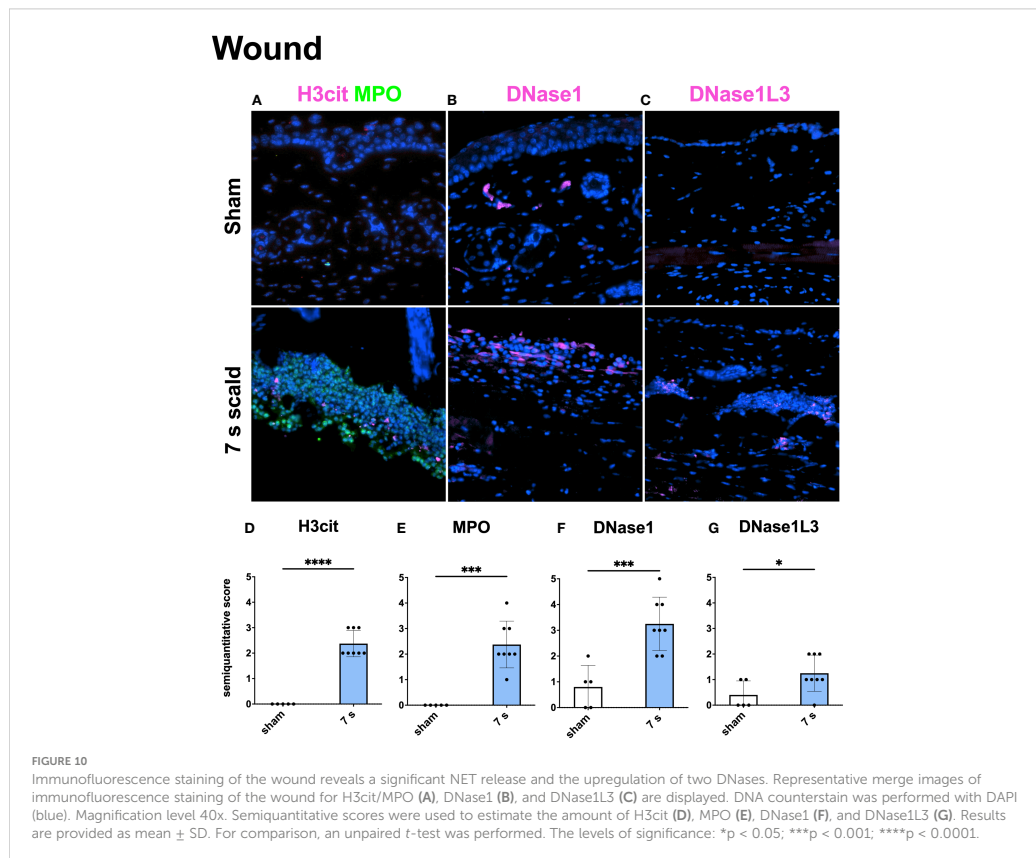
Submersion for 10 s considerably injured livers and kidneys and caused 100% mortality within 9 h. It was not used in further experiments. This contrasts with the experience of previous trials (48, 49). Possible explanations include the use of younger mice, with a thinner layer of subcutaneous fat in our experiments (around 20 g), leading to less isolation from heat. This emphasizes the need for standardization of time, age, and weight of mice in scald injury models. Exposure for 6 s induced systemic responses after 72 h, with a survival rate of 100%. This indicates a low systemic effect when investigating burn induced sepsis. Exposure for 7 s caused delayed



mortality between 24 and 72 h. Consequently, we already evaluated the 7 s scald experiments after 24 h. Scalding for 6 s and 7 s damaged the integrity of the dermal collagen fibers. This included the loss of the mainly parallel orientation. Cross-linked collagen fibers provide the structural and mechanical basis of human and murine skin (50). An irreversible denaturation of the native triple helical structure triggers a shrinkage of the dermal skin layer (51, 52). Loss of amino acid bonding randomizes the orientation of the collagen fibers (53). These denaturated collagen fibers reportedly provide the stimulus for fibroblasts that initiates the healing of burns (54). Leukocytes

infiltrated the space between dermal white adipose tissue (dWAT) and panniculus carnosus (PC). In this infiltration, enhanced cC3 levels, an early marker for apoptosis (55), are displayed. It rises within the first hours after thermal injury, especially in deeper skin layers. Apoptosis is an active process that requires functional metabolism and the maintenance of intact membranes. Only cells in deeper skin layers, which do not immediately necrotize after the thermal stimulus, are able to initiate apoptosis (56). The depth of the injury increases with the exposure-time. Thus, apoptosis after 7 s scalding occurred in deeper skin layers compared to shorter treatment times.





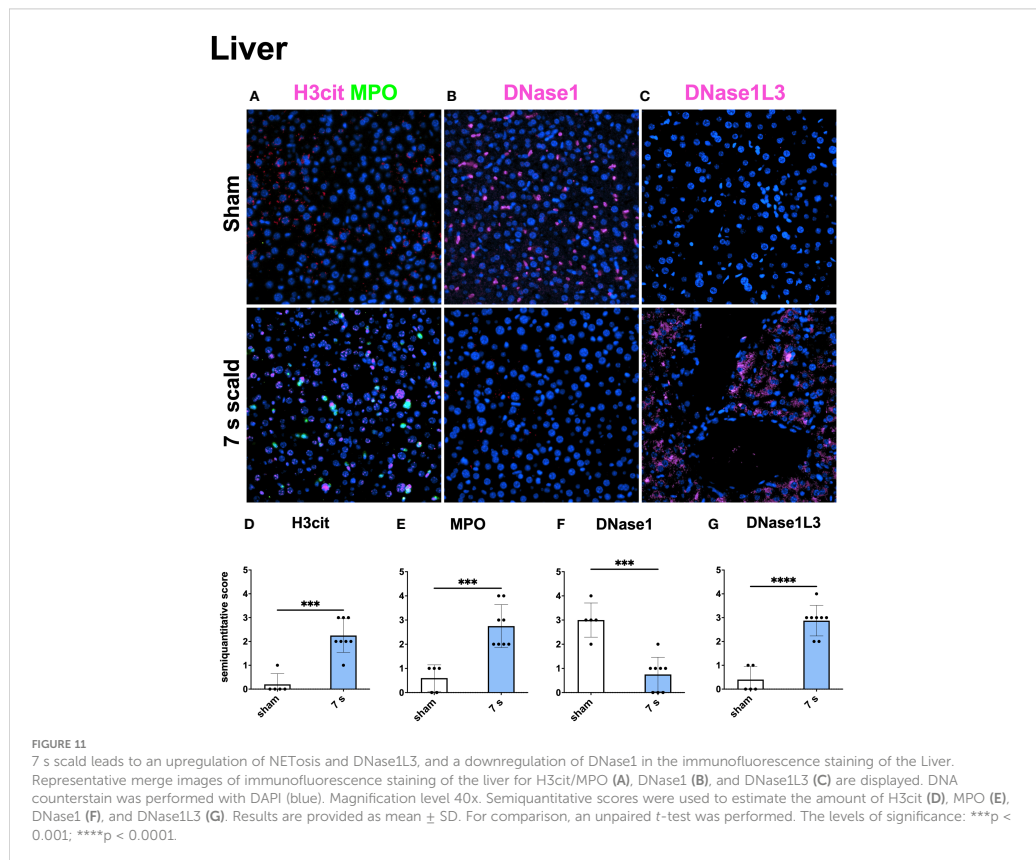
In addition to local effects, systemic reactions emerged especially 24 h after 7 s scalding. Markers of neutrophil activation and NET formation were significantly elevated in plasma (cfDNA, NE, nucleosome) and in wounds, lungs, and livers (H3cit, MPO). A previous trial using a rat burn model suggested that NET release after thermal injury correlates with the total body surface area (TBSA) (57).

The increase of cfDNA in injured patients reportedly served as an early predictor of sepsis and mortality (58–60). Even in burn patients, an early increase of cfDNA level is associated with death (61). The pro-thrombotic NETs link innate immunity to the hemostatic system (62–66). Burns release intact chromatin, which is extremely thrombogenic (57) and contributes to organ dysfunction in burn patients (60, 67). In the current study, DNase1 protein, was upregulated in the plasma of all scald groups. This may be due to the high levels of actin, which is released by injured cells and inhibits the activity of DNase1 (60, 68). Whether it circulates as an active nucleolytic enzyme or as an inactive complex with g-actin is elusive and requires further studies. The enzyme is mainly expressed in the intestinal tract and thus the systemic increase may be explained by an increased permeability of the intestinal tract after severe trauma (69, 70). In contrast, tissue bound DNase1, was significantly reduced in

lung and liver samples after thermal injury. From the current experiments it is unclear, whether the tissue bound DNase1 is synthesized locally or implanted from circulation. Yet, NET-induced vascular occlusion and consecutive organ dysfunction favors the hypothesis of locally impaired synthesis. DNase1L3 is a second enzyme able to degrade NETs and other kinds of extracellular chromatin (66). We detected this enzyme in wound, liver, and lung samples after thermal injury. This nuclease is secreted by macrophages into inflamed tissue and balances the immune responses of neutrophils (71).

Why does scalding of the skin lead to damage to the liver and lungs? NETs have been identified as a cause of tissue damage in murine sepsis (72). In our large area scald model, neutrophils may play a similar role as reported for other forms of sepsis. 24 h after a 7 s scald, neutrophil activation, NETs (via H3cit/MPO) and oxidative stress (via MDA) were high in lung and liver. This may be the result of an increased neutrophil sequestration after thermal injury. In our model, activated neutrophils may cause oxidative stress which subsequently induces tissue damage, reduces organ function, and eventually multiple organ failure (73).

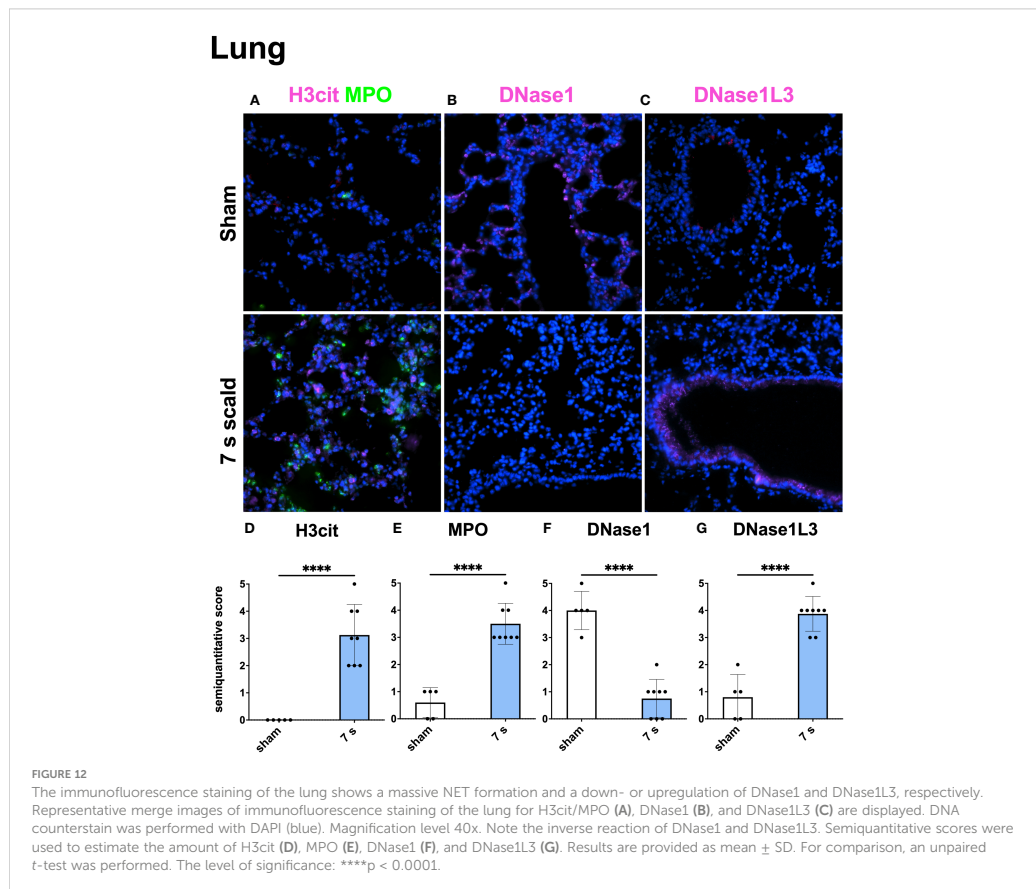
The transcriptome of lung tissue confirms this explanation, as gene expressions involved in cell cohesion, extracellular matrix organization,



and immune response are altered. Beside upregulation of several acute phase proteins, we observed a remarkable upregulation of metallothionein in the liver. These proteins are crucial for the anti-inflammatory response and the prevention of organ damage after thermal injury in mice (74). In addition, hepatic gene expression changes are compatible with the known hypermetabolic state after thermal injury (75). The early phase is characterized through an impaired energy metabolism, including increased gluconeogenesis and protein turnover which results in a hyperglycemia (76). Similar changes regarding inflammation and metabolism were observed in humans as well (3). However, results concerning the regulation of individual genes cannot be transferred to humans one-to-one: As shown previously, inflammation and host responses to injuries tend to differ significantly between humans and mice (77). This accounts also for genomic responses after burns. As shown by Seok et al., gene changes of murine burns correlate poorly with gene changes in human burns (Pearson correlation $R^2 = 0.08$). Interestingly, genomic responses to burns, mechanical trauma, and endotoxemia correlate much more strongly in humans ($R^2 = 0.47-0.91$) than in mice ($R^2 = 0.00-0.13$) (78). To draw conclusions from mouse findings in case of burns, one must bear in mind that the changes of gene expression over time differs significantly: while the alterations of gene expression in both humans

and mice occurs within the first few hours, the recovery time was dramatically longer and lasted up to several months in humans (78). Since NETs are the main targets in this study, we stimulated neutrophil bone marrow release with G-CSF to minimize the differences in the peripheral blood neutrophil counts of murine and human blood; the former has a strong preponderance of lymphocytes (75-90% lymphocytes, 10-25% neutrophils), whereas the latter is rich in neutrophils (50-70% neutrophils, 30-50% lymphocytes). As reported by Mestas et al., there are many other differences in the innate and adaptive immune systems of humans and mice. This applies to the toll receptors, some NK-inhibitory receptor families, components of the T-cell signaling pathway or chemokine (receptor) expression, just to mention a few (27). For these reasons, it is important to keep in mind that immune responses to murine burns might not be similar in humans. Despite the limitation regarding the transferability of results obtained in murine models, the importance of these models in relation to metabolic or immune responses and to various types of traumata, including burns, cannot be denied.

Of note, in this study, no wound dressings were used since the ethics committee did not approve the use of tie-over-dressing. An overview of the literature shows that many murine scald models are conducted without wound dressing, even those analyzing late phases



of wound healing (10, 14, 48, 79, 80). Nonetheless, one should keep in mind, that the omission of wound dressings can potentially affect the validity of the presented models in terms of analysis of later healing phases, including scar formation, which might be influenced by wound dressing. As shown in a histological study, the use of a wound dressing can positively influence wound healing parameters such as wound closure time and inflammatory response, possibly by influencing the wounds micromilieu (81).

Patients with large-scale burn injuries often develop bacterial translocation and consecutive systemic infections (82). The acute shift of the blood flow to essential organs after thermal injury causes ischemia in the gastrointestinal tract. This results in an increased permeability of the intestinal mucosa and a transfer of intestinal pathogens into the bloodstream (83). These settle in large organs like lung, liver, brain and in lymph nodes (84). In our experiment, we only observed a moderate bacterial translocation to lung and liver after 6 and 7 s scald in a few mice. Possibly, the 24 h observation time was too short for the detection of reliable bacterial translocation in 7 s scald. Nevertheless, the observed rise of LPS levels in the liver may indicate an incipient bacterial translocation. This assumption is supported by the data of the single survivor of the 7 s 72 h group (not shown). Here,

an increased bacterial load (CFU n = 10280) was observed which might explain the high mortality rate in this group. Besides the possibility of endogenous bacterial translocation from the intestine, potential exogenous wound contamination should also be considered, inter alia by lack of a wound dressing. However, in a comparable murine scald model, systemic spread of local wound contamination tended to begin at the earliest after three days (85). In patients with severe thermal injuries, sepsis often occurs after a few days or weeks, despite intensive medical treatment at a high standard (86).

In addition to oxidative stress and bacterial translocation, insufficient blood flow in the capillary bed due to non-canonical micro-thromboembolism and vascular occlusion may serve as a further mechanism that precipitates distant pathologies including multi organ failure in burns. Indeed, in fatal COVID-19-related sepsis vascular occlusions can be detected in most autopsy samples from lung, liver, and kidney (87). Interestingly, enormous difference between mice exposed to hot water for 6 and 7 s regarding mortality rates was observed in this study, which might be explainable by a related mechanism: After surface scalding, organ failure occurs despite the organs not being exposed to high temperatures. This organ damage does not occur immediately.

Having this in mind, we argue that the tissue-toxic effect somehow spreads from the skin to the internal organs, most likely *via* a hematogenous route. Candidate culprits are intravascular NETs that have been reported to be able to occlude vessels with various diameters and consequently cause failure of distant organs (87, 88). Perhaps, initiating a sufficient amount of NETs capable of initiating multiple organ damage and death depends on a significant volume of injured subdermal tissue.

This study has several limitations, for instance the limited number of organs included for analysis, the limited number of experimental settings such as water temperature and exposure time, and the limited number of timepoints of evaluation. The relatively small sample sizes were necessary to comply with the specifications for stressful animal experiments. Furthermore, regarding for example transcriptome analysis, it was unfortunately not possible to add animals with other types of traumata for legal reasons; this limits the possibility to understand the specificity of the alterations found in this trial. Further studies based on the results described above are needed to provide mechanistic findings. Moreover, the lack of measurement of blood values which are typically altered in sepsis, such as blood count, coagulation, or liver enzymes, restrict the informative value. The omission of wound dressings could affect the validity of the presented model in terms of analysis of later healing phases, including scar formation, and might favor wound contamination and development of sepsis.

In conclusion, the current study characterized two murine scald models. For trials focusing on the very early phase of burn-induced sepsis and the later stages of burn pathophysiology exposure times of 7 s and 6 s scald are advisable, respectively. The characterization of these two models, which induce a reliable, standardized thermal injury, shows an involvement of neutrophil activity, oxidative stress, bacterial translocation, and vascular occlusions. The models are suitable to standardize thermal injury in mice and enable further investigations. The extensive transcriptome analysis conducted in this study, constitutes the basis for further in-depth analysis of the mechanisms of specific pathways involved in the early phase of burn induced pathologies.

Data availability statement

The data of the transcriptome analysis presented in the study are deposited in the European Nucleotide Archive repository, accession number PRJEB57842. You can access them directly via this link: <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB57842>.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Authority for Justice and Consumer Protection Hamburg.

Author contributions

JE: designed study, acquisition, analyzed data, and interpreted the data, drafted the manuscript, and approved the final revision. ML: designed study, acquisition, analyzed data, and interpreted the data, drafted the manuscript, and approved the final revision. AK: acquisition,

analyzed and interpreted the data, and approved the final revision. LA: acquisition, analyzed and interpreted the data, and approved the final revision. LS: analyzed data, and approved the final revision. KR: analyzed data, and approved the final revision. LPR: analyzed data, and approved the final revision. CM: analyzed data, interpreted the data, and approved the final revision. CS: analyzed data, and approved the final revision. MA: analyzed data, and approved the final revision. HR: analyzed data, interpreted the data, and approved the final revision. MH: analyzed and interpreted the data, drafted the manuscript, and approved the final revision. MB: designed study, analyzed and interpreted the data, drafted the manuscript, and approved the final revision. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This study was supported by the Georg & Jürgen Rickertsen Stiftung and by the Werner Otto Stiftung.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Christian Gorzelanny, Department of Dermatology and Venereology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, for providing the immunofluorescence microscope and Kristin Hartmann, Mouse Pathology Core Facility, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, for the processing and staining of the histological samples. Furthermore, the authors appreciate the expertise in the field of conventional and immunofluorescence staining protocols of Birgit Appl, Department of Pediatric Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf. Furthermore, we thank both the Georg & Jürgen Rickertsen Stiftung and the Werner Otto Stiftung for their generous financial support for conducting this study.

Conflict of interest

MB serves as a medical advisor of Neutrolis, Cambridge, MA, USA that focuses on developing therapies against NETs. MB is a stakeholder of Neutrolis. No compounds from Neutrolis were used in this study.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1113948/full#supplementary-material>

References

- James SL, Lucchesi LR, Bisignano C, Castle CD, Dingels ZV, Fox JT, et al. Epidemiology of injuries from fire, heat and hot substances: Global, regional and national morbidity and mortality estimates from the global burden of disease 2017 study. *Injury Prev* (2020) 26:i36–45. doi: 10.1136/INJURYPREV-2019-043299
- Greenhalgh DG. Management of burns. *N Engl J Med* (2019) 380:2349–59. doi: 10.1056/NEJMRA1807442
- Jeschke MG, van Baar ME, Choudhry MA, Chung KK, Gibran NS, Logsetty S. Burn injury. *Nat Rev Dis Primers* (2020) 6:1–25. doi: 10.1038/s41572-020-0145-5
- Smolle C, Cambiaso-Daniel J, Forbes AA, Wurzer P, Hundeshagen G, Branski LK, et al. Recent trends in burn epidemiology worldwide: A systematic review. *Burns* (2017) 43:249–57. doi: 10.1016/j.burns.2016.08.013
- Jeschke MG, Gauglitz GG, Kulp GA, Finnerty CC, Williams FN, Kraft R, et al. Long-term persistence of the pathophysiological response to severe burn injury. *PLoS One* (2011) 6:e21245. doi: 10.1371/journal.pone.0021245
- Gauglitz GG, Song J, Herndon DN, Finnerty CC, Boehning D, Barral JM, et al. Characterization of the inflammatory response during acute and post-acute phases after severe burn. *Shock* (2008) 30:503–7. doi: 10.1097/SHK.0b013e31816e3373
- Stanojic M, Abdullahi A, Rehous S, Parousis A, Jeschke MG. Pathophysiological response to burn injury in adults. *Ann Surg* (2018) 267:576–84. doi: 10.1097/SLA.0000000000002097
- O'Sullivan ST, O'Connor TPF. Immunosuppression following thermal injury: The pathogenesis of immunodysfunction. *Br J Plast Surg* (1997) 50:615–23. doi: 10.1016/S0007-1226(97)90507-5
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Sci* (1979) (2004) 303:1532–5. doi: 10.1126/science.1092385
- Heuer A, Stiel C, Elrod J, Königs I, Vincent D, Schlegel P, et al. Therapeutic targeting of neutrophil extracellular traps improves primary and secondary intention wound healing in mice. *Front Immunol* (2021) 12:614347. doi: 10.3389/FIMMUN.2021.614347
- Hua C, Lyu L, Ryu HS, Park SY, Lim NK, Abueva C, et al. Design and evaluation of a scalding animal model by the boiling water method. *Med Lasers, Engineer Basic Research Clin Appl* (2020) 9:51–7. doi: 10.25289/ML.2020.9.1.51
- Hernandez A, Patil NK, Bohannon JKA. Murine model of full-thickness scald burn injury with subsequent wound and systemic bacterial infection. *Methods Mol Biol* (2021) 2321:111–20. doi: 10.1007/978-1-0716-1488-4_10
- Beffa DC, Fischman AJ, Fagan SP, Hamrahi VF, Paul KW, Kaneki M, et al. Simvastatin treatment improves survival in a murine model of burn sepsis: Role of interleukin 6. *Burns* (2011) 37:222–6. doi: 10.1016/j.burns.2010.10.010
- Bohannon JK, Cui W, Toliver-Kinsky T. Endogenous fms-like tyrosine kinase-3 ligand levels are not altered in mice after a severe burn and infection. *BMC Immunol* (2009) 10:47. doi: 10.1186/1471-2172-10-47/FIGURES/4
- Song J, Finnerty CC, Herndon DN, Boehning D, Jeschke MG. Severe burn-induced endoplasmic reticulum stress and hepatic damage in mice. *Mol Med* (2009) 15:316–20. doi: 10.2119/MOLMED.2009.00048
- Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci* (2014) 71:3241–55. doi: 10.1007/S00018-014-1612-5
- Younan G, Suber F, Xing W, Shi T, Kunori Y, Åbrink M, et al. The inflammatory response after an epidermal burn depends on the activities of mouse mast cell proteases 4 and 5. *J Immunol* (2010) 185:7681–90. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1002803
- Huang Cc, Yan Sh, Chen D, Chen Bc, Zhao Nw. Application of on-line NanoLC-IT-TOF in the identification of serum β -catenin complex in mice scald model. *PLoS One* (2012) 7:e46530. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0046530
- Song J, Wolf SE, Herndon DN, Wu XW, Jeschke MG. Second hit post burn increased proximal gut mucosa epithelial cells damage. *Shock* (2008) 30:184–8. doi: 10.1097/SHK.0B013E318162A3F6
- Adams DH, Ruzehaji N, Strudwick XL, Greenwood JE, Campbell HD, Arkell R, et al. Attenuation of flightless I, an actin-remodelling protein, improves burn injury repair via modulation of transforming growth factor (TGF)- β 1 and TGF- β 3. *Br J Dermatol* (2009) 161:326–36. doi: 10.1111/J.1365-2133.2009.09296.X
- Muthu K, He LK, Szilagyi A, Stevenson J, Gamelli RL, Shankar R. Propranolol restores the tumor necrosis factor- α response of circulating inflammatory monocytes and granulocytes after burn injury and sepsis. *J Burn Care Res* (2009) 30:8–18. doi: 10.1097/BCR.0B013E3181921F22
- Plackett TP, Gamelli RL, Kovacs EJ. Gender-based differences in cytokine production after burn injury: A role of interleukin-6. *J Am Coll Surg* (2010) 210:73–8. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2009.09.019
- Liu QY, Yao YM, Zhang SW, Yan YH, Wu X. Naturally existing CD11c(Low) CD45RB(High) dendritic cells protect mice from acute severe inflammatory response induced by thermal injury. *Immunobiology* (2011) 216:47–53. doi: 10.1016/J.IMBIO.2010.03.005
- Howell K, Posluszny J, He LK, Szilagyi A, Halzer J, Gamelli RL, et al. High Maf β expression following burn augments monocyte commitment and inhibits DC differentiation in hemopoietic progenitors. *J Leukoc Biol* (2012) 91:69–81. doi: 10.1189/JLB.0711338
- Posluszny JA, Muthumalaiappan K, Kini AR, Szilagyi A, He LK, Li Y, et al. Burn injury dampens erythroid cell production through reprioritizing bone marrow hematopoietic response. *J Trauma* (2011) 71:1288–96. doi: 10.1097/TA.0B013E31822E2803
- Tamura M, Hattori K, Nomura H, Oheda M, Kubota N, Imazeki I, et al. Induction of neutrophilic granulocytosis in mice by administration of purified human native granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Biochem Biophys Res Commun* (1987) 142:454–60. doi: 10.1016/0006-291X(87)90296-8
- Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *J Immunol* (2004) 172:2731–8. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731
- Klinke M, Vincent D, Trochimiuk M, Appl B, Tiemann B, Reinshagen K, et al. Development of an improved murine model of necrotizing enterocolitis shows the importance of neutrophils in NEC pathogenesis. *Sci Rep* (2020) 10:8049. doi: 10.1038/S41598-020-65120-Y
- Cheung MC, Spalding PB, Gutierrez JC, Balkan W, Namias N, Koniaris LG, et al. Body surface area prediction in normal, hypermuscular, and obese mice. *J Surg Res* (2009) 153:326–31. doi: 10.1016/j.jss.2008.05.002
- Wang Y, Wang C, Cai X, Mou C, Cui X, Zhang Y, et al. IL-21 stimulates the expression and activation of cell cycle regulators and promotes cell proliferation in EBV-positive diffuse large B cell lymphoma. *Sci Rep* (2020) 10:12326. doi: 10.1038/S41598-020-69227-0
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. Fastp: An ultra-fast all-in-One FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* (2018) 34(17):i884–90. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* (2013) 29:15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* (2014) 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* (2012) 16:284–7. doi: 10.1089/omi.2011.0118
- Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The molecular signatures database hallmark gene set collection. *Cell Syst* (2015) 1:417–25. doi: 10.1016/j.cels.2015.12.004
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nat Genet* (2000) 25:25–9. doi: 10.1038/75556
- Safraan M, Rosen N, Twik M, BarShir R, Stein TI, Dahary D, et al. The GeneCards suite. *Pract Guide to Life Sci Database* Singapore: Springer Singapore (2021), 27–56. doi: 10.1007/978-981-16-5812-9_2
- Boettcher M, Fuchs TA, Schäfer H, Appl B, Trochimiuk M, Jiménez-Alcázar M, et al. Modulation of thrombosis significantly reduces testicular damage after testicular torsion in rats: Anti-thrombotic treatment and testicular torsion. *Urology* (2016) 88:227.e1–7. doi: 10.1016/j.UROLOGY.2015.11.004
- Lenz M, Maiberg T, Armbrust L, Kiviit W, von der Wense A, Reinshagen K, et al. CDNA and DNases: New biomarkers of sepsis in preterm neonates - a pilot study. *Cells* (2022) 11:192. doi: 10.3390/CELLS11020192
- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* (2010) 191:677–91. doi: 10.1083/JCB.201006052
- Fuchs T, Kremer Hovinga J, Schatzberg D, Wagner D, Lämmle B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood* (2012) 120:1157–64. doi: 10.1182/BLOOD-2012-02-412197
- Morrill EE, Tuleberg AN, Stender CJ, Lamichhane R, Brown RJ, Lujan TJA. Validated software application to measure fiber organization in soft tissue. *Biomech Model Mechanobiol* (2016) 15:1467–78. doi: 10.1007/s10237-016-0776-3
- Erdfelder E, Faul F, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods* (2009) 41:1149–60. doi: 10.3758/BRM.41.4.1149
- Nishio J, Negishi H, Yasui-Kato M, Miki S, Miyazawa K, Aoki K, et al. Identification and characterization of a novel enterococcus bacteriophage with potential to ameliorate murine colitis. *Sci Rep* (2021) 11:20231. doi: 10.1038/s41598-021-99602-4
- Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med Assoc* (2018) 81:94–101. doi: 10.1016/j.jcma.2017.11.002
- Lewis DL. Animal experimentation: Implementation and application of the 3Rs. *Emerg Top Life Sci* (2019) 3:675–9. doi: 10.1042/ETLS20190061
- Shukla SK, Sharma AK, Shaw P, Kalonia A, Yashavardhan MH, Singh S. Creation of rapid and reproducible burn in animal model with a newly developed burn device. *Burns* (2020) 46:1142–9. doi: 10.1016/j.burns.2019.12.005
- Toliver-Kinsky TE, Cui W, Murphey ED, Lin C, Sherwood ER. Enhancement of dendritic cell production by fms-like tyrosine kinase-3 ligand increases the resistance of mice to a burn wound infection. *J Immunol* (2005) 174:404–10. doi: 10.4049/JIMMUNOL.174.1.404
- Finnerty CC, Przkora R, Herndon DN, Jeschke MG. Cytokine expression profile over time in burned mice. *Cytokine* (2009) 45:20. doi: 10.1016/j.CYTO.2008.10.005

50. Verhaegen PDHM, van Zuijlen PPM, Pennings NM, van Marle J, Niessen FB, van der Horst CMAM, et al. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. *Wound Repair Regen* (2009) 17:649–56. doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00533.X
51. Ye H, Rahul, Kruger U, Wang T, Shi S, Norfleet J, et al. Burn-related collagen conformational changes in ex vivo porcine skin using raman spectroscopy. *Sci Rep* (2019) 9:19138. doi: 10.1038/s41598-019-55012-1
52. Wright NT, Humphrey JD. Denaturation of collagen via heating: An irreversible rate process. *Annu Rev BioMed Eng* (2002) 4:109–28. doi: 10.1146/ANNUREV.BIOENG.4.101001.131546
53. Theodossiou T, Rapti GS, Hovhannisyan V, Georgiou E, Politopoulos K, Yova D. Thermally induced irreversible conformational changes in collagen probed by optical second harmonic generation and laser-induced fluorescence. *Lasers Med Sci* (2002) 17:34–41. doi: 10.1007/S10103-002-8264-7
54. Zhou J, Zhang X, Liang P, Ren L, Zeng J, Zhang M, et al. Protective role of MicroRNA-29a in denatured dermis and skin fibroblast cells after thermal injury. *Biol Open* (2016) 5:211–9. doi: 10.1242/BIO.014910
55. Luo HM, Hu S, Bai HY, Wang HB, Du MH, Lin ZL, et al. Valproic acid treatment attenuates caspase-3 activation and improves survival after lethal burn injury in a rodent model. *J Burn Care Res* (2014) 35:e93–8. doi: 10.1097/BCR.0B013E31828A8D32
56. McNamara AR, Zamba KD, Sokolich JC, Jaskille AD, Light TD, Griffin MA, et al. Apoptosis is differentially regulated by burn severity and dermal location. *J Surg Res* (2010) 162:258–63. doi: 10.1016/j.jss.2009.01.038
57. Otawara M, Roushan M, Wang X, Ellett F, Yu YM, Irimia D. Microfluidic assay measures increased neutrophil extracellular traps circulating in blood after burn injuries. *Sci Rep* (2018) 8:16983. doi: 10.1038/s41598-018-34952-0
58. Jackson Chornenki NL, Coke R, Kwong AC, Dwivedi DJ, Xu MK, McDonald E, et al. Comparison of the source and prognostic utility of CfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Med Exp* (2019) 7:29. doi: 10.1186/S40635-019-0251-4
59. Nguyen DN, Stensballe A, Lai JCY, Jiang P, Brunse A, Li Y, et al. Elevated levels of circulating cell-free DNA and neutrophil proteins are associated with neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis in immature mice, pigs and infants. *Innate Immun* (2017) 23:524–36. doi: 10.1177/1753425917719995
60. Dinsdale RJ, Hazeldine J, al Tarrah K, Hampson P, Devi A, Ermogenous C, et al. Dysregulation of the actin scavenging system and inhibition of DNase activity following severe thermal injury. *Br J Surg* (2020) 107:391–401. doi: 10.1002/BJS.11310
61. Altrichter J, Zedler S, Kraft R, Faist E, Mitzner SR, Sauer M, et al. Neutrophil-derived circulating free DNA (Cf-DNA/NETs), a potential prognostic marker for mortality in patients with severe burn injury. *Eur J Trauma Emergency Surg* (2010) 36:551–7. doi: 10.1007/S00068-010-0013-1
62. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, de Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* (2012) 10:136–44. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04544.X
63. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci* (2010) 107:15880–5. doi: 10.1073/pnas.1005743107
64. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* (2007) 13:463–9. doi: 10.1038/NM1565
65. Zhou Y, Xu Z, Liu Z. Impact of neutrophil extracellular traps on thrombosis formation: New findings and future perspective. *Front Cell Infect Microbiol* (2022) 12:910908. doi: 10.3389/fcimb.2022.910908
66. Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science* (2017) 358:1202–6. doi: 10.1126/SCIENCE.AAM8897
67. Boneschansker L, Inoue Y, Oklu R, Irimia D. Capillary plexuses are vulnerable to neutrophil extracellular traps. *Integr Biol (Camb)* (2016) 8:149–55. doi: 10.1039/C5IB00265F
68. Jiménez-Alcázar M, Kim N, Fuchs TA. Circulating extracellular DNA: Cause or consequence of thrombosis? *Semin Thromb Hemost* (2017) 43:553–61. doi: 10.1055/S-0036-1597284
69. Faries PL, Simon RJ, Martella AT, Lee MJ, Machiedo GW. Intestinal permeability correlates with severity of injury in trauma patients. *J Trauma* (1998) 44:1031–6. doi: 10.1097/00005373-199806000-00016
70. Shimada O, Ishikawa H, Tosaka-Shimada H, Yasuda T, Kishi K, Suzuki S. Detection of deoxyribonuclease I along the secretory pathway in paneth cells of human small intestine. *J Histochem Cytochem* (1998) 46:833–40. doi: 10.1177/002215549804600706
71. Napirei M, Ludwig S, Mezhrab J, Klöckl T, Mannherz HG. Murine serum nucleases—contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNaseI and DNaseI-like 3 (DNaseII3). *FEBS J* (2009) 276:1059–73. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06849.X
72. McDonald B, Davis RP, Kim SJ, Tse M, Esmion CT, Kolaczowska E, et al. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood* (2017) 129:1357–67. doi: 10.1182/BLOOD-2016-09-741298
73. Hansbrough JF, Wikström T, Braide M, Tenenhaus M, Rennekampff OH, Kiessig V, et al. Neutrophil activation and tissue neutrophil sequestration in a rat model of thermal injury. *J Surg Res* (1996) 61:17–22. doi: 10.1006/JSR.1996.0074
74. Zhang W, Xie Y, Liu W, Xu X, Chen X, Liu H, et al. Role of metallothionein in post-burn inflammation. *Inflammation* (2016) 39:768–74. doi: 10.1007/s10753-016-0305-7
75. Yu YM, Tompkins RG, Ryan CM, Young VR. The metabolic basis of the increase of the increase in energy expenditure in severely burned patients. *J Parenter Enteral Nutr* (1999) 23:160–8. doi: 10.1177/0148607199023003160
76. Williams FN, Herndon DN, Jeschke MG. The hypermetabolic response to burn injury and interventions to modify this response. *Clin Plast Surg* (2009) 36:583–96. doi: 10.1016/j.cps.2009.05.001
77. Tompkins RG. Genomics of injury: The glue grant experience. *J Trauma Acute Care Surg* (2015) 78:671–86. doi: 10.1097/TA.0000000000000568
78. Seok J, Warren HS, Alex GC, Michael NM, Henry VB, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2013) 110:3507–12. doi: 10.1073/PNAS.1222878110/-DCSUPPLEMENTAL/SAPP.PDF
79. Porter C, Herndon DN, Bhattarai N, Ogunbileje JO, Szczesny B, Szabo C, et al. Differential acute and chronic effects of burn trauma on murine skeletal muscle bioenergetics. *Burns* (2016) 42:112–22. doi: 10.1016/j.burns.2015.10.026
80. Bohannon FJ, Nunez Lopez O, Herndon DN, Wang X, Bhattarai N, Ayadi AE, et al. Burn trauma acutely increases the respiratory capacity and function of liver mitochondria. *Shock* (2018) 49:466–73. doi: 10.1097/SHK.0000000000000935
81. Zhang X, Xu R, Hu X, Luo G, Wu J, He WA. Systematic and quantitative method for wound-dressing evaluation. *Burns Trauma* (2015) 3:s41038-015-0013-9. doi: 10.1186/S41038-015-0013-9
82. Epstein MD, Banducci DR, Manders EK. The role of the gastrointestinal tract in the development of burn sepsis. *Plast Reconstr Surg* (1992) 90:524–31. doi: 10.1097/00006534-199209000-00032
83. Liu X, Chen Y, You B, Peng Y, Chen Y, Yang Z, et al. Molecular mechanism mediating enteric bacterial translocation after severe burn: The role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Burns Trauma* (2021) 9:tkaa042. doi: 10.1093/BURNST/TKAA042
84. Maejima K, Deitch EA, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. *Infect Immun* (1984) 43:6. doi: 10.1128/IAI.43.1.6-10.1984
85. Bohannon J, Cui W, Sherwood E, Toliver-Kinsky T. Dendritic cell modification of neutrophil responses to infection after burn injury. *J Immunol* 185:2847–53. doi: 10.4049/jimmunol.0903619
86. Fitzwater J, Purdue GF, Hunt JL, O'keefe GE. The risk factors and time course of sepsis and organ dysfunction after burn trauma. *J Trauma* (2003) 52:959–66. doi: 10.1097/01.TA.0000029382.26295.AB
87. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine* (2020) 58:102925. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102925
88. Ackermann M, Anders HJ, Bilyy R, Bowlin GL, Daniel C, de Lorenzo R, et al. Patients with COVID-19: In the dark-NETs of neutrophils. *Cell Death Differentiation* (2021) 28(11):3125–39. doi: 10.1038/s41418-021-00805-z

Supplemental material

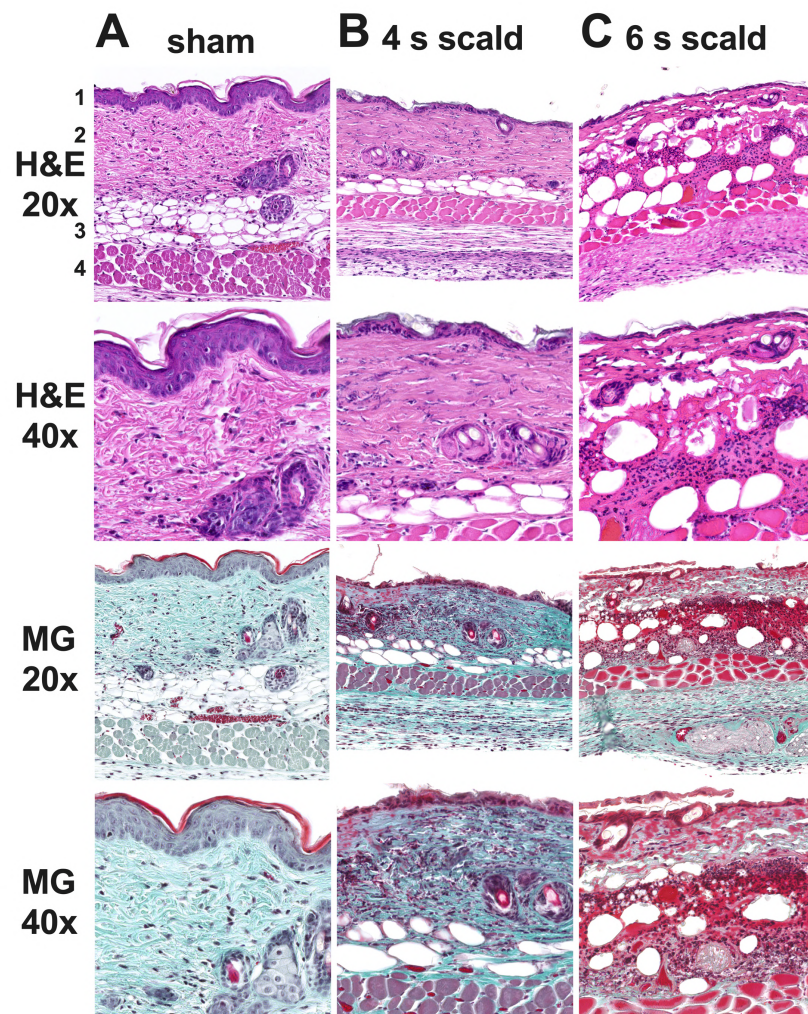


Figure S1: **Depth of the wounds 72 h after intervention.** Representative images of hematoxylin and eosin (HE) and Masson Goldner Trichrome (MG) staining of sham (A) compared to 4 s scald (B) and 6 s scald (C) are depicted. We observed a gradual destruction of the skin layers after 4 s and 6 s scald. For orientation, murine skin layers are indicated exemplary (1: Epidermis, 2: dermis, 3: dermal white adipose tissue (dWAT), 4: panniculus carnosus).

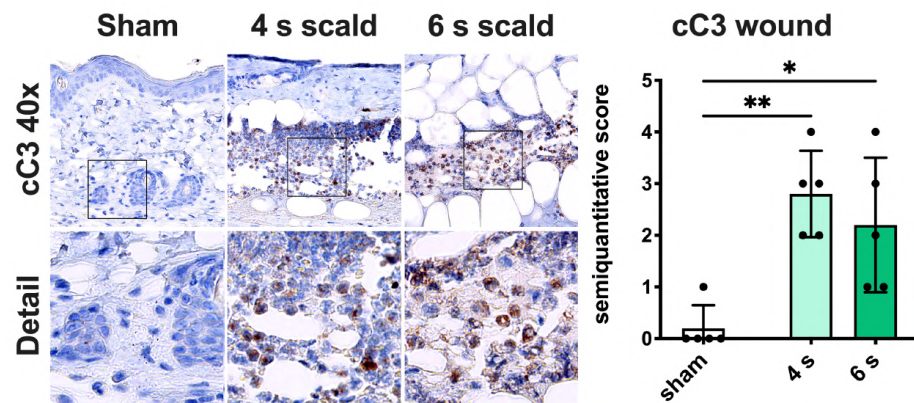


Fig. S2: **Scalding for 4 and 6 s leads to increased dermal apoptosis after 72 h.** Representative images of IHC staining for cleaved caspase 3 (cC3) are shown for sham, 4 s, and 6 s scald. Semiquantitative scoring reveals a significant increase of cC3 in the dermis and the dermal white adipose tissue (dWAT) in 4 s and 6 s scald protocols compared to sham. Results are provided as mean $\pm$ SD. For comparison, one-way ANOVA with Dunnett's correction was performed. The levels of significance: * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$.

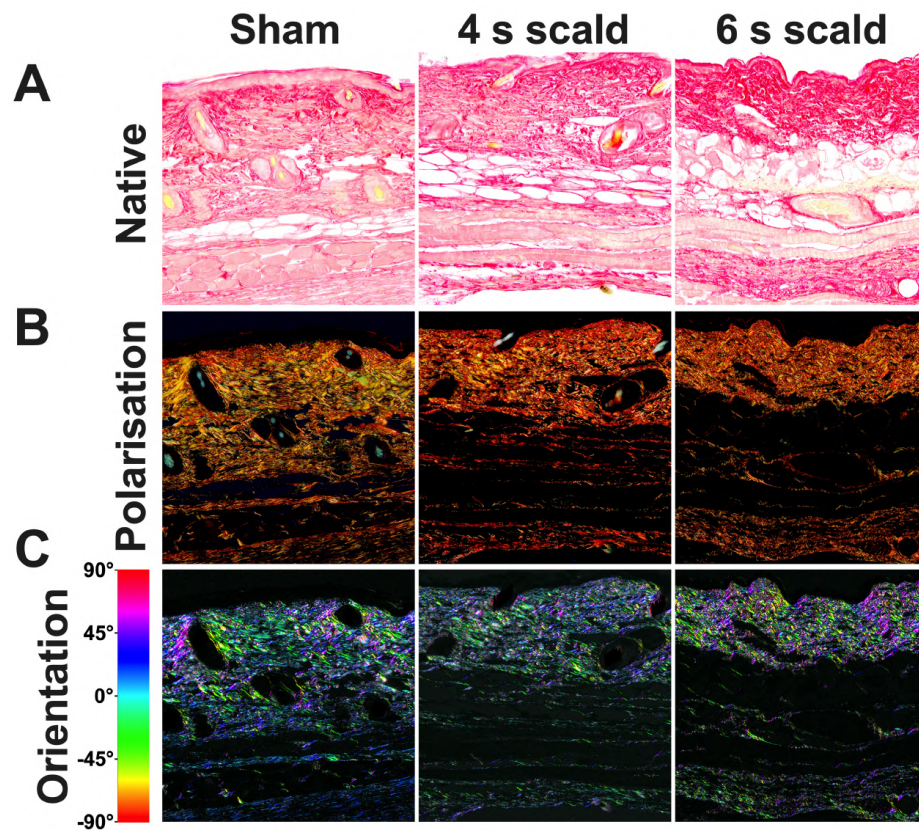


Fig. S3: **Scalding induces shrinking and reorganization of dermal collagen matrix.** Representative images of native (A) and polarized (B) picro sirius red stains of sham, 4 s and 6 s scald are shown. Green represents collagen III and red represents collagen I fibers. Orientation of fibers is visualized using a color-based scale (C). Scalding for 6 s induces a reorganization of the dermal collagen fibers, which lose their mainly parallel formation.

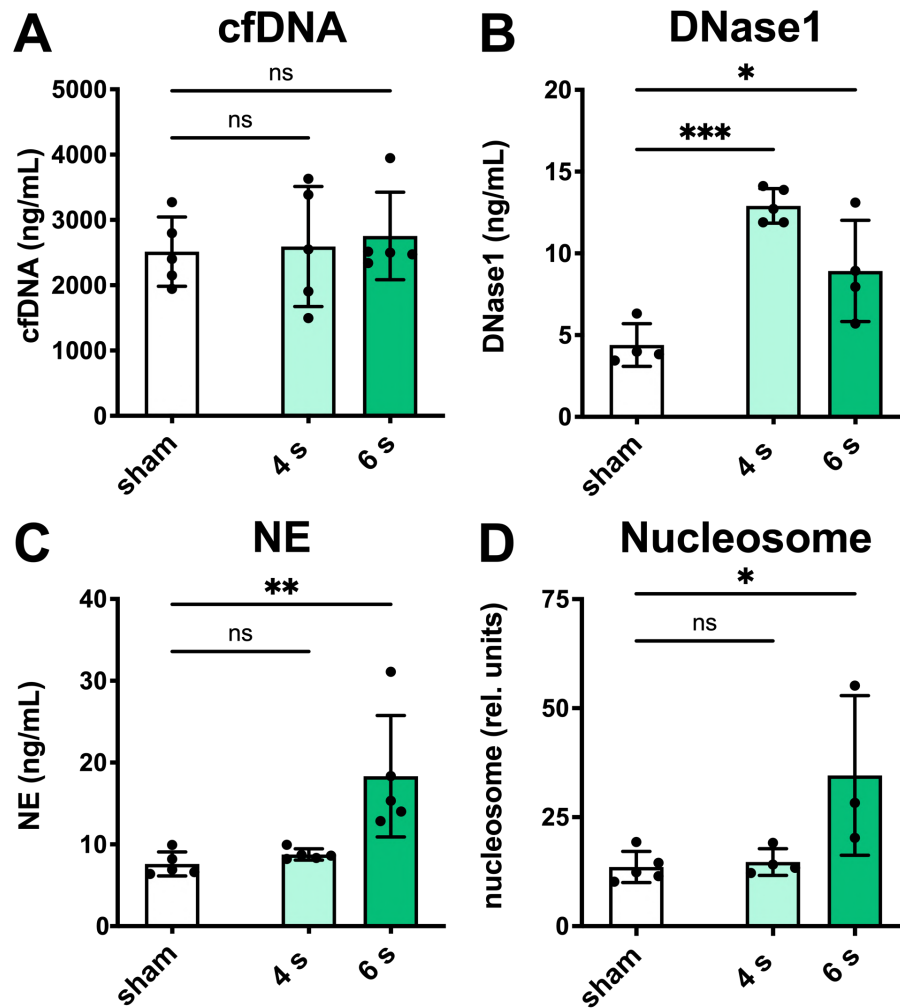


Fig. S4: **Plasma levels of markers of NETosis rise after 6 s scald.** CfDNA assay (A), DNase1 ELISA (B), NE ELISA (C), and nucleosome ELISA (D) are depicted. Only 6 s scald leads to a significant upregulation of NETosis markers in the circulation. Results are provided as mean $\pm$ SD. For comparison, one-way ANOVA with Dunnett's correction was performed. The levels of significance: ns – not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

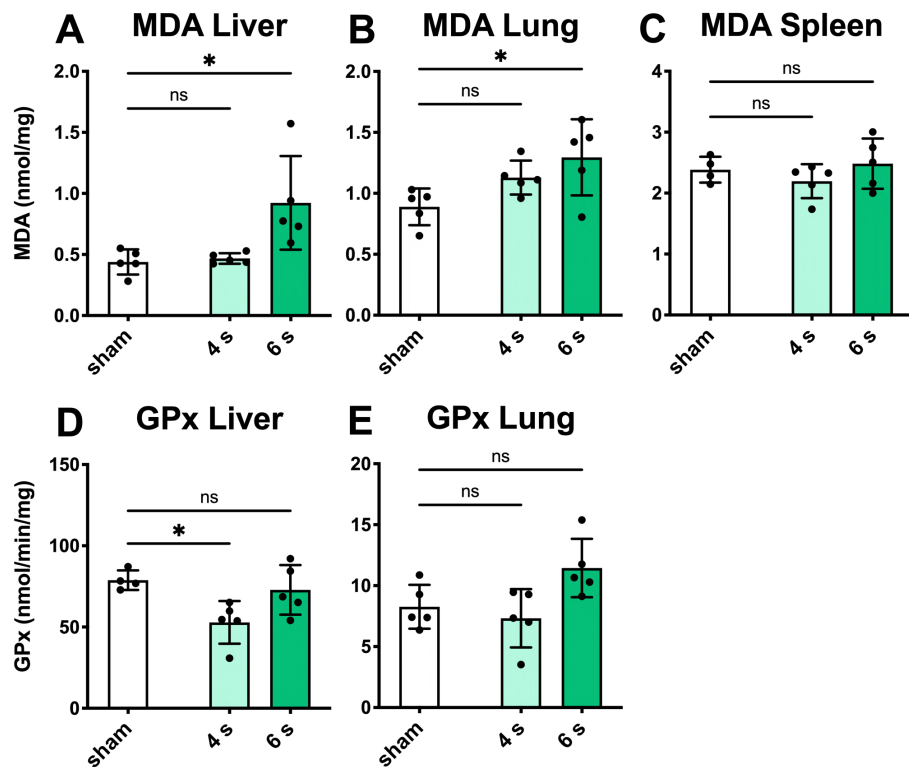


Fig. S5: **6 s scald induces oxidative stress in the liver and lung after 72 h.** MDA, a marker for oxidative stress reaction, was measured in the liver (A), lung (B), and spleen (C). To measure changes in oxidative capacity, GPx was assayed in the liver (D) and lung (E). 6 s but not 4 s scald induces oxidative stress in the liver and lung. Oxidative capacity was not altered. Results are provided as mean $\pm$ SD. For comparison, one-way ANOVA with Dunnett's correction was performed. The levels of significance: ns – not significant; * $p < 0.05$.

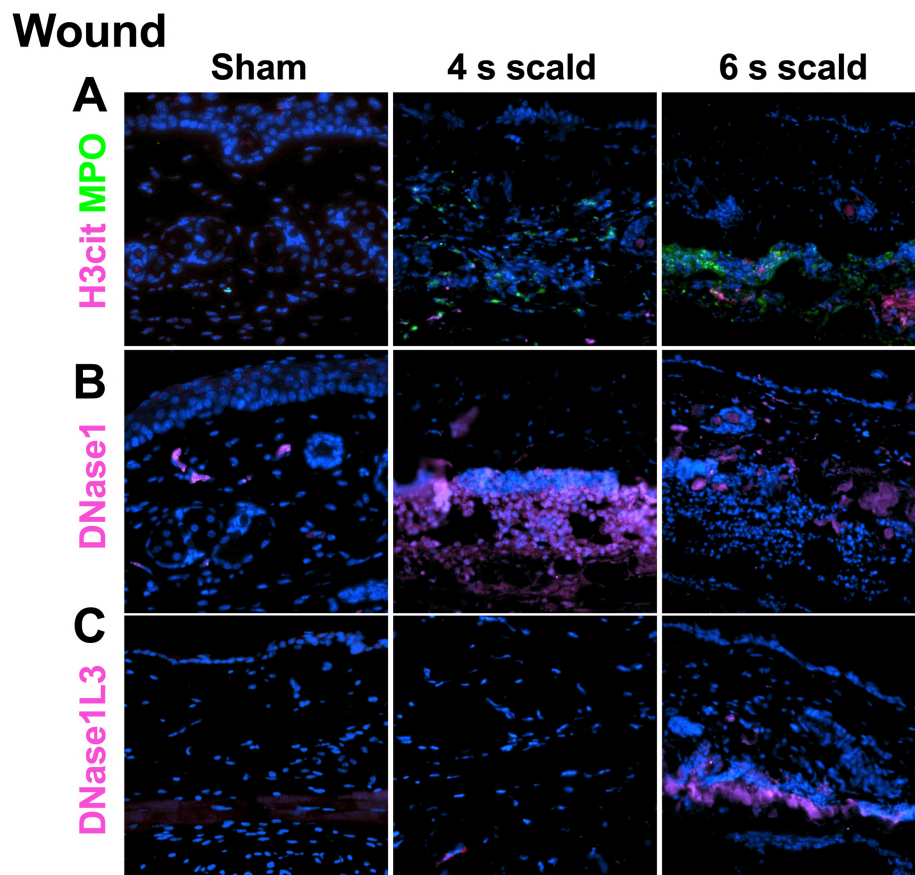


Fig. S6A: **NETs and NET-degrading nucleases increased in scalding wounds.** Representative merge images of immunofluorescence staining of the wound for H3cit/MPO (A), DNase1 (B), and DNase1L3 (C) are displayed. DNA counterstain was performed with DAPI (blue). Magnification level 40x. Note that we have seen significant NET formation even with 4 s scalds.

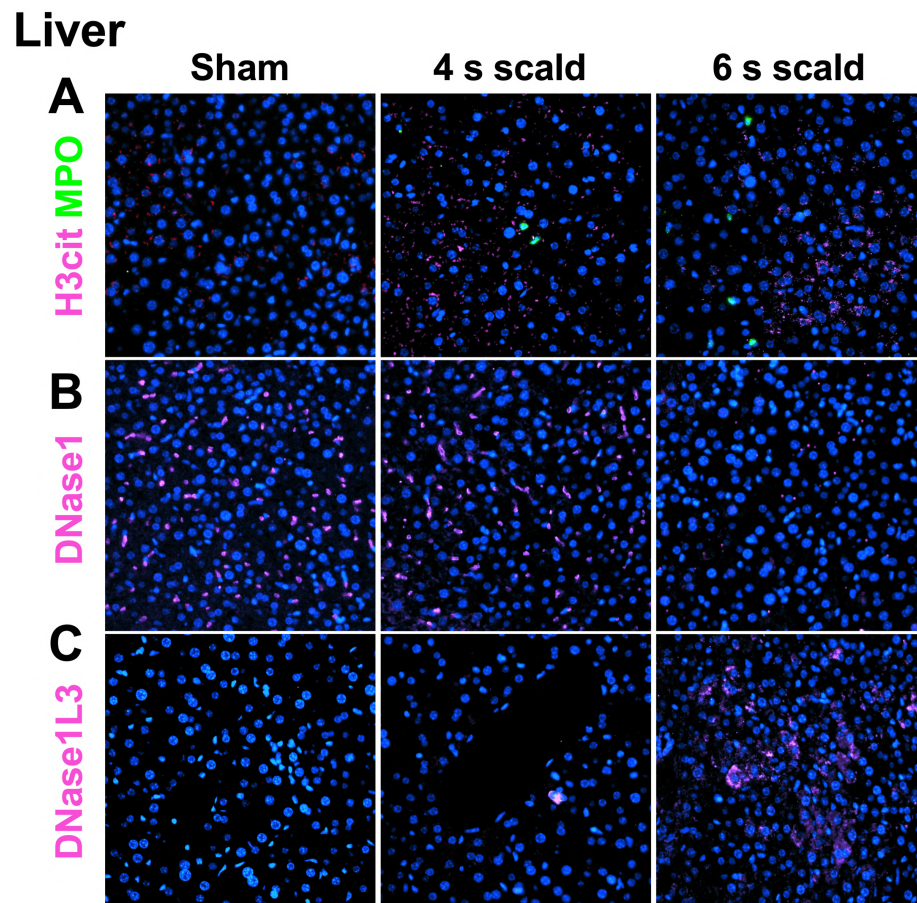


Fig. S6B. **Significant NET formation, decreased DNase1 and increased DNase1L3 in the liver after 6 s scald.** Representative merge images of immunofluorescence staining of the liver for H3cit/MPO (A), DNase1 (B), and DNase1L3 (C) are displayed. DNA counterstain was performed with DAPI (blue). Magnification level 40x. Note that in the group of 6 s scalds DNase1 behaves inversely to the other parameters.

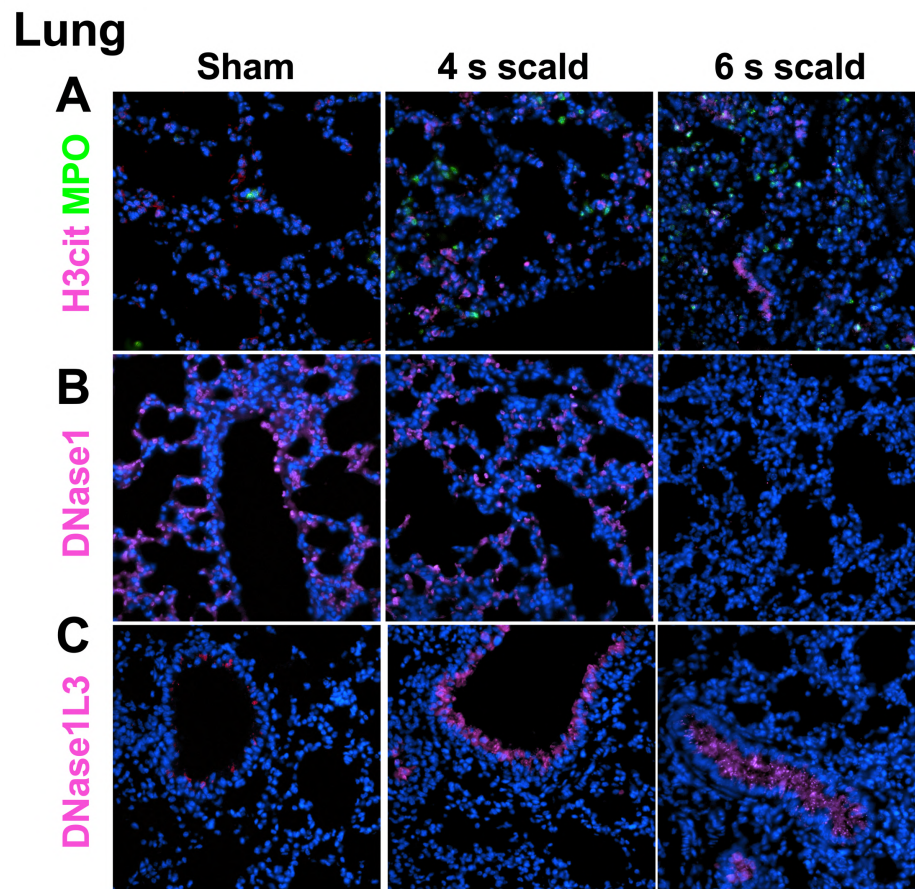


Fig. S6C: **Scalding for 4 s and 6 s induces NET formation and DNase1L3 upregulation.** Representative merge images of immunofluorescence staining of the lung for H3cit/MPO (A), DNase 1 (B), and DNase 1L3 (C) are displayed. DNA counterstain was performed with DAPI (blue). Magnification level 40x. Note that in the group of 6 s scalds DNase1 behaves inversely to the other parameters.

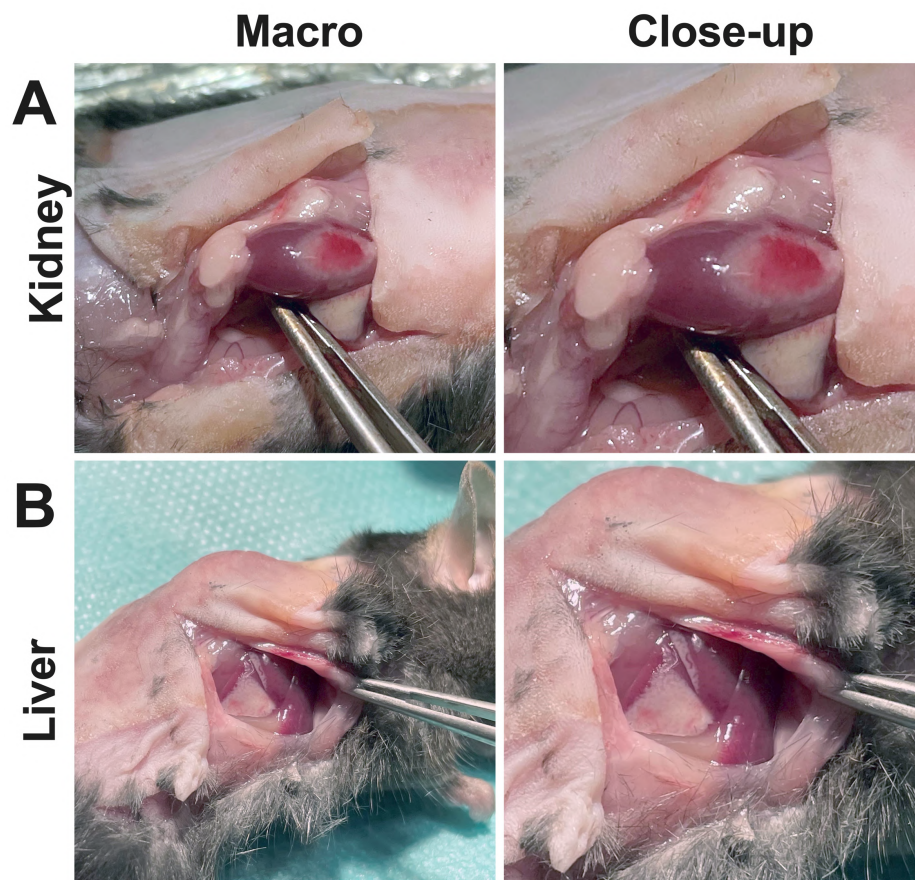


Fig. S7: **7 s scalding causes damage of kidneys and liver.** Representative macroscopic images of the kidney (A) and liver (B) of two mice from 7 s scald group, which had to be sacrificed, are displayed.

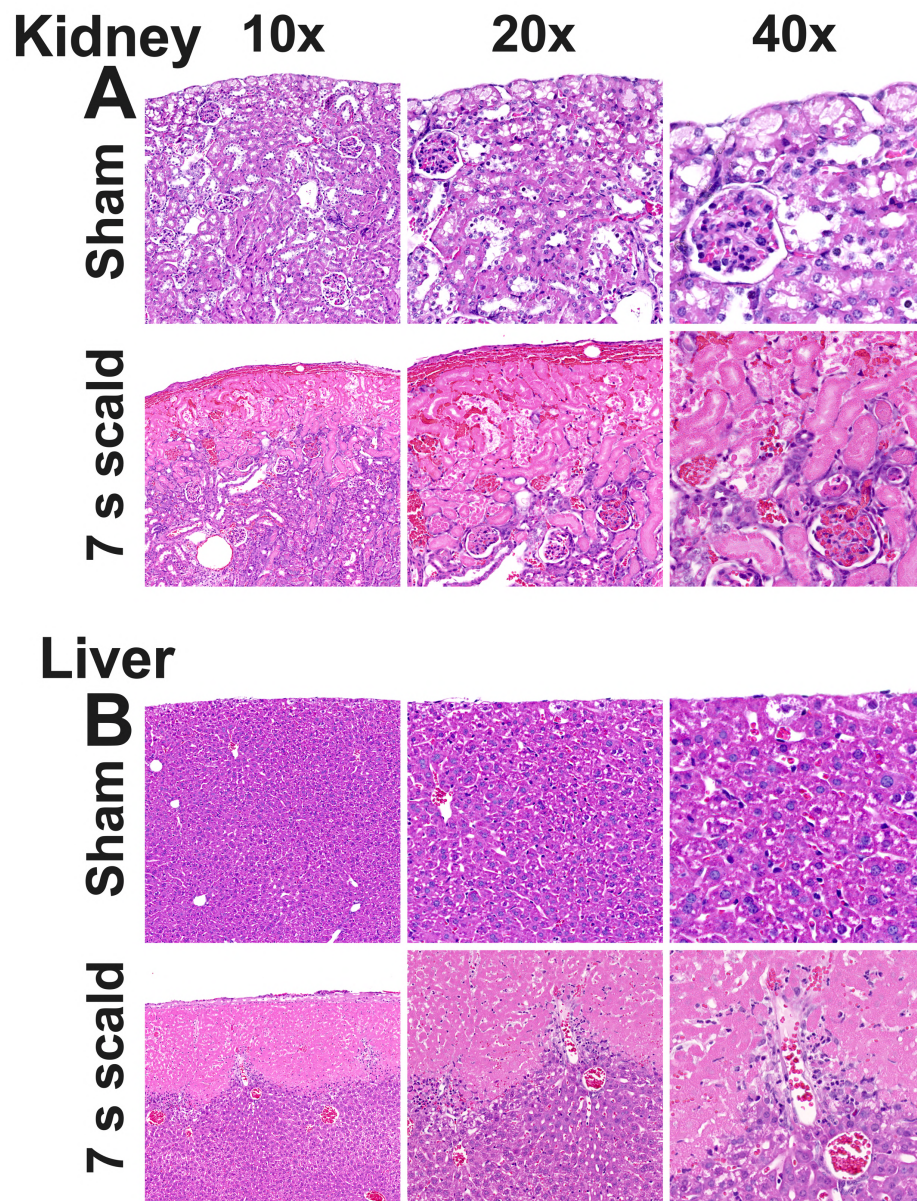


Fig. S8: **7 s scald causes necrotic tissue damage in kidney and liver.** Representative histological images of the kidney (A) and liver (B) of two mice from 7 s scald group, which had to be sacrificed, are displayed in comparison to sham. 10x, 20x, and 40x magnifications are shown. Note the sharply bounded necrotic area.

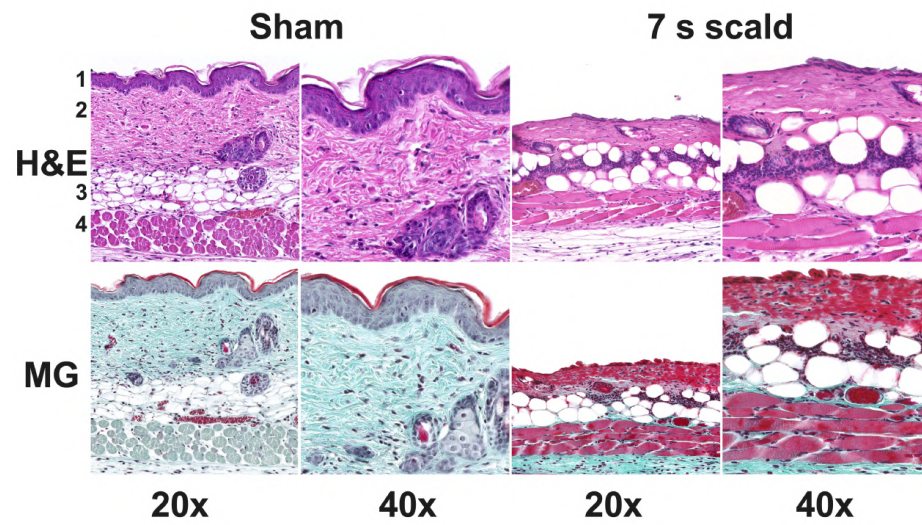


Fig. S9: **Histopathological evaluation reveals a destruction of the epidermal and dermal skin layers and a distinct leucocyte infiltration after 24 h.** Representative images in two magnifications of hematoxylin and eosin (H&E) and Masson Goldner Trichrome (MG) of sham group compared to 7 s scald are shown. For orientation, the main murine skin layers are displayed in one image (1: epidermis, 2: dermis, 3: dermal white adipose tissue, 4: panniculus carnosus). Note the complete destruction of the epidermis and the shrinking of the dermis.

Gene	Protein name	Function	Log2FC
Liver top 5 upregulated			
Saa2	Serum amyloid A2	Acute phase protein	11,21697143
Saa1	Serum amyloid A1	Acute phase protein	9,652682200
Lcn2	Lipocalin-2	Neutrophil innate immunity	8,566388467
Mt2	Metallothionein-2	Heavy metals binding	7,845776444
Mt1	Metallothionein-1	Heavy metals binding	6,264934479
Liver top 5 downregulated			
Ugt1a9	UDP-Glucuronosyltransferase 1-9	Glucuronidation pathway	-6,127202235
Atp2b2	ATPase Plasma Membrane Ca ²⁺ Transporting 2	Intracellular calcium homeostasis	-5,310555817
Ugt1a5	UDP-Glucuronosyltransferase 1-5	Glucuronidation pathway	-5,302704396
Ushbp1	USH1 Protein Network Component Harmonin Binding Protein 1	PDZ domain binding activity	-4,999354129
A1bg	Alpha-1-B Glycoprotein	Innate Immunity	-4,998026812

Tab. S1: **Top 5 up- and downregulated coding mRNA molecules in liver.** Shown are the detected genes, the protein names, the functions and the corresponding log2FC values. Functions of proteins were taken out of GeneCard database provided by the Weizmann Institute of Science.

Gene	Protein name	Function	Log2FC
Lung top 5 upregulated			
Pla1a	Phospholipase A1 Member A	Hydrolyzes fatty acids	3,36476881
Apod	Apolipoprotein D	Component of high-density lipoprotein	2,94194633
Ahsg	Alpha 2-HS Glycoprotein	Endocytoses promotion/ Reduces ectopic calcification	2,846083195
Serpina1b	Alpha-1-Antitrypsin	Protease Inhibitor	2,310397035
Ttr	Transthyretin	Thyroid hormone binding	2,207143074
Lung top 5 downregulated			
Spon2	Spondin 2	Lipopolysaccharide binding activity	-2,814544263
Wisp2	WNT1-inducible-signaling pathway protein 2	Connective tissue growth factor	-2,718376276
Jchain	Joining Chain of Multimeric IgA/IgM	IgA binding activity	-2,637237949
Muc5b	Mucin 5B	Component of mucus secretions	-2,553768354
Dio2	Iodothyronine Deiodinase 2	T4 to T3 conversion	-2,531324546

Tab. S2: **Top 5 up- and downregulated coding mRNA molecules in lung.** Shown are the detected genes, the protein names, the functions and the corresponding log2FC values. Functions of proteins were taken out of GeneCard database provided by the Weizmann Institute of Science.

Bei den weiteren Seiten des Anhangs (Tabellen S3-S7) handelt es sich um Rohdaten der Transkriptom-Analyse. Diese sind hier nicht eingefügt und können unter <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1113948> abgerufen werden.

3. Zusammenfassung

3.1 Englisch

Severe burns lead to distinctive pathophysiological changes, particularly impacting the immune system. For a better understanding of the immune response to heat-induced damage, a murine scald model was developed. Insights into the functions of NETs and DNases can pave the way for new surgical or pharmacological treatments for severe burns. In this study, C57BL/6 mice were used to test four different scalding protocols with varying exposure times to 98 °C hot water. Observation time was 72 h but an additional group with a shorter observation period was included to minimize mortality and focus on the initial phase of pathophysiology. After 24 h and 72 h blood and tissue samples including wound, liver, lung, and spleen samples, were collected and analyzed for NET formation (cfDNA, nucleosome, H3cit, NE, MPO), DNases (DNase1, DNase1L3), oxidative stress (GPx, MDA), apoptosis (cC3), bacterial translocation (CFU, LPS), dermal destruction (H&E, MG) and reorganization of the extracellular matrix (PSR). Moreover, transcriptome analyzes were conducted on lung and liver tissue samples. Results demonstrated that a 7 s exposure to hot water caused significant systemic and local effects, as well as considerable mortality, leading to an optimal observation period of 24 h. To study later stages of burn pathology at 72 h, a 6 s exposure was used. Both exposure durations resulted in notable collagen disorganization, increased oxidative stress, NET formation, apoptosis, and changes in the levels of DNase1 and DNase1L3. LPS level in liver was altered after 7 s only. Transcriptomic data revealed significant changes in genes involved in acute phase signaling, cell cohesion, extracellular matrix reorganization, and immune response. Thus, this research identified two scald models allowing analysis of early and late severe burn effects, providing reproducible and standardized injury assessments. The study highlighted the critical involvement of neutrophil activity and the role of NETs in burn injuries. Comprehensive transcriptome analysis detailed the acute phase and tissue remodeling processes essential for healing, offering a foundational understanding for future research.

3.2 Deutsch

Schwere Verbrennungen führen zu charakteristischen pathophysiologischen Veränderungen, die besonders das Immunsystem betreffen. Um die Immunantwort auf thermische Verletzungen besser zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein murines Verbrühungsmodell entwickelt. Erkenntnisse über die Funktionen von NETs und DNasen können den Weg für neue chirurgische oder pharmakologische Behandlungsoptionen schwerer Verbrühungen ebnen. In dieser Studie wurden C57BL/6-Mäuse verwendet. Es wurden vier verschiedene Verbrühungsprotokolle mit unterschiedlichen Expositionszeiten gegenüber 98 °C heißem Wasser untersucht. Eine zusätzliche Gruppe mit einer kürzeren Beobachtungszeit wurde etabliert, um die Mortalität zu minimieren und die frühe Phase der Pathophysiologie zu untersuchen. 24 h und 72 h nach der Verbrühung wurden Blut- und Gewebeproben, einschließlich Wund-, Leber-, Lungen- und Milzproben, entnommen und auf NETose (cfDNA, Nukleosomen, H3cit, NE, MPO), DNasen (DNase1, DNase1L3), oxidativen Stress (GPx, MDA), Apoptose (cC3), bakterielle Translokation (CFU, LPS), dermale Destruktion (H&E, MG) und eine Umstrukturierung der extrazellulären Matrix (PSR) untersucht. Zudem wurden Transkriptomanalysen an Lungen- und Lebergewebeproben durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Exposition für 7 s bedeutende systemische und lokale Effekte sowie eine beträchtliche Mortalität nach 72 h verursachte, was zur Verkürzung der Beobachtungszeit auf 24 h in dieser Gruppe führte. Um spätere Stadien der Verbrennungspathologie nach 72 h zu untersuchen, erwies sich das 6 s Modell als optimal. Beide Expositionszeiten führten zu einer deutlichen Kollagendesorganisation, erhöhtem oxidativen Stress, NETose, Apoptose und Veränderungen in den Spiegeln von DNase1 und DNase1L3. Die Daten der Transkriptomanalyse offenbarten signifikante Veränderungen in Genen, die an Akutphase-Signalwegen, Zellkohäsion, Strukturierung der extrazellulären Matrix und Immunantwort beteiligt sind. Die vorliegende Forschungsarbeit identifizierte somit zwei reproduzierbare sowie standardisierte Verbrühungsmodelle, die die Analyse der frühen oder späten Effekte schwerer Verbrühungen ermöglichen. Die Studie hob die entscheidende Beteiligung der Neutrophilen Granulozyten und die Rolle der NETs bei Verbrennungsverletzungen hervor. Umfassende Transkriptomanalysen zeigen Veränderungen der Akute-Phase-Reaktion und Remodelingprozesse und bieten somit eine Basis für die Entwicklung zukünftiger experimenteller Fragestellung.

4. Literaturverzeichnis

Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG (2014) Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci.* 71(17):3241–3255.

Altrichter J, Zedler S, Kraft R, Faist E, Mitzner SR, Sauer M, Windolf J, Scholz M, Lögters T (2010) Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs), a potential prognostic marker for mortality in patients with severe burn injury. *Eur J Trauma Emerg S.* 36(6):551–557.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nat Genet.* 25(1):25-29

Bohannon J, Cui W, Toliver-Kinsky T (2009) Endogenous Fms-like tyrosine kinase-3 ligand levels are not altered in mice after a severe burn and infection. *BMC Immunol.* 10(1):47.

Bohanon F, Nunez Lopez O, Herndon DN, Wang X, Bhattarai N, Ayadi AE, Prasai A, Jay JW, Rojas-Khalil Y, Toliver-Kinsky TE, Finnerty CC, Radhakrishnan RS, Porter C (2018) Burn Trauma Acutely Increases the Respiratory Capacity and Function of Liver Mitochondria. *Shock.* 49(4):466–473.

Boneschansker L, Inoue Y, Oklu R, Irimia D (2016) Capillary plexuses are vulnerable to neutrophil extracellular traps. *Integr Biol.* 8(2):149–155.

Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, de Meyer SF, Bhandari AA, Wagner DD (2012) Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 10(1):136–144.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* 303(5663):1532–1535.

Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 34(17):i884-i890

Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, DeVinney R, Doig CJ, Green FHY, Kubes P (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 13(4):463–469.

Dinsdale RJ, Hazeldine J, Al Tarrah K, Hampson P, Devi A, Ermogenous C, Bamford AL, Bishop J, Watts S, Kirkman E, Dalle Lucca JJ, Midwinter M, Woolley T, Foster M, Lord JM,

- Moiemen N, Harrison P (2020) Dysregulation of the actin scavenging system and inhibition of DNase activity following severe thermal injury. *Br J Surg.* 107(4):391–401.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 29(1):15–21.
- Dölling M, Hermann M, Boettcher M (2024) NETworking for Health and in Disease: Neutrophil Extracellular Traps in Pediatric Surgical Care. *Children.* 11(3):295.
- Elrod J, Lenz M, Kiwit A, Armbrust L, Schönfeld L, Reinshagen K, Pagerols Raluy L, Mohr C, Saygi C, Alawi M, Rohde H, Hermann M, Boettcher M (2023) Murine scald models characterize the role of neutrophils and neutrophil extracellular traps in severe burns. *Front Immunol.* 7(14):1113948.
- Epstein MD, Banducci DR, Manders EK (1992) The role of the gastrointestinal tract in the development of burn sepsis. *Plast Reconstr Surg.* 90(3):524–531.
- Erdfelder E, Faul F, Buchner A, Lang AG (2009) Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods.* 41(4):1149–1160.
- Faries PL, Simon RJ, Martella AT, Lee MJ Machiedo GW (1998) Intestinal permeability correlates with severity of injury in trauma patients. *J Traum.* 44(6):1031–1036.
- Finnerty CC, Przkora R, Herndon DN, Jeschke MG (2009) Cytokine expression profile over time in burned mice. *Cytokine.* 45(1):20-25.
- Fuchs T, Kremer Hovinga J, Schatzberg D, Wagner D, Lämmle B (2012) Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood.* 120(6):1157–1164.
- Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *P Natl Acad Sci USA.* 107(36):15880–15885.
- Gauglitz GG, Song J, Herndon DN, Finnerty CC, Boehning D, Barral JM, Jeschke MG (2008) Characterization of the inflammatory response during acute and post-acute phases after severe burn. *Shock.* 30(5):503–507.
- Hansbrough JF, Wikström T, Braide M, Tenenhaus M, Rennekampff OH, Kiessig V, Bjursten LM (1996) Neutrophil activation and tissue neutrophil sequestration in a rat model of thermal injury. *J Surg Res.* 61(1):17–22.
- Heuer A, Stiel C, Elrod J, Königs I, Vincent D, Schlegel P, Trochimiuk M, Appl B, Reinshagen K, Raluy LP, Boettcher M (2021) Therapeutic Targeting of Neutrophil

Extracellular Traps Improves Primary and Secondary Intention Wound Healing in Mice. *Front Immunol.* 12:614347.

Ineichen B, Furrer E, Grüninger S, Zürrer W, Macleod M (2024) Analysis of animal-to-human translation shows that only 5% of animal-tested therapeutic interventions obtain regulatory approval for human applications. *PLoS Biol.* 22(6):e3002667.

Jackson Chornenki NL, Coke R, Kwong AC, Dwivedi DJ, Xu MK, McDonald E, Marshall JC, Fox-Robichaud AE, Charbonney E, Liaw PC (2019) Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intens Care Med Exp.* 7(1):29.

Jeschke MG, Gauglitz GG, Kulp GA, Finnerty CC, Williams FN, Kraft R, Suman OE, Mlcak RP, Herndon DN (2011) Long-term persistence of the pathophysiologic response to severe burn injury. *PloS One.* 6(7):e21245.

Jeschke MG, van Baar ME, Choudhry MA, Chung KK, Gibran NS, Logsetty S (2020) Burn injury. *Nat Rev Dis Primers.* 6(1):1–25.

Jiménez-Alcázar M, Kim N, Fuchs TA (2017) Circulating Extracellular DNA: Cause or Consequence of Thrombosis? *Semin Thromb Hemost.* 43(6):553–561.

Jiménez-Alcázar M, Napirei M, Panda R, Köhler EC, Kremer Hovinga JA, Mannherz HG, Peine S, Renné T, Lämmle B, Fuchs TA (2015) Impaired DNase1-mediated degradation of neutrophil extracellular traps is associated with acute thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost.* 13(5):732-742.

Klinke M, Vincent D, Trochimiuk M, Appl B, Tiemann B, Reinshagen K, Pagerols Raluy L, Boettcher M (2020) Development of an improved murine model of necrotizing enterocolitis shows the importance of neutrophils in NEC pathogenesis. *Sci Rep.* 10(1):8049.

Lenz M, Maiberger T, Armbrust L, Kiwit A, Von der Wense A, Reinshagen K, Elrod J, Boettcher M (2022) cfDNA and DNases: New Biomarkers of Sepsis in Preterm Neonates - A Pilot Study. *Cells.* 11(2):192.

Lewis DI (2019) Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs. *Emerg Top Life Sci.* 3(6):675–679.

Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P (2015) The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Syst.* 1(6):417–425.

Liu X, Chen Yu, You B, Peng Y, Chen Yajie, Yang Z, Zhang Y, Chen J (2021) Molecular mechanism mediating enteric bacterial translocation after severe burn: the role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Burns Trauma.* 9:tkaa042.

Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15(12):550.

- Lu Y, Elrod J, Hermann M, Knopf J, Boettcher M (2024) Neutrophil Extracellular Traps: A Crucial Factor in Post-Surgical Abdominal Adhesion Formation. *Cells*. 13(11):991.
- Maejima K, Deitch EA, Berg RD (1984) Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. *Infect Immun*. 43(1):6-10.
- Masopust D, Sivula CP, Jameson SC (2017) Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice to Understand Human Immunology. *J Immunol*. 199(2):383-388.
- McNamara AR, Zamba KD, Sokolich JC, Jaskille AD, Light TD, Griffin MA, Meyerholz DK (2010) Apoptosis is differentially regulated by burn severity and dermal location. *J Surg Res*. 162(2):258–263.
- Meng W, Paunel-Görgülü A, Flohé S, Witte I, Schädel-Höpfner M, Windolf J, Lötgers TT (2012) Deoxyribonuclease Is a Potential Counter Regulator of Aberrant Neutrophil Extracellular Traps Formation after Major Trauma. *Mediators Inflamm*. 2012(149560):1-8
- Mestas J, Hughes CCW (2004) Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol*. 172(5):2731–2738.
- Michael M, Vermeren S (2019) A neutrophil-centric view of chemotaxis. *Essays Biochem*. 63(5):607-618.
- Morrill EE, Tulepbergenov AN, Stender CJ, Lamichhane R, Brown RJ, Lujan TJ (2016) A validated software application to measure fiber organization in soft tissue. *Biomech Model Mechan*. 15(6):1467–1478.
- Nguyen DN, Stensballe A, Lai JCY, Jiang P, Brunse A, Li Y, Sun J, Mallard C, Skeath T, Embleton ND, Berrington JE, Sangild PT (2017) Elevated levels of circulating cell-free DNA and neutrophil proteins are associated with neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis in immature mice, pigs and infants. *Innate Immun*. 23(6):524–536.
- Nishio J, Negishi H, Yasui-Kato M, Miki S, Miyanaga K, Aoki K, Mizusawa T, Ueno M, Aina A, Muratani M, Hangai S, Yanai H, Hasegawa H, Ishii Y, Tanji Y, Taniguchi T (2021) Identification and characterization of a novel *Enterococcus* bacteriophage with potential to ameliorate murine colitis. *Sci Rep*. 11:20231.
- O'Sullivan ST, O'Connor TPF (1997) Immunosuppression following thermal injury: the pathogenesis of immunodysfunction. *Br J Plast Surg*. 50(8):615–623.
- Otawara M, Roushan M, Wang X, Ellett F, Yu YM, Irimia D (2018) Microfluidic Assay Measures Increased Neutrophil Extracellular Traps Circulating in Blood after Burn Injuries. *Sci Rep*. 8(1):16983.
- Petri B, Sanz MJ (2018) Neutrophil chemotaxis. *Cell Tissue Res*. 371:425-436.

Poppelaars F, Holers VM, Thurman JM (2025) Analysis of animal-to-human translation shows that only 5% of animal-tested therapeutic interventions obtain regulatory approval for human applications. *J Clin Invest.* 135(12):e188347.

Porter C, Herndon DN, Bhattarai N, Ogunbileje JO, Szczesny B, Szabo C, Toliver-Kinsky T, Sidossis LS (2016) Differential acute and chronic effects of burn trauma on murine skeletal muscle bioenergetics. *Burns.* 42(1):112–122.

Seok J, Shaw WH, Alex GC, Michael NM, Henry VB, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, López CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier R V., Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG (2013) Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *P Natl Acad Sci USA.* 110(9):3507–3512.

Shimada O, Ishikawa H, Tosaka-Shimada H, Yasuda T, Kishi K, Suzuki S (1998) Detection of deoxyribonuclease I along the secretory pathway in Paneth cells of human small intestine. *J Histochem Cytochem.* 46(7):833–840.

Smolle C, Cambiaso-Daniel J, Forbes AA, Wurzer P, Hundeshagen G, Branski LK, Huss F, Kamolz LP (2017) Recent trends in burn epidemiology worldwide: A systematic review. *Burns.* 43(2):249–257.

Stanojcic M, Abdullahi A, Rehou S, Parousis A, Jeschke MG (2018) Pathophysiological Response to Burn Injury in Adults. *Ann Surg.* 267(3):576–584.

Tamura M, Hattori K, Nomura H, Oheda M, Kubota N, Imazeki I, Ono M, Ueyama Y, Nagata S, Shirafuji N, Asano S (1987) Induction of neutrophilic granulocytosis in mice by administration of purified human native granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Biochem Bioph Res Co.* 142(2):454–460.

Theodossiou T, Rapti GS, Hovhannisyan V, Georgiou E, Politopoulos K, Yova D (2002) Thermally induced irreversible conformational changes in collagen probed by optical second harmonic generation and laser-induced fluorescence. *Laser Med Sci.* 17(1):34–41.

Toliver-Kinsky TE, Cui W, Murphey ED, Lin C, Sherwood ER (2005) Enhancement of dendritic cell production by fms-like tyrosine kinase-3 ligand increases the resistance of mice to a burn wound infection. *J Immunol.* 174(1):404–410.

Tompkins RG (2015) Genomics of Injury: The Glue Grant Experience. *J Trauma Acute Care.* 78(4):671-686.

- Wargnies M, Rommelaere G, Candiracci J, Pamart D, Varsebroucq R, Jibassia F, Serneo F, Laloux V, Thiry O, Lambert F, Lobbens A, Van den Ackerveken P, Herzog M (2025) Quantification of H3.1-nucleosomes using a chemiluminescent immunoassay: A reliable method for neutrophil extracellular trap detection. *PLoS One*. 20(8):e0329352
- Williams FN, Herndon DN, Jeschke MG (2009) The hypermetabolic response to burn injury and interventions to modify this response. *Clin Plast Surg*. 36(4):583–596.
- Wright NT, Humphrey JD (2002) Denaturation of collagen via heating: an irreversible rate process. *Annu Rev Biomed Eng* 4:109–128.
- Yang C, Montgomery M (2021) Dornase alfa for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 3(3):CD001127
- Ye H, Rahul, Kruger U, Wang T, Shi S, Norfleet J, De S (2019) Burn-related Collagen Conformational Changes in ex vivo Porcine Skin using Raman Spectroscopy. *Sci Rep*. 9(1):19138.
- Yu G, Wang LG, Han Y, He QY (2012) ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics*. 16(5):284–287.
- Yu YM, Tompkins RG, Ryan CM, Young VR (1999) The metabolic basis of the increase of the increase in energy expenditure in severely burned patients. *Jpen-Parenter Enter*. 23(3):160–168.
- Zeng Y, Xu W, Chao P, Xiao Y, Yang T (2025) Neutrophil extracellular traps as a potential marker of systemic lupus erythematosus activity. *Int Immunopharmacol*. 146:113840.
- Zhang W, Xie Y, Liu W, Xu X, Chen X, Liu H, Liu Y (2016) Role of Metallothionein in Post-Burn Inflammation. *Inflammation*. 39(2):768–774.
- Zhang X, Xu R, Hu X, Luo G, Wu J, He W (2015) A systematic and quantitative method for wound-dressing evaluation. *Burns Trauma*. 3(1):15.
- Zhou J, Zhang X, Liang P, Ren L, Zeng J, Zhang M, Zhang P, Huang X (2016) Protective role of microRNA-29a in denatured dermis and skin fibroblast cells after thermal injury. *Biol Open*. 5(3):211–219.
- Zhou Y, Xu Z, Liu Z (2022) Impact of Neutrophil Extracellular Traps on Thrombosis Formation: New Findings and Future Perspective. *Front Cell Infect Mi*. 12(1):910908.

5. Abkürzungsverzeichnis

3R	<i>Replace, reduce, refine</i> Deutsch: Ersetzen, reduzieren, verfeinern
ANOVA	<i>One-way analysis of variance</i> Deutsch: Einfaktorielle Varianzanalyse
cC3	<i>Cleaved Caspase 3</i> Deutsch: Gespaltene Caspase 3
cfDNA	<i>Circulating free desoxyribonucleic acid</i> Deutsch: Zirkulierende, freie Desoxyribonukleinsäure
CFU	<i>Colony forming units</i> Deutsch: Koloniebildende Einheiten
Col I	<i>Collagen I</i> Deutsch: Kollagen I
Col III	<i>Collagen III</i> Deutsch: Kollagen III
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNase1	Desoxyribonuklease 1
DNase1L3	Desoxyribonuklease 1 like 3
DNBSEQ	DNA-Nanoball-Sequenzierungsplattform
dWAT	<i>Dermal white adipose tissue</i> Deutsch: Dermales weißes Fettgewebe
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> Deutsch: Enzymatisches Immunabsorptionsverfahren
ENA	Europäisches Nukleotidarchiv
FDR	<i>False discovery rate</i> Deutsch: Falscherkennungsrate
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> Deutsch: Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GO	Gene Ontology
GPx	Glutathion-Peroxidase
H&E	Hämatoxylin- und Eosinfärbung
H3cit	Citrulliniertes Histon 3
IF	Immunfluoreszenz
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight</i> Deutsch: Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisation-Flugzeitanalyse
MDA	Malondialdehyd

MG	Masson-Goldner-Trichrom-Färbung
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> Deutsch: Boten-Ribonukleinsäure
MSigDB	<i>Molecular Signatures Database</i> Deutsch: Molekulare Signaturen Datenbank
NE	Neutrophile Elastase
NETose	Bildung von NETs
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i> Deutsch: Neutrophile extrazelluläre Fallen
ns	Nicht signifikant
PAD4	Peptidyl-Arginin-Deiminase4
PSR	Picro-Sirius-Rot-Färbung
SD	<i>Standard deviation</i> Deutsch: Standardabweichung
TBSA	<i>Total body surface area</i> Deutsch: Gesamtkörperoberfläche

6. Abbildungsverzeichnis

6.1 Abbildung 1

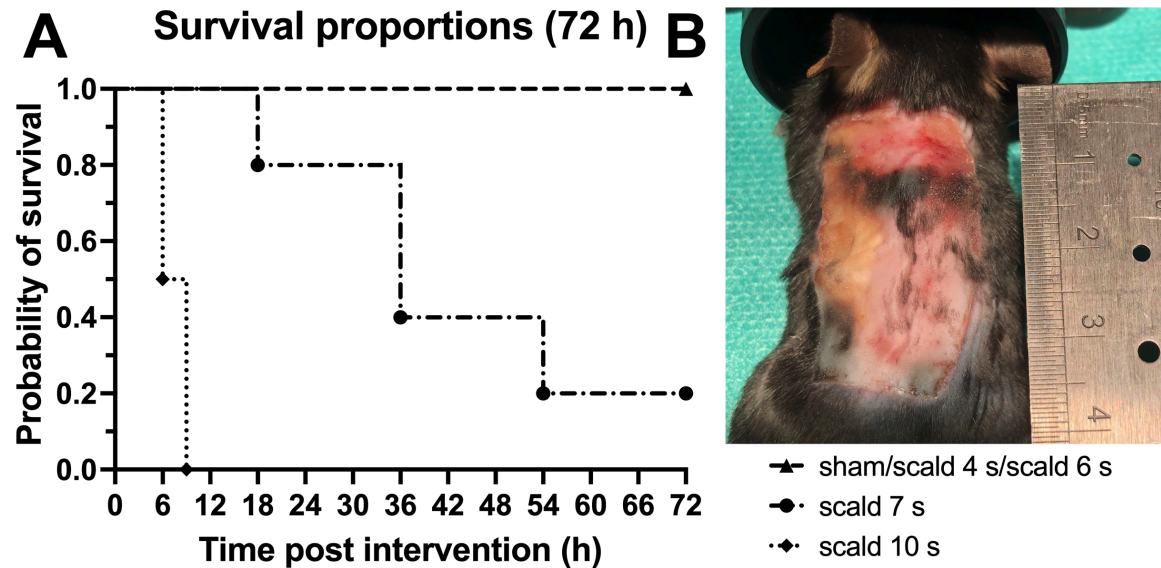


Abbildung 1 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Eine Verbrühung von 7 s oder 10 s verringerte die Überlebensrate von Mäusen signifikant. Dargestellt ist das Überleben aller Studiengruppen bis zu 72 h nach der Intervention (A). Der Log-rank-Test (Mantel-Cox) bestätigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Überlebenskurven ($p = 0,0095$). Es kommt zu einem starken Anstieg der Sterblichkeit, wenn die Mäuse für 7 s oder länger verbrüht wurden. Makroskopischer Befund der Wunde der überlebenden Maus mit 7 s Verbrühung 72 h nach dem Eingriff. Es ist eine scharf begrenzte Wundfläche sichtbar (B).

6.2 Abbildung 2

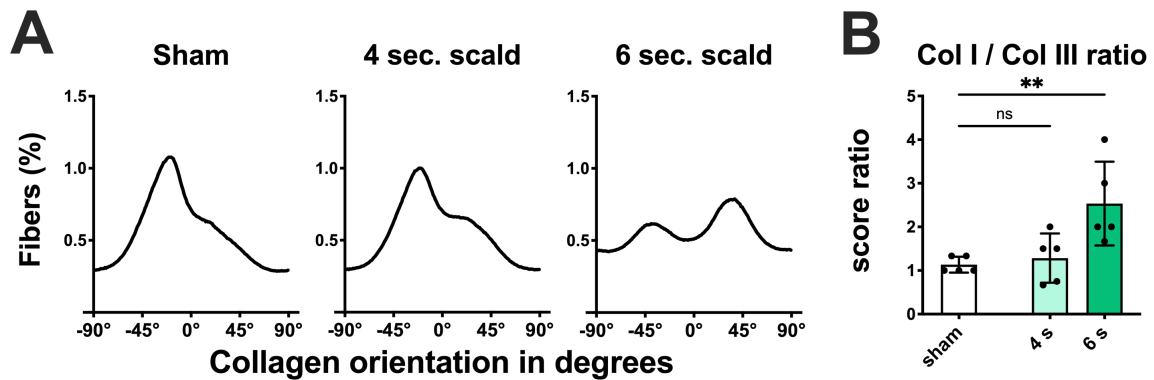


Abbildung 2 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Eine Verbrühung von 6 s führt zu einer veränderten Zusammensetzung und Umstrukturierung der dermalen Kollagenmatrix. Der Anteil der Fasern wird in Abhängigkeit der Orientierung der Fasern in Grad für die Kontrolle und die 4 s bzw. 6 s Verbrühung dargestellt (A). Die Graphen stellen den Mittelwert aller Individuen einer Gruppe dar. Zur Veranschaulichung der Veränderungen in der Kollagenzusammensetzung nach thermischer Verletzung wird das Verhältnis der semiquantitativen Werte dargestellt (B). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (engl. *standard deviation*, SD) angegeben. Zum Vergleich wurde ein ANOVA mit Dunnett-Korrektur durchgeführt. Signifikanzniveaus: ns, nicht signifikant; $**p < 0,01$.

6.3 Abbildung 3

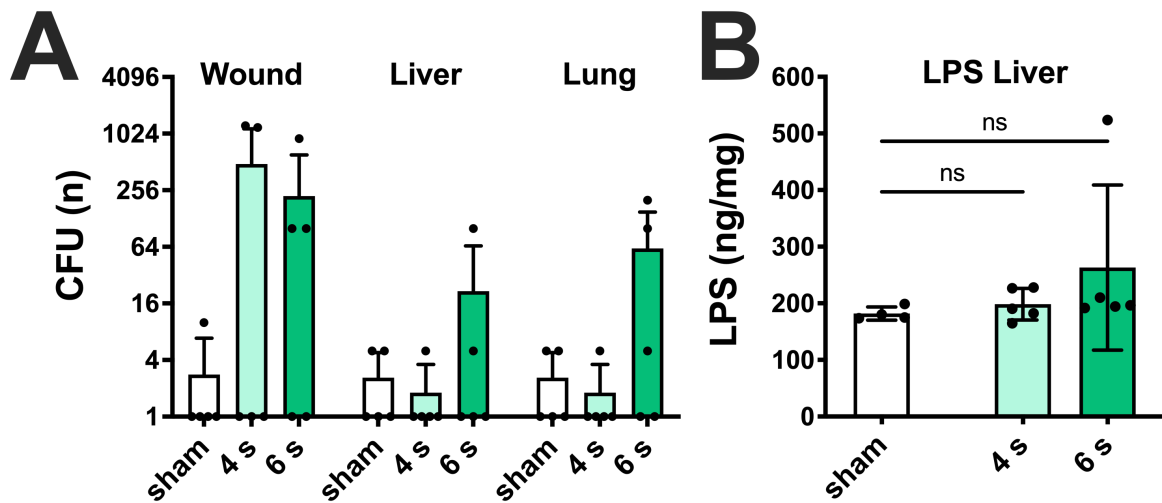


Abbildung 3 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Die 6 s Verbrühung verursacht eine systemische bakterielle Translokation. Die CFU wurden in Wund-, Leber- und Lungenproben bestimmt (A). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SD auf einer $\log_2$ -Skala angegeben. Der LPS-Gehalt in der Leber wurde mittels ELISA quantifiziert (B). Die CFU steigen bei einer 6 s Verbrühung im Vergleich zu einer 4 s Verbrühung bei einigen Individuen deutlich an. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben und es wurde ein ANOVA mit Dunnett-Korrektur durchgeführt. Signifikanzniveau: ns, nicht signifikant.

6.4 Abbildung 4

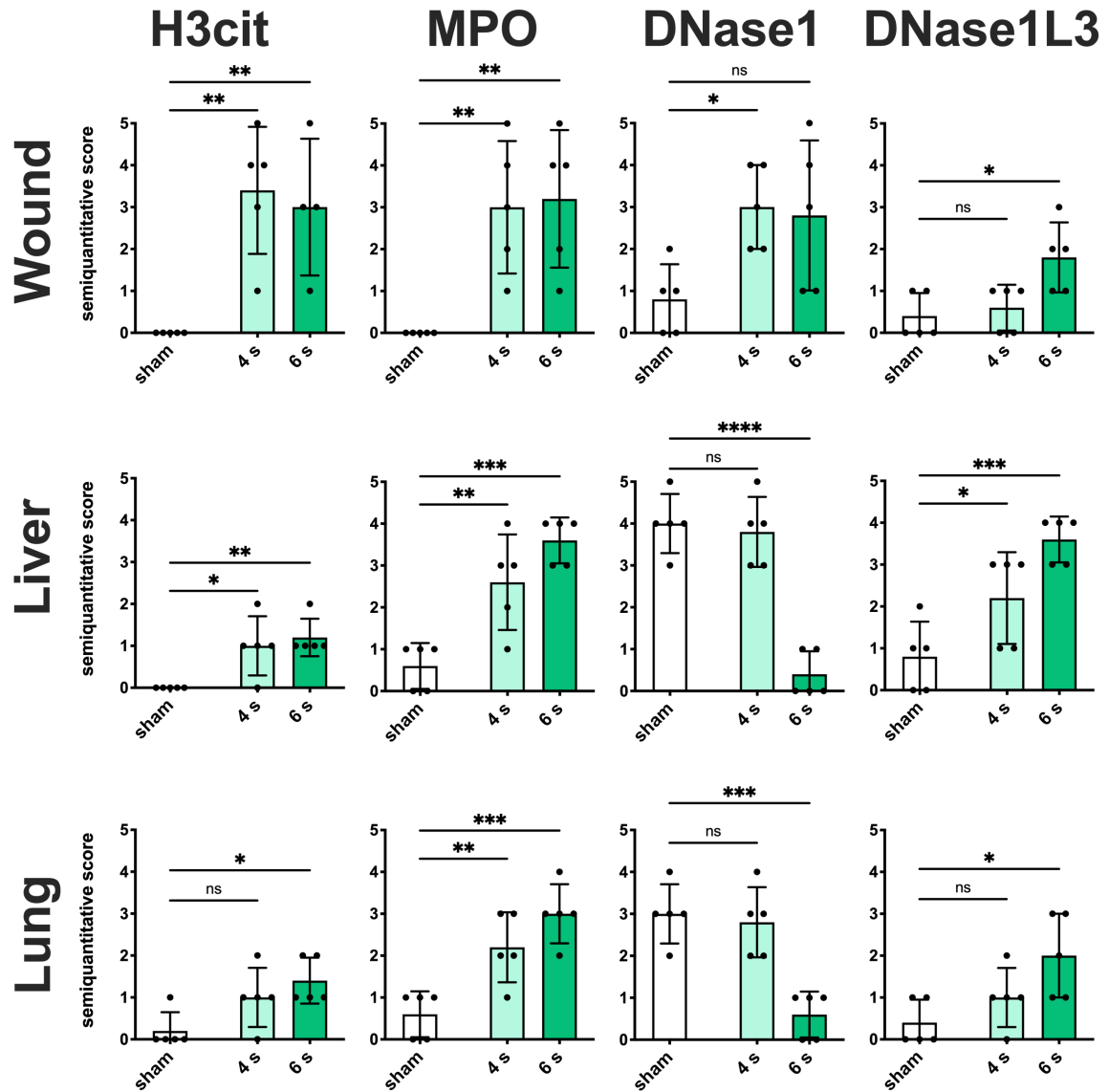


Abbildung 4 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Die IF-Färbungen auf H3cit, MPO, DNase1 und DNase1L3 wurden semiquantitativ ausgewertet, um die jeweilige Menge abzuschätzen. Eine 6 s Verbrühung führt zu einer signifikanten NETose, einer Hochregulation von DNase1L3 und einer Herabregulation von DNase1. Die Ergebnisse werden als Mittelwert $\pm$ SD angegeben und es wurde eine ANOVA mit Dunnett-Korrektur durchgeführt. Signifikanzniveaus: ns, nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

6.5 Abbildung 5

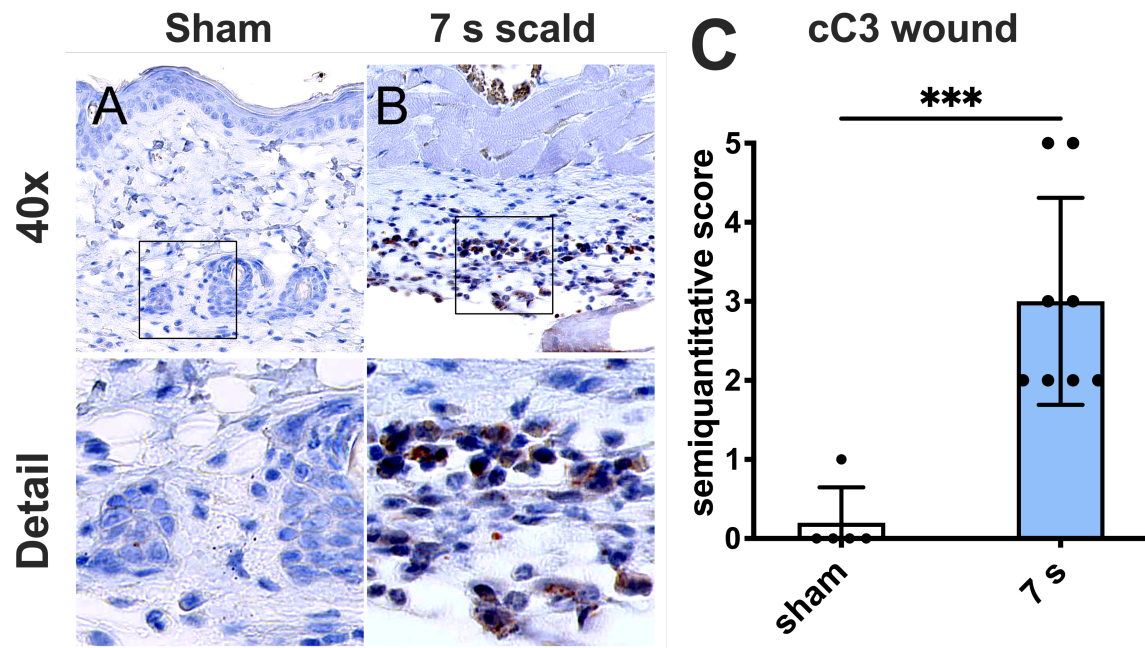


Abbildung 5 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Eine 7 s Verbrühung führt nach 24 h zu Apoptose in der Haut. Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung für cC3 sind für die Kontrolle (A) und die 7 s Verbrühung (B) gezeigt. Die semiquantitative Auswertung (C) ergab eine signifikante Hochregulation von cC3 im subkutanen Bindegewebe bei 7 s Verbrühung im Vergleich zur Kontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Zum Vergleich wurde ein ungepaarter *t*-Test durchgeführt. Signifikanzniveau: *** $p < 0,001$.

6.6 Abbildung 6

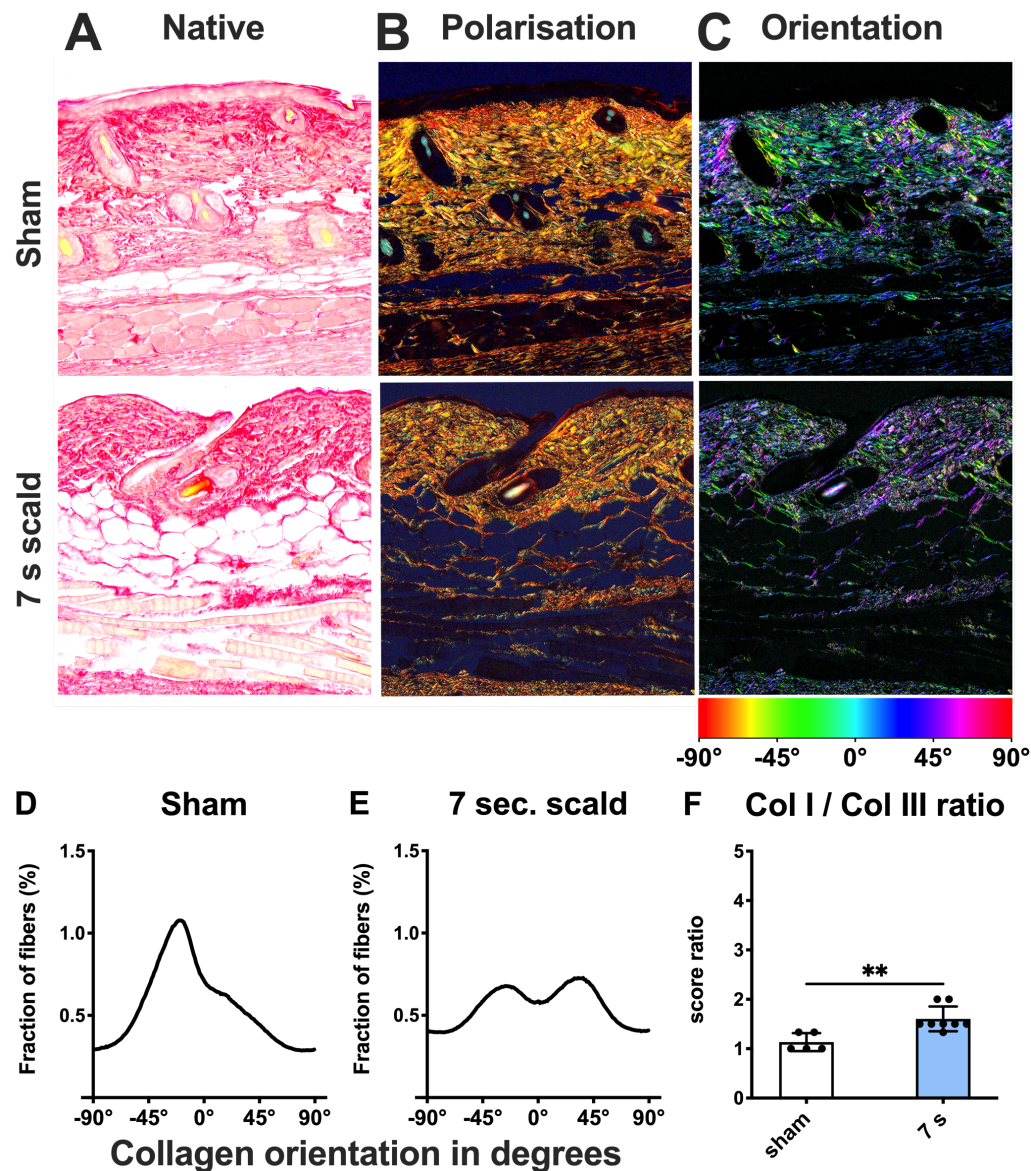


Abbildung 6 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Eine Verbrühung für 7 s verändert die Zusammensetzung und Ausrichtung des Hautkollagens nach 24 h signifikant. Abgebildet sind repräsentative Bilder von nativen (A) und polarisierten (B) PSR-Färbungen der Kontrolle und nach 7 s Verbrühung. Kollagen III ist grün dargestellt, Kollagen I rot. Die Orientierung der Fasern wird anhand einer farbbasierten Skala (C) dargestellt. Der Anteil der Fasern wird in Abhängigkeit von der Orientierung der Fasern in Grad für die Kontrolle (D) und die 7 s Verbrühung (E) dargestellt. Der Graph stellt den Mittelwert aller Individuen einer Gruppe dar. Das Verhältnis der semiquantitativen Werte (F) zeigt die Veränderungen in der Kollagenzusammensetzung nach thermischer Verletzung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Zum Vergleich wurde ein ungepaarter t -Test durchgeführt. Signifikanzniveau: $**p < 0,01$.

6.7 Abbildung 7

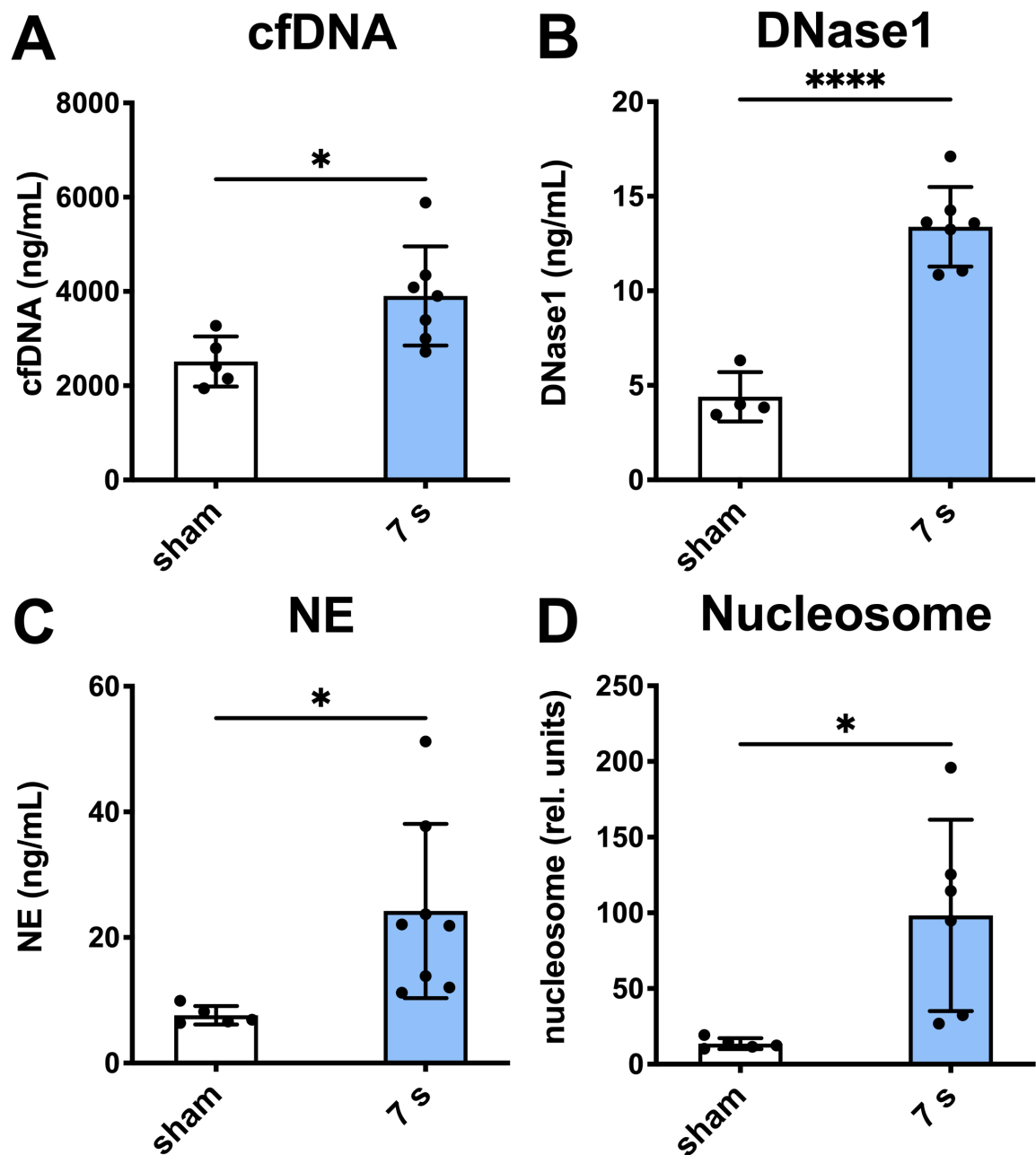


Abbildung 7 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Die Plasmaspiegel der Marker der neutrophilen Aktivierung wurde mittels ELISA (DNase1, NE, Nukleosomen) und einem fluoreszenz-basierten Assay (cfDNA) bestimmt. Die 7 s Verbrühung führt zu einer Hochregulation der untersuchten Marker im Plasma nach 24 h. Dargestellt sind cfDNA (A), DNase1 (B), NE (C) und Nukleosomen (D). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Zum Vergleich wurde ein ungepaarter *t*-Test durchgeführt. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

6.8 Abbildung 8

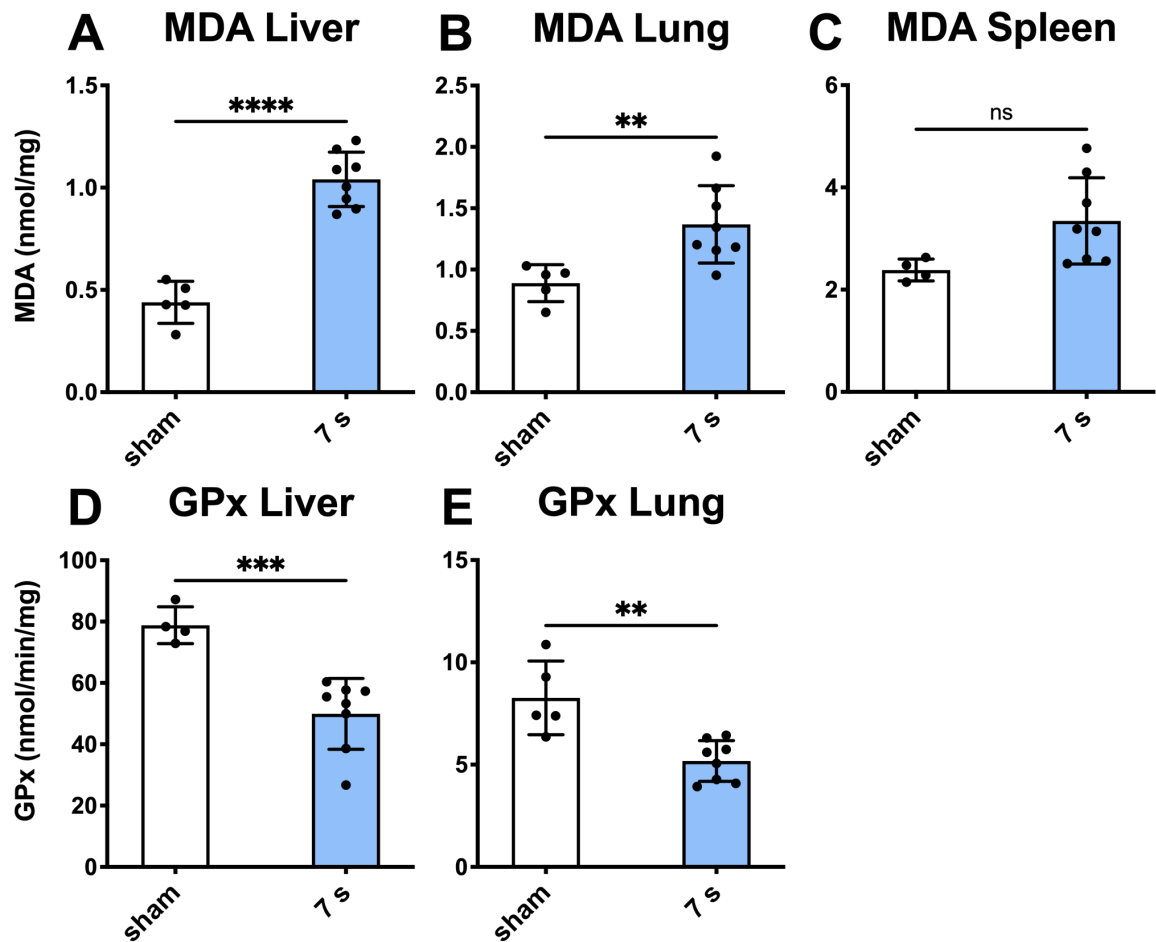


Abbildung 8 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Eine Verbrühung für 7 s induziert oxidativen Stress in Leber und Lunge nach 24 h. MDA, ein Marker für oxidative Stressreaktionen, wurde in Leber (A), Lunge (B) und Milz (C) mittels eines quantitativen Assays gemessen. Zur Messung der oxidativen Kapazität wurde GPx in Leber (D) und Lunge (E) quantitativ bestimmt. In Leber und Lunge induziert die 7 s Verbrühung oxidativen Stress und verringert die oxidative Kapazität. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Zum Vergleich wurde ein ungepaarter *t*-Test durchgeführt. Signifikanzniveaus: ns, nicht signifikant; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

6.9 Abbildung 9

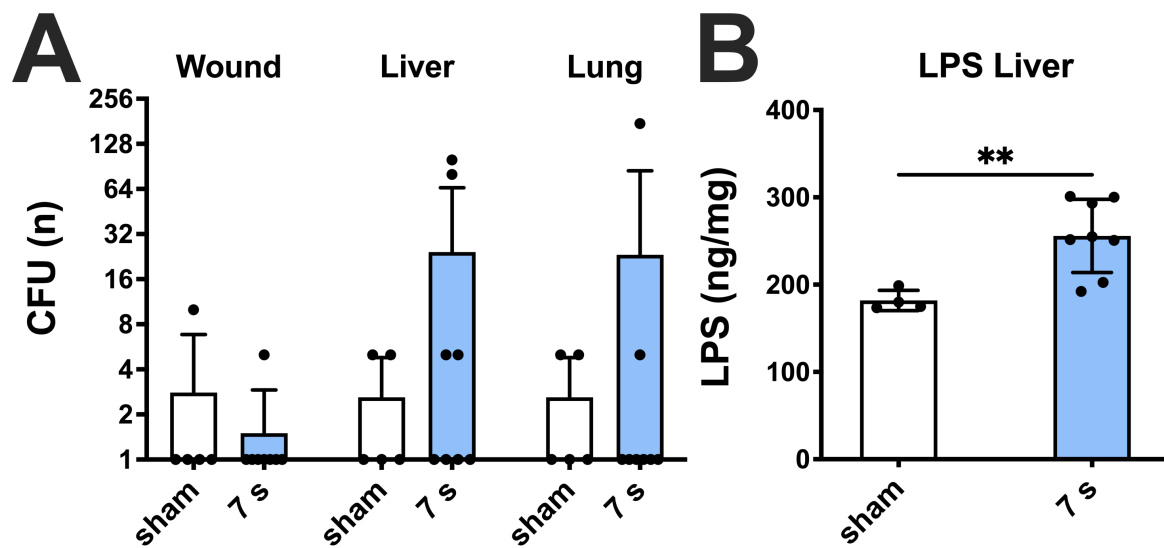


Abbildung 9 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Die 7 s Verbrühung induziert die bakterielle Translokation in Leber und Lunge und einen Anstieg von LPS in der Leber nach 24 h. Die CFU nach Ausstrichen auf Agar-Nährböden von Organlysaten wurden mit Wund-, Leber- und Lungenproben untersucht (A). Die Ergebnisse werden als Mittelwert $\pm$ SD auf einer $\log_2$ -Skala angegeben. Der LPS-Spiegel in der Leber (B) wurde mittels ELISA quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Zum Vergleich wurde ein ungepaarter t -Test durchgeführt. Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$.

Wound

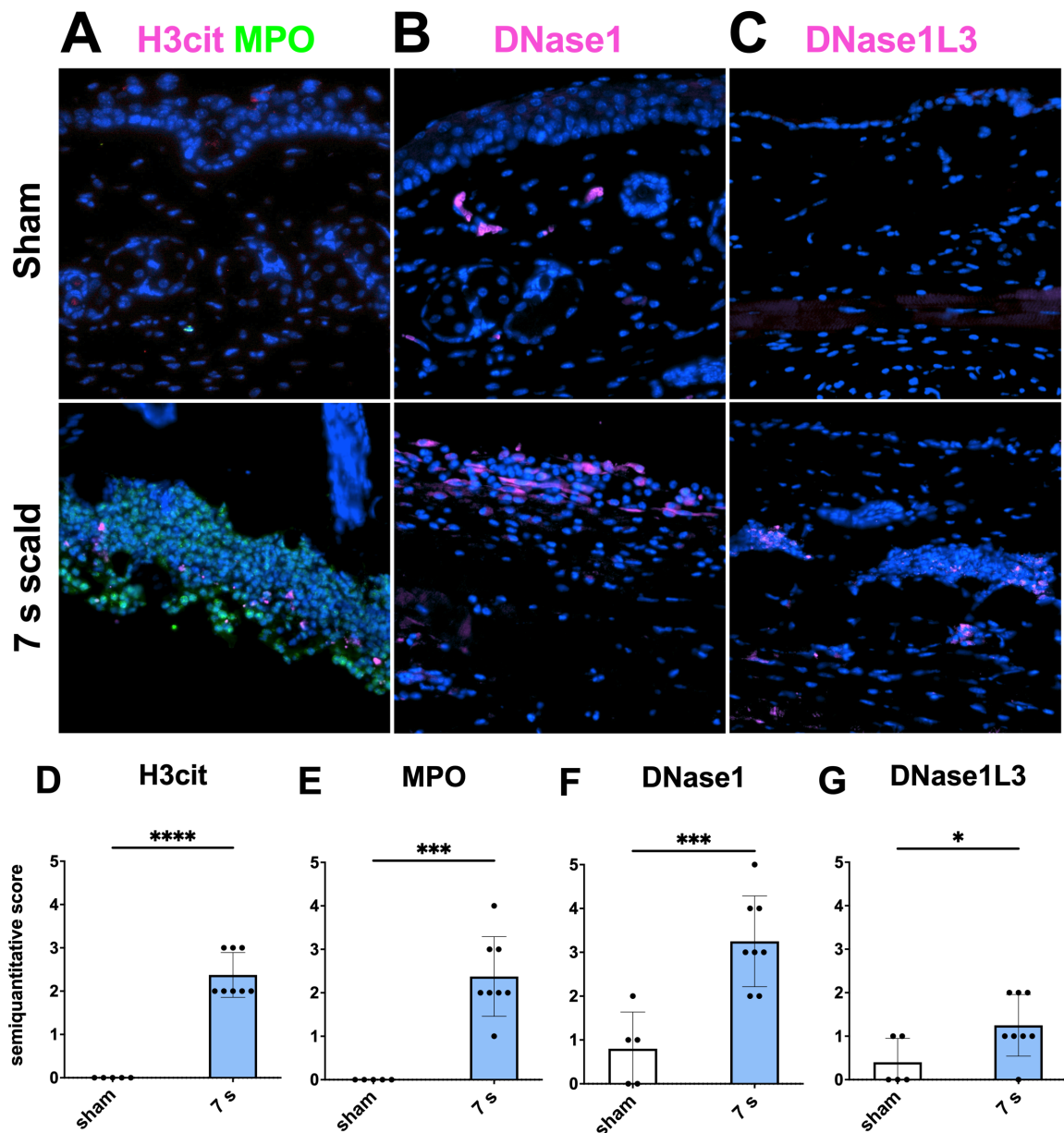


Abbildung 10 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Die IF-Färbung der Wunde zeigt eine signifikante NETose und die Hochregulation von DNase1 und DNase1L3. Dargestellt sind repräsentative, zusammengeführte Bilder der IF-Färbung der Wunde für H3cit/MPO (A), DNase1 (B) und DNase1L3 (C). Die DNA-Gegenfärbung wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Vergrößerungsstufe 40x. Semiquantitative Scores wurden verwendet, um die Menge an H3cit (D), MPO (E), DNase1 (F) und DNase1L3 (G) abzuschätzen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Zum Vergleich wurde ein ungepaarter *t*-Test durchgeführt. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Liver

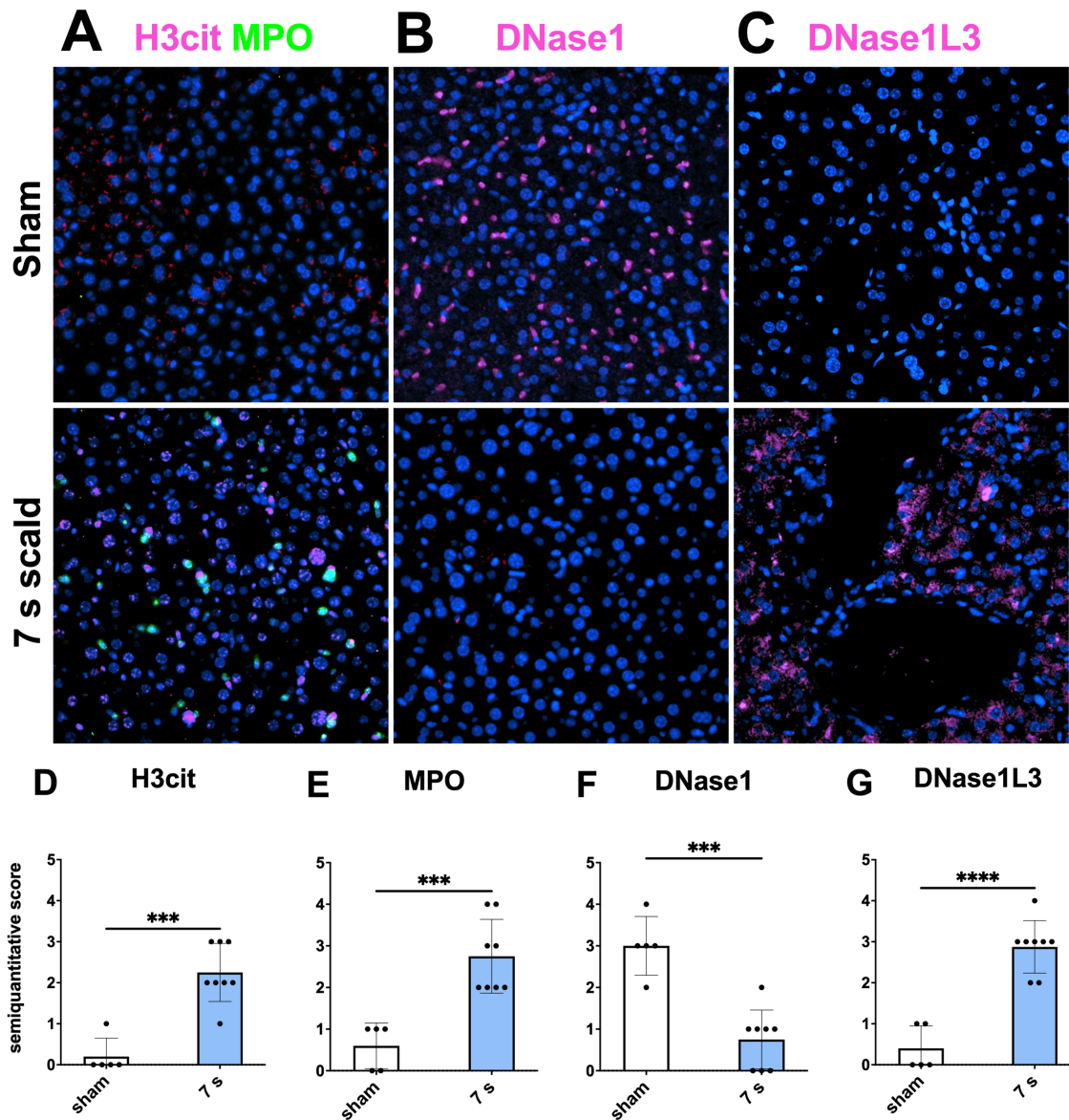


Abbildung 11 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Eine 7 s Verbrühung führt zu NETose, zu einer Hochregulation der DNase1L3 und zu einer Herabregulation von DNase1 in der IF-Färbung der Leber. Dargestellt sind repräsentative, zusammengesetzte Bilder der IF-Färbung der Leber für H3cit/MPO (A), DNase1 (B) und DNase1L3 (C). Die DNA-Gegenfärbung wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Vergrößerungsstufe 40x. Semiquantitative Scores wurden verwendet, um die Menge an H3cit (D), MPO (E), DNase1 (F) und DNase1L3 (G) abzuschätzen. Die Ergebnisse werden als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Zum Vergleich wurde ein ungepaarter *t*-Test durchgeführt. Signifikanzniveaus: *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Lung

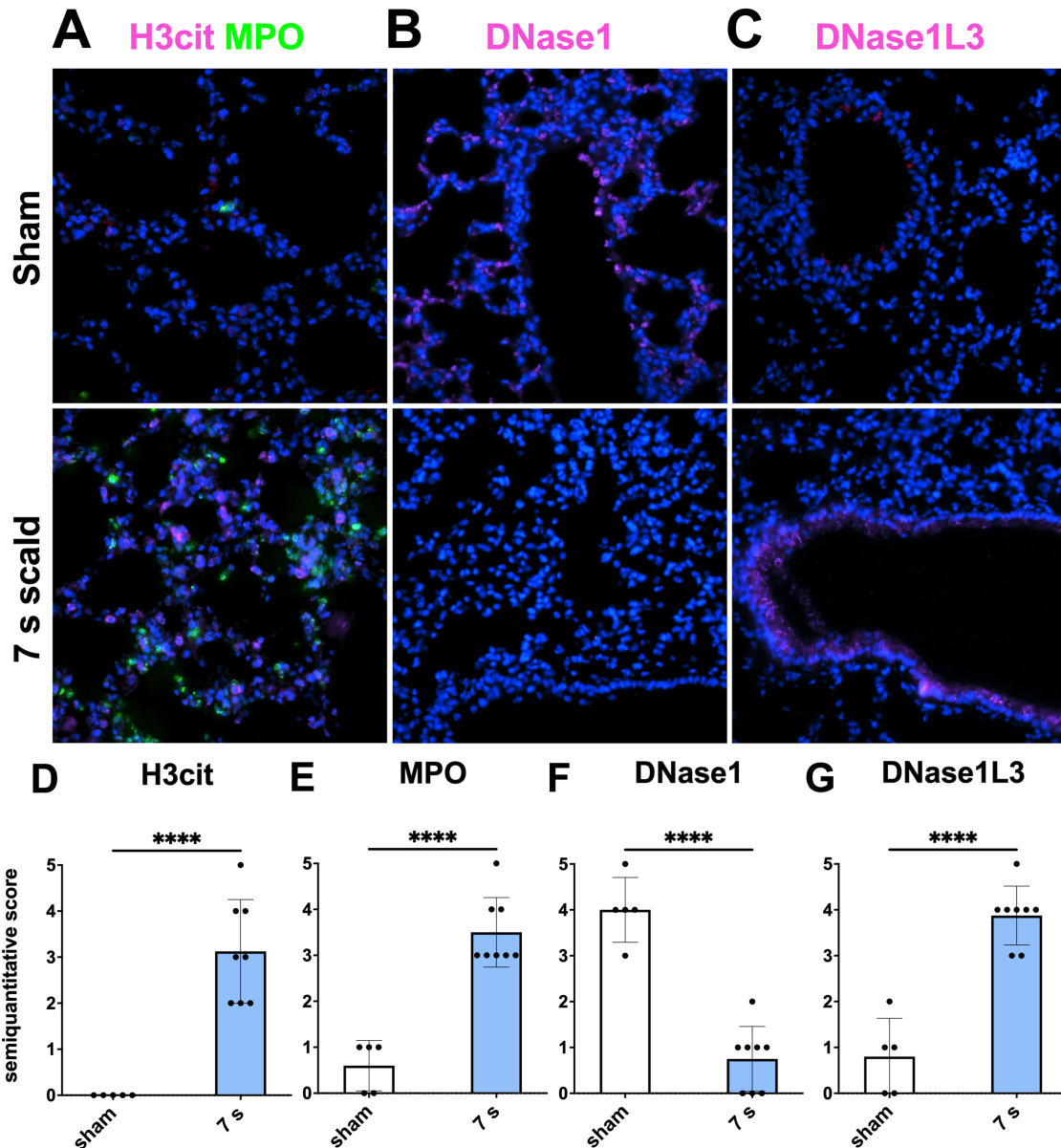


Abbildung 12 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Die IF-Färbung der Lunge zeigt eine deutliche NETose, eine Herabregulation der DNase1 und eine Hochregulation der DNase1L3. Dargestellt sind repräsentative, zusammengesetzte Bilder der IF-Färbung der Lunge für H3cit/MPO (A), DNase1 (B) und DNase1L3 (C). Die DNA-Gegenfärbung wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Vergrößerungsstufe 40x. Semiquantitative Scores wurden verwendet, um die Menge an H3cit (D), MPO (E), DNase1 (F) und DNase1L3 (G) abzuschätzen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Zum Vergleich wurde ein ungepaarter *t*-Test durchgeführt. Signifikanzniveau: **** $p < 0,0001$.

6.13 Abbildung S1

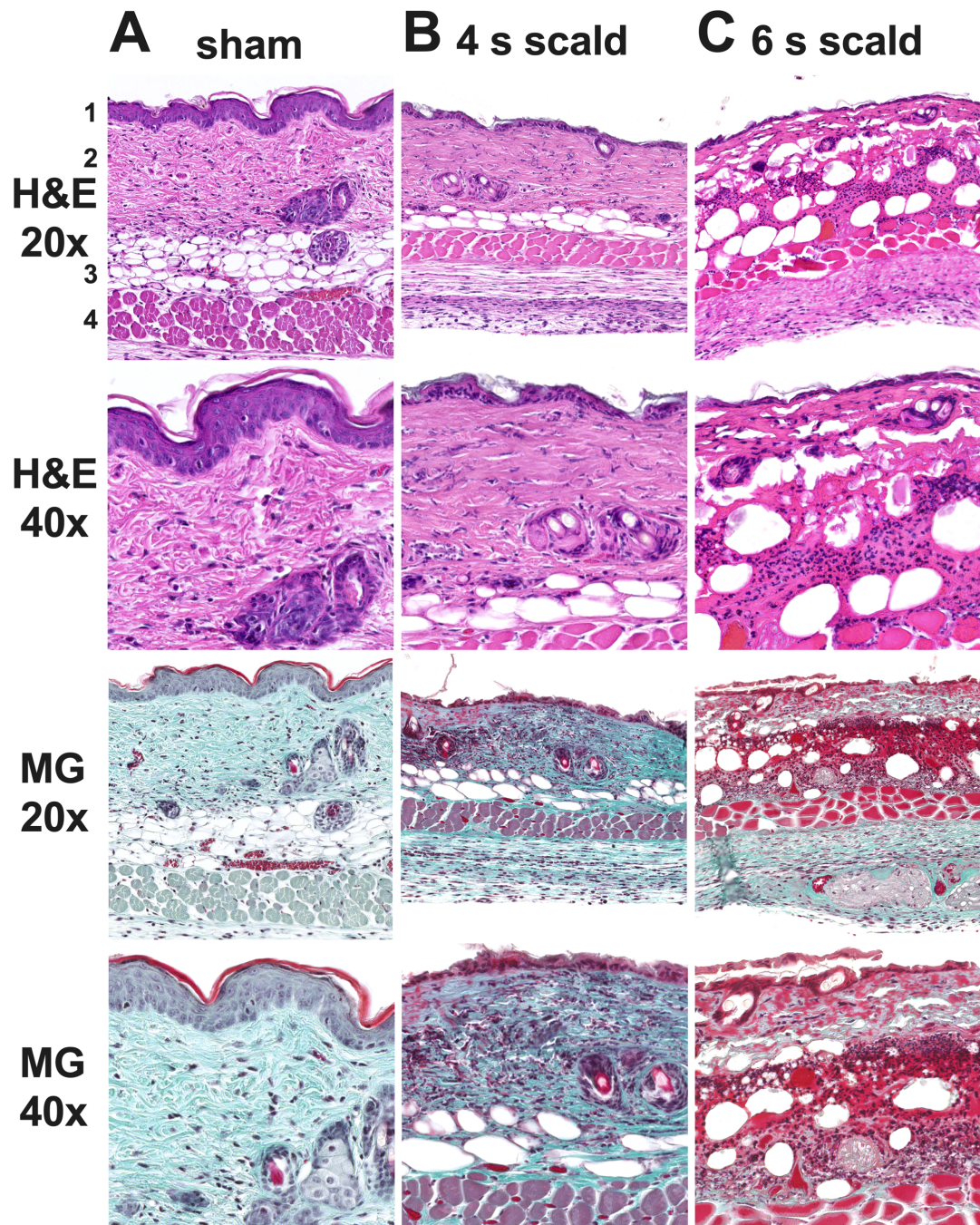


Abbildung S1 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Durch die Einwirkung der thermischen Energie kommt es zu einer dosisabhängigen Destruktion der Hautschichten. Repräsentative Bilder der H&E und MG-Färbung von Kontrollen (A) im Vergleich zu 4 s (B) und 6 s Verbrühung (C) sind abgebildet. Wir beobachteten eine graduelle Zerstörung der Hautschichten nach 4 s und 6 s Verbrühung. Zur Orientierung sind exemplarisch die murinen Hautschichten angegeben (1: Epidermis, 2: Dermis, 3: dWAT, 4: *panniculus carnosus*).

6.14 Abbildung S2

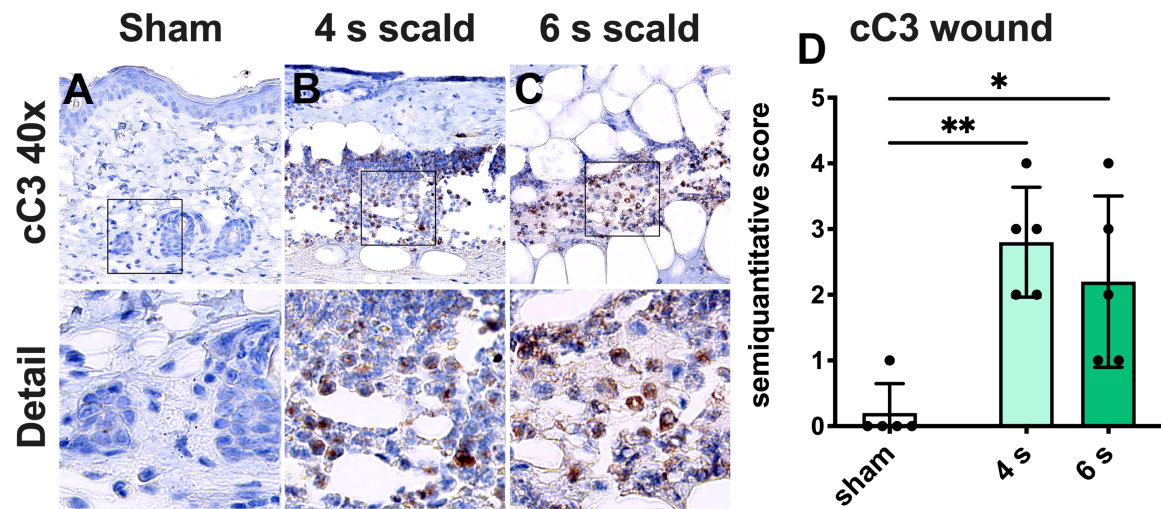


Abbildung S2 (entnommen aus Elrod et al. 2023): 4 s und 6 s Verbrühungen führen zu erhöhter dermaler Apoptose nach 72 h. Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung für cC3 sind für Kontrollen (A) und die 4 s (B) und 6 s Verbrühung (C) gezeigt. Die semiquantitative Auswertung zeigt einen signifikanten Anstieg von cC3 in der Dermis und im dWAT bei den 4 s und 6 s Modellen im Vergleich zur Kontrolle (D). Die Ergebnisse werden als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Zum Vergleich wurde ein ANOVA mit Dunnett-Korrektur durchgeführt. Signifikanzniveaus: * $p = 0,05$; ** $p < 0,01$.

6.15 Abbildung S3

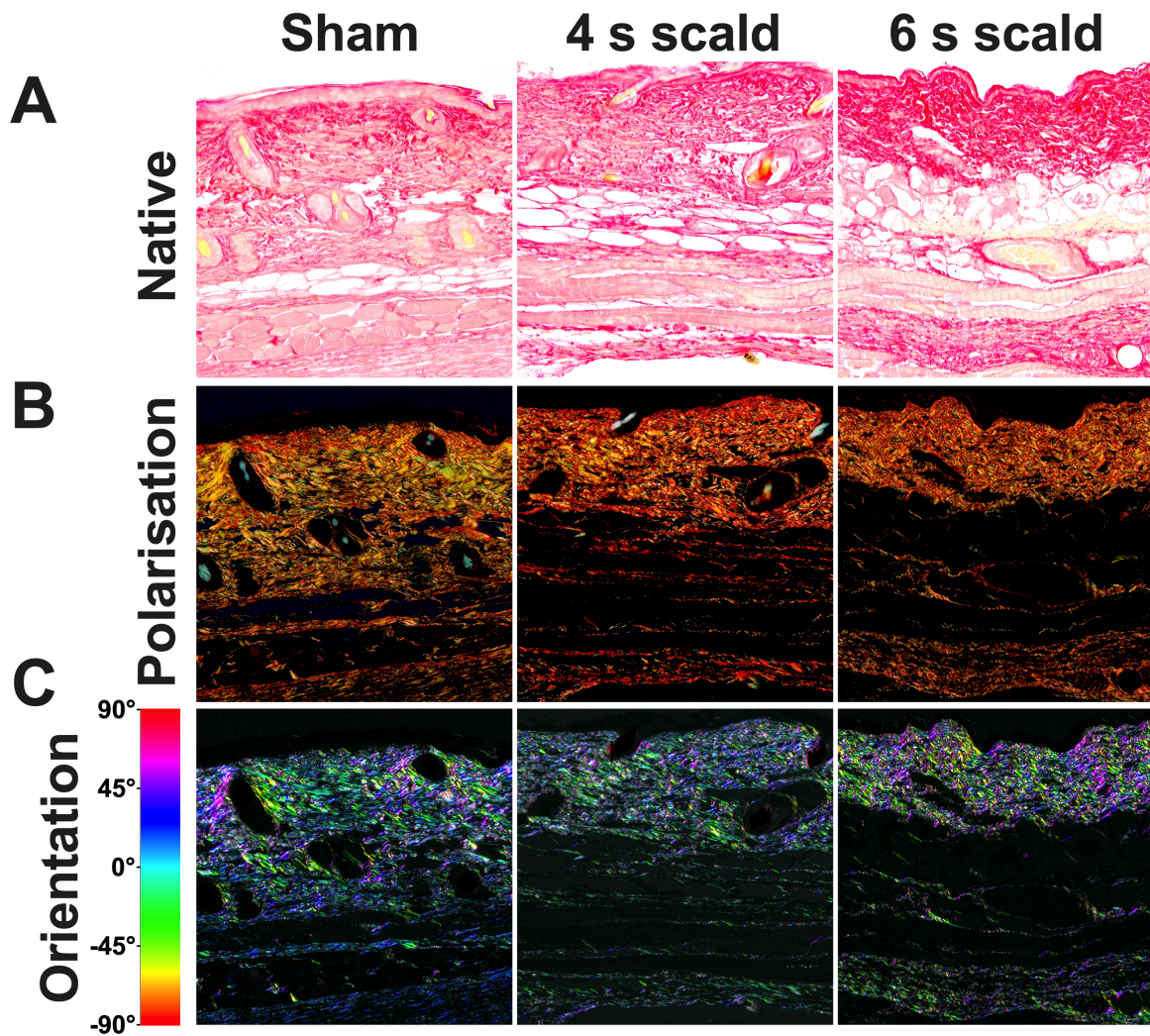


Abbildung S3 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Eine Verbrühung für 4 oder 6 s führt zu einer Schrumpfung und Reorganisation der dermalen Kollagenmatrix. Repräsentative Bilder von nativen (A) und polarisierten (B) PSR-Färbungen von Kontrollen, 4 s und 6 s Verbrühungen sind dargestellt. Kollagen III ist grün und Kollagen I ist rot dargestellt. Die Ausrichtung der Fasern wird anhand einer Farbskala visualisiert (C). Eine Verbrühung von 6 s führt zu einer Umstrukturierung der dermalen Kollagenfasern, die ihre überwiegend parallele Anordnung verlieren.

6.16 Abbildung S4

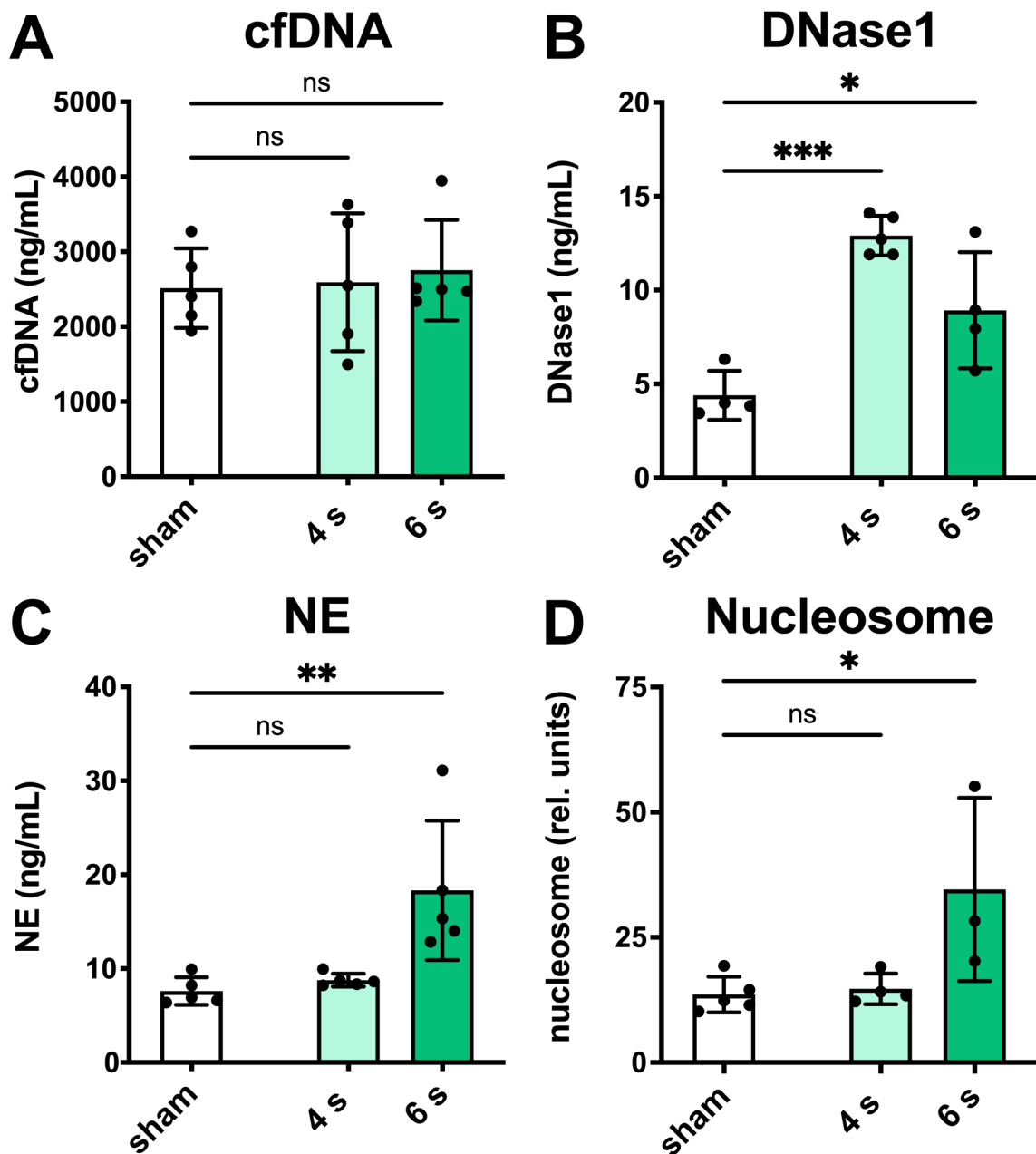


Abbildung S4 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Die Plasmaspiegel der Marker der neutrophilen Aktivierung wurden mittels ELISA (DNase1, NE, Nukleosomen) und einem fluoreszenz-basierten Assay (cfDNA) bestimmt. Dargestellt sind cfDNA (A), DNase1 (B), NE (C) und Nukleosomen (D). Nur eine 6 s Verbrühung führt zu einer signifikanten Hochregulation der NETose-Marker außer cfDNA im Plasma. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Zum Vergleich wurde ein ANOVA mit Dunnett-Korrektur durchgeführt. Signifikanzniveaus: ns, nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.17 Abbildung S5

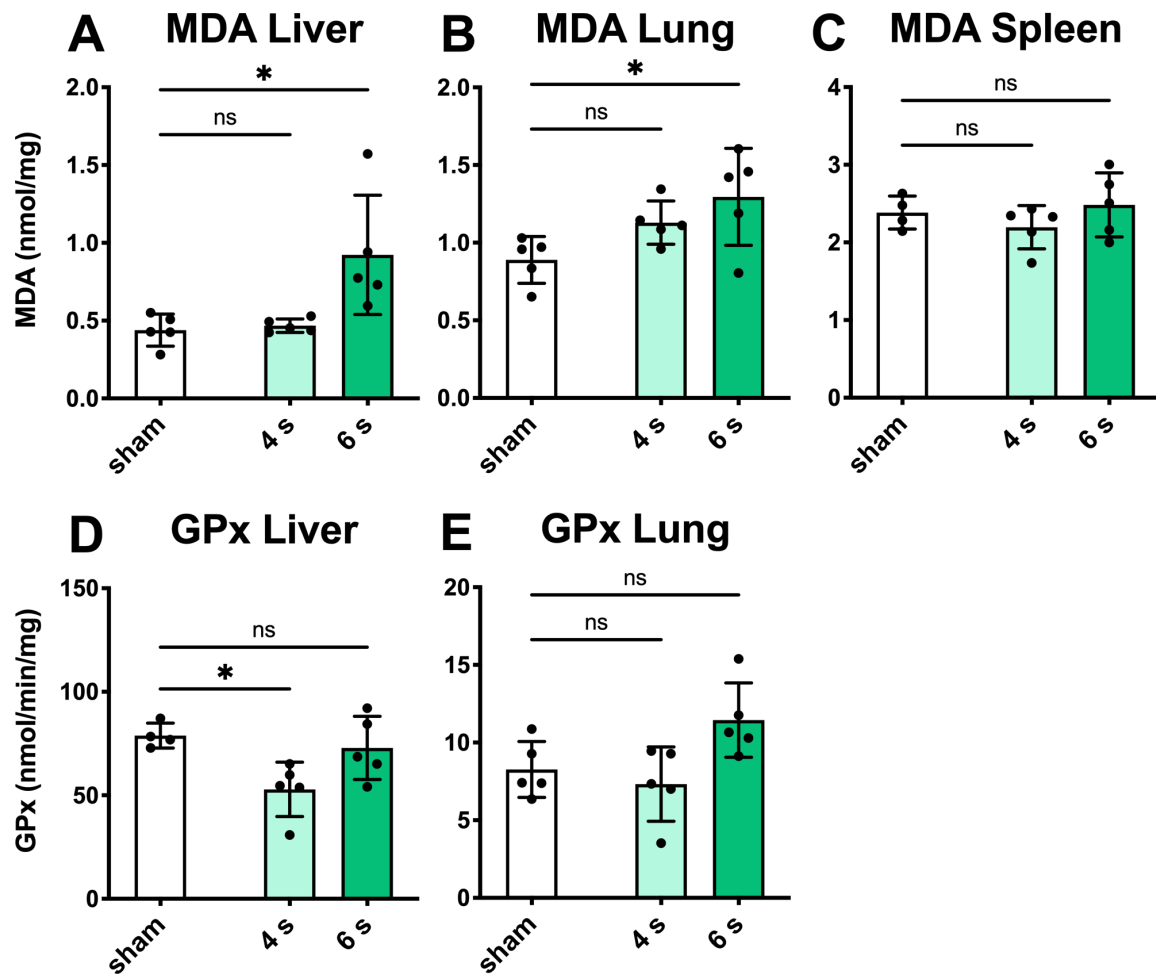


Abbildung S5 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Eine 6 s Verbrühung induziert oxidativen Stress in Leber und Lunge nach 72 h. MDA, ein Marker für eine oxidative Stressreaktion, wurde in Leber (A), Lunge (B) und Milz (C) gemessen. Zur Messung der Veränderungen in der oxidativen Kapazität wurde GPx in der Leber (D) und der Lunge (E) bestimmt. Bei der Verbrühungszeit von 6 s, nicht jedoch von 4 s, wird oxidativer Stress in Leber und Lunge induziert. Die oxidative Kapazität wurde nicht verändert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Zum Vergleich wurde ein ANOVA mit Dunnett-Korrektur durchgeführt. Signifikanzniveaus: ns, nicht signifikant; $*p < 0,05$.

Wound

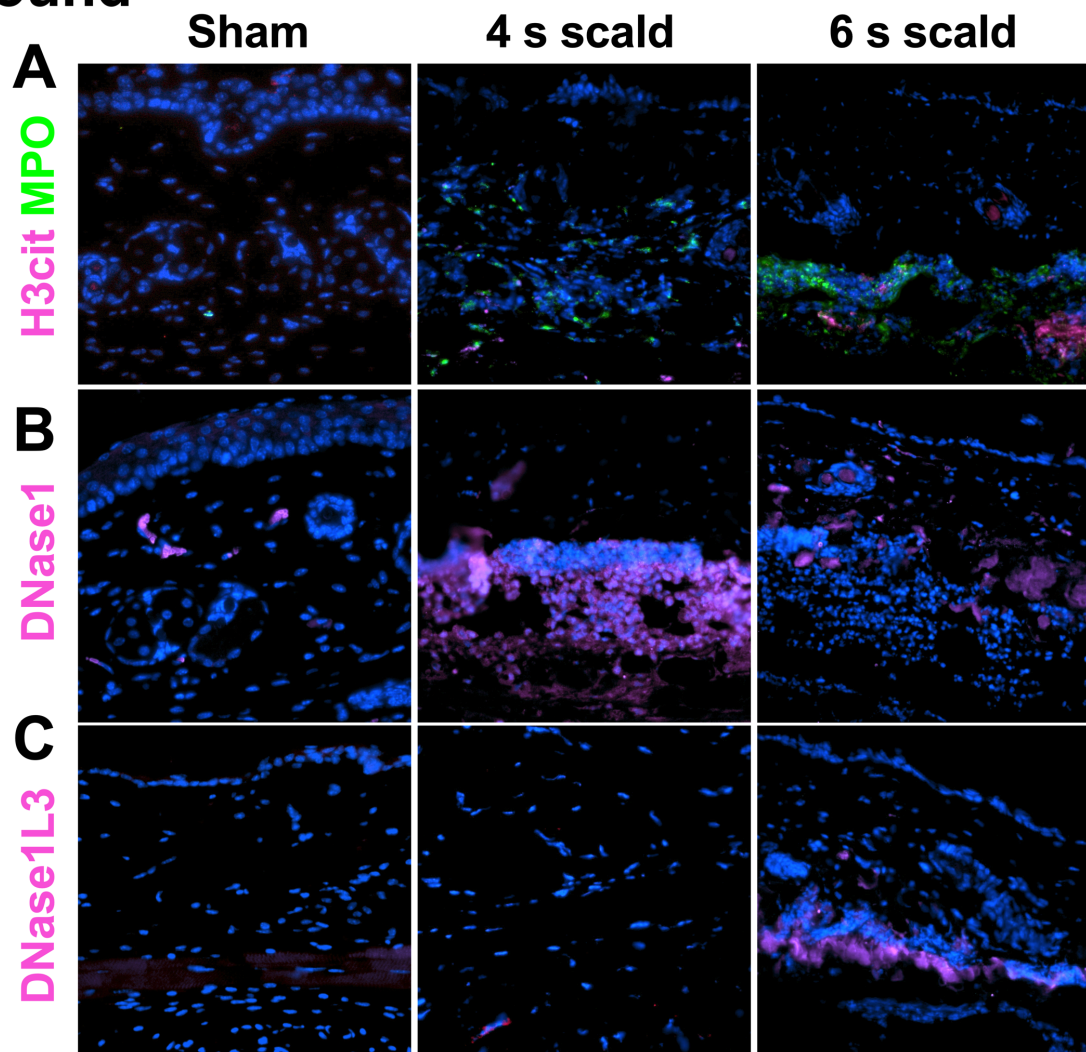


Abbildung S6A (entnommen aus Elrod et al. 2023): NETs und NET-abbauende Nukleasen sind in Verbrühungswunden erhöht. Dargestellt sind repräsentative, zusammengesetzte Bilder der IF-Färbung der Wunde für H3cit/MPO (A), DNase1 (B) und DNase1L3 (C). Die DNA-Gegenfärbung wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Vergrößerungsstufe 40x. Man beachte, dass selbst bei einer Verbrühung von 4 s eine signifikante NET-Bildung zu beobachten ist.

6.19 Abbildung S6B

Liver

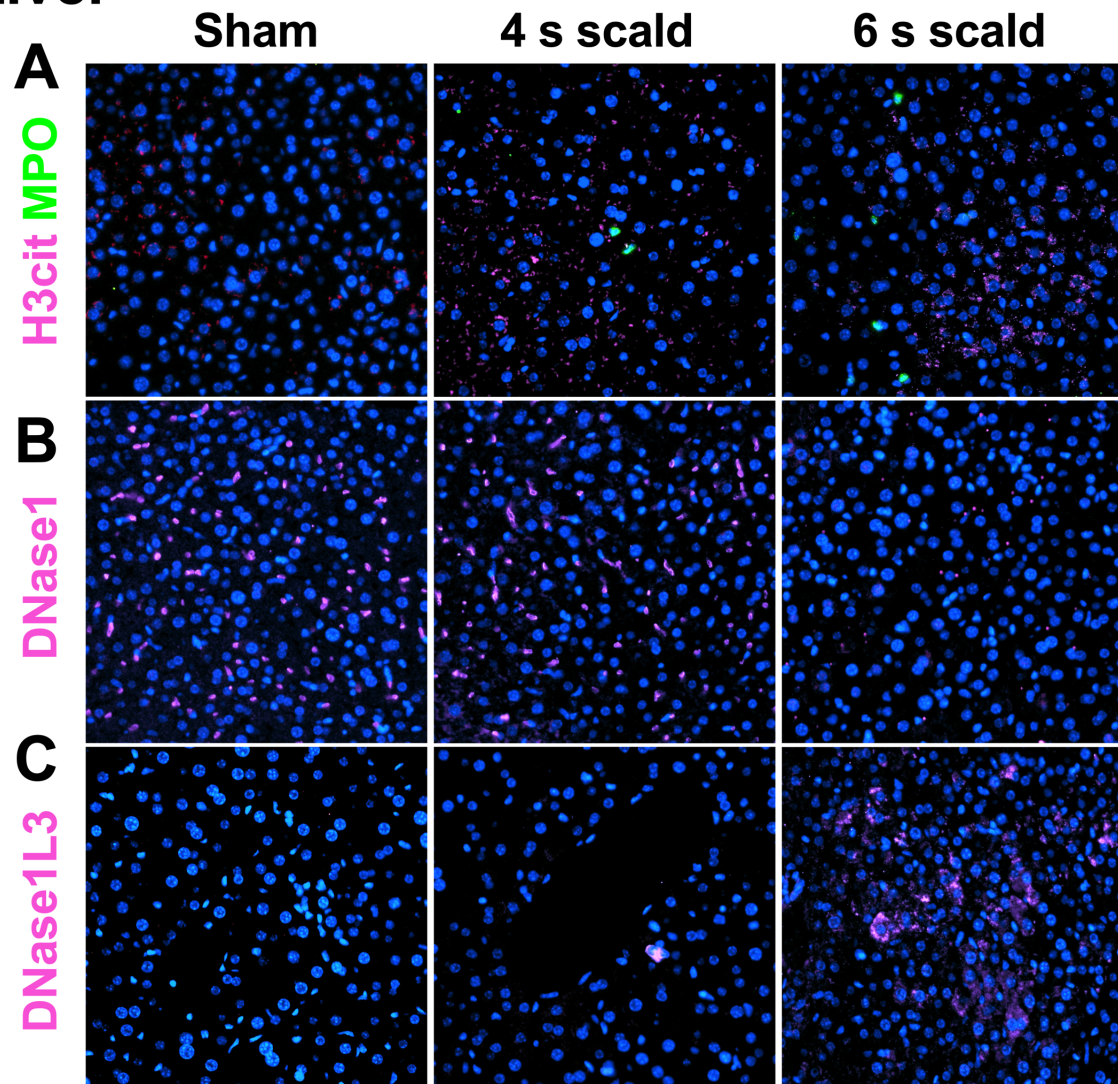


Abbildung S6B (entnommen aus Elrod et al. 2023). NETose, verringerte DNase1 und erhöhte DNase1L3 in der Leber nach 6 s Verbrühung. Dargestellt sind repräsentative, zusammengesetzte Bilder der IF-Färbung der Leber für H3cit/MPO (A), DNase1 (B) und DNase1L3 (C). Die DNA-Gegenfärbung wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Vergrößerungsstufe 40x.

6.20 Abbildung S6C

Lung

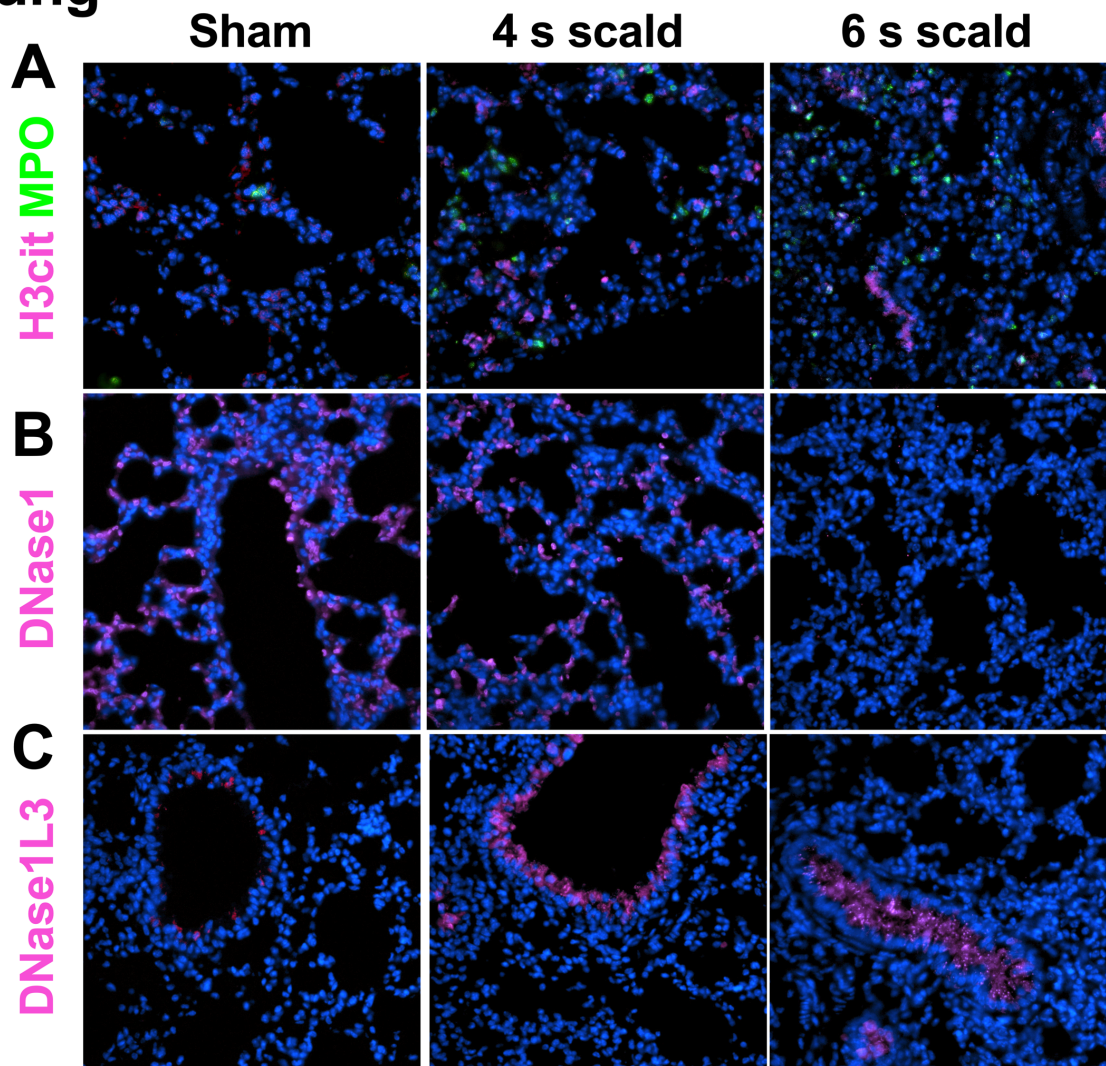


Abbildung S6C (entnommen aus Elrod et al. 2023): Die Verbrühung für 4 s und 6 s induziert die Bildung von NETs und die Hochregulation von DNase1L3. Dargestellt sind repräsentative, zusammengesetzte Bilder der IF-Färbung der Lunge für H3cit/MPO (A), DNase1 (B) und DNase1L3 (C). Die DNA-Gegenfärbung wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Vergrößerungsstufe 40x.

6.21 Abbildung S7

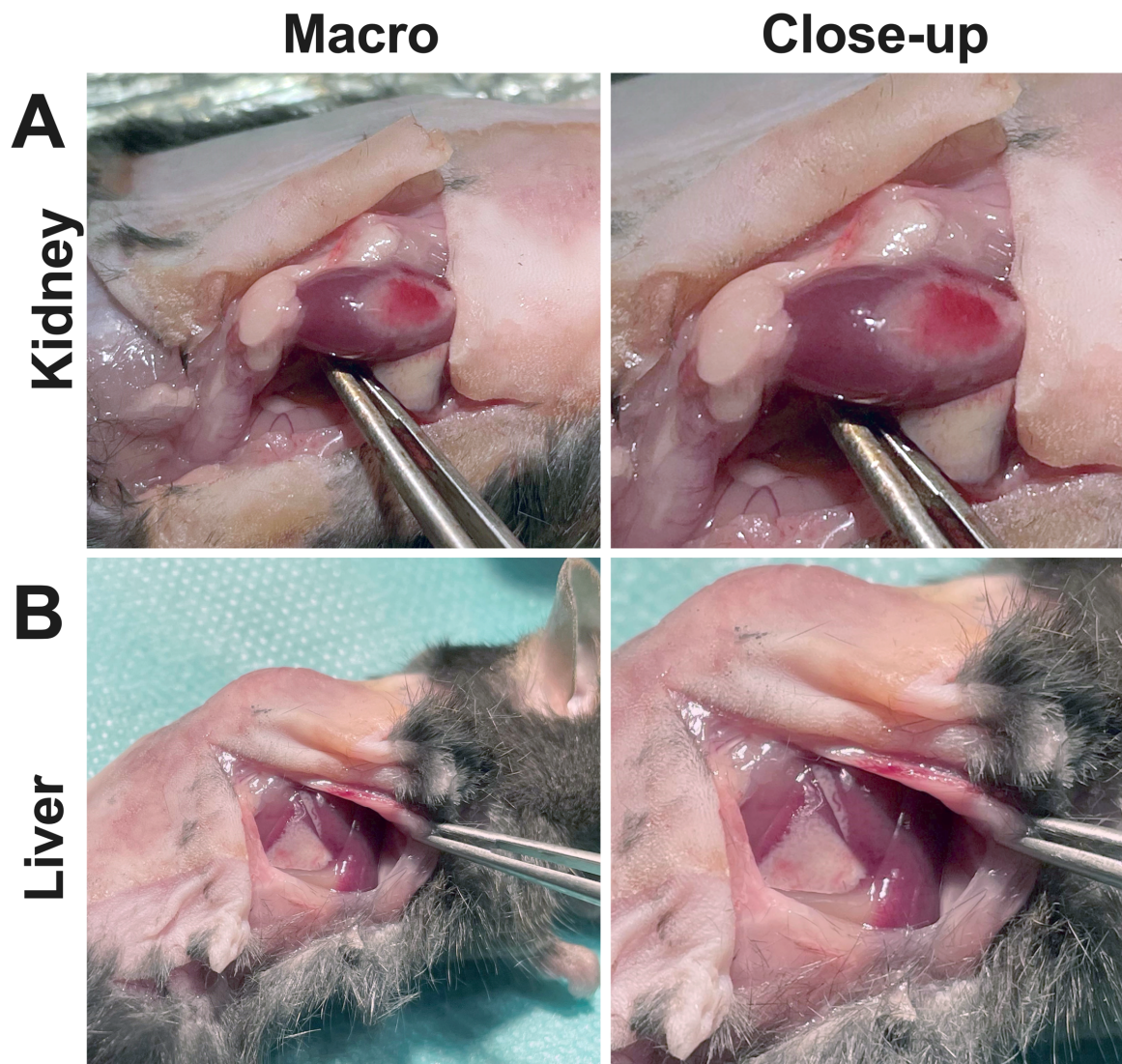


Abbildung S7 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Die 7 s Verbrühung verursacht Schäden an Nieren bzw. Leber in 2 von 5 Individuen. Dargestellt sind repräsentative makroskopische Bilder der Niere (A) und der Leber (B) von zwei Mäusen aus der Gruppe der 7 s Verbrühungen, die aufgrund einer hohen Belastung mittels vorzeitiger Euthanasie aus dem Versuch genommen werden mussten.

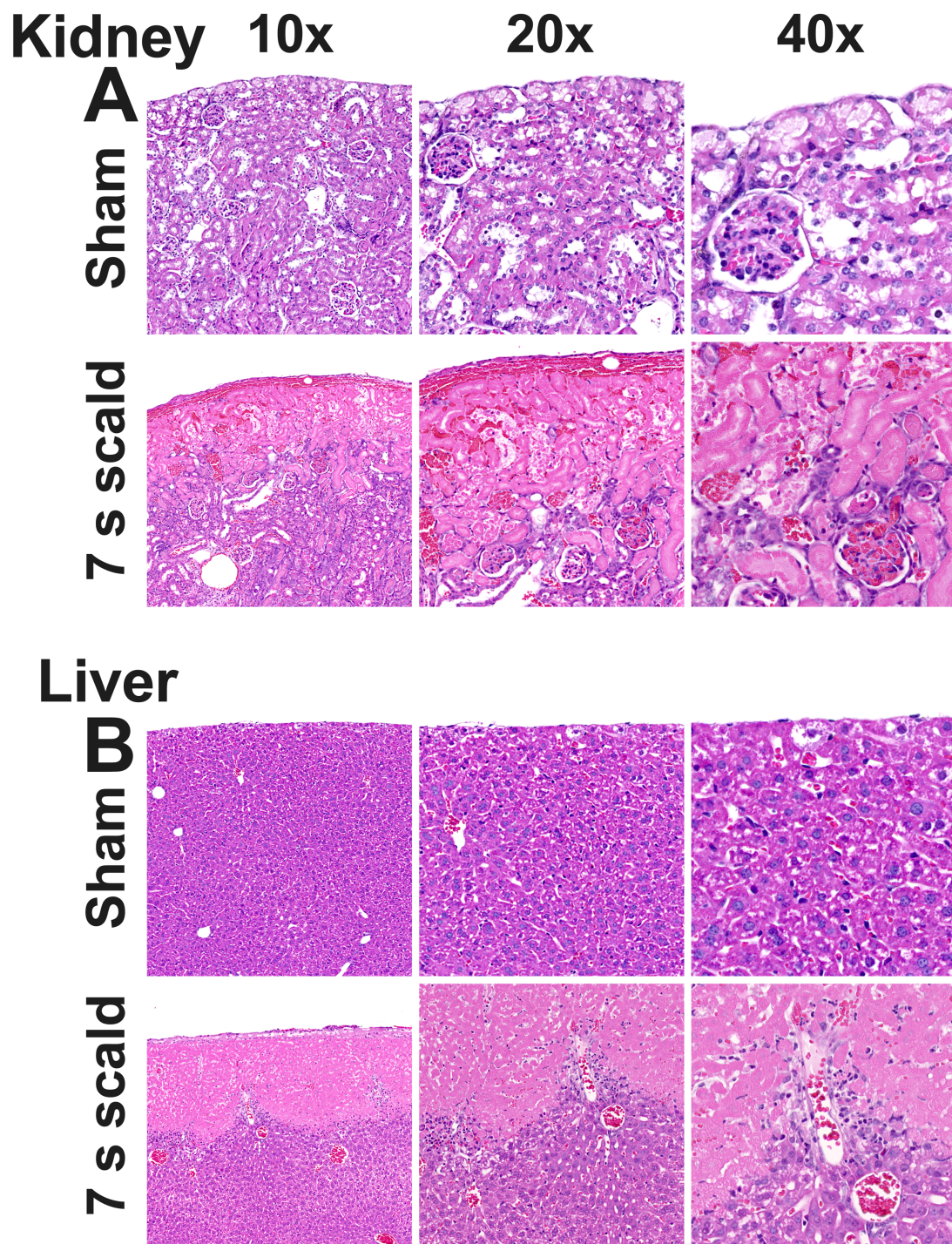


Abb. S8 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Eine 7 s Verbrühung verursacht einen scharf begrenzten nekrotischen Gewebeschäden in Niere und Leber. Dargestellt sind repräsentative histologische Bilder von Niere (A) und Leber (B) von zwei Mäusen aus der 7 s Verbrühungsgruppe, die aufgrund einer hohen Belastung vorzeitig euthanasiert werden mussten, im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind 10-, 20- und 40-fache Vergrößerungen.

6.23 Abbildung S9

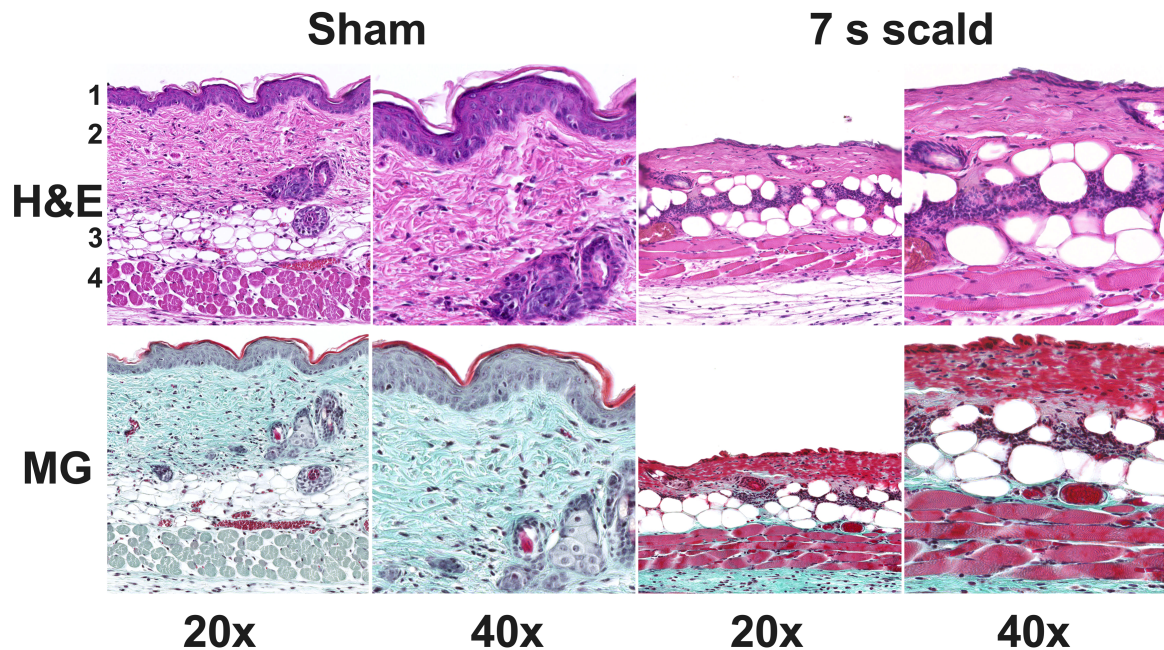


Abb. S9 (entnommen aus Elrod et al. 2023): Die histopathologische Auswertung zeigt eine Zerstörung der epidermalen und dermalen Hautschichten und eine ausgeprägte leukozytäre Infiltration nach 24 h. Gezeigt werden repräsentative Bilder in zwei Vergrößerungen von H&E und MG der Kontrollgruppe im Vergleich zur 7 s Verbrühung. Zur Orientierung sind die Hautschichten der Maus exemplarisch dargestellt (1: Epidermis, 2: Dermis, 3: dWAT, 4: *panniculus carnosus*). Es zeigt sich eine vollständige Zerstörung der Epidermis und ein Schrumpfen der Dermis.

7. Tabellenverzeichnis

7.1 Tabelle S1

Top 5 der hoch- und herabregulierten kodierenden mRNA-Moleküle in der Leber

Gen	Protein	Funktion	Log ₂ FC
Top 5 der hochregulierten Gene in der Leber			
Saa2	Serum amyloid A2	Akute-Phase-Protein	11,22
Saa1	Serum amyloid A1	Akute-Phase-Protein	9,65
Lcn2	Lipocalin-2	Neutrophile Granulozyten	8,57
Mt2	Metallothionein-2	Schwermetallbindung	7,85
Mt1	Metallothionein-1	Schwermetallbindung	6,26
Top 5 der herabregulierten Gene in der Leber			
Ugt1a9	UDP-Glucuronosyl-transferase 1-9	Glucuronidierung	-6,13
Atp2b2	Plasma Membrane Ca ²⁺ Transporting ATPase 2	Intrazelluläre Calciumhomöostase	-5,31
Ugt1a5	UDP-Glucuronosyl-transferase 1-5	Glucuronidierung	-5,30
Ushbp1	USH1 Protein Network Component Harmonin Binding Protein 1	PDZ-Domänen-Bindung	-5,00
A1bg	Alpha-1-B Glycoprotein	Angeborene Immunität	-5,00

Tabelle S1 (übersetzt entnommen aus Elrod et al. 2023): Dargestellt sind die Gene, die Proteinennamen, die Funktionen und die entsprechenden log₂FC-Werte. Die Funktionen der Proteine wurden aus der GeneCard-Datenbank des Weizmann Institute of Science entnommen.

7.2 Tabelle S2

Top 5 der hoch- und herabregulierten kodierenden mRNA-Moleküle in der Lunge

Gen	Protein	Funktion	Log ₂ FC
Top 5 der hochregulierten Gene in der Lunge			
Pla1a	Phospholipase A1 Member A	Hydrolysiert Fettsäuren	3,36
Apod	Apolipoprotein D	Bestandteil des High Density Lipoproteins	2,94
Ahsg	Alpha 2-HS Glycoprotein	Endozytoseförderung	2,85
Serpina1b	Alpha-1-Antitrypsin	Proteaseinhibitor	2,31
Ttr	Transthyretin	Schilddrüsenhormon- bindung	2,21
Top 5 der herabregulierten Gene in der Lunge			
Spon2	Spondin 2	Bindet Lipopolysaccharid	-2,81
Wisp2	WNT1-inducible- signaling pathway protein 2	Wachstumsfaktor des Bindegewebes	-2,72
Jchain	Joining Chain of Multimeric IgA/IgM	Bindet IgA	-2,64
Muc5b	Mucin 5B	Bestandteil der mukösen Sekretion	-2,55
Dio2	Iodothyronine Deiodinase 2	Konversion T4 zu T3	-2,53

Tabelle S2 (übersetzt entnommen aus Elrod et al. 2023): Dargestellt sind die Gene, die Proteinnamen, die Funktionen und die entsprechenden log₂FC-Werte. Die Funktionen der Proteine wurden aus der GeneCard-Datenbank des Weizmann Institute of Science entnommen.

7.3 Tabelle S3

Abrufbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1113948>

7.4 Tabelle S4

Abrufbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1113948>

7.5 Tabelle S5

Abrufbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1113948>

7.6 Tabelle S6

Abrufbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1113948>

7.7 Tabelle S7

Abrufbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1113948>

8. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Die vorliegende Studie wurde im kinderchirurgischen Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Eppendorf unter der Leitung von Prof. Konrad Reinshagen durchgeführt. Die Konzeption der Studie und die Formulierung der Tierversuchsanträge erfolgte durch Prof. Michael Boettcher, PD Dr. Julia Elrod und Moritz Lenz.

Die Tierversuche und die Prozessierung der Proben wurden von Moritz Lenz, PD Dr. Julia Elrod, Lina Armbrust und Antonia Kiwit durchgeführt. Dr. Laia Pagerols Raluy unterstützte die Tierversuche in organisatorischen Fragen und war als wissenschaftliche Laborleitung an der Etablierung der Versuche beteiligt.

Die Etablierung der Assays sowie die Analytik der Gewebe- und Blutproben wurden von Moritz Lenz durchgeführt. Die Versuche zur Detektion bakterieller Translokation wurden von Prof. Holger Rohde, PD Dr. Julia Elrod und Moritz Lenz konzipiert, durchgeführt und ausgewertet.

Die Vorbereitung der Objektträger und die konventionellen Färbungen erfolgten durch Kristin Hartmann (Mauspathologie Core Facility). Das Färbeprotokoll für die H3Cit/MPO-Doppelfärbung wurde von Lavinia Schönfeld etabliert. Alle IF-Färbungen wurden von Moritz Lenz durchgeführt. Moritz Lenz führte die mikroskopische und semiquantitative Auswertung aller Färbungen durch. Die Transkriptomanalyse wurde von einem externen Dienstleister (Beijing Genomics Institute, Shenzhen, China) durchgeführt.

Die statistische Auswertung, die Interpretation und die grafische Darstellung der Daten wurde von Moritz Lenz und PD Dr. Julia Elrod vorgenommen. Dr. Malik Alawi und Dr. Ceren Saygi entwickelten die statistische Auswertung der Transkriptomsanalyse und führten diese mit Moritz Lenz und PD Dr. Julia Elrod aus.

Das Manuskript wurde von Moritz Lenz und PD Dr. Julia Elrod verfasst. Prof. Konrad Reinshagen, Prof. Michael Boettcher, Prof. Martin Herrmann und Dr. Christoph Mohr trugen zur inhaltlichen und stilistischen Verfeinerung des Textes bei. Die hier vorliegende zusammenfassende Darstellung wurde durch Moritz Lenz verfasst.

9. Danksagung

Ich danke Prof. Konrad Reinshagen für die Ermöglichung des Themas, für die großzügige Bereitstellung der Mittel und für die engagierte Betreuung der Promotion.

Weiterhin danke ich Prof. Michael Boettcher für die Überlassung des Themas, die unkomplizierte Betreuung der Dissertation und die Einbindung in die Arbeitsgruppe. Danke für das Vertrauen, das Du mir entgegengebracht hast und dafür, dass Du immer eine Lösung parat hattest.

Vielen Dank auch Dir, PD Dr. Julia Elrod, für die Betreuung, den wissenschaftlichen Input und das Vertrauen in mich und meine Arbeit. Ich danke Dir für Deinen immerwährenden Optimismus, Deine pragmatische Art und Deinen kritischen Geist. Du hast das Feuer für die Wissenschaft in mir entfacht!

Ich bedanke mich bei Dr. Laia Pagerols Raluy für die alltägliche Betreuung im Labor und die gemeinsame kreative Lösung von technischen und organisatorischen Problemen. Weiterhin bedanke ich mich bei Birgit Appl und Magda Trochimiuk für die gute Einarbeitung im Labor und die Unterstützungen bei allen technischen Fragen.

Die große Expertise weiterer Einrichtungen des UKE hat in hohem Maße zu einem Gelingen der Doktorarbeit beigetragen. Ich danke Kristin Hartmann (Mauspathologie Core Facility), Dr. Christian Gorzelanny (Klinik für Dermatologie und Venerologie), Prof. Holger Rohde und seinem Team (Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene), Dr. Malik Alawi und Dr. Ceren Saygi (Bioinformatik Facility) sowie dem Team der Forschungstierhaltung.

Ein besonderer Dank gilt der Werner-Otto-Stiftung und der Georg & Jürgen Rickertsen Stiftung für die großzügige finanzielle Unterstützung des Projektes.

Ich bin sehr glücklich Euch, Lina Armbrust und Antonia Kiwit, im Labor kennengelernt zu haben. Wir haben zusammen die Höhen und Tiefen einer Doktorarbeit erlebt und sind Freunde fürs Leben geworden. Vielen Dank dafür!

Meinen besten Freunden, Paul Kretschmer und Leonie Korczanowski, danke ich für die treue Freundschaft, für die gemeinsamen Jahre im Studium und dafür, dass Ihr immer für mich da seid. Ich bin stolz darauf, wie wir unseren Weg bisher gegangen sind.

Liebe Sofia, ich danke Dir von ganzem Herzen dafür, dass wir uns gegenseitig durch das Studium und die Promotion getragen haben, zusammen unser Leben gestalten und gemeinsam Pläne für die Zukunft schmieden. Ich schätze Dein ehrliches Feedback und die neuen Blickwinkel, die Du mir immer wieder aufzeigst. Packen wir es zusammen an!

Ich danke ganz besonders meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung meines Lebensweges. Mami und Papi, Ihr habt ein unbeschreibliches Vertrauen in mich. Das gibt Sicherheit und Kraft.

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum

Unterschrift