

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Suppression intrahepatischer Inflammation durch Dexamethason-Nanokapseln  
in einem Gallengangsatriesiemodell der Maus

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Lorenz Messing  
aus Hannover

Mainz, 2021

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturdiskussion .....</b>	<b>3</b>
2.1 Gallengangsatresie .....	3
2.1.1 Beschreibung des Krankheitsbildes und Epidemiologie.....	3
2.1.2 Einteilung und mögliche Genesen.....	3
2.1.3 Pathologie der Gallengangsatresie .....	4
2.1.4 Klinische Symptome.....	5
2.1.5 Klinische Diagnostik .....	5
2.1.6 Therapie .....	6
2.1.7 Komplikationen und Prognose .....	7
2.2 Leberimmunologie.....	8
2.2.1 Anatomie der Leber und ihres Immunsystems .....	8
2.2.2 Leberinflammation.....	9
2.3 Gallengangsligatur im Mausmodell .....	10
2.3.1 Aufbau des Cholestase-Modells.....	10
2.3.2 Pathomechanismus.....	11
2.4 Dexamethason Nanokapseln .....	12
2.4.1 Wirkstoff .....	12
2.4.2 Nanokapseln .....	13
2.4.3 Synthese und Eigenschaften der Kapseln .....	13
2.5 Hypothesen .....	14
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
3.1 Material .....	15
3.2 Methoden .....	21
3.2.1 Nanokapseln .....	21
3.2.2 Bereitstellung der Mäuse und Tierschutz .....	21
3.2.3 Narkose.....	22

3.2.4 <i>In vitro</i> Tests.....	22
3.2.5 <i>In vivo</i> Tests.....	29
3.2.6 Versuchspläne .....	32
3.2.7 Statistik .....	33
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
4.1 NCs <i>in vitro</i> .....	35
4.1.1 Kapseldarstellung im FACS .....	35
4.1.2 NPC Suppression von IL-6 <i>in vitro</i> .....	35
4.1.3 Kapselaufnahme in der Zellkultur.....	36
4.1.4 Vergleich Nanokapseln – lösliches Dexamethason.....	37
4.1.5 Vergleich Nanokapseltypen .....	38
4.2 NCs <i>in vivo</i> .....	39
4.2.1 Zytokin Antwort und Kapselaufnahme.....	39
4.3 BDL .....	41
4.3.1 Zytokin Ausschüttung.....	41
4.3.2 Anstieg der Transaminasen .....	42
4.3.3 Zellinfiltration (NPC Isolation und FACS) .....	42
4.3.4 Cell Targeting.....	43
4.4 BDL – Therapie .....	44
4.4.1 Laborauswertung .....	44
4.4.2 Zellinfiltration .....	48
4.4.3 Histologie – Trichrom Färbung.....	49
4.4.4 Cell Targeting.....	50
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>52</b>
5.1 Charakterisierung der Dexamethason Nanokapseln .....	52
5.1.1 Austestung der Nanokapseln .....	52
5.1.2 NCs supprimieren <i>in vitro</i> Inflammation nach Phagozytose durch NPCs..	52
5.1.3 Vergleich der Kapselformulierung gegenüber löslichem Dexamethason ..	54
5.1.4 <i>In vivo</i> applizierte DXM-NCs supprimieren Zytokin-Response in NPCs....	55
5.2 Auswirkungen und Behandlung der Gallengangsligatur.....	56
5.2.1 Laborparameter.....	56
5.2.2 Zellinfiltration .....	60
5.2.3 Cell Targeting.....	63
5.2.4 Histologie .....	65

5.3 Repräsentativität und Limitationen .....	67
5.3.1 Alternative BDL-Modelle der Gallengangsatesie.....	67
5.3.2 Rotavirus-Modell .....	69
5.3.3 Vorteile der BDL als Gallengangsatesiemodell .....	69
5.3.4 Weitere Limitationen .....	70
5.4 Fazit und Ausblick .....	71
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>73</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>81</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>82</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BA	Biliary Atresia
BASM	Biliary atresia splenic malformation [Syndrom]
BDL	Bile Duct Ligation
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBA	Cytokine Bead Array
CD	cluster of differentiation
CK	Cytokeratine
CMV	Cytomegalovirus
DC	Dendritische Zelle
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
et al.	<i>lateinisch</i> „und andere“
etc.	<i>lateinisch</i> „und so weiter“
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
h	Stunden
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
i.v.	intravenös
IC	Infiltrierende Zellen
ICCS	Intracellular Cytokine Staining
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin

In vitro	<i>lateinisch</i> „im [Reagenz]Glas“
In vivo	<i>lateinisch</i> „im Lebenden“
KC	Kupferzelle
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Liver sinusoidal endothelial cells
MHC	major histocompatibility complex
n	Stichprobengröße/ Anzahl
NaCl	Kochsalzlösung
NC	Nanokapseln
NG	Neutrophile Granulozyten
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NPC	hepatic Non parenchymal cells
o.g.	oben genannt
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
Rpm	Revolutions per minute
sDXM	lösliches Dexamethason
SMA	smooth muscle actin
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like-Rezeptor (toll-like receptor)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
u.a.	unter anderem

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Illustration der durch BDL ausgelösten Pathomechanismen in 4 Abschnitten.....	12
Abbildung 2: Gating-Strategie der FACS Analyse. ....	26
Abbildung 3: Intraoperative Fotografie.....	29
Abbildung 4: Exemplarische Analyse eines Batches der genutzten DXM-NCs. ....	35
Abbildung 5: Suppression der IL-6 Ausschüttung von NPCs <i>in vitro</i> . ....	36
Abbildung 6: Vergleich der Kapselaufnahme anhand verschiedener Inkubationszeiten und NC-Konzentrationen. ....	37
Abbildung 7: Vergleich der IL-6 Suppression <i>in vitro</i> durch aufsteigende Konzentrationen von DXM-NCs und löslichem DXM.....	38
Abbildung 8: Vergleich der IL-6 Suppression <i>in vitro</i> durch aufsteigende Konzentrationen unterschiedlicher NC-Typen. ....	39
Abbildung 9: a) Anteil NC+ NPCs und der IL-6 Expression nach <i>in vivo</i> Gabe von NCs oder sDXM. b) Aufnahme DXM-Cy5-NCs durch verschiedene Zellpopulationen <i>in vivo</i> . ....	40
Abbildung 10: IL-6 Expression nach BDL gegenüber Kontrollen. ....	41
Abbildung 11: Laborchemische Auswertung der a) Transaminasen und b) Cholestase-Parameter <i>in vivo</i> .....	42
Abbildung 12: a) Vergleich der NPC-Subpopulationen nach BDL gegenüber Kontrollen. b) Exemplarische Dot-Plot Überlagerung der NPC-Population einer BDL Maus (rot) und einer Kontrollmaus (blau). ....	43
Abbildung 13: Vergleich der NC-Aufnahme von NPC Subpopulationen <i>in vitro</i> . . . .	44
Abbildung 14: Vergleich der Transaminasen nach BDL: NC- und DXM-Therapie mit Kontroll-BDL und Sham. ....	45
Abbildung 15: Vergleich der Zytokin-Sekretion nach BDL durch DXM-NCs, sDXM Kontrollen oder Sham. ....	47
Abbildung 16: Zellinfiltration verschiedener Zelltypen anhand der gesamten NPC-Population.....	48
Abbildung 17: Vergleich histologischer Leberschnitte in Trichromfärbung nach BDL/Sham. ....	49
Abbildung 18: Vergleich der Nekroseareale in histologischen Leberschnitten.....	50
Abbildung 19: Vergleich der <i>in vivo</i> NC-Aufnahme verschiedener Zellpopulationen.	51



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Lösungen .....	15
Tabelle2: FACS Antikörper .....	16
Tabelle 3: Angesetzte Puffer und Medien.....	17
Tabelle 4: Allgemeines und Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 5: Kits .....	19
Tabelle 6: Medikamente .....	19
Tabelle 7: Geräte .....	19
Tabelle 8: Software.....	20
Tabelle 9: FACS Färbungen .....	24
Tabelle 10: ICCS Färbung .....	28
Tabelle 11: Trichromfärbung Teil 1 .....	31
Tabelle 12: Trichromfärbung Teil 2.....	31

## 1 Einleitung

Gallengangsatresie ist eine Erkrankung, in der eine neonatale Cholangiopathie mit Obliteration des Gallengangs entsteht. Die Ursachen sind verschieden und teils ungeklärt. Die übliche Therapie ist die operative Wiederherstellung des Gallenabflusses (Kasai-Portoenterostomie). Sie hält jedoch einen zunehmenden Schaden der Leber nicht gänzlich auf. Daher ist die Gallengangsatresie die häufigste Ursache von Lebertransplantation im Kindesalter (Hopkins *et al.* 2017; Vij *et al.* 2020).

Die Gallengangligatur (englisch Bile Duct Ligation, BDL) ist ein etabliertes Tiermodell, eine experimentelle Cholestase in Mäusen und Ratten zu erzeugen. Dies eignet sich aufgrund der großen Reproduzierbarkeit und pathophysiologisch ähnlicher Prozesse zur Untersuchung einer Gallengangsatresie (Wang *et al.* 2014; Tag *et al.* 2015).

Nach einer Kasai-Operation wird häufig Dexamethason als adjuvante Therapie eingesetzt, um die anhaltende Fibrosierung und Entzündung der Leber zu hemmen. Trotzdem ist der Therapieerfolg meist nicht durchschlagend sowie mit systemischen Nebenwirkungen verbunden. Infektanfälligkeit, Entwicklungsverzögerung oder Cushing-Syndrom stellen übliche Folgen einer chronischen Glukokortikoid-Behandlung im Kindesalter dar (Tanaka *et al.* 2019).

Nanocarrier sind Substanzträger im Nanometer-Bereich. Sie sind Ziel zunehmender Studien, da sie eine gezielte, geschützte und effektive Abgabe eines Wirkstoffes oder bioaktiver Moleküle ermöglichen. Nanokapseltherapien wurden bereits in anderen Bereichen wie der Rheumatherapie oder Chemotherapie etabliert. Auch im Bereich Immunsuppression bzw. Antiinflammation besteht ein großes Interesse an Nanocarriern. Medikamenteneffekte können gesteuert und Nebenwirkungen reduziert werden (Musacchio *et al.* 2011; Patel *et al.* 2019).

Die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kapseln aus Wasser-in-Öl Miniemulsion wurde zuvor etabliert und beschrieben (Landfester 2009; Fichter *et al.* 2013). Als neue Formulierung der Nanokapseln konnten diese vollständig aus Dexamethason polymerisiert werden. Dies bietet vielversprechende Vorteile in der biologischen Abbaubarkeit und geringeren Toxizität. Es konnte in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden, dass die genutzten Kapseln *in vitro* von immunaktiven

Leberzellen aufgenommen werden. Zudem zeigte sich eine intrazelluläre Freigabe des Wirkstoffes und die Reduktion der Entzündungsaktivität (Fichter *et al.* 2013).

Die Leber als Organ zur Filterung des Blutes ist prädestiniert zur Aufnahme von einem Großteil intravenös applizierter Nanokapseln. Somit lässt sich eine gezielte Dexamethason Abgabe durch Nanokapseln in inflammatorische Leberzellen, wie Kupferzellen oder Makrophagen erreichen. Dies bietet neue Ansätze für die Therapie cholestatischer Erkrankungen wie der Gallengangsatresie (Pietrzak-Nguyen *et al.* 2014; Jiang *et al.* 2020).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welche Effekte Dexamethason Nanokapseln auf den cholestatischen Leberschaden nach Gallengangsligatur haben.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Gallengangsatresie

#### 2.1.1 Beschreibung des Krankheitsbildes und Epidemiologie

Gallengangsatresie (englisch biliary atresia, BA), ist eine fortschreitende obstruktive Cholangiopathie der extra- und intrahepatischen Gallenwege. Sie äußert sich primär mit Symptomen einer Cholestase wie Ikterus und blassem Stuhl. Die Ätiologie dieser Erkrankung ist heterogen. Therapeutisch ist sie meist nur operativ heilbar und verläuft unbehandelt häufig tödlich (Lakshminarayanan *et al.* 2016). Insgesamt ist diese Erkrankung die häufigste Ursache von Leberversagen nach Geburt, sowie die häufigste Indikation zur Lebertransplantation bei Kindern weltweit (Min *et al.* 2020; Vij *et al.* 2020). Studien gehen von einer Inzidenz zwischen 1 in 15.000 und 1 in 19.000 aus und sehen eine leichte Häufung beim weiblichen Geschlecht (Asai *et al.* 2015). In den USA gibt es Hinweise für eine leichte Zunahme der Inzidenz in den letzten Jahrzehnten (Hopkins *et al.* 2017).

#### 2.1.2 Einteilung und mögliche Genesen

Die Ursachen der Gallengangsatresie sind nicht abschließend geklärt. Es werden genetische und idiopathische Ursachen diskutiert (El-Araby *et al.* 2020). In diesem Sinne kann sie nach ihrem Auftreten in eine isolierte Form oder im Zusammenhang mit anderen Fehlbildungen als syndromale BA eingeteilt werden. Ortiz-Perez *et al.* beschreiben letztere als eine „embryonale/entwicklungsbedingte“ BA mit Auftreten schon im 1. Trimenon der Schwangerschaft (<20%) und auf der anderen Seite eine „perinatale/ erworbene“ BA (<80%) (Ortiz-Perez *et al.* 2020). Die embryonale BA tritt typischerweise in der Form eines BASM-Syndroms auf (Biliary Atresia Splenic Malformation), welches eine BA und das Vorhandensein einer Poly- oder Asplenie einschließt (Petersen *et al.* 2013). Diese Entität hat eine schlechtere Prognose als Patienten mit einer isolierten BA und kann zudem mit weiteren Defekten, beispielsweise des Herz-Kreislaufsystems assoziiert sein (Ortiz-Perez *et al.* 2020).

Davenport *et al.* beschreiben neben der isolierten und syndromalen BA die weitere Einteilung in eine cystische BA und Cytomegalie (CMV)- assoziierte BA (Davenport 2012). Letztere ist mit einer perinatalen Infektion assoziiert und äußert sich mit

positiver Serologie (IgM Antikörper). Neuere Studien legen deutlich mehr Viren als mögliche Ursachen nahe. Auch eine Infektion mit Rotaviren, Reoviren, humanen Herpesviren, humanen Papillomaviren, Adenoviren, Epstein-Barr Viren, Hepatitis B Viren und Parvovirus B19 kann in der Pathogenese der BA als Trigger fungieren. Die Assoziation mit CMV, Reoviren und Rotaviren wurden in diesem Zusammenhang in der Literatur am ausgeprägtesten analysiert (Vij *et al.* 2020). Zu welchem Zeitpunkt diese Virusinfektionen stattfinden müssen und welche weiteren Faktoren dabei zum Auslösen einer BA führen, ist noch weitgehend unbekannt (Petersen *et al.* 2013; Hopkins *et al.* 2017).

Die Gallengangsatriesie kann zudem nach Befallsmuster in intra- und extrahepatisch eingeteilt werden. Bei extrahepatischer BA sind die Gallengänge meist vollständig obstruiert, das Epithel ist segmental bis vollständig betroffen. Bei intrahepatischer BA sind die Gallengänge meist hypoplastisch in die Portaltrakte der Leber eingebettet und von mehrkernigen Hepatozyten umgeben. Die Gallengänge sind dabei entzündlich und fibrotisch verändert (Asai *et al.* 2015). Dies findet sich jedoch in der weiteren Literatur häufig nicht wieder, da meist ein Befall intra- und extrahepatischer Gallengänge vorliegt und andere Einteilungen vorgezogen werden.

### 2.1.3 Pathologie der Gallengangsatriesie

Generell führen entzündliche und fibrotische Veränderungen des Gewebes zur Obstruktion der Gallenwege (Asai *et al.* 2015). Die Immunreaktion auf zellulärer Ebene lässt sich dabei in unterschiedliche Bereiche differenzieren. Cholangiozyten besitzen neben ihrer Funktion als physikalische Begrenzung der Gallengänge auch eine immunologische Funktion. Eine Vielzahl Rezeptor-vermittelter Signalwege ermöglichen ihnen bereits eine Aktivierung der Immunantwort. Diese kann bspw. im Rahmen einer Virusinfektion auftreten. Zugleich wird dabei in Makrophagen wie Kupferzellen oder dendritische Zellen eine antivirale Reaktion gestartet. Diese schränkt durch autokrine und parakrine Ausschüttung von Zytokinen die Ausbreitung des Virus ein (Ortiz-Perez *et al.* 2020).

Dieses pro-inflammatorische Milieu rekrutiert und aktiviert weitere Immunzellen. Infolgedessen greift ein Teil der aktivierten inflammatorischen Zellen das Gallengangsepithel an. Dies wird durch Interferon- $\gamma$  vermittelt und geschieht mit Hilfe von Zytokinen und zytotoxischen Substanzen. Dabei induzieren NK-Zellen den Zelltod der

Cholangiozyten, nachdem sie durch dendritische Zellen aktiviert wurden. Auf ähnliche Weise geschieht dies innerhalb einer Epithelinvasion durch aktivierte neonatale CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die nekrotisierenden oder apoptotischen Zellen setzen damage-associated molecular patterns (DAMPs) frei. IL-33 als eines davon kumuliert in der extrazellulären Matrix und fördert Inflammation und Fibrose (Ortiz-Perez *et al.* 2020; Vij *et al.* 2020).

Im Verlauf zeigt sich eine duktale Proliferation und zunehmende Obstruktion der Gallenwege. In diesem Rahmen wurde Cytokeratin 7 (CK7) als Marker identifiziert und die Anzahl CK7<sup>+</sup> Zellen nimmt zu. Die geschädigten Cholangiozyten, sowie die im entzündlichen Milieu aktivierten Immunzellen setzen pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  oder IL-6 frei. Immunhistochemisch lässt sich dadurch eine erhöhte Zellinfiltration durch Immunzellen darstellen. Insbesondere um die Portalfelder verstärkt dies die Entzündungsreaktion. Hepatische Sternzellen proliferieren und transformieren zu Myofibroblasten. Diese spielen eine entscheidende Rolle im Aufbau extrazellulärer Matrix und somit in der Ausbildung einer Leberfibrose.  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) ist ein intrazellulär exprimierter Marker für die Aktivität der Myofibroblasten (Vij *et al.* 2020).

#### 2.1.4 Klinische Symptome

Eine BA präsentiert sich mit zunehmendem neonatalem Ikterus, acholischen Stühlen und Dunkelverfärbung des Urins. Ansonsten zeigt sich initial meist ein gesundes Erscheinungsbild. Im Verlauf können eine Gedeihstörung, Hepatomegalie oder Bauchumfangzunahme durch Aszites auf eine BA hinweisen. Die Symptome treten meist in den ersten Wochen bis Lebensmonaten auf. Durch fehlende Resorption fettlöslicher Vitamine entsteht ein Vitamin-K-Mangel. Auch eine dadurch ausgelöste Hirnblutung kann ein erstes Symptom der Erkrankung sein (Baumann *et al.* 2002). Bei Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu chronischen Veränderungen des Lebergewebes (Asai *et al.* 2015; Lakshminarayanan *et al.* 2016).

#### 2.1.5 Klinische Diagnostik

Laborchemisch können im Rahmen einer BA erhöhte Leberparameter wie Transaminasen, Gamma-Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) sowie erhöhte Bilirubinwerte gemessen werden (Baumann *et al.* 2002). Ein weiteres diagnostisches Verfahren ist

die Sonographie, bei der die Gallenblase meist schwierig darstellbar ist. Das „triangular cord sign“ ist ein bedeutender Hinweis auf eine BA und stellt den verschlossenen Ductus hepaticus communis dar. Jedoch schließt ein sonographisch unauffälliger Befund eine BA nicht aus. (Baumann *et al.* 2002; Imanieh *et al.* 2009).

Zur Diagnosestellung wird meist die transkutane Leberbiopsie angewendet, dessen Auswertung je nach Erfahrung des Pathologen eine Sensitivität von 65-95% erreicht. Sie kann sich aber in manchen Fällen als schwierig darstellen (Davenport 2012). Auch eine hepatobiliäre Sequenzszintigraphie ist eine weitere diagnostische Möglichkeit, bei der die eingesetzten Tracer im positiven Fall nicht ausgeschieden werden können (Baumann *et al.* 2002). Beweisend für eine BA ist die in diesem Alter schwierige endoskopische retrograde Cholangiopancreatographie (ERCP) oder eine operative Cholangiographie durch Laparoskopie oder Laparotomie (Davenport 2012).

#### 2.1.6 Therapie

Die Therapie der Wahl ist eine Hepato-Porto-Jejunostomie nach Morio Kasai, die Mitte des 20. Jahrhunderts entwickelt worden ist. Durch das Fortschreiten der Erkrankung und damit einhergehender Leberschädigung ist eine frühe Operation entscheidend. Sie sollte im besten Fall vor dem 60. Lebensjahr oder früher durchgeführt werden (McKiernan *et al.* 2000). Dadurch kann eine initiale Bilirubin-Clearance von 70-80% der Patienten erreicht werden. Nach 90 Lebensjahren erreichen dies nur noch 25% (Feldman *et al.* 2015). Etwa ein Drittel der Patienten kann nach erfolgreicher und rechtzeitiger Operation mit ihrer nativen Leber ein Alter von 10 Jahren erreichen, etwa ein Viertel ein Alter von 20 Jahren (Chardot *et al.* 2006).

Im Zuge der Operation erfolgt die Abtrennung der extrahepatischen Gallenwege und eine Darm-Schleifenrekonstruktion mittels Y-Roux-Schlinge, welche auf die Leberpforte aufgesetzt wird. Hierdurch kann der Gallenabfluss gesichert werden (Kasai 1974). Dies zögert den Verlauf der Erkrankung und somit die Notwendigkeit einer Lebertransplantation hinaus.

In der konservativen Therapie nach fehlgeschlagener oder (zu) später operativer Intervention müssen Komplikationen durch eine fortschreitende Leberinsuffizienz reduziert werden. Auch nach rechtzeitiger und erfolgreicher Operation wird in Revisionsoperationen häufig eine Fibrose, vor allem der Leberpforte, gesehen.

Supportive Ernährungstherapie und Substitution der essenziellen fettlöslichen Vitamine spielen dabei eine wichtige Rolle. Im Verlauf kommt es in den meisten Fällen durch einen vermehrten Rückstau der Galle und die dadurch ausgelösten inflammatorischen Prozesse zur Leberzirrhose. Dies führt zu einer Indikation einer Lebertransplantation. Stringer *et al.* gehen hierbei von 70% der betroffenen Patienten aus (Stringer *et al.* 2007). Somit ist die BA die häufigste Ursache einer pädiatrischen Lebertransplantation (Asai *et al.* 2015).

Postoperativ werden häufig adjuvante Steroidtherapien eingesetzt. Diese erfolgen mit dem Ziel einer Reduzierung periduktaler Inflammation und Ödeme und dadurch einer Verbesserung des Gallenabflusses. Meta-Analysen zeigten eine verbesserte Bilirubin-Clearance, vor allem kurzzeitig (<1 Jahr) nach Kasai-Operation (Chen *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2017). Tanaka *et al.* konnten insbesondere bei Patienten mit postoperativ initial schlechter Clearance einen Vorteil durch Steroidtherapie erkennen (Tanaka *et al.* 2019).

Stringer *et al.* sahen ein deutlich verbessertes Outcome nach Portoenterostomie durch den kurzen Einsatz von Dexamethason über 15 Tage in Kombination mit einer Dauertherapie mit Ursodeoxycholsäure (Stringer *et al.* 2007).

Eine langfristige Zunahme der Clearance sowie der Überlebens-Rate durch eine Kortison-Monotherapie nach Kasai-Operation als auch eine Abnahme der Notwendigkeit zur Transplantation konnten in Studien nicht gezeigt werden. So konnte auch eine 2018 durchgeführte Cochrane-Metaanalyse im Langzeiteffekt der Therapie mit Glukokortikoiden keinen Unterschied zur Placebo-Gruppe feststellen (Tyraskis *et al.* 2018). Zu beachten sind auch Nebenwirkungen durch die Therapie im Rahmen einer Einschränkung der allgemeinen Entwicklung, des Wachstums oder der Entstehung eines Cushing-Syndroms. Auch eine Zunahme der postoperativen Komplikationen durch die immunsuppressionsbedingte höhere Infektanfälligkeit und schlechtere Wundheilung ist nicht auszuschließen. (Bezerra *et al.* 2014; Alonso *et al.* 2018).

### 2.1.7 Komplikationen und Prognose

Der Behandlungserfolg hängt vom Diagnosezeitpunkt und interindividuellem Erfolg der operativen Therapie ab (Kumar *et al.* 2019). Zu Komplikationen gehören Cholangitis,



portale Hypertension mit daraus resultierenden Ösophagusvarizen und Aszites (Davenport 2012). Ohne Therapie führt die BA zur Leberzirrhose. Diese endet meist in den ersten Lebensjahren tödlich (Baumann *et al.* 2002).

Zu den prognostischen Faktoren gehören das Alter des Kindes bei Kasai-Operation, die Erfahrung des Operateurs, postoperative Cholangitits, das Vorhandensein einer Leberzirrhose sowie noch unklare genetische Faktoren (Shneider *et al.* 2006; Yassin *et al.* 2020).

Die Prognose fällt je nach Begleiterkrankungen schlechter aus, zum Beispiel bei Patienten mit BASM (Tanaka *et al.* 2019).

## 2.2 Leberimmunologie

### 2.2.1 Anatomie der Leber und ihres Immunsystems

Die Leber ist in ihrer Mikroanatomie aufgebaut, um antigen- und nährstoffreiches Blut aus dem Magen-Darmtrakt durch ein System aus Sinusoiden zu filtern. In diesem Netzwerk befinden sich antigenpräsentierende Zellen und Lymphozyten. Diese bilden die erste immunologische Barriere der Leber aus und regulieren in großem Maße die Immunantwort der Leber. Die gesunde Leber besteht aus unterschiedlichen Zelltypen leberständiger Zellen. Den Großteil machen hier Hepatozyten mit etwa 2/3 aller Leberzellen aus. Sie bilden das Leberparenchym. Daneben steht die im Folgenden beschriebene diverse Population von immunologisch aktiven nicht-parenchym-Zellen (englisch non parenchymal cell = NPC). Diese bestehen zum größten Anteil aus Lebersinusoid Endothelzellen (englisch liver sinusoidal endothelial cells = LSEC), Kupferzellen (KC) und intrahepatische Lymphozyten. Hepatische Sternzellen, Gallengangzellen, Gefäßendothelzellen, hepatische Progenitorzellen und dendritische Zellen sind als NPCs in geringerer Anzahl vorhanden. In einer geschädigten oder entzündlich veränderten Leber können sich diese Verhältnisse verschieben. Dies geschieht mittels Zellinfiltration zu Gunsten von Granulozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und Lymphozyten (Racanelli *et al.* 2006; Mohar *et al.* 2015).

Lymphozyten finden sich bereits in der gesunden Leber durch das Parenchym, sowie in den Portalfeldern verteilt. Sie werden in konventionelle und nicht-konventionelle Subpopulationen des in der Leber besonders deutlich ausgeprägten „angeborenen“

Immunsystems (natürlichen Killerzellen (NK) und NK-T Zellen) und des „adaptiven“ Immunsystems (T- und B-Zellen) aufgeteilt. Beide Seiten beinhalten eine diverse Population von T-Zellen, welche auf MHC (= major histocompatibility complex) Molekülen gebundene Antigene erkennen. Die MHC Moleküle werden von Antigen-präsentierende Zellen exprimiert. In der Leber sind dies vor allem Kupfferzellen, LSECs und dendritische Zellen (Racanelli *et al.* 2006).

LSECs machen etwa 50% der NPCs aus und kleiden die Lebersinusoide aus. Dabei lassen sie kleine Lücken in den dahinter liegenden Disse-Raum. Somit kann das Blutplasma ungehindert zu den Hepatozyten strömen, während Blutzellen nicht durch die Lücken hindurch passen. Dendritische Zellen (DCs) spielen in der Immunmodulation der gesunden Leber eine untergeordnete Rolle. Sobald sie aktiviert sind, migrieren sie mit den aufgenommenen Antigenen in extrahepatische Lymphknoten und präsentieren diese dort (Racanelli *et al.* 2006).

Kupfferzellen machen etwa 20% der NPCs aus und befinden sich hauptsächlich innerhalb der Lebersinusoide. Dort haben sie die zentrale Funktion per Phagozytose Toxine und Antigene aus dem Blutstrom zu filtern. Kupfferzellen modulieren aus dieser Position heraus die Immunantwort der Leber. Sie haben eine proinflammatorische Funktion nach Aktivierung zu ihrem klassischen M1 Phänotypen. Dies geschieht zum Beispiel durch bakterielles LPS (Lipopolysaccharide). M1 KCs schütten Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 oder Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  aus, was zur Aktivierung von Lymphozyten und zur raschen Infiltration von Immunzellen aus dem Blut in die Leber führt. Auf der anderen Seite können Kupfferzellen die Immunantwort als alternativer M2 Phänotyp selektiv herunter regulieren. Dies erfolgt zum einen durch eine Zytokin-vermittelte Hemmung der T-Zell Aktivierung. Zum anderen hemmen sie die Rezeptor-vermittelte Antigenaufnahme der LSECs und DCs. So regulieren Kupfferzellen auch die Lebertoleranz gegenüber Antigenen. Die Balance zwischen M1 und M2 Kupfferzellen spielt eine zentrale Rolle in der Leberpathologie (Duwaerts *et al.* 2013; Sato *et al.* 2016).

### 2.2.2 Leberinflammation

Gehring *et al.* verglichen BDL-Mäuse nach Kupfferzell-Depletion gegenüber BDL-Mäusen mit IL-6- oder TNF- $\alpha$ -Mangel. Es zeigten sich nach BDL deutlich höhere Inflammation und Leberschäden in den Mäusen ohne KCs oder mit IL-6-Mangel. Dies

lässt auf eine protektive Wirkung der Kupfferzellen in der Cholestase schließen, welche die Expression von IL-6 einbezieht (Gehring *et al.* 2006).

Die durch Inflammation ausgelöste Zellinfiltration in die Leber wird zusätzlich durch chemotaktische Zytokine gesteuert, die von multiplen Leberzelltypen wie u.a. Kupfferzellen, LSECs und hepatischen Sternzellen ausgeschüttet werden. Infiltrierende Immunzellen exprimieren spezifische Zytokinrezeptoren. Sie werden durch deren Bindung an die jeweiligen Zytokine aktiviert (Karlmark *et al.* 2008).

In der entzündeten Leber spielen nach Infiltration neben den Kupfferzellen noch inflammatory mononuclear phagocytes (iMNP) eine wichtige Rolle in der Entstehung der weiteren Leberentzündung und Fibrose. iMNP exprimieren ebenso Zytokine und Chemokine (z.B. IL-6). Sie haben aber eine deutlich pro-inflammatorische Wirkung im Vergleich zu Kupfferzellen. Die Infiltration und Aktivierung der iMNP wird durch die Kupfferzellen gesteuert. Zur Differenzierung der Zelltypen in der Maus unterscheiden sich KCs mit den Oberflächenmarkern F4/80<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, CD115<sup>+</sup>, CD11b<sup>-/lo</sup>, Ly-6C<sup>lo</sup> von denen der iMNP mit F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>hi</sup> (Duwaerts *et al.* 2013).

Auf die Pathomechanismen der BDL- und somit Cholestase -induzierten Inflammation wird in 2.3.2 eingegangen.

## 2.3 Gallengangsligatur im Mausmodell

### 2.3.1 Aufbau des Cholestase-Modells

Die Gallengangsligatur (englisch bile duct ligation = BDL) ist eine etablierte Methode zur Untersuchung von cholestatischen Leberpathologien und wird häufig bei Nagetieren, insbesondere Mäusen und Ratten, im experimentellen Setting durchgeführt (Yokota *et al.* 2018). Das Modell hat eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, wenn es durch darin geschultes Personal durchgeführt wird (Tag *et al.* 2015).

Die vollständige BDL wird durch Ligatur des Ductus choledochus erreicht und führt nach wenigen Stunden zur obstruktiven Cholestase sowie zur Leberentzündung. Nach 2-3 Wochen folgt der fibrotische Umbau der gesamten Leber, welcher bis zur Zirrhose des Lebergewebes führt (Georgiev *et al.* 2008; Tag *et al.* 2015; Xie *et al.* 2017).

Eine ausführliche Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Methode erfolgt unter 3.2.5.1.

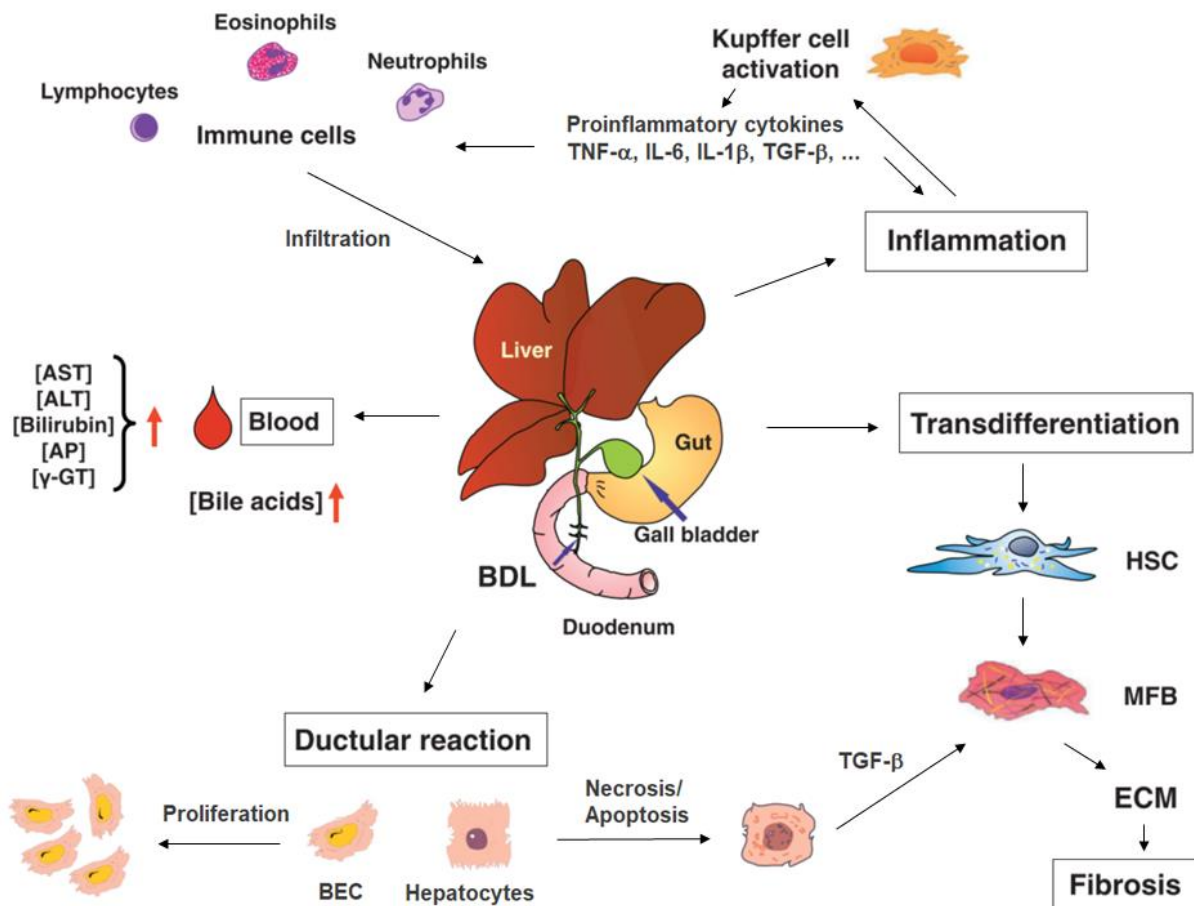
### 2.3.2 Pathomechanismus

Die Cholestase nach BDL lässt sich in mehrere, teils überlappende Phasen einteilen, zunächst eine akute Phase, auf die eine Immunreaktion folgt. Im Verlauf entstehen als dritte Phase fibrotische Veränderungen (Jang *et al.* 2012).

Als Folge der Cholestase werden im Rahmen der gestauten Gallensäuren pro-inflammatorische Mediatoren freigesetzt (Zhang *et al.* 2012). Dadurch entsteht eine reaktive Proliferation der Gallengangsepithelzellen [Ductular reaction]. Teile der umgebenden Hepatozyten nekrotisieren oder lösen Apoptose aus (Miyoshi *et al.* 1999). Die untergehenden Zellen setzen Wachstumsfaktor Beta (englisch transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) frei, wodurch Myofibroblasten aktiviert werden. Bei länger andauernder Leberschädigung werden hepatische Sternzellen zu den genannten  $\alpha$ -SMA positiven Myofibroblasten ausdifferenziert [Transdifferenzierung]. Unter Aktivierung führt dies im Verlauf zur vermehrten Bildung von Kollagenen und somit zum Aufbau der extrazellulären Matrix und schließlich zur Fibrose (Tag *et al.* 2015).

Des Weiteren wird durch die Cholestase eine Entzündungsreaktion gestartet [Inflammation]. In dessen Rahmen werden Kupfferzellen der Leber aktiviert, die entzündungsfördernde Zytokine wie IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TGF- $\beta$  freisetzen. Diese bewirken eine Infiltration von Immunzellen aus der Blutbahn in die Leber (Karlmark *et al.* 2008).

Aufgrund der zuvor beschriebenen Prozesse steigen die laborchemischen Leberparameter wie zum Beispiel die Alanin-Aminotransferase (ALAT), die Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Bilirubin oder  $\gamma$ -GT. Bei anhaltender BDL kann es zu sekundären Organschädigungen kommen, zum Beispiel Nierenschädigung. (Georgiev *et al.* 2008; Tag *et al.* 2015; Xie *et al.* 2017)



**Abbildung 1: Illustration der durch BDL ausgelösten Pathomechanismen in 4 Abschnitten.** Ductular reaction, 2. Transdifferentiation, 3. Inflammation und 4. Blood. Abkürzungen: BEC (Biliary epithelial cells) = Gallengangs Epithelzellen, TGF-β (Transforming Growthfactor beta) = Transformierender Wachstumsfaktor, HSC (hepatic stellate cells) = Lebersternzellen, MFB (myofibroblasts) = Myofibroblasten, ECM (extracellular matrix) extrazelluläre Matrix. Modifiziert nach (Tag *et al.* 2015).

## 2.4 Dexamethason Nanokapseln

### 2.4.1 Wirkstoff

Dexamethason (DXM) ist ein synthetisches Glucocorticoid mit einer ausgeprägten immunsuppressiven und anti-inflammatorischen Wirkung. Diese verläuft zum größten Teil über die Hemmung spezifischer Eigenschaften von Leukozyten, sowie Reduktion der Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine. Zudem besteht ein breites Anwendungsspektrum und klinisch große Bedeutung. Im Vergleich zu Kortison hat DXM eine etwa 25-fach höhere Wirkung (Meikle *et al.* 1977; Parente 2017).

#### 2.4.2 Nanokapseln

In der Erforschung neuer Wege zur Applikation und damit alternativer Pharmakokinetik haben Nanocarrier an Bedeutung gewonnen. Eine biomedizinisch wirksame Substanz kann dadurch in einem schützenden Träger verpackt und am gewünschten Zielort freigesetzt werden. Es folgt eine selektive Anreicherung des Wirkstoffs in einem gewünschten Organ, beziehungsweise in spezifischen Zellen (=Targeted Delivery). Somit entsteht im Gegenzug eine relative verminderte Konzentration der Kapseln in Organen/Zellen mit geringer Kapselaufnahme. Die dadurch erhoffte Reduktion von Nebenwirkungen im Gegensatz zu einer systemischen Therapie sind ein weiterer Grund für das Interesse an Nanocarriern. Es besteht ein breites Spektrum an möglichen verpackten Substanzen wie Proteine, DNA oder Arzneimittel. Verschiedene Formen von Trägern sind dabei Liposome, Partikel, Micellen oder auch Kapseln. Der Anspruch an den Träger ist dabei neben der erhaltenen Wirkung der Substanz die biologische Abbaubarkeit des Trägers im Körper (Musacchio *et al.* 2011).

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Nanokapseln (englisch Nanocapsule = NC) beschrieben.

#### 2.4.3 Synthese und Eigenschaften der Kapseln

Das Verfahren der inversen Miniemulsion ermöglicht die Synthese von Nanokapseln aus Biomolekülen. Das Ergebnis ist dabei eine stabile Kapselstruktur, welche gänzlich aus Dexamethason aufgebaut ist und eine Kern-Hülle-Morphologie aufweist (Landfester 2009). Es besteht ein zunehmendes Verständnis über die Mechanismen der Kapselaufnahme in die Zellen und die Freisetzung dessen Wirkstoffe. Die weitere Forschung in diesem Gebiet schließt sich den teilweise ungeklärten Fragen nach dem Abbau der Kapselüberreste, der Kapselinteraktion mit körpereigenen Proteinen und der Verteilung der Kapseln im Körper an (Landfester *et al.* 2013).

Dabei wurde eine Nanokapselgröße von zwischen 200 – 300 nm erreicht, welche sich als geeignet für die Aufnahme in hepatischen Phagozyten darstellte. Mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop konnte die Kapselaufnahme in die Zellen und die Freisetzung dessen Inhalt nachgewiesen werden (Tomcin *et al.* 2014). Die Zytokin-Analyse mittels ICCS zeigte eine Reduktion der Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Leberzellen mit zuvor aufgenommenen Kapseln (Fichter *et al.* 2013).

## 2.5 Hypothesen

Dexamethason Nanokapseln werden *in vivo* von phagozytierenden Zellen der Leber aufgenommen. Im Rahmen eines akuten Leberschadens durch Cholestase haben sie anti-inflammatorische Wirkung und modulieren die Immunantwort der Leber.

Es ergaben sich folgende weitere Fragestellungen:

- In welche Leberzellen werden die Kapseln aufgenommen?
- Welchen Effekt haben die Nanokapseln auf die Ausschüttung von Zytokinen und laborchemischen Leberparametern?
- Ändert sich durch die Nanokapseltherapie die entzündliche Zellinfiltration in die Leber?
- Reduzieren die Nanokapseln eine Leberschädigung und lässt sich diese Reduktion histologisch darstellen?
- Ist der Effekt der Nanokapseln auf eine cholestatiche Leberinflammation vergleichbar mit der Wirkung von löslichem Dexamethason?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Tabelle 1: Chemikalien und Lösungen

Name	Hersteller	Katalognummer
10x Coating Buffer	eBioscience	San Diego, CA, USA
10x PBS	Sigma-Adrich	Steinheim, DE
1N HCL	Carl Roth Gmbh	Karsruhe, DE
2.4G2	Becton, Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
250x Avidin-HRP	eBioscience	San Diego, CA, USA
250x Capture AB	eBioscience	San Diego, CA, USA
250x Detection AB	eBioscience	San Diego, CA, USA
2-mercaptoethanol	Gibco, Life Technologies	Carlsbad, CA, US
3.0 g Aniline Blue	Carl Roth Gmbh	Karsruhe, DE
5x ELISA/ELISPOT Diluent	eBioscience	San Diego, CA, USA
70% Ethanol	Carl Roth Gmbh	Karsruhe, DE
96% Ethanol	Carl Roth Gmbh	Karsruhe, DE
Acetic Acid 100%	Carl Roth Gmbh	Karsruhe, DE
Aqua dest. Ampuwa	Fresenius KABI	Bad Homburg, DE
Assay Diluent	Sigma-Adrich	Steinheim, DE
BD Cytotfix Cytoperm	Becton, Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
BD Perm/Wash tm	Becton, Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Chromotrope 2R	Sigma-Adrich	Steinheim, DE
DNase Typ I	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
Essenzielle und nicht essenzielle Aminosäuren	Sigma Aldrich Chemie Gmbh	Steinheim, DE
Essigsäure >99.7%	Sigma-Adrich	Steinheim, DE
FCS	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh	Steinheim, DE
Fetal Bovine Serum	Hyclones, GE Healthcare Life Sciences	Logan, UT, US
Formaldehyd (Roti Histofix 4%)	Carl Roth Gmbh	Karsruhe, DE
Golgi Plug	Becton, Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
HBSS ohne Ca/Mg	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh	Steinheim, DE
HBSS ohne Ca/Mg + phenol red	Sigma Aldrich Chemie Gmbh	Steinheim, DE
HEPES Buffer	Gibco, Life Technologies	Carlsbad, CA, US
Histodenz	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
Isopropanolol 100%	Hedinger	Stuttgart, DE
KHCO3	Carl Roth Gmbh	Karsruhe, DE



Kollagenase	Roche	Basel, CH
L-glutamin 200mM	Gibco, Life Technologies	Carlsbad, CA, US
LPS eb ultrapure	InvivoGen	San Diego, CA, USA
Lyophilized Standard IL-6	eBioscience	San Diego, CA, USA
Lyophilized Standard TNFa	eBioscience	San Diego, CA, USA
Natrium-Pyruvat Lösung	Sigma Aldrich Chemie Gmbh	Steinheim, DE
NH4CL	Carl Roth Gmbh	Karsruhe, DE
Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/ml Pen + 10.000 ug/ml Strep	Gibco, Life Technologies	Carlsbad, CA, US
Phosphotungstic Acid	Fluka Analytical	Buchs, CH
Roti-Clear	Carl Roth Gmbh	Karsruhe, DE
RPMI Medium 1640	Gibco, Life Technologies	Carlsbad, CA, US
TMB	Sigma-Adrich	Steinheim, DE
Trypan Blue Staining 0,4%	Gibco, Life Technologies	Carlsbad, CA, US
Tween	Sigma-Adrich	Steinheim, DE
Waschpuffer	GenID Gmbh	Straßberg, DE

Tabelle2: FACS Antiköper

Name	Fluorochrom	Hersteller	Ort
CD4	APC-Cy7	eBioscience	San Diego, CA, USA
CD8a	PerCP-Cy5.5		
CD11b	PE		
CD11b	PE-Cy7		
CD11c	PE		
CD11c	PE-Cy7		
CD31	PE		
CD45	PB		
CD45	APC		
F4/80	FITC		
F4/80	APC-Cy7		
Ly6C	PB		
Ly6C	PerCP Cy5.5		
Ly6G	FITC		
IL-6	PB		

Tabelle 3: Angesetzte Puffer und Medien

Name	Inhalt
Wash Medium	500ml RPMI + 5% FCS + 1% Pen/Strep
Perfusionsmedium	HBSS ohne Ca und Mg, mit phenol red. + 5% hitzeinaktiviertes FBS + 40 mg/100ml collagenase + 0.001% DNase Type I
30% Histodenz	3g Histodenz + 7ml HBSS ohne Ca, Mg und phenol red. Filtersterilisiert
Kulturmedium R10	500ml RPMI 1640 + 10% hitzeinaktiviertes FCS + 1% L-glutamine + 1% HEPES + 1% essenzielle und nicht-essenzielle Aminosäuren + 1% Na-Pyruvat + 100 U/ml penicillin und 100 ug/ml Streptomycin + 50 uM 2-mercaptoethanol (1:000)
Lysis solution	4,145g NH <sub>4</sub> CL + 0,5g KHCO <sub>3</sub> + 17,6 mg NA <sub>2</sub> EDTA Gelöst in 400 ml aqua dest. und mit 1N HCL auf pH 7,2 – 7,4 eingestellt.
Washpuffer (ELISA)	900 ml Aqua dest. + 100 ml 10x PBS + 0,005% Tween
FACS Puffer	PBS + 2% FCS
FACS FLOW	9L Aqua dest. + 1l 10x PBS
Collagenase	100µg Collagenase Auf 1ml HBSS
Narkose	0,6ml Ketamin + 0,2ml Rompun + 1,7ml NaCl Davon 0,1ml/10gKG i.p.
Bouin´s Fixative	71,4% Pikrinsäure 23,8% Formaldehyd 4,8% Essigsäure
Trichrom Staining solution	1000 ml Aqua dest. + 8.0 g Phosphotungstic Acid + 10.0 ml Acetic Acid

	+ 6.0 g Chromotrope 2R + 3.0 g Aniline Blue
--	--

Tabelle 4: Allgemeines und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Ort
1 ml Spritze Omnifix - F	B Braun	Melsungen, DE
15 cm Verlängerung	Icu medical	San Clemente, CA, USA
20ml Spritze, BD Discardit II	Becton, Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
25 ul Kapillare, Na-heparin beschichtet, minicaps	Hirschmann Laborgeräte Gmbh & Co KG	Eberstadt, DE
48 Well Flachbodenplatte	VWR	Radnor, PA, USA
96 Well Flachbodenplatte, Cellstar	Greiner bio-one	Kremsmünster, AT
Cell Strainer, easystrainer	Greiner bio-one	Kremsmünster, AT
Cellstar Tubes 15 ml, conical bottom	Greiner bio-one	Kremsmünster, AT
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner bio-one	Kremsmünster, AT
Eppendorf Tubes 5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Facs Tubes 5ml	Fisher Scientific	Hampton, NH, USA
Gelbe Kanülen, 24G Jelco i.v. Catheter	Smiths Medical International Ltd	Rossendale, UK
Handschuhe latex, sempercare	sempermed	Wien, AT
Handschuhe, nitril	starlab	Hamburg, DE
High binding 96 Well	Greiner bio one	Kremsmünster, AT
Multi-Safe Seal Tubes 0,5 ml	Carl Roth Gmbh+Co. KG	Karlsruhe, DE
Nadel 6-0 und Faden, Ethicon Vicryl	Johnson & Johnson International	New Brunswick, NJ, USA
Nadeln, Microlance 3	Becton, Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Pipetten steril, Cellstar, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner bio-one	Kremsmünster, AT
Pipettenspitzen, Biosphere Filter Tips	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, DE
Sterican 26 G Nadeln	B Braun	Melsungen, DE
Sterile Handschuhe sempermed supreme surgical gloves	Semperit technische Produkte gmbh	Wien, AT
Surgical Mask	Halyard	Alpharetta, GA, USA
Tubes 5ml	Greiner bio-one	Kremsmünster, AT

V-bottom Plate 96 Well	Nunc A/S	Roskilde, DK
Vlieskompressen	Fuhrmann Gmbh	Much, DE

Tabelle 5: Kits

Verwendung	Name	Hersteller	Ort
CBA	Mouse Th1/Th2/Th17	BD Biosciences	Franklin Lakes, NJ, USA
ELISA	Ready-Set-GO IL-6 Ready-Set-GO TNF-a	BD Biosciences	Franklin Lakes, NJ, USA

Tabelle 6: Medikamente

Name	Hersteller
Fortecortin® (Dexamethason)	Merck Serono GmbH, Darmstadt, DE
Ketanest S® (Es-Ketamin)	Pfizer Pharma, New York City, USA
Rompun® (Xylazin)	Bayer HealthCare, Leverkusen, DE
Dexamethason Nanokapseln	Max-Plank-Institut für Polymerforschung, Mainz, DE
Dexamethason Cy5 Nanokapseln	Max-Plank-Institut für Polymerforschung, Mainz, DE
Dexamethason Phosphat Nanokapseln	Max-Plank-Institut für Polymerforschung, Mainz, DE

Tabelle 7: Geräte

Gerät	Hersteller	Ort
Absauger, Vacusafe comfort	IBS Integra Biosciences AG	Zizers, CH
Autoklav, Systec V50	Systec GmbH	Linden, DE
Bart Trimmer Series 7	Braun	Kronberg im Taunus, DE
BD FACSCanto, Flow Cytometer (CBA)	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Co2 Inkubator HERACell 240i	Thermo Electron LED GmbH	Osterode, DE
ELISA reader, Tecan sunrise	Tecan Austria GmbH	Gröding, AUT
Elisa washer	Dynex Technologies	Chantilly, VA, USA
FACS, BD LSR II	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Feinwaage	Sartorius GmbH	Göttingen, DE
LEICA HI1210	Leica	Wetzlar, DE
LEICA RM2255	Leica	Wetzlar, DE
Mikroskop, Model CKX41	Olympus Corporation	Tokyo, JP
OpticLab H850	Plustek	Taipeh, TWN
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, DE
Pipetus	Hirschmann	Eberstadt, DE
Platform Shaker Str6	Stuart Scientific	Staffordshire, UK

Sterilbank Thermo Scientific	Thermo Electron LED Gmbh	Langensfeld, DE
Vortexer, Agitateur Top-Mix	Bioblock Scientific	Illkirch, FR
Wage	Voltcraft	Wollerau, CH
Wärmelampe Theratherm DeLuxe par38	OSRAM	München, DE
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16r	Thermo Electron LED Gmbh	Osterode, DE
Zentrifuge Heraeus Multifuge 4KR	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA

Tabelle 8: Software

Software	Hersteller
FACSDiva Version 5.0.3 BD FACS Canto	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
FACSDiva Version 6.1.1 BD LSR II	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
Flowjo 10.6.2	FlowJo LLC (Ashland, USA)
Graphpad Prism 9	Graphpad Software (San Diego, USA)
ImageJ	NIH (Bethesda, MD, USA)
Magellan	Männedorf, CH
Microsoft 365 Office	Microsoft (Redmont, USA)
SilverFast AI	LaserSoft Imaging AG (Kiel, DE)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Nanokapseln

Die Nanokapseln, im Folgenden als NCs (englisch Nanocapsules) bezeichnet, wurden für alle durchgeführten Versuche, wie unten beschrieben, durch das Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz hergestellt. Es wurden NCs verwendet, deren Hülle aus polymerisiertem Dexamethason aufgebaut wurde. Zudem wurden NCs mit beinhaltendem Cy5-Farbstoff genutzt. Dies war erforderlich, um die NCs mittels Fluorochromen in der Durchflusszytometrie detektieren zu können. Die NCs wurden stets bei 4°C in wässriger Lösung gelagert und vor Beginn der einzelnen Versuche auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

In der Synthese der Kapseln wurde einer wässrigen Phase mit 10 mg/ml Dexamethason eine Surfactant-Cyclohexan Mischung hinzugegeben. Diese Lösung wurde anschließend verrührt, wodurch Wasser-in-Öl Tröpfchen entstehen. Die Phasen wurden daraufhin durch Ultraschall homogenisiert, was die Tröpfchen auf die gewünschte Größe reduziert. Ein Crosslinker polymerisierte die Hüllen der Tröpfchen zu Kapseln. Der Kern blieb dabei flüssig und beinhaltete die zu Beginn angelegte wässrige Phase. Abschließend wurden die Kapseln erneut in eine wässrige Phase übertragen. Wenn die Nanokapseln zur durchflusszytometrischen Detektion einen Fluoreszenzfarbstoff beinhalten sollten, wurde der wässrigen Phase zu Beginn 100 pmol/µl Cy5 hinzugefügt (Fichter *et al.* 2013; Landfester *et al.* 2013).

### 3.2.2 Bereitstellung der Mäuse und Tierschutz

Als Versuchstiere wurden ausschließlich weibliche Mäuse im Alter von 8-10 Wochen aus dem Stamm C57BL/6J verwendet. Diese wurden durch die zentrale Versuchstiereinrichtung Mainz des TARC (Translational Animal Research Center) der Universität Mainz bereitgestellt. Vor Beginn der Versuche wurden alle Behandlungsprotokolle durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz gesichtet und die Durchführung genehmigt. Die Behandlung der Tiere verlief im Rahmen der vom NIH (national institutes of health) publizierten Richtlinien „principles for use of animals“ und „guide fort the care and use of laboratory animals“.

Zur Betreuung, Pflege und tierschutzgerechten Tötung der Mäuse wurde zudem vor Beginn der Versuche ein entsprechender durch das TARC abgehaltener und

zertifizierter Kurs absolviert. Die Mäuse wurden in Gruppen von 5 Tieren je Käfig in einem 12-Stunden Licht, 12-Stunden Dunkelheit Rhythmus mit ununterbrochenem Angebot an Nahrung und Wasser gehalten.

### 3.2.3 Narkose

Die Narkose wurde kombiniert mittels Inhalationsanästhesie und intraperitonealer Injektion durchgeführt. Zur Narkoseeinleitung wurde den Mäusen zunächst ein Röhrchen mit Isofluran vorgehalten. Nach Wirkeintritt wurde 0,1ml/10g Körpergewicht Ketamin/Rompun-Gemisch intraperitoneal appliziert. Dadurch wurde eine ausreichende Narkosetiefe, Analgesie und Relaxation erreicht. Dies erlaubte präzises arbeiten und Abschirmung von Stress und Schmerzen. Gleichzeitig war keine Beatmung notwendig. Es wurde vor jedem Eingriff die ausreichende Tiefe der Narkose mittels Reflexprüfung getestet. Wenn kein Narkosemittel nachgespritzt wurde, wachten die Mäuse nach etwa einer Stunde aus der Narkose auf.

### 3.2.4 *In vitro* Tests

#### 3.2.4.1 NPC Isolation via Leberperfusion

Um die an Inflammationsprozessen beteiligten Leberzellen analysieren und isoliert untersuchen zu können, mussten Nicht-parenchymale-Zellen der Leber gewonnen werden. Dies wurde durch Entnahme der Leber, Auflösung in ihre zellulären Bestandteile und Isolation der NPCs erreicht, was im Folgenden erläutert wird.

Nach Eintreten der Narkose wurden die Mäuse auf einer Arbeitsunterlage fixiert und das Abdomen rasiert sowie mit 70% Alkohol desinfiziert. Anschließend erfolgte die Laparotomie im Medianschnitt und das Aufsuchen der Portalvene. Diese wurde mit einem 24 g Katheter kanüliert und mit 20 ml Perfusionsmedium gespült. Das Medium konnte nach Durchtrennung der Vena cava inferior durch die Leber abfließen.

Im nächsten Schritt wurde die Gallenblase intakt reseziert. Die Leber wurde entnommen und in kleine Stücke zerteilt. Diese wurden in einem 50 ml Tube mit 5ml frischem Perfusionsmedium für 15 Minuten bei 37° inkubiert und anschließend auf Eis gelegt. Die verdauten Leberfragmente wurden daraufhin durch einen Nylon Cell Strainer gedrückt und mit weiterem Medium durchgespült. Die entstehende

Zellsuspension wurde auf 400 rpm bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert, um die ungewünschten Parenchymzellen zu sedimentieren. Die Lösung im Überstand samt gelöster Zellen wurde abgenommen und bei 300 g, 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, um diesmal die NPCs zu sedimentieren. Der Überstand wurde verworfen und die verbliebenen Zellen in 1 ml kaltem HBSS gelöst und anschließend in 2 ml frisch hergestelltem 30% Histodenz resuspendiert. Darüber wurde 1 ml HBSS geschichtet und das Tube bei 1500 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Die in der Histodenz Phase befindlichen Zellen wurden mit einer sterilen Pipette abgenommen, in ein 15 ml Tube in 12 ml Washmedium gelöst und erneut bei 300 g, 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die hier abgesetzten Zellen wurden schließlich in 1 ml Kulturmedium resuspendiert.

Die isolierten NPCs konnten mittels Trypanblau Zellzählung ausgezählt werden. Dabei wurden etwa 10 µl Zellen in 90 µl Trypanblau resuspendiert und in einer Neubauerzählkammer ausgezählt (Gezählte Zellen × Verdünnungsfaktor × Kammerfaktor / Anzahl der gezählten Quadrate = Zellzahl).

#### 3.2.4.2 Zellkultur

Zellkulturen wurden angesetzt, um *in vitro* entweder die Zytokinantwort der isolierten NPCs messen zu können oder die Zellen vor durchflusszytometrischer Analyse mit NCs und DXM inkubieren zu können. Dafür wurden 96 Well Flachbodenplatten benutzt und in Kulturmedium auf  $5 \times 10^5$  Zellen/ml sowie 250 µl/Well eingestellt. Je nach Versuchsaufbau wurde der Hälfte der Wells zur Stimulation 2,5 µg/ml LPS zugegeben. Zudem wurden sie mit verschiedenen Konzentrationen DXM-NCs sowie löslichem DXM über mindestens 12 Stunden inkubiert. Abschließend wurden die Überstände zur weiteren Verwendung abpipettiert und bei -20 °C eingefroren.

#### 3.2.4.3 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zum Nachweis und zur Analyse der Zytokinantwort innerhalb der Zellkultur wurden murine IL-6 und TNF-α ELISA des Ready-Set-Go Kits verwendet. Der ELISA wurde mittels Standards und monoklonalen Capture-, sowie Detection-Antikörpern nach Herstellerprotokoll durchgeführt und die gewonnenen Daten mittels Magellan-Software berechnet.



### 3.2.4.4 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Durchflusszytometrie ermöglicht die Bestimmung von Zellen anhand ihrer Oberflächenantigene, intrazellulären Granularität und Größe. Dies erfolgt mittels der Messung von Vorwärts und Seitwärts-Streuung eines Laserstrahls und Einsatz von Fluorochromen. Diese können die jeweiligen Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe messen, die im Prozess an die Oberflächenantigene gekoppelt wurden. Die dazugehörigen Färbungen werden in Tabelle 9 erläutert.

Die Zellen wurden zunächst, je nach Anzahl der Färbungen, in FACS Tubes pipettiert und über 10 Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden den abzentrifugierten Zellen zum Block der Fc-Rezeptoren unspezifische Antikörper hinzugefügt. Hierfür wurden sie in 50 µl FACS Puffer mit 1.0 µl 2.4G2 resuspendiert und über 15 Minuten bei 4 °C inkubiert.

Für die Färbung der Oberflächenantigene wurden, je nach gewünschter Färbung, die in Tabelle 2 (3.1) genannten Oberflächenmarker in 50 µl FACS Puffer hinzugegeben und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Zur Unterbrechung der Färbungsreaktion wurde daraufhin 1 ml FACS Puffer hinzugefügt und die ungebundenen Antikörper bei 300 g über 10 Minuten abzentrifugiert. Anschließend mussten die Zellen vor der Messung in einem Volumen von 200-350 µl FACS Puffer resuspendiert werden. Die Kompensation der Fluorochrome und abschließende Messung wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Es kamen die in folgender Tabelle genannten Färbungen zum Einsatz.

Tabelle 9: FACS Färbungen

#### **Kombi-Färbung 1**

Fluorochrom	Marker	Menge [µl]
APC	CD45	0,02
FITC	Ly6G	0,5
PB	Ly6C	0,5
APC-Cy7	F4/80	0,6
PE	CD11c	0,06

APC	CD45	0,02
FITC	Ly6G	0,5
PB	Ly6C	0,5
APC-Cy7	F4/80	0,6
PE	CD11b	0,3

**Färbung 2**

Fluorochrom	Marker	Menge [ $\mu$ l]
PB	CD45	0,125
PE	CD31	0,0,06
FITC	F4/80	0,5
PE-Cy7	CD11c	0,5
APC	Cy5 NCs	-

**Kombi-Färbung 3**

Fluorochrom	Marker	Menge [ $\mu$ l]
APC	CD45	0,02
FITC	Ly6G	0,5
PB	Ly6C	0,5
APC Cy7	F4/80	0,6
PE	CD11b	0,3

APC	CD45	0,02
FITC	F4/80	0,5
PB	Ly6C	0,5
PE	CD11c	0,06
PE-Cy7	CD11b	0,03

**Färbung 4**

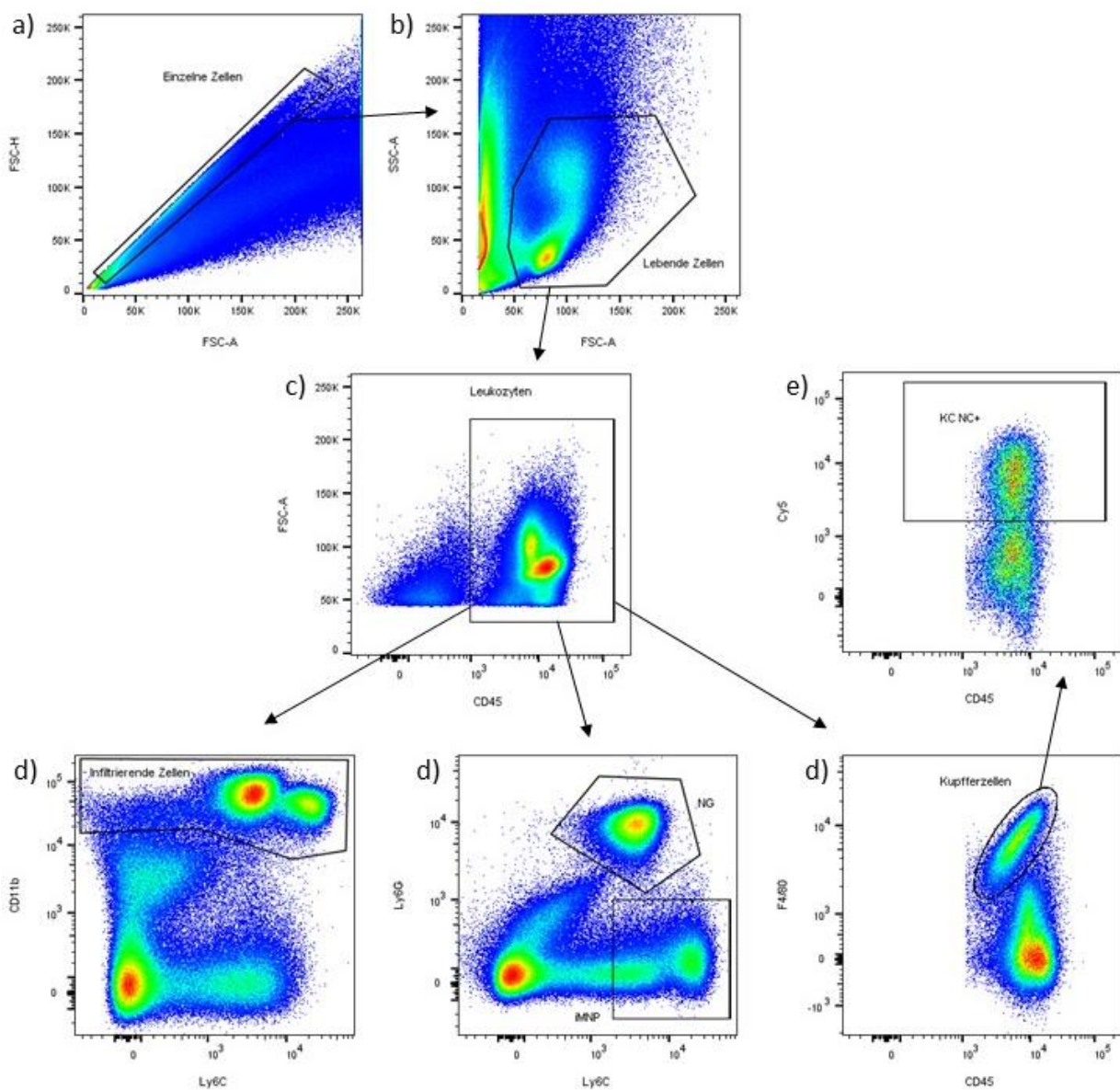
Fluorochrom	Marker	Menge [ $\mu$ l]
PB	CD45	0,125
PE	CD31	0,006
APC-Cy7	F4/80	0,6
FITC	CD11c	0,5
APC	Cy5 NCs	-

**Färbung 5**

Fluorochrom	Marker	Menge [ $\mu$ l]
PB	CD45	0,125
PE	CD11b	0,3
APC-Cy7	F4/80	0,6
FITC	Ly6G	0,5
APC	Cy5 NCs	-
PerCP Cy5.5	Ly6C	1

### Gating-Strategie:

In dieser Arbeit wurde, wenn nicht anders beschrieben, die in Abbildung 2 dargestellte Gating-Strategie angewandt. Nach Auswahl einzelner lebender Zellen folgte das Gating der CD45<sup>+</sup> Leukozyten. Als deren Subtypen wurden infiltrierende Zellen (IC) als CD45<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> definiert, neutrophile Granulozyten (NG) als CD45<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, infiltrierende mononukleäre inflammatorische Zellen (iMNP) als CD45<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, Ly6G<sup>-</sup> und Kupferzellen (KC) als CD45<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>. Wenn im Versuch integriert, wurden zudem die Kapsel-positiven Zellen der einzelnen Zellpopulationen ausgewertet.



**Abbildung 2: Gating-Strategie der FACS Analyse.** Die in e) dargestellte Differenzierung in NC positive Zellen ist exemplarisch für das an d) angeschlossene Gating.

#### 3.2.4.5 Cytometric Bead Array (CBA)

Die Messung der Zytokinkonzentration, wahlweise im Serum der Blutentnahmen und in Überständen der Zellkulturen, erfolgte mittels CBA. Hierbei können Capture Beads, welche mit den Antikörpern für die gewünschte Messung gekoppelt sind, durch Fluorochrome detektiert werden. Diese Beads werden den Proben hinzugefügt und binden darüber an die zu messenden Zytokine. Die quantitative Messung erfolgt durch die Bindung an zusätzliche Detection Antikörper.

Dafür wurde zunächst je nach Anzahl der Messungen das Vielfache von 2,5 µl von jedem der 7 Capture Beads genommen und vermischt. Daraus wurde 12,5 µl jeder Probe und den Reagenzien der Standardreihe hinzugefügt. Im nächsten Schritt wurde 12,5 µl Detection Reagent hinzugefügt und über 2 Stunden inkubiert.

Dem wurde 1 ml Waschpuffer hinzugegeben und bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert, um die Reaktion zu stoppen und die Beads abzusetzen. Abschließend konnten die Überstände abgesaugt und das gewonnene Pellet vor der Messung in 300 µl FACS Puffer resuspendiert werden. Die Einstellungen und Messung am BD FACS Canto wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

#### 3.2.4.6 Intracellular Cytokine Staining (ICCS)

ICCS gekoppelt mit Durchflusszytometrie ermöglicht die Messung intrazellulärer Zytokine und gleichzeitig die Bestimmung der zugehörigen Zellen. Um dies zu ermöglichen müssen sowohl die Oberflächenmarker antikörpergekoppelt gefärbt sowie die Zellmembran permeabilisiert werden. Im nächsten Schritt wird mit weiteren Antikörpern intrazellulär gefärbt.

Dafür wurden zunächst 1 µl Golgi Plug pro 1 ml Zellsuspension jeder Probe hinzugefügt und über 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und bei 360 g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden, analog zur FACS-Methode, in 50 µl FACS Puffer mit 5 µg 2.4G2 resuspendiert und daraufhin in eine V-Bottom Plate überführt und dort bei 4 °C über 15 Minuten inkubiert.

Für die Oberflächenfärbung wurden 50 µl Mastermix hinzugefügt und über 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde zweimaliges Waschen mit zunächst 100 µl FACS und dann 200 µl FACS Puffer durchgeführt und jeweils für 5 Minuten bei 360 g

und 4 °C zentrifugiert und anschließend abgekippt. Dies befreite die Proben von überschüssigen Antikörpern.

Für die Permeabilisierung wurde 100 µl BD Cytotfix/Cytoperm hinzugefügt und über 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das zuvor genannte zweimalige Waschen mit BD Perm/Wash anstelle von FACS Puffer wiederholt.

Für die intrazelluläre Färbung wurde nun 100 µl AK-Masternix in 1x Perm/Wash 5 µg/Tube 2.4G2 zugefügt. Dies wurde über 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Das oben genannte zweimalige Waschen wurde daraufhin erneut mit 1x BD Perm/Wash wiederholt. Abschließend wurden die Zellen in 100 µl FACS Puffer resuspendiert und in FACS-Tubes überführt. Die Messung erfolgte mittels FACS Gerät regulär nach Herstellerangaben.

Tabelle 10: ICCS Färbung

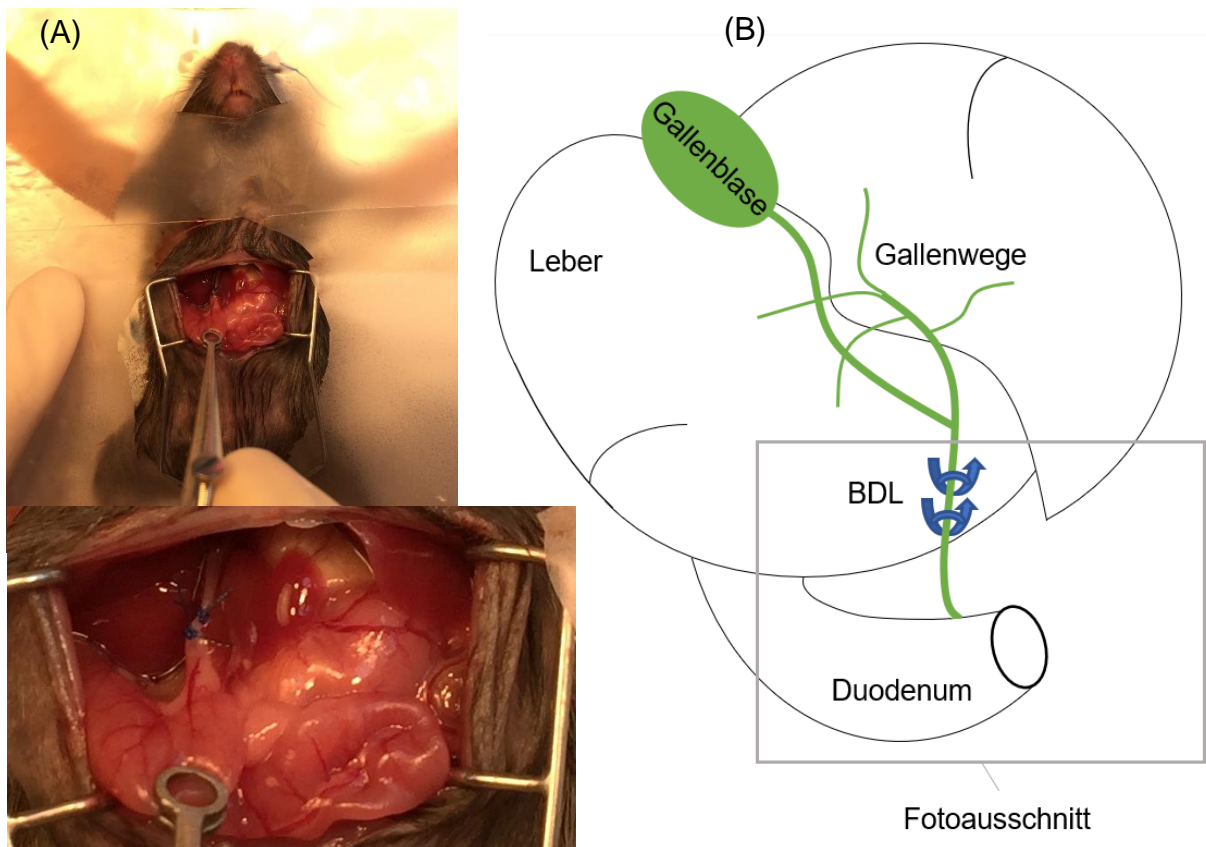
**Färbung 6**

Fluorochrom	Marker	Menge [µl]
APC	Cy5 NCs	-
FITC	F4/80	0,5
PB	IL-6	0,3
PE	CD31	0,006
PE-Cy7	CD11c	0,5

### 3.2.5 *In vivo* Tests

#### 3.2.5.1 Bile Duct Ligation (BDL)

Nach Einleitung der Narkose wurde das Abdomen der Maus rasiert und mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Pfoten wurden auf der Arbeitsfläche mit Tape fixiert. Um eine Infektion zu vermeiden wurde ausschließlich autoklaviertes Besteck verwendet und steril gearbeitet. Das Operationsgebiet wurde mit einem Lochtuch abgedeckt und ausgeleuchtet. Nach medianer Laparotomie mittels Schere wurde der Schnitt aufgespreizt und der Gallengang aufgesucht. Dieser wurde mit 6/0 Monocryl Faden doppelt ligiert. Daraufhin wurde zunächst das Peritoneum und anschließend die Haut mit 6/0 Vicryl Faden verschlossen. Die Mäuse wurden daraufhin zur Beobachtung und weiteren Behandlung in saubere Käfige gesetzt. Abbildung 3 zeigt die intraoperative Darstellung der BDL.



**Abbildung 3: Intraoperative Fotografie. (A)** Darstellung des doppelt ligierten Gallengangs mit Vergrößerung. **(B)** Schematische Darstellung mit Beschriftung.

Neben der BDL wurden zusätzlich als Vergleichsgruppe Sham-Operationen durchgeführt. Hier erfolgte im gleichen Verfahren die Darstellung des Gallenganges, jedoch ohne anschließende Ligatur. Das Abdomen wurde daraufhin auf gleiche Weise

verschlossen. Abgesehen von der fehlenden Ligatur wurden die Mäuse im weiteren Verlauf gleich behandelt und -therapiert.

#### 3.2.5.2 Kapselapplikation und Blutentnahmen

Wenn es für den jeweiligen Versuch vorgesehen war, wurden DXM-NCs oder lösliches Dexamethason 30 Minuten nach Ligatur intravenös über die Schwanzvene appliziert.

Blutabnahmen zur Bestimmung der Zytokine mittels CBA wurden per tail clipping nach 2 Stunden und 4 Stunden abgenommen, teilweise zusätzlich nach 18 und 42 Stunden.

Dazu wurde <0,3 mm der Schwanzspitze mit einer desinfizierten Schere amputiert und die heraustretenden Blutstropfen mit einer 25 µl Kapillare aufgefangen. Die Kapillare wurde daraufhin mit 25 µl 1:1 mit 1xPBS in ein Eppendorfgefäß durchgespült und bei 2 g für 10 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde in 0,5ml Eppendorfgefäße abpipettiert und zur weiteren Verwendung eingefroren.

Zusätzlich konnten bei Versuchen mit einhergehender Tötung der Maus kardiale Blutabnahmen durchgeführt werden. Dabei wurde nach Entnahme der Leber eine Kanüle von abdominal durch das Diaphragma in die linke Herzkammer vorgeschoben und bis zum Stillstand des Herzens langsam Blut abgezogen. Dies wurde je nach bestimmtem Versuchsende zwischen 18 Stunden und mehreren Tagen nach Ligatur durchgeführt. Zur Bestimmung der Leberwerte ASAT, ALAT, Bilirubin und Gamma-GT wurde das gewonnene Blut 1:2 mit PBS verdünnt. Die Proben wurden anschließend dem Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz zur Analyse zugeführt.

#### 3.2.5.3 Leberhistologie und Trichrom Färbung

Zur Durchführung der Histologie wurde den Mäusen zunächst die Leber entnommen. Dabei wurde, wie in den zuvor beschriebenen Versuchen nach Fixation, Desinfektion und Abdecken, die mediane Laparotomie in Narkose durchgeführt. Die Leber wurde aufgesucht und durch die Pfortader mit zunächst 5 ml 1xPBS gespült. Daraufhin wurde erneut mit 4% Formaldehyd gespült und die Leber herausgeschnitten. Die entnommenen Lebern wurden direkt in 4% Formaldehydlösung aufgenommen und auf einem Schüttler über mindestens 24 Stunden bewegt.

Daraufhin wurden die Lebern durch die Core Facility Histologie der Universitätsmedizin Mainz in Paraffin eingeblockt. Die eingeblockten Lebern wurden mit einem Mikrotom auf 5 µm Breite geschnitten und auf Objektträger präpariert.

Für die Trichrom Färbung wurden die Paraffinschnitte bei 70°C für eine Stunde ablaufen gelassen und daraufhin, wie in Tabelle 11 beschrieben, entparaffiniert und entwässert.

Tabelle 11: Trichromfärbung Teil 1

Arbeitsschritt	Dauer	Reagenz
Entparaffinierung	Je 5 Minuten	Roti-Clear I Roti-Clear II Roti-Clear III
Entwässerung	Je 3 Minuten	100% Isopropanolol 100% Isopropanolol 96% Ethanol 70% Ethanol 50% Ethanol Aqua dest.

Die entwässerten Schnitte wurden daraufhin eine Stunde mit Bouin-Lösung inklusive 3g Anilinblau bei 56°C fixiert und dann mit mit aqua dest. gespült. Anschließend wurden sie über 12 Minuten in Trichrom Staining solution gefärbt. Es folgte wie in Tabelle 12 beschrieben, die weitere Entwässerung und abschließende Behandlung, bevor die Schnitte mit Deckgläsern abgedeckt werden konnten.

Tabelle 12: Trichromfärbung Teil 2

1 Minuten	0,5% Essigsäure 0,5% Essigsäure 96% Ethanol 96% Ethanol
3 Minuten	100% Isopropanolol 100% Isopropanolol
5 Minuten	Roti-Clear I
10 Minuten	Roti-Clear II



### 3.2.6 Versuchspläne

#### **Versuchsplan BDL**

Für die BDL Versuche in 4.3 wurden 3 Versuche mit ähnlichem Aufbau durchgeführt. Dabei wurden in den Durchläufen 1 und 2 insgesamt 3 BDL-Mäuse und 2 Kontrollmäuse verwendet. Im dritten Durchlauf wurden 2 BDL- und 2 Kontrollmäuse verwendet.

Folgender Ablauf wurde in 3 Wiederholungen durchgeführt:

1. Vor Operation: Blutentnahme zur Bestimmung der Zytokin-Ausgangswerte für die spätere Analyse mittels CBA. Gewichtsmessung der Mäuse zur Dosisfindung der Narkose und weitere Vorbereitungen.
2. Durchführung der BDL
3. Blutentnahmen zur Analyse nach 2, 4 und 18 Stunden zur Zytokin-Messung per CBA.
4. NPC-Isolation nach 18 Stunden mit zusätzlich kardialer Blutentnahme zur laborchemischen Analyse der Transaminasen und Cholestase-Parameter.
5. Alternativen weiterer Verwendung der NPCs:
  - a. FACS zur Bestimmung der Zusammensetzung der Zellsuspension und Analyse der Zellinfiltration
  - b. Zellkultur mit Inkubation über 24 Stunden und Zugabe von DXM-Cy5-NCs, Fortecortin und LPS
    - i. Abnahme der Überstände für CBA Analyse der Zytokinausschüttung
    - ii. Ernten der Zellen und FACS-Analyse der NC Aufnahme in die Zellen

#### **Versuchsplan BDL – Therapie**

Für die in 4.4 beschriebenen Versuche erfolgten 4 Durchläufe mit ähnlichem Versuchsaufbau. Unter gleichen Kriterien gewonnene Ergebnisse wurden zur Gesamtauswertung und Darstellung gepoolt.

In den Durchläufen wurden dreimalig 18 Mäuse und im finalen Versuch 28 Mäuse verwendet. Die Gruppen wurden aufgeteilt in je 5 (oder 8) Mäuse für BDL mit anschließend Gabe von NCs, Gabe von DXM oder keine Behandlung. An 3 (oder 4) weiteren Mäusen wurden Sham Operationen durchgeführt.

1. Vor Operation: Blutentnahme zur Bestimmung der Ausgangswerte der Zytokine und Leberwerte für die spätere Analyse mittels CBA und durch das Zentrallabor. Gewichtsmessung der Mäuse zur Dosisfindung der Narkose und weitere Vorbereitungen.
2. Durchführung von BDL und Sham-Operationen
3. Die Behandlung mit sDXM und DXM-NCs erfolgte eine halbe Stunde nach BDL über intravenöse Applikation. Die BDL-Kontrollgruppe und die Sham-Gruppe erhielten keine Behandlung.
  - a. Dosis DXM-Cy5-NCs: 60µg / 20g Maus
  - b. Dosis lösliches DXM: 3µg /20g Maus
4. Blutentnahmen zur CBA-Analyse der Zytokin-Ausschüttung fanden nach 2, 4 und 18 Stunden statt.
5. Blutentnahmen zur Bestimmung der Leberwerte mit Auswertung im Zentrallabor fanden nach 24, 48 und 72 Stunden statt. Die Abnahme nach 96 Stunden erfolgte kardial während des folgenden Schritts.
6. Nach 96 Stunden erfolgte je nach Plan des jeweiligen Durchlaufs die Leberperfusion zur NPC-Isolation oder die Leberentnahme zur anschließenden Histologie.
7. Nach NPC Isolation folgte die Auswertung per FACS mit Analyse der Zellpopulationen und/oder die Inkubation in Zellkultur mit Abnahme der Überstände zur CBA Analyse nach 18 Stunden.

### 3.2.7 Statistik

Die Analyse der Ergebnisse wurden mittels t-Test, ein- oder zweifaktorieller ANOVA durchgeführt.  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant erklärt. Weitere Signifikanzniveaus wurden folgendermaßen festgelegt:  $< 0:01$  (\*\*),  $< 0,001$  (\*\*\*) .

In der graphischen Darstellung der Versuche wurde neben dem arithmetischen Mittel stets die Standardabweichung angegeben. Die Stichprobengröße wurde dabei in der Abbildungsbeschreibung oder im Fließtext angegeben.

Aufgrund von geringen Stichprobengrößen oder unzureichender Wiederholung einzelner Versuche waren einer statistischen Auswertung in einigen Versuchen Grenzen gesetzt. Neben der Angabe von Mittelwerten und Standardabweichung

wurden die Angabe von Signifikanzniveaus an diesen Stellen unterlassen. Die Ergebnisse dieser Versuche können aus statistischer Betrachtung lediglich als Tendenzen betrachtet werden.

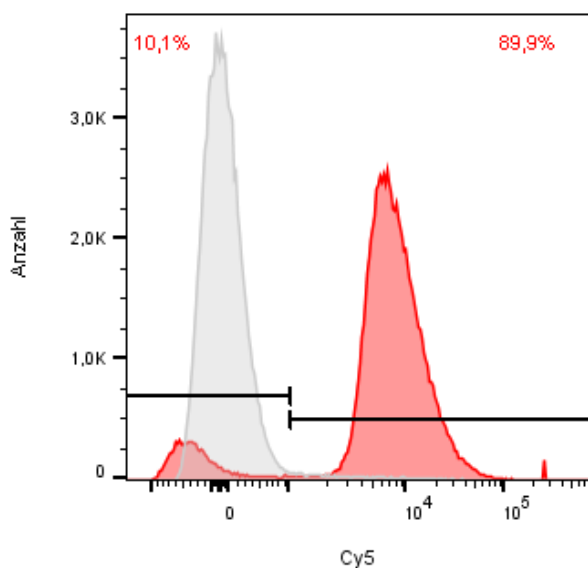
Ausschlusskriterium von Einzelwerten in der Versuchsauswertung war das Vorliegen von Ausreißern, welche mit einer während der Durchführung beobachteten Unregelmäßigkeit vereinbar sind. Hier sind bspw. die unzureichende Ligatur mit anschließend nicht erhöhtem Bilirubin, die relevante Leberverletzung im Rahmen der BDL mit anschließend überproportional erhöhten Leberparametern oder makroskopisch vollständig zerstörter Leber zu nennen. Ebenso wurden die akquirierten Ergebnisse vorzeitig verstorbener Mäuse aus der Auswertung ausgeschlossen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 NCs in vitro

#### 4.1.1 Kapseldarstellung im FACS

Im ersten Teil der Versuche wurden die Nanokapseln *in vitro* getestet und durchflusszytometrisch analysiert. Zunächst wurde getestet welcher Anteil der verwendeten Nanokapseln sich im FACS detektieren lässt. Dies war relevant für die Auswertung späterer Versuche in denen durchflusszytometrisch die Kapselaufnahme in verschiedene Zelltypen gemessen werden sollte. Es wurden DXM-Cy5-NCs genutzt, dessen Farbstoff im APC-Kanal gemessen werden konnte, sowie reguläre DXM-NCs als Kontrolle. Die Kapselsuspensionen wurden dafür auf eine Konzentration von 25 µg/ml verdünnt. Abbildung 4 zeigt, im Histogramm rot dargestellt, die Abgrenzung von ~90% der Cy5 NCs. Die Populationen ließen sich in der Darstellung gut differenzieren. Die verbliebenen ~10% wurden entweder als Kapseln ohne Cy5 Farbstoff oder als Kapselschrott gewertet. Die im Histogramm grau dargestellten DXM-NCs lagen zu ~97% unter der festgelegten Grenze von  $10^3$ .



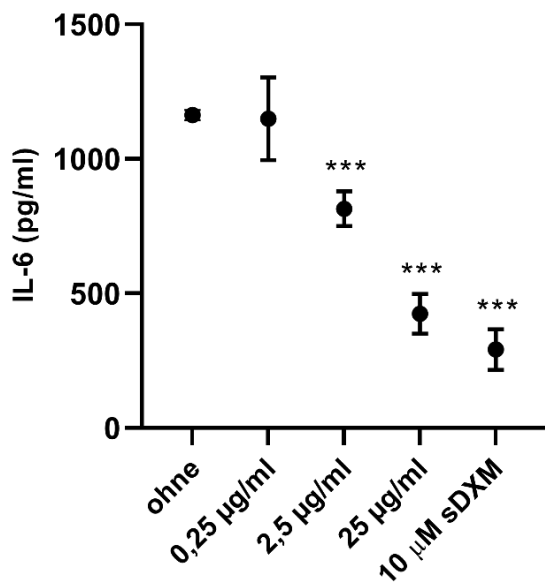
**Abbildung 4: Exemplarische Analyse eines Batches der genutzten DXM-NCs.** Vergleich DXM-NCs mit enthaltenem Cy5-Farbstoff (rot) gegenüber DXM-NCs ohne Cy5 (grau).

#### 4.1.2 NPC Suppression von IL-6 *in vitro*

Im Folgenden wurde die Suppression von IL-6 durch Dexamethason in der Zellkultur getestet. IL-6 wurde wegen seiner Rolle als pro-inflammatorisches Zytokin als Parameter ausgewählt. Hierfür wurden NPCs mit 2,5 µg/ml LPS sowie NCs mit den in

Abbildung 5 genannten Konzentrationen in 4 Wells pro Bedingung über Nacht inkubiert. Zusätzlich wurde eine Negativ-Kontrolle ohne Zugabe von DXM sowie eine Positiv-Kontrolle mit der Gabe von 10  $\mu$ M löslichem DXM (sDXM) hinzugefügt. Am Folgetag erfolgte die Abnahme der Überstände, um die Menge an sezerniertem IL-6 zu messen (Abb. 5).

Es zeigte sich, dass die NCs eine Suppression der IL-6 Ausschüttung bewirkten, welche eine Phagozytose der Kapseln durch Zellen voraussetzt. Diese Suppression zeigte sich zudem als abhängig von der Dosis der hinzugegebenen Kapseln.

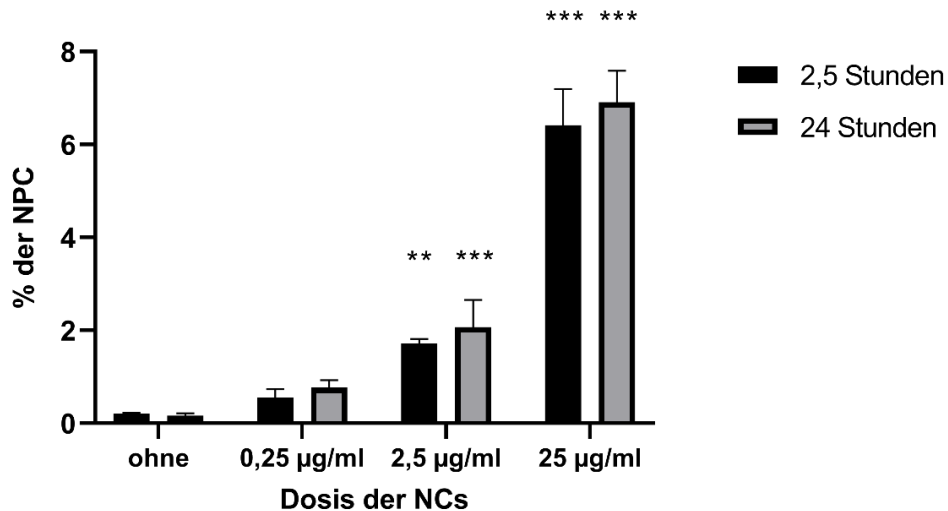


**Abbildung 5: Suppression der IL-6 Ausschüttung von NPCs *in vitro*.** Stimulation von NPCs mit 2,5  $\mu$ g/ml LPS und verschiedenen Konzentrationen DXM-NCs über Nacht. Als Positivkontrolle dienten 10  $\mu$ M lösliches DXM. Alle Bedingungen wurden mit der Negativkontrolle verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (einfaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ).

#### 4.1.3 Kapselaufnahme in der Zellkultur

Es folgte der Vergleich der Kapselaufnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Kapselkonzentrationen. Hierfür wurden  $10^6$  Zellen/ml mit den in Abbildung 6 beschriebenen Konzentrationen NCs inkubiert. Eine Kulturplatte wurde nach 2,5 Stunden, die andere Platte nach 24 Stunden abgeerntet, die Zellen gefärbt (Tab. 10, Färbung 2) und im FACS ausgewertet. Abbildung 6 zeigt den Anteil der NPCs, in denen Kapseln detektiert werden konnten.

Es zeigte sich eine deutliche Differenz in den unterschiedlichen Konzentrationen, wobei mit zunehmender Zehnerpotenz ein höherer Anteil NPCs Kapseln aufnahm. Hingegen zeigte die längere Inkubation der Kapseln mit den NPCs keine ausschlaggebende Steigerung der Kapselaufnahme.



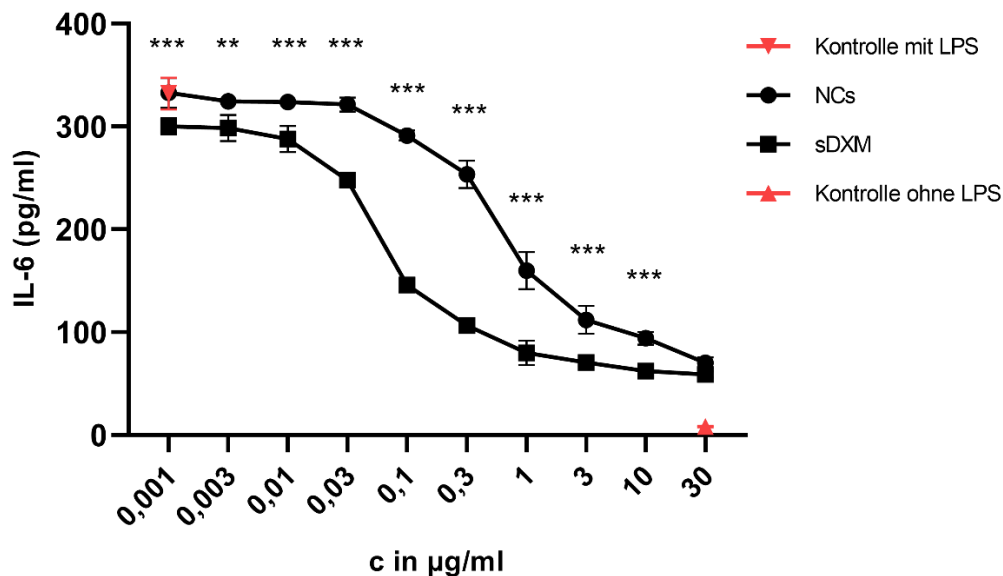
**Abbildung 6: Vergleich der Kapselaufnahme anhand verschiedener Inkubationszeiten und NC-Konzentrationen.** Die positiven Zellen wurden nach Aufnahme verschiedener Konzentrationen Cy5-NCs im FACS detektiert. Alle Bedingungen wurden mit der Negativ-Kontrolle (ohne) verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ).

#### 4.1.4 Vergleich Nanokapseln – lösliches Dexamethason

An dieser Stelle wurde die Wirkung der DXM-NCs mit der von löslichem DXM verglichen, um die Wirkungen in Relation zu setzen und einen Umrechnungsfaktor zu bestimmen. Dieser erlaubte in den folgenden Versuchen, die Effekte der jeweils applizierten Dosen vergleichen zu können und einen Ausgangspunkt für die jeweilige Dosis zur *in vivo* Immunsuppression zu haben. Als Parameter für diesen Vergleich wurde die Reduktion der Ausschüttung von IL-6 in der Zellkultur ausgewählt.

Hierfür wurden  $1,25 \times 10^5$  NPCs/ml ausgesät und mit  $2,5 \mu\text{g/ml}$  LPS stimuliert. Zusätzlich wurden NCs und lösliches DXM jeweils in 10 gleichen, aufsteigenden Konzentrationen hinzugegeben. Als Kontrollwert der maximalen und minimalen IL-6-Ausschüttung wurde die Zugabe von NCs und DXM ausgelassen und die Wells entweder mit oder ohne LPS inkubiert. Die Zellkulturen wurden für 24 Stunden im

Brutschrank belassen. Nach Ablauf der Zeit erfolgte die Abnahme der Überstände und Messung der IL-6 Konzentration mittels ELISA (Abb. 7). Das Ergebnis wurde graphisch ermittelt, indem der Abstand der Wendepunkte der Kurven bestimmt wurde. Der gesamte Versuch wurde insgesamt dreimalig wiederholt und der Mittelwert 22,67 daraus als Umrechnungsfaktor bestimmt. Lösliches DXM bewirkte hier somit die gleiche Reduktion der IL-6 Ausschüttung, wie die 22,67-fache Konzentration an NCs.

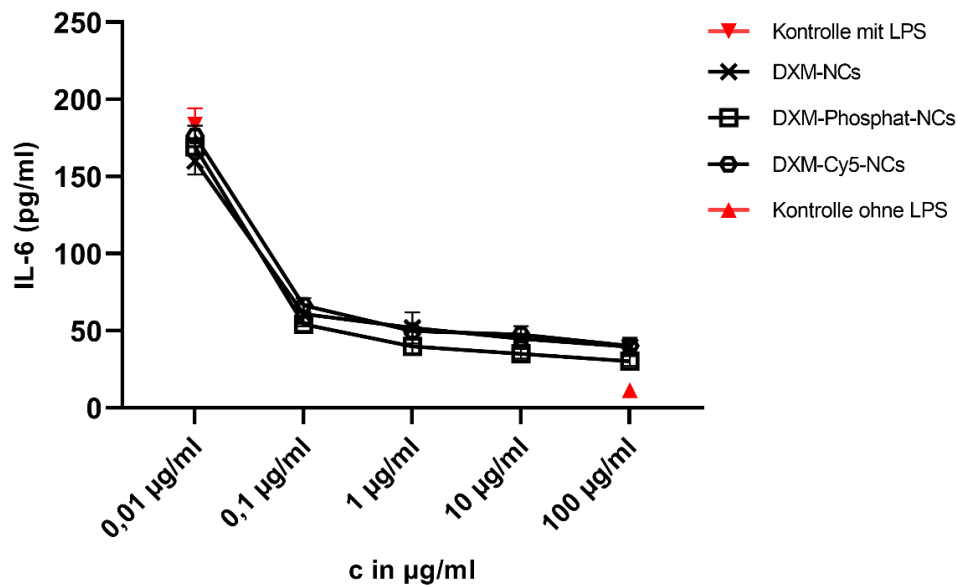


**Abbildung 7: Vergleich der IL-6 Suppression *in vitro* durch aufsteigende Konzentrationen von DXM-NCs und löslichem DXM.** Zur Stimulation wurden die NPCs zusätzlich mit 2,5 µg/ml LPS inkubiert. Als Kontrollen (rot) dienten NPCs mit und ohne LPS. Die Daten der NC-Gruppe wurden mit der sDXM-Gruppe verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Šidák's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ).

#### 4.1.5 Vergleich Nanokapseltypen

In einem anderen Versuch wurde der gleiche Testaufbau zum Vergleich unterschiedlicher Typen von NCs herangezogen. Erneut wurden NPCs isoliert und für diesen Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen von DXM-NCs, DXM-Phosphat-NCs und DXM-Cy5-Ncs inkubiert. Die Kontrollen erfolgten erneut ohne Kapselzugabe entweder mit oder ohne LPS-Stimulation (Abb. 8).

Durch die geringen Unterschiede der IL-6 Suppression, die im Bereich der Messungengenauigkeit lagen, wurden die verschiedenen NC-Typen in den darauffolgenden Versuchen als wirkungsgleich betrachtet.



**Abbildung 8: Vergleich der IL-6 Suppression *in vitro* durch aufsteigende Konzentrationen unterschiedlicher NC-Typen.** Zur Stimulation wurden die NPCs zusätzlich mit 2,5 µg/ml LPS inkubiert. Als Kontrollen (rot) dienten NPCs mit und ohne LPS. Die verschiedenen NC-Typen wurden miteinander verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ).

## 4.2 NCs in vivo

### 4.2.1 Zytokin Antwort und Kapselaufnahme

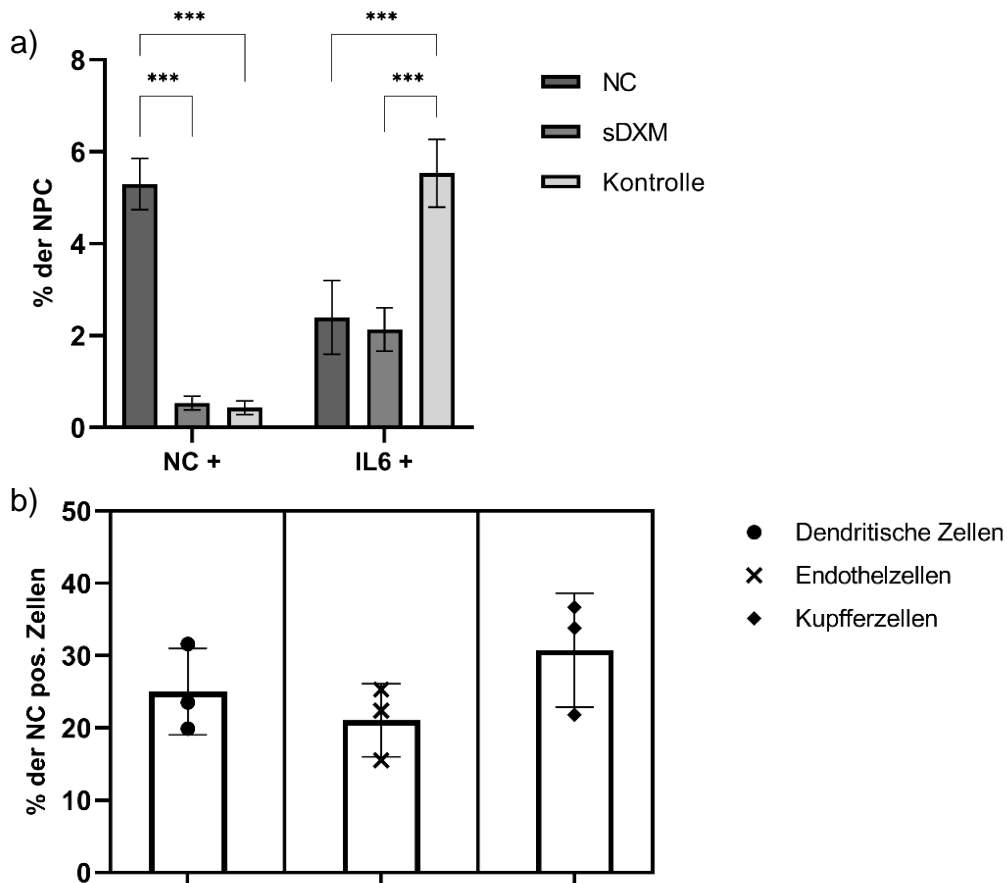
Für diesen Versuch wurden die Kapseln den Mäusen intravenös (i.v.) gespritzt, um die Aufnahme der NCs sowie die Menge an intrazellulärem IL-6 mittels ICCS zu bestimmen. Dazu wurden 9 Mäuse in die 3 Gruppen NC, DXM und Kontrolle aufgeteilt. Die NC Gruppe erhielt 300 µg gelöste DXM-Cy5-NCs, der DXM Gruppe wurde 0,15mg/kg = 3µg / 20g Maus verabreicht, die Kontrolle erhielt keine Applikation. 3 Stunden später wurden die NPCs der Mäuse isoliert. Daraufhin wurden  $10^6$  Zellen/ml mit 2,5 µg/ml LPS für weitere 18 h inkubiert, anschließend die Zellen geerntet, gefärbt (Tab. 10, Färbung 6) und mittels ICCS ausgewertet.

Abbildung 9a zeigt den Anteil an NPCs die sich im Gating positiv für entweder Cy-5 oder für IL-6 gezeigt haben. Es ließ sich im Mittelwert eine Kapselaufnahme der NC-Gruppe von ca. 5,5% der Gesamt-NPCs darstellen. Ebenso stellte sich der Anteil von NPCs mit über den festgelegten Grenzwert hinaus intrazellulär exprimierten IL-6 bei den behandelten Gruppen niedriger dar. Es zeigte sich, dass die DXM-NCs das IL-6



genauso stark wie das lösliche DXM supprimieren. Zudem konnte eine Aufnahme von etwa 5,5% NCs in den NPCs gemessen werden.

In der Differenzierung der NPCs nach Zelltyp in Kupfferzellen (CD45<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>), Endothelzellen (CD45<sup>-</sup>, CD31<sup>+</sup>) und dendritische Zellen (CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>) gelang keine signifikante Abgrenzung von Kapsel-positiven Populationen. Die NC<sup>+</sup> Zellen wurden hier zur Vergleichbarkeit gegenübergestellt. Dieser Versuch dient somit nur für eine grobe Einschätzung der Verteilung (Abb. 9b).



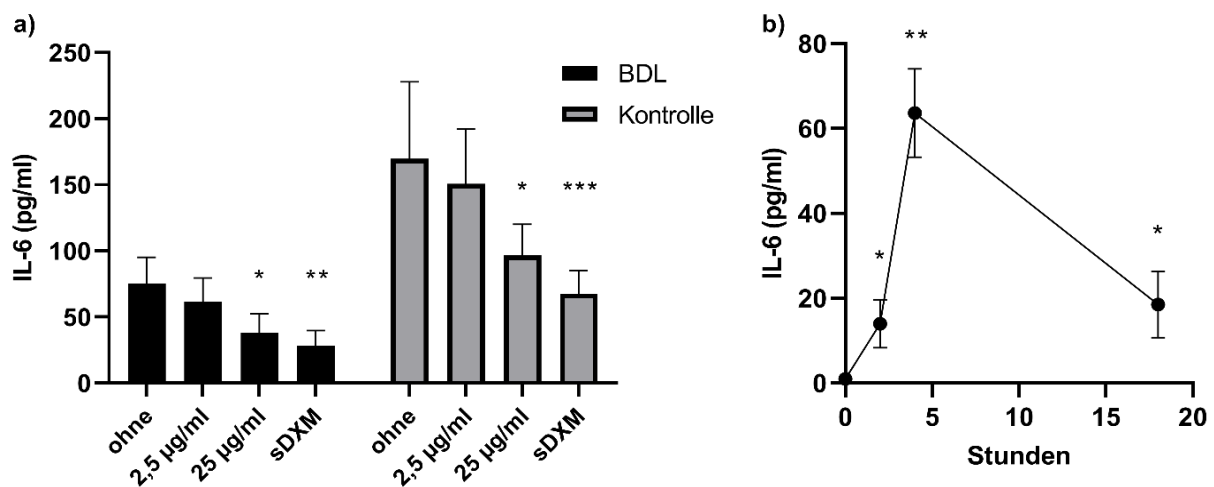
**Abbildung 9: a) Anteil NC+ NPCs und der IL-6 Expression nach *in vivo* Gabe von NCs oder sDXM.** Negativkontrollen erhielten keine Applikation. Nach Isolation wurden die NPCs mit 2,5 µg/ml LPS stimuliert und weitere 18h inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels ICCS. Die Bedingungen wurden mit der NC-Gruppe bzw. mit der Kontrolle verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3). **b) Aufnahme DXM-Cy5-NCs durch verschiedene Zellpopulationen *in vivo*.** Stimulation der NPCs mit 2,5 µg/ml LPS und Inkubation über 18h. Die Auswertung erfolgte mittels ICCS. Die Bedingungen wurden untereinander verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3).

## 4.3 BDL

### 4.3.1 Zytokin Ausschüttung

In den Versuchen in diesem Abschnitt wurde die Gallengangsligatur eingeführt und untersucht. Zur Analyse der dadurch bedingten Zytokin Ausschüttung wurde den Mäusen nach BDL bzw. den Kontrollmäusen nach 2, 4 und 18 Stunden Blut abgenommen. In 2 Durchläufen (3 x BDL + 2 Kontrollen) wurden Zellkulturen angelegt. Es wurde zwischen der Zugabe von NCs in zwei Konzentrationen, DXM als Positivkontrolle und einer Negativkontrolle unterschieden. Die Wells wurden mit 2,5 µg/ml LPS stimuliert und über 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels CBA.

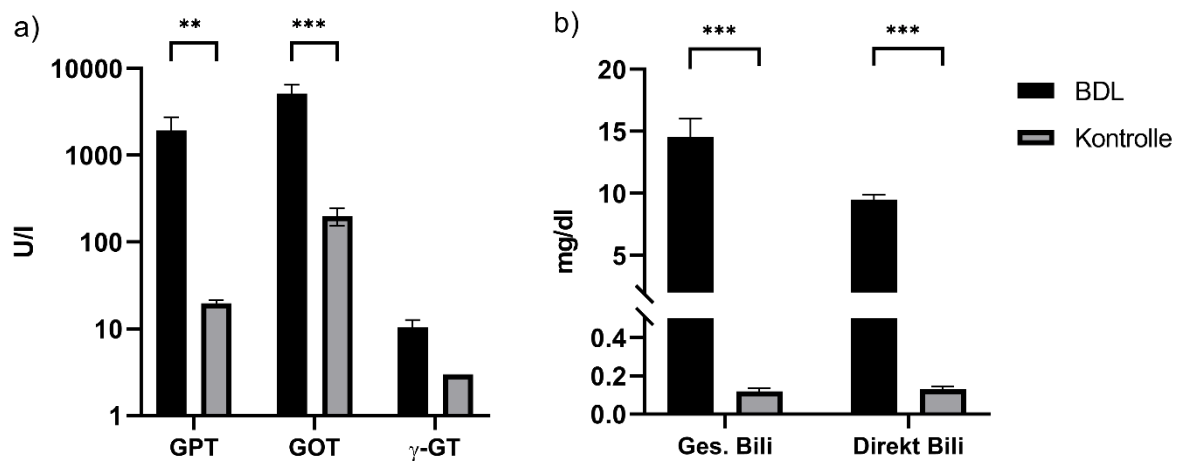
Es zeigte sich eine höhere Expression von IL-6 in der Kontrollgruppe gegenüber der BDL Gruppe (Abb. 10a). Innerhalb der Gruppen konnte die bereits in Abbildung 5 beschriebene Suppression von IL-6 durch zunehmende Konzentrationen von NCs und DXM gezeigt werden. Die in Abbildung 10b dargestellten Graphiken zeigen die Zytokin Ergebnisse der Blutentnahmen von BDL-Mäusen. Nach 4 Stunden zeigte sich das Maximum der IL-6 Expression, welche nach 18 Stunden wieder rückläufig war.



**Abbildung 10: IL-6 Expression nach BDL gegenüber Kontrollen.** **a)** Vergleich der IL-6 Sekretion nach *in vitro* Stimulation mit 2,5 µg/ml LPS und Gabe aufsteigender Konzentrationen DXM-NCs sowie löslichem DXM. Die Bedingungen wurden mit den Kontrollen verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (BDL-Gruppe  $n = 6$ , Kontrolle  $n = 4$ ). **b)** Zeitlicher Verlauf des gemessenen IL-6 im Serum nach BDL. Vergleich der Werte im Verlauf gegenüber dem Ausgangswert. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 8$ ).

#### 4.3.2 Anstieg der Transaminasen

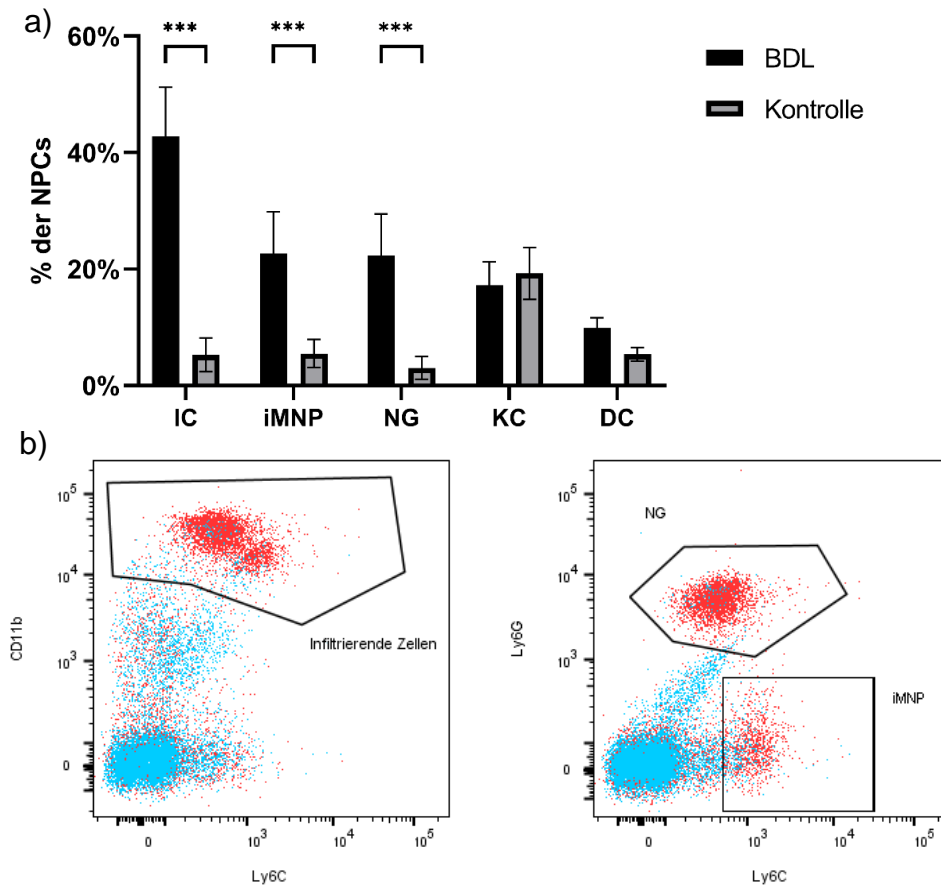
Im Zuge der NPC-Isolation wurde den Mäusen kardial Blut abgenommen. Dies fand in den zuvor beschriebenen 3 Versuchen 18 Stunden nach BDL statt. Die Messungen dieser Versuche wurden zur Auswertung gepoolt. Die in Abbildung 12 gezeigten Ergebnisse der Auswertung bestanden somit aus 8 Mäusen in der BDL-Gruppe und 6 Mäusen aus der Kontrollgruppe. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Transaminasen nach durchgeführter BDL. Ebenso stieg das gesamte, sowie das direkte Bilirubin deutlich an. Der Anstieg der  $\gamma$ -GT fiel weniger stark aus. Insgesamt zeigte sich laborchemisch ein deutliches Korrelat der zuvor operativ verursachten Cholestase.



**Abbildung 11: Laborchemische Auswertung der a) Transaminasen und b) Cholestase-Parameter *in vivo*.** Kardiale Blutentnahme 18 Stunden nach BDL. Die Bedingungen wurden gegenüber den Kontrollen verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Šidák's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (BDL-Gruppe  $n = 8$ , Kontrolle  $n = 6$ ).

#### 4.3.3 Zellinfiltration (NPC Isolation und FACS)

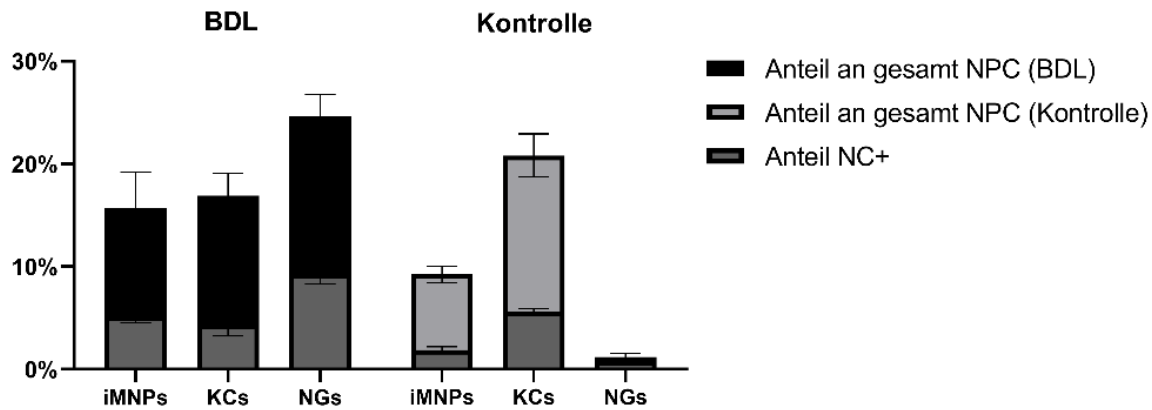
In den gleichen Versuchen konnte mittels Durchflusszytometrie die Zellinfiltration in die Leber und somit die anteilige Umschichtung der NPC-Population getestet werden. Hierfür wurden die isolierten NPCs je nach Versuch mit unterschiedlichen Färbungen behandelt (Tab. 10, Kombi-Färbungen 1 und 3), um jeweils andere Zelltypen qualitativ und quantitativ analysieren zu können (Abb. 13). Nach einer zuvor durchgeführten BDL konnten deutlich mehr infiltrierende Zellen (IC), inflammatorische mononukleäre Phagozyten (iMNP) und neutrophile Granulozyten (NG) nachgewiesen werden. Die Population von Kupfferzellen (KC) blieb annähernd gleich, in dendritischen Zellen (DC) konnte eine geringe Zunahme gemessen werden.



**Abbildung 12: a) Vergleich der NPC-Subpopulationen nach BDL gegenüber Kontrollen.** Analyse mittels Durchflusszytometrie. Die Bedingungen wurden gegenüber der Kontrollgruppe verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Šidák's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (BDL-Gruppe  $n = 8$ , Kontrolle  $n = 6$ ). **b) Exemplarische Dot-Plot Überlagerung der NPC-Population einer BDL Maus (rot) und einer Kontrollmaus (blau).** Analyse mittels Durchflusszytometrie. ( $n = 1$ ).

#### 4.3.4 Cell Targeting

Zur Auswertung der Einflüsse der BDL auf die gezielte Aufnahme von Nanokapseln (englisch cell targeting) *in vitro* wurden den NPCs in Zellkultur DXM-Cy5-NCs hinzugegeben. Hierfür wurden 2 BDL Mäuse und 2 Kontroll-Mäuse verwendet. Die NPCs wurden schließlich geerntet, gefärbt (Tab. 10, Kombifärbung 3) und mittels FACS ausgewertet. Hier zeigte sich die in Abbildung 13 dargestellte Kapselaufnahme von etwa 20 – 30% in allen bestimmten Zellpopulationen nach BDL sowie mit gleichen Anteilen in den Kontrollmäusen. Die großen Unterschiede der BDL gegenüber Kontrollen in den relativen Anteilen der Zellen an der Gesamtpopulation, spiegeln die Ergebnisse aus dem zuvor beschriebenen Ergebnisteil der Zellinfiltration wider (4.3.3).



**Abbildung 13: Vergleich der NC-Aufnahme von NPC Subpopulationen *in vitro*.** Nach der BDL wurden NPCs isoliert und mit DXM-Cy5-NCs über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Menge an NC<sup>+</sup> Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die NC-positiven Zellen sind als Superposition ihrer gesamten Subpopulation dargestellt. Die Bedingungen wurden gegenüber der Kontrollgruppe verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Šidák's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ).

## 4.4 BDL – Therapie

In diesem Abschnitt erfolgte die Einführung der *in vivo* Behandlung der BDL mit DXM-NCs und löslichem DXM. Es wurde der Einfluss der Therapie auf die Laborauswertung, die Zellinfiltration und auf Nekroseareale in histologischen Schnitten untersucht. Zudem wurde das Cell Targeting der NCs analysiert.

### 4.4.1 Laborauswertung

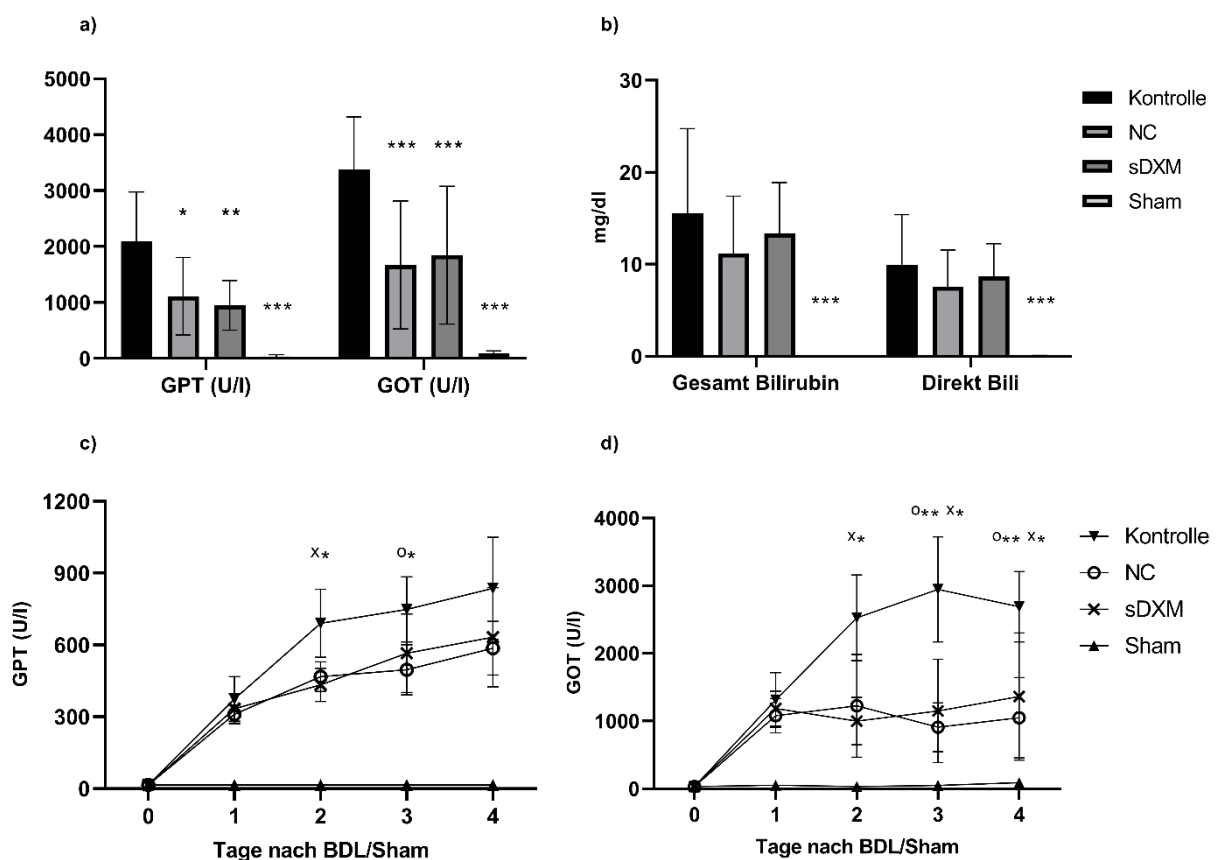
#### 4.4.1.1 Transaminasen

Für die Auswertung der Transaminasen wurden die Proben der täglichen Blutentnahmen zusammen mit denen der finalen kardialen Blutentnahme aller Versuchstiere an das Zentrallabor zur Auswertung gegeben.

Abbildung 14a und 14b zeigen den Vergleich der Ergebnisse kardialer Blutentnahmen 96 Stunden nach BDL. Es konnte eine Reduktion der Transaminasen durch die Therapie mit NCs oder löslichem DXM dargestellt werden. Die Wirksamkeit der NC-Therapie lässt sich hier nicht von derer der DXM-Therapie abgrenzen. Die als Negativ-

Kontrolle dienende Sham-Operation zeigte den zu erwartenden ausbleibenden Anstieg der Transaminasen. Unterschiede im Anstieg des gesamten und/oder des direkten Bilirubins ließen sich zwischen der Therapie-Gruppe und der Kontrolle nicht darstellen.

In den Abbildungen 14c und 14d sind die Verläufe der GPT und GOT in den täglichen Blutentnahmen dargestellt. Hier zeigt sich ein Unterschied im Anstieg beider Transaminasen von den Therapie-Gruppen zur Kontrolle ab dem zweiten Tag. Ein Unterschied zwischen NC-Gabe und derer von löslichem DXM ließ sich auch hier nicht analysieren.



**Abbildung 14: Vergleich der Transaminasen nach BDL: NC- und DXM-Therapie mit Kontroll-BDL und Sham.** a) und b) zeigen Ergebnisse kardialer Blutentnahmen nach 96 Stunden. Die Bedingungen wurden mit der Kontrollgruppe verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (BDL-Gruppen je  $n = 14$ , Sham  $n = 4$ ). c) und d) zeigen den Verlauf der GPT bzw. GOT aus täglichen Blutentnahmen. Die Werte im Verlauf wurden mit den Ausgangswerten verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (BDL-Gruppen je  $n = 8$ , Sham  $n = 4$ ).

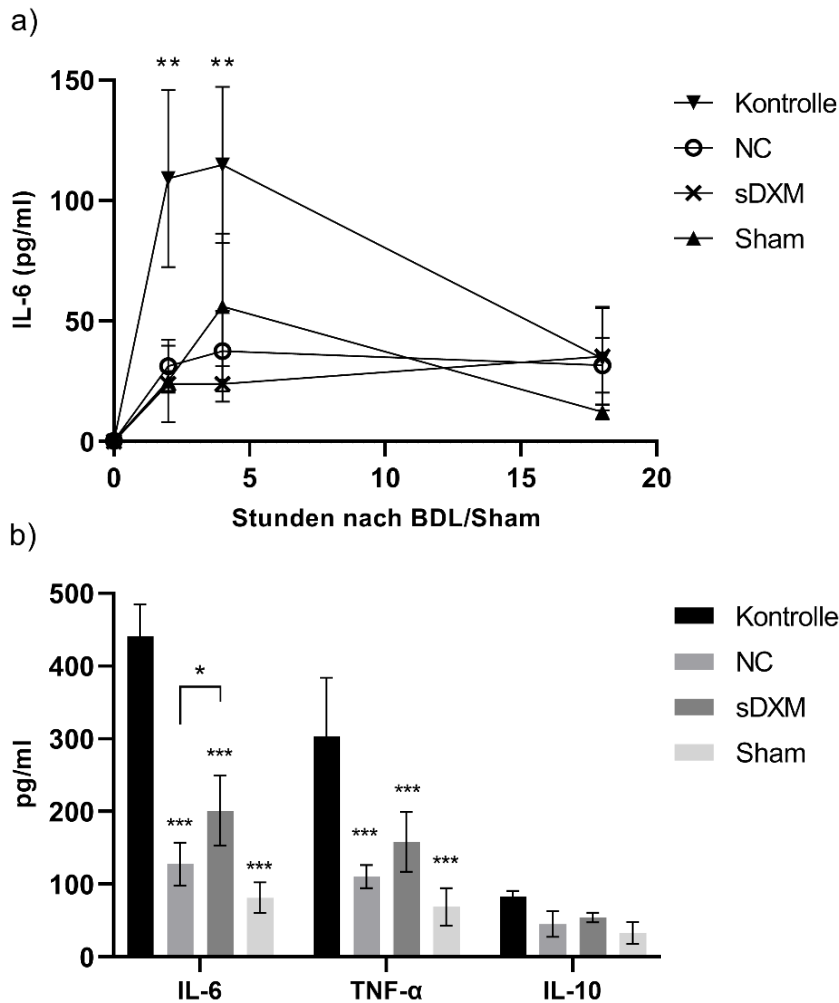
#### 4.4.1.2 Zytokine

Die Zytokinwerte aus den Blutentnahmen nach 0, 2, 4 und 18 Stunden wurden jeweils gepoolt, wenn die zuvor erläuterten Kriterien zutrafen. Abbildung 17a zeigt den IL-6 Verlauf. Hier konnte eine Reduktion der IL-6-Expression durch die Therapie mit NC oder sDXM gegenüber der Kontrollgruppe ab dem 2-Stunden Wert gezeigt werden.

Die IL-6 Ausschüttung nach Sham-Operation ließ sich nicht von BDLs nach Therapie abgrenzen. Nach 4 Stunden zeigte sich in der Sham-Gruppe vereinzelt höhere Werte als bei den Mäusen mit Therapie. Nach 18 Stunden zeigte sich die IL-6 Sekretion in der Kontrollgruppe rückläufig und auf einem ähnlichen Niveau wie nach Therapie.

Abbildung 17b stellt die Werte der CBA-Analyse von Überständen der Zellkultur dar. Die kultivierten NPCs wurden 96 Stunden nach BDL isoliert und mit 2,5 µg/ml LPS stimuliert. Die Überstände wurden nach 18 Stunden Inkubation abgenommen und mittels CBA ausgewertet. Diese Analyse ermöglicht eine Aussage über die Zytokinausschüttung der NPCs unabhängig von interorganischen Faktoren.

Hier zeigte sich ebenso wie in den Blutentnahmen eine Reduktion der IL-6 Expression und in dieser Auswertung auch der TNF- $\alpha$  Expression bei vorheriger *in vivo* Therapie. In der IL-6 Expression stellte sich zudem ein signifikant niedrigerer Wert in der NC Gruppe gegenüber der sDXM Gruppe dar.



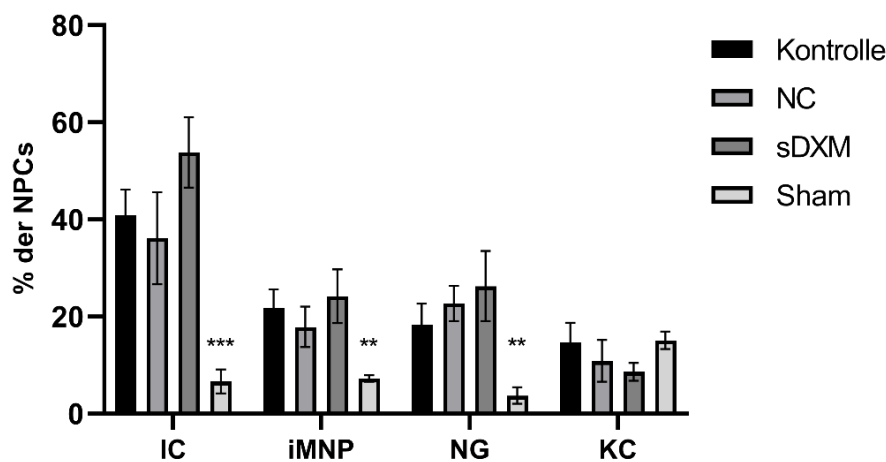
**Abbildung 15: Vergleich der Zytokin-Sekretion nach BDL durch DXM-NCs, sDXM Kontrollen oder Sham.** **a)** Verlauf der *in vivo* IL-6 Sekretion in Serumproben. Werte im Verlauf wurden mit den Ausgangswerten verglichen. Gleiches Signifikanzniveau der Gruppen als gemeinsamer Wert angegeben. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (BDL-Gruppen je  $n = 5$ , Sham  $n = 3$ ). **b)** *In vitro* Zytokin-Expression von NPCs. Die Isolation und Kultivierung der NPCs erfolgte 96 Stunden nach BDL/Sham. Stimulation mit  $2,5 \mu\text{g/ml}$  LPS. Die Bedingungen wurden mit den Kontrollen verglichen. Zudem erfolgte der Vergleich der NC und sDXM Gruppen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (BDL-Gruppen je  $n = 5$ , Sham  $n = 3$ ).



#### 4.4.2 Zellinfiltration

In mehreren Versuchsdurchläufen wurde zudem unter gleichen Kriterien die Zellinfiltration ausgewertet und zur abschließenden Auswertung gepoolt. Dabei wurde der prozentuale Anteil einer Zellpopulation an den NPCs in den Gruppen verglichen. Infiltrierende Zellen nach BDL ist hier als relative Zunahme einer Zellpopulation gegenüber der Sham-Gruppe zu verstehen. Es wurde zudem der Effekt der Therapie auf die Infiltration ausgewertet (Abb. 16).

Es zeigte sich eine deutliche Zunahme in allen Zellen, die in Folge der Entzündungsreaktion in die Leber immigrieren. Demnach stellten sich die infiltrierenden Zellen, iMNPs, sowie neutrophile Granulozyten um das Vielfache vergrößert dar. Die Kupferzellen als leberständige Population zeigten sich nach BDL bei etwa 15% anteilig nicht vermehrt. Die Population der infiltrierenden Zellen zeigte die ausgeprägteste Zunahme auf bis zu etwa 43%. iMNPs und NGs machten nach BDL einen Anteil von etwa 20% aus. Eine eindeutige Differenzierung zwischen Therapie- und Kontroll-Gruppen ist nach Auswertung der Daten nicht möglich.

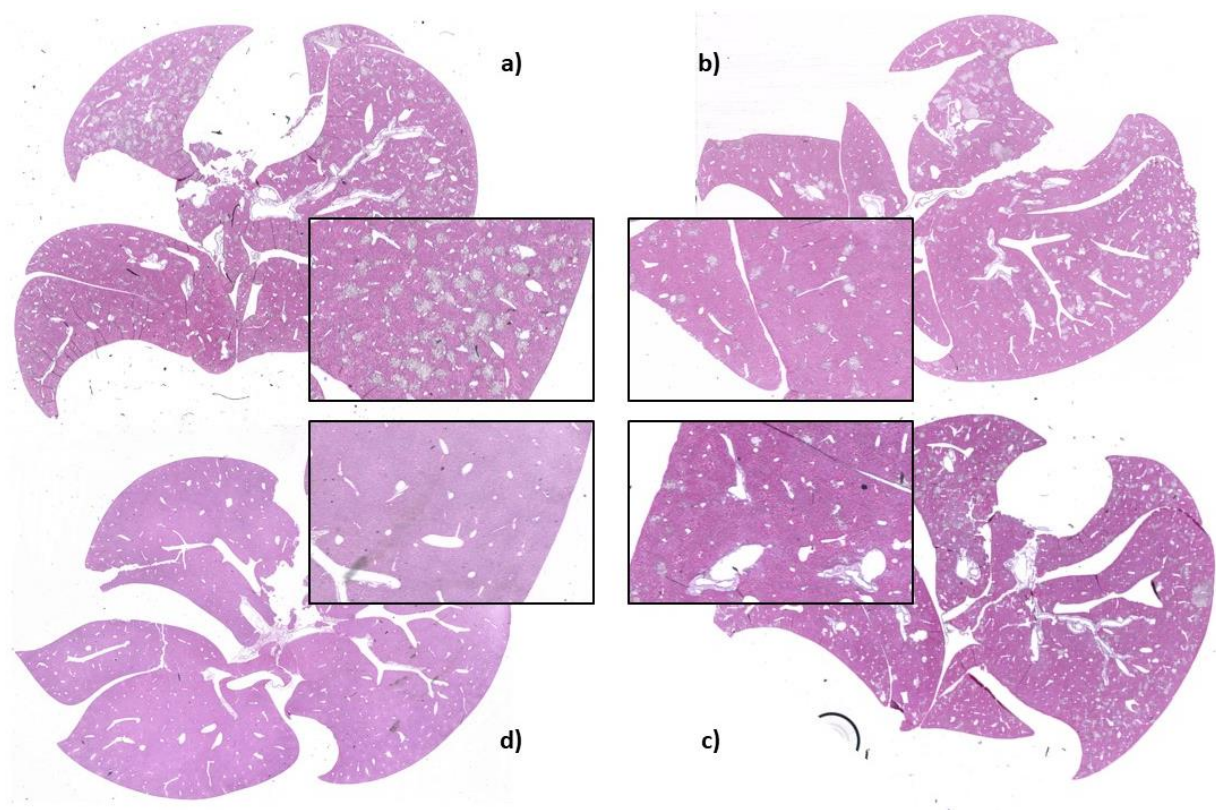


**Abbildung 16: Zellinfiltration verschiedener Zelltypen anhand der gesamten NPC-Population.** *In vivo* Applikation von DXM-NCs und sDXM gegenüber Kontrollgruppen nach BDL. Die Sham Gruppe diente als Negativkontrolle. 96h nach der BDL/Sham wurden die NPCs isoliert, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Bedingungen wurden gegenüber der Kontrollgruppe verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (BDL-Gruppen je  $n = 12$ , Sham  $n = 4$ ).

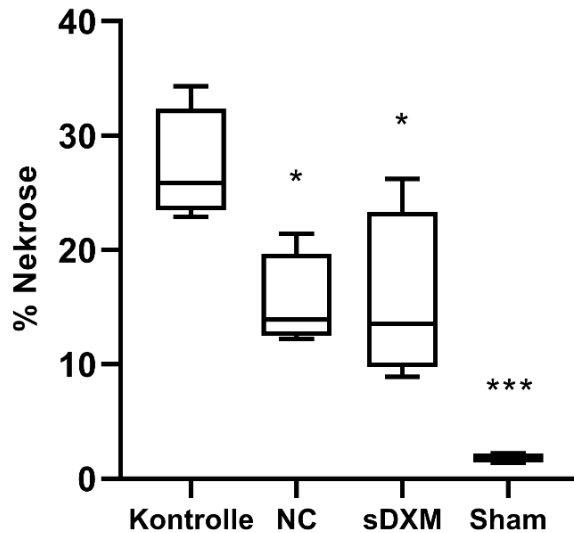
#### 4.4.3 Histologie – Trichrom Färbung

Nach drei Versuchsdurchläufen wurden zum Vergleich der nekrotischen Leberareale histologische Trichrom-Färbungen angefertigt. Die Einzelergebnisse der unterschiedlichen Schnitte zeigten ähnliche Ergebnisse, die in Abbildung 17 exemplarisch aufgeführt sind. Eine Quantifizierung der nekrotischen Areale erfolgte graphisch mittels ImageJ Software. Nach mehreren Testdurchläufen mit geringerer Versuchstierzahl wurden in einem der finalen Durchläufe in diesem Abschnitt die Lebern von 18 Mäusen gefärbt und verglichen.

In der Kontrollgruppe konnte eine diffuse Durchsetzung nekrotischer Areale gezeigt werden. Knapp ein Drittel der Schnittfläche erscheint betroffen. Die Schnitte b und c der therapierten Gruppen zeigen ein ähnlich diffuses Bild, aber mit in anteilig weniger Nekrosen. Im Schnitt der Sham-Leber lassen sich keine Nekrosen erkennen. Abbildung 18 zeigt die Quantifizierung der Nekrose-Anteile.



**Abbildung 17: Vergleich histologischer Leberschnitte in Trichromfärbung nach BDL/Sham.** Exemplarische Darstellung der Versuchsgruppen **a)** Kontrolle, **b)** DXM-NC **c)** sDXM und **d)** Sham. Die Entnahme der Lebern und histologische Auswertung erfolgte 96h nach BDL/Sham. Die Kästen zeigen Vergrößerungen der darunterliegenden Ausschnitte.



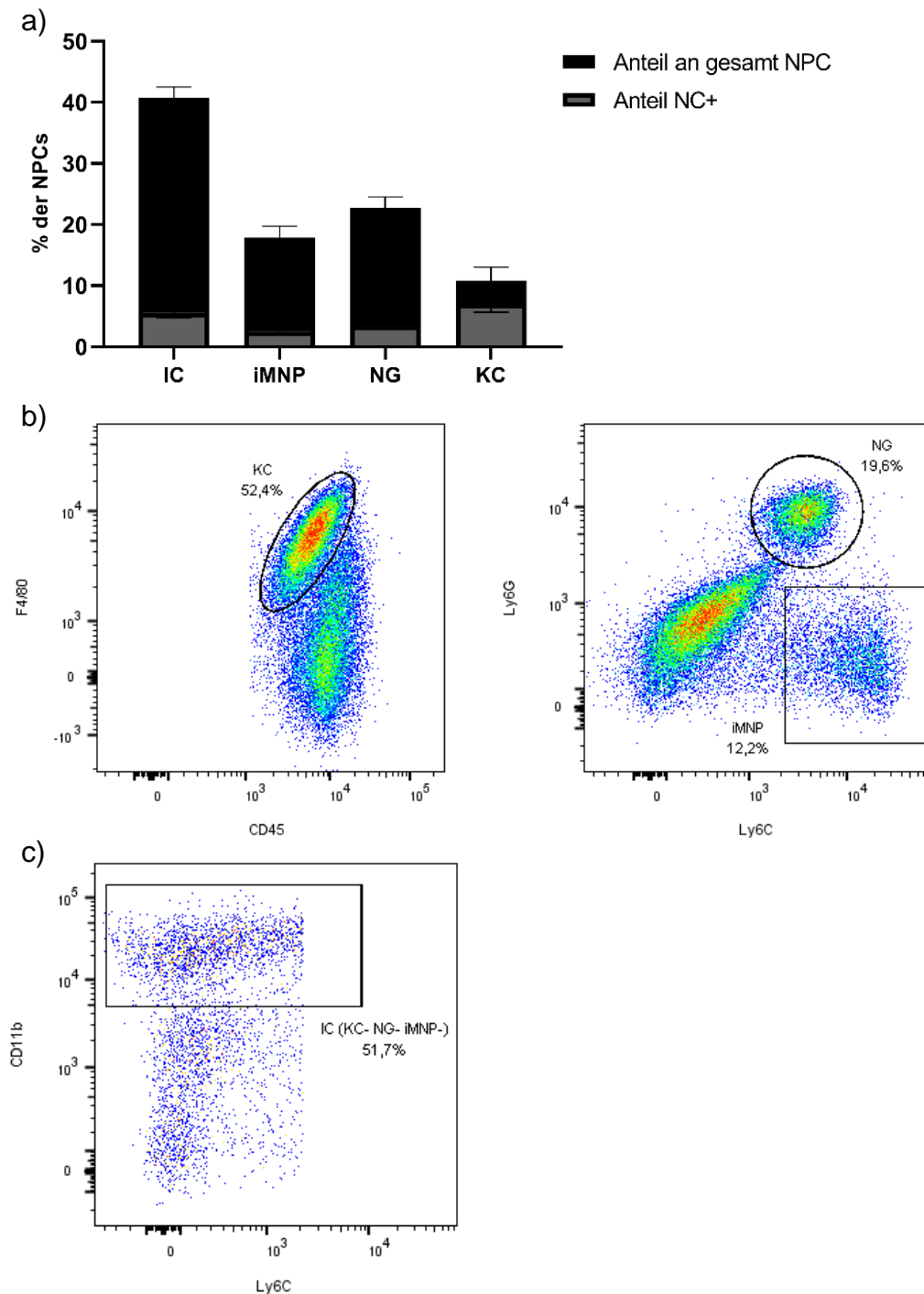
**Abbildung 18: Vergleich der Nekroseareale in histologischen Leberschnitten.** *In vivo* Applikation von DXM-NCs und löslichem DXM gegenüber Kontrollen nach BDL/Sham. Entnahme der Lebern nach 96h, histologische Präparierung und Trichromfärbung. Die Bedingungen wurden mit der Kontrollgruppe verglichen. Signifikanzniveaus wurden festgelegt als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (zweifaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test). Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (BDL-Gruppen je  $n = 5$ , Sham  $n = 3$ ).

#### 4.4.4 Cell Targeting

Zur Auswertung der Kapselaufnahme in die Zellen wurden die NPCs mittels FACS analysiert. Die Gabe der NCs erfolgte 30 Minuten nach BDL und die NPC-Isolation nach 96 Stunden. In den in Abbildung 19a dargestellten Ergebnissen zeigte sich in den über die Tage nach BDL in die Leber einwandernden Populationen der ICs, NGs und iMNPs jeweils eine Aufnahme von etwa 10% der Zellen. Hingegen zeigten die leberständigen Kupfferzellen eine Kapselaufnahme von 60-70%.

Abbildung 19b zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer Leber nach BDL und Kapseltherapie. Die hier dargestellte Differenzierung der Kapsel-positiven Zellen zeigte etwa 50% der aufgenommenen Kapseln in Kupfferzellen. 20% der Kapseln konnten in neutrophilen Granulozyten festgestellt werden und etwa 12% in den iMNPs. Die Population der infiltrierenden Zellen konnte hier nicht aufgeführt werden, da NGs und teilweise iMNPs auch den ICs zugeordnet werden müssen. Alle anderen Populationen sind hingegen sich voneinander unterscheidende Zellen.

Abbildung 19c zeigt etwa 50% der verbleibenden Kapseln in den infiltrierenden Zellen bei einem Gating nach Ausschluss von KC, NG und iMNP aus dieser Population. Dies entspricht einem Anteil an den gesamten Kapsel-positiven Zellen von etwa 8%. Die verbleibenden 8% können mit der hier verwendeten Färbung nicht zugeordnet werden.



**Abbildung 19: Vergleich der *in vivo* NC-Aufnahme verschiedener Zellpopulationen.** Durchflusszytometrische Auswertung. **a)** Anteil NC-positiver Zellen als Superposition ihrer Gesamt-Population (BDL-Gruppen je  $n = 10$ , Sham  $n = 6$ ). **b)** und **c)** exemplarischer Darstellung NC-positiver Zellen im Dot Plot mit verschiedenen Gatings.

## 5 Diskussion

### 5.1 Charakterisierung der Dexamethason Nanokapseln

#### 5.1.1 Austestung der Nanokapseln

Die in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten Nanokapseln wurden durch das Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz bereitgestellt und dazu in einer Wasser-in-Öl Mikroemulsion polymerisiert. Da dies für Versuche, bei denen eine FACS-Auswertung geplant war, in einer Cy5-enthaltenden Lösung durchgeführt wurde, enthielten alle stabilen Cy5-Kapseln somit gleichermaßen Anteile Farbstoff.

In der in 4.1.1 beschriebenen Messung mit markierten Kapseln zeigte sich eine zuverlässige Abgrenzung der Färbung. Dies gab einen Anhaltspunkt für den Anteil der messbaren Kapseln in den folgenden Versuchen mit intrazellulärer Kapselaufnahme. Vor dem Hintergrund lassen sich bei etwa 90% als positiv gemessenen Events die verbleibenden 10% überwiegend als Kapselschrott bewerten, da alle Kapseln mit erhaltener Kern-Hülle Differenzierung Cy-5 enthalten müssen.

In der durchflusszytometrischen Auswertung zeigt sich dieser Schrott als Fragmente unterschiedlicher Größe, maximal aber mit Größe der Nanokapseln. Es lässt sich nach Gabe der Kapseln somit auch auf eine Gabe von 10% abzubauenden Festkörpern ohne Wirkung folgern. Die Möglichkeit einer höheren Aufreinigung durch z.B. Zentrifugation, ohne weitere Kapseln zu zerstören, ist dabei anzunehmen. Dies wurde aber hier nicht weiterverfolgt. Ebenso lässt sich annehmen, dass somit mindestens etwa 90% der Kapseln nach dem Prozess der Herstellung, Lagerung, Transport und unter Versuchsanwendung einen intakten Kerninhalt besitzen. Die weite Aussparung von Kapseln mit indifferenter Cy5-Konzentration weist zudem auf eine hohe Dichtigkeit und Stabilität der Kern-Hüllen Struktur mit geringer Leckage des Inhaltes hin.

#### 5.1.2 NCs supprimieren *in vitro* Inflammation nach Phagozytose durch NPCs

##### 5.1.2.1 DXM-Nanocarrier supprimieren pro-inflammatorische Zytokine

Der in dieser Arbeit zentrale *in vitro* gemessene Effekt der Nanokapseln war die Suppression von IL-6 in der NPC-Zellkultur. Dies stellte sich zudem in Abhängigkeit

von der NC-Dosis dar. IL-6 wurde hier stellvertretend als eines der pro-inflammatorisch wirksamen Zytokine analysiert.

In ihrer Studie konnten Bartneck *et al.* liposomale Carrier mit Dexamethason beladen. Diese hemmten *in vitro* die Zytokinexpression von murinen NPCs. Zusätzlich zeigte sich *in vitro* eine Reduktion der Zellmigration von Makrophagen als Reaktion auf die Zytokin-Suppression. Als Modell eines akuten Leberschadens diente hier die Gabe von Conavalin A, ein chronischer Leberschaden wurde mit Gabe von Carbon tetrachloride simuliert (Bartneck *et al.* 2014).

Die Reduktion des von Leber-NPCs ausgeschüttetem IL-6 konnte in einer weiteren Studie durch Silica (SiO<sub>2</sub>)-Nanokapseln nachgewiesen werden. Dexamethason wurde hier in Kapseln mit einer Kern-Hüllen Morphologie eingeschlossen. Hier konnte zudem eine gute Stabilität der Kapseln im Blutplasma durch eine PEGylierung der Kapseln und infolgedessen beobachteten Stealth-Effekt durch Oberflächenanhaftung von Blutproteinen gezeigt werden (Jiang *et al.* 2020).

Die Autoren der vorangehend genannten Studie zeigten zudem eine Dosis-abhängige IL-6 Suppression mittels unterschiedlicher enkapsulierter DXM-Konzentrationen. In der hier in 4.1.3 gemessenen *in vitro* Kapselaufnahme stellte sich ebenso eine konzentrationsabhängige IL-6 Reduktion dar. Der in dieser Arbeit gemessene Dosis-Verlauf deckt sich mit den zuvor von Fichter *et al.* erzielten Ergebnissen. Die maximale Sättigung der Zellen durch Kapselaufnahme wurde in diesen Versuchen nicht erreicht. Eine maximal hohe Kapselbeladung zu erreichen ist auch aufgrund zunehmender Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Konzentration nicht zu erstreben (Fichter *et al.* 2013).

Die geringe Zunahme der Kapselaufnahme nach 24 Stunden gegenüber 2,5 Stunden lässt sich durch die unmittelbare Nähe der Kapseln gegenüber den phagozytierenden Zellen erklären, welche in gemeinsamem Kulturmedium resuspendiert wurden. Eine Übertragbarkeit auf das *in vivo* Modell ist im Rahmen der konzentrationsabhängigen Zunahme der phagozytierten Zellen anzunehmen. Auch eine rasche Aufnahme der Kapseln, welche den NPCs in den Lebersinusoiden unmittelbar nach Kapselapplikation präsentiert werden, ist wahrscheinlich.

#### 5.1.2.2 Kupfferzellen als primäres Ziel der anti-inflammatorischen NC-Therapie

Die Phagozytose der Kapseln durch Leber-NPCs und das Freiwerden des Kapselinhaltes innerhalb der Zellen wurde mit den hier verwendeten Kapseln zuvor durch Fichter *et al.* konfokalmikroskopisch gezeigt. Die Aufnahme der NCs wurde hier mittels einer CellTracker™ Färbung dargestellt, welche beim Kontakt mit intrazellulären Esterasen einen Farbumschlag hervorruft (Fichter *et al.* 2013).

Die erfolgende Zytokin-Suppression in der vorliegenden Arbeit lässt ebenfalls auf eine Kapselaufnahme in die Zellen mit subsequentem Freiwerden des Kapselinhaltes schließen. Innerhalb der NPCs wird IL-6 nach Stimulation mit LPS maßgeblich von Kupfferzellen freigesetzt. Daher kann der gemessene Effekt an dieser Stelle im größten Teil der Kapselaufnahme durch Kupfferzellen zugeordnet werden.

KCs sind, wie in 2.2 beschrieben, primär für die Mediation der Phagozytose unspezifischer Partikel, Substanzen, Endotoxine uvm. verantwortlich. Zudem werden entzündliche Prozesse in großem Maße durch die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 moduliert. Somit bilden Kupfferzellen mit ihrer prädestinierten Kapselaufnahme und Immunmodulation eine Schlüsselrolle in den in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen.

#### 5.1.2.3 Alternative Formen eines Targeted Delivery von Dexamethason

Das DXM im Kern der Kapseln wird bei den in dieser Arbeit genutzten NCs durch den intrazellulären Abbau der Kapseln freigesetzt. Mittels verschiedener Kapsel-formulierungen sind andere Mechanismen der Wirkstoff-Freisetzung möglich. So wurde in einer weiteren Studie in pH sensiblen Laponit Nanoplättchen Dexamethason enkapsuliert. Auf diese Weise konnte die Wirkung gezielt in azidotischem, wie bspw. entzündlichem Gewebe, freigesetzt werden (Roozbahani *et al.* 2017).

#### 5.1.3 Vergleich der Kapselformulierung gegenüber löslichem Dexamethason

DXM in seiner gelösten Form reduzierte die IL-6 Ausschüttung bei einem direkten Vergleich stärker als die Nanokapseln. Basierend auf diesen Versuchen konnte ein Wirkungsfaktor des löslichen DXM von 22,67 gegenüber den DXM NCs berechnet werden. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass der Wirkstoff Teil seines Effekts durch die Polymerisation verliert, wohingegen das lösliche DXM in vollständig

bioaktiver Form vorliegt. Wirksame Anteile der verwendeten Kapseln sind hier das aus dem Kern freiwerdende DXM sowie bioaktive Moleküle in den Hüllenfragmenten. Fichter *et al.* vermuteten, dass die polymerisierte Hülle durch ihren hydrophilen Charakter mobile Ketten der DXM-Moleküle in den flüssigen Kern hervorragen lässt und die Hülle somit einen eigenen wirksamen Effekt erreicht (Fichter *et al.* 2013).

Der in 4.1.5 beschriebene Vergleich verschiedener Kapseltypen zeigte jedoch keine relevante Differenz in der IL-6 Suppression. Dies ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass die Beschaffenheit der Kapseln sich dabei nicht ändert. Der Zusatz von Cy5 zeigte keine Veränderung in der Wirkung, ebenso nicht die Verwendung von DXM-Phosphat. Letzteres nimmt als Pro-Drug eine 500-fach wasserlöslichere Form als reines DXM an. Phosphatasen in den Zellen spalten zur Aktivierung die Phosphatgruppe ab, was im gleichen Wirkstoff resultiert. Die Wasserlöslichkeit macht dabei am ehesten bei höheren Konzentrationen und in intravenöser Applikation freien Wirkstoffes einen Unterschied (Salt *et al.* 2018). Es kann somit in den folgenden Versuchen von vergleichbaren Effekten der unterschiedlichen DXM-(Kapsel-)Formulierungen untereinander ausgegangen werden.

Die Versuche in dieser Arbeit wurden im Verlauf mit mehreren Batches, also Herstellungszyklen von Kapseln durchgeführt. Der Kapselvergleich gegenüber löslichem DXM wurde nur mit einem Batch dreimalig wiederholt, somit lässt sich der Mittelwert nicht auf alle verwendeten Kapseln übertragen. Bei gleichem Herstellungsverfahren mit gleichen Konzentrationen ist aber nicht von erheblichen Differenzen auszugehen. Zudem sind den Abweichungen der Ergebnisse durch Messungenauigkeit und Ungenauigkeiten in den Versuchsdurchführungen ein größerer Effekt zuzuordnen.

#### 5.1.4 *In vivo* applizierte DXM-NCs supprimieren Zytokin-Response in NPCs

In den *in vivo* Versuchen konnte die Aufnahme der Nanokapseln in die Zellen gezeigt werden. Im Vergleich zu der in 4.1.3 beschriebenen *in vitro* Kapselaufnahme von etwa 7% der NPCs stellte sich *in vivo* mit etwa 5,5% kapselpositiven NPCs eine ähnliche Größenordnung dar. Dies lässt auf eine gute Bereitstellung der Kapseln gegenüber den Leberphagozyten *in vivo* schließen.



Die *in vivo* Gabe von DXM-NCs und des löslichen Dexamethason zeigten beide nach anschließend angelegten Zellkulturen und Stimulation mit LPS eine intrazelluläre Reduktion der IL-6 Expression. Als Glukokortikoid mit einer langen Wirksamkeit über etwa 48 Stunden hat DXM in der Inkubation der Zellkultur über 24 Stunden seinen Effekt noch nicht verloren (Meikle *et al.* 1977). Eine Abnahme der Suppression bei längerer Inkubationszeit der Zellkultur und erneuter LPS Gabe ist anzunehmen. Es bleibt offen, ob die in den Zellen verbleibenden DXM-NC eine länger andauernde Suppression als das lösliche DXM bewirken. Dies wurde hier nicht getestet und könnte Teil weitergehender Versuche sein.

In der gezeigten Differenzierung der kapselaufnehmenden Zellen stellt sich ein ähnliches Verhältnis zwischen LSECs (Endothelzellen), DCs und KCs dar. Jedoch war ein deutlicheres Verhältnis der Phagozytose zugunsten der KCs zuvor anzunehmen. Die indifferente Verteilung ist hier am ehesten auf eine ungenaue Färbung zusammen mit einer geringen Anzahl isolierter NPCs zurückzuführen. Eine Analyse der Kapselaufnahme unterschiedlicher Zellen wurde in späteren Versuchen nach BDL erneut durchgeführt.

Im Ganzen ist die Aussagekraft des unter 4.2.1 gezeigten Versuches als den anderen Versuchen untergeordnet zu betrachten. Klare Tendenzen lassen sich ausschließlich aus der im FACS dargestellten hier *in vivo* stattgehabten Kapselaufnahme in die Zellen und der daran angeschlossenen intrazellulären IL-6 Suppression ableiten.

## 5.2 Auswirkungen und Behandlung der Gallengangsligatur

### 5.2.1 Laborparameter

#### 5.2.1.1 Erhöhung der Transaminasen nach BDL als Parameter der Zellschädigung

In den hier durchgeführten Versuchen zeigte sich eine verlässlich reproduzierbare Erhöhung der Transaminasen als Korrelat des cholestatischen Leberzellschadens. Duwaerts *et al.* sahen 3 Tage nach BDL eine signifikante Erhöhung der ALT (GPT) auf im Mittel 1050 U/L gegenüber einer Sham-Gruppe ohne relevanten Anstieg (Duwaerts *et al.* 2013). Diese Werte sind sehr gut vergleichbar mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit und decken sich mit denen weiterer Studien. Die Messung der Transaminasen erfolgte meist nach 2-3 Tagen (Miyoshi *et al.* 1999; Gehring *et al.* 2006; Jang *et al.* 2012). Georgiev *et al.* zeigten in ihrer Untersuchung des Zeitverlaufs

nach BDL einen Anstieg der ALT (GPT) mit Maximum nach 2 Tagen. Bereits ab dem dritten Tag fielen die Werte rasch unter 1000 U/l. Anschließend verblieben die Transaminasen über den gesamten beobachteten Zeitraum bis nach 45 Tagen leicht erhöht (Georgiev *et al.* 2008). Der beschriebene initiale Peak konnte in dieser Arbeit nicht gesehen werden. Die hier gemessenen Transaminasen im Zeitverlauf bis 96 Stunden nach BDL repräsentieren die Akutphase des Leberschadens. Mit ausgeprägten interindividuellen Schwankungen bei den Mäusen zeigte sich dennoch ein steter Anstieg der Transaminasen mit angedeutetem Abfall nach vier Tagen in der GOT.

Neben der Messung der Transaminasen in der Akutphase ist eine Bestimmung derer Verhältnisse als Verlaufsmarker im Rahmen der entstehenden Leberfibrose möglich. Xie *et al.* zeigten hierzu in BDL-Mäusen eine Korrelation des Aspartat-Aminotransferase zu Alanin-Aminotransferase Verhältnis (GOT / GPT) zu früher Leberfibrose (Xie *et al.* 2017).

#### 5.2.1.2 Zunahme der pro-inflammatorischen Zytokinantwort durch Zellinfiltration

In der Auswertung von Serumproben nach BDL zeigte sich ein rascher Anstieg des IL-6 als Zeichen der akuten Inflammation. Dies deckt sich mit den *in vitro* Ergebnissen nach LPS Stimulation von NPCs. Ebenso zeigten Vergleichsarbeiten ähnliche Ergebnisse (Gehring *et al.* 2006; Duwaerts *et al.* 2013).

Die Expression von IL-6 im akutem Leberschaden nach BDL ist zum größten Teil auf Makrophagen zurückzuführen. Diese sezernieren in der akuten Entzündungsreaktion eine Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen. Innerhalb der ersten Stunden bis wenigen Tage sind dies hauptsächlich Kupfferzellen. Diese aktivieren im weiteren Verlauf iMNP, welche neben anderen Zellen in die Leber infiltrieren und ebenfalls pro-inflammatorisch wirken. In der Differenzierung von Kupfferzellen gegenüber iMNPs drei Tage nach BDL sahen Duwaerts *et al.* in iMNP-angereicherten Kulturen eine deutlich höhere Expression von IL-6 gegenüber Kulturen mit angereicherten Kupfferzellen. Unterschiede in der Konzentration von TNF- $\alpha$  konnten nicht gesehen werden, TGF- $\beta$  zeigte sich höher in den Kulturen der KCs (Duwaerts *et al.* 2013).

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Zunahme der IL-6 Expression nach BDL bei beobachteter Infiltration von iMNPs. Es ist somit von einer durch die Infiltration

bedingten Steigerung der inflammatorischen Antwort auszugehen. So zeigte sich in der in 4.4.1 beschriebenen IL-6 Analyse in der Zellkultur eine trotz gleicher LPS-Stimulation höhere IL-6 Expression bei zuvor durchgeführter BDL gegenüber der Sham-Gruppe. Dies lässt auf eine stattgehabte Infiltration von iMNP's schließen. Zellinfiltration bedingt somit vermehrte Inflammation.

#### 5.2.1.3 Reduktion der Inflammation und des Leberzellschadens durch DXM-NCs

Nach einmaliger Gabe von Dexamethason, eine halbe Stunde nach BDL, zeigte sich in den Versuchen eine konsequente Suppression der Transaminasen. Dies war im zeitlichen Verlauf ab dem zweiten Tag nach BDL zu beobachten. Es ist somit anzunehmen, dass vor allem das initiale Freiwerden der GPT aus dem Zytosol der geschädigten Hepatozyten nicht primär inflammationsbedingt ist. In der Messung der Zytokine im Serum nach BDL wird zudem ein deutlich abgeflachter IL-6 Ausschlag durch die Therapie deutlich. In Vergleichsarbeiten sind ähnliche Versuchsaufbauten meist mit täglichen Gaben von DXM verbunden (Eken *et al.* 2006; Verhulst *et al.* 2016). Der Therapiebeginn in der frühen Akutphase der Inflammation, zusammen mit der langen Wirkdauer des DXM unterbricht somit bereits die Entstehung der frühen Entzündungsreaktion und hemmt den Leberschaden über mehrere Tage.

In dem unter 4.1.2 bereits erwähnten Modell von akutem Leberschaden mittels ConA oder CCl<sub>4</sub> von Bartneck *et al.* konnten ähnliche Ergebnisse mit DXM Liposomen statt Kapseln erzielt werden. Die durchgeführte Therapie mit Nanocarriern reduzierte ebenfalls signifikant den Leberzellschaden anhand der Reduktion der ALT/GPT. Ebenso zeigte sich eine Hemmung der Inflammation anhand einer verminderten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine. Die Reduktion des Leberzellschadens zeigte sich in dieser Studie unter Therapie mit Nanocarriern sogar größer als mit freiem DXM (Bartneck *et al.* 2015).

Weder in der Messung der Zytokine noch bei den Transaminasen konnte ein relevanter Unterschied in der Wirkung der Nanokapseln gegenüber dem freien DXM gemessen werden. Die in 4.1.4 beschriebene *in vitro* Äquivalenz-Dosis zeigt somit auch *in vivo* einen gleichen Effekt nicht nur auf die IL-6 Suppression als *in vitro* Referenzwert, sondern auch auf die Leberzellschädigung. Auch die andere Pharmakodynamik der NCs *in vivo* weist in den Versuchen keine abweichenden Effekte vor.

Wang *et al.* therapierten Mäuse mit DXM-Nanokapseln (Nanolipid Carrier) in einem CCl<sub>4</sub>-Modell akuten Leberschadens. Die durch die Therapie bedingte Reduktion der Transaminasen zeigte in ihrer Studie keinen Unterschied zwischen der NC-Gruppe und löslichem DXM, obwohl sie wie unter Bartneck *et al.* einen ausgeprägteren Effekt der NCs auf die Fibrose sahen. Sie schlossen somit darauf, dass der suppressive Effekt der DXM-NCs auf die Fibrose nicht allein durch den Erhalt von Parenchymzellen zu erklären sei. Der ausgeprägtere Effekt der NCs auf die Fibrose könnte in der Akkumulation der NCs in unterschiedlichen NPCs über die Zeit begründet sein (Wang *et al.* 2010).

Mehrfachgaben der Nanocarrier gegenüber der Einmalgabe in der vorliegenden Arbeit wären notwendig, um diese Akkumulation zu erreichen. Es zeigte sich ebenfalls kein Unterschied in den Transaminasen im Vergleich der DXM oder NC-Therapie. Eine Fibrose wurde hier nicht quantifiziert, da die Messungen ausschließlich in der Akutphase nach BDL durchgeführt wurden und nie die Phase der Fibrose erreicht wurde. Vor dem Hintergrund ist aber ein protektiver Effekt der hier genutzten NCs auf die Fibrose und ggf. sogar auf die Senkung der Transaminasen über die Wirkung des löslichen DXM hinaus in Betracht zu ziehen.

Unterschiede aufgrund der verschiedenen Modelle und dadurch anderem Ansprechen auf die Therapie sind ebenfalls möglich, zudem wurden jeweils andere Kapselformulierungen genutzt. Weitergehende Versuche sind notwendig, um die beschriebenen NC-Effekte im vorliegenden BA-Modell zu ergründen.

#### 5.2.1.4 Dosisabhängige Effekte der DXM-(NC-)Therapie

Wang *et al.*, verglichen die Wirkung unterschiedlicher Kapseldosen, bei der sich eine gesteigerte Protektion vor Fibrose in intermediären oder niedrigen Dosen zeigte (Wang *et al.* 2010). Vermehrte Fibrose durch gesteigerte Toxizität bei höheren Kapseldosen mit eigenem fibrogenen Effekt ist hier denkbar.

Eken *et al.* konnten in ihrer Studie mit BDL in Ratten unter hoher Dosis freien Dexamethasons keinen signifikant größeren Effekt auf die Reduktion eines histopathologischen Scores erkennen. In der Auswertung zeigte sich in der Gruppe der therapierten Ratten, besonders unter intermediären oder niedrigen DXM-Dosen, eine signifikante Reduktion des Bilirubins und der Transaminasen gegenüber den

Kontrollen (Eken *et al.* 2006). Zum Vergleich konnte in der hier vorliegenden Arbeit keine Reduktion des Bilirubins durch Therapie nachgewiesen werden. Eine vermehrte Konjugation des Bilirubins durch erhaltene Hepatozyten und anschließende Elimination über die Nieren ist denkbar. Eken *et al.* wählten hingegen eine Versuchsdauer über 14 Tage mit täglicher DXM Gabe (Eken *et al.* 2006). Der längere Beobachtungszeitraum scheint für einen messbaren Effekt geeigneter zu sein.

## 5.2.2 Zellinfiltration

### 5.2.2.1 Zytokin vermittelte Zellinfiltration nach Inflammation

Wie bereits unter 5.2.1 diskutiert, werden durch die akute Zellschädigung nach Cholestase Transaminasen freigesetzt. Aufgrund dessen steigt das Bilirubin. Zudem erfolgt die pro-inflammatorische Aktivierung lokaler immunmodulatorischer Zellen wie der Kupferzellen mit Ausschüttung von bspw. IL-6, IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ .

Die Zellinfiltration als Reaktion auf eine akute oder chronische Leberschädigung wird im größten Teil durch Zytokine (und Chemokine) gesteuert. Die Signalwege der unterschiedlichen Immunzellen konnten durch die Untersuchung von Tiermodellen und Patientenproben zunehmend identifiziert werden. So konnte in Studien gezeigt werden, dass Knock-outs bestimmter Chemokine (CCR1, CCR5) in Mäusen nach BDL zu verminderter Infiltration von Makrophagen führen (Zimmermann *et al.* 2011). Zusätzlich wird die Infiltration von iMNP (Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten) in entzündliche Leberareale unabhängig von Chemokin-Rezeptoren durch fokale Induktion von interzellulären Adhäsionsmolekülen gesteuert. Die zentrale Aktivierung der infiltrierenden Zellen, vor allem aus dem Knochenmark, verläuft jedoch Zytokin gesteuert (Shi *et al.* 2010).

Infolgedessen entsteht eine Migration von Entzündungszellen in die Leber, vor allem in die portalen Felder. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich eine dadurch bedingte Verschiebung der NPC-Populationen hin zu infiltrierenden CD11b<sup>+</sup> Zellen, welche aus dem Knochenmark rekrutiert werden, Ly6C<sup>+</sup> iMNPs und Ly6G<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten.

Histologische Analysen von BDL-Lebern zeigen die dadurch bedingte Modulation der NPC-Population als chronisch inflammatorische Infiltrate. Zudem präsentiert sich eine

Infiltration von den in dieser Arbeit nicht quantifizierten Lymphozyten, Eosinophilen und Plasmazellen (O'Brien *et al.* 2016).

Es konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten innerhalb der ersten 3 Stunden nach BDL in die Leber infiltrieren und dort für Tage bis Wochen im Rahmen der Fibrogenese verbleiben. Neutrophile Granulozyten und weitere infiltrierende Zellen sind dabei in direkter Korrelation mit der Entstehung von Fibrose assoziiert (Saito *et al.* 2000; Eken *et al.* 2006).

Duwaerts *et al.* sahen in ihrer Auswertung 3 Tage nach BDL ebenfalls einen durch Zellinfiltration bedingten deutlichen Anstieg der iMNP und neutrophiler Granulozyten. Kupferzellen und iMNP als Lebermakrophagen machten nach BDL gemeinsam etwa 34% der NPC aus. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich dies noch deutlicher mit etwa 40%. Duwaerts *et al.* differenzierten die KCs und iMNP durch die Injektion von magnetischen Beads vor Durchführung der BDL. Zudem charakterisierten sie die iMNP als F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>hi</sup> gegenüber CD45<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup> in dieser Arbeit (Duwaerts *et al.* 2013). Die Differenzierung zwischen CD11b<sup>+</sup> und CD11b<sup>-</sup> iMNP wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher durchgeführt und es wurde sich auf die Abgrenzung der iMNP Gesamtpopulation begrenzt. Die Differenzierung zwischen KCs und iMNP ist durch erweiterte Zellmarker und die Gabe von Beads in der Arbeit von Duwaerts *et al.* als genauer zu bewerten. Eine Abgrenzung der Zellpopulationen im Rahmen einer tendenziellen Aussage ist durch die Methode in der vorliegenden Arbeit dennoch anzunehmen.

In den durchgeführten Versuchen konnten keine relevanten Unterschiede im Anteil der Kupferzellen an den Gesamt-NPCs vor und nach BDL gezeigt werden. Die gleichen Ergebnisse wurden auch von Georgiev *et al.* erzielt, welche erst 2 Wochen nach BDL mit der Manifestation einer Fibrose einen deutlichen Anstieg der KC-Population beobachteten (Georgiev *et al.* 2008).

#### 5.2.2.2 Ausbleibende Reduktion der Zellinfiltration durch DXM-(NC-)Therapie

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich die Zellinfiltration nicht signifikant durch die DXM Therapie beeinflusst. Möglich ist, dass durch die einmalige Gabe 30 Minuten nach BDL und Auswertung nach 4 Tagen ein zu geringer Zeitraum der Versuchslaufzeit therapeutisch abgedeckt wurde. Für die Reduktion der

Transaminasen über 4 Tage reichte die Einmalgabe jedoch aus. In der Bestimmung der IL-6 Ausschüttung zeigte sich eine Suppression des initialen Peaks mit anschließendem Angleichen der BDL-Gruppen. Stellvertretend für die Modulation der Zellinfiltration ist auch eine Reduktion des IL-6 nach spätestens 18 Stunden nicht mehr wahrscheinlich. Ein ähnliches Verhalten anderer pro-inflammatorischer Zytokine ist anzunehmen. Infolgedessen könnten infiltrierende Zellen nach Ablauf der Suppression nicht mehr durch die Einmalgabe beeinflusst werden. Diese Annahme unterstützt, dass DXM neben IL-6 auch die Expression u.a. von IL-8 und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) supprimiert. Diese Zytokine haben eine deutliche Assoziation mit portaler Zellinfiltration. Dies zeigten Hsieh *et al.* im Rahmen ihrer Studie mittels verminderter Infiltration von Lymphozyten und Neutrophilen nach BDL. Dabei wurde 2 Wochen nach Ligatur der Gallenabfluss über zuvor eingesetzte Tubes wiederhergestellt und im Sinne einer Kasai Portoenterostomie anschließend die tägliche DXM Gabe begonnen. Eine Reduktion der Zellinfiltration durch DXM konnten somit gezeigt werden (Hsieh *et al.* 2004).

#### 5.2.2.3 Modulation der Immunzellpopulation

Neben der oben bereits beschriebenen Suppression pro-inflammatorischer Zytokine und Transaminasen führt die Gabe von DXM-Carriern nach Leberschaden zu einer Reduktion der Gesamt-Leukozytenzahl. Dies verläuft im Rahmen einer geringeren Zellinfiltration. In ihrer Studie zeigten Bartneck *et al.* zudem eine Depletion von T-Zellen. Diese präsentierten sich sensibler gegenüber DXM in lysosomaler Verpackung, was zu vermehrter Apoptose von T-Zellen aber nicht von Makrophagen führte. Neben der zu erwartenden Reduktion einer Immunzellinfiltration zeigt dies einen weiteren Vorteil der DXM-Nanocarrier gegenüber ihrer konventionellen Formulierung, die diese gezielte Effektplatzierung ohne hohe Nebenwirkungen nicht erreicht. DXM-Nanocarrier führen neben der beschriebenen Reduktion entzündlicher Zellinfiltration zu einem Anstieg des protektiven M2 Kupfferzell-Phänotypen. In dieser Form exprimieren KCs selbst anti-inflammatorische Zytokine. Um diesen Effekt durch die in der vorliegenden Arbeit genutzten NCs zu zeigen, bedarf es jedoch weiterer Versuche. Aufgrund eines sehr ähnlichen Musters von Zielzellen mit intrazellulärem Freiwerden des DXM ist eine ähnliche Wirkung aber anzunehmen (Bartneck *et al.* 2015).

Die in 4.4.2 dargestellte Tendenz einer geringeren Kupfferzell-Population nach Therapie kann zumindest gegenüber der Sham-Population mit einem relativen Anstieg der anderen Zellpopulationen erklärt werden. Verhulst *et al.* analysierten ein Modell eines durch eine DDC (C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>)-Diät verursachten akuten Leberschadens. Es zeigte sich neben verminderten pro-entzündlichen Zytokinen eine verminderte Zahl Kupfferzellen durch eine DXM-Therapie. Die Autoren führten dies auf eine Reduktion des MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) zurück (Verhulst *et al.* 2016). Neben den durch DXM unveränderten Populationen der anderen NPCs ist der geringe Unterschied in den KC-Populationen in der vorliegenden Arbeit jedoch auch mit Messungengenauigkeit erklärbar.

#### 5.2.2.4 Zellinfiltration wirkt Fibrinogen

Die Infiltration der Immunzellen wirkt wiederum pro-inflammatorisch. In dieser entzündlichen Umgebung werden, wie einleitend beschrieben, hepatische Sternzellen aktiviert und bilden als Myofibroblasten extrazelluläre Matrix. Diese Aktivierung erfolgt unter anderem durch die Faktoren TGF- $\beta$  und VEGF, deren Ausschüttung sich durch Glukokortikoide ebenfalls hemmen lässt. Andrade *et al.* sahen eine Reduktion der Leberfibrose nach BDL in Ratten durch anschließende Gabe von Prednisolon. Zudem zeigte Pentoxifyllin (PTX), ein anti-fibrogenes Medikament, in einer weiteren Versuchsgruppe eine ähnliche Reduktion (Andrade Wde *et al.* 2009). In ihrer anschließenden Studie zeigten beide Medikamente die reduzierte Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) und PTX zusätzlich von TGF- $\beta$  (Andrade Wde *et al.* 2012). Eine Reduktion der bei längerer Versuchsdauer entstehenden Fibrose auch durch Dexamethason und DXM-NCs in weiterführenden Versuchen dieser Arbeit ist anzunehmen.

#### 5.2.3 Cell Targeting

##### 5.2.3.1 Biodistribution der Kapseln in Makrophagen der Leber

Die beschriebenen Effekte sind auf die gezielte Aufnahme der Nanokapseln durch phagozytierende Leberzellen zurückzuführen. Nach intravenöser Applikation der Kapseln werden diese, aufgrund von Form und Größe, zu einem großen Anteil von der Leber aus dem Blut gefiltert. Auch andere Organe wie Milz, Lunge oder Niere nehmen mit ihrem retikulohistiozytären System an der Aufnahme von Kapseln teil. Diese



prädominante Aufnahme durch die Leber ist bedingt durch ihre Funktion als primäres filtrierendes Organ für Fremdkörper und Toxine aus dem Blut. Somit ist die Leber auch das primäre Aufnahmeorgan für unterschiedliche Nanocarrier in dafür konstruierter Formulierung (Wang *et al.* 2010; Pietrzak-Nguyen *et al.* 2014; Bartneck *et al.* 2015; Jiang *et al.* 2020). Das Wissen, von welchen Zellen die Kapseln aufgenommen werden, ist entscheidend, um zu verstehen, an welcher Stelle das DXM gezielt Einfluss nimmt. Ein Beispiel ist hier die Suppression der Zytokinexpression.

In den unter 4.3.3 beschriebenen Zellkulturen nahmen 20-30% der Zellen aller gemessener Populationen Nanokapseln auf. Eine differenzierte Aufnahme aufgrund mikroanatomischer Gegebenheiten ist in der Zellkultur nicht möglich und alle drei Populationen bestehen aus phagozytierenden Zellen. Daher konnte in der Zellkultur keine klare Abgrenzung vorgenommen werden. Hingegen zeigte sich in der in 4.4.4 beschriebenen *in vivo* Gabe der Kapseln eine Aufnahme von über 50% durch Kupferzellen. Kupferzellen modulieren die Entzündungsreaktion der Leber und sind primäres Ziel der gewünschten DXM Therapie im Sinne des Targeted Delivery, was hiermit gelang. Auch vor dem im vorherigen Punkt diskutierten Hintergrund einer Aktivierung zum anti-inflammatorischen M2 Phänotyp durch enkapsuliertes DXM (Bartneck *et al.* 2015).

Die geringe Aufnahme durch iMNP von etwa 12% kann auf die frühe Gabe der Kapseln vor der stattgehabten Zellinfiltration zurückgeführt werden. Die Aufnahme durch Lymphozyten, LSECs oder weiteren NPC-Typen befindet sich unter den verbleibenden 8%, die unter den hier verwendeten Markern nicht zuzuordnenden Zellen.

Auch in der Studie von Wang *et al.* mit DXM-Nanolipidcarriern in durch CCl<sub>4</sub> induziertem Leberschaden in Mäusen zeigte sich eine Akkumulation in der Leber mit einer hauptsächlich Aufnahme von über 50% durch Makrophagen. Die NC Formulierung führte zudem bei Gabe über längere Zeit zu höheren Plasmakonzentrationen gegenüber dem freien DXM. Eine längere Exposition der Leberphagozyten gegenüber dem Wirkstoff bedeutet demnach bessere Wirkung durch geringere Dosis (Wang *et al.* 2010).

### 5.2.3.2 Die Rolle der Kupfferzellen als primäre Zielort der Nanocarrier

Gegenüber den hier diskutierten Formen enkapsulierten Wirkstoffes wurde Dexamethason von Melgert *et al.* an mannosyliertes Albumin gekoppelt (Dexa5-Man10-HSA), welches ebenfalls in Rattenlebern nach BDL akkumulierte. Dort wurde es fast ausschließlich von Kupfferzellen aufgenommen und konnte *in vitro* die Reduktion der TNF- $\alpha$  Ausschüttung und *in vivo* die Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bewirken. Auf der anderen Seite zeigte sich jedoch eine beschleunigte Fibrogenese, welche auf eine pro-inflammatorische M1 Aktivierung der Kupfferzellen mit stimulierter TIMP-1 Expression zurückgeführt werden konnte (Melgert *et al.* 2001). Dies steht der protektiven M2 Aktivierung durch enkapsuliertes DXM konträr gegenüber (Bartneck *et al.* 2015).

In jedem Fall sind die Kupfferzellen eine der zentralen Ziele der Therapie mit lebergesteuerten Nanocarriern und können je nach Formulierung der Kapseln unterschiedliche Effekte am selben Zielort erreichen. In dieser Arbeit zeigten Nanokapseln nach Targeted Delivery in Kupfferzellen eine Suppression der IL-6 Ausschüttung. Einen gegenteiligen Effekt konnten Pietrzak-Nguyen *et al.* durch die Kopplung der Kapseln an MPLA (monophosphoryl lipid A), einem synthetischen Toll-like-rezeptor Agonisten, erreichen. Dadurch gelang es, eine deutliche Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine, in dem Fall IL-6 und TNF- $\alpha$  durch Kupfferzellen und IFN- $\gamma$  sowie IL-12 durch dendritische Zellen zu induzieren (Pietrzak-Nguyen *et al.* 2014).

Das Verständnis der Kupfferzell-Aktivierung durch die jeweilige Therapie mit Nanocarriern hat somit eine Schlüsselrolle in der Modulation der Entzündungsreaktion.

## 5.2.4 Histologie

### 5.2.4.1 Reduktion biliärer Infarkte durch DXM-(NC-)Therapie

In Folge der beschriebenen Mechanismen des akuten Leberschadens durch Cholestase entstehen biliäre Infarkte, welche sich histologisch quantifizieren lassen. Dies geschieht in der Akutphase innerhalb der ersten Tage nach BDL und geht der Entstehung einer Fibrose voraus.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich mittels Trichromfärbung Nekrosen von etwa 24% - 32% der Leberanschnitte 4 Tage nach BDL, was sich durch die initiale Einmalgabe von DXM oder DXM-NCs auf 10% - 23% reduzieren ließ.

Duwaerts *et al.* sahen in ihrer Histologie 3 Tage nach BDL in der Hematoxylin und Eosin (HE-) Färbung im Mittel etwa 5% Nekrose des Leberanschnittes (Duwaerts *et al.* 2013). Ebenfalls mit HE gefärbt zeigten sich in der Histologie von Gehring *et al.* im Mittelwert etwa 3-5% geschädigte Leberareale aus 4 getesteten Mäusen nach 7 Tagen (Gehring *et al.* 2006). In der Charakterisierung des Zeitverlaufes nach BDL sahen Georgiev *et al.* bei täglichen Vergleichsmessungen in der HE-Färbung einen raschen Anstieg der Leberschädigung. Die biliären Infarkte erreichten ein Maximum von bis zu 10% nach 2-3 Tagen und verzeichneten anschließend einen raschen Abfall auf <2% (Georgiev *et al.* 2008). Etwa 10% geschädigtes Areal sahen auch Jang *et al.* in ihren Mäusen 3 Tage nach BDL (Jang *et al.* 2012).

Die Unterschiede der Leberschädigung nach BDL zu der Vergleichsliteratur sind somit deutlich. Dass die Ursache dafür in einer anderen BDL-Technik liegt, ist unwahrscheinlich, da diese im Wesentlichen auf gleiche Art und Weise durchgeführt wurde. Ebenso wurde in den meisten Arbeiten mit C57BL/6J der gleiche Maus-Stamm im gleichen Alter von 8-12 Wochen verwendet. Die Verwendung einer anderen Färbung mit der gezielten Darstellung von nekrotischen Arealen mittels Trichrom Färbung in der vorliegenden Arbeit kann eine Erklärung darstellen. Hier ist zu vermuten, dass die gleichen Areale in der Trichrom Färbung sich in größerem Ausmaß darstellen. Ebenso ist eine unterschiedliche Auswertungsstrategie mittels Software denkbar. Das vorrangige Ziel dieser Arbeit ist jedoch die Darstellung der Reduktion der infarzierten Areale und nicht die Quantifizierung des Leberschadens nach BDL. Dies ließ sich durch Therapie mit DXM und DXM-NCs gleichermaßen darstellen, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Therapien zu messen.

#### 5.2.4.2 Mechanismen der Suppression des Parenchymschadens

Die Therapie durch Dexamethason führt durch die diskutierte Hemmung des entzündlichen Milieus und der verminderten Zellinfiltration zu einer Reduktion der histologischen Schäden. In Fortsetzung dessen konnten weitere Wege der protektiven Wirkung des DXM ergründet werden. Studien konnten zeigen, dass DXM in einem cholestatischen Leberschaden nach BDL den intrinsischen, mitochondrialen

Signalweg der Apoptose inhibiert, was in einer Verminderung apoptotischer Zelluntergänge resultiert (Tiao *et al.* 2011). Eken *et al.* sahen eine Korrelation mit den durch DXM Therapie erhöht gemessenen antioxidativ wirksamen Enzymen wie der Superoxid dismutase, Katalase und Glutathione peroxidase. Sie führten histologische Auswertungen von Lebern nach BDL in Ratten durch und zeigten deutlich geringere Parenchymschäden und geringere Fibrose unter DXM Therapie (Eken *et al.* 2006).

Durch die tubuläre Proliferation als Folge des initialen Zellschadens entsteht ein Umbau der periportalen Felder. Studien zeigen eine Abschwächung dieser duktaalen Reaktion durch Dexamethason. Verhulst *et al.* sahen dies in Zusammenhang mit einem positiven Effekt auf die Fibrogenese und die Expansion von CD19<sup>+</sup> Zellen, assoziiert mit duktaaler Reaktion (Verhulst *et al.* 2016). Unklar bleibt, ob enkapsuliertes DXM die gleichen Effekte auf CD19<sup>+</sup> Zellen hat, wenn die Kapseln primär von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden und dort ihre Wirkung freisetzen. Eine dadurch gegenüber freiem DXM schlechtere Reduktion der biliären Infarkte oder der Fibrose kann in dieser Arbeit oder den zum Vergleich aufgeführten Studien nicht gesehen werden. Im Gegenteil sahen Bartneck *et al.* in ihren Modellen akuten und chronischen Leberschadens durch ConA und CCl<sub>4</sub> unter Therapie mit DXM-Liposomen eine deutlichere Reduktion der histologischen Schäden und der Krankheitsschwere als mit konventionellem Dexamethason (Bartneck *et al.* 2015).

Verhulst *et al.* sahen im Vergleich zu den Effekten des Glukokortikoids eine ähnliche Reduktion der duktaalen Reaktion durch den TNF- $\alpha$  Antikörper Infliximab. TNF- $\alpha$  als eines der zentralen pro-inflammatorischen Zytokine in der Immunmodulation durch die Kupfferzellen erweist sich somit als weiterer wichtiger Baustein in der entzündlichen Umgebung (Verhulst *et al.* 2016).

## 5.3 Repräsentativität und Limitationen

### 5.3.1 Alternative BDL-Modelle der Gallengangsatresie

Neben der klassischen BDL gibt es andere Modelle zur Simulation einer BA, welche sich zu unterschiedlichen Schwerpunkten hin entwickelt haben. Nach Petersen können Tiermodelle einer Gallengangsatresie in 3 Gruppen aufgeteilt werden: pränatale, postnatale und Virus-Modelle (Petersen 2012). Die BDL kann hiernach in die Gruppe der postnatalen Modelle eingeteilt werden.

Als Alternativen bestehen zunächst Erweiterungen des klassischen BDL Protokolls, um den Verhältnissen der BA näher zu kommen. Eine Studie stellte eine Methode vor, um unmittelbar vor der BDL in Ratten Polyethylen-Tubes in den Gallengang einzuführen. Diese konnten nach 2 Wochen entfernt werden um die Wiederherstellung des Gallenabflusses und somit eine Kasai Portoenterostomie zu simulieren (Wang *et al.* 2014). Eine weitere Studie beschäftigte sich mit BDL in Ratten und anschließender Wiederherstellung des Abflusses durch chirurgische Anastomose einer Zyste mit dem Jejunum. Sie sahen in molekularen und histologischen Auswertungen die teilweise Reversibilität pathologischer Veränderung (de Aro Braz *et al.* 2018). An dieser Stelle erneut zu erwähnen ist die unter 5.2.5 bereits beschriebene Wiederherstellung des Gallenabflusses durch die Tube-an-Tube Rekonstruktion nach stattgehabter BDL (Hsieh *et al.* 2004).

Ein weiteres Modell ist die partielle BDL, bei der sich unter zunächst gleichem Anstieg der Transaminasen und des Bilirubins die Versuchsgruppe der partialen Ligatur gegenüber der klassischen BDL teilweise erholt und weniger ausgeprägte Nekrosen entstehen. Die Autoren sahen dies als weitere Möglichkeit, einen wiederhergestellten Gallenfluss nach Obstruktion und somit zum Beispiel die Verhältnisse nach Kasai Portoenterostomie zu simulieren (Heinrich *et al.* 2011; Yokota *et al.* 2018).

Daneben gibt es als Alternativen zur BDL weitere Modelle, um eine BA zu simulieren. So zum Beispiel in der Medikamenten-induzierten Methode von Tatekawa *et al.*, welche mittels direkter Ethanol-Injektion über einen Katheter in den Gallengang von Ratten eine sklerosierende Cholangitis hervorruft. Infolgedessen können erhöhte Werte von ALT/GPT, AST/GOT und Bilirubin gemessen werden, sowie immunhistochemisch veränderte Verteilungsmuster von  $\alpha$ -SMA und TGF- $\beta$  (Tatekawa *et al.* 2013).

Die genannten BDL-Modelle sind Ziel von Kritik, da sie als immer bessere Simulationen der Cholestase einer Gallengangsatresie anzusehen sind, sie jedoch nicht die ursächliche Krankheit und deren pathophysiologische Prozesse abbilden. Der Einfluss einer medikamentösen Therapie oder die Ableitung pathophysiologischer Prozesse kann in solchen Modellen nur von limitierter Aussagekraft sein (Madadi-Sanjani *et al.* 2019).

Dies ist auch zu übertragen auf das Modell in der hier vorliegenden Arbeit. Mit der durchgeführten BDL ohne Wiederherstellung des Gallenabflusses unterliegt die hier

gewählte Methodik Limitierungen hinsichtlich der Vergleichbarkeit zu einer Gallengangsatresie.

### 5.3.2 Rotavirus-Modell

Das Rotavirus Mausmodell ist an dieser Stelle in seiner Vergleichbarkeit zur BA in einigen Hinsichten als überlegen zu bewerten. Es konnte gezeigt werden, dass intraperitoneal applizierte Rotaviren in neugeborenen Mäusen zu einer 100% reproduzierbaren Obstruktion der Gallenwege führen (Madadi-Sanjani *et al.* 2019). Dies kommt der viralen Genese einer Gallengangsatresie deutlich näher und lässt eine Analyse der pathophysiologischen Prozesse, die zur Cholestase führen zu. Als Anzeichen der stattgehabten Cholestase können in den untersuchten Mäusen gegenüber Kontrollgruppen makroskopisch akolische Stühle und Gelbverfärbung der Skleren und des Fells sowie mikroskopisch eine Inflammation der Leber mit Infiltration von Immunzellen gesehen werden (Mohanty *et al.* 2019).

Eine Limitation dieser Methode war die frühe Mortalität der Mäuse, wodurch langfristige Folgen der Effekte kaum überprüft werden konnten. Dies konnte aber mit der Einführung des TUCH Rotavirus Modelles (Tulane University and Cincinnati Children's Hospital) und infolgedessen deutlich verlängerter Überlebenszeiten beglichen werden (Ortiz-Perez *et al.* 2020). Auch ist die antepartum Applikation von Rotaviren Ziel einiger Studien, um das Modell noch getreuer der BA zu gestalten. Dies ist aktuell aufgrund der resultierenden instabilen neugeborenen Mäuse und der technischen Herausforderung, wiederholt Versuche an ihnen durchzuführen noch nicht ausgereift (Madadi-Sanjani *et al.* 2019).

### 5.3.3 Vorteile der BDL als Gallengangsatresiemodell

Es lassen sich die genannten Argumente für Limitationen der BDL als Gallengangsatresie Modell der Maus finden. Hingegen gibt es auch Hinweise für die Anwendung von BDL Modellen.

Zum Beispiel können die Auswirkung einer Kasai Portoenterostomie und daran anschließender Therapieoptionen, wie der Applikation von DXM, in manchen BDL Modellen simuliert werden. Aufgrund der Größe und Instabilität der Mäuse im

Rotavirus-Modell könnte dies dort nur schwer durchgeführt werden. Ein Wiederherstellen des Gallenflusses ist in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht durchgeführt worden.

O'Brien *et al.* schlossen in ihrer Studie darauf, dass BDL in Ratten und Mäusen nicht nur ein Modell einer Cholestase ist, sondern sich zudem auf viele Mechanismen von akut dekompensierten Lebererkrankungen übertragen lässt. Auch klinisch finden sich mit Leber- und Nierendysfunktionen, sowie niedriger Blutglukose, Sarkopenie und kardiovaskulärer Dysfunktion viele Effekte einer akut dekompensierten Lebererkrankung (O'Brien *et al.* 2016).

Mit dem Ziel humane Krankheitsprozesse zu verstehen sind murine Modelle grundsätzlich limitiert. So gibt es auch histologische Unterschiede in Lebern humaner Cholestase gegenüber BDL in Mäusen (O'Brien *et al.* 2016; Sato *et al.* 2016).

Es lassen sich jedoch zentrale Gemeinsamkeiten der Pathogenese humaner und muriner Cholestase aufzeigen. Einer dukталen Reaktion von Gallengangs-Epithelzellen mit deren Proliferation schließt sich die Infiltration von Immunzellen in die Leber an. In Arealen mit vermehrter Proliferation wird  $\alpha$ -SMA gesteuert, insbesondere vermittelt durch aktivierte HSCs extrazelluläre Matrix produziert, die zu einer Fibrose führt. Leberschäden lassen sich durch Transaminasen und erhöhte Cholestaseparameter quantifizieren (Tag *et al.* 2015; Vij *et al.* 2020). Somit eignet sich das Modell zur Untersuchung von Krankheiten die in Zusammenhang mit akuter Cholestase, Leberinflammation und zunehmender Leberfibrose stehen.

#### 5.3.4 Weitere Limitationen

Erhöhte Transaminasen und Bilirubin als quantitative Marker für Leberzellschädigung bzw. für eine Cholestase sind in der Literatur und in der vorliegenden Arbeit klare Verhältnisgrößen. In der Übertragung auf die BA kann eine Reduktion dieser Werte aber nicht eindeutig mit einem vermehrten Überleben verbunden werden (Noor *et al.* 2020). Zum Verständnis und zur Evaluation pathophysiologischer Prozesse bleibt die Auswertung dieser Parameter aber ein wichtiger Marker.

Durch die effektive und spezifische Freigabe des Wirkstoffes ist es das Ziel, unerwünschte Wirkungen in anderen Zellen, Geweben oder Organen zu reduzieren. In diesem Fall ist auch die Reduktion von Nebenwirkungen im zentralen Nervensystem

ein erwünschter Effekt, der sich durch die in Kapselform erschwerte Überwindung der Blut-Hirn-Schranke zeigt. Anderen Studien konnten auch den gezielten Transport enkapsulierten Wirkstoffes in das zentrale Nervensystem zeigen (Domínguez *et al.* 2014). Die Wahl der Kapselformulierung und dessen Testung ist somit entscheidend, die gewünschten Effekte zu erreichen.

#### 5.4 Fazit und Ausblick

Trotz Limitationen in der Übertragbarkeit auf eine Gallengangsatresie konnten einige Effekte neuer vollständig aus DXM synthetisierter Nanokapseln auf den akuten cholestatischen Leberschaden nach BDL dargestellt werden. Mit einer gezeigten Reduktion des Leberzellschadens *in vivo* im Rahmen niedrigerer Transaminasen, der Eindämmung histologischer Nekroseareale und der gezielten Wirkstoffabgabe an Leber-NPCs bestätigt sich die unter 2.6 aufgestellte Hypothese.

Als Ursache für den ausbleibenden Effekt auf die Zellinfiltration kann die frühe Einmalgabe der NCs vermutet werden. Eine im Rahmen der Vergleichsliteratur deutliche Reduktion der Zellinfiltration durch DXM kann bei einer Anpassung des Versuchsaufbaus angenommen werden (Hsieh *et al.* 2004; Bartneck *et al.* 2015). Weitere Versuche sind notwendig, um dies zu bestätigen.

Insgesamt zeigte sich die akute Leberschädigung nach BDL in einem Anstieg der Transaminasen und der histologischen Nekroseareale. Die Leberfibrose als Langzeiteffekt nach Cholestase wird in der BDL mit ausgeprägtem Anstieg nach etwa einer Woche beobachtet (Georgiev *et al.* 2008; Tag *et al.* 2015). Mit der hier durchgeführten Einmalgabe der Nanokapseln nach einer halben Stunde findet somit eine Therapie in der frühen Entzündungsreaktion statt. Dies konnte durch die Wirkung des Dexamethasons über etwa 48 Stunden den primären Anstieg der Inflammation und des Leberschadens abflachen.

Weitere Versuche sind notwendig, DXM-Nanokapseln in anderen Gallengangsatresie-Modellen zu testen, wie etwa mit Wiederherstellung des Gallenabflusses nach BDL (Wang *et al.* 2014).

Des Weiteren sollte die in anderen Kapselformulierungen vielfach gezeigte Biodistribution mit der Frage nach hauptsächlichlicher Akkumulation der Kapseln in der



Leber auch mit den hier verwendeten Kapseln untersucht werden. Gezielte Wirkstoffabgabe im Sinne des Targeted Delivery ist nicht nur für die Effekte am Zielort, sondern auch für die Reduktion von Nebenwirkungen in anderen Organsystemen eine der zentralen Argumente für die Nutzung von Nanocarriern (Fichter *et al.* 2013; Pietrzak-Nguyen *et al.* 2014).

In weiterführenden Versuchen sollten zudem die Effekte unterschiedlicher Kapseldosen überprüft werden, da sich in Studien zu den dosis-abhängigen Effekten von DXM und DXM-NCs teils nicht-proportionale Effekte zeigten (Wang *et al.* 2010).

Ein weiterer Punkt ist die biologische Abbaubarkeit der Kapselreste durch die Zellen. Es ist unklar, ob Anteile der polymerisierten Hüllen in den Zellen zurückbleiben. Es muss überprüft werden, ob die Synthese der Kapseln vollständig aus DXM ohne Trägersubstanz diesbezüglich einen Benefit darstellt.

Auch eine Testung der Nebenwirkungsprofile der Kapseln gegenüber löslichem DXM ist entscheidend, um diese zentralen Argumente zu stützen. In weiterführenden Versuchen konnte die gewünschte Reduktion von peripheren Nebenwirkungen durch systemische Dexamethason-Wirkung nicht gezeigt werden. Hier ließ sich nicht endgültig klären, ob der vollständige Effekt der Wirkung durch die Kapseln und nicht teilweise durch daraus freiwerdendem DXM entstanden ist. Die Dichtheit der Kapseln muss in weiterführenden Versuchen belegt werden, um eine Anwendung der Kapselformulierung zu begründen. Alternativ ist es möglich, die Versuche mit anderen Kapselformulierungen zu wiederholen und weiterzuführen, in welchen ein Austreten des Wirkstoffes minimiert werden kann (Jiang *et al.* 2020)

## 6 Zusammenfassung

Das Überleben nach Gallengangsatresie konnte durch die Weiterentwicklung von Lebertransplantationen und Immunsuppression in den letzten Jahrzehnten deutlich verlängert werden. Das Langzeitüberleben ohne Transplantation von 20-30% bleibt jedoch nicht zufriedenstellend. Die Krankheitsmechanismen besser zu verstehen und neue Therapieformen zu entwickeln sind entscheidende Ansätze dies zu verbessern (Lakshminarayanan *et al.* 2016; Vij *et al.* 2020).

In Studien akuten und chronischen Leberschadens zeigen sich Dexamethason Nanocarrier in Pharmakokinetik, Biodistribution und Nebenwirkungsprofilen einer konventionellen Dexamethason-Therapie überlegen (Wang *et al.* 2010; Bartneck *et al.* 2015).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte vollständig aus Dexamethason synthetisierter Nanokapseln im Mausmodell einer Gallengangsatresie zu untersuchen.

Es wurden NPCs aus Mäuselebern isoliert und ihre Eigenschaften unter Einfluss von DXM-Nanokapseln oder löslichem Dexamethason untersucht. Hierfür wurden Zellkulturen angelegt, mit Lipopolysacchariden stimuliert und mittels ELISA und CBA ausgewertet. Zudem erfolgte die Messung der Kapselaufnahme in die Zellen mittels Durchflusszytometrie und deren intrazellulärer Effekte im ICCS.

Für die *in vivo* Experimente wurde Mäusen operativ der Gallengang ligiert. Als Kontrolle erfolgten Sham-Operationen. Die darauffolgenden Effekte des cholestaten Leberschadens wurden unter Therapie mit DXM-NC, löslichem DXM oder ohne Therapie gemessen. Es folgte eine Bestimmung der Zytokinausschüttung mittels CBA aus Blutserum sowie der Messung inflammatorischer Zellinfiltration im FACS. Zudem wurden Trichrom-gefärbte Histologien zur Quantifizierung von Arealen nekrotischen Leberschadens analysiert. Die Bestimmung von Transaminasen aus Serumproben erfolgte durch das Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz.

In den Ergebnissen zeigte sich die *in vitro* Aufnahme der NCs von Leber-NPCs. Dies resultierte in einer Dosis-abhängigen Reduktion der IL-6 und der TNF- $\alpha$  Ausschüttung, stellvertretend für weitere anti-inflammatorische Effekte. *In vivo* präsentierte sich die Aufnahme der Nanokapseln hauptsächlich in Kupferzellen und nachrangig in weiteren Leberphagozyten. Dadurch erreichten die DXM-NCs eine Suppression cholestaten Leberschadens nach BDL. Im Rahmen dessen konnten erniedrigte

Transaminasen, eine verminderte pro-inflammatorische Zytokin-Expression und eine Reduktion biliärer Infarkte gezeigt werden.

Signifikante Unterschiede in der Zellinfiltration konnten in den hier durchgeführten Versuchen nicht analysiert werden, wobei dies im Hinblick auf andere Studien nach Modifikation und Erweiterung erneuter Versuche zu erwarten wäre. Des Weiteren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen Nanokapseln und freiem Dexamethason.

Insgesamt bestätigte sich eine effektive Reduktion cholestatischen Leberschadens durch selektive Abgabe enkapsulierten Dexamethasons an hepatische Immunzellpopulationen. Suppression von Inflammation durch Nanokapseltherapie bietet somit einen Ansatz für weitere Forschung im Gebiet neuer Therapieformen der Gallengangsatresie.

## 7 Literaturverzeichnis

Alonso, E. M., W. Ye, K. Hawthorne, V. Venkat, K. M. Loomes, C. L. Mack, P. M. Hertel, S. J. Karpen, N. Kerkar, J. P. Molleston, K. F. Murray, R. Romero, P. Rosenthal, K. B. Schwarz, B. L. Shneider, F. J. Suchy, Y. P. Turmelle, K. S. Wang, A. H. Sherker, R. J. Sokol, J. A. Bezerra and J. C. Magee (2018). "Impact of Steroid Therapy on Early Growth in Infants with Biliary Atresia: The Multicenter Steroids in Biliary Atresia Randomized Trial." J Pediatr **202**: 179-185.e174.

Andrade Wde, C., L. F. Silva, M. C. Coelho, A. C. Tannuri, V. A. Alves and U. Tannuri (2012). "Effects of the administration of pentoxifylline and prednisolone on the evolution of portal fibrogenesis secondary to biliary obstruction in growing animals: immunohistochemical analysis of the expression of TGF- $\beta$  and VEGF." Clinics (Sao Paulo) **67**(12): 1455-1461.

Andrade Wde, C., U. Tannuri, L. F. da Silva and V. A. Alves (2009). "Effects of the administration of pentoxifylline and prednisolone on the evolution of portal fibrogenesis secondary to biliary obstruction-an experimental study in growing animals." J Pediatr Surg **44**(11): 2071-2077.

Asai, A., A. Miethke and J. A. Bezerra (2015). "Pathogenesis of biliary atresia: defining biology to understand clinical phenotypes." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **12**(6): 342-352.

Bartneck, M., F. M. Peters, K. T. Warzecha, M. Bienert, L. van Bloois, C. Trautwein, T. Lammers and F. Tacke (2014). "Liposomal encapsulation of dexamethasone modulates cytotoxicity, inflammatory cytokine response, and migratory properties of primary human macrophages." Nanomedicine **10**(6): 1209-1220.

Bartneck, M., K. M. Scheyda, K. T. Warzecha, L. Y. Rizzo, K. Hittatiya, T. Luedde, G. Storm, C. Trautwein, T. Lammers and F. Tacke (2015). "Fluorescent cell-traceable dexamethasone-loaded liposomes for the treatment of inflammatory liver diseases." Biomaterials **37**: 367-382.

Baumann, U. and A. Ballauff (2002). "Gallengangsatresie." Monatsschrift Kinderheilkunde **150**(1): 27-33.

Bezerra, J. A., C. Spino, J. C. Magee, B. L. Shneider, P. Rosenthal, K. S. Wang, J. Erlichman, B. Haber, P. M. Hertel, S. J. Karpen, N. Kerkar, K. M. Loomes, J. P. Molleston, K. F. Murray, R. Romero, K. B. Schwarz, R. Shepherd, F. J. Suchy, Y. P. Turmelle, P. F. Whittington, J. Moore, A. H. Sherker, P. R. Robuck and R. J. Sokol (2014). "Use of corticosteroids after hepatoportoenterostomy for bile drainage in infants with biliary atresia: the START randomized clinical trial." Jama **311**(17): 1750-1759.

Chardot, C. and M. O. Serinet (2006). "Prognosis of biliary atresia: what can be further improved?" J Pediatr **148**(4): 432-435.

Chen, Y., S. A. Nah, L. Chiang, G. Krishnaswamy and Y. Low (2015). "Postoperative steroid therapy for biliary atresia: Systematic review and meta-analysis." J Pediatr Surg **50**(9): 1590-1594.

Davenport, M. (2012). "Biliary atresia: clinical aspects." Seminars in Pediatric Surgery **21**(3): 175-184.

- de Aro Braz, M. J., L. E. Corbi, A. C. A. Tannuri, M. C. M. Coelho, J. O. Gonçalves, S. Serafini and U. Tannuri (2018). "Analysis of the reversibility of biliary cirrhosis in young rats submitted to biliary obstruction." J Pediatr Surg **53**(7): 1408-1413.
- Domínguez, A., B. Suárez-Merino and F. Goñi-de-Cerio (2014). "Nanoparticles and blood-brain barrier: the key to central nervous system diseases." J Nanosci Nanotechnol **14**(1): 766-779.
- Duwaerts, C. C., S. Gehring, C. W. Cheng, N. van Rooijen and S. H. Gregory (2013). "Contrasting responses of Kupffer cells and inflammatory mononuclear phagocytes to biliary obstruction in a mouse model of cholestatic liver injury." Liver Int **33**(2): 255-265.
- Duwaerts, C. C., E. P. Sun, C. W. Cheng, N. van Rooijen and S. H. Gregory (2013). "Cross-activating invariant NKT cells and kupffer cells suppress cholestatic liver injury in a mouse model of biliary obstruction." PLoS One **8**(11): e79702.
- Eken, H., H. Ozturk, H. Ozturk and H. Buyukbayram (2006). "Dose-related effects of dexamethasone on liver damage due to bile duct ligation in rats." World J Gastroenterol **12**(33): 5379-5383.
- El-Araby, H. A., M. A. Saber, N. M. Radwan, D. M. Taie, N. M. Adawy and A. M. Sira (2020). "Temporal histopathological changes in biliary atresia: A perspective for rapid fibrosis progression." Annals of Hepatology.
- Feldman, A. G. and C. L. Mack (2015). "Biliary Atresia: Clinical Lessons Learned." J Pediatr Gastroenterol Nutr **61**(2): 167-175.
- Fichter, M., G. Baier, M. Dedters, L. Pretsch, A. Pietrzak-Nguyen, K. Landfester and S. Gehring (2013). "Nanocapsules generated out of a polymeric dexamethasone shell suppress the inflammatory response of liver macrophages." Nanomedicine **9**(8): 1223-1234.
- Gehring, S., E. M. Dickson, M. E. San Martin, N. van Rooijen, E. F. Papa, M. W. Harty, T. F. Tracy, Jr. and S. H. Gregory (2006). "Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice." Gastroenterology **130**(3): 810-822.
- Georgiev, P., W. Jochum, S. Heinrich, J. H. Jang, A. Nocito, F. Dahm and P. A. Clavien (2008). "Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation." Br J Surg **95**(5): 646-656.
- Heinrich, S., P. Georgiev, A. Weber, A. Vergopoulos, R. Graf and P. A. Clavien (2011). "Partial bile duct ligation in mice: a novel model of acute cholestasis." Surgery **149**(3): 445-451.
- Hopkins, P. C., N. Yazigi and C. M. Nylund (2017). "Incidence of Biliary Atresia and Timing of Hepatoportoenterostomy in the United States." J Pediatr **187**: 253-257.
- Hsieh, C.-S., C.-C. Huang, L.-T. Huang, Y.-J. Tsai, M.-H. Chou and J.-H. Chuang (2004). "Glucocorticoid treatment down-regulates chemokine expression of bacterial cholangitis in cholestatic rats." Journal of Pediatric Surgery **39**(1): 10-15.
- Imanieh, M. H., S. M. Dehghani, M. H. Bagheri, V. Emad, M. Haghghat, M. Zahmatkeshan, H. R. Forutan, A. R. Rasekhi and F. Gheisari (2009). "Triangular Cord Sign in Detection of Biliary Atresia: Is It a Valuable Sign?" Digestive Diseases and Sciences **55**(1): 172.
- Jang, J. H., A. Rickenbacher, B. Humar, A. Weber, D. A. Raptis, K. Lehmann, B. Stieger, W. Moritz, C. Soll, P. Georgiev, D. Fischer, E. Laczko, R. Graf and P. A.

- Clavien (2012). "Serotonin protects mouse liver from cholestatic injury by decreasing bile salt pool after bile duct ligation." Hepatology **56**(1): 209-218.
- Jiang, S., D. Prozeller, J. Pereira, J. Simon, S. Han, S. Wirsching, M. Fichter, M. Mottola, I. Lieberwirth, S. Morsbach, V. Mailänder, S. Gehring, D. Crespy and K. Landfester (2020). "Controlling protein interactions in blood for effective liver immunosuppressive therapy by silica nanocapsules." Nanoscale **12**(4): 2626-2637.
- Karlmarm, K. R., H. E. Wasmuth, C. Trautwein and F. Tacke (2008). "Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease." Expert Rev Gastroenterol Hepatol **2**(2): 233-242.
- Kasai, M. (1974). "Treatment of biliary atresia with special reference to hepatic portoenterostomy and its modifications." Prog Pediatr Surg **6**: 5-52.
- Kumar, R., B. B. Lal, V. Sood, R. Khanna, S. Kumar, K. G. S. Bharathy and S. Alam (2019). "Predictors of Successful Kasai Portoenterostomy and Survival with Native Liver at 2 Years in Infants with Biliary Atresia." J Clin Exp Hepatol **9**(4): 453-459.
- Lakshminarayanan, B. and M. Davenport (2016). "Biliary atresia: A comprehensive review." Journal of Autoimmunity **73**: 1-9.
- Landfester, K. (2009). "Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles." Angewandte Chemie International Edition **48**(25): 4488-4507.
- Landfester, K. and V. Mailänder (2013). "Nanocapsules with specific targeting and release properties using miniemulsion polymerization." Expert Opin Drug Deliv **10**(5): 593-609.
- Madadi-Sanjani, O. and C. Petersen (2019). "Translational Research in Biliary Atresia: News from Mice and Men." Eur J Pediatr Surg **29**(4): 336-341.
- McKiernan, P. J., A. J. Baker and D. A. Kelly (2000). "The frequency and outcome of biliary atresia in the UK and Ireland." Lancet **355**(9197): 25-29.
- Meikle, A. W. and F. H. Tyler (1977). "Potency and duration of action of glucocorticoids. Effects of hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on human pituitary-adrenal function." Am J Med **63**(2): 200-207.
- Melgert, B. N., P. Olinga, J. M. Van Der Laan, B. Weert, J. Cho, D. Schuppan, G. M. Groothuis, D. K. Meijer and K. Poelstra (2001). "Targeting dexamethasone to Kupffer cells: effects on liver inflammation and fibrosis in rats." Hepatology **34**(4 Pt 1): 719-728.
- Min, J., M. Ningappa, J. So, D. Shin, R. Sindhi and S. Subramaniam (2020). "Systems Analysis of Biliary Atresia Through Integration of High-Throughput Biological Data." Front Physiol **11**: 966.
- Miyoshi, H., C. Rust, P. J. Roberts, L. J. Burgart and G. J. Gores (1999). "Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas." Gastroenterology **117**(3): 669-677.
- Mohanty, S. K., B. Donnelly, H. Temple and G. M. Tiao (2019). "A Rotavirus-Induced Mouse Model to Study Biliary Atresia and Neonatal Cholestasis." Methods Mol Biol **1981**: 259-271.
- Mohar, I., K. J. Brempeles, S. A. Murray, M. R. Ebrahimkhani and I. N. Crispe (2015). "Isolation of Non-parenchymal Cells from the Mouse Liver." Methods Mol Biol **1325**: 3-17.

- Musacchio, T. and V. P. Torchilin (2011). "Recent developments in lipid-based pharmaceutical nanocarriers." Front Biosci (Landmark Ed) **16**: 1388-1412.
- Noor, H. Z., H. Z. Noor, A. Makhmudi and Gunadi (2020). "The impact of serum total bilirubin, alanine transaminase and gamma-glutamyl transferase on survival of biliary atresia patients following Kasai procedure." Med J Malaysia **75**(Suppl 1): 1-4.
- O'Brien, A., L. China, K. A. Massey, A. Nicolaou, A. Winstanley, J. Newson, A. Hobbs, T. Audzevich and D. W. Gilroy (2016). "Bile duct-ligated mice exhibit multiple phenotypic similarities to acute decompensation patients despite histological differences." Liver Int **36**(6): 837-846.
- Ortiz-Perez, A., B. Donnelly, H. Temple, G. Tiao, R. Bansal and S. K. Mohanty (2020). "Innate Immunity and Pathogenesis of Biliary Atresia." Front Immunol **11**: 329.
- Parente, L. (2017). "Deflazacort: therapeutic index, relative potency and equivalent doses versus other corticosteroids." BMC Pharmacol Toxicol **18**(1): 1.
- Patel, P., N. Meghani, K. Kansara and A. Kumar (2019). "Nanotherapeutics for the Treatment of Cancer and Arthritis." Curr Drug Metab **20**(6): 430-445.
- Petersen, C. (2012). "Biliary atresia: the animal models." Semin Pediatr Surg **21**(3): 185-191.
- Petersen, C. and M. Davenport (2013). "Aetiology of biliary atresia: what is actually known?" Orphanet J Rare Dis **8**: 128.
- Pietrzak-Nguyen, A., M. Fichter, M. Dedters, L. Pretsch, S. H. Gregory, C. Meyer, A. Doganci, M. Diken, K. Landfester, G. Baier and S. Gehring (2014). "Enhanced in vivo targeting of murine nonparenchymal liver cells with monophosphoryl lipid A functionalized microcapsules." Biomacromolecules **15**(7): 2378-2388.
- Racanelli, V. and B. Rehmann (2006). "The liver as an immunological organ." Hepatology **43**(2 Suppl 1): S54-62.
- Roosbahani, M., M. Kharaziha and R. Emadi (2017). "pH sensitive dexamethasone encapsulated laponite nanoplatelets: Release mechanism and cytotoxicity." Int J Pharm **518**(1-2): 312-319.
- Saito, J. M. and J. J. Maher (2000). "Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant." Gastroenterology **118**(6): 1157-1168.
- Salt, A. N., J. J. Hartsock, F. Piu and J. Hou (2018). "Dexamethasone and Dexamethasone Phosphate Entry into Perilymph Compared for Middle Ear Applications in Guinea Pigs." Audiol Neurootol **23**(4): 245-257.
- Sato, K., C. Hall, S. Glaser, H. Francis, F. Meng and G. Alpini (2016). "Pathogenesis of Kupffer Cells in Cholestatic Liver Injury." Am J Pathol **186**(9): 2238-2247.
- Shi, C., P. Velazquez, T. M. Hohl, I. Leiner, M. L. Dustin and E. G. Pamer (2010). "Monocyte trafficking to hepatic sites of bacterial infection is chemokine independent and directed by focal intercellular adhesion molecule-1 expression." J Immunol **184**(11): 6266-6274.
- Shneider, B. L., M. B. Brown, B. Haber, P. F. Whittington, K. Schwarz, R. Squires, J. Bezerra, R. Shepherd, P. Rosenthal, J. H. Hoofnagle and R. J. Sokol (2006). "A multicenter study of the outcome of biliary atresia in the United States, 1997 to 2000." J Pediatr **148**(4): 467-474.

- Stringer, M. D., S. M. Davison, S. R. Rajwal and P. McClean (2007). "Kasai portoenterostomy: 12-year experience with a novel adjuvant therapy regimen." Journal of Pediatric Surgery **42**(8): 1324-1328.
- Tag, C. G., S. Weiskirchen, K. Hittatiya, F. Tacke, R. H. Tolba and R. Weiskirchen (2015). "Induction of experimental obstructive cholestasis in mice." Lab Anim **49**(1 Suppl): 70-80.
- Tanaka, Y., C. Shirota, T. Tainaka, W. Sumida, K. Oshima, S. Makita, T. Tanaka, Y. Tani, K. Chiba and H. Uchida (2019). "Efficacy of and prognosis after steroid pulse therapy in patients with poor reduction of jaundice after laparoscopic Kasai portoenterostomy." Pediatr Surg Int **35**(10): 1059-1063.
- Tatekawa, Y., A. Nakada and T. Nakamura (2013). "Intrahepatic biliary ablation with pure ethanol: an experimental model of biliary atresia." Surg Today **43**(6): 661-669.
- Tiao, M. M., T. K. Lin, J. B. Chen, C. W. Liou, P. W. Wang, C. C. Huang, Y. M. Chou, Y. H. Huang and J. H. Chuang (2011). "Dexamethasone decreases cholestatic liver injury via inhibition of intrinsic pathway with simultaneous enhancement of mitochondrial biogenesis." Steroids **76**(7): 660-666.
- Tomcin, S., G. Baier, K. Landfester and V. Mailänder (2014). "Pharmacokinetics on a microscale: visualizing Cy5-labeled oligonucleotide release from poly(n-butylcyanoacrylate) nanocapsules in cells." Int J Nanomedicine **9**: 5471-5489.
- Tyraskis, A., C. Parsons and M. Davenport (2018). "Glucocorticosteroids for infants with biliary atresia following Kasai portoenterostomy." Cochrane Database Syst Rev **5**(5): Cd008735.
- Verhulst, S., J. Best, W. K. Syn, H. Reynaert, K. H. Hellemans, A. Canbay, L. Dolle and L. A. van Grunsven (2016). "Infliximab and Dexamethasone Attenuate the Ductular Reaction in Mice." Sci Rep **6**: 36586.
- Vij, M. and M. Rela (2020). "Biliary atresia: pathology, etiology and pathogenesis." Future Sci OA **6**(5): Fso466.
- Wang, J. B., C. Liu, Y. C. Yeh, C. P. Liu, C. J. Chang, C. Y. Chen and T. Chin (2014). "A novel rat model simulating biliary atresia after a Kasai operation." J Invest Surg **27**(3): 183-190.
- Wang, M. T., Y. Jin, Y. X. Yang, C. Y. Zhao, H. Y. Yang, X. F. Xu, X. Qin, Z. D. Wang, Z. R. Zhang, Y. L. Jian and Y. Huang (2010). "In vivo biodistribution, anti-inflammatory, and hepatoprotective effects of liver targeting dexamethasone acetate loaded nanostructured lipid carrier system." Int J Nanomedicine **5**: 487-497.
- Xie, C., B. Ma, N. Wang and L. Wan (2017). "Comparison of serological assessments in the diagnosis of liver fibrosis in bile duct ligation mice." Exp Biol Med (Maywood) **242**(14): 1398-1404.
- Yassin, N. A., G. El-Tagy, O. N. Abdelhakeem, N. Asem and H. El-Karaksy (2020). "Predictors of Short-Term Outcome of Kasai Portoenterostomy for Biliary Atresia in Infants: a Single-Center Study." Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition **23**(3): 266-275.
- Yokota, S., Y. Ono, T. Nakao, P. Zhang, G. K. Michalopoulos and Z. Khan (2018). "Partial Bile Duct Ligation in the Mouse: A Controlled Model of Localized Obstructive Cholestasis." J Vis Exp(133).



Zhang, M. Z., P. C. Xun, K. He and W. Cai (2017). "Adjuvant steroid treatment following Kasai portoenterostomy and clinical outcomes of biliary atresia patients: an updated meta-analysis." World J Pediatr **13**(1): 20-26.

Zhang, Y., J. Y. Hong, C. E. Rockwell, B. L. Copple, H. Jaeschke and C. D. Klaassen (2012). "Effect of bile duct ligation on bile acid composition in mouse serum and liver." Liver Int **32**(1): 58-69.

Zimmermann, H. W. and F. Tacke (2011). "Modification of chemokine pathways and immune cell infiltration as a novel therapeutic approach in liver inflammation and fibrosis." Inflamm Allergy Drug Targets **10**(6): 509-536.

## Danksagung

## Lebenslauf