

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

Suppression der intrahepatischen Inflammationsantwort durch Glukokortikoid-Nanokapseln
in vitro und an einem in vivo Autoimmunhepatitis Mausmodell

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

Vorgelegt von

Jan Dieter Schneider
aus Oberwesel

Mainz, 2021

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

In Memoriam und leider von uns gegangen.

Meine Schwester Kathrin

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1. Ziel der Dissertation	1
2. Literaturdiskussion	3
2.1 Die Autoimmunhepatitis, eine Krankheit mit vielen Unklarheiten.....	3
2.1.1 Steigende Anzahl von Neuerkrankungen	3
2.1.2 Mechanismen des Leberschadens	5
2.1.3 Th17, geheimer Übeltäter?	7
2.1.4 Akuter Verlauf bei jungen Patienten	7
2.1.5 Diagnostikkriterien und Autoantikörper	8
2.2 Entzündungskontrolle durch aktuelle Therapieprinzipien.....	10
2.2.1 Nebenwirkungen aktueller Therapieverfahren	10
2.2.2 Können Lebertransplantationen helfen?	12
2.3 Tiermodelle der AIH.....	13
2.4 Nanotechnologie, eine neue Alternative?	14
2.5 Glukokortikoid-Nanokapseln: „Cargo and Carrier“	17
3. Material und Methoden	20
3.1 Tiere, TARC & Ethikantrag.....	20
3.2 Geräte	21
3.3 Verbrauchsmaterialien	21
3.4 Chemikalien & Lösungen	22
3.4.1 Ansetzen von LPS	23
3.4.2 Ansetzen von Galactosamin	23
3.5 DXM Nanokapseln	24

3.6	Anästhesie	25
3.7	Erhalten der Blutproben	26
3.7.1	Blutentnahme aus der Schwanzspitze des Versuchstiers	26
3.7.2	Blutentnahme durch Herzpunktion des Versuchstiers	26
3.8	Zellisolation & Zellkulturen	27
3.8.1	Isolation Nicht-Parenchymaler-Leberzellen	27
3.8.2	Einfluss der DXM NC auf Zytokinsekretion <i>in vivo</i>	30
3.9	Histologie	31
3.9.1	Kryoschnitte	31
3.9.2	Färbung apoptotischer Zellen – TUNEL Färbung	32
3.10	ELISA	33
3.11	Durchflusszytometrie.....	35
3.12	CBA.....	38
3.13	Zentrallabor Mainz.....	38
3.14	Software.....	39
3.15	Statistik	39
4.	Ergebnisse	40
4.1	Kapseltestung <i>in vitro</i>	40
4.1.1	Initialer <i>in vitro</i> Test	40
4.1.2	Ermittlung der Äquivalenzdosis und der mittleren effektiven Konzentration	42
4.1.3	Vergleich der Äquivalenzdosis mit anderen DXM Kapseln	44
4.2	Etablierung des Schadensmodells	45
4.2.1	Dosisfindung <i>in vivo</i>	45
4.2.2	Kinetik der Zytokine <i>in vivo</i>	46
4.2.3	Balance zwischen Leberschaden und Überleben	48
4.2.4	Cholestaseparameter	50
4.3	Behandlung <i>in vivo</i>	51
4.3.1	Überlebensrate & Verhalten	51
4.3.2	Behandlung <i>in vivo</i> : Transaminasen ALT und AST	53
4.3.3	Behandlung <i>in vivo</i> : IL-6	54
4.4	Zellinfiltration	56
4.5	<i>In Situ</i> Cell Death Detection	58
4.6	<i>In vitro</i> Prüfung der Kapseldichtigkeit.....	60
5.	Diskussion	61
5.1	Limitierung der Versuche.....	62
5.1.1	Dichtigkeit der Kapseln – andere Glukokortikoide?	62
5.1.2	Variabilität des Schadensmodells <i>in vivo</i>	65
5.2	Effekte der DXM NC und mögliche Ausblicke	67
5.2.1	Bedeutung der Transaminasen und Zytokin-Effekte <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	67
5.2.2	<i>In vivo</i> Überleben & geringe Toxizität der Kapseln	70
5.2.3	Einfluss der Zellinfiltration	72

5.3	Weitere Probleme und Herausforderungen	73
6.	Zusammenfassung.....	75
7.	Literaturverzeichnis.....	77
7.1	Literaturangaben (alphabetisch sortiert).....	77
7.2	Bücher.....	86
8.	Anhang.....	87
9.	Danksagung.....	88
10.	Tabellarischer Lebenslauf	89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIH	Autoimmunhepatitis
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMA	Antimitochondriale Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
AP-1	activator protein 1
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin-7
ASC	autoimmune sclerosing cholangitis
AST	Aspartat-Aminotransferase
CBA	Cytometric Bead Array
CD	cluster of differentiation
CMV	Zytomegalie-Virus
cy5	Cyanin-5
dest	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DXM	Dexamethason
DXM NC	Dexamethason Nanokapsel
DXM-P NC	Dexamethason-Phosphat-Nanokapsel
DXM sol.	lösliches Dexamethason
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol, Alkohol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
F-Bottom	flat bottom

FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Beschleunigung; $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
Gal-N	Galactosamin
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCl _{aq}	Salzsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEV	Hepatitis-E-Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRP	horseradish peroxidase
HSV	Herpes-Simplex-Viren
IAIHG	Internationale Autoimmunhepatitis Gruppe
IFN γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
Il	Interleukin
iMNP	inflammatorische mononukleäre Phagozyten
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LC1	anti-liver-cytosol 1
LH	Lithium Heparin
LKM1	anti-liver kidney microsomal 1
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	liver sinusoidal endothelial cell
Ly-6C	lymphocyte antigen 6 complex, locus C1
Ly6-G	lymphocyte antigen 6 complex, locus G
M	mol

MEK	Methylethylketon
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
NaCl	Natriumchlorid
NC	Nanokapsel
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' von aktivierten B-Zellen
ng	Nanogramm (1 pg = 10 ⁻⁹ kg)
NPC	Nicht-Parenchymzellen
P	Phosphat
PB	Pacific Blue™
P/S	Penicillin Streptomycin
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Tandem-Konjugat
pg	Pikogramm (1 pg = 10 ⁻¹² kg)
QM	Qualitätsmanagement
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumlaurylsulfat
SMA	smooth muscle antigen
sol.	soluble (eng.: löslich)
TDI	2,4-Toluen-Diisocyanat
Th1	Typ-1-T-Helferzelle
Th2	Typ-2-T-Helferzelle
TM	Trade Mark

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Zunahme der Inzidenzrate der AIH in Dänemark, alters- und geschlecht standardisiert (SIR)</i>	<i>4</i>
<i>Abbildung 2: Mechanismen des Leberschadens: Überblick der beteiligten Zelltypen und der Zytokine .</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 3: Anzahl der Reviews gefunden zum Stichwort „nanomedicine“</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 4: Überblick über verschiedene Nanopartikelsysteme</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 5: Kombinationsmöglichkeiten von Träger- und Freisetzungstoffen</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 6: Konfokales Laserscanning cy5 gefärbter DXM NCs und deren Aufnahme in NPCs</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 7: Kristallstruktur (PDB: 3FXI) des LPS-Moleküls aus E. coli</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 8: Galactosamin (Gal-N).....</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 9: Dexamethason-Phosphat Nanokapseln in Elektronenrastermikroskop.....</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 10: Gewinnung von NPCs mittels Durchspülen der Leber mit Perfusionsmedium</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 11: Gatingstrategie</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 12: Suppression der Zytokinantwort (IL-6) in vitro durch Gabe von DXM NC.....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 13: Ermittlung der Äquivalenzdosis durch Suppression der Zytokinantwort (IL-6) in vitro von DXM NC und DXM sol. mit verschiedenen Konzentrationen</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 14: Ergänzende Kurven zu Abbildung 13 mit niedrigeren Konzentrationen.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 15: Ermittlung der Äquivalenzdosis durch Suppression der Zytokinantwort (IL-6) in vitro mit anderem DXM NC Batch.....</i>	<i>44</i>

<i>Abbildung 16: Zytokinkonzentrationen von IL-6 und TNFα in Blutplasma nach AIH Schadenssetzung in vivo (t=2h)</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 17: Zytokinkonzentrationen von IL-6 in Blutplasma nach AIH Schadenssetzung in vivo und eventueller Behandlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 18: Zytokinkonzentrationen von TNFα in Blutplasma nach AIH Schadenssetzung in vivo und Behandlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 19: Quantifizierung des Leberschadens mittels ALT in vivo durch verschiedene Konzentrationen in Blutplasma</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 20: Ermittlung der Überlebensrate mittels Kaplan-Meier-Kurve durch Leberschaden und eventueller Therapie mit DXM NC und sol.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 21: Konzentration von ALT in vivo mit und ohne Behandlung durch DXM NC bzw. sol. in Blutplasma</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 22: Konzentration von IL-6 in vivo mit und ohne Behandlung durch DXM NC bzw. sol. in Blutplasma.</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 23: Leukozyteninfiltration der AIH Schadensgruppe (1) und DXM NC (2) im Vergleich</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 24: Typisierung der Zellen und relative Quantifizierung der Zellinfiltration unterschiedlicher hepatischer Zellpopulationen.....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 25: Histologische Schnitte hepatischer Apoptose Zellen (TUNEL Färbung).....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 26: Quantifizierung histologischer Schnittbilder nach TUNEL Färbung.....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 27: IL-6 Suppressionsantwort 2 Tage alter DXM NCs im Vergleich zu Überstand, Pellet und DXM sol.</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 28: Keilstrichformeln verschiedener synthetischer Glukokortikoide mit Rot-Markierung der Hydroxylgruppen.....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 29: IL-6 Suppressionsantwort 43 Tage alter DXM NCs im Vergleich zu Überstand, Pellet und löslichem DXM.....</i>	<i>87</i>

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: IAHG - Diagnostischer Score zur klinischen Ermittlung einer AIH (Alvarez et al., 1999)</i>	<i>9</i>
<i>Tabelle 2: Vereinfachter klinischer Score zur Ermittlung der AIH (Hennes et al., 2008).....</i>	<i>9</i>
<i>Tabelle 3: Liste benutzter Geräte</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 4: Liste allgemeiner Verbrauchsmaterialien</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 5: Liste verwendeter Chemikalien.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 6: Materialien zur Herstellung des LPS</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 7: Materialien zur Herstellung des Gal-N.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 8: Materialien zur Durchführung der Anästhesie.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 9: Materialien für murine Blutentnahme.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 10: Materialien zur Gewinnung der murinen NPCs.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 11: Materialien zur Erstellung der Zellkulturen</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 12: Materialien zur Erstellung der histologischen Schnitte.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 13: Materialien für TUNEL Assay Färbung.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 14: Materialien für ELISA</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 15: Materialien für Durchflusszytometrie.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 16: Benutzte Antikörper zur Kategorisierung der NPCs</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 17: Materialien für CBA</i>	<i>38</i>

<i>Tabelle 18: Benutzte Software und Programme</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 19: Bewertung des Verhaltens der Versuchstiere innerhalb des Versuches</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 20: Verschiedene LPS und Gal-N Konzentrationen und deren ALT Durchschnittswerte, Zusammenstellung angelehnt an (Hamesch et al., 2015)</i>	<i>66</i>

1. ZIEL DER DISSERTATION

Die Leber ist Teil des Immunsystems. Lymphozyten-Populationen der Leber spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen und der Rekrutierung weiterer zirkulierender Lymphozyten. Antigene kommen mit Endothelzellen und Kupfferzellen in Kontakt, die eine Immunantwort auslösen (Racanelli and Rehermann, 2006). Im Rahmen der Autoimmunhepatitis (AIH) ist diese Antwort gegen körpereigene Zellen gerichtet, wodurch eine Leberschädigung hervorgerufen wird. Diese Erkrankung muss unter anderem über einen längeren Zeitraum mit Glukokortikoiden behandelt werden, welche erhebliche Nebenwirkungen beim Patienten induzieren.

In dieser Dissertation soll mit Hilfe von Nanopartikeln ein neuer therapeutischer Ansatz untersucht werden. In Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Polymerforschung wurden Dexamethason Nanokapseln (DXM NC) synthetisiert, welche durch eine Polymerisation des Dexamethason (DXM) zusätzlich gelöstes DXM (DXM sol.) im Innern der Kapsel einschließen. Dabei sollten zuerst murine nicht-parenchymatöse Zellen (NPC) aus den Lebern isoliert und *in vitro* in Zellkulturen gebracht werden, um einen Immunsuppressionseffekt mit unterschiedlichen Dosen von DXM NC zu beschreiben.

In einem weiteren Schritt wurden die Kapseln in einem murinen *in vivo* Modell durch intravenöse Applikation in den Blutstrom appliziert und gelangten in die Leber. Dort wurden sie von den Kupfferzellen und anderen antigenpräsentierenden Zellen als Fremdmaterial erkannt und phagozytiert. Dabei sollte mit Hilfe unterschiedlicher Surrogatparameter die Suppression der Immunantwort zu herkömmlichen DXM gemessen werden. Dies soll mit einem *in vivo* AIH Modell getestet werden, welches zuerst im Labor

etabliert werden musste. Der Leberschaden in der Maus sollte mit dem Lipopolysaccharid (LPS) aus *E. coli* und dem Aminozucker Galactosamin (Gal-N) durchgeführt werden.

Um einen Suppressionseffekt durch DXM NC beschreiben zu können, kamen verschiedene Analysen zur Anwendung. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Zytokine, Transaminasen und Cholestaseparameter im Serum oder in der Zellkultur gemessen. Ebenfalls wurden im Idealfall mit Hilfe von Zelltypisierung und Histologie die unterschiedlichen Infektionsvorgänge verdeutlicht.

Ein Wirken des DXM NC Ansatzes *in vivo* hat das Potential für eine klinische Anwendung. Dabei müssten Fragen der Toxizität, physiologischer Verträglichkeit, Aufnahmemechanismen und Elimination geklärt werden. Ebenso müssen die Erkenntnisse aus murinen Experimenten, bei denen die Tiere in wenigen Stunden beobachtet werden, von einer eventuellen humanen Implementation über mehrere Monate bis Jahre differenziert werden.

2. LITERATURDISKUSSION

2.1 Die Autoimmunhepatitis, eine Krankheit mit vielen Unklarheiten

Im Jahre 1990 bestätigte die Internationale Autoimmunhepatitis Gruppe (IAIHG) während einer zweiwöchigen Konferenz offiziell die Bezeichnung der Krankheit als „Autoimmunhepatitis“ (AIH) (Johnson and McFarlane, 1993). Diese Benennung sei für die Beschreibung des Verlaufes am treffendsten, da sich die Krankheit meist akut mit fluktuierendem Verlauf präsentiert und beizeiten Spontanremissionen oder inaktive Phasen auftreten können (Alvarez et al., 1999). Noch bis heute sind Ätiologie und genaue Pathogenese unbekannt, es werden genetische sowie umweltbeeinflussende Faktoren diskutiert. Man geht davon aus, dass eine Immunantwort auf Leberautoantigene abzielt, welche ungehemmt, da die immunregulatorischen Mechanismen versagen, einen Leberschaden initiiert und aufrechterhält (Liberal et al., 2011). Eine Differenzierung der Autoantikörper lässt die AIH in Typ 1 und Typ 2 unterteilen. Ersterer ist der häufigere Typ, welcher mit positiven ANA und SMA Antikörpern assoziiert ist. Letzterer macht zirka ein Drittel der Autoimmunhepatitiden aus, tritt bei Erwachsenen seltener auf und präsentiert sich klinisch häufiger fulminant. Bei der Typ 2 AIH können LKM1 (anti-liver kidney microsomal 1) und/oder LC1 (anti-liver-cytosol 1) Antikörper nachgewiesen werden (Floreani et al., 2013).

2.1.1 Steigende Anzahl von Neuerkrankungen

Es gibt wenige populationsbasierte Studien, bei welchen sich genaue epidemiologische Aussagen über die relativ seltene Erkrankung treffen lassen. Im Jahre 2013 wurde von

einem dänischen Team eine retrospektive Kohortenstudie veröffentlicht, welche über einen längeren Zeitraum (1994 bis 2012) eine große Stichzahl Erkrankter ($n = 1721$) erfasste (Gronbaek et al., 2014). Die Inzidenzrate der AIH in Dänemark beträgt $1,68 / 100.000$ Einwohner und ist damit vergleichbar hoch wie z. B. im Vereinigten Königreich mit $3,0 / 100.000$ Einwohner (Whalley et al., 2007), Norwegen mit $1,9 / 100.000$ Einwohner (Boberg et al., 1998) oder anderen weltweit ermittelten Werten zwischen $0,52$ bis $1,9 / 100.000$ Einwohnern pro Jahr (Gronbaek et al., 2014). Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass die Neuerkrankungsrate innerhalb der 18 Jahre von $1,37$ im Jahr 1994 auf $2,33$ im Jahr 2012 stieg (Abbildung 1) und somit vergleichbare Inzidenzsteigerungen zu beobachten sind wie bei der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (Molodecky et al., 2012) und der Rheumatoiden Arthritis (Myasoedova et al., 2010).

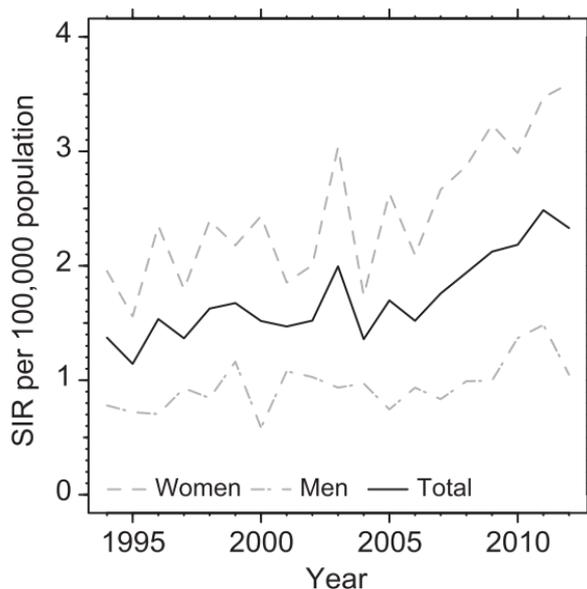


Abbildung 1: **Zunahme der Inzidenzrate der AIH in Dänemark, alters- und geschlecht standardisiert (SIR)** (Gronbaek et al., 2014)

In Kanada wurden in einer retrospektiven Kohortenstudie von 2000 bis 2008 alle AIH Fälle bei Kindern unter 18 Jahren erfasst, wobei eine Gesamtfallzahl von 159 und dabei eine Inzidenzrate bei Kindern von $0,23 / 100.000$ Einwohnern pro Jahr ermittelt werden konnte (Jimenez-Rivera et al., 2015). Am King's College Hospital in London wurden steigende Inzidenzraten von $2,3\%$ in den 90ern auf 12% seit 2000 festgestellt, jedoch könnte hier den Daten ein Bias unterliegen (Mieli-Vergani and Vergani, 2009).

Die Prävalenz der AIH liegt weltweit zwischen 15 / 100.000 Einwohnern in Japan (Yoshizawa et al., 2016) bis 35,9 / 100.000 Einwohnern in Alaska, USA (Hurlburt et al., 2002). Dieser große Unterschied lässt verschiedene genetische oder umwelt-bedingte Auslöser vermuten, da auch in Asien die Prävalenz geringer ist als in anderen Erdteilen (Liberal et al., 2016). So zum Beispiel betragen die Prävalenzen im asiatisch-pazifischen Raum 4,0 / 100.000 Einwohner in Singapur (Lee et al., 2001) und 4,82 / 100.000 in Südkorea (Kim et al., 2017).

Frauen sind in einem Verhältnis von 1:4 häufiger von der AIH betroffen (Manns et al., 2010a), jedoch verläuft die AIH bei Männern aggressiver, wobei der Einfluss von Sexualhormonen auf das Immunsystem diskutiert wird (Al-Chalabi et al., 2008).

Lange dachte man, dass die AIH vor allem Patienten im jüngeren und mittleren Lebensalter betrifft, aber es konnte gezeigt werden, dass die AIH zum einen auch über dem 60. Lebensjahr auftreten kann (Liberal et al., 2015) und dass sie zum anderen in der Adoleszenz sowie im Alter zwischen 30 und 45 Jahren jeweils einen Peak aufweist (Manns et al., 2010a).

2.1.2 Mechanismen des Leberschadens

Verschiedene Mechanismen sind im Rahmen der AIH auszumachen, die aufgrund der Komplexität noch nicht detailliert verstanden wurden. Der Krankheit gehen vielschichtige Interaktionen von Gen- und Umweltfaktoren voraus, welche sich in ihrem Vorkommen und Verhalten verstärken oder abschwächen können (Karlsen et al., 2015).

Als genetischer Einflussfaktor der AIH steht das Human Leukocyte Antigen (HLA) im Vordergrund, welches verschiedene wichtige Gene zur Regulierung der adaptiven Immunabwehr beinhaltet (Liberal et al., 2016). Die Allele DRB1*0301 mit RR = 4,58 und DRB1*0401 mit RR = 5,97 gehören zu den primären Einflussgenen, die mit einer AIH Typ 1 bei Europäern und Nordamerikanern assoziiert sind (Strettell et al., 1997). In einer niederländischen und deutschen Genomstudie konnten bei 1100 Patienten neben dem Einfluss der DRB1*0301 bzw. DRB1*0401 Gene mit Signifikanzwerten von $p = 5,3 \times 10^{-49}$ bzw. $p = 3,0 \times 10^{-18}$ weitere Gene, u.a. SH2B3 und CARD10, nachgewiesen werden (de Boer et al., 2014). Beschrieben sind noch weitere HLA Assoziationen, u.a. protektive Allele,

welche die Wahrscheinlichkeit einer AIH verringern (Duarte-Rey et al., 2009) oder je nach Subtyp geografische und ethnische Besonderheiten aufweisen (Oliveira et al., 2011).

Kreuzreaktionen zwischen fremden Bakterienoberflächen und körpereigenen Zelloberflächen mit fast homologer Struktur, genannt molekulares Mimikry, sind ein weiterer Versuch, die Ätiologie von Autoimmunkrankheiten zu erklären (Christen and von Herrath, 2004). Die Aminosäuresequenz des Hepatitis-C-Virus (HCV) Polyproteins zeigt eine große Ähnlichkeit zum Leberenzym CYP2D6, das von anti-LKM-1 Antikörpern erkannt wird. Somit ist HCV ein potentieller Trigger für die Produktion der anti-LKM-1 Antikörper, welche als erhöhter Titer bei der AIH zu messen sind. Auch kommen Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-E-Virus (HEV), Zytomegalie-Virus (CMV) und Herpes-Simplex-Virus (HSV) als mögliche Auslöser der AIH in Frage (Liberal et al., 2011). Ein allgemeiner Auslöser für die AIH ist noch nicht gefunden worden (Liberal et al., 2016). Auch Medikamente können eine Hepatitis mit autoimmuner Beteiligung auslösen, wie es zum Beispiel beim Anästhetikum Halothan nachgewiesen werden konnte (Neuberger, 1998).

Ein einflussreicher Stimulus für die massive Einwanderung von inflammatorischen Zellen ins Leberparenchym wird weiterhin gesucht und diskutiert. Es gibt mehrere Mechanismen, wie die Hepatozyten vom Immunsystem angegriffen werden (*Abbildung 2*): Im Rahmen des adaptiven Immunsystems präsentieren dendritische Zellen (APC) das Antigen mittels MHC Komplex, welches CD4 Helferzellen differenzieren lässt und die Sekretion von Zytokinen vorantreibt. IL-12 aktiviert Th1 Zellen, um $IFN\gamma$ zu sekretieren, welches zum einen Monozyten und zytotoxische CD8 T-Zellen aktiviert und natürliche Killer-Zellen unterstützt, und zum anderen eine abnormale Expression der MHC-II auf der Oberfläche der Hepatozyten und eine Hochregulation von MHC-I Molekülen induziert, womit die Entzündungsreaktion weiter vorangetrieben wird. Ebenso aktivieren IL-10, IL-13 und insbesondere IL-4 durch Th2 Zellen das humorale Immunsystem: Aus B-Zellen entstandene Plasmazellen produzieren Autoantikörper, welche zytotoxisch wirken und das Komplementsystem aktivieren (Liberal et al., 2016).

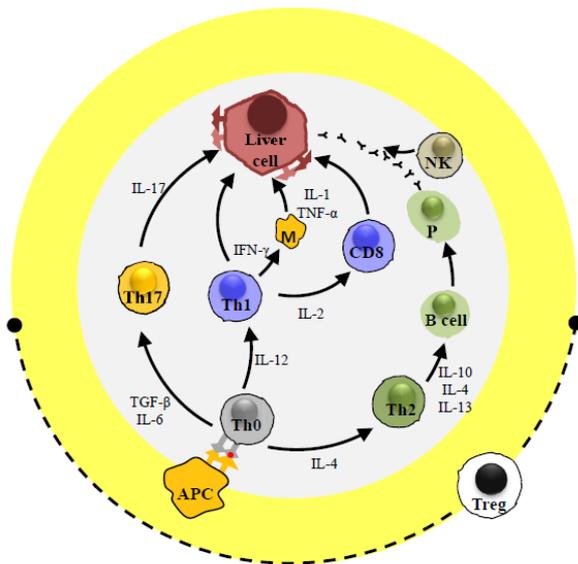


Abbildung 2: **Mechanismen des Leberschadens: Überblick der beteiligten Zelltypen und der Zytokine** (Liberal et al., 2016)

2.1.3 Th17, geheimer Übeltäter?

Abbildung 2 zeigt noch einen weiteren Weg auf: Die Aktivierung von Th17 Zellen mittels IL-6. Die Rolle der Th17 Zellen im Rahmen der AIH ist noch nicht ganz verstanden, jedoch konnte gezeigt werden, dass Th17 Zellen vermehrt in der pädiatrischen Form der AIH/PSC vorkommen als in der rein pädiatrischen AIH (Liberal et al., 2016) und dass die Depletion von Th17 Zellen eine T-Zell vermittelte Hepatitis mindert (Lafdil et al., 2009). Th17 Zellen findet man gehäuft bei der AIH, welche vermehrt IL-17 produzieren und wahrscheinlich Hepatozyten dabei induzieren, das proinflammatorische Zytokin IL-6 zu produzieren. Hier könnten interessante therapeutische Ansätze liegen (Zhao et al., 2011).

2.1.4 Akuter Verlauf bei jungen Patienten

Rund ein Viertel der Patienten zeigen klinisch eine akute ikterische Hepatitis (Stravitz et al., 2011). Die pädiatrische AIH äußert sich oft akuter und aggressiver als die der jungen oder älteren Erwachsenen, sodass von einem akuten Entzündungsgeschehen ausgegangen werden muss (Floreani et al., 2013). Dieses Kriterium spielt für die experimentelle Untersuchung dieser Dissertation eine entscheidende Rolle.

Es gibt zwei Typen der AIH: Typ-1 ist seropositiv für SMA und ANA, Typ-2, fast ausschließlich nur im Kindesalter vorkommend, eher für anti-LKM1 Antikörper (Mieli-Vergani and Vergani, 2009). Häufig sind in der Pädiatrie sklerosierende Cholangitiden mit autoimmunen Prozessen koexistent, genannt ASC (engl.: autoimmune sclerosing cholangitis) (Gregorio et al., 2001). Vereinzelt wird die AIH erst im fortgeschrittenen Stadium durch klinische Zeichen der Leberzirrhose manifest (Portale Hypertension, Hypersplenismus und gastrointestinale Blutung) (Manns et al., 2010a).

2.1.5 Diagnostikkriterien und Autoantikörper

Bei der AIH sind in der Leber histologische Entzündungsreaktionen, nicht-spezifische Autoantikörper und erhöhte Konzentrationen von Immunglobulin G zu beobachten (Mieli-Vergani and Vergani, 2009). Es gibt keinen Einzeltest zur Erkennung der AIH. Im Jahre 1999 entwickelte die IAIHG einen Score (*Tabelle 1*), mit dem die Wahrscheinlichkeit einer AIH ermittelt werden kann. Werte über 15 bei unbehandelten Patienten (17 bei Behandelten) sprechen definitiv, zwischen 10 – 15 (12 – 17 bei Behandelten) wahrscheinlich für eine AIH (Alvarez et al., 1999). Dieser Score wird vor allem für wissenschaftliche Zwecke genutzt, da er für den klinischen Alltag meist zu komplex ist (Lohse, 2011). Er wird jedoch für Patienten herangezogen, die wenige oder atypische Eigenschaften einer AIH aufweisen (Manns et al., 2015). Für den klinischen Alltag gibt es einen vereinfachten Test (*Tabelle 2*), welcher sich auf die Antikörper und Leberhistologie konzentriert und bei Werten über 6 eine Diagnose in Betracht gezogen werden muss, über 7 definitiv (Hennes et al., 2008). Jedoch ist keiner dieser Kriterienkataloge gut anwendbar für die juvenile Form der AIH, da Autoantikörper Titer häufig sehr viel niedriger sind als die angegebenen adulten Werte (Floreni et al., 2013). Hinzu kommt, dass mit diesen Scores keine gute differentialdiagnostische Unterscheidung zwischen der AIH und der ASC vorgenommen werden kann und deshalb häufig eine Cholangiografie durchgeführt werden muss (Hiejima et al., 2011).

Tabelle 1: IAIHG - Diagnostischer Score zur klinischen Ermittlung einer AIH (Alvarez et al., 1999)

Parameter	Eigenschaft / Messwert	Punkte
Geschlecht	Weiblich	+2
	Männlich	0
GOT:GPT (AST:ALT) Ratio	> 3	-2
	1.5 – 3	0
	< 1.5	2
Serumglobuline oder IgG	> 2 über normal	+3
	1.5 – 2 über normal	+2
	1 – 1.5 über normal	+1
	< 1	0
ANA, SMA oder anti-LKM-1 Titer	> 1:80	+3
	1:80	+2
	1:40	+1
	< 1:40	0
AMA	Positiv	-4
Virale Hepatitis Marker	Positiv	-3
	Negativ	+3
Medikamenten Einnahme (hepatotoxische Medikamente)	Positiv	-4
	Negativ	+1
Durchschnittlicher Alkoholkonsum	< 25 g/Tag	+2
	> 60 g/Tag	-2
Leberhistologie	Nekrosierende Hepatitis	+3
	Plasmazellen	+1
	Rosetten in Hepatozyten	+1
	Keine von oberen Kriterien	-5
	Biliäre Veränderungen	-3
	Sonstige Veränderungen	-3
Weitere Autoimmunerkrankungen	Positiv	+2
Seropositiv	Anti-SLA/LP, actin, ASGPR, pANNA	+2
HLA	DR3 oder DR4	+1
Ansprechen der Therapie	Remission	+2
	Rückfall	+3

Tabelle 2: Vereinfachter klinischer Score zur Ermittlung der AIH (Hennes et al., 2008)

Parameter	Eigenschaft / Messwert	Punkte
ANA oder SMA	≥ 1:40	+1
ANA oder SMA oder anti-LKM-1 oder SLA	≥ 1:80 ≥ 1:40 positiv	+2
IgG	> über normal	+1
	> 1,1 mal über normal	+2
Leberhistologie	Kompatibel mit AIH	+1
	Typisch für AIH	+2
Abwesenheit von viraler Hepatitis	Ja	+2

2.2 Entzündungskontrolle durch aktuelle Therapieprinzipien

Als Ansatz zur Therapie steht ein breites Spektrum zur Verfügung, jedoch wird bei allen Therapieansätzen nicht die Ursache, sondern unspezifisch der Inflammationsprozess gehemmt.

Ziel der Therapie ist die Erreichung und Erhaltung einer Remission zum Schutz vor einer Leberzirrhose und weiteren Komplikationen. Eine gewünschte Remission zeigt sich in der klinischen Praxis durch normale Transaminasenspiegel, fehlende histologische Entzündungszeichen sowie Negativierung der Autoantikörper-Titer ($\leq 1:20$ für ANA und SMA und $\leq 1:10$ für anti-LKM-1). Die optimale Länge einer Behandlung ist nicht bekannt, kann aber mittels Leberbiopsie und Unterbleiben von Entzündungszeichen determiniert werden. Bei Normalisierung des Gesamt IgG und bei niedrigen Autoantikörpern kann eine Therapiepause nach 1-2 Jahren in Betracht gezogen werden. Dies ist bei AIH Typ-1 häufiger der Fall als bei Typ-2. Im Allgemeinen ist jedoch von einer langfristigen Therapiedauer über mehrere Jahre auszugehen (Floreani et al., 2013).

2.2.1 Nebenwirkungen aktueller Therapieverfahren

Die pädiatrische AIH wird mit einer Anfangsdosis von 2 mg/kg/Tag Prednisolon bzw. Prednison therapiert, welche sukzessiv über einen Zeitraum von 4-8 Wochen gesenkt wird. Eine Absenkung der Transaminasen lässt sich bei 80 % der Patienten innerhalb der ersten zwei Monate beobachten (Floreani et al., 2013). Es ist wichtig, dass die Kinder in dieser Phase engmaschige labormedizinische Kontrollen erfahren und die Medikationsdosen angepasst werden, um die Folgen von Nebenwirkungen abzufangen oder auf neue Medikamentengruppen umzusteigen.

Neben Prednisolon können auch Dexamethason oder Hydrokortison gegeben werden, die sich in Pharmakokinetik und Nebenwirkungsspektrum unterscheiden. Glukokortikoide hemmen nicht-genomisch oder genomisch u.a. die Gentranskription bestimmter Gene durch Bindung an den Glukokortikoidrezeptor-Homodimer oder indirekt Transkriptionsprozesse und deren Transkriptionsfaktoren (AP-1 und NF- κ B) (Strehl and Buttgerit, 2013). Jene Transrepressionseffekte begründen die anti-inflammatorischen Effekte (Coutinho and Chapman, 2011).

Zudem beeinflussen sie weitere Prozesse: Steigerung der Glukoneogenese, Verringerung der Glukosetoleranz, Unterstützung einer katabolen Stoffwechsellage mit daraus folgender Muskelatrophie, Verminderung des Knochenwachstums und Osteoporose. Weiterhin steigt die renale Ausscheidung von Kalium und Protonen sowie die Retention von Natrium und Wasser. Durch die Zuführung von synthetisierten Glukokortikoiden nimmt die körpereigene Glukokortikoidsynthese ab, die über eine negative Rückkopplung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse gesteuert ist. Daraus resultieren mögliche Nebenwirkungen, u.a. Hyperglykämie, Bluthochdruck und gastrointestinale Blutungen (Doyle et al., 2010), die die Therapie erheblich beeinträchtigen oder sogar zum Abbruch zwingen können. Nebenwirkungen sind abhängig von Therapiedauer und Dosis. Im Allgemeinen werden Nebenwirkungen erwartet, sobald die Cushing-Schwellen-Dosis überschritten wird. Die meist verwendeten synthetischen Glukokortikoide haben unterschiedliche Wirkungen: 30 mg Hydrokortison haben eine äquivalente antiinflammatorische Wirkung wie 7,5 mg Prednisolon oder 1 mg Dexamethason (Paragliola et al., 2017).

Zu den wichtigsten Nebenwirkungen gehören erhöhte Infektanfälligkeit und Exazerbation bestehender Infektionen, Störung der Wundheilung, ophthalmologische Beschwerden, Hautveränderungen (Striae distensae, Akne) und ein iatrogen induziertes Cushing-Syndrom (Hypertonie, Fettverteilungsstörung, Amenorrhö) (Schacke et al., 2002). Da die lipophilen Glukokortikoide die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, treten ebenfalls psychische Störungen auf, wie Schlaflosigkeit, Nervosität, Persönlichkeitsveränderungen bis hin zu Psychosen (Hodgins et al., 2018) (Paragliola et al., 2017).

Der Entdeckung des Kortisols und seiner Wirkungen wurde als ‚wahres Wundermedikament bejubelt‘ und bescherte den Amerikanern E. C. Kendall und P. S. Hench sowie dem Schweizer T. Reichstein 1950 den Nobelpreis (www.nobelprize.org (01.07.2018)). Dennoch ist die Anwendung von Kortikosteroiden insbesondere bei pädiatrischen Patienten mit vielen Problemen behaftet. Unter anderem kann es durch den katabolen Effekt zur Wachstumshemmung kommen. Kleinere, höher frequentierte Tagesdosen haben weniger Auswirkungen auf eine verringerte Endgröße als eine hochdosierte Kortisontherapie. Allerdings ist eine zu niedrig dosierte Steroidtherapie bei aggressiven AIH Formen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für einen Rückfall assoziiert (Sokollik et al., 2018) (Samaroo et al., 2006).

Budenosid ist eine Alternative zu Prednison, welches weniger Nebenwirkungen aufweist, jedoch bei bereits zirrhotischen Patienten ungenügend wirkt und daher nur bei nicht-zirrhotischen Patienten diskutiert werden sollte (Manns et al., 2010b). Nach 6 Monaten weisen Budenosid und Prednison in Kombination mit Azathioprin eine Remissionsrate von 15,8 % bzw. 14,8 %, nach 12 Monaten 50 % bzw. 41,1 % auf (Wojnarowski et al., 2011).

Bei 85 % der Patienten wird als zweite Medikamentengruppe allein oder in Kombination häufig das Immunsuppressivum Azathioprin eingesetzt, dessen Metabolit 6-Mercaptopurin die zelluläre Immunantwort inhibiert. Am King's College Hospital in London beispielsweise wird mit einer Dosis von 0,5 mg/kg/Tag gestartet, welche bei Unterbleiben von toxischen Zeichen bis zu 2,5 mg/kg/Tag hochdosiert wird, denn ein ideales therapeutisches Level ist bisher nicht festgelegt worden. Die Dosierung von Azathioprin differiert zwischen verschiedenen Fachzentren deutlich. Die Gefahr beim Azathioprin liegt in seiner hepatotoxischen Wirkung, welche eine ikterische Stoffwechsellage verstärken kann (Floreani et al., 2013). Ebenfalls ist Azathioprin mutagen und teratogen (Leroy et al., 2015). Es können Knochenmarkdepressionen mit Leukopenie, Übelkeit, Durchfall und Erbrechen auftreten. Bei resistenten oder Azathioprin intoleranten Patienten kann auf Mycophenolat-Mofetil umgestellt werden (Aw et al., 2009), welches selektiv die DNA-Synthese in Lymphozyten hemmt (Freissmuth et al., 2016). Bei Nicht-Ansprechen oder zu starken Nebenwirkungen können darüber hinaus Calcineurininhibitoren in Betracht gezogen werden (Floreani et al., 2013).

2.2.2 Können Lebertransplantationen helfen?

Lebertransplantationen sind indiziert, wenn der durch die Erkrankung ausgelöste Leberschaden zu groß und die Leberfunktion stark eingeschränkt ist. Eine Transplantation kann bei AIH Patienten lebensrettend sein (Sahebjam and Vierling, 2015). Denn trotz Behandlung mit Glukokortikoiden erleben 40 % der behandelten Kinder einen Rückfall, der durch wieder steigende Transaminasen charakterisiert ist (Gregorio et al., 1997).

Bei 10 % der AIH erkrankten pädiatrischen Patienten wird eine Lebertransplantation durchgeführt, 20 % der Erkrankten erleiden ein Rezidiv. (Liberal et al., 2012) Die 5 Jahres-

Überlebensrate bei lebertransplantierten Patienten in Europa und den USA mit einer AIH liegt bei 72 % (Mendes et al., 2011).

Das Risiko an einer *de novo* AIH zu erkranken ist nach einer Lebertransplantation höher, die aufgrund einer anderen Erkrankung durchgeführt werden musste (Hernandez et al., 2001).

2.3 Tiermodelle der AIH

Die Herausforderung der zugrundeliegenden experimentellen Arbeit besteht darin die AIH unter möglichst einfachen Laborbedingungen gut zu imitieren. Dabei ist zu bedenken, dass viele murine Tiermodelle humane Krankheiten nicht vollständig abbilden und Ätiologie sowie die genaue Pathogenese der AIH bisher nicht verstanden sind. Gewünscht ist ein Schadensmodell, welches einen progressiven Leberschaden, eine akute Hepatitis mit erhöhten Transaminasen, imitiert.

Dabei gibt es mehrere Aspekte zu berücksichtigen: Erstens werden in einigen Modellen mit den für die AIH typischen Autoantikörpern gearbeitet, obwohl bis heute noch kein direkter Pathomechanismus gefunden wurde. Zweitens spielen im Serum messbare inflammatorische Faktoren eine wichtige Rolle, wie z.B. Chemokine und Zytokine, welche bei AIH Patienten erhöht sind. Drittens wurde ein gestörtes Verhältnis zwischen Th1 und Th17 Zellen mit erhöhtem Vorkommen nachgewiesen (Christen, 2018). Im idealen AIH Modell werden alle 3 Aspekte zur Nachahmung der Erkrankung genutzt.

Es gibt Tiermodelle, die mit lebertoxischen Substanzen arbeiten, beispielsweise bereits seit 1970 mit Lipoproteinen (Buschenfelde et al., 1972), dem Protein Concanavalin A (Tiegs et al., 1992) (Heymann et al., 2015) oder durch wiederholende intraperitoneale Applikation von *Sutellaria baicalensis* und *Bupleurum chinesis* (Wang et al., 2014). Des Weiteren wird mit transgenen Mausmodellen gearbeitet wie den NTxPD-1 ^{-/-} Knock-Out-Mäusen, die durch Dysbalance der T-Zell Populationen eine massive Lebernekrose erfahren (Kido et al., 2008), den *Aire* (Autoimmun regulierten) defizienten Mäusen, die zu 20 % eine AIH erwerben (Obermayer-Straub et al., 2001) oder den Traf6 Δ TEC Mäusen, die die negative Selektion von T-Zellen beeinträchtigen (Bonito et al., 2013).

Darüber hinaus gibt es Tiermodelle, welche mit Autoantigenen einer AIH arbeiten: Humane Autoantikörper gegen das Cytochrom-P450 Enzym CYP2D6, welches typisch für die AIH-2 ist, oder das Enzym FTCD können im murinen Modell mit Hilfe von Adenoviren (Ad-2D6 bzw. Ad-FTCD) als Trigger benutzt werden, um eine hepatische Inflammation zu generieren (Holdener et al., 2008) (Hardtke-Wolenski et al., 2013).

Das *in vivo* Leberschadenmodell mit dem Lipopolysaccharid (LPS) aus *E. coli* und dem Aminosucker Galactosamin (Gal-N) ist einfacher durchführbar als beispielsweise Versuchsabläufe mit Knockout-Maus Züchtungen.

Unabhängig von der AIH gibt es viele Forschungsgruppen, die mit den Substraten LPS und Gal-N arbeiten, um murine Leberschäden zu setzen. Dabei variierten die Dosen und die möglichen Applikationswege zwischen intravenös (i.v.) und intraperitoneal (i.p.): Je nach Fragestellung wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Applikationsdosen und -arten verwendet. Beispielsweise nutzte eine Arbeitsgruppe die Dosen 25 ng LPS und 20 mg Gal-N pro Versuchstier i.v. (Yoshida et al., 2007), eine andere 10 µg/kg LPS und 500 mg/kg Gal-N i.p. (Yang et al., 2015a) oder eine weitere 1 µg LPS und 8 mg Gal-N pro Versuchstier i.v. (Emoto et al., 2003).

Ein geeignetes Schadensmodell soll im Labor etabliert werden, um einerseits anhand gemessener Zytokine (IL-6) oder Transaminasen (ALT) auf einen entstandenen Leberschaden zu schließen. Andererseits muss es zu definierten Zeitpunkten möglich sein, dem Versuchstier Blutserum und Leber für weitere Analysen zu entnehmen (*Kapitel 4.2.3*).

2.4 Nanotechnologie, eine neue Alternative?

„Die Möglichkeiten der Nanomedizin zur Verbesserung der Gesundheit sind grenzenlos“ (Pautler and Brenner, 2010). Solche und viele weitere enthusiastische Zuschreibungen liest man gehäuft in der Literatur. Seit zirka 10 Jahren steigt die Anzahl der in PubMed gefundenen Reviews auf 1134 im Jahr 2020 über nanomedizinische Themen kontinuierlich an. Durch die Erforschung und Entdeckung verschiedenster Nanopartikel kommt es zu vielreichenden Anwendungsgebieten (Sweeney, 2015).

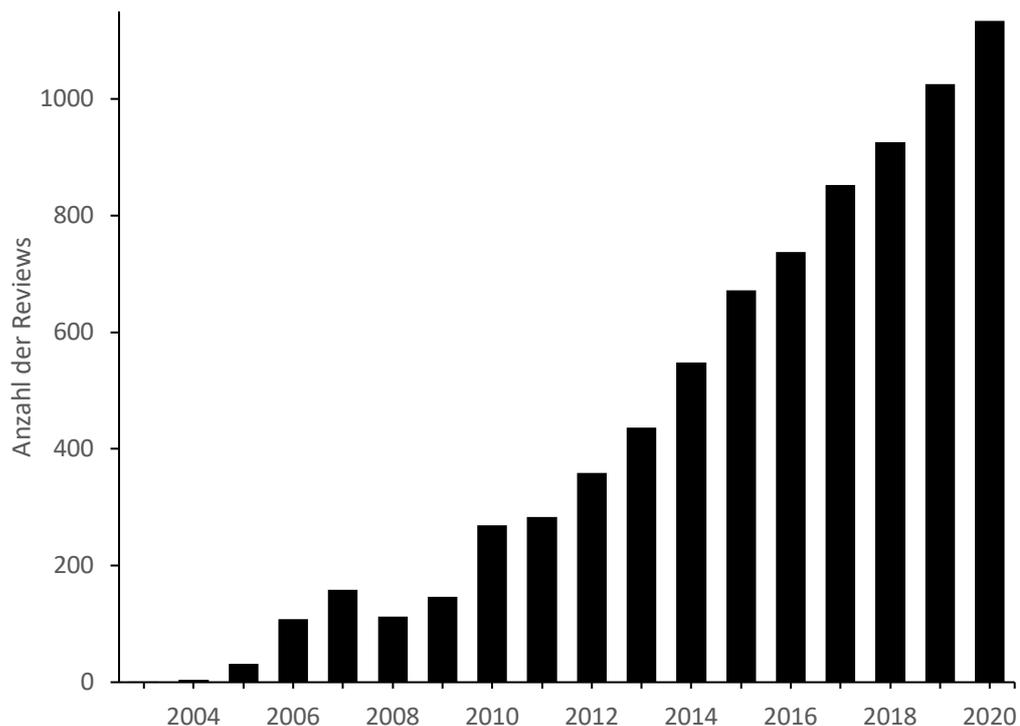


Abbildung 3: **Anzahl der Reviews gefunden zum Stichwort „nanomedicine“** auf der englischsprachigen PubMed Plattform www.pubmed.gov ab dem Jahr 2002 bis 2020, Stand: 15.05.2021

Die Nanotechnologie wird durch verschiedene Forschungsinitiativen gefördert. Die Europäische Kommission stellte von 2003 bis 2006 1,3 Milliarden Euro Forschungsgelder zur Verfügung (The Lancet Vol 362, 2003) und aus dem Etat des Präsidenten der Vereinigten Staaten von Amerika wurden allein für das Jahr 2016 1,5 Milliarden US Dollar für den Forschungsbereich eingesetzt (Chang et al., 2015). Auch für Entwicklungsländer kann die Technologie von besonderem Interesse sein: Es gibt Bestrebungen, Krankheiten wie Tuberkulose (Dube et al., 2013) oder HIV (Liszewicz and Toke, 2013) mittels nanotechnischer Verfahren zu behandeln. Das erste nanomedizinische Produkt Doxil® gelangte vor mehr als 20 Jahren auf den Markt (van der Meel et al., 2013), welches als liposomales Nanopartikel vorliegend eine geringere Kardiotoxizität und optimalere Pharmakokinetik aufweist (Lyseng-Williamson et al., 2013). Durch Nanotechnologie entsteht im pharmazeutischen Bereich der Krebstherapie durch mRNA Impfungen neue Möglichkeiten (Reichmuth et al., 2016). 2020 gelang es durch nanopartikuläre Formulierungen den Firmen BioNTech und Pfizer mit Comirnaty® (Lamb, 2021) sowie Moderna mit der mRNA-1273 (Baden et al., 2021) eine Impfung gegen das SARS-CoV-2 Virus zu etablieren. Hier werden kationische Lipide mit Cholesterol und pegyliertes Lipid

kombiniert (Ickenstein and Garidel, 2019), welche durch Komplexbildung die mRNA, welches das Genom zur Sequenzierung für das Spike Protein des SARS CoV-2 Virus beinhaltet, stabilisiert und vor RNAsen schützt.

Nanopartikel ermöglichen je nach Beschaffenheit und Material einzigartige nützliche Funktionen, um in Zellen eindringen zu können und so die Freisetzung des Medikaments optimaler zu steuern (Langer and Weissleder, 2015). Die Vielfalt der verschiedenen Subtypen von Nanopartikeln ist groß (Abbildung 4): So können die Hüllen der Nanopartikel aus Lipiden, organischen oder anorganischen Materialien bestehen. Polymere spielen hierbei eine wichtige Rolle.

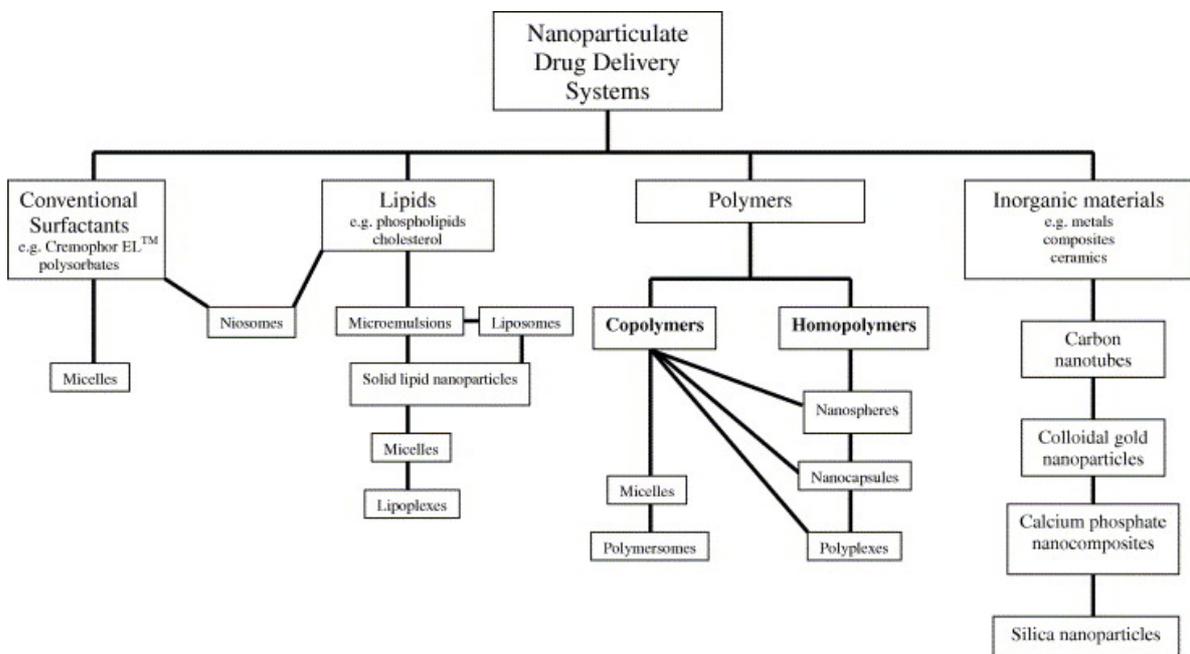


Abbildung 4: Überblick über verschiedene Nanopartikelsysteme (Letchford and Burt, 2007)

Zu den Polymeren gehören unter anderem Nanosphären und die in dieser Arbeit verwendeten Nanokapseln, welche nicht nur therapeutisch, sondern auch diagnostisch eingesetzt werden (Langer and Weissleder, 2015). Auch werden diese als nano-vesikuläre Systeme definiert, die eine typische Kern-Schalen-Struktur aufweisen (Mora-Huertas et al., 2010). Es handelt sich hierbei um 1 bis 1000 nm große Teilchen, bei denen die zu wirkende Substanz einkapsuliert, gelöst oder aufgenommen werden kann (Letchford and Burt, 2007). Verschiedene Strukturen für den Aufbau der Nanokapseln sind vorstellbar (Abbildung 5): Entweder kann der Kern die aktive Substanz in flüssiger (a), fester beziehungsweise polymerisierter Form (b) oder als molekulare Dispersion (c) beinhalten (Mora-Huertas et al., 2010).

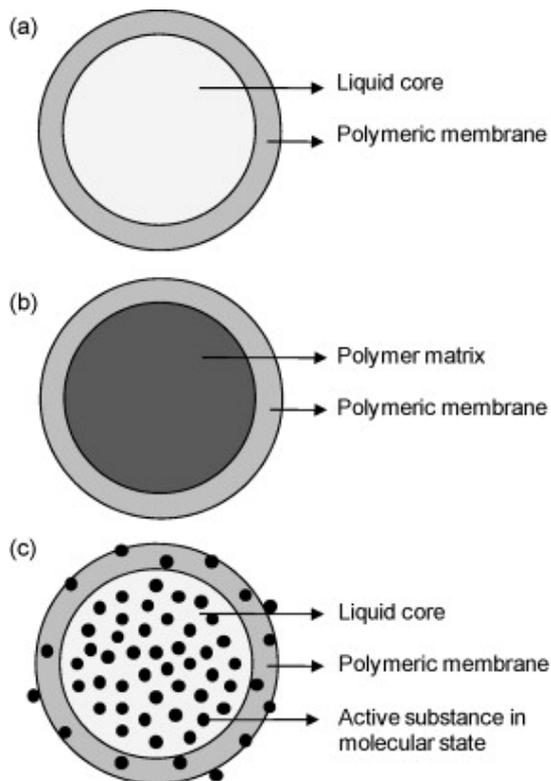


Abbildung 5: **Kombinationsmöglichkeiten von Träger- und Freisetzungstoffen** (Mora-Huertas et al., 2010)

2.5 Glukokortikoid-Nanokapseln: „Cargo and Carrier“

Ziel der Dissertation ist es, dass intravenös applizierte Nanokapseln im Blut zirkulieren bis sie in der Pfortaderregion von Kupfferzellen phagozytiert werden. Jede Nanokapsel agiert dabei wie ein „Nanocontainer“ (Baier et al., 2012), der Dexamethason im Kern gelöst für das biologische System bereitstellt. Eine subkutane oder orale Applikation wäre in diesem Fall nicht zielführend, da nicht-antigenpräsentierende Langerhans Zellen der Haut (Liard et al., 2012) beziehungsweise enterochromaffine Zellen des Gastrointestinaltraktes (van der Lubben et al., 2001) die Partikel primär aufnehmen würden. Da die Inflammation und Immunantwort hauptsächlich in der Leber vermutet wird, fügt sich die Idee des Modells ideal mit der Therapie der DXM NC zusammen: Das angeborene unspezifische Immunsystem der Leber nimmt die Glukokortikoide auf, um so die subsequenten Inflamationsprozesse zu supprimieren.

Polymere Trägersysteme haben das Potential DXM gezielter freizusetzen (Urbanska et al., 2014), um den Therapieeffekt am Ort der Inflammation zu erhöhen. Gleichzeitig werden die

systemischen Nebenwirkungen u.a. dadurch vermindert, dass die Blut-Hirn-Schranke nicht überwunden wird. Verschiedene Forschungsgruppen arbeiten mit unterschiedlichen DXM Träger- und Freisetzungssystemen, so zum Beispiel mit Polylactid-co-glycolid (PLGA) (Gomez-Gaete et al., 2007), DXM Polymer-Mizellen (Coimbra et al., 2012), Polyethylenglycol (PEG) (Liu et al., 2010), Liposomen (Bhardwaj and Burgess, 2010), Hydroxyethylstärke (HES) (Fichter et al., 2013), Lipid-Nanopartikeln (Chen et al., 2018) oder Silika-Nanokapseln (Jiang et al., 2020). Es wurden keine toxischen Effekte oder Nebenwirkungen dieser Trägersysteme dokumentiert. Bis 2014 wurden die genannten Polymersysteme vorwiegend durch *in vitro* Modelle untersucht (Urbanska et al., 2014), woraufhin erste Arbeitsgruppen begannen, DXM Trägersysteme *in vivo* zu testen (Bartneck et al., 2015). Als Anwendung werden zum Beispiel DXM geladene PLGA-TPGS Nanopartikel im Vergleich zu herkömmlichen DXM getestet, die bei intravitrealer Applikation die Bioverfügbarkeit des DXM bessern und somit Anwendungen für hintere Augensegmenterkrankungen finden könnten (Yang et al., 2013).

Für die *in vitro* und *in vivo* Experimente wurden DXM Nanokapseln verwendet, deren Inhalt und die Hülle selbst aus polymerisiertem DXM 21-Phosphat-Dinatrium Salz (Fortecortin®) bestanden, welches als Pro-Pharmakon im Organismus zu aktivem DXM umgewandelt wird (Hemenway et al., 2007). So kommen weniger unterschiedliche Stoffe und Chemikalien in Kontakt zum *in vivo* Organismus, welche unerwünschte Immunantworten und mögliche Überreaktionen generieren könnten. Als eine Art Monosystem ist DXM Inhalt und Träger („*Cargo and Carrier*“) in einer Kapsel, somit konnte bei der Synthese der polymerisierten Kapseln auf andere Substanzen verzichtet werden.

Basierend auf Vorarbeiten der eigenen Laborgruppe konnte durch *in vitro* Experimente gezeigt werden, dass DXM NCs von NPCs der Leber aufgenommen werden. Mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie und mit cy5 gefärbten DXM NCs wurde die Aufnahme und Freisetzung des DXM in die Zellen verdeutlicht (*Abbildung 6*). Die Phänotypisierung der Zellen war möglich: CD45⁺F4/80⁺ (Kupffer) Zellen und CD45⁻CD31⁺ (LSECs) nahmen DXM NCs auf (Fichter et al., 2013).

Für die *in vivo* Experimente wird angenommen, dass durch i.v. Applikation die DXM NC in der Leber akkumulieren und von den dortigen Zellen, unter anderem in den Gefäßen des sinusoidalen Systems befindlichen Kupfferzellen, phagozytiert werden (Sadauskas et al.,

2007). Kupfferzellen repräsentieren ca. 35 % der Nicht-parenchymen Leberzellen (Gregory and Wing, 2002), nehmen im Rahmen der adaptiven Immunantwort unspezifisch Partikel aus dem Blut auf (Parker and Picut, 2005) und produzieren unter anderem IL-6 (Tan et al., 2009) (Fichter et al., 2013).

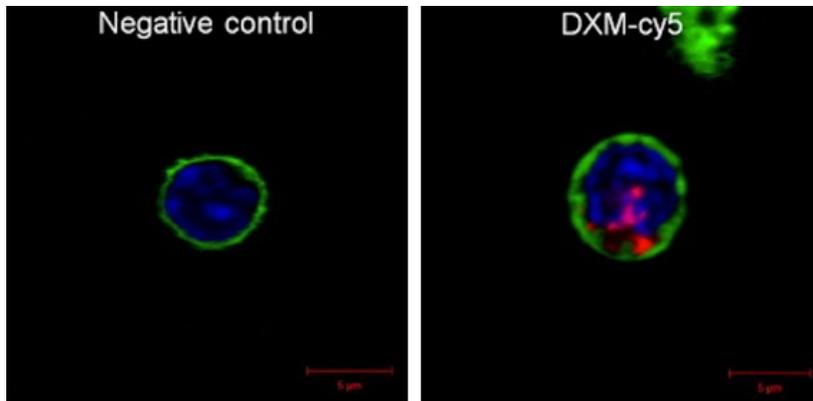


Abbildung 6: **Konfokales Laserscanning cy5 gefärbter DXM NCs und deren Aufnahme in NPCs.** (Fichter et al., 2013)

Generell steigen IL-6 Konzentrationen bei Entzündungsreaktionen (Tanaka et al., 2014).

Nanokapseln verhalten sich unter *in vivo* Bedingungen unterschiedlich als *in vitro*, da Zellkulturen mit konzentrierten Populationen nicht die komplexen physiologischen Rahmenbedingungen widerspiegeln. Unter anderem interagieren Nanokapseln *in vivo* mit Proteinen, Lipiden und anderen Metaboliten des Blutes, Zelloberflächen, Temperatur und unterschiedlichen pH-Milieus (Cedervall et al., 2007). In Zusammenschau all dieser Prozesse wird von dem Phänomen der Corona gesprochen: An der Oberfläche der Kapseln lagern sich Biomoleküle, welche nicht nur die physikalischen und chemischen Eigenschaften, sondern auch die biomedizinischen Eigenschaften ändern können (Feliu et al., 2016). Bei einer möglichen klinischen Anwendung der DXM NCs müssten die genannten biologischen, physikalischen und chemischen Phänomene genau untersucht und verstanden werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere, TARC & Ethikantrag

Für die *in vivo* Versuche wurden weibliche C57BL/6J Mäuse in einem Alter von 6 bis 8 Wochen verwendet. Die Tiere wurden vom krankenhauseigenen Versuchstierinstitut der Universität Mainz bezogen und aufbewahrt, wo sie einem regelmäßigen 12h Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt waren und ständigen Zugang zu Futter und Wasser hatten.

Bei den Versuchen wurde darauf geachtet, dass die Mäuse ungefähr das gleiche Gewicht hatten. Im Schnitt wiesen sie ein Gewicht von 19,6 g ($\pm 1,1$ g) auf.

Fähigkeiten und Grundkenntnisse in der Pflege, Betreuung und tierschutzgerechter Tötung, Probeentnahme, Applikation und Anästhesie bei Versuchstieren wurden im „Translational Animal Research Center“ der Universität Mainz vermittelt.

Der Ethikantrag wurde im Februar 2013 gestellt und daraufhin genehmigt.

Alle Ergebnisse, Experimente und Rohdaten wurden analog und digital erfasst und gespeichert.

3.2 Geräte

Tabelle 3: Liste benutzter Geräte

Material (alphabetisch)	Information
Absaugsystem	Integra IBS Vacusafe comfort Firma Integra Biosciences
Brutschränke	CO2 Inkubator Heracell 240i Firma Thermo Fisher Scientific
ELISA Waschgerät	Dynex Opsys MW™ Microplate Washer Firma Dynatech
FACSCanto™	Firma BD Biosciences
Fixateur für Versuchstier	Föhr Medical Instruments GmbH
LSR II	Firma BD Biosciences
Mikroskop Olympus CKX41	Firma Olympus Life Science Solutions
Photometer	Sunrise Mikrotiterplatten Firma Tecan
Pipetten	2,5, 10, 20, 100, 200 und 1000 µL Firma Eppendorf Research
Pipetus®-Akku	Firma Hirschmann Laborgeräte
Rotlichtlampe	Firma Luxoplast
Sartorius Analysewaage	Firma AS Wägetechnik
Zentrifuge Megafuge 16R	Firma Thermo Scientific
Zentrifuge Fresco 17	Firma Thermo Scientific

3.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Liste allgemeiner Verbrauchsmaterialien

Material (alphabetisch)	Information
Aluminiumfolie	-
Einmalpipetten	1, 5, 15 und 25 ml Firma greiner bio-one
Mundschutz	Firma Halyard Health
Octeniderm	alkoholisches Hautantiseptikum, Firma Schuelke

Material (alphabetisch)	Information
Parafilm®	Länge 38m x Breite 100mm, Firma Bemis
Pasteurpipetten	Firma Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Pipetten	10, 200 & 1000 µl graduated tip Firma Starlab
Reaktionsgefäße	Falcon™ Round-Bottom Polystyrene Tubes Firma Falcon Brand products
Styroporplatte	(aus alten Kühlboxen recycelt)
Zentrifugenröhrchen, Falcon©	Firma Falcon Brand products, 15 & 50 ml

3.4 Chemikalien & Lösungen

In diesem Abschnitt werden Chemikalien und Lösungen aufgelistet, die in verschiedenen Versuchen zur Anwendung kamen. Spezifische Chemikalien und Lösungen für bestimmte Experimente werden in dem dazugehörigen Kapitel erwähnt.

Tabelle 5: Liste verwendeter Chemikalien

Material	Information
EtOH	Firma Roth®, Ethanol 70% vergällt, 5l ≥ 70%, mit ca. 1 % MEK
PBS	Firma Sigma-Aldrich®, D8537, 500 ml, Lot RNBD7616
FCS	Firma Hyclone, Calf Growth Serum Lot APM22522, DEC2009, Lagerung -18° C
HBSS	Firma Sigma-Aldrich®, H6648 500 ml, Lot RNBD7298
P/S	Firma Sigma-Aldrich®, P0781-100ML Penicillin Streptomycin Lot 04M4802V, Lagerung -18° C
RPMI-1640 MEDIUM	Firma Sigma-Aldrich®, R0883 500 ml, Lot RNBD8622, Lagerung 7° C

3.4.1 Ansetzen von LPS

Tabelle 6: Materialien zur Herstellung des LPS

Material (alphabetisch)	Information
H ₂ O dest.	Aqua, Firma Braun
LPS	LPS-EB Ultrapure, Firma InvivoGen Lot. # L3P-38-02

Zielkonzentration des LPS für die *in vitro* Kapselversuche und das *in vivo* Schadensmodell waren 1 mg/ml. Unter sterilen Bedingungen wurden 1 mg Gal-N in 1 ml destilliertem H₂O gelöst und bei -20° C aufbewahrt.

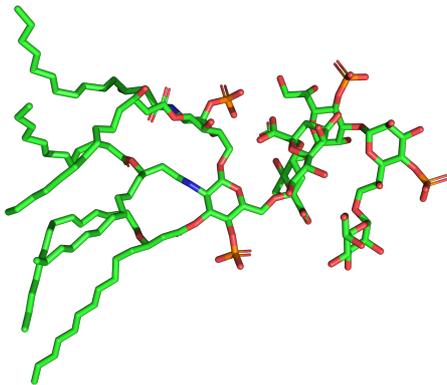


Abbildung 7: **Kristallstruktur (PDB: 3FXI) des LPS-Moleküls aus *E. coli*** (C grün, O rot, N blau, P orange). [PyMOL (Schrödinger, Version 2.1.1), 11.07.2018 nach (Park et al., 2009)]

3.4.2 Ansetzen von Galactosamin

Tabelle 7: Materialien zur Herstellung des Gal-N

Material (alphabetisch)	Information
NaCl	0,9% Isotonische Kochsalzlösung in Polyethylenampullen, Firma Fresenius Kabi
Gal-N	D-Galactosamin Hydrochlorid ≥ 98%, C ₆ H ₁₄ ClNO ₅ , M 215,64 g/mol, Firma Roth®

Zielkonzentration des Gal-N für das Schadensmodell waren 50 mg/ml. Dafür wurden unter sterilen Bedingungen (Filter, Sterilbank) 500 mg Gal-N in 10 ml sterilem NaCl aufgelöst und bei -20° C in kleinen Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

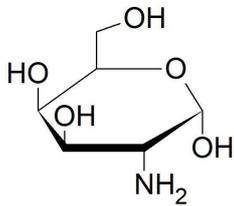


Abbildung 8: **Galactosamin** (Gal-N), [Chemskech, 10. 07.2018]

3.5 DXM Nanokapseln

Die in den Experimenten verwendeten Dexamethason-Phosphat-Nanokapseln (kurz: DXM-PC) wurden im Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz synthetisiert und analysiert. Nach Testung der Kapseln *in vitro* und erfolgter ELISA-Analyse wurden die Kapseln schließlich den Mäusen i.v. über die Schwanzvene in NaCl gelöst appliziert.

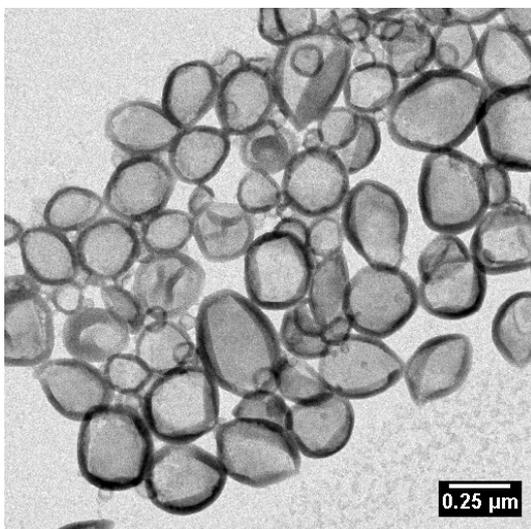


Abbildung 9: **Dexamethason-Phosphat Nanokapseln in Elektronenrastermikroskop** [MPI, ■■■■■, 04.05.2016]

Zur Synthese der Kapseln: 1000 µl Dexamethason 21-Phosphat-Dinatrium Salz (Fortecortin®) (10 mg/ml) und 400 µl PBS Puffer wurden als wässrige Phase mit 20 mg NaCl, 100 mg Surfactant (Poly((Ethylen-Co-Butylene)-b-(Ethylenoxid))), welcher als grenzflächen-

aktive Substanz zwischen den beiden Phasen fungiert, in 7,5 g Cyclohexan bei 25° C für 1 h vermischt. Danach wurde das Gemisch mit Hilfe von Ultraschall homogenisiert. Anschließend wurde für die Dauer von 5 Minuten 5 g Cyclohexan, 30 mg Surfactant und 40 mg TDI (2,4-Toluen-Diisocyanat) durch Tröpfeln hinzugefügt. TDI fungiert bei der Synthese als sogenannter Crosslinker, welcher die Moleküle der Nanokapselhülle polymerisierend vernetzt. Die Reaktion erfolgte in 24 h durch ständiges Rühren. Anschließend wurden die Kapseln durch Zentrifugation gereinigt, um Surfactant und das Cyclohexan zu entfernen, und für 24 Stunden durch ständiges Umrühren in SDS-Lösung gelöst. Durch Ultraschallbad, Dialyse und weiteres Zentrifugieren wurden die Kapseln gereinigt und schließlich in 0,9 % NaCl resuspendiert (Fichter et al., 2013). Die Kapseln wurden im eigenen Labor unter ständigem Mischen mittels magnetischen Rührfischs bei 4° C aufbewahrt und nach maximal 6 Wochen verworfen.

3.6 Anästhesie

Tabelle 8: Materialien zur Durchführung der Anästhesie

Material (alphabetisch)	Information
Ketaminhydrochlorid	Ketamin-hameln 10x10ml Firma hameln pharmaceuticals GmbH 50 mg/ml Injektionslösung
Rompun® 2%	Wirkstoff Xylaxinhydrochlorid Firma Bayer, 25ml

Zwanzig Minuten vor Beginn einer Intervention wurde das Versuchstier mit Ketamin und Rompun analgesiert, relaxiert und sediert. Insgesamt 0,6 ml Ketamin (50 mg/ml Ketamin-hameln) wurden mit 0,2 ml Xylazin (20 mg/ml Rompun) und 1,7 ml NaCl vermischt, wovon pro 20 g Körpergewicht der Maus 250 µl i.p. injiziert wurden.

Um eine erfolgreiche Analgesierung und Sedierung zu gewährleisten, wurden die Beatmung, die Vigilanz und die Reflexe der Maus beurteilt. Hierbei wurde u.a. der Zwischenzehenreflex ausgelöst (Arras et al., 2001).

3.7 Erhalten der Blutproben

Tabelle 9: Materialien für murine Blutentnahme

Material (alphabetisch)	Information
BD Microlance™ 3	Firma Becton Dickinson, 20G 1½'' – Nr. 1; 0,9 x 40 mm Lot 1504 23
Li-Heparin Probengefäß	Firma Sarstedt 35 I.E. Heparin / ml Blut Lot 1072002
Na-Heparin Einmal-Kapillarpipetten	Firma Hirschmann® Laborgeräte, 25 µl

Die mit PBS verdünnten Proben wurden bei Raumtemperatur mit 2000 x g für 10 min zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde pipettiert und entweder bei -20° C konserviert oder sofort zur Messung weiterverwendet (CBA, ELISA oder Zentrallabor).

3.7.1 Blutentnahme aus der Schwanzspitze des Versuchstiers

Der analgesierte Maus wurde mit einer vorher alkoholdesinfizierten Schere ein kleines Stück Schwanzspitze entfernt und unter eine Infrarot-Wärmelampe zur Weitstellung der venösen Gefäße gehalten. Mit einer 25 µl heparinisierten Glaskapillare wurde Blut entnommen und mit PBS verdünnt. Die Menge des abnehmenden Blutes hing von der zu gewünschten Messgröße ab:

- Zytokine für CBA oder ELISA Messung
 - ⇒ 25 µl Blut mit 25 µl PBS verdünnen (1:2)
- Transaminasen für Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz
 - ⇒ 50 µl Blut mit 100 µl PBS verdünnen (1:3)

3.7.2 Blutentnahme durch Herzpunktion des Versuchstiers

Um größere Volumina an Blut zu gewinnen, wurde abhängig von der Fragestellung per Herzpunktion 200 bis 300 µl Blut entnommen. Hierbei war jedoch keine weitere Messung im Experiment möglich, da das Tier nach der Entnahme verstirbt. Nach Analgesierung,

Sedierung und Überprüfung der Reflexe (*Kapitel 3.6*) wurde nach Desinfektion des Fells die Maus abdominal eröffnet und das untere Diaphragma freigelegt. Mit einer 20G Kanüle wurde im flach gehobenen Winkel das Diaphragma, die Pleura und der Herzbeutel durchstoßen, um das Blut aus der Herzkammer entnehmen zu können. Dabei musste beachtet werden, dass bei ungenauer Injektion ein möglicher Pneumothorax die Blutentnahme erschweren konnte. Nach erfolgreichem Materialgewinn wurde die Maus durch Überstreckung getötet und fachgerecht entsorgt.

3.8 Zellisolation & Zellkulturen

3.8.1 Isolation Nicht-Parenchymaler-Leberzellen

Tabelle 10: Materialien zur Gewinnung der murinen NPCs

Material (alphabetisch)	Informationen
BD Discardit™ II	Firma Becton Dickinson S.A., 20ml Lot 1509116
Collagenase	Firma Roche 100 mg/ml in HBSS
DNase Typ I	2,5 mg/ml in HBSS
Histodenz™	Firma Sigma-Aldrich®, H6648 Lot WXBB7925V C ₁₉ H ₂₆ I ₃ N ₃ O ₃ MW: 821.14 g/mol
Injekt® - F	Firma B. Braun Melsungen AG ml – 1 ml / Luer Solo Lot 15H31C8
Minisart® Filter	Firma sartorius stedim, 0.20µl Single use filter unit. Nicht pyrogenisch. Lot 41195103
Neubauer-Zählkammer	Firma Marienfeld-Superior, Deutschland
Sterican®	Firma Braun, 26G 1'' – 0,45 x 25 mm Lot 1509116
Verbindungsleitung micro 15 cm	Firma MDSS GmbH, steril Lot 2940419

Zu den Nicht-Parenchymzellen der Leber gehören unter anderem die sinoidalen Endothelzellen, natürliche Killerzellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, Dendritische Zellen, Ito-Zellen beziehungsweise hepatische Sternzellen und die Kupfferzellen (Mohar et al., 2015) (Xing et al., 2016). Mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens kann man die genannten Zellen von den Hepatozyten isolieren.

Die Extremitäten der narkotisierten Maus wurden auf einer Styroporplatte, welche mit Aluminiumfolie überspannt war, mit Injektionsnadeln fixiert und das Abdomen mit Ethanol (EtOH) desinfiziert. Nach kranial wurde nun etwas oberhalb der Harnblase das Abdomen der Maus bis zum unteren Sternum eröffnet und zur Darstellung der Vena hepatica wurden oberer und unterer Gastrointestinaltrakt so gut wie möglich nach lateral verlagert. Nach Punktion der Pfortvene mit einer 26G Nadel und einer 30cc Spritze wurde die Leber langsam mit 4° C gekühltem 20 ml Perfusionsmedium (HBSS + 5% FCS + 40 mg / 100 ml Collagenase + 0,001% DNase Typ I) durchspült.



Abbildung 10: **Gewinnung von NPCs mittels Durchspülen der Leber mit Perfusionsmedium.**
[Februar 2016]

Sobald die Leber allmählich bleich wurde und sich ausdehnte, wurde der untere Teil der Vena cava inferior aufgeschnitten und das Perfusionsmedium konnte auslaufen. Durch Kompression der unteren Hohlvene mit einer Pinzette konnte die Leber mehrere Zyklen gut durchgespült werden.

Nach Beendigung des Spülvorganges musste die Gallenblase ohne Beschädigung vorsichtig entfernt und die Leber aus dem Abdomen entnommen werden. Falls mehrere NPC Isolationen an einem Versuchstag durchgeführt wurden, wurden die Zellen auf Eis zwischengelagert. In kleine Stücke geschnitten wurden die Lebersegmente bei genau 37° C für genau 15 min in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml Perfusionsmedium im Brutschrank aufbewahrt. Bei Überschreiten der 15 min stieg die Wahrscheinlichkeit, dass Oberflächenmarker auf den Zellen verdaut werden.

Unter der Sterilbank wurde nun mit dem Ende des Kolbens einer 1 ml Spritze die Leber durch ein Nylonfilter gedrückt. Hierbei wurden nicht gewünschte Rückstände wie zum Beispiel Haare oder Fett durch das Sieb aufgehalten. In regelmäßigen Zwischenschritten wurde insgesamt 50 ml Waschmedium (RPMI + 5%FCS + 1% P/S) zum Durchspülen des Filters hinzugegeben und später wieder auf Eis gestellt.

Nun wurde das Röhrchen bei 400 rpm für 15 min bei 4° C zentrifugiert. Vorsichtig wurden 48 ml Überstand mit der Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet bestand hauptsächlich aus parenchymalen Zellen, die verworfen wurden.

In einem zweiten Zentrifugationsschritt bei 4°C und 300 x g für 10 min setzten sich die vorher gelösten Zellen ab. Der Überstand wurde verworfen. In genau 1 ml eiskaltem HBSS wurde nun das Pellet gelöst und in ein kleines Röhrchen mit 2 ml gekühlten 30 % Histodenz (3 g Histodenz gelöst in 7 ml HBSS, ohne Calcium und Magnesium) überführt und sanft durchmischt. Tropfen für Tropfen wurde HBSS der Mischung aufgeschichtet, welches durch einen geringeren Dichtegradienten oben auf der Mischung liegen blieb. Nach Zentrifugation ohne Beschleunigung und Bremse bei 1500 x g, 4° C und 20 min wurden die NPCs mit einer Glaspipette an jener Grenzfläche entnommen, die man als trüb braune Schicht im Röhrchen identifiziert. In einem 15 ml Reaktionsgefäß wurden die gesammelten NPCs im Waschmedium gelöst (pro Leber ein Reaktionsgefäß) und in einem letzten Schritt bei 300 x g, 4° C und 10 min zentrifugiert.

Um die Anzahl der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer feststellen zu können, wurde das Pellet in genau 1 ml Wasch- oder Kulturmedium gelöst. Insgesamt 10 µl Zellsuspension wurden 1:10 mit 90 µl Trypanblau verdünnt und dadurch gefärbt. Bei Vorliegen der Newton Interferenzfarben zwischen Zählkammer und Deckglas konnte von einer korrekten Lage ausgegangen und 10 µl gefärbte Zellsuspension in den Zwischenraum pipettiert

werden. Es wurden die 1mm² großen Felder oben rechts und unten links gezählt und die ungefähre Zell-Gesamtzellzahl errechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Zellzahl [n]} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnung}}{\text{Anzahl gezählter Quadrate}} = \frac{n \times 10^4 \times 10}{2}$$

3.8.2 Einfluss der DXM NC auf Zytokinsekretion *in vivo*

Tabelle 11: Materialien zur Erstellung der Zellkulturen

Material (alphabetisch)	Information
2-Mercaptoethanol	Firma Gibco [®] by Life Technologies 20 ml, 50mM, Lot 1667366, Lagerung 7°C
Essentielle und nicht-essentielle Aminosäuren	Firma Sigma-Aldrich [®] , M7145, Mem Non-Essential Amino Acid Solution 100x, 100 ml, Lot RNBD6813, Lagerung 7°C
HEPES Puffer	Firma Sigma-Aldrich [®] , H0887, HEPES Buffer, 100 ml, Lot RNBD6239, Lagerung 7°C
L-Glutamin	Firma Sigma-Aldrich [®] , G7516, 100ml, 200mM Lot RNBD4216, Lagerung -18°C
Na-Pyruvat	Firma Sigma-Aldrich [®] , S8636, Sodium Pyruvate 100ml, 100mM, Lot RNBD6096, Lagerung 7°C
Zellkulturplatte	Cat. No. 655 180; 96 Well Cell Culture Plate steril, F-bottom, with lid

Zur Herstellung des Kulturmediums wurde dem RPMI-1640 Medium 10% hitzeinaktiviertes FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % HEPES Puffer, 1 % essentielle und nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % Natrium-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt und bei 7° C gelagert. Erst vor Verwendung wurde 0,1 % 50 µM 2-Mercaptoethanol hinzugegeben.

Nach Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden abhängig vom Experiment pro Kavität in der Zellkulturplatte die gleiche Anzahl Zellen mit 250 µl Kulturmedium pipettiert. Zur

Stimulation der Zytokinsekretion wurden pro Kavität 2,5 µg/ml LPS und unterschiedliche Konzentrationen von DXM NC bzw. DCM sol. hinzugegeben.

Nach 20 h Inkubation im Brutschrank bei 35° C wurde pro Kavität 220 µl Überstand entnommen und im Gefrierschrank für weitere Analysen konserviert. Die dabei synthetisierten Zytokine IL-6 und TNFα wurden mittels ELISA (*Kapitel 3.10*) analysiert.

3.9 Histologie

3.9.1 Kryoschnitte

Tabelle 12: Materialien zur Erstellung der histologischen Schnitte

Material (alphabetisch)	Information
Cryomold®	O.C.T.™ Firma Sakura
Tissue-TeX®	O.C.T.™ Compound Containing 125ml Firma Sakura Lot 1526601005

Sechs Stunden nach Injektion des LPS und Gal-N wurden die Mäuse betäubt. Nach Ausbleiben der Reflexe wurde das Abdomen eröffnet, die gesamte Leber entnommen, in ein Schälchen mit Tissue-TeX ohne Lufteinschluss getaucht und bei -90° C innerhalb von 2 min schockgefroren.

Im -21° C gekühlten Schneidegerät, welches freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Schuppan (Translationale Immunologie) der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt wurde, wurde der gefrorene Leberblock mit Tissue-TeX® an die Schneideposition befestigt, und die histologischen Schnitte wurden in einer Breite von 7 µm vorgenommen. Mit Pinsel und Pinzette wurden die Kryoschnitte an Deckgläsern aufgebracht und im Gefrierschrank bei -20° C bis zur Färbung aufbewahrt.

3.9.2 Färbung apoptotischer Zellen – TUNEL Färbung

Tabelle 13: Materialien für TUNEL Assay Färbung

Material (alphabetisch)	Informationen
BSA	Bovines Albumin Serum (lyophilisiert), Firma Sigma Aldrich, ≥96 %
DNase I	1000 U (5 U/μl) Cat No. E1345-01, Lot. 101015, Lagerung -20°C
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Firma Roche Lot. 11684795910
Natriumcitrat	≥99%, frei gelöst
Objektträger	76 x 26 mm, geschnitten, Mattrand Firma Menzel-Gläser
Paraformaldehyd (PFA)	Polyoxymethylene, Puder, 95 % Firma Sigma Aldrich
Tris-HCl	pH 3,5-5,0 (0.5 M in H ₂ O), ≥ 99 % Firma Sigma Aldrich
Triton X-100TM	Firma Sigma Aldrich

Pro Gruppe wurden mehrere Schnitte angefertigt, einschließlich zwei für je eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Zirka 80 μl Fixationslösung (4 % Paraformaldehyd in PBS) wurden bei Raumtemperatur auf das Gewebe getropft und für 20 min inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte vorsichtig 30 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben für 2 min mit Permeabilisationslösung (0,1 % Triton C-100 in 0,1% Natriumcitrat) bei 4°C inkubiert. Vor der Färbung wurde zweimal mit PBS gewaschen.

Die einzelnen Färbungen wurden vorbereitet:

- TUNEL Reaktionsmischung (50 μl Enzym-Lösung + 450 μl Label-Lösung bei 4°C)
- Negativkontrolle (50 μl Label-Lösung bei 4°C)
- Positivkontrolle (300 U/ml DNase + 50mM Tris-HCl + 1 mg/ml BSA bei Raumtemperatur)

Sobald die Fläche um die Proben trocknete, wurde 50 μl Farbstoff pro Schnitt verwendet und für 60 Minuten bei 37°C in Dunkelheit und angefeuchteter Raumluft inkubiert.

Schließlich wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen und mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Als Extinktionswellenlänge wurde 481 nm und als Detektionswellenlänge 529 nm benutzt.

Pro Probe wurden aus zufällig ermittelten Flächen 10 Fotografien angefertigt und mit dem Programm ImageJ analysiert.

3.10 ELISA

Tabelle 14: Materialien für ELISA

Material (alphabetisch)	Information
Capture Antibody	Anti-Mouse IL-6 Purified (250X) Lot E053291633
Coating Buffer	10X Lot E10288-1656
Detection Antibody	Anti-Mouse IL-6 Biotin (250X) Lot E12616-102
ELISA/ELISPOT Diluent	Lot 4273480
Enzyme	Avidin-HRP (250X) Lot 4278917
Mikrotiter-Platte, 96 Kavitäten	Micoplate, 96 Well, PS, F-Bottom, High Binding Lot E15083AH
Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go!	Firma affymetrix eBioscience Lot 4288651
Standard	Mouse IL-6 Lyophilized Standard Lot 4280337
Stop Solution (Schwefelsäure)	1M H ₃ PO ₄ (Schwefelsäure) Firma Carl Roth Deutschland
Substrate	1X TMB Solution Lot E00008-1655
TWEEN® 20	Firma Sigma-Aldrich

Mit Hilfe des Protokolls des „ELISA Ready-Set-Go!“ Kits konnte der Versuchsablauf durchgeführt und beschrieben werden.

In einem ersten Schritt wurden die Mikrotiterplatten über Nacht bei 4° C in einem Kühlschrank mit einem Coating Buffer inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen, Inkubation mit Assay Diluent für eine Stunde und nochmals weiterem Waschen wurde zusätzlich neben der Standardreihe pro Kavität 50 µl bzw. 100 µl Probe pipettiert. Hierbei unterschieden sich die Proben innerhalb der jeweiligen Experimente:

- *in vitro* Versuch, um die Wirksamkeit der DXM NC zu testen
 - ⇒ Überstand aus Zellkulturen
- *in vivo* Versuch, um die Wirksamkeit der DXM NC im Mausmodell zu testen
 - ⇒ Blutplasma in einer Verdünnung 1:6

Je nach Experiment wurden die Zytokine TNF α und IL-6 gemessen. Als Standard wurde ein vom Hersteller gefriergetrockneter muriner TNF α bzw. IL-6 Standard verwendet, welcher mit 1 ml destilliertem Wasser für 15 min gelöst und in siebenmaliger Wiederholung 1:2 verdünnt wurde (500 pg/ml bis 3,91 pg/ml Standard). Um das Ergebnis als realistisch einschätzen zu können, wurden zur Überprüfung des Arbeitsablaufes je zwei Kavitäten nur mit Medium – je nach Experiment Zellkulturmedium oder PBS – oder Assay Diluent inkubiert.

Als letzte Schritte wurden die Mikrotiterplatten mit Avidin-HRP und danach mit TMB Lösung inkubiert und schließlich die Reaktion mit Schwefelsäure geblockt. Zur Detektion der Extinktion wurde im Programm der Tecan Software Magellan® eine logarithmische Standardkurve erstellt, um auch hier die Aussagekraft des Ergebnisses zu überprüfen.

3.11 Durchflusszytometrie

Tabelle 15: Materialien für Durchflusszytometrie

Material (alphabetisch)	Information
BD™ CompBeads Anti-Rat and Anti-Hamster Ig κ	Firma BD Biosciences, 6.0 ml Lot 4212929
BD™ CompBeads Negative Control	Firma BD Biosciences, 6.0 ml Lot 4212929
Human Fc-Block	privigen® 5g 100 mg/ml Infusionslösung (10 %) 1:8,3,
FACS Puffer	PBS + 2 % FCS

Mittels Durchflusszytometrie (FACS) können Zellpopulationen ermittelt und klassifiziert werden. Jede Zelle besitzt charakteristische Oberflächenrezeptoren, welche durch spezifische Antikörper gebunden werden. Die Antikörper sind mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt und werden mittels Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge detektiert.

Tabelle 16: Benutzte Antikörper zur Kategorisierung der NPCs

Spezifität (alphabetisch)	Fluorochrom	µl/Reaktionsgefäß	Klon	Isotyp	Hersteller
CD11b	PE	0,3	M1/70	Ratte / IgG2b, κ	eBiosciences
CD11c	PE	0,06	N418	Armenian hamster / IgG	eBiosciences
CD45	APC	0,02	30-F11	Ratte / IgG2b, κ	eBiosciences
F4/80	APC-Cy7	0,6	BM8	Ratte / IgG2a, κ	eBiosciences
Ly6C	V450 (PB™)	0,5	1A8	Ratte / IgG2a, κ	BD
Ly6G	FITC	0,5	1A8	Ratte / IgG2a, κ	BD

Für die Analyse der NPCs wurden in dieser Arbeit die Antikörper CD11b, CD11c, CD45, F4/80, Ly6C und Ly6G benutzt (*Tabelle 16*), die mit folgenden Fluorochromen kombiniert waren: Phycoerythrin (PE), Pacific Blue™ (PB), Allophycocyanin (APC), Allophycocyanin-Cyanin-7 (APC-Cy7) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC).

Zur Färbung der Zellen wurden zuerst 1×10^6 Zellen pro Reaktionsgefäß pipettiert, auf Eis gestellt und 10 min bei 4°C mit 300 x g zentrifugiert. Freie F_c-Fragmente wurden anschließend blockiert, damit die Antikörper nicht unspezifisch an Rezeptoren binden. Hierfür wurden die Zellen in 50 µl pro Reaktionsgefäß FACS Puffer (PBS + 2% FCS) suspendiert, mit 1,0 µl 2.4G2 (auch CD 16/32 Block) als F_c-Block vermischt und anschließend bei 4°C für 15 min inkubiert. Als nächster Schritt wurden die Zellen mit den Oberflächenmarkern und 50 µl FACS Puffer gefärbt und für 30 min bei 4°C stehen gelassen. Bevor die Messung starten konnte, wurden die Reaktionsgefäße mit 500 µl FACS Puffer pro Reaktionsgefäß gewaschen, für 10 min mit 300 x g zentrifugiert und in 300 µl FACS Puffer pro Reaktionsgefäß erneut suspendiert. Ebenfalls mussten ungefärbte und Kompensations-Reaktionsgefäße mit Ratten- und Hamsterantikörpern (pro Reaktionsgefäß ein Tropfen) vorbereitet werden, um mittels FACS Software die Proben der gefärbten Zellen mit den einzelnen Farbstoffen kalibrieren zu können.

Mittels Vorwärts- (FSC, 440 nm) und Seitwärtsstreulicht (SSC, 375 nm) ließen sich auch ungefärbte Zellen unterscheiden. Anhand der Zellgröße oder der Granularität konnten Zellpopulationen voneinander abgegrenzt und auf diese Weise beispielsweise „verklebte“ Zellen erkannt werden. Für die Messung wurden mittels der Kompensationen die idealen Spannungswerte eingestellt und mit ihnen die gefärbten Proben gemessen.

Abbildung 11 verdeutlicht die nach der Messung verwendete Gatingstrategie: Mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht werden einzelne und noch biologisch lebende Zellen erkannt. Mit Hilfe der CD45 Markierung werden nun die Leukozyten spezifischer detektiert und nach Untergruppen aufgeschlüsselt:

- Ly6G positiv: Makrophagen, Monozytäre Zellen
- Ly6G und Ly6C positiv: Neutrophile Granulozyten
- F4/80 positiv: Kupfferzellen
- CD11b: infiltrierende Zellen - Monozyten, Neutrophile Granulozyten, Natürliche Killerzellen, Granulozyten und Makrophagen

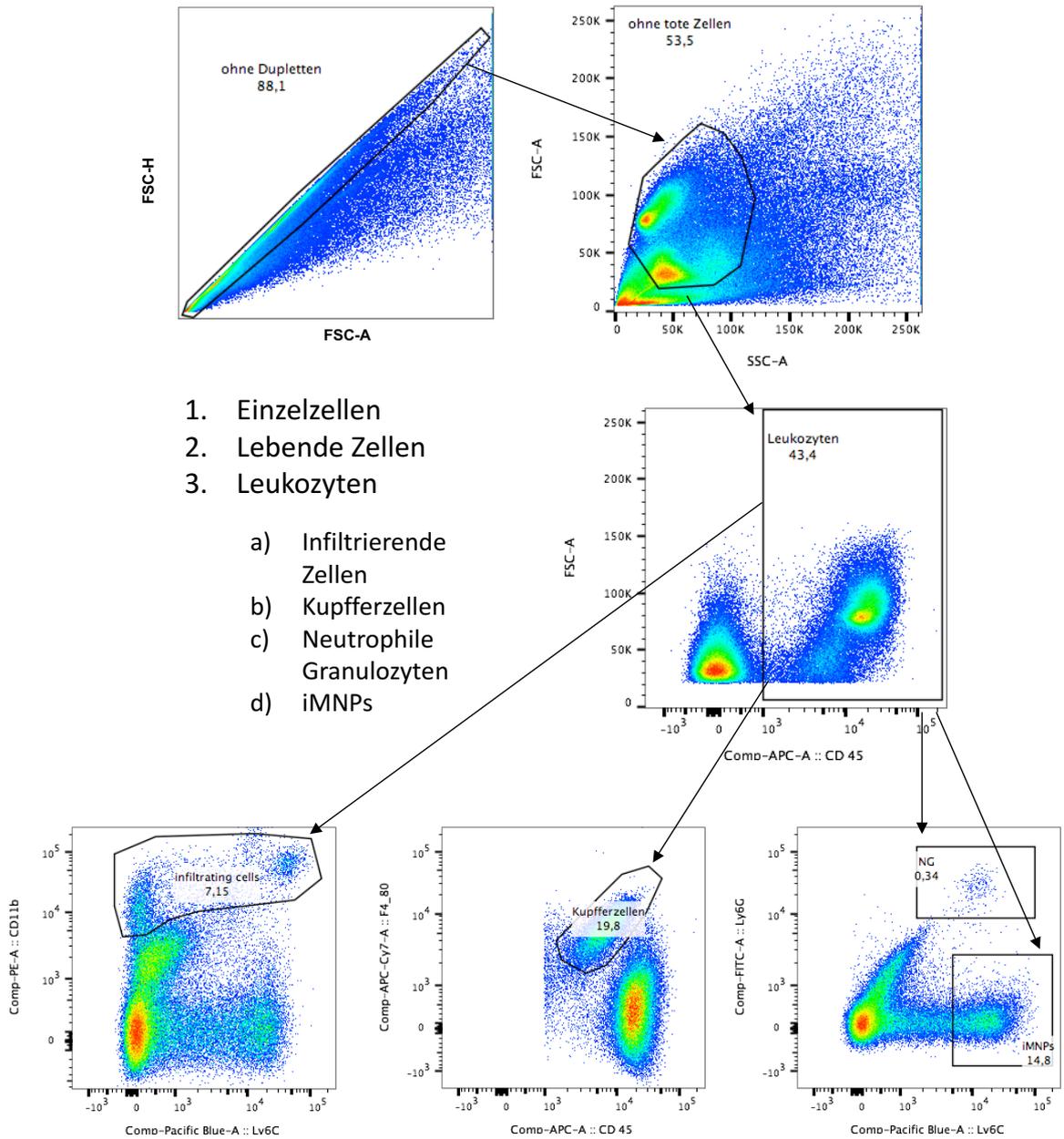


Abbildung 11: Gatingstrategie

3.12 CBA

Tabelle 17: Materialien für CBA

Material (alphabetisch)	Information
BD™ Cytometric Bead Array (CBA)	Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit Lot: 5310854, -4°C
FACS Puffer	PBS + 2% FCS

Um geringste Konzentrationen muriner Interleukine messen zu können, musste in einigen Versuchsreihen anstatt eines ELISA ein Cytometric Bead Array (CBA) durchgeführt werden. Hierbei werden fluoreszierende Beads mit spezifischen Antikörpern konjugiert, welche Zytokine in einer Probe binden, und deren Konzentration wird quantifiziert. Wenn sich daher die Probe mit unbekannter Zytokinkonzentration mit Beads und Detektorreagent verbindet, entsteht ein Sandwich-Komplex und es kann anhand der Signalstärke eine Konzentration ermittelt werden.

Das Cytometric Bead Array Kit der Firma BD wurde für die Detektion der Zytokine IL-2, IL-4, IL6, IL-10, IL-17A, IL- γ und TNF verwendet.

Die ermittelten Ergebnisse wurden mit der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software ermittelt und dokumentiert.

3.13 Zentrallabor Mainz

In Kooperation mit dem Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz wurde das in PBS verdünnte Blut der Versuchstiere auf die Transaminasen ALT und AST untersucht. Dabei wurde stets der Verdünnungsfaktor protokolliert und später mit der vom Labor ermittelten Konzentration korrigiert.

3.14 Software

Tabelle 18: Benutzte Software und Programme

Software (alphabetisch)	Information
EndNote™	X7.8, Thomson Reuters™ (New York City)
FCAP Array™	Version 3.0 Firma BD „Biosciences“
FlowJo	Version 10.1r5 für Mac OS X (Ashland, Oregon)
ImageJ	Version 2.0.0-rc-43/1.52d (Bethesda, Maryland)
Lauris Client	Swisslab® Lauris® (Schweiz)
Magellan™	Tecan Software, Forma Tecan Trading AG (Schweiz)
Microsoft® Office 365 für Mac	Version 15.31 (Redmond, Washington)
SigmaPlot	Version 11.0, Systat Software (San Jose, USA)

3.15 Statistik

In der Regel wurden die Versuche dreimal durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 11.0.

Für die statistische Auswertung wurde entweder der Student's t-Test oder der One way ANOVA Test durchgeführt. Es wurden Gruppen miteinander statistisch verglichen, eventuelle Signifikanzen ermittelt (*p < 0,5; **p < 0,1; ***p < 0,01) und in den Graphen angegeben.

4. ERGEBNISSE

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden in einem Zeitraum von 13 Monaten durch experimentelle Arbeit ermittelt und ausgewertet. Allgemein wurde eine Schadensgruppe (LPS + Gal-N) mit Therapiegruppen und Negativkontrollen durch verschiedene Methoden miteinander verglichen.

4.1 Kapseltestung *in vitro*

4.1.1 Initialer *in vitro* Test

Pro Bedingung wurden $5 \cdot 10^5/ml$ NPCs mit $2,5 \mu g/ml$ LPS stimuliert und mit DXM NC (0,24 wt%) beziehungsweise löslichem DXM als Positivkontrolle ($10 \mu M$) behandelt. $10 \mu M$ DXM sol. entsprechen $3,925 \mu g/ml$. Die Zellen inkubierten bei $37^\circ C$ im Brutschrank für 20 h. Die Zytokinkonzentration der Zellkultur wurde anschließend mit Hilfe der ELISA Methode gemessen.

Abbildung 12 zeigt, weshalb eine Stimulation mit einem Endotoxin für das gewählte Experiment als sinnvoll zu erachten ist: Durch Induktion einer vermehrten Zytokinproduktion lassen sich nach Behandlung mit Glukokortikoiden sichtbar stärkere Unterschiede feststellen. Ohne Behandlung und ohne Gabe von LPS wurde eine IL-6 Konzentration von 6 pg/ml ($\pm 1 \text{ pg/ml}$) gemessen, welche sich kaum von den behandelten Gruppen mit DXM NC unterscheidet (z.B. $2,5 \mu g/ml$ DXM NC: $c(\text{IL-6}) = 5 \text{ pg/ml}$ ($\pm 2 \text{ pg/ml}$)).

Daher konzentriert sich das weitere Vorgehen der Versuche sowie die Interpretation der Ergebnisse auf die mit LPS stimulierten NPCs.

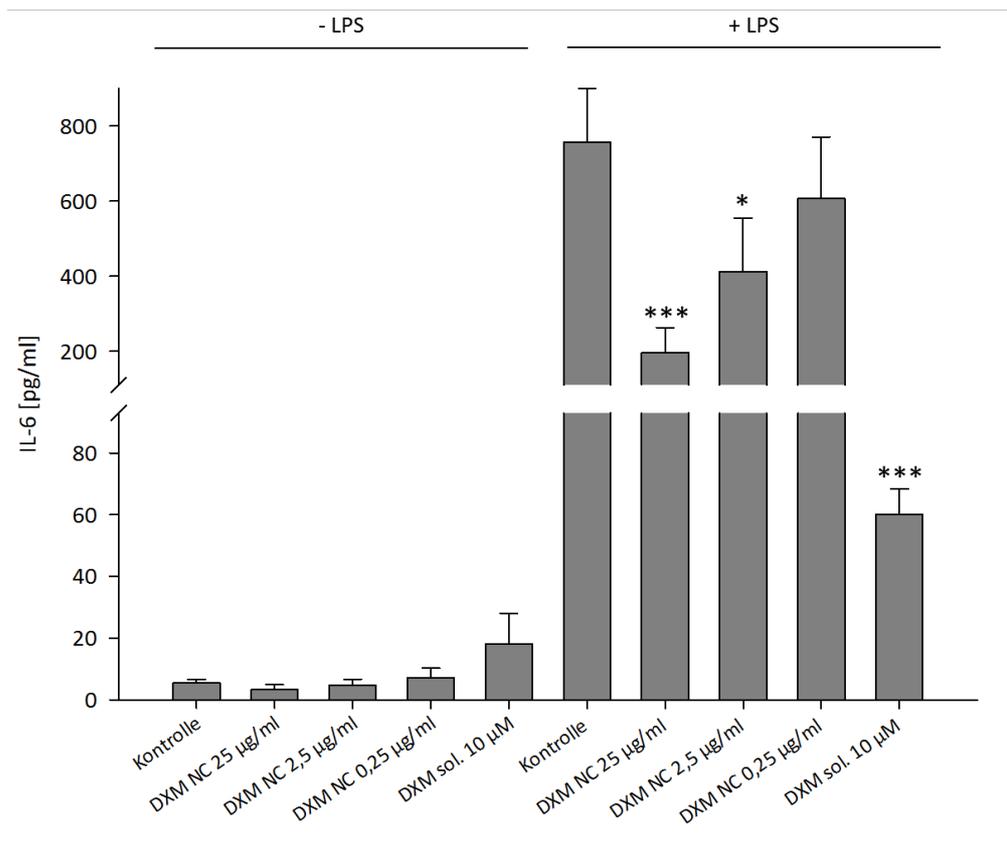


Abbildung 12: **Suppression der Zytokinantwort (IL-6) *in vitro* durch Gabe von DXM NC.** Sekretion von IL-6 mit und ohne Stimulation der NPC *in vitro*. Stimulation mit 2,5 µg/ml LPS und 3 verschiedenen DXM NC Konzentrationen (25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 0,25 µg/ml) sowie löslichem DXM (\triangleq DXM sol.) Konzentration mit 3,925 µg/ml (= 10 µM) als Positivkontrolle mit Standardabweichungen. n=4. *p < 0,5, ***p < 0,001 (One way ANOVA)

Eine zunehmende Konzentration von DXM NCs korreliert mit einer abnehmenden IL-6 Sekretion. Bei 10-facher Steigerung der DXM NC Dosis sinkt die IL-6 Sekretion um etwa ein Drittel (*Abbildung 12*). Der Suppressionseffekt mittels herkömmlichen DXM mit einer Dosis von 3,925 µg/ml war deutlich stärker ausgeprägt als mit den untersuchten DXM NC Konzentrationen. Die Konzentration des IL-6 sank um ca. 90 %.

Auch die TNF α Sekretion wurde gemessen. Allerdings fielen die Effekte deutlich geringer aus. Bei 25 µg DXM NC konnte die Konzentration um max. 30 % gesenkt werden. Geringere DXM NC Konzentrationen wiesen keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle auf. Insgesamt war die Sekretion von TNF α niedrig, sodass sich Unterschiede nach LPS Gabe nur schlecht abgrenzen ließen.

4.1.2 Ermittlung der Äquivalenzdosis und der mittleren effektiven Konzentration

Um den therapeutischen Effekt der DXM NCs und DXM sol. *in vivo* verlässlich vergleichen zu können, mussten in *in vitro* Versuchen diejenigen Dosen ermittelt werden, die einen ähnlichen Suppressionseffekt auf die Zytokin-produzierenden Zellen ausüben. Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen im Bereich von 0,3 ng/ml bis 30 µg/ml getestet.

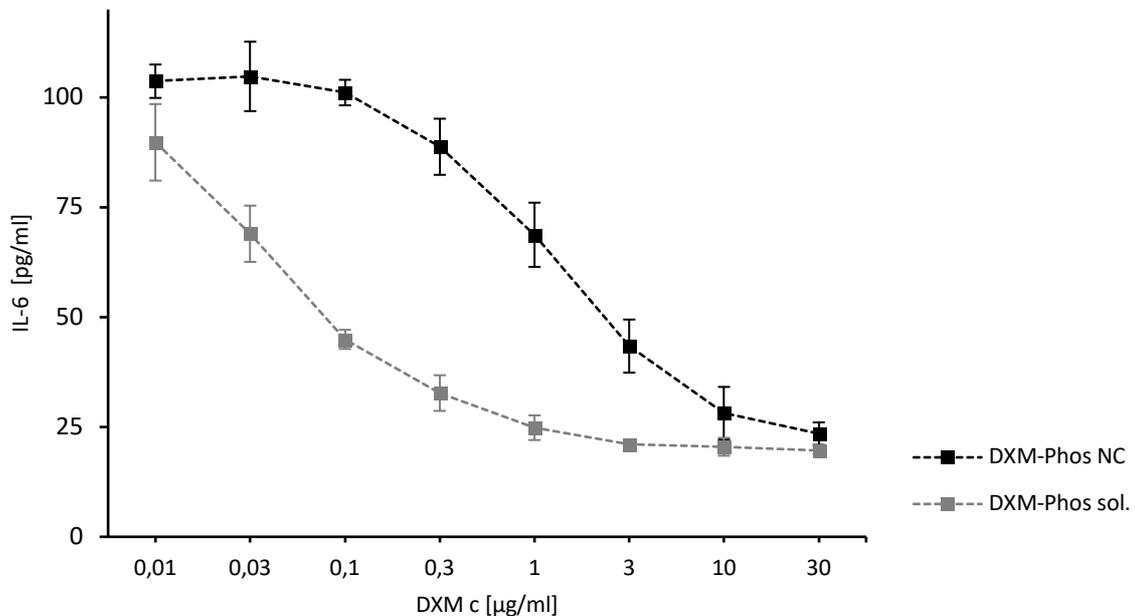


Abbildung 13: Ermittlung der Äquivalenzdosis durch Suppression der Zytokinantwort (IL-6) *in vitro* von DXM NC und DXM sol. mit verschiedenen Konzentrationen. Logarithmische Skalierung der Abszisse, Wirkungsvergleich DXM sol. (grau) im Vergleich zu DXM NC (schwarz) (0,45 wt%) mit Standardabweichungen. n=3-4.

In einer ersten Versuchsreihe wurden DXM NCs in einer Konzentration von 0,3 ng/ml bis 1 µg/ml den Zellen, die zusätzlich mit 2,5 µg/ml LPS stimuliert wurden, zugegeben. Aufgrund fehlender Suppressionsantworten wurden in weiteren Versuchen höhere Konzentrationen gewählt, welche logarithmisch ($\log_{10} 3 \approx 0,5$) aufgetragen wurden (Abbildung 13).

Als Kontrollen dienten eine Positivkontrolle mit Gabe von LPS ($c = 113 \text{ pg/ml} (\pm 4 \text{ pg/ml})$) und eine Negativkontrolle ($c = 7 \text{ pg/ml} (\pm 2 \text{ pg/ml})$). Die Kontrollen sind in Abbildung 13 nicht dargestellt.

Anhand der Messwerte liegt die mittlere effektive Konzentration (EC_{50} Wert) als arithmetisches Mittel ungefähr bei 60 pg/ml. Auch optisch lassen sich die Wendepunkte in

diesem Bereich ermitteln; eine annähernd sigmoidale Funktion ist in beiden Fällen erkennbar. Da der linke Abschnitt des Graphenplateaus des DXM sol. nicht wirklich aus *Abbildung 13* ersichtlich wird, zeigte ein anderes Experiment mit niedrigeren Konzentrationen, dass auch DXM sol. ein Konzentrationsplateau erreicht: Ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml ließ sich ein Wirkungsunterschied zwischen DXM sol. und DXM NC feststellen (*Abbildung 14*).

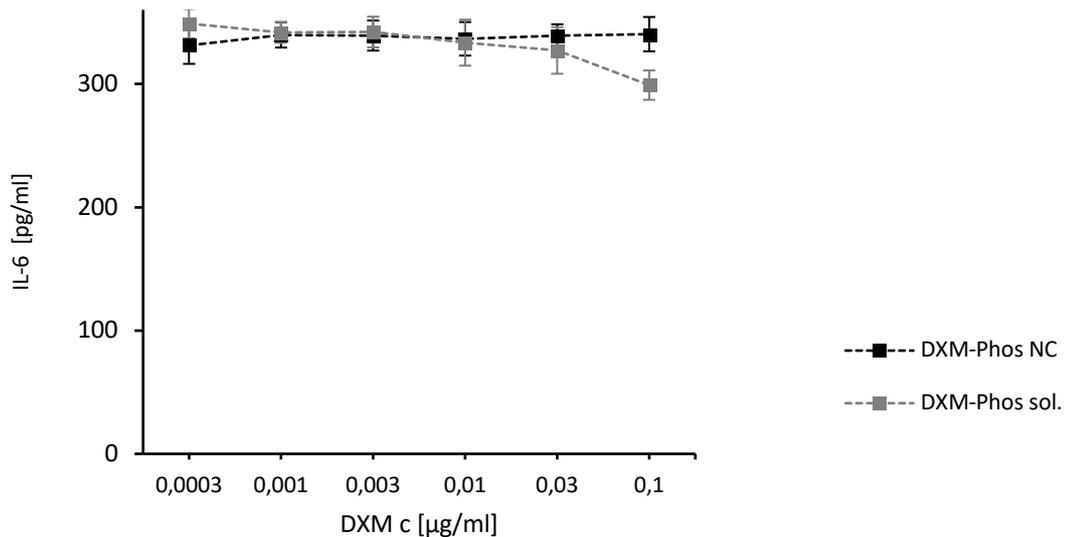


Abbildung 14: Ergänzende Kurven zu *Abbildung 13* mit niedrigeren Konzentrationen. Logarithmische Skalierung der Abszisse, DXM sol. (grau) im Vergleich zu DXM NC (schwarz) mit Standardabweichungen.

Die zu bestimmende Äquivalenzdosis kann einerseits graphisch, andererseits durch mathematische Analyse ermittelt werden.

Die IL-6 Suppressionsantworten weichen mit 0,03 µg/ml DXM sol. oder 1 µg/ml DXM NC um 0,3 % ab. Ähnliches gilt für die Konzentrationsdifferenzen zwischen 0,01 µg/ml DXM sol. und 0,3 µg/ml DXM um 1,1 % oder 0,1 µg/ml DXM sol. und 3 µg/ml DXM NC um 3 %. Aufgrund der IL-6 Konzentrationen innerhalb der Vergleichsgruppen kann auf einen Faktor von 30 geschlossen werden. Somit hat eine 30-mal höhere Konzentration von DXM NC *in vitro* einen ähnlichen Suppressionseffekt wie lösliches DXM. Die Konzentrationen dürfen nicht im Sättigungsbereich liegen.

Da dieser Versuch insgesamt dreimal im Labor durchgeführt wurde, konnte durch Ermittlung einer konvenierenden Funktion der Wendepunkt sowie eine Äquivalenzdosis um

zirka den Faktor 30 bestätigt werden. Bei späteren Experimenten wurde somit eine 30-fache Dosis an DXM NCs eingesetzt, um dem biologischen Effekt *in vitro* gerecht zu sein.

4.1.3 Vergleich der Äquivalenzdosis mit anderen DXM Kapseln

Die vom MPI hergestellten DXM NCs wiesen pro Batch eine unterschiedliche Volumenkonzentration auf. Daher wurde die Kapselwirkung mit jedem Batch erneut kontrolliert. *Abbildung 15* zeigt beispielsweise die IL-6 Sekretion eines anderen DXM NCs Batch als vorher beschrieben.

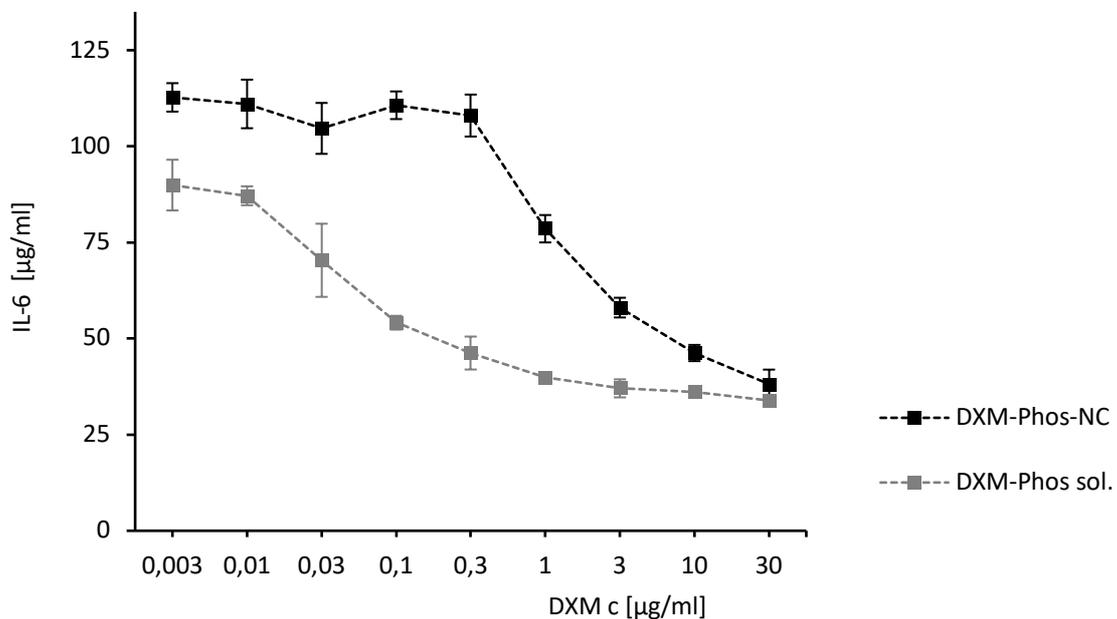


Abbildung 15: **Ermittlung der Äquivalenzdosis durch Suppression der Zytokinantwort (IL-6) *in vitro* mit anderem DXM NC Batch.** Logarithmische Skalierung der Abszisse, lösliches DXM-Phos (grau) im Vergleich zu DXM-Phos NC (schwarz) mit Standardabweichungen.

4.2 Etablierung des Schadensmodells

Mehrere Fragestellungen mussten für einen ideal gesetzten Leberschaden mittels des bakteriellen Endotoxins LPS von *E. coli* und des Aminozuckers Galactosamin (Gal-N, auch N-Acetylgalactosamin) beantwortet werden, um ein verlässliches und reproduzierbares Modell im Labor zu etablieren. Somit wurden in mehreren Versuchsdurchläufen unterschiedliche Applikationswege (intravenös und intraperitoneal) und Dosen von LPS sowie Gal-N gewählt. Als Hauptindikatoren eines gelungenen Leberschadens wurde die IL-6 Konzentrationen aus Blutplasma an unterschiedlichen Zeitpunkten mittels CBA oder ELISA sowie die Transaminase ALT im Zentrallabor Mainz bestimmt.

4.2.1 Dosisfindung *in vivo*

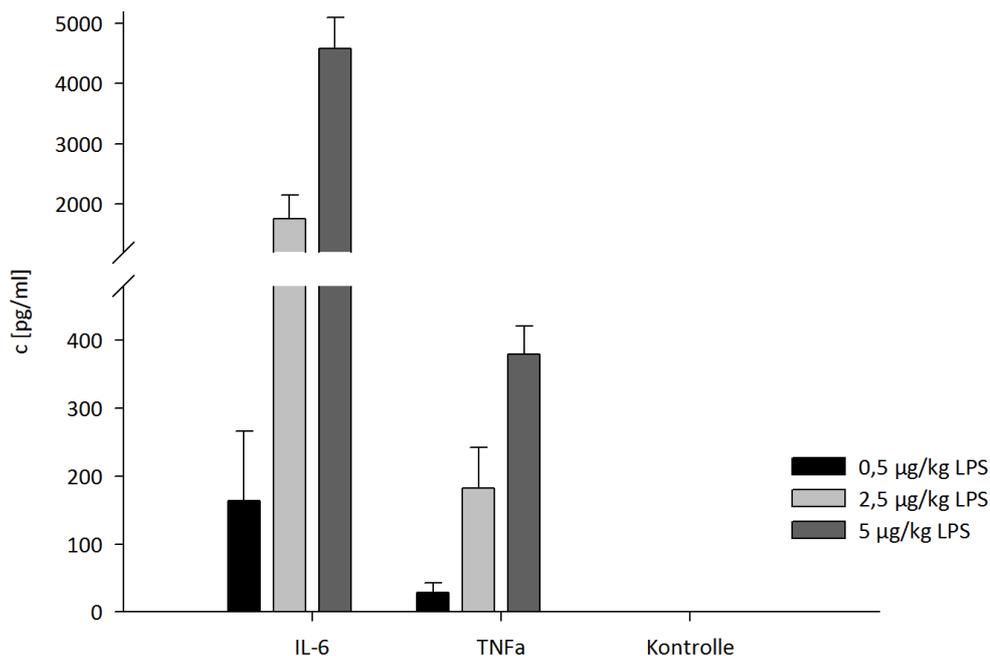


Abbildung 16: **Zytokinkonzentrationen von IL-6 und TNF α in Blutplasma nach AIH Schadenssetzung *in vivo* (t=2h).** Unterschiedliche i.v. Applikationsdosen mit 0,5 µg/kg (n=3), 2,5 µg/kg (n=2) und 5 µg/kg (n=2) LPS und jeweils 400 mg/kg Gal-N; Kontrollgruppe (n=3) unter Schwellwert und daher nicht durch CBA detektierbar.

Zur Etablierung des LPS/Gal-N Schadens wurde die Dosis gesucht, die eine ausreichende Inflammation bewirkte. Limitierende Faktoren waren u.a. eine nicht zu starke Immunantwort, um keinen unerwünschten Schock oder Sepsis-ähnlichen Zustand

auszulösen. Ebenfalls sollte das Versuchstier zur Gewinnung bestimmter Analyseparameter einen definierten Zeitraum überleben. Mittels CBA wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-6 und TNF α analysiert.

Durch Erhöhung der LPS Dosis (*Abbildung 16*) erfolgte eine vermehrte Sekretion von TNF α und IL-6: beispielsweise bewirkte ein Verfünfachen der Dosis LPS eine ca. zehnfach stärkere IL-6 Antwort und eine ca. sechsfach größere TNF α Sekretion.

In diesem Versuch überlebte jeweils eine Maus der Gruppe 250 und 500 ng/kg nicht im Zeitraum $t = 4\text{h}$ und $t = 24\text{h}$ nach Applikation des intravenösen AIH Schadens.

4.2.2 Kinetik der Zytokine *in vivo*

Um zu verstehen, welche Zytokine im verwendeten AIH Modell zu welchem Zeitpunkt produziert werden, wurde zu den Zeitpunkten $t = 0\text{h}$, $t = 1\text{h}$, $t = 2\text{h}$, $t = 4\text{h}$ und $t = 24\text{h}$ die Konzentrationen von IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A und TNF α im Blutplasma mittels CBA gemessen. Zur Setzung des Leberschadens wurde die Dosis 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS und 400 mg/kg Gal-N gewählt und den Versuchstieren intravenös appliziert. Eine Messung zum Zeitpunkt $t = 24\text{h}$ war in der Schadensgruppe nicht mehr möglich, da die Mäuse im Zeitraum zwischen 4 und 24h verstorben waren. In dieser Versuchsreihe wurden auch Gruppen etabliert, die mit DXM NCs und DXM sol. behandelt wurden.

Die Zytokinkonzentrationen zu den Zeitpunkten $t = 1\text{h}$, $t = 2\text{h}$ und $t = 4\text{h}$ geben Hinweise, inwieweit sich die Konzentrationen im Verlauf verändern (*Abbildung 17*). Bei der ersten Messung ($t = 1\text{h}$) konnte in den Gruppen AIH 5263 pg/ml (± 992 pg/ml), DXM NC 3401 pg/ml (± 1426 pg/ml) und DXM sol. 4553 pg/ml (± 1414 pg/ml) IL-6 gemessen werden.

Zum Zeitpunkt $t = 2\text{h}$ wiesen alle Gruppen die höchste Konzentration von IL-6 auf. Ohne Behandlung stieg die IL-6 Antwort um mehr als das Doppelte (268 %), wohingegen sich in den Gruppen mit DXM NC bzw. DXM sol. die Zytokinsekretion kaum vom ersten Messwert ($t=1$) unterschied. Nach 4 h sanken in allen Gruppen die IL-6 Konzentrationen.

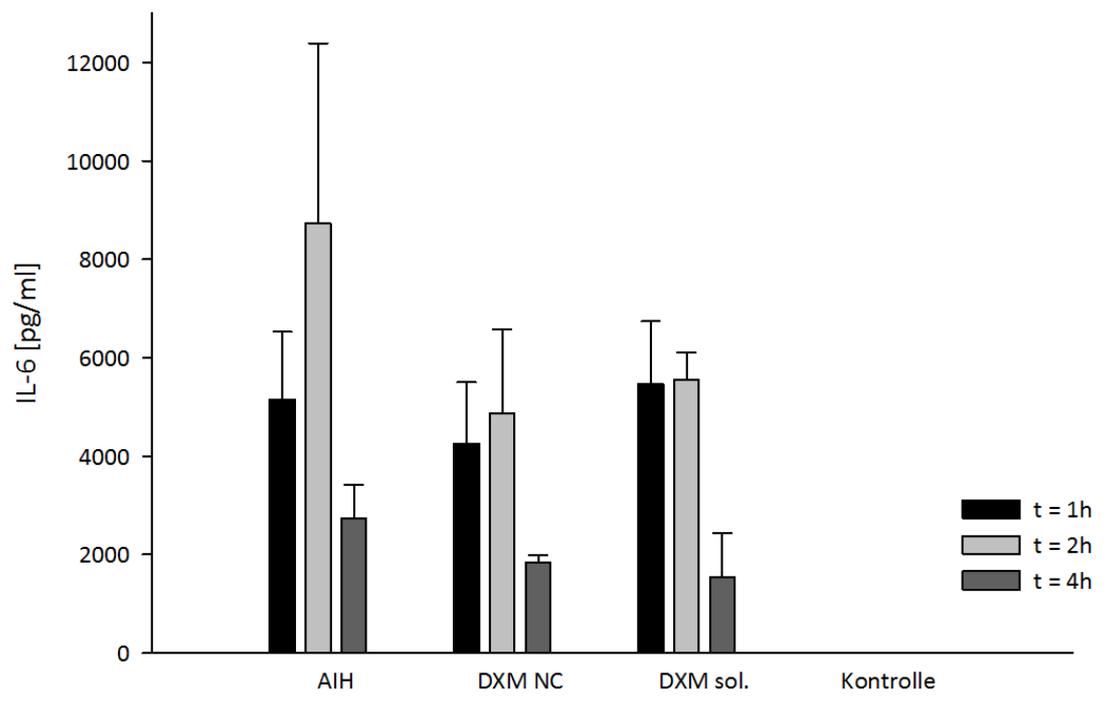


Abbildung 17: **Zytokinkonzentrationen von IL-6 in Blutplasma nach AIH Schadenssetzung *in vivo* und eventueller Behandlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten.** Suppression der IL-6 Konzentration in Blutplasma durch DXM sol. und NC zu unterschiedlichen Zeitpunkten (t=1h, t=2h, t=4h). Gabe von 5 µg/kg LPS und 400 µg/kg Gal-N intravenös zum Zeitpunkt t = 0h, AIH ohne Behandlung (n=4), 4,5 µg/kg DXM-P NC (n=5) und 0,15 µg/kg DXM-P sol. (n=4). Kontrolle (n = 2).

Der kinetische Verlauf von TNF α wies eine andere Dynamik auf (*Abbildung 18*). Die höchsten Konzentrationen konnten zum ersten Zeitpunkt (t = 1h) gemessen werden: AIH 3111 pg/ml (\pm 1444 pg/ml), DXM NC 605 pg/ml (\pm 288 pg/ml) und DXM sol. 619 pg/ml (\pm 191 pg/ml). Im Verlauf nahm in allen Versuchsgruppen die Konzentration von TNF α ab.

Im Vergleich zu IL-6 waren die Konzentrationen von TNF α in allen Gruppen geringer.

Nach 24 Stunden konnten nur geringe Zytokinkonzentration gemessen werden. Ebenfalls konnte zu geringen Teilen (n=4) IFN- γ gemessen werden mit einem Maximum in der t=4h Messung: Die unbehandelte Gruppe wies eine Konzentration von 14 pg/ml (\pm 4 pg/ml), die DXM NC 4 pg/ml (\pm 3 pg/ml) und DXM sol. 2 pg/ml (\pm 2 pg/ml) auf. Daten werden grafisch nicht gezeigt.

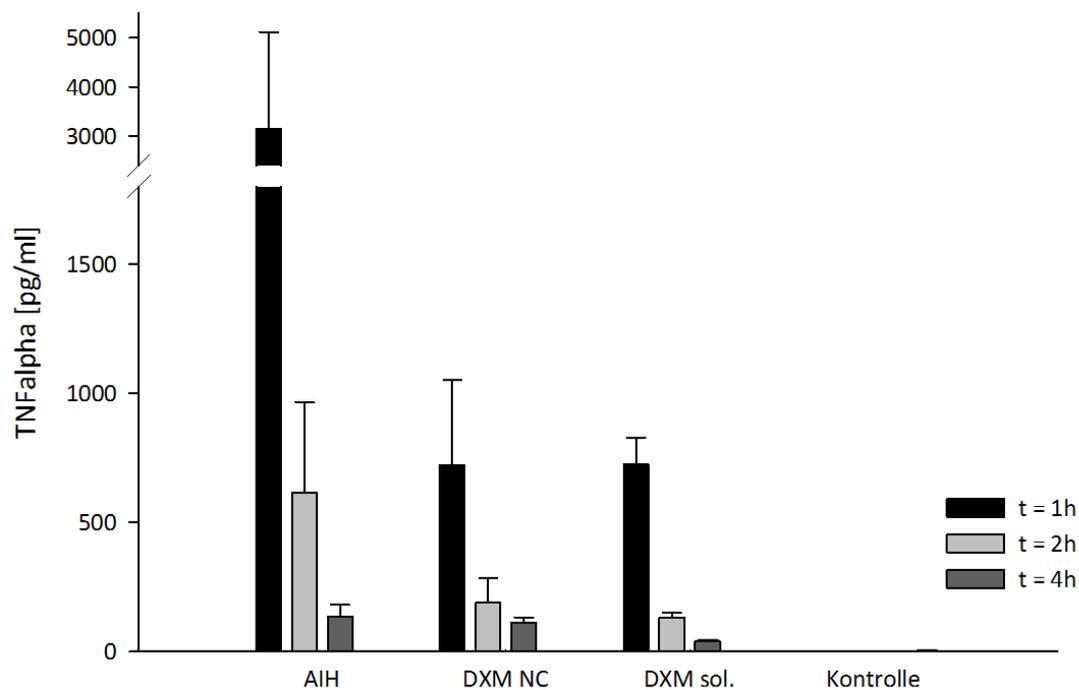


Abbildung 18: Zytokinkonzentrationen von TNF α in Blutplasma nach AIH Schadenssetzung *in vivo* und Behandlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Gabe von 5 μ g/kg LPS und 400 μ g/kg Gal-N intravenös zum Zeitpunkt t = 0h, AIH ohne Behandlung (n=4), 4,5 μ g/kg DXM-P NC (n=5), hellgrau und 0,15 μ g/kg DXM-P sol. (n=4). Kontrolle (n = 2).

4.2.3 Balance zwischen Leberschaden und Überleben

Zur Etablierung eines geeigneten und einfach durchführbaren Leberschadenmodells wurde eine Versuchsreihe mit intraperitonealen Injektionen (einfaches Handling) durchgeführt. Hierbei variierten die Konzentrationen des LPS und Gal-N. In vier Experimenten wurden die Transaminasen nach 6 Stunden über Herzpunktion bestimmt, da dies nach vorheriger Beobachtung der letzte mögliche Zeitpunkt war, bevor der Großteil der Versuchstiere verstarb:

- 100 % der Versuchstiere starben mit 10 μ g/kg LPS und 500 mg/kg Gal-N i.p. (n=4) sowie mit 5 μ g/kg LPS und 500 mg/kg Gal-N i.p. (n=4)
- 66 % mit 3 μ g/kg LPS und 300 mg/kg Gal-N i.p. (n=3)
- 33 % mit 1 μ g/kg LPS und 300 mg/kg Gal-N i.p. (n=9)

- bei niedrigeren LPS mit gleichen Gal-N Konzentrationen verstarben keine Versuchstiere. Hier konnte auch kein Blut über die Schwanzvene entnommen werden.

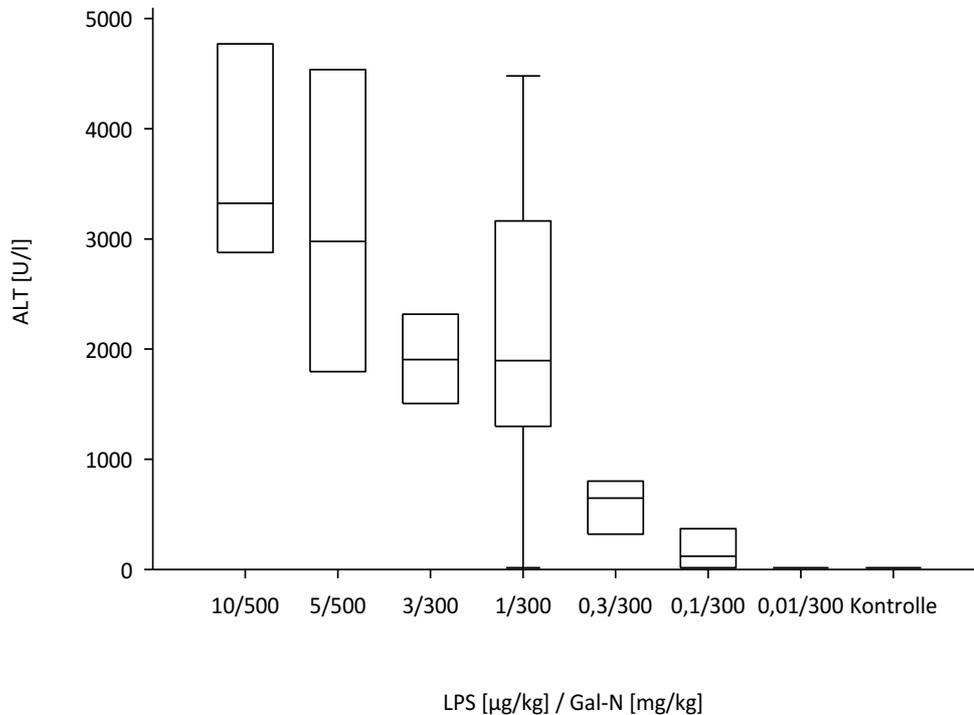


Abbildung 19: **Quantifizierung des Leberschadens mittels ALT *in vivo* durch verschiedene Konzentrationen in Blutplasma.** Intraperitoneale Applikation verschiedener Konzentrationen von LPS und Gal-N und Messung der Transaminase ALT zum Zeitpunkt t = 6h. LPS in µg/kg, Gal-N in mg/kg: 10/500 n=4; 5/500 n=4; 3/300 n=3; 1/300 n=9; 0,3/300 n=4; 0,1/300 n=5; 0,01/300 n=5. Kontrolle n=4.

Die durch den Leberschaden verursachte Transaminasenerhöhung variierte zwischen den einzelnen Konzentrationen (*Abbildung 19*): Durch 10 µg/kg LPS und 500 mg/kg Gal-N (n=4) wurde eine durchschnittliche Konzentration von 3657 U/l (± 1054 U/l) ALT und 2921 U/l (± 707 U/l) AST ermittelt, wohingegen mit 3 µg/kg LPS und 300 mg/kg Gal-N (n=3) das arithmetische Mittel bei 1909 U/l (± 405 U/l) ALT und 1639 U/l (± 157 U/l) AST und mit 1 µg/kg LPS und 300 mg/kg Gal-N (n=9) bei 2107 U/l (± 1349 U/l) ALT und 1819 U/l (± 1009 U/l) AST lag.

Der Gruppe mit gleichzeitig 100 % Überlebensrate und der höchsten Transaminasenkonzentration von durchschnittlich 590 U/l (± 267 U/l) wurden 0,3 µg/kg LPS und 300 mg/kg Gal-N injiziert. Zum Zeitpunkt t = 24h (n=4) konnten Konzentrationen von

durchschnittlich 415 U/l (\pm 243 U/l) ALT und 198 U/l (\pm 91 U/l) AST gemessen werden. Diese Gruppe wurde für das weitere Vorgehen ausgewählt, da sich durch bessere Überlebenschancen mehr Daten generieren ließen und die Werte der Transaminasen nicht zu stark erhöht waren.

0,1 μ g/kg LPS mit 300 mg/kg Gal-N verursachten, ebenso wie die Kontrollgruppe, keine ALT Erhöhung ($<$ 15 U/l (\pm 5 U/l)).

4.2.4 Cholestaseparameter

In ersten Etablierungsversuchen wurden zusätzlich zu Zytokinen und Transaminasen weitere folgende Laborparameter bestimmt:

- Gamma-Glutamyltransferase (Referenzbereich 9 – 36 U/l)
- Gesamt-Bilirubin (Referenzbereich 0,2 – 1,2 mg/dl)
- Direktes-Bilirubin (Referenzbereich $<$ 0,5 mg/dl)

Der Schaden erfolgte durch 0,05 μ g/kg, 0,5 μ g/kg bzw. 5 μ g/kg LPS und zusätzlich 400 mg/kg Gal-N intravenös (n = 5). Die Werte wurden zu den Zeitpunkten t = 24h und t = 48h gemessen. Hierbei waren die Parameter jedoch stets unter oder innerhalb des vom Mainzer Zentrallabor angegebenen Referenzbereiches. Für die weitere Etablierung des Schadensmodells der Autoimmunhepatitis wurden die Cholestaseparameter nicht mehr gemessen.

4.3 Behandlung *in vivo*

4.3.1 Überlebensrate & Verhalten

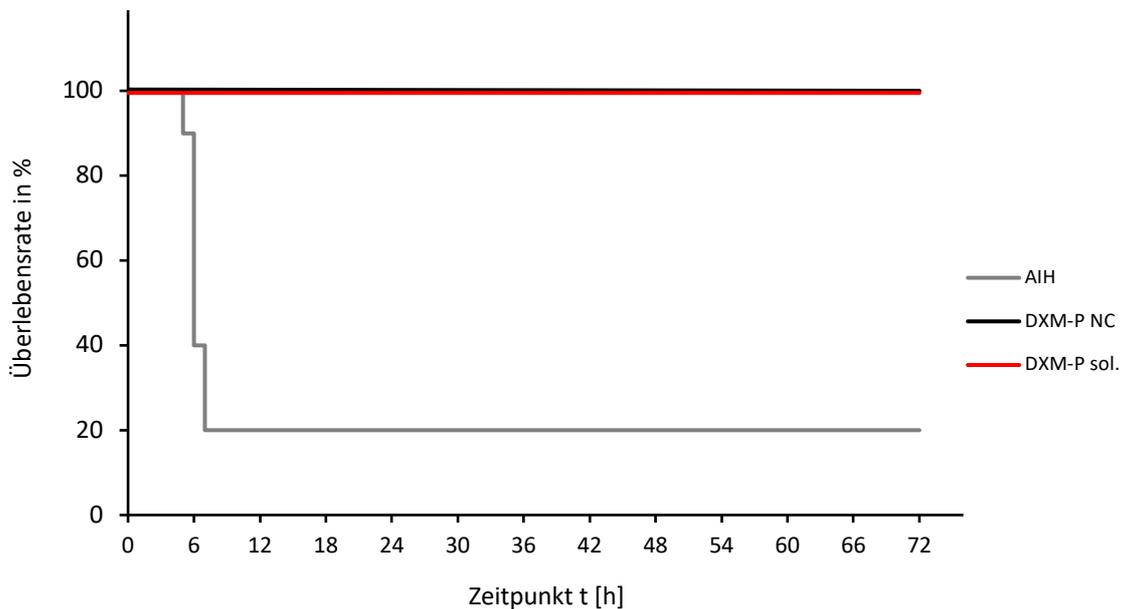


Abbildung 20: **Ermittlung der Überlebensrate mittels Kaplan-Meier-Kurve durch Leberschaden und eventueller Therapie mit DXM NC und sol.** Gabe von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS und 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Gal-N intravenös zum Zeitpunkt $t = 0\text{h}$, AIH ohne Behandlung ($n=10$, grau), 4,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DXM-P NC (0,45 $\omega\text{t}\%$, $n=9$, schwarz) und 0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DXM-P sol. ($n=9$, rot) zum Zeitpunkt $t = -0,5\text{h}$.

In einem dreitägigen *in vivo* Experiment wurden 30 Mäuse in 3 Gruppen auf ihren Todeszeitpunkt genau untersucht. Aufgrund unvollständiger Injektion wurde aus den beiden Therapiegruppen je eine Maus nicht gewertet. Vor intravenöser Applikation von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS und 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Gal-N erhielten die Mäuse der Therapiegruppen 4,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DXM NC ($n = 9$; 0,45 $\omega\text{t}\%$) bzw. 0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lösliches DXM ($n = 9$), ebenfalls intravenös. In einem vorher festgelegten Protokoll wurden die Mäuse bis $t = 8\text{h}$ engmaschig kontrolliert, anschließend wurden die Kontrollen alle 3 Stunden durchgeführt. Zwischen 309 und 415 Minuten nach Gabe des Leberschadens starben 8 der 10 unbehandelten Mäuse. Dahingegen überlebten alle behandelten Mäuse mit DXM NC und DXM sol. bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes $t = 72\text{h}$ (Abbildung 20).

Nach einem selbst entwickelten Protokoll wurde das Verhalten der Mäuse im Verlauf beobachtet und bewertet. Bei der Beobachtung wurden unter anderem folgende Kriterien beurteilt:

- Stehen die Augenlider tiefer? (Sunken Eyes)
- Wirkt das Versuchstier apathisch und weniger mobil? (Apathy)
- Liegt die Maus zusammengekrümmt? (Crouched position)

Tabelle 19: Bewertung des Verhaltens der Versuchstiere innerhalb des Versuches

Kriterium	AIH	DXM NC	DXM sol.
„Sunken Eyes“ t = 5	60 %	0 %	0 %
„Apathy“ t = 5	80 %	0 %	0 %
„Crouched position“ t = 5,5	70 %	0 %	0 %

Weitere Kriterien wie „general aggressiveness“, „increased activity“ und „extended sleeping“ wurden erhoben, konnten aber aufgrund schwieriger Abgrenzungsmöglichkeiten und subjektiver möglicher Fehlinterpretation nicht umgesetzt werden.

Zusätzlich wurde protokolliert, ob sich die Versuchstiere eher in der Gruppe oder alleine aufhalten und sich putzen. Hier konnte kein Unterschied im Verhalten beobachtet werden.

4.3.2 Behandlung *in vivo*: Transaminasen ALT und AST

30 Minuten vor Schadenssetzung wurde den Versuchstieren DXM NC oder DXM sol. intravenös injiziert ehe zum Zeitpunkt $t = 0\text{h}$ $0,3\ \mu\text{g}/\text{kg}$ LPS und $300\ \text{mg}/\text{kg}$ Gal-N intraperitoneal.

Die Ergebnisse aus fünf Versuchsreihen wurden zusammengefasst und sind als Box Plots dargestellt (Abbildung 21). Die durchschnittliche ALT (GPT) Konzentration der Schadensgruppe ($n=18$) lag bei $918\ \text{U}/\text{l}$ ($\pm 587\ \text{U}/\text{l}$), die der DXM NCs ($n=16$) $146\ \text{U}/\text{l}$ ($\pm 72\ \text{U}/\text{l}$) und DXM sol. ($n=16$) $113\ \text{U}/\text{l}$ ($\pm 71\ \text{U}/\text{l}$). Die ALT war in der Kontrollgruppe ($n=5$) nicht detektierbar ($< 15\ \text{U}/\text{l}$).

Es besteht nach statistischer Auswertung ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (DXM NC und DXM sol.) und der Schadensgruppe.

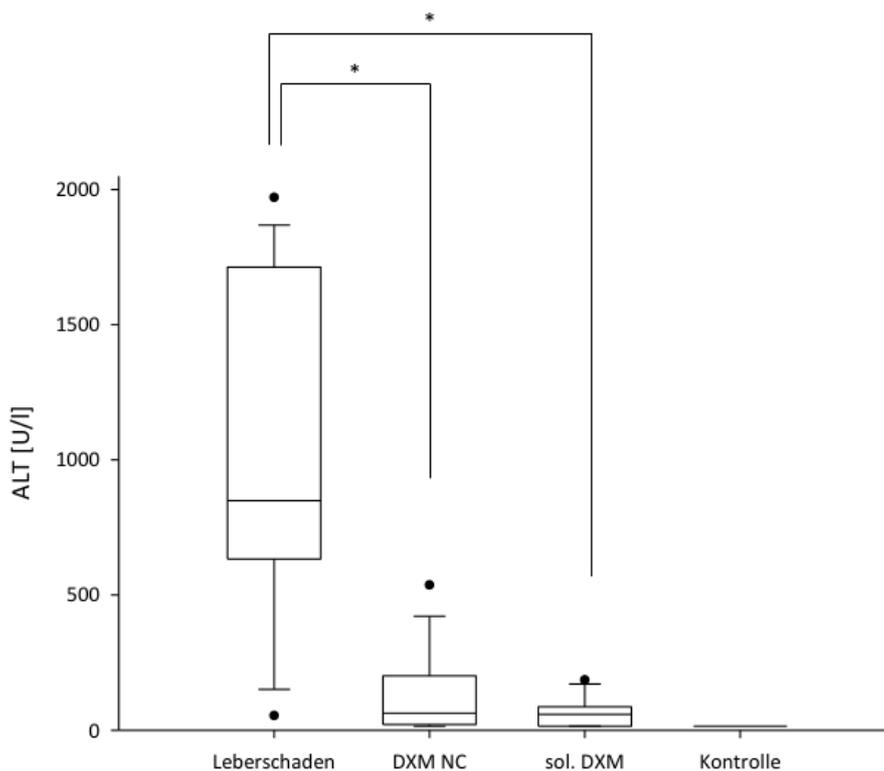


Abbildung 21: **Konzentration von ALT *in vivo* mit und ohne Behandlung durch DXM NC bzw. sol. in Blutplasma.** Transaminasenkonzentration ALT zum Zeitpunkt $t=6\text{h}$. Leberschaden (AIH) ($n=18$): $0,3\ \mu\text{g}/\text{kg}$ LPS und $300\ \text{mg}/\text{kg}$ Gal-N i.p.; DXM NC ($n=16$): AIH + $3\ \text{mg}/\text{kg}$ DXM-P NC i.v.; DXM sol. ($n=16$): AIH + $0,15\ \text{mg}/\text{kg}$ i.v. DXM sol.; Kontrolle ($n=5$). * $p < 0,05$ (One way ANOVA).

Ebenso wurde die Konzentration der Transaminase AST bestimmt und ausgewertet. Die durchschnittliche AST (oder GOT) Konzentration in der Schadensgruppe (n=18) lag bei 883 U/l (± 363 U/l), die der DXM NC (n=16) bei 295 U/l (± 193 U/l) und DXM sol. (n=16) bei 217 U/l (± 160 U/l). ALT war in der Kontrollgruppe (n=5) mit einer Konzentration von 73 U/l (± 16 U/l) detektierbar.

Aus den ermittelten Transaminasenwerten lässt sich der im klinischen Alltag häufig verwendete De-Retis-Quotient bestimmen.

$$De - Retis - Quotient = \frac{AST (GOT)}{ALT (GPT)}$$

Der Quotient erlaubt es die Schwere der Leberzellschädigung einzuschätzen: Ein Quotient über 1 deutet auf eine schwere Leberzellschädigung (Nekrosetyp) hin, wohingegen ein Quotient unter 1 auf eine leichte Leberzellschädigung hindeutet. Liegen die Transaminasen im Referenzbereich, ist ein erhöhter De-Retis-Quotient nicht aussagekräftig (Lurie et al., 2015). Aus den ermittelten Transaminasen lassen sich durch deren arithmetische Mittel folgende Quotienten generieren:

- Schadensgruppe: De-Retis-Quotient = 1,0
- DXM NC : De-Retis-Quotient = 2,0
- DXM sol. : De-Retis-Quotient = 1,9

Aufgrund nicht gemessener ALT Konzentrationen (ALT unter Messschwelle des Zentrallabors der Universitätsmedizin Mainz) kann für die Kontrollgruppe kein Quotient errechnet werden.

4.3.3 Behandlung *in vivo*: IL-6

Zusätzlich wurde mittels ELISA das Zytokin IL-6 zum Zeitpunkt t = 2h gemessen (*Abbildung 22*).

Die durchschnittliche IL-6 Konzentration der Schadensgruppe (n=12) lag bei 3382 pg/ml (± 1026 pg/ml), die der DXM NC (n=18) bei 1404 pg/ml (± 1048 pg/ml) und DXM sol. (n=18)

bei 1179 pg/ml (± 828 pg/ml). Ebenfalls konnte in der Kontrollgruppe (n=5) eine geringe Menge von IL-6 detektiert werden: 38 pg/ml (± 27 pg/ml).

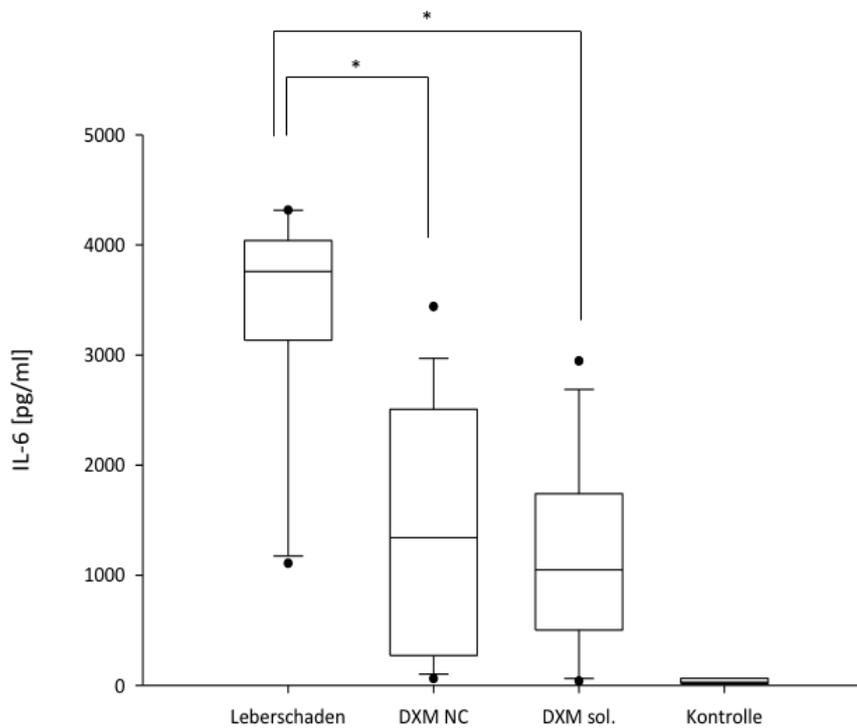


Abbildung 22: **Konzentration von IL-6 *in vivo* mit und ohne Behandlung durch DXM NC bzw. sol. in Blutplasma.** Zytokinkonzentration (IL-6) zum Zeitpunkt t = 2h. Leberschaden (AIH) (n=12): 0,3 μ g/kg LPS und 300 mg/kg Gal-N i.p.; DXM NC (n=18): AIH + 3 mg/kg DXM-P NC i.v.; DXM sol. (n=18): AIH + 0,15 mg/kg i.v. DXM sol.; Kontrolle (n=5). *p < 0,05 (One way ANOVA).

Es besteht nach statistischer Auswertung ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen und der Schadensgruppe.

4.4 Zellinfiltration

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden NPCs zum Zeitpunkt $t = 6$ h isoliert und in Medium überführt. Pro Versuchstier wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Bedingung gefärbt und analysiert.

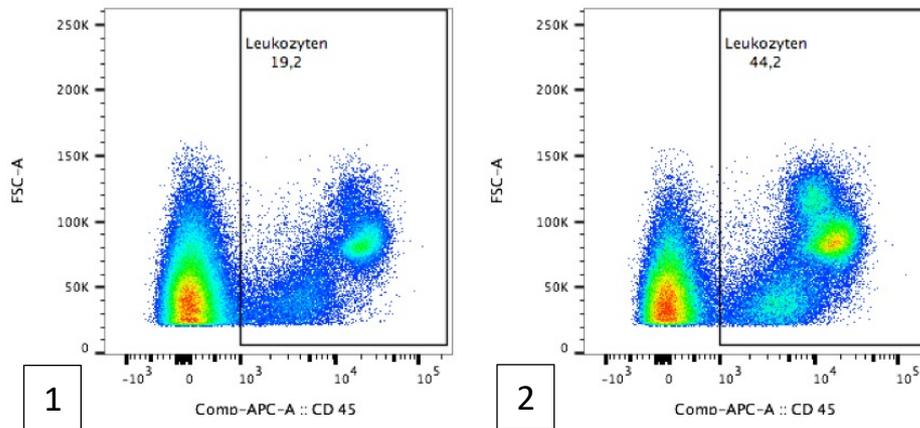


Abbildung 23: **Leukozyteninfiltration der AIH Schadensgruppe (1) und DXM NC (2) im Vergleich.** Relative Leukozyteninfiltration $CD45^+$ als FlowJo® Graphik im Vergleich.

Zuerst wurden alle $CD45^+$ Leukozyten ermittelt und ihre absolute Anzahl mit der Gesamtzellzahl verglichen. Der relative Anteil der $CD45^+$ Leukozyten war in der AIH Gruppe bei 19,7 % ($\pm 2,8$ %), in der mit DXM NC behandelten Gruppe bei 38,9 % ($\pm 7,5$ %) und in der mit löslichem DXM bei 36,9 % ($\pm 20,1$ %). Die Kontrolle lag bei 42,9 %. Damit wiesen die Therapiegruppen eine höhere relative Anzahl an $CD45^+$ Leukozyten als die unbehandelte Gruppe auf. Es konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Der $CD11b$ Rezeptor wird von verschiedenen Leukozyten exprimiert (u.a. Monozyten, Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Natürliche Killer Zellen). In der Kontrollgruppe waren 6,25 % ($\pm 0,77$ %), in der AIH Gruppe 19,2 % ($\pm 3,48$ %), in der DXM NC Gruppe 30,9 % ($\pm 2,97$ %) und in der DXM sol. Gruppe 30,33 % ($\pm 4,25$ %) $CD11b^+$. Im Vergleich zur Kontrollgruppe infiltrierten bei den beiden Therapiegruppen eine signifikant höhere Zahl $CD11b^+$ Zellen in die Leber (Abbildung 24).

Durch $Ly6G^+$ Zellen konnten inflammatorische mononukleäre Phagozyten (iMNP) klassifiziert werden: In der Kontrollgruppe wurde ein relativer Anteil von 12,3 % ($\pm 1,8$ %) und in der Schadensgruppe von 14,3 % ($\pm 2,4$ %) nachgewiesen. Der Anteil von iMNPs war

in den Therapiegruppen höher (DXM NC 23,2 % ($\pm 2,6$ %) und DXM sol. 22,5 % ($\pm 4,6$ %)), es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der DXM NC und der Kontrollgruppe ermittelt werden.

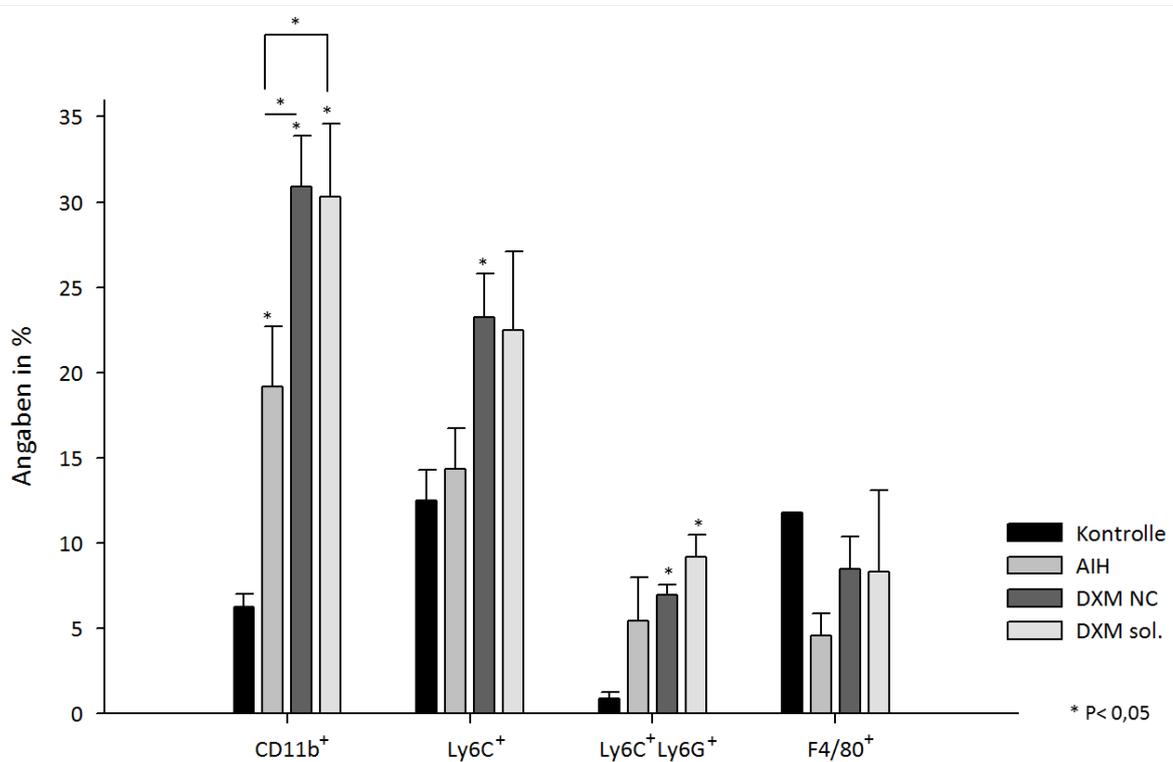


Abbildung 24: **Typisierung der Zellen und relative Quantifizierung der Zellinfiltration unterschiedlicher hepatischer Zellpopulationen.** Zeitpunkt t=6h. Leberschaden (AIH) (n=3): 0,3 µg/kg LPS und 300 mg/kg Gal-N i.p.; DXM NC (n=3): AIH + 3 mg/kg DXM-P NC i.v.; DXM sol. (n=3): AIH + 0,15 mg/kg i.v. DXM sol.; Kontrolle (n=2-3). *p < 0,05 (Student's t-Test)

Zusätzlich zu den Ly6C⁺ Zellen konnte mittels Ly6G die Gruppe der Neutrophilen Granulozyten (Ly6C⁺Ly6G⁺) detektiert werden. Hierbei waren signifikante Unterschiede zwischen den Therapiegruppen (DXM NC 6,9 % ($\pm 0,6$ %) und DXM sol. 9,2 % ($\pm 4,6$ %)), und der Kontrollgruppe (0,9 % ($\pm 0,4$ %)) vorhanden, somit war der relative Anteil dieser Zellgruppe unter Therapie deutlich größer. Es bestand kein statistischer Unterschied zwischen der Schadensgruppe (5,5 % ($\pm 2,5$ %)) und der Kontrollgruppe.

Die Quantifizierung der F4/80⁺ Kupfferzellen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Schadensgruppe wies einen relativen Anteil von 4,6 % ($\pm 1,3$ %), die DXM NC Gruppe 8,5 % ($\pm 1,9$ %) und die DXM sol. Gruppe 8,3 % ($\pm 4,8$ %) auf. Insgesamt 11,8 % der Kontrollgruppe waren F4/80 positiv.

4.5 *In Situ* Cell Death Detection

Für die histologische Analyse wurde ein Leberschaden intraperitoneal mit 0,3 µg/kg LPS und 300 mg/kg Gal-N gesetzt. Anschließend wurde eine Versuchsgruppe mit 3 mg/kg DXM NC und die andere mit 0,15 µg/kg DXM sol. therapiert.

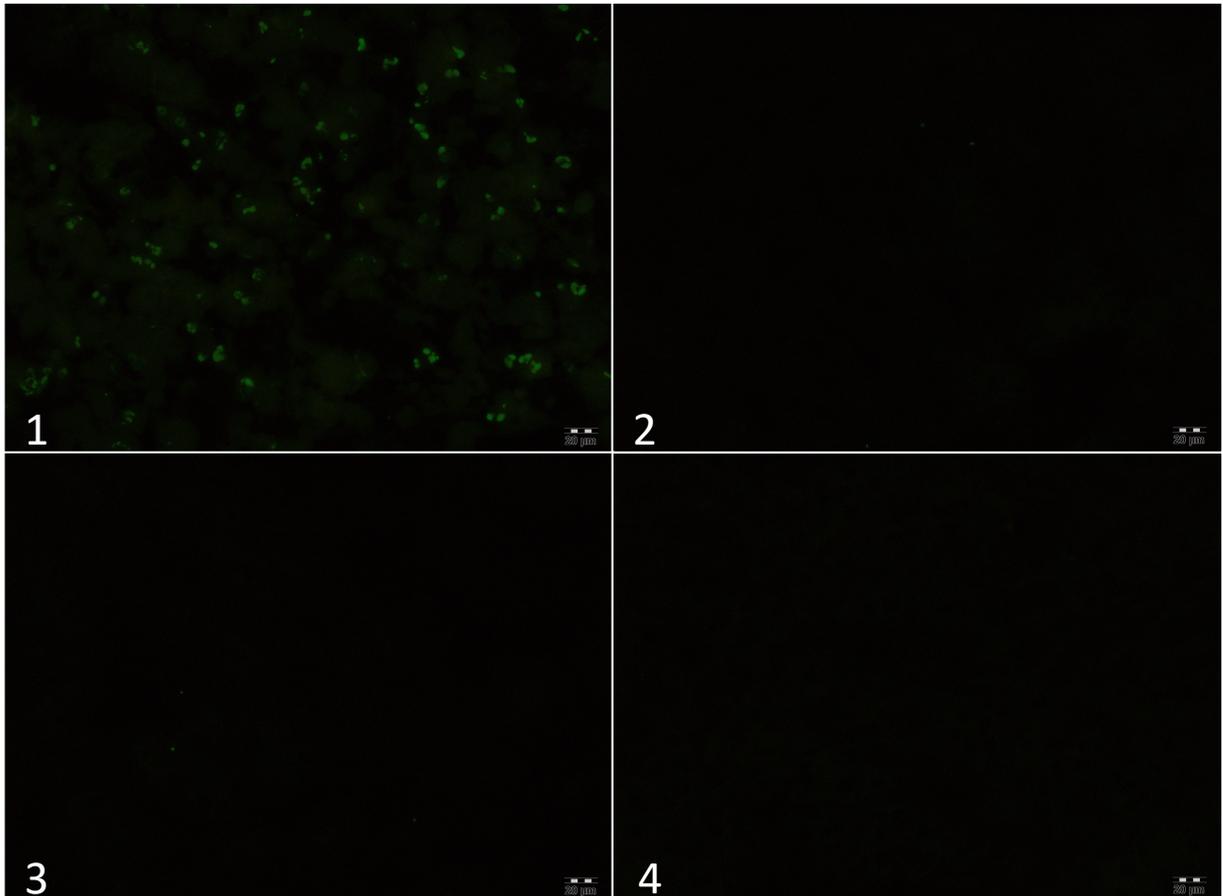


Abbildung 25: **Histologische Schnitte hepatischer Apoptose Zellen (TUNEL Färbung)**. AIH Schadenssetzung (1), Therapie mit DXM NC (2) bzw. sol. (3) und Kontrolle (4). Direct TUNEL labeling assay, Zeitpunkt $t = 6h$. Leberschaden (AIH) ($n=4$): 0,3 µg/kg LPS und 300 mg/kg Gal-N i.p. zum Zeitpunkt $t = 0h$; DXM NC ($n=4$): AIH + 3 mg/kg DXM-P NC i.v. zum Zeitpunkt $t = -0,5h$; DXM sol. ($n=4$): AIH + 0,15 mg/kg i.v. DXM sol. Zeitpunkt $t = -0,5h$; Kontrolle ($n=4$).

Es wurden mehrere histologische Kryoschnittbilder einer Leber miteinander verglichen ($n=10$) und mittels ImageJ® ausgewertet. Apoptotische Vorgänge der Zellen können optisch durch grün leuchtende Kerne erkannt werden: Bei der Methode werden freie DNA 3'OH Enden mit fluoreszierendem dUTP gefärbt. Dies ist allerdings nur bei Zellen mit kaputter Zellmembran möglich, wohingegen in nicht färbbarem Gewebe intakte Zellen vorhanden sind.

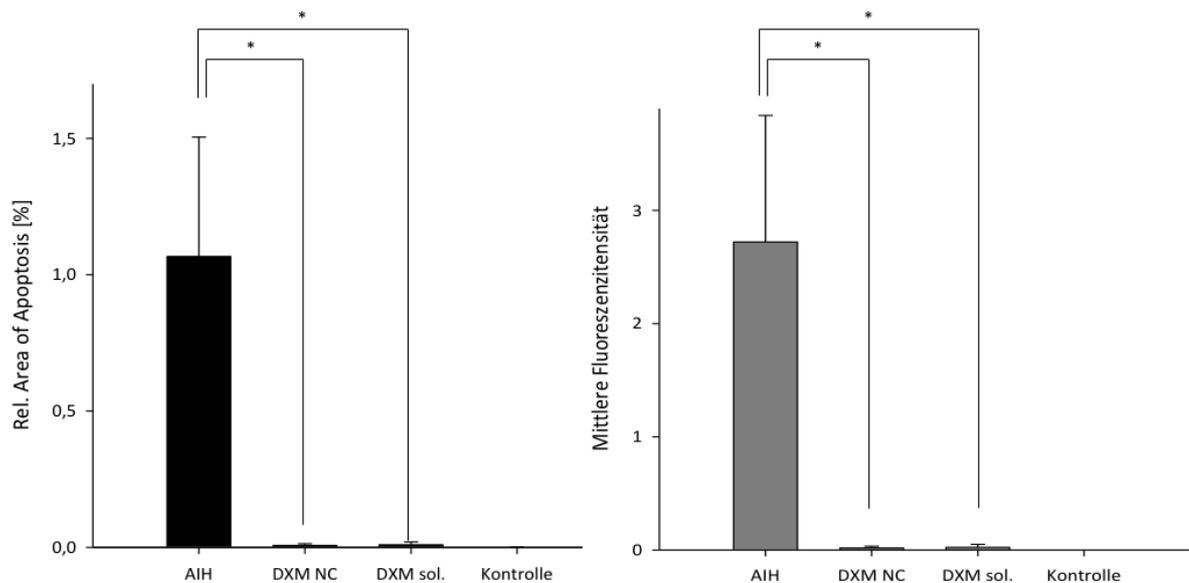


Abbildung 26: **Quantifizierung histologischer Schnittbilder nach TUNEL Färbung.** Relativer Anteil der fluoreszierenden Fläche apoptotischer Zellen (Rel. Area of Apoptosis) in Prozent und durchschnittliche Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes. AIH 0,3 µg/kg LPS + 300 mg/kg Gal-N i.p.; DXM NC: AIH + 3 mg/kg DXM-P NC i.v.; DXM sol.: AIH + 0,15 mg/kg i.v. DXM sol.; n = 10-11. Kontrolle n=5. *p < 0,05 (One way ANOVA).

Mittels ImageJ® wurde die Größe der gefärbten Fläche im Vergleich zur ungefärbten Fläche in Relation gesetzt (Relative Area of Apoptosis) und die Intensität der Farben innerhalb der einzelnen Schnitte verglichen (mittlere Fluoreszenzintensität).

Insgesamt 1,1 % ($\pm 0,4$ %) der gesamten Fläche der ausgewählten Schnitte der AIH, 0,07 % ($\pm 0,06$ ‰) der DXM Nanokapseln und 0,1 ‰ ($\pm 0,1$ ‰) der löslichen DXM Gruppe wurden angefärbt. Die Kontrolle war nicht färbbar (0,01 ‰).

Die Angabe der mittleren Fluoreszenzintensität ist ein Tool des Programmes ImageJ® ohne Einheit: die Intensität der Schadensgruppe lag bei 2,7 ($\pm 1,1$), DXM NC 0,02 ($\pm 0,02$), DXM sol. 0,02 ($\pm 0,02$). In der Kontrollgruppe konnte keine Fluoreszenzintensität gemessen werden.

4.6 *In vitro* Prüfung der Kapseldichtigkeit

In zwei separaten Experimenten wurden 2 Tage und 6 Wochen alte DXM NCs, deren zentrifugierter Überstand (15 min, 2500 x g, 4 °C), bestehend aus löslichem DXM, und deren Pellet, welcher für die Zellkultur nach Zentrifugation in Medium gelöst wurde, mit DXM sol. in ihrer biologischen Wirkung *in vitro* verglichen. Diese Experimente dienten der Prüfung der Kapseldichtigkeit. Dabei wurden die Konzentrationen 3 µg/ml, 1 µg/ml, 0,3 µg/ml und 0,1 µg/ml verwendet. Die Zellkulturen wurden für 19 Stunden im Brutschrank inkubiert. Das Zytokin IL-6 wurde mittels ELISA detektiert.

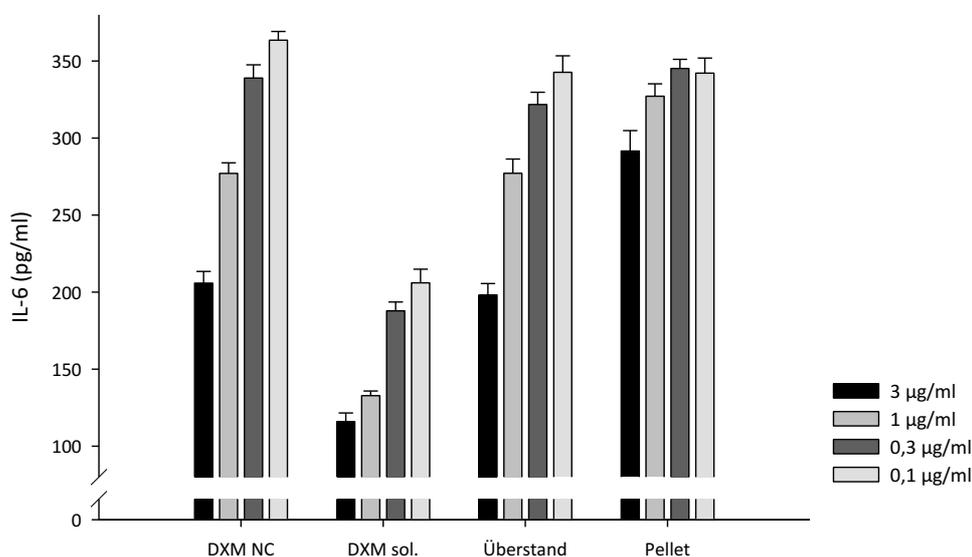


Abbildung 27: **IL-6 Suppressionsantwort 2 Tage alter DXM NCs im Vergleich zu Überstand, Pellet und DXM sol.** IL-6 Sekretion *in vitro* nach Gabe von 2 Tagen alten DXM NC (0,14%ωt), DXM sol., zentrifugiertem Überstand und Pellet. Kontrolle bei 331,9 pg/ml (\pm 4,3 pg/ml). n = 4. Keine Statistik.

Die IL-6 Sekretion der NPCs fiel geringer aus, je höher die Konzentration des verabreichten Glukokortikoids war. Ebenfalls ließ sich erneut die Äquivalenzdosis um den Faktor 30 zwischen DXM NC und DXM sol. bestätigen.

Durch die Gabe von 3 µg/ml DXM NC wurden 206 pg/ml (\pm 8 pg/ml) und von 3 µg/ml Überstand 198 pg/ml (\pm 7 pg/ml) IL-6 gemessen. Die Suppression durch das gelöste Pellet (3 µg/ml) fiel mit 292 pg/ml (\pm 13 pg/ml) IL-6 geringer aus.

Die Wirkung der DXM NC ist hierbei ähnlich der des Überstandes. Gleiches ließ sich mit älteren DXM NC nachweisen.

5. DISKUSSION

Die Untersuchung der Nanokapseln anhand eines *in vitro* und *in vivo* Modelles obliegt mehrerer Variablen, die verändert werden können. Durch verschiedene Methoden sollte der biologische Effekt der DXM NC mit der des herkömmlichen DXM verglichen werden. In der Diskussion wird zunächst auf die Limitierung des Systems (Dichtigkeit der DXM NC) und der Experimente (Variabilität der Schadensmodelle) eingegangen, deren Verlauf und Parameter in zukünftigen Untersuchungen gegebenenfalls verbessert und angepasst werden können.

Daraufhin wird die Wirksamkeit der DXM NC *in vitro* sowie *in vivo* und deren Effekte auf die Zellinfiltration sowie deren toxische Auswirkungen mit Ausblick auf eine mögliche Implementierung in den klinischen Alltag diskutiert.

5.1 Limitierung der Versuche

5.1.1 Dichtigkeit der Kapseln – andere Glukokortikoide?

Es besteht durch die experimentellen Untersuchungen die Annahme, dass die systemische Wirkung der in den Versuchen benutzten DXM NC denen des herkömmlichen DXM gleichwertig ist. Jedoch haben die letzten, für diese Arbeiten durchgeführten Versuche, den Verdacht aufgeworfen, dass die Hüllen der Nanokapseln eventuell undicht sein könnten. Hierzu wurden die DXM NC inklusive des Überstandes zentrifugiert und *in vitro* getestet (Kapitel 4.6). Unabhängig vom Alter der Kapseln zeigte die immunsuppressive Wirkung des Überstandes keinen signifikanten Unterschied zu der immunsuppressiven Wirkung der nicht zentrifugierten Nanokapseln. Der Versuch könnte jedoch dahingehend selbst limitierend sein, da durch die Zentrifugation die Kapseln den löslichen Inhalt in den Überstand abgeben. Um diese Frage weitergehend zu überprüfen, wurden im Rahmen der Dissertation durch Kollegen der Laborgruppe zwei Gruppen von Mäusen zehn Tage je DXM NC und DXM sol. intravenös appliziert und ein geringes Thymusgewicht, wie bei einer Immunsuppression erwartet, ermittelt. Dabei konnte zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied bezüglich des Thymusgewichts festgestellt werden, woraufhin sich der Verdacht, dass es Batches von DXM NC gab, die Undichtigkeiten in der Hülle aufwiesen, erhärtete.

Perspektivisch könnten durch weitere chemikalische Verfahren mit beispielsweise Filtern genauer analysiert werden, wie hoch die Konzentration des DXM im Überstand ist. Es könnten auch andere Messungen angestrebt werden, um die genaue Konzentration von Glukokortikoiden innerhalb der Nanokapseln festzustellen, die zur biologischen Wirkung beiträgt.

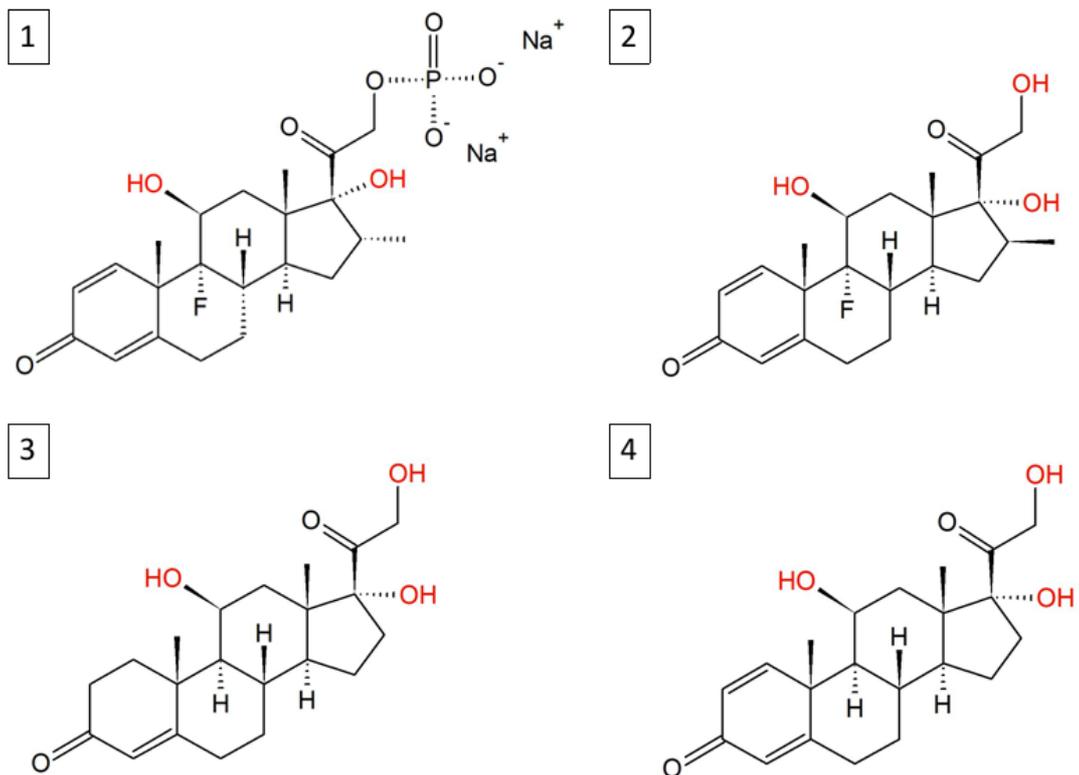


Abbildung 28: Keilstrichformeln verschiedener synthetischer Glukokortikoide mit Rot-Markierung der Hydroxylgruppen. (1) DXM 21-Phosphat-Dinatrium Salz (Fortecortin®), (2) Betamethason, (3) Hydrocortison, (4) Prednisolon

Als Erklärung für die eventuelle Undichtigkeit könnte die Betrachtung des benutzten Dexamethason-Phosphat-Moleküls dienen. DXM-P besitzt eine sekundäre und eine tertiäre Hydroxylgruppe, welche sich an der Polymerisationsreaktion mit dem Cross-Linker TDS beteiligen. Durch zwei reaktive Gruppen könnten sich möglicherweise zu wenige Moleküle untereinander vernetzen und Lücken in der Nanokapselhülle bilden (Abbildung 28). Für diese Hypothese konnten jedoch keine Belege in der Literatur gefunden werden.

Im Vergleich zu anderen Materialien, die in der Polymerchemie verwendet werden, (beispielsweise PLGA oder rekombinante Proteine) ist das DXM Molekül klein. Dies könnte ein weiterer Grund für die eventuelle Undichtigkeit der DXM NC sein. Jiang et al. zeigten beispielsweise anhand von Silika NC (SiO₂-DXM-NCs), welche DXM in Öl gelöst im Kern ausweisen, dass nach 15 Tagen 95 % des Medikamentes gehalten wurde. SiO₂-DXM-NCs können mögliche geeignete DXM Träger zu Behandlung entzündlicher Lebererkrankungen sein (Jiang et al., 2020).

Ein Lösungsvorschlag könnte eine Nanokapselsynthese mit anderen Glukokortikoiden sein. Neben DXM gäbe es beispielsweise Bethamethason, Hydrocortison oder Prednisolon, welche zusätzlich eine reaktionsfreudige primäre Hydroxylgruppe aufweisen. Dabei müsste beachtet werden, dass sich ihre biologische Wirkstärke unterscheidet. Die relative antiphlogistische Wirkung des DXM zu Cortisol beträgt 25 und ist mit der des Betamethason (=25) vergleichbar, Hydrocortison (=0,8) und Prednisolon (=4) wirken schwächer (Lüllmann et. al., 2010). Durch eine stärkere Vernetzung der Glukokortikoide in der Hülle könnte eine größere Dichte hergestellt werden. Denkbar wären auch Mischungen aus verschiedenen Glukokortikoiden, um die biologische Wirksamkeit und die gute Vernetzbarkeit mit unterschiedlichen Stoffen zu kombinieren. Interdisziplinär könnten die chemischen und biologischen Aspekte mit neuen oder modulierten Ansätzen gelöst werden. Zum Beispiel konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Deflazacort-Nanokapseln die Barrierefunktion und die entzündungshemmende Wirkung auf Lungenepithelzelllinien verbessern. Deflazacort gehört zur Gruppe der Glukokortikoide und wurde durch den biologisch abbaubaren Kunststoff Polycaprolacton in ca. 200 nm große NC enkapsuliert. *In vitro* Auflösungs tests zeigten, dass eine kontrollierte Freisetzung von Deflazacort aus den NCs eine verbesserte Wirkung auf die Zellen erklären könnte. Ebenfalls reduzierten die NC Entzündungsmarker (Rigo et al., 2017). Interessant wäre ein Ansatz, jene Kapseln mit DXM zu beladen und diese in einem AIH Modell wie in dieser Dissertation anzuwenden und diese mit den DXM NC zu vergleichen. In der Therapie der Rheumatischen Arthritis, ebenfalls eine autoimmune Erkrankung, konnten DXM NC Modelle eingesetzt werden, welche Vorteile gegenüber herkömmlichen DXM zeigten. So zeigten Crielaard et. al., dass herkömmliches DXM nach intravenöser Schadenssetzung einer Kollagen-Antikörper induzierten Arthritis nur eine kurzfristige Verringerung der klinischen Anzeichen von Arthritis hatte, wohingegen i.V. applizierte DXM beladene polymere Mizellen signifikant die klinischen Anzeichen einer Entzündung reduzieren konnten. Auch eine dauerhafte Verringerung war möglich. Die Autoren betonen den Vorteil der polymeren Mizellen zur Optimierung der Arzneimittelfreisetzungskinetik (Crielaard et al., 2012). Dieses und andere DXM beladene Systeme wie DXM PCL-PEG-Mizellen halten sich relativ lange im Blutkreislauf auf und sammeln sich überwiegend in entzündeten Gelenken an. Sie reduzieren auch die entzündliche Zytokinexpression (Wang et al., 2016). Auch DXM kombinierte Nanopartikel wie die Chitosan-Nanopartikel mit DXM und Methotraxat zeigen *in vitro* und *in vivo* Versuchen antientzündliche Effekte (Kumar et al., 2017). DXM beladene Liposomen (Dex-

Liposomen) haben in experimentellen Mausmodellen ebenfalls einen therapeutischen Effekt gezeigt: Dex-Liposomen konnten bei einer immunvermittelten akuten Hepatitis und am Wirkungsort den Schweregrad der Erkrankung, Leberverletzungen und Fibrose signifikant reduzieren (Bartneck et al., 2015).

5.1.2 Variabilität des Schadensmodells *in vivo*

Tiermodelle sind ein wichtiges Instrument, um autoimmunausgelöste Leberschäden und deren Zytokin- und Zellbeteiligungen genauer zu verstehen (Sucher et al., 2019). Die Zytokin- und Transaminasenkonzentrationen des in dieser Dissertation angewendeten Schadensmodells unterliegt nach intravenöser oder intraperitonealer Schadenssetzung mit LPS und Gal-N großen interindividuellen Schwankungen. AIH-Modelle mit LPS und anderen Hepatotoxinen wie Gal-N sind ein ubiquitär angewendetes Modell, um hepatische Entzündungen zu induzieren. Obwohl die Handhabung von LPS leicht ist, können unbeabsichtigte Variationen Ergebnisse eines bestimmten Experimentes beeinflussen (Hamesch et al., 2015). Interindividuelle Schwankungen zeigen sich auch in anderen AIH-Modellen und ähneln damit durch ihre Heterogenität der klinischen AIH (Gatselis et al., 2015).

Mit einer erhöhten Dosis von LPS konnte in dieser Arbeit eine erhöhte Zytokinkonzentration gemessen werden. So stieg beispielsweise bei einer Verzehnfachung des LPS von 0,5 µg/kg auf 5 µg/kg die Konzentration des IL-6 um ca. das 30-fache und die des TNFα um ca. das 10-fache. (*Kapitel 4.2.1*) Ebenfalls konnten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation des LPS und Gal-N unterschiedlich hohe Zytokinkonzentrationen gemessen werden. Somit wurde 1 Stunde nach Applikation des Leberschadens die höchste TNFα Konzentration und nach ca. 2 Stunden die höchste IL-6 Konzentration gemessen. (*Kapitel 4.2.2*) Diese zeitliche Dynamik der Zytokinkonzentrationen stimmte mit anderen Arbeiten überein wie beispielsweise mit der von Yoshida et al. Dort wurde durch Gabe von LPS und Gal-N bei BALB/c Mäusen die höchste TNFα Konzentration nach 1 Stunde und höchste IL-6 Konzentration nach 2 Stunden gemessen (Yoshida et al., 2007). Die Arbeitsgruppe von Yoshida et al. konnte zudem erhöhte ALT Werte erst nach 24 Stunden messen. Mit denen in dieser Dissertation verwendeten Chemikalien und C57BL/6 Mäusen wurde die höchste ALT Konzentration zum

Zeitpunkt 6 Stunden gemessen, da die meisten Versuchstiere den Zeitraum von 24 Stunden nicht überlebten. Zudem zeigten sich starke interindividuelle Schwankungen bei einer Standardabweichung von ca. 1300 IU/L (*Kapitel 4.2.3*). Eine solche interindividuelle Variabilität zeigte sich auch mit einer erhöhten Standardabweichung u.a. bei Yoshida et al. oder anderen Arbeitsgruppen (*Tabelle 20*). Ein genauer quantitativer Vergleich ist durch unterschiedliche Mausmodelle, Konzentrationen und Zeitpunkte der Zytokinmessung kaum möglich. Trotz gleicher Versuchsbedingungen und einer gezielten Applikation gab es auch, wie in dieser Arbeit, Versuchstiere, die keine erhöhte ALT Konzentration aufwiesen. Nach mehreren Wiederholungen konnte dieses Phänomen stets beobachtet werden.

Tabelle 20: Verschiedene LPS und Gal-N Konzentrationen und deren ALT Durchschnittswerte, Zusammenstellung angelehnt an (Hamesch et al., 2015).

Dosis LPS und Gal-N	ALT Konzentration U/l (Mean)	Studie
100 ng LPS und 8 mg Gal-N	~ 2100 (t=6h)	(Bahjat et al., 2000)
10 ng LPS und 8 mg Gal-N	~ 120 (t=8h)	(Wu et al., 2014)
25 ng LPS und 20 mg Gal-N	~ 3000 (t=8h)	(Yoshida et al., 2007)
10 µg/kgKG LPS und 500 mg/kgKG Gal-N	~ 1200 (t=8h)	(Yang et al., 2015b)
5mg/kg LPS und 300 mg/kgKG Gal-N	~ 5800 (t=5h)	(Hoque et al., 2014)

Die Arbeitsgruppe Abe et al. zeigte durch intravenöse Applikation von 25 ng LPS und 20 mg Gal-N nach 8 Stunden einen signifikanten Transaminasenanstieg, welcher sich im zeitlichen Verlauf reduzierte. Hier zeigten sich auch deutliche Schwankungen der ALT Werte von 1200 bis 2600 U/L. Eine signifikante Reduktion des Leberschadens konnte durch die Arbeitsgruppe mit Hilfe von Glycyrrhizin gezeigt werden (Abe et al., 2008).

Der niedrige De-Retis-Quotient = 1 (*Kapitel 4.3.2*) spricht für einen vergleichbaren hepatischen Zelluntergang der AIH und somit für ein murines AIH-Modell. Eine weitere Interpretation des Wertes ist aufgrund seiner Definition limitiert.

5.2 Effekte der DXM NC und mögliche Ausblicke

Viele Jahre nach Einführung in die klinische Praxis gehören Glukokortikoide zu den wichtigsten und meistbenutzten anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Medikamenten. Die Behandlung stößt im Rahmen von Langzeittherapien oder hoher Dosen aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen jedoch an ihre Grenzen (Strehl and Buttgerit, 2013). Könnten Glukokortikoide gezielt am Ort der Pathogenese wirken und lokal die Immunantwort supprimieren, fielen im Idealfall die systemischen Nebenwirkungen geringer aus.

5.2.1 Bedeutung der Transaminasen und Zytokin-Effekte *in vitro* und *in vivo*

In mehreren *in vivo* und *in vitro* Versuchen wurden verschiedene Konzentrationen von DXM NC eingesetzt. In verschiedenen Versuchssettings konnte meist eine geringere IL-6 Produktion nach Gabe der DXM NC gemessen werden. DXM durchdringt die Wirtszellmembran und bindet an die im Zellzytoplasma vorhandenen Glukokortikoidrezeptoren, die u.a. eine Abnahme der Gentranskription zu den proinflammatorischen Zytokinen IL-6, TNF- α und IFN- γ führen (Patel, S.K. et al., 2020).

So konnten beispielsweise 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DXM NCs *in vitro* die IL-6 und TNF α Antwort von isolierten murinen, mit LPS stimulierten NPCs signifikant um 71 % bzw. 17 % senken (Kapitel 4.1.1). Die absoluten Konzentrationen der Zytokine unterschieden sich von den publizierten Daten der eigenen Laborgruppe (Fichter et al., 2013), jedoch konnte das relative Abnehmen der Zytokinkonzentration mit steigender DXM NC Konzentration gezeigt werden. Durch das Supprimieren der IL-6 Konzentration kann auf einen biologischen Effekt der DXM NCs geschlossen werden.

Auch 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DMX NCs senken signifikant die IL-6 Konzentration. Daher ist es mit DXM NC *in vitro* möglich, die Zytokinproduktion der NPCs signifikant zu supprimieren. IL-6 ist ein löslicher Rezeptor, der unter anderem bei Entzündungen in der Leber Fibroisierung, Nekrosereaktionen und Krebsentwicklung mit beeinflusst (Del Campo et al., 2018). Es kann davon ausgegangen werden, dass sich eine geringere Konzentration proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6 oder TNF α , positiv auf die Pathogenese auswirkt. Ziel dieser Arbeit war es

zuerst, eine Modulation der Zytokinantwort durch DXM NC zu ermitteln. Perspektivisch könnten Versuchsabläufe und Detektionen anderer Zytokinkonzentrationen interessant sein, um den genauen Mechanismus der DXM NC Wirkung im biologischen System zu verstehen. Auch die Zytokinkonzentration des IFN- γ nimmt durch die Gabe von DXM NCs ab, welches einen Einfluss auf vielfältiger immunologisch relevanter Gene besitzt (Schroder et al., 2004).

In vitro supprimierten DXM NCs in einer ca. 30-fach stärkeren Konzentration als DXM sol. die Sekretion von IL-6 der isolierten murinen NPCs (*Kapitel 4.1.2*), sprich man benötigt die ca. 30-fache Konzentration der DXM NCs für einen ähnlichen Suppressionseffekt. Durch graphische Darstellung einer sigmoidalen Kurve und Ermittlung des Wendepunktes konnte dabei die effektive Dosis der DXM NC approximiert und die Äquivalenzdosis errechnet werden. Eine mögliche Erklärung für diesen hohen Faktor liegt an der Bindung und Beteiligung des DXM in der DXM NC Hülle, welches biologisch wahrscheinlich nicht aktiv ist und kaum Einfluss auf die Unterdrückung der Inflammationsantwort hat. Da die Kapseln nicht systemisch, sondern vermutlich konzentriert nur am Ort der Pathogenese wirken (Fichter et al., 2013), wird die relativ hohe Konzentration nicht als Nachteil angesehen. *In vivo* Experimente anderer NCs wie z.B. DXM in Liposomen durch *ex vivo* Analysen (Bartneck et al., 2015) oder Silika NCs durch *in vivo und ex vivo* CT-Darstellung (Jiang et al., 2020) zeigten, dass auch andere Arten von NCs in der Leber akkumulieren. In einer Studie von Violetto et. al. wurden durch *in vivo* Versuche Avidin-Nucleic-Acid-Nano-Assemblies (ANANEN) mit DXM konjugierte NCs (genannt ANANEN-Hz-Dex) getestet, welche sich, durch *ex vivo* Analysen gezeigt, gezielt in der Leber konzentrierten. Als Schadensmodell diente ein durch Injektion eines Adenovirus sogenanntes Cytochrom P450 2D6 Mausmodell, welche die Pathomechanismen der menschlichen AIH gut widerspiegelt, einschließlich erhöhter Transaminasen, Leberinfiltration und Fibrose. Die Behandlung der AIH war durch das ANANEN-Hz-Dex wirksamer als das freie Medikament, u.a. waren die plasmatischen ALT und AST Spiegel nach 6 Tagen geringer als in den Kontrollgruppen (Violatto et al., 2019). ANANEN-Hz-Dex deutet auf einen vielversprechenden Träger zur Kontrolle chronischer Leberentzündungen hin. Aufgrund des unterschiedlichen Analysezeitpunktes und etablierten Schadensmodelles lassen sich die Ergebnisse dieser Dissertation nicht quantitativ vergleichen, jedoch zeigen sich qualitativ Parallelen zu den hier genutzten DXM NCs (*Kapitel 4.3.2*). Auch hier könnte ein eventueller langsamer Abbau

der DXM NC im Leberparenchym eine langfristige Verfügbarkeit des freien Medikamentes an entsprechender Stelle garantieren.

Interessanterweise zeigen die ermittelten EC₅₀ Dosen von DXM NC und DXM sol. ähnliche Phänomene: Zum Beispiel zeigen die Transaminasen ALT und AST im Serum sowie das Zytokin IL-6 in beiden Gruppen signifikante Suppressionseffekte (*Kapitel 4.3.2 und 4.3.3*).

DXM NC zeigen nicht nur immunsuppressive Effekte *in vitro*: Anhand der signifikanten geringen Konzentration von Surrogat-Markern wie der Zytokin-Sekretion (*Kapitel 4.2.2*) von TNF- α und IL-6 (*Kapitel 4.3.3*) oder der Transaminasen-Konzentration von ALT und AST um ca. den Faktor 6 (*Kapitel 4.3.2*) kann im Vergleich zum therapierten Schaden auf einen immunsuppressiven Effekt *in vivo* geschlossen werden. Andere Arbeitsgruppen mit anderen Leber-Schadenmodellen wie z.B. mit Concanavalin A (ConA) zeigten ebenfalls geringere Serumkonzentrationen von AST und ALT (Bartneck et al., 2015).

Interessant wäre hier ein Vergleich mit einem NC DXM Träger System ohne biologisch aktives DXM. So zum Beispiel zeigte die Gruppe Bartneck et. al, dass *in vivo* applizierte Liposomen (mit und ohne DXM beladen) leicht toxische Effekte nach 24h durch erhöhte ALT sowie AST Serumkonzentration ohne vorher applizierten Schaden aufweisen.

Im Hinblick auf eine pädiatrische Anwendung wäre die Fragestellung interessant, inwieweit DXM NC bei geringeren Dosierungen, und nicht in der notwendigen 30-fachen Dosierung, in Kombination mit einer gezielten therapeutischen Anwendung *in vivo* ähnliche biologische Effekte hätte. Allgemein können pädiatrische Medikamentendosierungen nicht anhand der Erwachsenendosis herunterskaliert werden, da sich Eliminationsmechanismen nicht proportional zum Körpergewicht verhalten und sich aufgrund der unreifen Leberfunktion eines Neugeborenen der Abbauprozess von Medikamenten unterscheidet (Anderson and Holford, 2013). Hinzu kommt das Problem, dass weniger pädiatrische pharmakologische Studien als herkömmliche Medikamentenstudien durchgeführt werden, die jedoch für eine sichere Therapie erforderlich wären (Holford et al., 2013). Hierfür können Tierexperimente interessant sein, bei denen geringere Dosen von DXM NC oder jüngere Versuchstiere verwendet werden.

5.2.2 *In vivo* Überleben & geringe Toxizität der Kapseln

DXM NC und herkömmliches DXM sol. sichern bei intraperitonealer Schadenssetzung von LPS und Gal-N das Überleben für mindestens 3 Tage. Im Gegensatz dazu überleben 80 % der Versuchstiere nicht länger als 7 Stunden und 10 Minuten, die keine Behandlung mit DXM NC oder DXM sol. erhielten. Somit sicherte, nur bei Betrachtung der DXM NC, eine Therapie das Überleben. Diese primären oder „harten“ Eckpunkte verdeutlichen die Wirkung der DXM NC: Sie sichern dem Versuchstier das Überleben.

Durch Beobachten der Versuchstiere ließ sich schlussfolgern, dass bei 100 % der behandelten Tiere das Verhalten unauffällig blieb. Diese Ergebnisse zeigten, dass auch bei unverändertem Verhalten der Tiere sowie bei geringen Entzündungsparametern eine Behandlung mit DXM NC hilft. In einem größeren Versuchsansatz könnte analysiert werden, bei welcher minimalen DXM NC Dosis das Überleben nach $t = 72\text{h}$ weiterhin gesichert ist.

Aus diesem Versuch ließen sich jedoch keine eventuellen Nebenwirkungseffekte der DXM Hülle ableiten, die nach Wirken der NC intrazellulär im Organismus übrigbleiben. Ebenso konnten hier auch keine Schlussfolgerungen auf eine Langzeitapplikation der DXM NC erfolgen. Ein möglicher weiterer Versuch könnte sein, den Versuchstieren einen Schaden zu setzen und diese über mehrere Tage mit DXM NC zu therapieren. In einer Studie von Nascimento et. al. wurde ein AIH Schaden mittels Concavalin A etabliert und anschließend mit *Ascaris suum*, einem Extrakt aus dem Schweinespulwurm, therapiert. Neben einer Reduktion der Transaminasenkonzentration ALT sowie AST konnte gezeigt werden, dass Tiere ohne therapeutische Intervention eine Überlebenswahrscheinlichkeit von ca. 40 % aufwiesen. Interessanterweise unterschieden die Autoren zwischen prophylaktischer und therapeutischer Intervention: die Versuchstiere, welche 30 Minuten vor Schadenssetzung mit *Ascaris suum* behandelt wurden, überlebten vollständig, wohingegen die Gruppe, welche nach 2 Stunden therapiert wurden, nur eine Überlebenswahrscheinlichkeit von ca. 70 % aufwiesen (Nascimento et al., 2014). Die Autoren begründen dies mit einer hohen IL-10 Produktion durch das Extrakt, welche den Einstrom von Neutrophilen und pro-inflammatorischen Zytokinen hemmt. In Übertragung an das DXM NC Überlebensversuch könnten verschiedene Applikationszeitpunkte und deren Einfluss auf Zytokinsekretionen genauer untersucht werden, um die Pathomechanismen genauer zu verstehen.

Glukokortikoide beeinflussen intrazelluläre Signalwege und können Einfluss u.a. auf apoptotische Vorgänge haben (Herold and Reichardt, 2013). Weiterhin kann speziell Dexamethason bei sehr hohen Konzentrationen sogar zytotoxisch wirken, was verschiedene *in vitro* Experimente zeigten (Nestler et al., 2002).

Durch TUNEL Assay Färbung konnte an histologischen Schnitten gezeigt werden (*Kapitel 4.5*), dass durch intraperitoneale Applikation von LPS und Gal-N zur Entstehung eines akuten Leberschadens signifikant mehr apoptotische Zellen in Apoptose gehen, was sich durch weitere Studien des gleichen (Kuhla et al., 2009) (Emoto et al., 2003) oder anderen Schadensmodellen wie zum Beispiel mit Concavalin A (Lian et al., 2015) bestätigt. In den Behandlungsgruppen mit DXM NC und DXM sol. gingen kaum Hepatozyten in Apoptose. Die histologischen Untersuchungen zeigen, dass weitaus weniger Zellen mit einer Therapie von DXM NC in Apoptose gingen. Um die zellulären Mechanismen besser zu verstehen und z.B. nekrotische und apoptotische Vorgänge differenzieren, wären weitere histologische Färbungen wie z.B. mit Annexin V interessant. Dieser bietet die weitere Möglichkeit, frühe Phasen der Apoptose vor dem Verlust der Zellmembranintegrität nachzuweisen (Vermees et al., 1995).

Für eine klinische Anwendung ist diese Fragestellung von entscheidender Bedeutung, denn Eliminationsvorgänge, Abbauprodukte und Akkumulationsphänomene der Nanokapsel(-schalen) müssen verstanden werden. Zudem gibt es in der Nanotechnologie Trägersysteme wie z.B. Nanorods, welche hepatotoxisch wirken (Bartneck et al., 2015). Durch das Fehlen apoptotischer Effekte in den Therapiegruppen kann auf eine geringe Toxizität der DXM NC (-Hülle) in dem untersuchten Zeitraum geschlossen werden.

Weiterhin sollten im Idealfall keine Crosslinker-Reste des TDS in der DXM NC vorhanden sein. TDS ist potenziell toxisch und für den Organismus schädlich. Es konnte zum Beispiel anhand von Bronchialepithelzellen *in vitro* gezeigt werden, dass TDS Entzündungsreaktionen fördert und immunreaktive Produkte freisetzt (Mattoli et al., 1990). Eine genaue Titration des TDS bei der Synthese der DXM NC müsste angestrebt werden.

Zudem könnte zusätzlich durch histologische ZNS Schnitte in Betracht gezogen werden, ob die DXM NC die Blut-Hirn-Schranke überwinden und Wirkungen auf das ZNS ausüben. Anhand von Silika-Nanokapseln konnte mittels TET-CT Imaging unter anderem auch gezeigt werden, dass die DXM NC nicht im zentralen Nervensystem nachweisbar sind (Jiang et al.,

2020). Somit kann angenommen werden, dass die DXM NC die Bluthirnschranke nur im geringen Umfang oder gar nicht überwinden.

5.2.3 Einfluss der Zellinfiltration

Die behandelten Tiere wiesen eine größere signifikante, hepatische Infiltration, beispielsweise CD11b⁺ Zellen, auf. Es gibt mehrere Anzeichen, dass B-Zellen als entscheidender Regulator bei Autoimmunerkrankungen fungieren. Derzeit geht man davon aus, dass CD11b⁺ in der B-Zell-Regulierungsfunktion eine schützende Wirkung auf die experimentelle Autoimmunhepatitis hat, wie *in vitro* Studien gezeigt haben (Liu et al., 2015). Dies könnte ein Erklärungsansatz sein, dass der Anteil CD11b⁺ Zellen in den Behandlungsgruppen signifikant höher war als in der reinen Schadensgruppe und somit die regulatorische Wirkung der Leukozyten verbesserte. Mit liposomalen DXM NCs konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass diese *in vitro* die Migration von Monozyten und Makrophagen signifikant hemmen (Bartneck et al., 2014).

Die Anzahl infiltrierender Zellen wie CD11b⁺ (signifikant) oder Ly6c⁺ (nicht signifikant) der AIH Schadensgruppe war kleiner als im Vergleich zu den Behandlungsgruppen mit DXM NCs und DXM sol. Das Infiltrieren von Ly6c⁺ Zellen (Monozyten-Makrophagen) wird mit chronischen Entzündungen und Fibrogenese in Verbindung gebracht und fördert die Auflösung von Verletzungen (Tacke and Zimmermann, 2014). Durch weitere Experimente, die auf diese Dissertation aufbauen, könnten mit unterschiedlichen Dosen Infiltrationsphänomene genauer untersuchen mit der Fragestellung, ob eine erhöhte hepatische Infiltration von NPCs durch DXM NC Behandlung anders auf den Krankheitsverlauf auswirkt. Der Anteil Ly6C⁺Ly6G⁺ (Neutrophile) ist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. In einer Concavalin A (Bonder et al., 2004) oder Acetaminophen (Liu et al., 2006) induzierten Hepatitis wird der Neutrophilenrekrutierung eine wesentliche Rolle negativer Effekte für die Entwicklung einer Leberschädigung zugesprochen. Sobald Neutrophile die Leber erreichen, vermitteln sie u.a. eine oxidative Abtötung von Hepatozyten und können schwere Leberschäden mit resultierendem Leberversagen mitverursachen (Ramaiah and Jaeschke, 2007).

DXM NC werden u.a. von Kupffer-Zellen phagozytiert (Fichter et al., 2013). In der Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zellinfiltration *in vivo* der Kupffer-Zellen beobachtet werden, wie in anderen AIH Schalenmodellen mit LPS und Gal-N gezeigt wurde. Zum Beispiel zeigte die Gruppe Hoque et. al. eine erhöhte Detektion von F4/80 Zellen im Vergleich zu unbehandelten Lebern (Hoque et al., 2014).

5.3 Weitere Probleme und Herausforderungen

Die Ergebnisse dieser Dissertation deuten auf eine mögliche biologische Wirkung der DXM NC und bieten Potential, denn herkömmliches DXM, wie es derzeit in der Therapie der AIH und bei anderen autoimmunen oder chronischen Erkrankungen über einen längeren Zeitraum gegeben wird, hat beträchtliche systemische Nebenwirkungen (*Kapitel 2.2.1*). Weiterhin ist eine zu frühe Freisetzung der Wirksubstanz ein nicht zu unterschätzendes Problem (Jiang et al., 2020). Die Einfachheit des Systems, dass Kapselhülle und Inhalt aus dem gleichen Material bzw. Molekül bestehen, machen eine mögliche klinische Anwendung attraktiv: Der Organismus wäre geringeren Mengen an Patho- und Antigenen ausgesetzt, da die Hülle der DXM NC sich möglicherweise inert verhält. Weiterhin ist ein genaues Verständnis notwendig, inwieweit biologische Wechselwirkungen der DXM NC mit Plasmaproteinen des Blutes eine Rolle spielen, wofür eine neu entwickelte *Ex-vivo* Methode ein neuer möglicher Ansatz sein könnte (Simon et al., 2021).

Eine neue Anwendung erfuhr DXM auch im Rahmen der COVID-19 Therapie (Noreen et al., 2021). Es konnte in einer klinischen Studie gezeigt werden, dass niedrig dosiertes DXM von 6 mg pro Tag im Vergleich zu anderen immunmodulierenden Medikamenten wie Azathromycin, Hydroxychloroquin und Lopinavir-Ritonavir die Mortalitätsrate einer SARS-Cov-2 Infektion reduziert (Horby et al., 2020). Lösliches DXM reduzierte die Todesrate um ein Drittel bei beatmeten Patienten und um ein Fünftel bei Patienten, die Sauerstoff erhielten. Der Nutzen einer DXM Therapie war auch nach 7 Tagen nach Symptombeginn deutlich, wenn die Lungenschädigung bereits fortgeschritten war (Group et al., 2021). Bezüglich Nebenwirkungen oder Langzeitfolgen einer längeren DXM Gabe gibt es aktuell keine aussagekräftigen Studien. Im Management der COVID-19 Therapie, der AIH oder

anderer Krankheiten, in denen bereits DXM zum Einsatz kommt, könnte eine Applikationsform als NC interessant sein. Neue Anwendungsmöglichkeiten geben Potential für ein gerichtetes Targeting sowie eine Minderung der systemischen Nebenwirkungen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die langwierige Therapie der pädiatrischen Autoimmunhepatitis mittels herkömmlichen Glukokortikoiden zeigt ein großes Nebenwirkungsprofil. Durch eine gezielte Ansteuerung der Leberzellen durch Glukokortikoide erhofft man sich geringere Nebenwirkungen (Poelstra et al., 2012). Ausschlaggebend und von besonderem Interesse ist eine Behandlung mit DXM NCs, die den gleichen therapeutischen Effekt wie herkömmliches DXM erzielen, jedoch niedriger dosiert appliziert werden können. Aufgrund eines gezielten hepatischen Ansteuerns könnten auf höhere Dosen im Idealfall verzichtet werden, um gleiche therapeutische Wirkungen zu erzielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Etablierung eines AIH Schadensmodelles DXM NCs mit herkömmlichen DXM im murinen Modell an Nicht-Parenchymalen-Leberzellen (NPC) getestet und mit Hilfe von Plasmaproben, ELISA-Tests, Durchflusszytometrie, Cytometric Bead Array und Histologie analysiert.

Die DXM NCs wurden aus Fortecotin® (Dexamethason 21-Phosphat-Dinatrium) u.a. mit Hilfe von TDI (2,4-Toluen-Diisocyanat) synthetisiert und aufbereitet. Anschließend wurden deren Wirkung *in vitro* an murinen NPCs mit und ohne Stimulation mit LPS getestet. DXM NCs konnten *in vitro* die Zytokinsekretion von IL-6 und TNF- α signifikant reduzieren. Durch Konzentrationsversuche konnte eine Äquivalenzdosis um den Faktor 30 ermittelt werden, um ähnliche biologische Effekte im Vergleich zu DXM sol. zu erzielen.

Ein AIH Leberschadenmodell mit LPS und Gal-N konnte durch intraperitoneale Applikation erfolgreich etabliert werden, was durch einen Anstieg von Transaminasen und Zytokinen gezeigt wurde.

Durch eine Kaplan-Meier-Kurve und Verhaltensprotokolle konnte ein vollständiges Überleben der mit DXM NCs behandelten Versuchstiere für bis zu 3 Tage nach AIH Schadenssetzung gezeigt werden. Eine Behandlung mit DXM NCs reduzierte signifikant die Transaminasen sowie Zytokinsekretion im Vergleich zur Schadensgruppe. Ein signifikanter Vorteil bei Applikation der Äquivalenzdosis im Vergleich zu herkömmlichen DXM konnte nicht gezeigt werden.

Mittels TUNEL Assay Färbung konnte anhand eines AIH Schadens gezeigt werden, dass durch eine DXM NC Behandlung signifikant weniger Zellen in Apoptose gehen. Eine erhöhte hepatische Zellinfiltration konnte ermittelt werden. In der Schadensgruppe sowie in den Behandlungsgruppen war der Anteil u.a. von Leukozyten, inflammatorischen mononukleären Phagozyten, Neutrophilen Granulozyten sowie Kupfferzellen erhöht. Im Vergleich zur Schadensgruppe war die Infiltration von CD11b⁺ Leukozyten signifikant erhöht als im Vergleich zur Schadensgruppe.

Aus der Gesamtheit der Ergebnisse lässt sich schließen, dass die in dieser Dissertation verwendeten DXM NC einen signifikanten Einfluss auf die intrahepatische Inflamationsantwort in einem AIH Schadensmodell haben. Es wird weiterhin vermutet, dass die Toxizität der DXM NC gering ist und gegebenenfalls eine gewisse Undichtigkeit der Kapselhülle vorliegt. Anwendungen anderer Glukokortikoide zur NC Synthese sind in Betracht zu ziehen. Eine klinische Implementation zur Therapie der AIH ist weiterhin erstrebenswert, bedarf aber weiterer *in vivo* Versuche, auch mit Hilfe anderer AIH Modelle, um die Pharmakokinetik und das Targeting der DXM NC besser zu verstehen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

7.1 Literaturangaben (alphabetisch sortiert)

2003. Nanomedicine: grounds for optimism, and a call for papers. *Lancet*, 362, 673.
- ABE, K., IKEDA, T., WAKE, K., SATO, T., SATO, T. & INOUE, H. 2008. Glycyrrhizin prevents of lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury through down-regulation of matrix metalloproteinase-9 in mice. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 60, 91-97.
- AL-CHALABI, T., UNDERHILL, J. A., PORTMANN, B. C., MCFARLANE, I. G. & HENEGHAN, M. A. 2008. Impact of gender on the long-term outcome and survival of patients with autoimmune hepatitis. *J Hepatol*, 48, 140-7.
- ALVAREZ, F., BERG, P. A., BIANCHI, F. B., BIANCHI, L., BURROUGHS, A. K., CANCADO, E. L., CHAPMAN, R. W., COOKSLEY, W. G., CZAJA, A. J., DESMET, V. J., DONALDSON, P. T., EDDLESTON, A. L., FAINBOIM, L., HEATHCOTE, J., HOMBERG, J. C., HOOFNAGLE, J. H., KAKUMU, S., KRAWITT, E. L., MACKAY, I. R., MACSWEEN, R. N., MADDREY, W. C., MANNIS, M. P., MCFARLANE, I. G., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H., ZENIYA, M. & ET AL. 1999. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*, 31, 929-38.
- ANDERSON, B. J. & HOLFORD, N. H. 2013. Understanding dosing: children are small adults, neonates are immature children. *Arch Dis Child*, 98, 737-44.
- ARRAS, M., AUTENRIED, P., RETTICH, A., SPAENI, D. & RULICKE, T. 2001. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp Med*, 51, 443-56.
- AW, M. M., DHAWAN, A., SAMYN, M., BARGIOTA, A. & MIELI-VERGANI, G. 2009. Mycophenolate mofetil as rescue treatment for autoimmune liver disease in children: A 5-year follow-up. *Journal of Hepatology*, 51, 156-160.
- BADEN, L. R., EL SAHLY, H. M., ESSINK, B., KOTLOFF, K., FREY, S., NOVAK, R., DIEMERT, D., SPECTOR, S. A., ROUPHAEL, N., CREECH, C. B., MCGETTIGAN, J., KHETAN, S., SEGALL, N., SOLIS, J., BROSZ, A., FIERRO, C., SCHWARTZ, H., NEUZIL, K., COREY, L., GILBERT, P., JANES, H., FOLLMANN, D., MAROVICH, M., MASCOLA, J., POLAKOWSKI, L., LEDGERWOOD, J., GRAHAM, B. S., BENNETT, H., PAJON, R., KNIGHTLY, C., LEAV, B., DENG, W., ZHOU, H., HAN, S., IVARSSON, M., MILLER, J., ZAKS, T. & GROUP, C. S. 2021. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med*, 384, 403-416.

- BAHJAT, F. R., DHARNIDHARKA, V. R., FUKUZUKA, K., MOREL, L., CRAWFORD, J. M., CLARE-SALZLER, M. J. & MOLDAWER, L. L. 2000. Reduced susceptibility of nonobese diabetic mice to TNF-alpha and D-galactosamine-mediated hepatocellular apoptosis and lethality. *J Immunol*, 165, 6559-67.
- BAIER, G., MUSYANOVYCH, A., MAILANDER, V. & LANDFESTER, K. 2012. Performing encapsulation of dsDNA and a polymerase chain reaction (PCR) inside nanocontainers using the inverse miniemulsion process. *Int J Artif Organs*, 35, 77-83.
- BARTNECK, M., PETERS, F. M., WARZECHA, K. T., BIENERT, M., VAN BLOOIS, L., TRAUTWEIN, C., LAMMERS, T. & TACKE, F. 2014. Liposomal encapsulation of dexamethasone modulates cytotoxicity, inflammatory cytokine response, and migratory properties of primary human macrophages. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10, 1209-1220.
- BARTNECK, M., SCHEYDA, K. M., WARZECHA, K. T., RIZZO, L. Y., HITTATIYA, K., LUEDDE, T., STORM, G., TRAUTWEIN, C., LAMMERS, T. & TACKE, F. 2015. Fluorescent cell-traceable dexamethasone-loaded liposomes for the treatment of inflammatory liver diseases. *Biomaterials*, 37, 367-82.
- BHARDWAJ, U. & BURGESS, D. J. 2010. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. *Int J Pharm*, 388, 181-9.
- BOBERG, K. M., AADLAND, E., JAHNSEN, J., RAKNERUD, N., STIRIS, M. & BELL, H. 1998. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol*, 33, 99-103.
- BONDER, C. S., AJUEBOR, M. N., ZBYTNUIK, L. D., KUBES, P. & SWAIN, M. G. 2004. Essential role for neutrophil recruitment to the liver in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol*, 172, 45-53.
- BONITO, A. J., ALOMAN, C., FIEL, M. I., DANZL, N. M., CHA, S., WEINSTEIN, E. G., JEONG, S., CHOI, Y., WALSH, M. C. & ALEXANDROPOULOS, K. 2013. Medullary thymic epithelial cell depletion leads to autoimmune hepatitis. *J Clin Invest*, 123, 3510-24.
- BUSCHENFELDE, K. H., KOSSLING, F. K. & MIESCHER, P. A. 1972. Experimental chronic active hepatitis in rabbits following immunization with human liver proteins. *Clin Exp Immunol*, 11, 99-108.
- CEDERVALL, T., LYNCH, I., LINDMAN, S., BERGGARD, T., THULIN, E., NILSSON, H., DAWSON, K. A. & LINSE, S. 2007. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 2050-5.
- CHANG, E. H., HARFORD, J. B., EATON, M. A., BOISSEAU, P. M., DUBE, A., HAYESHI, R., SWAI, H. & LEE, D. S. 2015. Nanomedicine: Past, present and future - A global perspective. *Biochem Biophys Res Commun*, 468, 511-7.
- CHRISTEN, U. 2018. Animal models of autoimmune hepatitis. *Biochim Biophys Acta*.
- CHRISTEN, U. & VON HERRATH, M. G. 2004. Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. *Mol Immunol*, 40, 1113-20.
- COIMBRA, M., RIJCKEN, C. J., STIGTER, M., HENNINK, W. E., STORM, G. & SCHIFFELERS, R. M. 2012. Antitumor efficacy of dexamethasone-loaded core-crosslinked polymeric micelles. *J Control Release*, 163, 361-7.

- COUTINHO, A. E. & CHAPMAN, K. E. 2011. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335, 2-13.
- CRIELAARD, B. J., RIJCKEN, C. J. F., QUAN, L., VAN DER WAL, S., ALTINTAS, I., VAN DER POT, M., KRUIJTZER, J. A. W., LISKAMP, R. M. J., SCHIFFELERS, R. M., VAN NOSTRUM, C. F., HENNINK, W. E., WANG, D., LAMMERS, T. & STORM, G. 2012. Glucocorticoid-loaded core-cross-linked polymeric micelles with tailorable release kinetics for targeted therapy of rheumatoid arthritis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 51, 7254-7258.
- DE BOER, Y. S., VAN GERVEN, N. M., ZWIERS, A., VERWER, B. J., VAN HOEK, B., VAN ERPECUM, K. J., BEUERS, U., VAN BUUREN, H. R., DRENTH, J. P., DEN OUDEN, J. W., VERDONK, R. C., KOEK, G. H., BROUWER, J. T., GUICHELAAR, M. M., VROLIJK, J. M., KRAAL, G., MULDER, C. J., VAN NIEUWKERK, C. M., FISCHER, J., BERG, T., STICKEL, F., SARRAZIN, C., SCHRAMM, C., LOHSE, A. W., WEILER-NORMANN, C., LERCH, M. M., NAUCK, M., VOLZKE, H., HOMUTH, G., BLOEMENA, E., VERSPAGET, H. W., KUMAR, V., ZHERNAKOVA, A., WIJMENGA, C., FRANKE, L., BOUMA, G., DUTCH AUTOIMMUNE HEPATITIS STUDY, G., LIFELINES COHORT, S. & STUDY OF HEALTH IN, P. 2014. Genome-wide association study identifies variants associated with autoimmune hepatitis type 1. *Gastroenterology*, 147, 443-52 e5.
- DEL CAMPO, J. A., GALLEGO, P. & GRANDE, L. 2018. Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies. *World J Hepatol*, 10, 1-7.
- DOYLE, L. W., EHRENKRANZ, R. A. & HALLIDAY, H. L. 2010. Dexamethasone Treatment in the First Week of Life for Preventing Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants: A Systematic Review. *Neonatology*, 98, 217-224.
- DUARTE-REY, C., PARDO, A. L., RODRIGUEZ-VELOSA, Y., MANTILLA, R. D., ANAYA, J. M. & ROJAS-VILLARRAGA, A. 2009. HLA class II association with autoimmune hepatitis in Latin America: a meta-analysis. *Autoimmun Rev*, 8, 325-31.
- DUBE, A., LEMMER, Y., HAYESHI, R., BALOGUN, M., LABUSCHAGNE, P., SWAI, H. & KALOMBO, L. 2013. State of the art and future directions in nanomedicine for tuberculosis. *Expert Opin Drug Deliv*, 10, 1725-34.
- EMOTO, M., EMOTO, Y., BRINKMANN, V., MIYAMOTO, M., YOSHIZAWA, I., STABER, M., VAN ROOIJEN, N., HAMANN, A. & KAUFMANN, S. H. 2003. Increased resistance of LFA-1-deficient mice to lipopolysaccharide-induced shock/liver injury in the presence of TNF-alpha and IL-12 is mediated by IL-10: a novel role for LFA-1 in the regulation of the proinflammatory and anti-inflammatory cytokine balance. *J Immunol*, 171, 584-93.
- FELIU, N., DOCTER, D., HEINE, M., DEL PINO, P., ASHRAF, S., KOLOSNAJ-TABI, J., MACCHIARINI, P., NIELSEN, P., ALLOYEAU, D., GAZEAU, F., STAUBER, R. H. & PARAK, W. J. 2016. In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chem Soc Rev*, 45, 2440-57.
- FICHTER, M., BAIER, G., DEDTERS, M., PRETSCH, L., PIETRZAK-NGUYEN, A., LANDFESTER, K. & GEHRING, S. 2013. Nanocapsules generated out of a polymeric dexamethasone shell suppress the inflammatory response of liver macrophages. *Nanomedicine*, 9, 1223-34.
- FLOREANI, A., LIBERAL, R., VERGANI, D. & MIELI-VERGANI, G. 2013. Autoimmune hepatitis: Contrasts and comparisons in children and adults - a comprehensive review. *J Autoimmun*, 46, 7-16.

- GATSELIS, N. K., ZACHOU, K., KOUKOULIS, G. K. & DALEKOS, G. N. 2015. Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics. *World J Gastroenterol*, 21, 60-83.
- GOMEZ-GAETE, C., TSAPIS, N., BESNARD, M., BOCHOT, A. & FATTAL, E. 2007. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, 331, 153-9.
- GREGORIO, G. V., PORTMANN, B., KARANI, J., HARRISON, P., DONALDSON, P. T., VERGANI, D. & MIELI-VERGANI, G. 2001. Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: a 16-year prospective study. *Hepatology*, 33, 544-53.
- GREGORIO, G. V., PORTMANN, B., REID, F., DONALDSON, P. T., DOHERTY, D. G., MCCARTNEY, M., MOWAT, A. P., VERGANI, D. & MIELI-VERGANI, G. 1997. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology*, 25, 541-7.
- GREGORY, S. H. & WING, E. J. 2002. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *J Leukoc Biol*, 72, 239-48.
- GRONBAEK, L., VILSTRUP, H. & JEPSEN, P. 2014. Autoimmune hepatitis in Denmark: incidence, prevalence, prognosis, and causes of death. A nationwide registry-based cohort study. *J Hepatol*, 60, 612-7.
- GROUP, R. C., HORBY, P., LIM, W. S., EMBERSON, J. R., MAFHAM, M., BELL, J. L., LINSELL, L., STAPLIN, N., BRIGHTLING, C., USTIANOWSKI, A., ELMAHI, E., PRUDON, B., GREEN, C., FELTON, T., CHADWICK, D., REGE, K., FEGAN, C., CHAPPELL, L. C., FAUST, S. N., JAKI, T., JEFFERY, K., MONTGOMERY, A., ROWAN, K., JUSZCZAK, E., BAILLIE, J. K., HAYNES, R. & LANDRAY, M. J. 2021. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*, 384, 693-704.
- HAMESCH, K., BORKHAM-KAMPHORST, E., STRNAD, P. & WEISKIRCHEN, R. 2015. Lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in mice. *Lab Anim*, 49, 37-46.
- HARDTKE-WOLENSKI, M., FISCHER, K., NOYAN, F., SCHLUE, J., FALK, C. S., STAHLHUT, M., WOLLER, N., KUEHNEL, F., TAUBERT, R., MANNS, M. P. & JAECKEL, E. 2013. Genetic predisposition and environmental danger signals initiate chronic autoimmune hepatitis driven by CD4+ T cells. *Hepatology*, 58, 718-28.
- HEMENWAY, J. N., NTI-ADDAE, K., GUARINO, V. R. & STELLA, V. J. 2007. Preparation, characterization and in vivo conversion of new water-soluble sulfenamide prodrugs of carbamazepine. *Bioorg Med Chem Lett*, 17, 6629-32.
- HENNES, E. M., ZENIYA, M., CZAJA, A. J., PARES, A., DALEKOS, G. N., KRAWITT, E. L., BITTENCOURT, P. L., PORTA, G., BOBERG, K. M., HOFER, H., BIANCHI, F. B., SHIBATA, M., SCHRAMM, C., EISENMANN DE TORRES, B., GALLE, P. R., MCFARLANE, I., DIENES, H. P., LOHSE, A. W. & INTERNATIONAL AUTOIMMUNE HEPATITIS, G. 2008. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 48, 169-76.
- HERNANDEZ, H. M., KOVARIK, P., WHITINGTON, P. F. & ALONSO, E. M. 2001. Autoimmune hepatitis as a late complication of liver transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 32, 131-6.
- HEROLD, M. J. & REICHARDT, H. M. 2013. Glucocorticoid-induced apoptosis in animal models of multiple sclerosis. *Crit Rev Immunol*, 33, 183-202.

- HEYMANN, F., HAMESCH, K., WEISKIRCHEN, R. & TACKE, F. 2015. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab Anim*, 49, 12-20.
- HIEJIMA, E., KOMATSU, H., SOGO, T., INUI, A. & FUJISAWA, T. 2011. Utility of simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 52, 470-3.
- HODGINS, G. E., SALTZ, S. B., GIBBS, E. P., GONZALEZ, R., REGAN, J. & NEMEROFF, C. 2018. Steroid-Induced Psychosis in the Pediatric Population: A New Case and Review of the Literature. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 28, 354-359.
- HOLDENER, M., HINTERMANN, E., BAYER, M., RHODE, A., RODRIGO, E., HINTEREDER, G., JOHNSON, E. F., GONZALEZ, F. J., PFEILSCHIFTER, J., MANNS, M. P., HERRATH, M. & CHRISTEN, U. 2008. Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P450 2D6 by virus infection. *J Exp Med*, 205, 1409-22.
- HOLFORD, N., HEO, Y. A. & ANDERSON, B. 2013. A pharmacokinetic standard for babies and adults. *J Pharm Sci*, 102, 2941-52.
- HOQUE, R., FAROOQ, A., GHANI, A., GORELICK, F. & MEHAL, W. Z. 2014. Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology*, 146, 1763-1774.
- HORBY, P., MAFHAM, M., LINSELL, L., BELL, J. L., STAPLIN, N., EMBERSON, J. R., WISELKA, M., USTIANOWSKI, A., ELMAHI, E., PRUDON, B., WHITEHOUSE, A., FELTON, T., WILLIAMS, J., FACCENDA, J., UNDERWOOD, J., BAILLIE, J. K., CHAPPELL, L., FAUST, S. N., JAKI, T., JEFFERY, K., LIM, W. S., MONTGOMERY, A., ROWAN, K., TARNING, J., WATSON, J. A., WHITE, N. J., JUSZCZAK, E., HAYNES, R. & LANDRAY, M. J. 2020. Effect of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with COVID-19: Preliminary results from a multi-centre, randomized, controlled trial. *medRxiv*, 2020.07.15.20151852.
- HURLBURT, K. J., MCMAHON, B. J., DEUBNER, H., HSU-TRAWINSKI, B., WILLIAMS, J. L. & KOWDLEY, K. V. 2002. Prevalence of autoimmune liver disease in Alaska Natives. *Am J Gastroenterol*, 97, 2402-7.
- ICKENSTEIN, L. M. & GARIDEL, P. 2019. Lipid-based nanoparticle formulations for small molecules and RNA drugs. *Expert Opin Drug Deliv*, 16, 1205-1226.
- JIANG, S., PROZELLER, D., PEREIRA, J., SIMON, J., HAN, S., WIRSCHING, S., FICHTER, M., MOTTOLA, M., LIEBERWIRTH, I., MORSBACH, S., MAILANDER, V., GEHRING, S., CRESPIY, D. & LANDFESTER, K. 2020. Controlling protein interactions in blood for effective liver immunosuppressive therapy by silica nanocapsules. *Nanoscale*, 12, 2626-2637.
- JIMENEZ-RIVERA, C., LING, S. C., AHMED, N., YAP, J., AGLIPAY, M., BARROWMAN, N., GRAITSON, S., CRITCH, J., RASHID, M., NG, V. L., ROBERTS, E. A., BRILL, H., DOWHANIUK, J. K., BRUCE, G., BAX, K., DENEAU, M., GUTTMAN, O. R., SCHREIBER, R. A., MARTIN, S. & ALVAREZ, F. 2015. Incidence and Characteristics of Autoimmune Hepatitis. *Pediatrics*, 136, e1237-48.
- JOHNSON, P. J. & MCFARLANE, I. G. 1993. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology*, 18, 998-1005.
- KARLSEN, T. H., LAMMERT, F. & THOMPSON, R. J. 2015. Genetics of liver disease: From pathophysiology to clinical practice. *J Hepatol*, 62, S6-S14.
- KIDO, M., WATANABE, N., OKAZAKI, T., AKAMATSU, T., TANAKA, J., SAGA, K., NISHIO, A., HONJO, T. & CHIBA, T. 2008. Fatal autoimmune hepatitis

- induced by concurrent loss of naturally arising regulatory T cells and PD-1-mediated signaling. *Gastroenterology*, 135, 1333-43.
- KIM, B. H., CHOI, H. Y., KI, M., KIM, K. A., JANG, E. S. & JEONG, S. H. 2017. Population-based prevalence, incidence, and disease burden of autoimmune hepatitis in South Korea. *PLoS One*, 12, e0182391.
- KUHILA, A., EIPEL, C., ABSHAGEN, K., SIEBERT, N., MENGER, M. D. & VOLLMAR, B. 2009. Role of the perforin/granzyme cell death pathway in D-Gal/LPS-induced inflammatory liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, G1069-76.
- KUMAR, V., LEEKHA, A., TYAGI, A., KAUL, A., MISHRA, A. K. & VERMA, A. K. 2017. Preparation and evaluation of biopolymeric nanoparticles as drug delivery system in effective treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmaceutical Research*, 34, 654-667.
- LAFDIL, F., WANG, H., PARK, O., ZHANG, W., MORITOKI, Y., YIN, S., FU, X. Y., GERSHWIN, M. E., LIAN, Z. X. & GAO, B. 2009. Myeloid STAT3 inhibits T cell-mediated hepatitis by regulating T helper 1 cytokine and interleukin-17 production. *Gastroenterology*, 137, 2125-35 e1-2.
- LAMB, Y. N. 2021. BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval. *Drugs*, 81, 495-501.
- LANGER, R. & WEISSLEDER, R. 2015. Nanotechnology. *JAMA*, 313, 135-6.
- LEE, Y. M., TEO, E. K., NG, T. M., KHOR, C. & FOCK, K. M. 2001. Autoimmune hepatitis in Singapore: a rare syndrome affecting middle-aged women. *J Gastroenterol Hepatol*, 16, 1384-9.
- LEROY, C., RIGOT, J. M., LEROY, M., DECANter, C., LE MAPIHAN, K., PARENT, A. S., LE GUILLOU, A. C., YAKOUB-AGHA, I., DHARANCY, S., NOEL, C. & VANTYGHEM, M. C. 2015. Immunosuppressive drugs and fertility. *Orphanet J Rare Dis*, 10, 136.
- LETCHFORD, K. & BURT, H. 2007. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm*, 65, 259-69.
- LIAN, F., WANG, Y., XIAO, Y., WU, X., XU, H., LIANG, L. & YANG, X. 2015. Activated farnesoid X receptor attenuates apoptosis and liver injury in autoimmune hepatitis. *Molecular medicine reports*, 12, 5821-5827.
- LIARD, C., MUNIER, S., JOULIN-GIET, A., BONDUELLE, O., HADAM, S., DUFFY, D., VOGT, A., VERRIER, B. & COMBADIÈRE, B. 2012. Intradermal immunization triggers epidermal Langerhans cell mobilization required for CD8 T-cell immune responses. *J Invest Dermatol*, 132, 615-25.
- LIBERAL, R., KRAWITT, E. L., VIERLING, J. M., MANNs, M. P., MIELI-VERGANI, G. & VERGANI, D. 2016. Cutting edge issues in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun*.
- LIBERAL, R., LONGHI, M. S., GRANT, C. R., MIELI-VERGANI, G. & VERGANI, D. 2012. Autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10, 346-53.
- LIBERAL, R., LONGHI, M. S., MIELI-VERGANI, G. & VERGANI, D. 2011. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 25, 653-64.
- LIBERAL, R., VERGANI, D. & MIELI-VERGANI, G. 2015. Update on Autoimmune Hepatitis. *J Clin Transl Hepatol*, 3, 42-52.
- LISZIEWICZ, J. & TOKE, E. R. 2013. Nanomedicine applications towards the cure of HIV. *Nanomedicine*, 9, 28-38.

- LIU, X., JIANG, X., LIU, R., WANG, L., QIAN, T., ZHENG, Y., DENG, Y., HUANG, E., XU, F., WANG, J. Y. & CHU, Y. 2015. B cells expressing CD11b effectively inhibit CD4⁺ T-cell responses and ameliorate experimental autoimmune hepatitis in mice. *Hepatology*, 62, 1563-75.
- LIU, X. M., QUAN, L. D., TIAN, J., LAQUER, F. C., CIBOROWSKI, P. & WANG, D. 2010. Syntheses of click PEG-dexamethasone conjugates for the treatment of rheumatoid arthritis. *Biomacromolecules*, 11, 2621-8.
- LIU, Z. X., HAN, D., GUNAWAN, B. & KAPLOWITZ, N. 2006. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*, 43, 1220-30.
- LOHSE, A. W. 2011. Recognizing autoimmune hepatitis: scores help, but no more. *J Hepatol*, 54, 193-4.
- LURIE, Y., WEBB, M., CYTTER-KUINT, R., SHTEINGART, S. & LEDERKREMER, G. Z. 2015. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 21, 11567-83.
- LYSENG-WILLIAMSON, K. A., DUGGAN, S. T. & KEATING, G. M. 2013. Pegylated Liposomal Doxorubicin: A Guide to Its Use in Various Malignancies. *BioDrugs*, 27, 533-540.
- MANNS, M. P., CZAJA, A. J., GORHAM, J. D., KRAWITT, E. L., MIELI-VERGANI, G., VERGANI, D., VIERLING, J. M. & AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, D. 2010a. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 51, 2193-213.
- MANNS, M. P., LOHSE, A. W. & VERGANI, D. 2015. Autoimmune hepatitis--Update 2015. *J Hepatol*, 62, S100-11.
- MANNS, M. P., WOYNAROWSKI, M., KREISEL, W., LURIE, Y., RUST, C., ZUCKERMAN, E., BAHR, M. J., GÜNTHER, R., HULTCRANTZ, R. W., SPENGLER, U., LOHSE, A. W., SZALAY, F., FÄRKILÄ, M., PRÖLS, M. & STRASSBURG, C. P. 2010b. Budesonide Induces Remission More Effectively Than Prednisone in a Controlled Trial of Patients With Autoimmune Hepatitis. *Gastroenterology*, 139, 1198-1206.
- MATTOLI, S., MASIERO, M., CALABRÒ, F., MEZZETTI, M., PLEBANI, M. & ALLEGRA, L. 1990. Eicosanoid release from human bronchial epithelial cells upon exposure to toluene diisocyanate in vitro. *J Cell Physiol*, 142, 379-85.
- MENDES, F., COUTO, C. A. & LEVY, C. 2011. Recurrent and de novo autoimmune liver diseases. *Clin Liver Dis*, 15, 859-78.
- MIELI-VERGANI, G. & VERGANI, D. 2009. Autoimmune Hepatitis in Children: What is Different from Adult AIH? *Seminars in Liver Disease*, 29, 297-306.
- MOHAR, I., BREMPELIS, K. J., MURRAY, S. A., EBRAHIMKHANI, M. R. & CRISPE, I. N. 2015. Isolation of Non-parenchymal Cells from the Mouse Liver. *Methods Mol Biol*, 1325, 3-17.
- MOLODECKY, N. A., SOON, I. S., RABI, D. M., GHALI, W. A., FERRIS, M., CHERNOFF, G., BENCHIMOL, E. I., PANACCIONE, R., GHOSH, S., BARKEMA, H. W. & KAPLAN, G. G. 2012. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142, 46-54 e42; quiz e30.
- MORA-HUERTAS, C. E., FESSI, H. & ELAISSARI, A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113-142.
- MYASOEDOVA, E., CROWSON, C. S., KREMERS, H. M., THERNEAU, T. M. & GABRIEL, S. E. 2010. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis Rheum*, 62, 1576-82.

- NASCIMENTO, W. C., SILVA, R. P., FERNANDES, E. S., SILVA, M. C., HOLANDA, G. C., SANTOS, P. A., ALBUQUERQUE, M. P., COSTA, V. A., PONTES-FILHO, N. T. & SOUZA, V. O. 2014. Immunomodulation of liver injury by *Ascaris suum* extract in an experimental model of autoimmune hepatitis. *Parasitology Research*, 113, 3309-3317.
- NESTLER, U., WINKING, M. & BOKER, D. K. 2002. The tissue level of dexamethasone in human brain tumors is about 1000 times lower than the cytotoxic concentration in cell culture. *Neurological Research*, 24:5, 479-482.
- NEUBERGER, J. 1998. Halothane hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 10, 631-3.
- NOREEN, S., MAQBOOL, I. & MADNI, A. 2021. Dexamethasone: Therapeutic potential, risks, and future projection during COVID-19 pandemic. *Eur J Pharmacol*, 894, 173854.
- OBERMAYER-STRAUB, P., PERHEENTUPA, J., BRAUN, S., KAYSER, A., BARUT, A., LOGES, S., HARMS, A., DALEKOS, G., STRASSBURG, C. P. & MANNS, M. P. 2001. Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *Gastroenterology*, 121, 668-77.
- OLIVEIRA, L. C., PORTA, G., MARIN, M. L., BITTENCOURT, P. L., KALIL, J. & GOLDBERG, A. C. 2011. Autoimmune hepatitis, HLA and extended haplotypes. *Autoimmun Rev*, 10, 189-93.
- PARAGLIOLA, R. M., PAPI, G., PONTECORVI, A. & CORSELLO, S. M. 2017. Treatment with Synthetic Glucocorticoids and the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis. *Int J Mol Sci*, 18.
- PARK, B. S., SONG, D. H., KIM, H. M., CHOI, B. S., LEE, H. & LEE, J. O. 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458, 1191-5.
- PARKER, G. A. & PICUT, C. A. 2005. Liver immunobiology. *Toxicol Pathol*, 33, 52-62.
- PAUTLER, M. & BRENNER, S. 2010. Nanomedicine: promises and challenges for the future of public health. *Int J Nanomedicine*, 5, 803-9.
- POELSTRA, K., PRAKASH, J. & BELJAARS, L. 2012. Drug targeting to the diseased liver. *J Control Release*, 161, 188-97.
- RACANELLI, V. & REHERMANN, B. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology*, 43, S54-S62.
- RAMAIAH, S. K. & JAESCHKE, H. 2007. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol*, 35, 757-66.
- REICHMUTH, A. M., OBERLI, M. A., JAKLENEC, A., LANGER, R. & BLANKSCHTEIN, D. 2016. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Ther Deliv*, 7, 319-34.
- RIGO, L. A., CARVALHO-WODARZ, C. S., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S., SCHNEIDER-DAUM, N., LEHR, C. M. & BECK, R. C. R. 2017. Nanoencapsulation of a glucocorticoid improves barrier function and anti-inflammatory effect on monolayers of pulmonary epithelial cell lines. *Eur J Pharm Biopharm*, 119, 1-10.
- SADAUSKAS, E., WALLIN, H., STOLTENBERG, M., VOGEL, U., DOERING, P., LARSEN, A. & DANSCHER, G. 2007. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol*, 4, 10.
- SAHEBJAM, F. & VIERLING, J. M. 2015. Autoimmune hepatitis. *Front Med*, 9, 187-219.
- SCHACKE, H., DOCKE, W. D. & ASADULLAH, K. 2002. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther*, 96, 23-43.

- SCHRODER, K., HERTZOG, P. J., RAVASI, T. & HUME, D. A. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75, 163-89.
- SIMON, J., KUHN, G., FICHTER, M., GEHRING, S., LANDFESTER, K. & MAILÄNDER, V. 2021. Unraveling the In Vivo Protein Corona. *Cells*, 10.
- SOKOLLIK, C., MCLIN, V. A., VERGANI, D., TERZIROLI BERETTA-PICCOLI, B. & MIELI-VERGANI, G. 2018. Juvenile autoimmune hepatitis: A comprehensive review. *J Autoimmun*, 95, 69-76.
- STRAVITZ, R. T., LEFKOWITZ, J. H., FONTANA, R. J., GERSHWIN, M. E., LEUNG, P. S., STERLING, R. K., MANNS, M. P., NORMAN, G. L., LEE, W. M. & ACUTE LIVER FAILURE STUDY, G. 2011. Autoimmune acute liver failure: proposed clinical and histological criteria. *Hepatology*, 53, 517-26.
- STREHL, C. & BUTTGEREIT, F. 2013. Optimized glucocorticoid therapy: teaching old drugs new tricks. *Mol Cell Endocrinol*, 380, 32-40.
- STRETTELL, M. D., DONALDSON, P. T., THOMSON, L. J., SANTRACH, P. J., MOORE, S. B., CZAJA, A. J. & WILLIAMS, R. 1997. Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*, 112, 2028-35.
- SUCHER, E., SUCHER, R., GRADISTANAC, T., BRANDACHER, G., SCHNEEBERGER, S. & BERG, T. 2019. Autoimmune Hepatitis-Immunologically Triggered Liver Pathogenesis-Diagnostic and Therapeutic Strategies. *Journal of immunology research*, 2019, 9437043-9437043.
- SWEENEY, A. E. 2015. Nanomedicine concepts in the general medical curriculum: initiating a discussion. *Int J Nanomedicine*, 10, 7319-31.
- TACKE, F. & ZIMMERMANN, H. W. 2014. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol*, 60, 1090-6.
- TAN, H. H., FIEL, M. I., SUN, Q., GUO, J., GORDON, R. E., CHEN, L. C., FRIEDMAN, S. L., ODIN, J. A. & ALLINA, J. 2009. Kupffer cell activation by ambient air particulate matter exposure may exacerbate non-alcoholic fatty liver disease. *J Immunotoxicol*, 6, 266-75.
- TANAKA, T., NARAZAKI, M. & KISHIMOTO, T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a016295.
- TIEGS, G., HENTSCHEL, J. & WENDEL, A. 1992. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest*, 90, 196-203.
- URBANSKA, J., KAREWICZ, A. & NOWAKOWSKA, M. 2014. Polymeric delivery systems for dexamethasone. *Life Sci*, 96, 1-6.
- VAN DER LUBBEN, I. M., VERHOEF, J. C., BORCHARD, G. & JUNGINGER, H. E. 2001. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev*, 52, 139-44.
- VAN DER MEEL, R., VEHMEIJER, L. J., KOK, R. J., STORM, G. & VAN GAAL, E. V. 2013. Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status. *Adv Drug Deliv Rev*, 65, 1284-98.
- VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H. & REUTELINGSPERGER, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184, 39-51.
- VIOLATTO, M. B., CASARIN, E., TALAMINI, L., RUSSO, L., BALDAN, S., TONDELLO, C., MESSMER, M., HINTERMANN, E., ROSSI, A., PASSONI, A., BAGNATI, R., BIFFI, S., TOFFANIN, C., GIMONDI, S., FUMAGALLI, S., DE SIMONI, M.-G., BARISANI, D., SALMONA, M., CHRISTEN, U., INVERNIZZI, P., BIGINI, P. & MORPURGO, M. 2019. Dexamethasone Conjugation to Biodegradable Avidin-Nucleic-Acid-Nano-Assemblies

- Promotes Selective Liver Targeting and Improves Therapeutic Efficacy in an Autoimmune Hepatitis Murine Model. *ACS Nano*, 13, 4410-4423.
- WANG, J. Y., LEE, C. Y., PAN, P. J., CHANG, W. C., CHIU, J. H., CHEN, W. S. & SHYR, Y. M. 2014. Herb-induced autoimmune-like hepatitis in C57BL/6J mice. *Liver Int*, 34, 583-93.
- WANG, Q., JIANG, J., CHEN, W., JIANG, H., ZHANG, Z. & SUN, X. 2016. Targeted delivery of low-dose dexamethasone using PCL-PEG micelles for effective treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of Controlled Release*, 230, 64-72.
- WHALLEY, S., PUVANACHANDRA, P., DESAI, A. & KENNEDY, H. 2007. Hepatology outpatient service provision in secondary care: a study of liver disease incidence and resource costs. *Clin Med (Lond)*, 7, 119-24.
- WOYNAROWSKI, M., NEMETH, A., BARUCH, Y., KOLETZKO, S., MELTER, M., RODECK, B., STRASSBURG, C., PROELS, M. & MANNS, M. P. 2011. 29 BUDESONIDE 3 MG TID IN THE TREATMENT OF AUTOIMMUNE HEPATITIS (AIH) IN ADOLESCENTS, A SUBGROUP ANALYSIS OF THE EUROPEAN AIH-BUC-STUDY. *Journal of Hepatology*, 54, S14.
- WU, Y. H., HU, S. Q., LIU, J., CAO, H. C., XU, W., LI, Y. J. & LI, L. J. 2014. Nature and mechanisms of hepatocyte apoptosis induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide challenge in mice. *Int J Mol Med*, 33, 1498-506.
- XING, X. K., WU, H. Y., FENG, H. G. & YUAN, Z. Q. 2016. Immune function of nonparenchymal liver cells. *Genet Mol Res*, 15.
- YANG, ZHOU, LI, ZHANG, JIANG, JIANG, BA, LI, WANG, YIN, GONG & LI. 2015a. Kupffer-cell-expressed transmembrane TNF- α is a major contributor to lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced liver injury. *Cell Tissue Res*.
- YANG, C., JIANG, L., BU, S., ZHANG, L., XIE, X., ZENG, Q., ZHU, D. & ZHENG, Y. 2013. Intravitreal administration of dexamethasone-loaded PLGA-TPGS nanoparticles for the treatment of posterior segment diseases. *J Biomed Nanotechnol*, 9, 1617-23.
- YANG, P., ZHOU, W., LI, C., ZHANG, M., JIANG, Y., JIANG, R., BA, H., LI, C., WANG, J., YIN, B., GONG, F. & LI, Z. 2015b. Kupffer-cell-expressed transmembrane TNF- α is a major contributor to lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced liver injury. *Cell and Tissue Research*.
- YOSHIDA, T., ABE, K., IKEDA, T., MATSUSHITA, T., WAKE, K., SATO, T., SATO, T. & INOUE, H. 2007. Inhibitory effect of glycyrrhizin on lipopolysaccharide and d-galactosamine-induced mouse liver injury. *Eur J Pharmacol*, 576, 136-42.
- YOSHIZAWA, K., JOSHITA, S., MATSUMOTO, A., UMEMURA, T., TANAKA, E., MORITA, S., MAEJIMA, T. & OTA, M. 2016. Incidence and prevalence of autoimmune hepatitis in the Ueda area, Japan. *Hepatol Res*, 46, 878-83.
- ZHAO, L., TANG, Y., YOU, Z., WANG, Q., LIANG, S., HAN, X., QIU, D., WEI, J., LIU, Y., SHEN, L., CHEN, X., PENG, Y., LI, Z. & MA, X. 2011. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PLoS One*, 6, e18909.

7.2 Bücher

LÜLLMANN H. et. al., Pharmakologie und Toxikologie, Thieme-Verlag Stuttgart, 2010

8. ANHANG

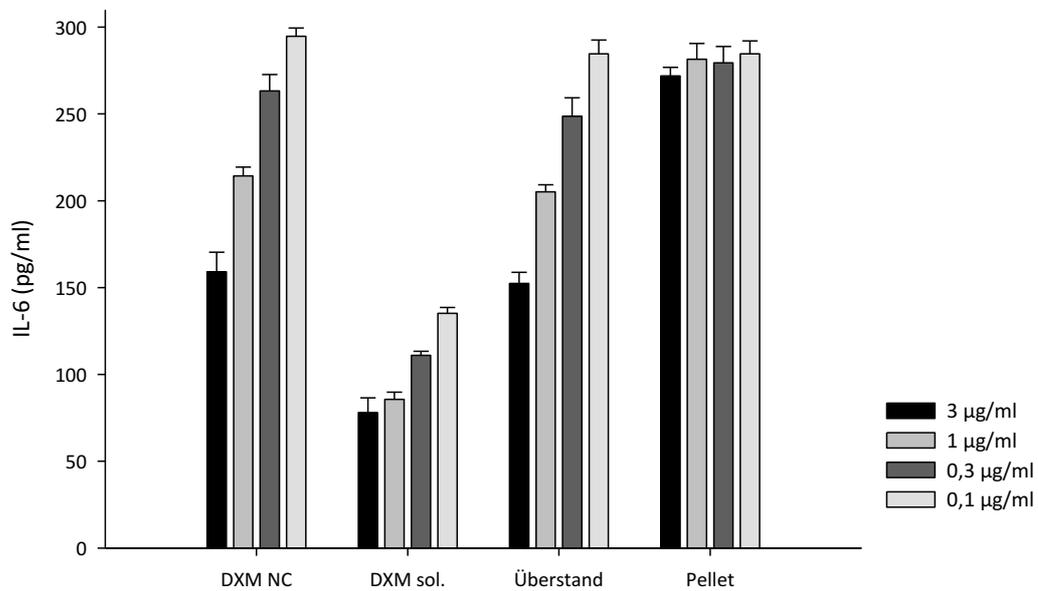


Abbildung 29: **IL-6 Suppressionsantwort 43 Tage alter DXM NCs im Vergleich zu Überstand, Pellet und löslichem DXM.** IL-6 Sekretion in vitro nach Gabe von 43 Tagen alten DXM NC (0,23%wt), DXM sol., zentrifugiertem Überstand und Pellet. Kontrolle bei 263,63 pg/ml ($\pm 12,82$ pg/ml). n = 4. Keine Statistik.

9. DANKSAGUNG

Mein größter Dank geht an meinen Doktorvater [REDACTED]

und an meine Eltern, meine Schwester [REDACTED] und ihrer Familie sowie an meinen Partner [REDACTED].

Danke auch an [REDACTED] und [REDACTED], meine Co-Medis [REDACTED] und [REDACTED] sowie dem restlichen Labor: [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED]. Mein herzlicher Dank für die Unterstützung am Ende und Korrekturvorschläge geht an [REDACTED]!

Nicht zu vergessen die „neue Laborcrew“: [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED]. Vielen Dank auch an den [REDACTED] sowie auch an unsere Kooperationspartnerinnen vom MPI: [REDACTED] und [REDACTED].

Und zuletzt möchte ich mich bei meiner Hausärztin [REDACTED] für Ihre Hilfe und Unterstützung bedanken.

10. TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Name	Jan Dieter Schneider
Geburtsdatum	26. August 1990
Geburtsort	Oberwesel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Beruflicher Werdegang	
Zeitraum	seit Mai 2020, Assistenzarzt in Weiterbildung
Arbeitgeber	Uniklinik Würzburg, Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie bei Prof. Romanos
Zeitraum	März bis Mai 2020, Arzt für Betreuung COVID-19 positiver Patienten
Arbeitgeber	Rhein-Hunsrück Kreis, Gesundheitsamt
Zeitraum	Januar 2019 bis Januar 2020, Assistenzarzt in Weiterbildung
Arbeitgeber	Uniklinik Frankfurt, Klinik für Psychiatrie und Psychosomatik bei Prof. Reif
Studium	
Studium	Humanmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2011 bis 2018
Abschluss	Staatsexamen am 17. Mai 2018 und Approbation als Arzt am 20. Juli 2018
Praktisches Jahr	1. Terial: Neurologie am BWZK in Koblenz 2. Terial: Chirurgie am Hospital de Clínicas (UFRGS) in Porto Alegre, Brasilien 3. Terial: Innere Medizin am Brüderkrankenhaus in Trier
Studium	Volkswirtschaftslehre, Universität Mannheim, 2010 (1. Semester)

Medizinische Promotion

Zeitraum Seit Januar 2016
Doktorandenstelle Arbeitsgruppe Pädiatrische Immunologie und Infektiologie
bei Prof. Dr. med. Stephan Gehring der Kinderklinik Universitätsmedizin Mainz

Stipendien

Zeitraum Seit April 2011
Art Deutschlandstipendium des Bundesministeriums für Bildung und Forschung für
begabte und leistungsstarke Studierende

Zeitraum September bis Dezember 2017
Art PROMOS-Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes für den
Auslandsaufenthalt in Brasilien, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Künstlerische Tätigkeit

Zeitraum März bis September 2012
Art Hauptdarsteller im Film „Die Andere Heimat“ von Edgar Reitz
Auszeichnungen Deutscher Filmpreis 2014 in den Kategorien Drehbuch, Regie und Spielfilm
Nominierung zum Preis der deutschen Filmkritik 2014 als „Bester Darsteller“

Ehrenamtliche Tätigkeit

Übersetzer für Arztbriefe bei „washabich.de“ in Dresden
Arzt bei „Medical Volunteers International“ für Geflüchtete und Obdachlose 2018
in Athen, Griechenland

Schulbildung

Zeitraum August 2001 bis März 2010
Qualifikation Abitur, Gymnasiale Oberstufe der IGS Kastellaun

Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache)
Englisch (fließend in Wort und Schrift, C1)
Brasilianisches Portugiesisch (fließend in Wort und Schrift, C1)
Französisch (Grundkenntnisse, A2)
Latinum