

Aus dem Institut für translationale Immunologie (TIM)
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Nanopartikulär gekoppeltes Alendronat zur antifibrotischen Immunmodulation bei
Leberfibrose

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

Vorgelegt von

Niklas Choteschovsky
aus Hanau

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion: 07.07.2026

Nachnutzungslizenz: CC-BY-4.0

[REDACTED]

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere Ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Teile, die wörtlich oder sinngemäß einer Veröffentlichung entstammen, sind kenntlich gemacht.

Ich möchte darauf hinweisen, dass Teile dieser Promotionsarbeit in Kaps L et al. "*pH-degradable, bisphosphonate-loaded nanogels attenuate liver fibrosis by repolarization of M2-type macrophages.*" Proc Natl Acad Sci USA, 2022 veröffentlicht wurden. (1)

Nach § 9 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 23. Oktober 2017 wurde die Vorveröffentlichung der Publikation angezeigt und ist in der Publikation selbst unter „*Author contributions*“ kenntlich gemacht. Etwaige publizierte Abbildungen sind als Bildzitate kenntlich gemacht.

Mainz, den 31.12.2025

Niklas Choteschovsky

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
1 Einleitung / Ziel der Dissertation	8
1.1 Leberfibrose	8
1.1.1 Allgemeine Aspekte	8
1.1.2 Klinische Aspekte	8
1.1.3 Diagnostik	9
1.1.4 Pathomechanismus	10
1.2 Bisphosphonate	14
1.2.1 Historischer Hintergrund	14
1.2.2 Wirkmechanismus von Bisphosphonaten	15
1.3 Nanopartikel	16
1.3.1 Allgemeines	16
1.3.2 Nanogelee	18
1.4 Tiermodelle der Leberfibrose	20
1.4.1 chemisch induzierte Fibrosemodelle	20
1.4.2 immunologisch induzierte Fibrosemodelle	21
1.4.3 chirurgisch induzierte Fibrosemodelle	22
1.4.4 weitere Mausmodelle	22
1.5 Ziel der Dissertation	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Verbrauchsmaterial	24
2.1.2 Zellkulturmedien	25
2.1.3 Geräte	25
2.1.4 Kits	28
2.1.5 Primer	28
2.1.6 Reagenzien	28
2.1.7 Rezepte	30
2.1.8 Zytokine	31
2.1.9 Antikörper	31
2.1.10 Zelllinien	32
2.1.11 Statistische Auswertung	32
2.2 In vitro Methoden	33
2.2.1 Zellkultur	33
2.2.2 Extraktion und Differenzierung von BMDM	33
2.2.3 RT-qPCR	35

2.2.4	Durchflusszytometrie (FACS)	36
2.3	in vivo Methoden	37
2.3.1	Tierversuch	37
2.3.2	CCL ₄ Fibrosemodell	37
2.3.3	Nahinfrarot-Bildgebung	39
2.3.4	Intrazelluläre Aufnahme in vivo	40
2.3.5	Hydroxyprolin-Bestimmung	40
2.3.6	Pikro-Siriusrot-Färbung	41
2.3.7	α -SMA-Färbung	41
2.3.8	Auswertung der Färbungen mit ImageJ	43
3	Ergebnisse	44
3.1	In vitro Zellkulturen	44
3.2	In vivo Versuche	47
4	Diskussion	55
4.1	Diskussion der in in-vitro-Ergebnisse	55
4.1.1	Zytotoxizität	55
4.1.2	Makrophagenpolarisation	56
4.1.3	intrazelluläre Aufnahme der Nanogelee	57
4.1.4	Genexpressionsanalyse	58
4.2	Diskussion der in-vivo-Ergebnisse	58
4.2.1	Biodistribution	59
4.2.2	Therapieeffekte und funktionelle Parameter	60
4.3	Limitationen und Ausblick	61
5	Zusammenfassung	63
6	Literatur	64
7	Anhang	78
8	Danksagung	79
9	Tabellarischer Lebenslauf	80

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Lange Beschreibung
α -SMA	α -smooth muscle actin
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase
AL	Alendronat
ALT	Alanin-Aminotransferase
AL/NP	nanopartikulär gekoppeltes Alendronat
AMP	Cyclic adenosine monophosphate
Arg 1	Arginase 1
AST	Aspartat-Aminotransferase
Bambi	bone morphogenetic protein and actin membrane-bound inhibitor
CCL-2	CC-chemokine ligand 2
CCL ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CXCL	C-X-X motif chemokine ligand
CCR-2	CC-chemokine receptor 2
CD	Cluster of differentiation
ECM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FIZZ 1	resistin-like molecule alpha
FPPS	Farnesylpyrophosphatsynthase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GOT	Asparat-Aminotransferase
GPT	Alanin-Aminotransferase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN γ	Interferon γ
IL-4	Interleukin 4

IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-13	Interleukin 13
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL-Cholesterin	Low density Lipoprotein – Cholesterin
LPS	Lipopolysaccharide
MASH	metabolic dysfunction-associated steatohepatitis
MASLD	metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MCSF	Macrophage colony stimulating factor
MFI	mean fluorescence intensity
MHC-II	major histocompatibility complex class II
MMP	Matrix-metalloproteinase
NIR	Nahinfrarot
NP	Nanopartikel
OG	Oregon Green
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PEG	Polyethylenglykol
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic) acid
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
RT-qPCR	Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RAFT	reversible-addition-fragmentation chain-transfer
SR	Sirius red
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TGF- β 1	transforming growth factor β 1

T _H 1	Typ-1-T-Helferzellen
T _H 2	Typ-2-T-Helferzellen
THR-β	thyroid hormone receptor β
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TLR 4	toll like receptor 4
TNF-α	tumour necrosis factor α
VEGF	vascular endothelial growth factor
YM-1	chitinase-like protein 3

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien der steatotischen Lebererkrankung.....	8
Abbildung 2: Leberarchitektur in gesunder Leber und fibrotischer Leber	10
Abbildung 3: <i>Pathomechanismus Leberfibrose</i>	12
Abbildung 4: Makrophagenpolarisation.....	13
Abbildung 5: chemische Strukturformel Pyrophosphonat vs Bisphosphonaten	14
Abbildung 6: Strukturformel von Alendronsäure.....	15
Abbildung 7: Kategorien von Nanopartikeln mit jeweiligen Charakteristika	17
Abbildung 8: Herstellung und Charaktersisierung von AL/NP	19
Abbildung 9: in vivo Testversuch	38
Abbildung 10: Schematische Darstellung CCL ₄ -Fibrosemodell.....	38
Abbildung 11: Testung der mit NIR-800RS markierten Wirkstoffe vor in vivo Applikation	39
Abbildung 12: Etablierung der α -SMA-Färbung	42
Abbildung 13: morphometrische Auswertung mittels ImageJ.....	43
Abbildung 14: Zytotoxizität an 3T3-Zellen, raw-Zellen und polarisierten Makrophagen.....	44
Abbildung 15: MFI von IL-10 in polarisierten Makrophagen	45
Abbildung 16: intrazelluläre Aufnahme von AL, NP, und AL/NP in vitro	46
Abbildung 17: qPCR in vitro von CCL2, IL-10 und YM-1.....	46
Abbildung 18: durchschnittliche Strahlungseffizienz Biodistribution	47
Abbildung 19: in vivo und ex vivo IVIS-Imaging in gesunden Mäusen	48
Abbildung 20: in vivo und ex vivo IVIS-Imaging in fibrotischen Mäusen.....	49
Abbildung 21: intrazelluläre Aufnahme in vivo	50
Abbildung 22: Körpergewicht, Gewicht Leber und Milz in [g].	51
Abbildung 23: Leber- und Nierenwerte 24 h nach i.v. Gabe von AL/NP.....	51
Abbildung 24: Leber- und Nierenwerte nach zweiwöchigem Therapieversuch	52
Abbildung 25: Hydroxyprolin-Assay, qPCR in vivo von CCL-2, IL-10 und CD 206.....	53
Abbildung 26: Sirius Red und alpha-SMA-Färbung	54
Abbildung 27: Gating-Strategie für IL-10 und die zelluläre Aufnahme in vitro	78
Abbildung 28: Gating-Strategie für die zelluläre Biodistribution in vivo.....	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 2 Zellkulturmedien	25
Tabelle 3 Geräte.....	27
Tabelle 4 Kits	28
Tabelle 5 Primer für RT-qPCR.....	28
Tabelle 6 Reagenzien.....	30
Tabelle 7 Rezepte	31
Tabelle 8 Zytokine	31
Tabelle 9 Antikörper	32
Tabelle 10 Zelllinien	32

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

1.1 Leberfibrose

1.1.1 Allgemeine Aspekte

Chronische Entzündungen der Leber führen zur Entwicklung einer Leberfibrose, die langfristig in eine Leberzirrhose und schließlich in ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) übergehen kann. (2) Eine Fibrose stellt dabei eine Folge überschießender Wundheilungsprozesse dar, bei der es zur exzessiven Bildung von Narbengewebe und zur Akkumulation extrazellulärer Matrix (ECM) kommt. Diese besteht neben hunderten funktionell relevanter Proteine, Proteoglykane und Glykosamine überwiegend aus Kollagen Typ I und III und ersetzt ehemals funktionelles, nun jedoch geschädigtes Lebergewebe. (2, 3) Chronische Entzündungen der Leber können vielfältige, meist multifaktorielle Ursachen haben. Die beiden wichtigsten pathogenetischen Gruppen sind neben genetisch bedingten Erkrankungen und autoimmunen Hepatitiden hepatotoxische und cholestatische Schädigungen. Primär hepatotoxische Prozesse führen zu einer direkten Schädigung der Hepatozyten. Zu den häufigsten Ursachen zählen Virushepatitiden B und C, chronischer Alkoholkonsum sowie das metabolische Syndrom, das in der Leber unter dem Begriff *Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease* (MASLD) zusammengefasst wird. (4–8) Dies umfasst Patienten mit hepatozellulärer Steatose, bei denen zusätzlich mindestens einer von fünf kardiometabolischen Risikofaktoren vorliegt. Zu diesen zählen Diabetes mellitus, Adipositas, arterielle Hypertonie, erhöhte Triglyzeridspiegel sowie erhöhte LDL-Cholesterinwerte. (9) Die entzündliche Form der MASLD bezeichnet man als metabolische Dysfunktions-assoziierte Steatohepatitis (*Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis*, MASH). Cholestatische Lebererkrankungen hingegen entstehen durch einen chronischen Rückstau des Gallenflusses. Zu den wichtigsten Vertretern zählen die primär biliäre Cholangitis (PBC) und die primär sklerosierende Cholangitis (PSC). (10, 11)

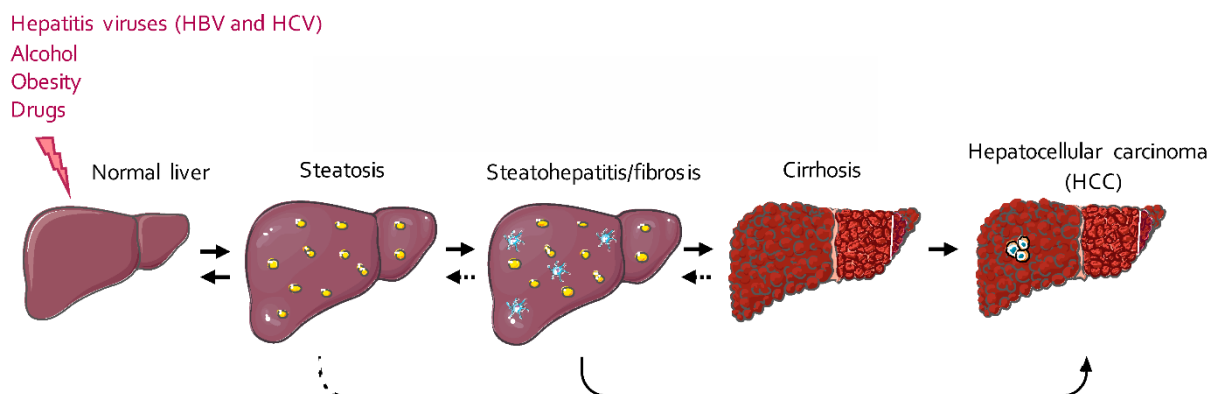


Abbildung 1: Stadien der steatotischen Lebererkrankung. Durch diese Schädigung oder andere Ätiologien wie Hepatitis B und C, oder Alkohol wird die Leber geschädigt. Durch chronische Entzündungsprozesse und überschießende Wundheilungsprozesse kommt es zum fibrotischen Umbau der Leber, dessen Endstadium die Leberzirrhose darstellt, oft auch mit der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms. (modifiziert nach Figure 1 Dolicka et al, Int. J. Mol. Sci., 2020)

1.1.2 Klinische Aspekte

Lebererkrankungen zählen weltweit zu den bedeutendsten Gesundheitsproblemen und sind Schätzungen zufolge für rund zwei Millionen Todesfälle pro Jahr verantwortlich. (12) Die Prävalenz der MASLD in Europa liegt bei etwa 24 %, die der schwerwiegenderen MASH bei 4 – 5 %. (13) Die Leberzirrhose als Endstadium chronischer Lebererkrankungen stellt dabei die neunthäufigste Todesursache in Europa dar. (12)

Zu diesem Umstand trägt auch bei, dass das Risiko für Folgeerkrankungen, insbesondere die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms, im Verlauf mit dem Fibrosestadium deutlich ansteigt. Die Angaben in der Literatur für die Entwicklung eines HCC bei klinisch kompensierten Zirrhotikern schwanken hierzu zwischen 1 und 3 % pro Jahr. (14). Unstrittig ist der Anstieg der jährlichen Inzidenz für die Entwicklung eines HCC von 0,02% bei MASH-Patienten ohne Leberzirrhose auf erwähnte 1 – 3% bei Patienten mit Leberzirrhose. (15) Die aktuelle S2k-Leitlinie zur nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung beziffert die jährliche Inzidenz für MASH-Patienten mit Zirrhose auf etwa 1,5 %, was einem rund 75-fach erhöhten Risiko im Vergleich zu nicht-zirrhosischen Patienten entspricht. (15)

Eine weitere schwerwiegende Komplikation chronischer Lebererkrankungen ist die Entwicklung einer portalen Hypertension. Sie stellt die wichtigste nicht-neoplastische Folgeerkrankung dar und führt zur Ausbildung von Ösophagusvarizen und Aszites. (16) Pathophysiologisch beruht sie auf einer Dysregulation der sinusoidalen Endothelzellen und hepatischen Sternzellen, die infolge der Ablagerung von extrazellulärer Matrix bzw. von Kollagenfasern sowie einem architektonischen Umbau der Leber mit von bindegewebigen Septen umschlossenen Regeneratknoten den intrahepatischen Gefäßwiderstand erhöhen (17–19).

Es ist wichtig, hierbei zu verstehen, dass die Diagnose einer MASLD nicht nur leberassoziierte Komplikationen mit sich bringt, sondern eine chronische Erkrankung der Leber als zentralem Stoffwechselorgans allgemein mit einem erhöhtem Sterberisiko, u.a. mit kardiovaskulären Komplikationen, einhergeht. So zeigt eine aktuelle schwedische Bevölkerungsstudie, dass Menschen mit MASLD ein fast zweifach erhöhtes Sterberisiko haben. (20)

In fortgeschrittenen Stadien (dekompensierte Zirrhose, frühes HCC) bleibt häufig nur die Lebertransplantation als kurativer Therapieansatz. Voraussetzung hierfür ist u.a. die Erfüllung der Milan-Kriterien. (21) Hiermit werden Patienten mit HCC und zeitgleicher Leberzirrhose selektiert. Die Kriterien dienen zur Abschätzung der Erfolgsaussichten einer Lebertransplantation. Bei den Kriterien handelt es sich um a) ein Tumorherd < 5cm, oder b) bis zu drei Tumorherde je < 3cm, c) keine extrahepatische Manifestation und d) keine vaskuläre Invasion. Trotz dieser Selektion besteht in Deutschland und Europa weiterhin eine ausgeprägte Spenderknappheit, wodurch tausende Betroffene auf den Transplantationslisten warten müssen. (22)

1.1.3 Diagnostik

Der nachfolgend dargestellte diagnostische Algorithmus orientiert sich an der aktuellen S2k-Leitlinie zur nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung. (15)

Bei Verdacht auf eine MASLD empfiehlt die Leitlinie zunächst die Abdomensonographie als primäre bildgebende Methode zur Sicherung der Diagnose einer steatotischen Lebererkrankung. Im Anschluss sollte mithilfe nicht-invasiver Verfahren eine Risikostratifizierung des Fibrosegrades erfolgen. Hierbei kommen insbesondere klinische Scores wie der Fibrosis-4-Index (FIB-4) sowie elastographische Methoden – beispielsweise die transiente Elastographie (*FibroScan*®) – zum Einsatz.

Bei Hinweis auf eine fortgeschrittene Leberfibrose wird zur exakten Stadieneinteilung die Durchführung einer Leberbiopsie empfohlen. Die histologische Diagnosesicherung einer MASH erfordert den Nachweis einer Steatose von >5 % im untersuchten Gewebe, das Vorliegen ballonierter Hepatozyten sowie eine lobuläre Entzündungsreaktion.

1.1.4 Pathomechanismus

Histologisch ist die Leber aus hexagonalen Leberläppchen aufgebaut, von denen jeweils drei um ein periportales, ECM-reiches Feld angeordnet sind. Dieses Feld enthält die Vena interlobularis (Ast der Vena portae), die Arteria interlobularis (Ast der Arteria hepatica) sowie einen interlobulären Gallengang. Diese drei Strukturen bilden zusammen die sogenannte Glisson-Trias.

In einem Leberläppchen sind die Hepatozyten balkenartig zirkulär um die Zentralvene angeordnet. Die zwischen den Zellbalken gelegenen Sinusoide sind mit einem diskontinuierlichen Endothel ausgekleidet. Der zwischen Endothelzellen und Hepatozyten liegende Disse-Raum stellt den Ort des Stoffaustauschs dar und beherbergt wichtige Immunzellen wie Kupffer-Zellen sowie hepatische Sternzellen, die auch Ito-Zellen oder *hepatic stellate cells* (HSC) genannt werden.

Im Verlauf fibrotischer Umbauprozesse kommt es zu einer Destruktion der regulären Leberarchitektur. (23) Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau einer gesunden Leber (A) im Vergleich zu einer fibrotischen Leber (B).

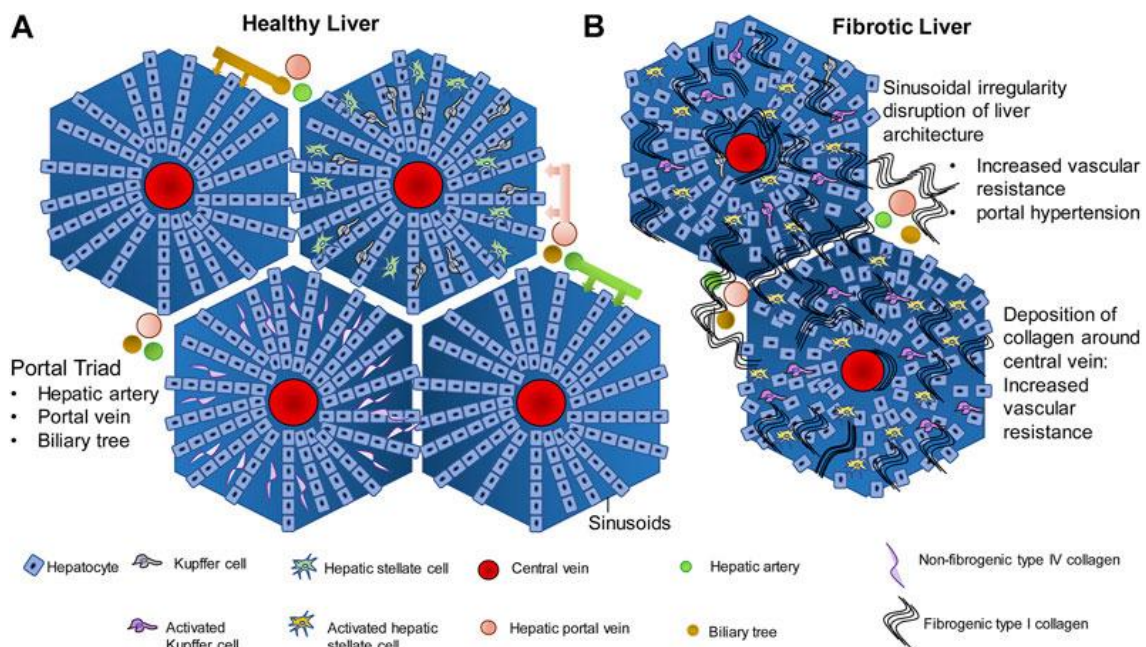


Abbildung 2: Leberarchitektur in gesunder Leber (A) und fibrotischer Leber (B). Im Rahmen der Wundheilung wird u.a. Kollagen Typ I zwischen die Sinusoide eingelagert und zerstört so die Leberarchitektur. Durch die Anlagerung von Kollagen um die Zentralvene nimmt deren Elastizität ab und es kommt zur Entstehung der portalen Hypertonie, wodurch kompensatorisch venöse Umgehungskreisläufe (Ösophagusvarizen) entstehen. (18) (modifiziert nach figure 1 in Acharya et al, *Frontiers in Pharmacology* 2021)

Die Entstehung der Leberfibrose ist ein hochkomplexer Prozess, bei dem zahlreiche Signalkaskaden und Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind. Dabei reagieren Immunzellen auf entzündliche Veränderungen und Reparaturmechanismen greifen ineinander. (24–28) Eine Leberschädigung führt zu Zellnekrose oder Apoptose. Die dabei freigesetzten intrazellulären Bestandteile aktivieren zusammen mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) u.a. über die *CC-chemokine receptor 2* (CCR2)-Achse die HSC. (29) Der primäre Ligand für CCR2, CCL2, wird auch als *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) bezeichnet. Makrophagen und HSC beginnen infolgedessen mit der Phagozytose der nekrotischen und apoptotischen Zellen. Beide Zelltypen sezernieren proinflammatorische Zytokine wie z.B. *tumor necrosis factor α* (TNF-α), die T-Zellen und neutrophile Granulozyten rekrutieren. (30–32) Durch die Freisetzung von *transforming growth factor β1* (TGF-β1) kommt es zur Transformation der hepatischen Sternzellen zu Myofibroblasten, die *α-smooth muscle actin* (α-SMA) exprimieren

und die Synthese von ECM und Kollagen Typ I initiieren. (2, 30–32) Die Aktivierung der hepatischen Sternzellen führt wiederum selbst zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie *Interleukin 6* (IL-6), *Interleukin 8* (IL-8) und auto-parakrin CCL2. (2, 33–35)

Unter physiologischen Bedingungen können Makrophagen nach kurz andauernder Schädigung, d.h. rascher Beseitigung der auslösenden Pathologie, durch die Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) den Abbau der zuvor gebildeten ECM einleiten. (36) Bei chronischen Lebererkrankungen und persistierender Schädigung entsteht jedoch ein Teufelskreis aus sich gegenseitig verstärkenden Signalkaskaden und es kommt zu einer wiederholten Aktivierung dieser Wundheilungsmechanismen. Die aktivierten Myofibroblasten hemmen über die Freisetzung von *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases* (TIMP) die proteolytische Aktivität der MMP, wodurch der ECM-Abbau verhindert und der fibrotische Umbau der Leber vorangetrieben wird. (33–35, 37)

Myofibroblasten stellen daher die Hauptquelle der extrazellulären Matrix dar. (31) Im Zuge der Aktivierung verlieren die HSC ihr gespeichertes Vitamin A und beginnen mit der Produktion von ECM und insbesondere auch Kollagen Typ I mit z.T. sechs- bis achtfacher Steigerung. (38) Neben hepatischen Sternzellen können jedoch auch periportale Fibroblasten, knochenmarkstämmige Fibrozyten und mesenchymale Stammzellen zur Population der Myofibroblasten beitragen. (25, 39, 40)

Im Folgenden soll nun näher auf die Rolle der Makrophagen eingegangen werden. Makrophagen sind zentrale Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und übernehmen Funktionen, die von der Elimination pathogener Erreger über die Regulation von Entzündungsreaktionen bis hin zur Wundheilung reichen. (41) In der Leber bestehen sie aus residenten Kupffer-Zellen und von Monozyten abgeleiteten Makrophagen. (42) Kupffer-Zellen machen dabei etwa 80–90 % aller Gewebsmakrophagen der normalen Leber aus. (43)

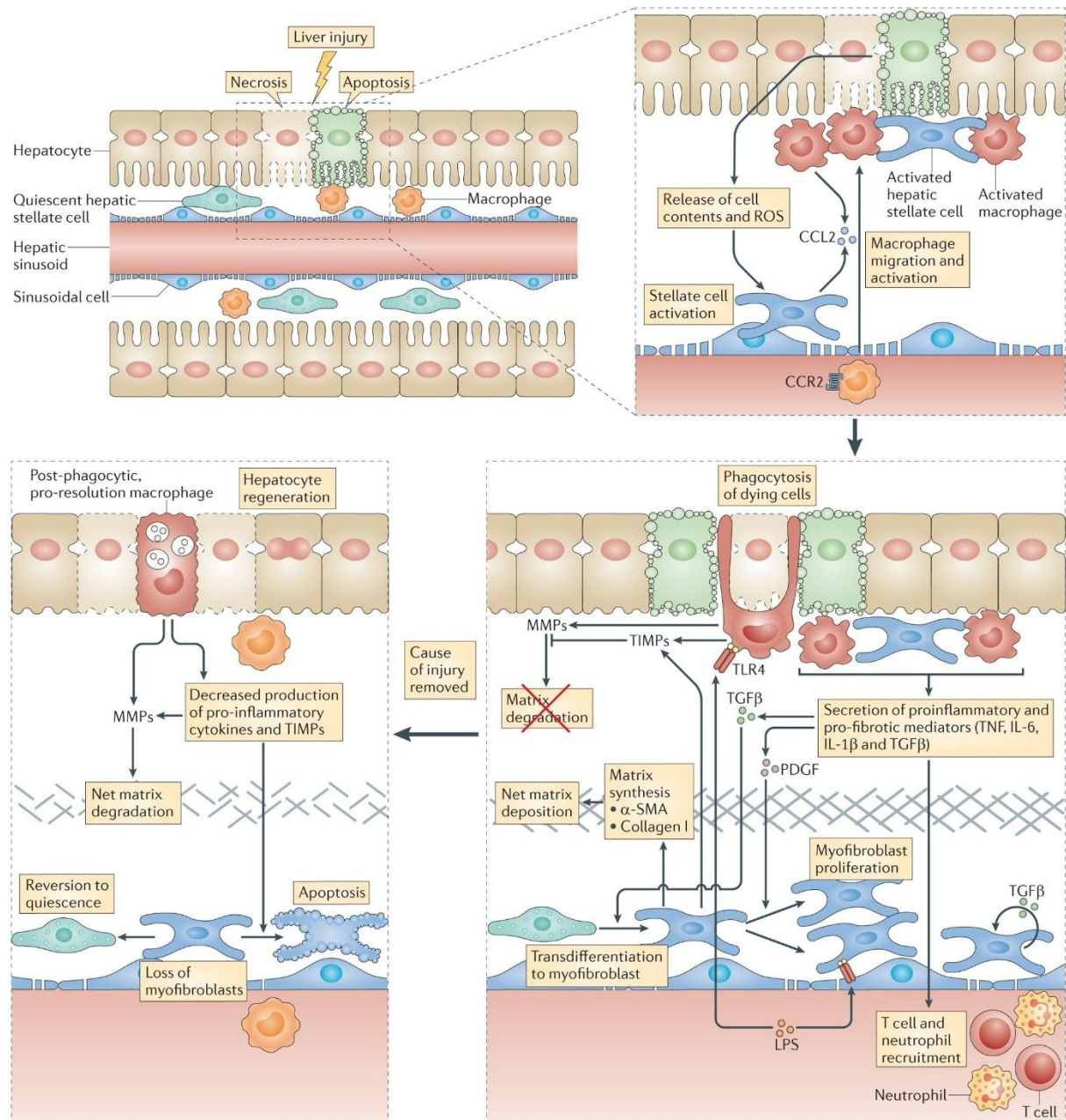
Nach Aktivierung, beispielsweise im Rahmen entzündlicher Prozesse, sezernieren Kupffer-Zellen TGF- β 1. (44) Unter physiologischen Bedingungen sind hepatische Sternzellen gegenüber TGF- β 1 weitgehend resistent, da sie hohe Mengen des *bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor* (BAMBI) exprimieren, welches die TGF- β -Signaltransduktion hemmt. (45)

Bei z.B. erhöhter Lipopolysaccharid-(LPS)-Exposition aus dem Darm, wie sie bei MASLD auftritt (46), binden LPS an Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) auf Makrophagen und geringer auch HSC. Dies führt zu einer Herabregulierung von BAMBI, wodurch die Zellen empfindlicher auf TGF- β 1 reagieren und in Myofibroblasten differenzieren können. (47, 48)

Während Kupffer-Zellen eine wichtige Rolle bei Homöostase und akuten Leberschädigungen spielen (41), dominieren bei chronischen Entzündungen die monozytenabgeleiteten Makrophagen. Dabei kommt es zu einer Abnahme der Kupffer-Zellpopulation und gleichzeitig zu einer Zunahme rekrutierter Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen differenzieren (49).

Karlmarm et al. konnten zeigen, dass diese Zellen damit einen zentralen Beitrag zur Entstehung der Leberfibrose leisten. (50) Ähnliche Mechanismen wurden auch bei fibrotischen Umbauprozessen in anderen Organen, darunter Lunge, (51) Haut (52) und Nieren (53) nachgewiesen.

Gleichzeitig besitzen Makrophagen die Fähigkeit, durch die Freisetzung von MMPs den Abbau der ECM einzuleiten (54). Abbildung 3 zeigt die beschriebenen Mechanismen schematisch zusammengefasst.



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 3: Eine Leberschädigung verursacht Zellnekrose oder Apoptose. Die dadurch freigesetzten intrazellulären Zellbestandteile aktivieren zusammen mit reaktiven Sauerstoffspezies die hepatischen Sternzellen über die CC-chemokine receptor 2 (CCR2)-Achse. CCR 2 wird auch als MCP 1 bezeichnet. Makrophagen und die hepatischen Sternzellen beginnen nun mit der Phagozytose der nekrotischen und apoptotischen Zellen. Beide setzen proinflammatorische Zytokine frei, die T-Zellen und neutrophile Zellen mobilisieren. Durch die Freisetzung von TGF-β1 kommt es zur Transformation der hepatischen Sternzellen zu Myofibroblasten, die α-SMA freisetzen und die Synthese von Kollagen Typ I initiieren. Unter physiologischen Bedingungen, sprich wenn der Grund für die Leberschädigung beseitigt ist, sind Makrophagen in der Lage, durch die Sekretion von MMPs den Abbau der zuvor zusätzlich aufgebauten extrazellulären Matrix zu initiieren. Bei chronischen Erkrankungen und fortwährender Leberschädigung kommt es jedoch zur repetitiven Aktivierung dieses Wundheilungsprozesses und die aktivierten Myofibroblasten hemmen durch die Freisetzung von TIMP die Proteasefähigkeit der MMPs. Hierdurch resultiert der fibrotische Umbau der Leber. (modifiziert nach Abb. 2 Pellicoro et al. Nature Reviews Immunology 2014)

Zur Erfüllung ihrer unterschiedlichen Aufgaben differenzieren Makrophagen in verschiedene funktionelle Phänotypen. (55) Bereits in den 1960er-Jahren beschrieb George Mackaness die sogenannte „*classical activation*“, bei der Makrophagen durch Zytokine wie Interferon γ (IFN- γ), Lipopolysaccharide (LPS), *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und *TNF* aktiviert werden. (56) Diese Cytokine sind eng mit einer Typ-1-T-Helferzelle (T_H1) vermittelten Immunantwort verbunden. (56, 57) So entstand der Terminus „M1-Makrophage“. M1-Makrophagen sind folglich proinflammatorisch und an der Beseitigung von Pathogenen wie z.B. Bakterien beteiligt.

In den 1990er-Jahren wurde mit der Entdeckung der „*alternative activation*“ durch Interleukin 4 (IL-4) ein weiteres Differenzierungsmuster beschrieben (56–58) Diese M2-Makrophagen sind überwiegend antiinflammatorisch und fördern die Wundheilung.

M2-Makrophagen werden in mehrere Subtypen unterteilt: (56, 58, 59)

- M2a: sezernieren v. a. TGF- β und sind maßgeblich an der Fibroseentstehung beteiligt,
- M2b: regulieren das Gleichgewicht zwischen Immunantwort und Wundheilung ($TH2$ -vermittelt),
- M2c: übernehmen Funktionen bei Phagozytose, Immunsuppression, Angiogenese und fibrotischen Prozessen,
- M2d: auch als tumour-associated macrophages (TAM) bezeichnet; sie fördern Tumorwachstum und Angiogenese

Je nach Polarisation sezernieren Makrophagen unterschiedliche Zytokinprofile. M1-Makrophagen produzieren u. a. TNF- α und CCL2 (54, 55, 60) während M2-Makrophagen u.a. durch den Mannose-Rezeptor 1 (CD206) gekennzeichnet sind und Zytokine wie TGF- β , IL-4, IL-10, IL-13 sowie *Chitinase-like protein 3* (YM-1) (54, 61–63). In Abbildung 4 ist die Polarisation von M1- und M2-Makrophagen schematisch zusammengefasst:

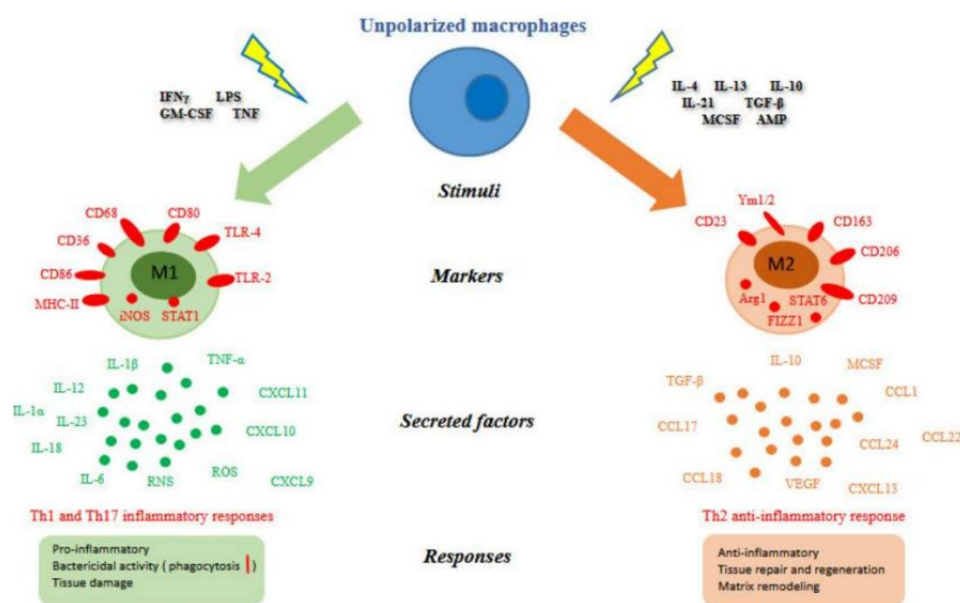


Abbildung 4: Makrophagenpolarisation mit Stimuli, Markern, sezernierten Zytokinen und Funktion. Es handelt sich um Interleukine (IL), Interferon γ (IFN γ), Lipopolysaccharide (LPS), granulocyte-macrophages colony stimulating factor (GM-CSF), tumour necrosis factor (TNF), Cluster of Differentiation (CD), major histocompatibility complex class II (MHC-II), inducible nitric oxide synthase (iNOS), signal transducer and activator of transcription (STAT), toll-like receptor (TLR), Arginase 1 (Arg1), resistin-like molecule alpha (FIZZ1), cyclic adenosine monophosphate (AMP), chemokine C-C motif ligand (CCL), C-X-C motif chemokine ligand (CXCL), reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), vascular endothelial growth factor (VEGF). (modifiziert nach Figure 2 Binatti et al International Journal of Molecular Sciences 2022)

Ein mögliches Ziel zukünftiger antifibrotischer Therapien besteht in der Repolarisation von M2- zu M1-Makrophagen, um so eine Reduktion fibrotischer Umbauprozesse zu erreichen. *Ma et al.* (2017) konnten in einem Mausmodell zeigen, dass eine Zytotherapie mit M1-Makrophagen zu einer signifikanten Reduktion der Leberfibrose führte (64) Ähnliche Effekte wurden auch in der Lunge beobachtet, wo eine Verminderung der M2-Makrophagen eine antifibrotische Wirkung zeigte. (65)

1.2 Bisphosphonate

1.2.1 Historischer Hintergrund

Die Entdeckung der Bisphosphonate beginnt unweit von Mainz in einer Apotheke in Worms, wo der Pharmazeut Theodor Salzer am 09.04.1894 in der „*Pharmaceutischen Zeitung*“ den Artikel „*Ueber die eigenthümliche Phosphorsäure des Handels*“ publiziert, worin er sich über die zunehmenden Verunreinigungen der durch die chemische Industrie hergestellten Chemikalien beklagt. Bei genauerer Betrachtung habe er eine ihm unbekannte Substanz entdeckt, die in zwei Flaschen Phosphorsäure als kristalliner Niederschlag ausgefallen sei. (66, 67) Erst später konnte diese Substanz als Pyrophosphat identifiziert werden; eine chemische Verbindung, die durch zwei miteinander verknüpfte Phosphonatgruppen charakterisiert ist. (66)

In den 1960er- und 1970er-Jahren wurde entdeckt, dass Pyrophosphat die Ausfällung von Kalziumphosphat hemmt. Diese Eigenschaft führte zunächst zu seiner industriellen Nutzung, etwa in Wasserkreisläufen und Waschmitteln, um Kalkablagerungen und die Bildung von Kesselstein zu verhindern. (68) Tierexperimentelle Studien zeigten ähnliche Effekte bei parenteraler Applikation, wohingegen die orale Gabe aufgrund der raschen enzymatischen Spaltung von Pyrophosphat durch alkalische Phosphatase keine therapeutische Wirksamkeit entfaltete. (68, 69)



Abbildung 5: Vergleich der chemischen Strukturformel von Pyrophosphat (li) mit der Grundstruktur von Bisphosphonaten (re). (modifiziert nach Abb.1 Barbosa et al Journal of medicinal Chemistry 2022)

Daher begann man an chemischen Strukturanaloga zu forschen und wurde bei den Bisphosphonaten fündig, siehe Abb. 5. Der entscheidende strukturelle Unterschied zwischen Pyrophosphat und Bisphosphonaten liegt in der zentralen Bindung: Während Pyrophosphat eine P–O–P-Verknüpfung aufweist, besitzen Bisphosphonate eine P–C–P-Bindung, bei der das Sauerstoffatom durch ein Kohlenstoffatom ersetzt wurde. Diese Modifikation verleiht den Bisphosphonaten eine erhöhte Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau. (70)

Wie Pyrophosphat können auch Bisphosphonate an Hydroxylapatit binden, was sie für den therapeutischen Einsatz bei Knochenerkrankungen prädestiniert. (69, 70) Das erste klinisch genutzte Bisphosphonat war Etidronat, das 1977 die Zulassung zur Behandlung des Morbus Paget erhielt; einer chronischen Knochenkrankheit, die durch vermehrten subkortikalen Knochenabbau und anschließenden unorganisierten Knochenanbau gekennzeichnet ist.

Die zweite Generation der Bisphosphonate bilden die sogenannten Aminobisphosphonate, die an der R₁-Position eine Hydroxylgruppe und an der R₂-Position eine Aminogruppe tragen. Ein prominenter Vertreter dieser Gruppe ist die Alendronsäure, die eine etwa 400-fach höhere Affinität zu Hydroxylapatit aufweist als Etidronat. (69, 71) Die Entdeckung der Alendronsäure gelang im Jahr 1974. (71) Ihre Strukturformel ist in Abbildung 6 dargestellt. Im Jahr 1995 wurde sie von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung der postmenopausalen Osteoporose zugelassen. (71) Heute gelten Bisphosphonate als die am besten evidenzbasierte medikamentöse Therapieoption zur Reduktion osteoporotischer Frakturen. (72)

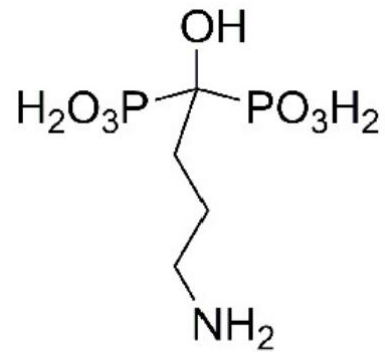


Abbildung 6: Strukturformel von Alendronsäure (modifiziert nach Abb. 2 Barbosa et al Journal of medicinal Chemistry 2022)

1.2.2 Wirkmechanismus von Bisphosphonaten

Wegen der hohen Affinität zu Hydroxylapatit (s.o.) werden Bisphosphonate nach Applikation rasch durch Osteoklasten intrazellulär aufgenommen. Durch die strukturelle Ähnlichkeit zu Pyrophosphat interagieren sie mit der Aminoacyl-tRNA-Synthase, die in Anwesenheit von Bisphosphonaten statt ATP das falsche Substrat Adenosin-5-O-(2,3-methylentriphosphat) bildet. Diese Verbindung kann nicht weiter verstoffwechselt werden, akkumuliert in den Osteoklasten und führt letztlich zu deren Apoptose. (69, 73)

Aminobisphosphonate besitzen darüber hinaus einen zweiten, zusätzlichen Wirkmechanismus. Sie hemmen das Enzym Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS), ein Schlüsselenzym des Mevalonatwegs, der eine zentrale Rolle im eukaryotischen Zellstoffwechsel spielt. (73) Die nachgeschalteten Metabolite dieses Weges sind essenziell für die Synthese von Steroiden und für die Funktion kleiner GTP-bindender Proteine (G-Proteine). (74) Eine Hemmung der FPPS führt somit zu einer Funktionsstörung der Osteoklasten, da die posttranslationale Prenylierung dieser GTPasen ausbleibt. (75)

Die Auswirkungen gehen jedoch weit über eine Funktionsstörung der Osteoklasten hinaus. Die Prenylierung von GTPasen ist elementar für die Regulation der Immunantwort, insbesondere über Rac1- und Rho-GTPasen, die an der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms beteiligt sind. (76–78) Durch die ausbleibende Prenylierung und damit fehlende Regulation von Rac1 kommt es zur Aktivierung des NLRP3-Signalweges, der wiederum über die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1β (IL-1β) und Interleukin-18 (IL-18) die Polarisation von M1-Makrophagen fördert. (76–81) Parallel dazu wurde gezeigt, dass TLR-4-vermittelte Signalwege ebenfalls zur durch Aminobisphosphonate ausgelösten Immunaktivierung beitragen können, indem sie über die Aktivierung von des Transkriptionsfaktors NF-κB die Rekrutierung von proinflammatorischen Makrophagen stimulieren. (82, 83) Diese kombinierte Aktivierung von NLRP3- und TLR-4-abhängigen Signalkaskaden kann als zentrale Grundlage der immunmodulatorischen Effekte von Aminobisphosphonaten angesehen werden.

Weber et al. zeigten 2021 in einem Tiermodell, dass es bei der intraperitonealen Applikation von Zolendronsäure, ein Bisphosphonat der 3. Generation, zu einem systemischen Anstieg von M1-Makrophagen kommt. (84) Hierbei wurden 120 Ratten in vier Gruppen unterteilt, wobei zwei Gruppen zusätzlich einem chirurgischen Trauma (Zahnextaktion und Tibiafraktur) ausgesetzt wurden. Unabhängig vom Trauma kam es in Lungen-, Milz- und Hautgewebe zu einer Repolarisation in Richtung M1-Makrophagen. Diese proentzündliche Antwort könnte zugleich eine Erklärung für das Auftreten von Kiefernekrosen liefern als bekannte Nebenwirkung der Bisphosphonattherapie liefern. (84)

Zusätzlich akkumulieren durch die Hemmung der FPPS Vorprodukte, die zu toxischen Metaboliten weiter verstoffwechselt werden und so ebenfalls die Apoptose der Osteoklasten einleiten. (75)

Durch die hohe Affinität zu Hydroxylapatit und damit die rasche Absorption im Knochen beträgt die orale Bioverfügbarkeit von Alendronsäure gerade einmal 0,9 – 1,8%. (85) Alendronsäure wird primär renal eliminiert, wobei etwa 40 – 60 % der applizierten Dosis langfristig im Knochengewebe eingelagert werden können, wo sie in Abhängigkeit vom Knochenstoffwechsel über Jahre persistieren. (85)

Da zahlreiche maligne Erkrankungen mit osteolytischen Knochenmetastasen assoziiert sind, lag es nahe, die therapeutische Wirksamkeit von Bisphosphonaten auch im onkologischen Kontext zu prüfen. Nach Lunge und Leber ist das Skelettsystem die dritthäufigste Lokalisation von Metastasen, wobei Prostata- und Mammakarzinome für bis zu 70 % der ossären Metastasen verantwortlich sind. (86) Ein Cochrane-Review aus dem Jahr 2017 zeigte, dass die Einnahme von Bisphosphonaten bei Frauen im frühen Stadium eines Mammakarzinoms mit einem reduzierten Risiko für das Auftreten ossärer Metastasen und einer verbesserten Gesamtüberlebensdauer assoziiert ist. (87) In weiteren Studien wurde untersucht, ob diese therapeutischen Effekte ausschließlich auf den bekannten Mechanismen beruhen oder ob zusätzliche antitumorale Eigenschaften bestehen. Es konnte gezeigt werden, dass Bisphosphonate eine Repolarisation von Tumor-assoziierten M2-Makrophagen (TAM) zu antitumoralen M1-Makrophagen induzieren. (88, 89) Des Weiteren wird die Differenzierung von Monozyten zu TAM beeinträchtigt. (90)

Um die immunmodulatorischen, antitumoralen und antifibrotischen Potenziale der durch Bisphosphonate induzierten Makrophagenrepolarisation therapeutisch gezielt zu nutzen, sind jedoch geeignete Trägersysteme erforderlich, die eine höhere extraskelletale Akkumulation ermöglichen. Ein vielversprechender Ansatz hierfür ist der Einsatz von Nanopartikeln – ein Konzept, das im folgenden Kapitel näher erläutert wird.

1.3 Nanopartikel

1.3.1 Allgemeines

Ein Nanometer entspricht einem Milliardstel Meter (10^{-9} m). Um diesen winzigen Größenbereich einzuordnen: Der Durchmesser von Axonen eines Neurons beträgt bei Säugetieren etwa 500 bis 10.000 nm (0,5–10 μ m), (91) während die Doppelhelix der DNA einen Durchmesser von etwa 2,5 nm aufweist. (92) Man mag zunächst vermuten, dass wir uns diesen Größenbereich erst dank modernster Technologien erschlossen haben. Dabei gibt es bereits Nachweise für Anwendung von Nanotechnologie in der Antike. Ein bekanntes Beispiel ist der sogenannte Lykurgbecher, ein im 4. Jahrhundert n. Chr. gefertigter römischer Trinkbecher aus dichroitischem Glas, das je nach Lichteinfall grün oder rot erscheint. Dieser Effekt beruht auf der Einlagerung von 50–100 nm großen Silber-Gold-Partikeln in das Glas. (93, 94)

Als Begründer der modernen Nanotechnologie gilt der Physik-Nobelpreisträger Richard Feynman, der mit seinem Vortrag „*There's Plenty of Room at the Bottom*“ (1959) die theoretischen Grundlagen legte. (94, 95) Spätestens mit dem Beginn des digitalen Zeitalters ist Nanotechnologie ein unverzichtbarer Bestandteil unseres Alltags geworden. So stellte IBM 2021 den weltweit ersten Mikroprozessor mit 2-nm-Technologie vor. (96) Neben industriellen Anwendungen nutzt auch die medizinische Forschung Nanotechnologie, um neuartige Therapiemöglichkeiten zu entwickeln und bestehende Hürden der Biodistribution und des zellulären Transports zu überwinden.

Nanopartikel lassen sich grundsätzlich in drei Hauptklassen einteilen: lipidbasierte, anorganische und polymere Nanopartikel. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt und sind in Abbildung 7 schematisch zusammengefasst.

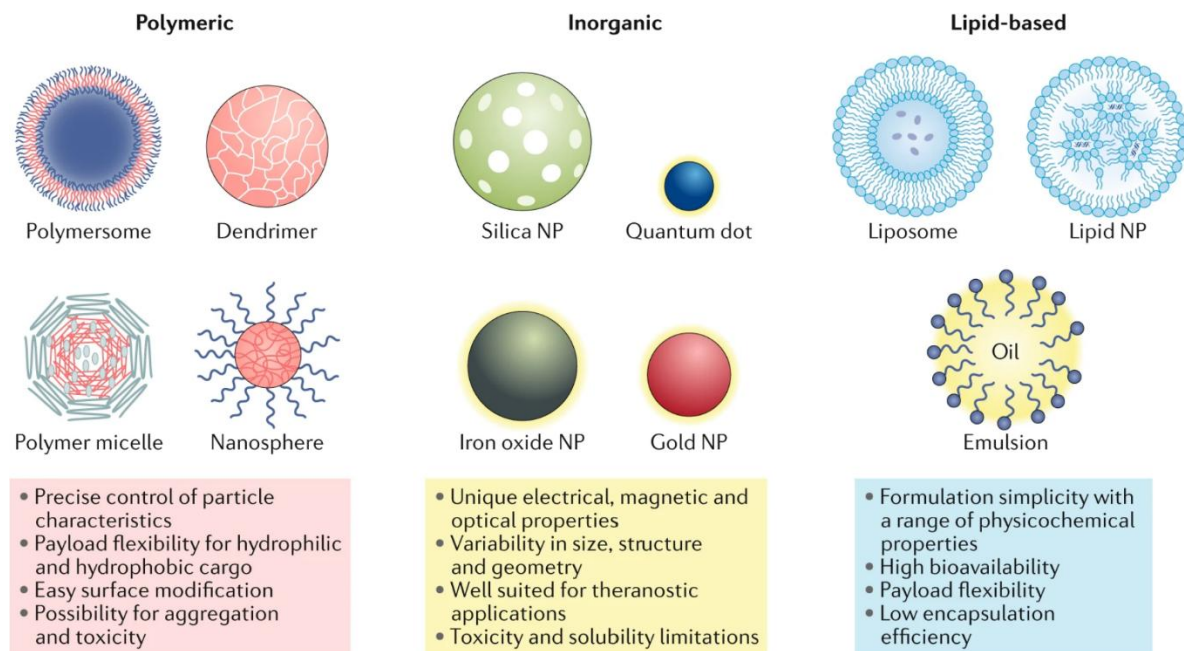


Abbildung 7: Kategorien von Nanopartikeln mit jeweiligen Charakteristika (modifiziert nach Fig. 2 *Classes of NPs* aus Mitchel et al Nature Reviews Drug Discovery 2021)

Lipidbasierte Nanopartikel bilden die am häufigsten von der FDA für therapeutische Zwecke zugelassene Kategorie. Sie lassen sich weiter in Liposomen, Emulsionen und Lipid-Nanopartikel unterteilen. (97) Allen gemeinsam ist eine lipidbasierte äußere Membran, die den Transport hydrophiler oder lipophiler Wirkstoffe im Inneren ermöglicht. Lipid-Nanopartikel bestehen typischerweise aus vier Komponenten: ionisierbaren Lipiden, die mit negativ geladenen Nukleinsäuren Komplexe bilden, sowie Phospholipiden, Cholesterin und Polyethylenglykol (PEG)-haltigen Lipiden. (97) Ein Nachteil dieser Partikelklasse liegt in der geringen Bioverfügbarkeit, da sie rasch von Leber und Milz aufgenommen werden. (98)

Anorganische Nanopartikel bestehen aus Materialien wie Gold, Silikaten oder Eisen und können als Nanosphären oder Nanokäfige („Nanocages“) synthetisiert werden. Diese metallischen Systeme weisen oftmals besondere physikalische Eigenschaften auf – beispielsweise zeigen Gold-Nanopartikel photothermische Effekte. (99) Die meisten von der FDA zugelassenen anorganischen Nanopartikel basieren auf Eisenoxid und werden etwa als Kontrastmittel als Alternative zu gadoliniumhaltigen Präparaten, oder in der Therapie von Eisenmangelzuständen eingesetzt. (97, 100) Ein limitierender Faktor ist die potenzielle Toxizität durch Schwermetallionen.

Polymere Nanopartikel sind aus Makromolekülen aufgebaut, die Wirkstoffe entweder im Partikelkern einschließen oder an der Oberfläche binden können. Ihr großer Vorteil liegt in der biologischen Abbaubarkeit, Wasserlöslichkeit und der hohen Variabilität in Größe und Form. (97, 101) Darüber hinaus lassen sich amphiphile Copolymer synthetisieren, bei denen unterschiedliche Polymere in Blöcken kombiniert werden, um gezielt deren chemische Eigenschaften zu nutzen. Ein Beispiel sind PEG-Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Nanopartikel (PEG-PLGA), die eine präzisere Zielstrukturerkennung ermöglichen und insbesondere in der Krebstherapie Anwendung finden. (102–104) PEGyliertes Interferon β -1a (Plegridy®), das 2014 zur Behandlung der Multiplen Sklerose zugelassen wurde, ist ein Beispiel für einen polymeren Nanopartikel. Durch die PEGylierung wird sowohl die Wirkstofflöslichkeit als auch die Halbwertszeit signifikant erhöht. (105, 106)

Neben der Materialklasse bestimmen auch physikochemische Parameter wie Partikelgröße, Form und Oberflächenladung (Zeta-Potential) wesentlich das Verhalten von Nanopartikeln im Organismus. Diese Faktoren beeinflussen Zellaufnahme, Zirkulationsdauer und Organdistribution entscheidend. (107, 108) Darüber hinaus können Nanopartikel durch

gezielte Oberflächenfunktionalisierung, wie etwa durch Konjugation von Antikörpern, Peptiden oder Zuckermolekülen, spezifisch an Zielzellen oder Gewebe gebunden werden. Diese sogenannte Targeting-Strategie ermöglicht eine verbesserte Anreicherung am Wirkort und reduziert systemische Nebenwirkungen. (108)

1.3.2 Nanogelee

Nanogelee sind vernetzte, dreidimensionale, polymere Nanopartikel mit einer hydrophilen Matrixstruktur. (109) Sie vereinen die Eigenschaften von Hydrogelen mit der Größe von Nanopartikeln und können dadurch große Mengen an Wirkstoffen, sowohl hydrophile als auch hydrophobe, aufnehmen und kontrolliert freisetzen. (109) Aufgrund ihrer hohen Wasseraufnahmefähigkeit und Biokompatibilität zählen Nanogelee zu den vielversprechendsten Trägersystemen in der modernen Nanomedizin.

Ein entscheidender Vorteil von Nanogelen gegenüber klassischen Nanopartikeln liegt in ihrer Struktur, die eine effiziente Passage biologischer Barrieren ermöglicht und das Risiko einer Erkennung durch das Immunsystem reduziert. (110) Ihre chemische Zusammensetzung und Quervernetzung kann gezielt angepasst werden, um Parameter wie Partikelgröße, Oberflächenladung und Abbaubarkeit zu steuern. Dadurch lassen sich Nanogelee auf spezifische Anwendungen zuschneiden, etwa für die pH- oder temperaturabhängige Freisetzung von Wirkstoffen oder für das gezielte Targeting bestimmter Gewebe. (110–112)

Besonders relevant sind Nanogelee im Wirkstoff- und Gentransport, da sie empfindliche Moleküle wie Proteine, Peptide oder Nukleinsäuren vor enzymatischem Abbau schützen und eine kontrollierte Abgabe am Zielort ermöglichen. (110, 112) Ihr hydrophiles Netzwerk minimiert zudem unspezifische Proteinadsorption und verlängert die Zirkulationsdauer im Blutkreislauf. (113, 114)

Die im Rahmen dieser Dissertation angewendeten Nanogelee wurden von [REDACTED] am Max-Planck-Institut für Polymerforschung bereitgestellt. Deren Synthese und kovalente Bindung mit Alendronat stellen somit keine eigene wissenschaftliche Leistung dar. Zum Verständnis soll das Vorgehen hier jedoch kurz erklärt werden und kann in Abbildung 8 nachvollzogen werden, die der Publikation von Kaps, Huppertsberg et al entnommen ist. (1)

Alendronsäure bietet als Aminobisphosphonat den Vorteil, dass ihre freie Aminogruppe eine kovalente Bindung an den Nanopartikel ermöglicht. Aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit und der chemisch hochreaktiven, polaren Aminogruppe entwickelte [REDACTED] in einer vorhergehenden Arbeit hydrolyseresistente, pH-abhängig abbaubare, auf Quadratsäure basierende Nanogelee. (111)

Für das in dieser Arbeit verwendete Nanogel wurde Alendronsäure zunächst durch eine Reaktion von Phosphortrichlorid und γ -Aminobuttersäure in Phosphorsäure und Methanschwefelsäure hergestellt (Abb. 8 A). Die für das Nanogel erforderlichen Blockcopolymere wurden anschließend mittels RAFT-Polymerisation („*reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization*“) eines Methacrylamid-Monomers mit funktioneller Quadratsäuregruppe hergestellt, an die anschließend PEG-Ketten transferiert wurden (Abb. 8 B). In polaren Lösungsmitteln bilden diese Blockcopolymere polymere Mizellen, die in weiteren Reaktionsschritten entlang der Aminogruppen pH-abhängig quervernetzt werden.

Zur Fluoreszenzmarkierung wurden Aminogruppen mit Oregon Green, einem fluoreszierenden Farbstoff, funktionalisiert, während Alendronsäure kovalent an freie Aminogruppen gebunden wurde. Das resultierende Nanogel ist pH-abhängig abbaubar und zersetzt sich unter sauren Bedingungen in einzelne Polymerketten (Abb. 8 C). Die erfolgreiche Kopplung von Alendronat wurde sowohl photometrisch durch eine Phosphatbestimmung als auch spektroskopisch bestätigt. Die in Abbildung 8 D gezeigten 35,5 % Bindungseffizienz

entsprechen nahezu dem theoretischen Maximum der möglichen Alendronat-Bindung an Quadratsäuregruppen. (1)

In weiteren Versuchen (Abb. 8 G) wurde die pH-abhängige Zersetzung des Alendronat-gekoppelten Nanogels untersucht und dessen Stabilität in humanem Blutplasma mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) bestätigt. Diese optische Methode misst Fluktuationen der Fluoreszenzintensität und erlaubt dadurch Rückschlüsse auf Partikelgröße, Wirkstoffbeladung und Stabilität in wässrigen Lösungen bzw. Plasma. (115) Hätten sich die Nanogelee nach Exposition in Blutplasma zersetzt und damit in ihrer Größe geändert, wäre es auch zu einer veränderten Fluoreszenz des am Nanogel gebundenen Oregon-Green-Farbstoffs gekommen. Da beide Messkurven nach 0 und 24h in Blutplasma identisch sind, konnte die Stabilität bestätigt werden.

Das Zeta-Potenzial (Abb. 8 F) beschreibt das elektrische Potenzial an der Oberfläche eines Partikels in Suspension oder Emulsion. Durch diese Oberflächenladung entsteht ein elektrisches Feld, das auf umgebende Ionen wirkt. Die Differenz dieses Potenzials kann als elektrische Spannung gemessen werden. Während unbeladene Nanogelee nahezu elektrisch neutral sind, weisen Alendronat-konjugierte Nanogelee eine negative Ladung auf. Dies bestätigt die erfolgreiche kovalente Bindung von Alendronsäure mit ihren negativ geladenen Phosphonatgruppen.

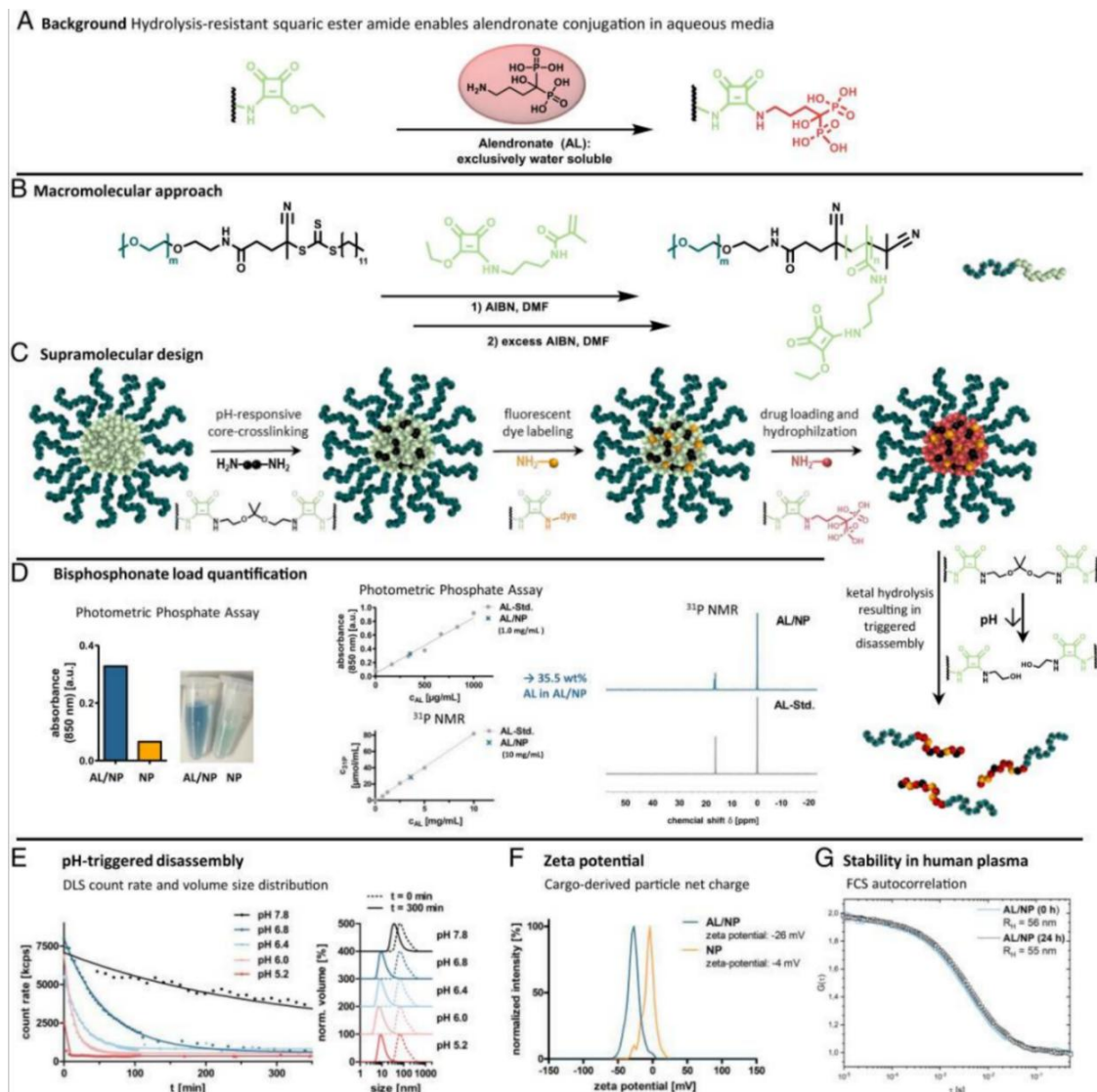


Abbildung 8: Herstellung von nanopartikulär gekoppeltem Alendronat und anschließende Charakterisierung (modifiziert nach Fig. 1 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

1.4 Tiermodelle der Leberfibrose

Zur Untersuchung pathophysiologischer Mechanismen und zur präklinischen Evaluation neuer Therapieansätze sind *in-vivo*-Modelle von zentraler Bedeutung. Sie ermöglichen es, komplexe Prozesse wie Entzündung, Zellinteraktionen und Matrixumbau im physiologischen Kontext abzubilden, was in *in-vitro*-Systemen nur eingeschränkt möglich ist.

Da die Ätiologie der Leberfibrose sehr heterogen ist, existiert eine Vielzahl unterschiedlicher experimenteller Modelle, die jeweils spezifische Aspekte der Erkrankung nachahmen. Unter Berücksichtigung ihrer klinischen Relevanz sollen im Folgenden die wichtigsten Tiermodelle vorgestellt werden. Einige davon sind gezielt auf bestimmte Pathologien wie die PBC, MASH oder AIH ausgerichtet, während andere Modelle insbesondere zur Untersuchung allgemeiner Mechanismen der Fibrogenese geeignet sind.

1.4.1 chemisch induzierte Fibrosemodelle

Zur experimentellen Induktion einer Leberfibrose werden verschiedene chemische Substanzen eingesetzt, darunter Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄), Thioacetamid (TAA), Dimethylnitrosamin (DMN), Diethylnitrosamin (DEN) sowie Paracetamol. Diese Modelle zeichnen sich durch eine gut kontrollierbare Dosis-Wirkungs-Beziehung und reproduzierbare pathophysiologische Veränderungen aus.

Eine Intoxikation mit **Paracetamol** stellt in vielen Ländern die häufigste Ursache für ein akutes Leberversagen dar. In Großbritannien werden jährlich rund 90.000 Fälle mit ca. 150 – 250 Todesfällen registriert. (116) Für Deutschland liegen keine gesicherten Daten zur Prävalenz vor, wobei hierzulande Paracetamol nur in 9% der Fälle ursächlich für ein akutes Leberversagen ist. (117) Durch die momentan über Social-Media verbreitete „Paracetamol-Challenge“, eine Mutprobe, bei der es darum geht, eine möglichst hohe Dosis Paracetamol zu überleben, ist diese Art der Vergiftung erschreckend relevant geworden. Im Februar 2025 warnte u.a. die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft vor dieser Praxis und wies auf die erheblichen Gefahren einer Überdosierung hin. (118)

Das hepatotoxische Zwischenprodukt N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI) entsteht während der Metabolisierung von Paracetamol. Bei Glutathionmangel kann NAPQI nicht inaktiviert werden, wodurch es zur oxidativen Schädigung der Hepatozyten kommt. Therapeutisch erfolgt die Gabe von Acetylcystein (ACC) als Antidot gemäß dem Prescott-Schema. (119) Auf molekularer Ebene führt NAPQI zu einer vermehrten Expression von α -SMA und zur Aktivierung hepatischer Sternzellen. (120)

Ein Paracetamol-basiertes Tiermodell ermöglicht daher die experimentelle Induktion einer Leberfibrose. (120) Tropkaya et al. (2020) beschrieben ein Protokoll, bei dem sich nach dreiwöchiger oraler Gavage von 500 mg/kg Paracetamol in Maisöl eine biliäre Zirrhose entwickelt, histologisch vergleichbar mit einer primär biliären Cholangitis (PBC). (121)

Die Nitrosamine **DEN** und **DMN** sind stark karzinogene Verbindungen, die ubiquitär in niedrigen Konzentrationen vorkommen. Aufgrund ihres kanzerogenen Potenzials wird in Deutschland die Nitratbelastung des Trinkwassers überwacht, da Nitrat im Körper zu Nitrit reduziert wird und daraus Nitrosamine gebildet werden können. Epidemiologische Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen einer hohen Aufnahme nitrosaminhaltiger Nahrungsmittel, wie etwa stark verarbeitete Fleischprodukte, und der Entstehung von Magen- und Ösophaguskarzinomen. (122–124) Darüber hinaus wird eine Rolle von Nitrosaminen in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung diskutiert. (125) Bekanntheit erlangten Nitrosamine auch durch den sogenannten „Valsartan-Skandal“ im Jahr 2018, als

Verunreinigungen mit Nitrosodimethylamin (NDMA) in Antihypertensiva nachgewiesen wurden. (126)

Tolba et al. (2015) veröffentlichten standardisierte Sicherheitsrichtlinien und ein Protokoll zur Induktion von Leberfibrose durch DEN und DMN. Eine Langzeitapplikation führt zusätzlich zur Entstehung von HCC. (127) Ein Nachteil ist die lange Versuchsdauer von bis zu 50 Wochen. (127) In einem 20-wöchigen Modell von Ding et al. (2017) traten zunächst entzündliche Veränderungen (Woche 2–6), anschließend fibrotische Umbauprozesse (Woche 8–12) und schließlich kam es zu Bildung von HCC. (Woche 14–20) auf. (128)

TAA kann zur industriellen Erzeugung von Schwefelwasserstoff verwendet werden, wird aber hauptsächlich in der tierexperimentellen Forschung zur Induktion von Leberfibrose und Tumorgenese verwendet. Bei der Metabolisierung entstehen Schwefeloxide, die über oxidativen Stress und durch Lipidperoxidation die hepatozelluläre Membran schädigen. Es kommt hierbei zur Aktivierung der TGF- β -Signalkaskade und zur Differenzierung hepatischer Sternzellen zu Myofibroblasten. (129) Es gibt diverse publizierte Versuchsprotokolle zur TAA-Anwendung, beispielsweise sei hier auf die Publikation von Popov et al. 2011 verwiesen. (130)

CCl₄ wurde 1839 durch den französischen Chemiker Henri Victor Regnault erstmals synthetisiert und fand bis Mitte des 20. Jahrhunderts breite Verwendung zur chemischen Reinigung von Textilien und als Lösungsmittel in Feuerlöschern. (131) Neben der bekannten hepatotoxischen Wirkung schädigt CCl₄ auch die Ozonschicht, weswegen es 1997 in das Montreal-Protokoll aufgenommen wurde. (132) Die Herstellung, der Vertrieb und die industrielle Verwendung von CCl₄ ist damit international verboten. Es darf nur noch zu Forschungszwecken verwendet werden.

CCl₄ wird durch das Enzym Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) zu Trichlormethyl- und Trichlormethylperoxy-Radikalen metabolisiert. (133) Diese hochreaktiven Spezies reagieren mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Zellmembranen und initiieren somit die Lipidperoxidation, während gleichzeitig proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und NO freigesetzt werden. (133–135) Die resultierenden Gewebeschäden aktivieren Reparaturmechanismen, und über die Freisetzung von TGF- β und IL-10 wird die Fibrogenese initiiert. (135, 136)

Gemäß des toxikologischen Berichts der US-Umweltbehörde (U.S. Environmental Protection Agency) beträgt die biologische Halbwertszeit von CCl₄ etwa vier Stunden. Rund 19 % werden unverändert über die Atemluft, 28 % als CO₂ und 0,11 % als Chloroform abgeatmet. 2,9 % der Metaboliten verbleiben gebunden in der Leber, während 2,7 % über den Urin und 11 % fäkal ausgeschieden werden. (137)

1.4.2 immunologisch induzierte Fibrosemodelle

Concanavalin A (Con A) ist ein aus dem Samen der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) isoliertes Lektin. Es bewirkt eine Aktivierung und Rekrutierung von T-Lymphozyten und wird daher hauptsächlich zur experimentellen Erforschung der Autoimmunhepatitis (AIH) eingesetzt. (138, 139) Nach intravenöser Applikation bindet Con A spezifisch an Glykoproteine auf der Oberfläche von T-Zellen und führt zu deren massiver Aktivierung und Proliferation. In der Folge werden proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-6 (IL-6) freigesetzt, die eine ausgeprägte Entzündungsreaktion im Leberparenchym hervorrufen. (140–143)

Neben der direkten Schädigung von Hepatozyten spielen auch nichtparenchymale Zellen, insbesondere Kupffer-Zellen und hepatische Sternzellen, eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der ConA-induzierten Leberschädigung. Kupffer-Zellen amplifizieren die

Immunantwort durch zusätzliche Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, während aktivierte Sternzellen zur Entwicklung einer sekundären Fibrose beitragen. (144)

Bei wiederholter oder langfristiger Gabe von Con A über mehrere Wochen kann somit im Tiermodell eine chronische Entzündung mit nachfolgender Fibrogenese induziert werden (143, 145). Dieses Modell besitzt aufgrund seiner immunvermittelten Mechanismen eine hohe Relevanz für das Verständnis autoimmuner Lebererkrankungen, wie sie beispielsweise bei der Autoimmunhepatitis vorkommen. (138)

1.4.3 chirurgisch induzierte Fibrosemodelle

Zur *in vivo*-Untersuchung cholestatischer Lebererkrankungen wird häufig die chirurgische Ligatur des *Ductus choledochus* eingesetzt. Nach etwa drei bis vier Wochen kommt es infolge der Gallenstauung zu ausgeprägten fibrotischen Umbauprozessen in der Leber. (146, 147) Neben der vollständigen Ligatur existieren auch modifizierte Verfahren, beispielsweise die Teilligatur des Gallengangs oder die spätere Anastomisierung zwischen Gallenblase und Jejunum zur Wiederherstellung des Gallenflusses. Diese Varianten erlauben die Untersuchung von Reversibilitätsmechanismen nach Cholestase. (146) Ein wesentlicher Nachteil chirurgisch induzierter Modelle besteht jedoch in der hohen perioperativen Mortalität, die sowohl auf die technische Komplexität des Eingriffs als auch auf postoperative Komplikationen wie beispielsweise Infektionen zurückzuführen ist. (148)

1.4.4 weitere Mausmodelle

Transgene Mausmodelle ermöglichen die gezielte Untersuchung spezifischer molekularer Mechanismen bei der Entstehung und Progression der Leberfibrose. Angesichts der Vielzahl verfügbarer Linien ist eine detaillierte Auflistung hier nicht zielführend. Aufgrund ihrer klinischen Relevanz soll jedoch exemplarisch das humanisierte TK-NOG-Mausmodell erwähnt werden, das vor allem zur Erforschung viraler Lebererkrankungen, insbesondere der Hepatitis C, eingesetzt wird. (149, 150)

Ein weiteres etabliertes Modell stellt die MDR2-Knockout-Maus dar, bei der das für den Phospholipidtransport verantwortliche *Abcb4*-Gen ausgeschaltet wurde. Diese Tiere entwickeln eine chronisch cholangitisartige Entzündung mit nachfolgender Fibrose und dienen somit als präklinisches Modell für die primär biliäre Cholangitis (PBC). (151)

Neben genetischen Ansätzen existieren nutritive Modelle, die diätinduzierte Stoffwechselveränderungen nachbilden. Die cholin- und L-Aminosäure-defiziente (CDAA)-Diät sowie die methionin- und cholin-defiziente (MCD)-Diät führen in Mäusen zu Steatohepatitis mit inflammatorischer Aktivierung und fibrotischem Umbau, was sie zu gängigen Modellen der MASH macht. (152)

1.5 Ziel der Dissertation

In den vorangegangenen Kapiteln wurden Diagnostik, klinischen Aspekte und insbesondere die pathophysiologischen Mechanismen der Leberfibrose dargestellt. Im Anschluss erfolgte eine detaillierte Beschreibung der Rolle von Makrophagen und ihrer unterschiedlichen Polarisationszustände bei der Entstehung und Progression der Erkrankung. Bis zum aktuellen Zeitpunkt (Stand: Dezember 2025) gibt es weltweit keinen spezifisch die Leberfibrose adressierenden und zugelassenen Wirkstoff. Die Prävention beziehungsweise die Umkehr fibrotischer Umbauprozesse stellt daher einen zentralen Bestandteil aktueller translationaler Forschungsbemühungen dar. (25)

Ein vielversprechender Ansatz in der antifibrotischen Therapie ist die gezielte Modulation von Lebermakrophagen, die als essenzielle Effektorzellen des angeborenen Immunsystems maßgeblich an der Regulation von Entzündungsreaktionen und zellulären Reparaturmechanismen beteiligt sind.

Bisphosphonate wie Alendronat konnten in murinen Tumormodellen eine Repolarisation von Makrophagen vom M2- in den M1-Phänotyp induzieren. (88, 89) Wie im Kapitel zu den Bisphosphonaten erläutert, besitzen diese Substanzen jedoch eine ausgeprägte Affinität zu Hydroxylapatit im Knochengewebe, was ihre systemische Bioverfügbarkeit erheblich einschränkt. Durch den Einsatz spezieller Nanopartikel soll die Bioverfügbarkeit von Alendronat in der Leber verbessert und eine gezielte Ansteuerung von Makrophagen, insbesondere des M2-Phänotyps, ermöglicht werden.

Im Kapitel zu Nanopartikeln wurden die unterschiedlichen Klassen von Trägersystemen und deren therapeutische Einsatzmöglichkeiten beschrieben. Darauf aufbauend wurden Synthese, Testung und Charakterisierung des in dieser Arbeit verwendeten nanopartikulär gekoppelten Alendronats erläutert. Der pH-abhängige Abbau der Nanogelee besitzt hierbei besondere Relevanz, da ein saures Mikromilieu ein charakteristisches Merkmal entzündlicher Prozesse darstellt – wie es auch im Rahmen der fibrotischen Lebererkrankung vorzufinden ist. (153)

Im Anschluss erfolgte eine Übersicht über die verschiedenen etablierten Tiermodelle der Leberfibrose. Unter Berücksichtigung der im Tierversuchsantrag festgelegten Rahmenbedingungen wurde das Mausmodell einer CCl₄-induzierten Leberfibrose ausgewählt, deren Induktion mittels oraler Gavage nach einem von uns optimierten Protokoll erfolgte. Dieses Modell erlaubt eine kosteneffiziente und zeitlich relativ rasche Induktion einer ausgeprägten parenchymatösen Fibrose und eignet sich insbesondere zur Überprüfung von Hypothesen, die auf eine Hemmung und auch Reversibilität der Leberfibrose abzielen. (154) Das CCl₄-Modell stellt das am weitesten verbreitete Tiermodell zur Untersuchung der Leberfibrose dar und wurde allein bis 2015 in über 50 000 Studien weltweit eingesetzt. (155)

Die daraus abgeleitete Hypothese lautet: Kann durch nanopartikulär gekoppeltes Alendronat eine effektive Repolarisation von Lebermakrophagen erzielt werden, die damit eine antifibrotische Immunmodulation ermöglicht?

Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten zunächst *in vitro*-Versuche zur Optimierung und Effektivitätsevaluation durchgeführt werden, gefolgt von einer *in vivo* Testung und Analyse im murinen Modell der CCl₄-induzierten Leberfibrose.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Nachfolgend werden die verwendeten Materialien, nach Untergruppen sortiert, tabellarisch aufgelistet.

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
96-well fast thermal cycling	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Arbeitshandschuhe	Starlab International GmbH
BD Microlance needle 26Gx1/2	BD Biosciences GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Beutel zum Einmalgebrauch	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Cell Scraper 28 cm long sterile	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
DAKO Pen	Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, USA)
Deckgläser 24x50 mm	Diagonal GmbH & Co. KG (Münster, Deutschland)
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Histosette tissue cassettes	Simport Scientific Inc. (Bernard-Pilon Beloeil, Kanada)
Inject-F Feindosierungsspritze 1ml	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)
Injektionsnadel (22 G, 25 G, 30 G)	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)
Injektionsspritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)
Insulinspritzen	BD Biosciences GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Kryo-Einfrierröhrchen (Cryo.S 2ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Kugeln aus rostfreiem Stahl	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
MicroAmp optical adhesive film	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Safe-Lock Tubes Reaktionsgefäß (0,2 ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Mikrotomklingen	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Mikrotomklingen MX 35 Premier	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Objektträger zur Bestimmung der Zellzahl	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
PCR tubes 0.2 ml Flat cap	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Petrischale 94/16mm steril	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

Pipettenspitzen gestopft (0,1-20µl, 100µl, 200µl, 1ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Polysine Objektträger	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Reagenzreservoir	VWR International (Radnor, USA)
Reagenzreservoir steril (25ml)	VWR International (Radnor, USA)
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50ml) (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Spritzenvorsatzfilter steril 0,2 µM	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Vakuumfiltrationseinheit 0,2 µM	VWR International (Radnor, USA)
Zählkammer (Neubauer)	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Zellkulturflaschen (Cellstar) (T25, T75, T175)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturplatten (6-Well, 12-Well, 24-Well, 96-Well)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellsieb (70 µM)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

Tabelle 1 Verbrauchsmaterialien

2.1.2 Zellkulturmedien

Name	Hersteller
Dulbeccos modified eagles medium (DMEM) Low Glucose und High Glucose	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
Iscove Modified DMEM (IMDM) ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

Tabelle 2 Zellkulturmedien

2.1.3 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklave	Systec V150	Systec GmbH & Co. KG (Linden, Deutschland)
CO ₂ -Inkubator	Hera cell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc. (Pittsburgh, USA)
Computer	Optiplex 7010	Dell Technologies Inc. (Round Rock, USA)
Dampfkochtopf	Vita Cuisine	Tefal S.A.S (Geislingen an der Steige, Deutschland)
Drucker	HL-4150CDN	Brother Industries Ltd. (Nagoya, Japan)
Eismaschine	ZNE 125	Ziegra Eismaschinen GmbH (Isernhagen, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop-Kamera	AxioCam MRc	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
FACS-Gerät	BD FACSCanto II	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Flüssigstickstofftank	Locator 6PLus	Thermo Fisher Scientific Inc. (Pittsburgh, USA)
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr Premium	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)

Gefrierschrank (-80 °C)	Hera Freeze HFU 586	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Heißwasserbad (Paraffineinbettung)	Leica HI1210	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Heizblock (digital)	VWR digital heatblock	VWR International (Radnor, USA)
Heizplatte	MR 3001	Heidolph Scientific Products GmbH (Schwabach, Deutschland)
IVIS Spectrum Imaging System	/	Caliper LifeSciences (Hopkinton, USA)
Ofen	Function Line B12	Heraeus Group (Hanau, Deutschland)
Kühlschrank (4 °C)/ (4 °C/-20 °C)	Profi Line	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)
Laborwerkbank	Pumpe Lab Bench	KNF DAC GmbH (Hamburg, Deutschland)
LightCycler	StepOnePlus™ Real-time PCR-System	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Magnetrührer	IKA® RCT basic IKAMAG™ Safety Control	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Mikroskop	Axiovert40 CFL	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
	CK2	EVIDENT Europe GmbH (Hamburg, Deutschland)
	AX10	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Mikrotom	RM2255	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Mikrotom-Wasserbad	HI1210	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Mikrozentrifuge	Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
	Ministar	VWR International (Radnor, USA)
Multipipettierhilfe	Ergo One	Starlab International GmbH (Hamburg, Deutschland)
pH-Meter	HI 9321	Windaus Labortechnik GmbH & Co. KG (Clausthal-Zellerfeld, Deutschland)
Photometer	Infinite M 200 Pro	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
	Gene Quant pro	GE Medical Systems Deutschland (Solingen, Deutschland)
Plas Labs™ Broome-Restrainer für Kleinnager	551BSRR	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Plattformschüttler (rotierend)	Rotamax 120	Heidolph Scientific Products GmbH (Schwabach, Deutschland)

Schüttler	Vibrax VXR	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Serologische Pipettierhilfe	Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, Deutschland)
Sicherheitswerkbank	Hera Safe KS	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Mastercycler Gradient	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	T 100 Thermal cycler	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Thermoschüttler	Thermo mixer compact	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc. (Bohemia, USA)
Waage	M-Pact AX2202	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Wasseraufbereitungssystem	Purelab Ultra	ELGA Veolia (Celle, D)
Wasserbad	JB4	Grant Instruments Europe B.V. (Amsterdam, Niederlande)
	Aqualine 2	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG (Lauder-Königshofen, Deutschland)
	Aqualine 12	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG (Lauder-Königshofen, Deutschland)
Zellzähler (Hämozytometer), automatisch	TC20	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X3R, 400R	Heraeus Group (Hanau, Deutschland)
	5804 R	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	5415R	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Fresco 21	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

Tabelle 3 Geräte

2.1.4 Kits

Kits	Hersteller
cDNA Super Mix reverse transcription kit	Quantabio (Beverly, USA)
Liver Dissociation Kit mouse	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Ready to use IHC/ICC kit	BioVision Inc. (Waltham, USA)

Tabelle 4 Kits

2.1.5 Primer

Zielgen	Forward Primer (5'-3')	Antisense Primer (3'-5')
β-Actin	GGCATTGTTACCAACTGGGACGAC	CCAGAGGCATACAGGGACAGCACAG
IL-10	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
YM-1	AGAAGGGAGTTTCAAACCTGGT	GTCTTGCTCATGTGTGTAAGTGA
CCL-2	GGCTCAGCCAGATGCAGTTAA	CCTACTCATTGGGATCATCTTGCT
CD206	AAGGCTATCCTGGTGGAAGAA	AGGGAAGGGTCAGTCTGTGTT

Tabelle 5 Primer für RT-qPCR

2.1.6 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
2-Propanol	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
70% Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniaklösung 32%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Beta-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
Chloroform	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Citric acid	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
DEPC treated water	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
DMSO	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
Dulbecco PBS	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
Eisessig	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
eBioscience™ Fixierbarer Vitalitätsfarbstoff eFluor™ 506	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Eosin	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)

Essigsäure	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
Ethanol Absolute	VWR International (Radnor, USA)
Ethidiumbromidlösung 0,025%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Kaliumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Ketamin Hameln 50mg/ml	Hameln pharmaceuticals (Hameln, Deutschland)
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Mayers Hämlaunlösung	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
Normal Horse Serum	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Nuklease-freies Wasser	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
Paraffin	Merck (Darmstadt, D)
Pen-Strep	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Pikrinsäurelösung 1,3%	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
Proteinase K	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Reinigungsmittel RNase Away	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Resazurin	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
RNA – Solv Reagent	Omega Bio-tek Inc (Georgia, USA)
Rompun 2%	Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)
Roti® Histokitt II	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure	VWR International (Radnor, USA)
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Triton-X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Trypan blue solution	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
Trypsin	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Tri-Natrium-Citrat Dihydrat	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)

Trizma base	Sigma-Aldrich (Mutter: Merck Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	VWR International (Radnor, USA)
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Xylol	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 6 Reagenzien

2.1.7 Rezepte

Produkt	Rezept
Methanol-Eisessig Lösung	90% Methanol 10% Eisessig
0,1M Citratpuffer	2,94g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (10x Citratpuffer) In 1000 ml Aqua dest lösen. Mit 1M HCL auf pH=6 einstellen
Angesäuertes Wasser	5ml Essigsäure (wasserfrei, syn: glacial) 1000ml dd H ₂ O
Antigen-Rückgewinnungspuffer (Zitratpuffer)	2,94 g Trinatriumcitrat In 1 L dH ₂ O lösen pH auf 6.0 einstellen
Chloramine-T-Lösung	150 mg/ml Chloramine T in 0,1 M Citratpuffer pH=6
Ehrlich-Reagenz	1,25 g Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml destilliertes Wasser
FACS Fixation buffer	0,4% Formaldehyd in PBS
PBS-EDTA	PBS EDTA 10 mmol/l
Picro-Siriusrot-Färbelösung	0,5g Siriusrot 500ml Gesättigte wässrige Pikrinsäure-Lösung
Phosphate buffered saline (PBS) 10X Stammlösung	137 mM NaCl (80 g) 2.0 mM KCl (2 g) 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ 14.4 g) 1.8 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄ 2.4 g) In 1 L dH ₂ O lösen pH auf 7.4
RBC-Lysepuffer	174 mM (9,3g) Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) 10 mM (1g) Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃) 0.1 mM (0,2 ml) Natriummethylen-diamin-tetraessigsäure (Na-EDTA) In 1 L dH ₂ O lösen pH mit HCL auf 7.3 einstellen
PBST 1X	100 ml der 10X PBS-Stammlösung 900 ml d H ₂ O, 1 ml Tween 20
TBST 1X	100 ml der 10X TBS-Stammlösung 900 ml d H ₂ O, 1 ml Tween 20
PEB Puffer	2 mM EDTA (4ml aus der 0.5M Stammlösung) EDTA) 0.5% bovine serum albumin (BSA) auf ein Volumen von 1L mit 1xPBS auffüllen
Tail Buffer	100mM Tris-HCl pH 8,5

	5mM EDTA 0,2% SDS 200 mM NaCl In 500 ml dH ₂ O (Steril filtern)
PBS (ohne Magnesium, ohne Calcium, für Zellkultur)	1l autoklaviertes, destilliertes Wasser 8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O 0,24 g KH ₂ PO ₄
DAPI Färbelösung	10 µl DAPI- Lösung (1 mg/ml) auf 10 ml Methanol
DAB-Entwickler-Lösung	5 ml destilliertes Wasser 2 Tropfen DAB Reagenz 1 (Puffer) 4 Tropfen DAB Reagenz 2 (DAB-Substrat) 2 Tropfen DAB Reagenz 3 (Meerrettichperoxidase-Substrat) DAB Substrat Kit
TBS (trisgepufferte Salzlösung) 1x	100 ml 10X TBS-Stammlösung 900 ml destilliertes Wasser 1 ml Tween 20
TBS-Stammlösung 10x	24.2g Trizma Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃) 80g NaCl 1 l destilliertes Wasser (entmineral.) pH auf 7,6
Wasserstoffperoxid 3%	1 ml 30% Wasserstoffperoxid 99 ml TBS

Tabelle 7 Rezepte

2.1.8 Zytokine

Zytokine (murin)	Hersteller
M-CSF	ImmunoTools GmbH (Friesoythe, Deutschland)
IL-4	ImmunoTools GmbH (Friesoythe, Deutschland)
IL-13	ImmunoTools GmbH (Friesoythe, Deutschland)
IFN-γ	ImmunoTools GmbH (Friesoythe, Deutschland)
LPS	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

Tabelle 8 Zytokine

2.1.9 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Katalognummer/ Chargennummer (LOT)
Anti-α-SMA Antibody	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)	ab124964
FITC anti-mouse CD 45 Antibody	BioLegend (San Diego, USA)	30-F11

PE anti-mouse F4/80 Antibody	BioLegend (San Diego, USA)	BM8
Pacific Blue™ anti-mouse/human CD11b Antibody	BioLegend (San Diego, USA)	M1/70
PE anti-mouse CD31 Antibody	BioLegend (San Diego, USA)	MED13.3
PE anti-Albumin Serum	R & D Systems (Boston, USA)	188835
PE anti-mouse CD3 Antibody	BioLegend (San Diego, USA)	17A2
FITC anti-mouse NK-1.1 Antibody	BioLegend (San Diego, USA)	PK136
FITC anti-mouse CD45 Antibody	BioLegend (San Diego, USA)	30-F11
Pacific Blue™ anti-mouse CD11c Antibody	BioLegend (San Diego, USA)	N418
BD Pharmingen™ PE Rat Anti-mouse CD90.2	BD Biosciences GmbH (Heidelberg, Deutschland)	53-2.1
APC anti-mouse IL-10 Antibody	BioLegend (San Diego, USA)	JES5-16E3
APC anti-mouse CD206 Antibody	BioLegend (San Diego, USA)	C068C2
PE anti-mouse IFN-γ Antibody	BioLegend (San Diego, USA)	XMG1.2

Tabelle 9 Antikörper

2.1.10 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
Raw Makrophagen (Raw 264.7)	Murine Mausmakrophagen (aus Aszites männlicher BALB/c Mäusen mit Abelson-Mausleukämievirus induziertem Tumor)	AG Schuppan
3T3 Fibroblasten	Murine embryonische Fibroblasten (aus einem Mausembryo isoliert)	AG Schuppan
BMDM	Aus murinem Knochenmark isolierte Monozyten	AG Schuppan

Tabelle 10 Zelllinien

2.1.11 Statistische Auswertung

Die Erstellung von Graphiken und die statistische Berechnung wurde mit Microsoft Excel und Graph Pad Prism Version 7 und Version 10.6 durchgeführt.

2.2 In vitro Methoden

2.2.1 Zellkultur

A Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Sämtliche Materialien, die von außen in den sterilen Arbeitsbereich eingebracht wurden, waren zuvor autoklaviert, desinfiziert oder steril filtriert.

Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurde das jeweilige Wachstumsmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) supplementiert. Für die kurzfristige Lagerung wurden die Zellen bei -80°C aufbewahrt.

Zum Start einer Zellkultur wurden eingefrorene Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad für etwa 5 min aufgetaut, anschließend mit 10 ml Kulturmedium in einer 10 ml-Pipette aufgenommen und in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation (10 min, 1000 rpm) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche mit 15 ml Medium ausgesät.

Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO_2 . Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 75 % wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin oder Accutase vom Flaschenboden gelöst. Bei Bedarf wurde ein Zellschaber eingesetzt. Die Einwirkzeit der Enzyme betrug etwa 3 min.

Verwendete Zelllinien und ihre Kulturbedingungen:

- Raw Makrophagen:
 - o Medium: DMEM low glucose
 - o Supplemente: 10% FBS, 5ml Pen/Strep (100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin), 5ml Glutamin (entspricht 2 mM im Medium)
- 3T3 Fibroblasten:
 - o Medium: DMEM low glucose
 - o Supplemente: 10% FBS, 5ml Pen/Strep (100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin), 5ml Glutamin (entspricht 2 mM im Medium)
- Bone marrow derived Macrophages (BMDM):
 - o Medium: IMDM ohne Phenolrot
 - o Supplemente: 10% FBS, 5ml Pen/Strep (100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin), 5ml Glutamin (entspricht 2 mM im Medium), 25 ng/ml murines M-CSF

Vor jedem Experiment wurde die Zellzahl bestimmt. Hierzu wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau versetzt und die Zellzahl automatisiert ermittelt. Bei Unklarheiten erfolgte eine zusätzliche manuelle Zählung mit einer Neubauer-Zählkammer. Experimente wurden ausschließlich mit Zellpopulationen durchgeführt, deren Vitalität $> 90\%$ betrug.

2.2.2 Extraktion und Differenzierung von BMDM

Bone-Marrow-Derived Macrophages (BMDM) sind aus dem Knochenmark gewonnene Zellen, die unter Zugabe spezifischer Wachstumsfaktoren in vitro zu reifen Makrophagen differenziert werden.

Die Zellen stammten aus 6–9 Wochen alten, weiblichen BALB/c-Mäusen. Die Tiere wurden gemäß dem genehmigten Tierversuchsantrag durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die Mäuse auf einer Styroporunterlage fixiert und mehrfach äußerlich mit 70 % Ethanol desinfiziert. Mittels einer Schere erfolgte eine longitudinale Inzision der Haut im Abdominalbereich, gefolgt vom Abziehen des Fells entlang des Körperstamms und der

Extremitäten. Nach Luxation des Hüftgelenks wurden beide Hinterbeine abgetrennt. Der verbleibende Kadaver wurde entsprechend den Sicherheitsvorschriften entsorgt.

Die abgetrennten Beine wurden in 70 % Ethanol überführt, auf eine sterile Werkbank gebracht und dort unter sterilen Bedingungen weiterpräpariert. Nach Entfernung der Muskulatur wurden die freigelegten Tibien und Femora erneut mit 70 % Ethanol desinfiziert und anschließend mit sterilem PBS gespült. Mit einer feinen Schere wurden die Epiphysen entfernt, sodass die Diaphysen beider Knochen eröffnet waren. Das Knochenmark wurde mithilfe einer 21G-Kanüle und 10 ml Wachstumsmedium ausgespült. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurde das Knochenmark homogen resuspendiert.

Die Suspension wurde durch ein 70 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Falconröhrchen filtriert, um Gewebereste zu entfernen, und bei 300G für 8 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte eine Erythrozytenlyse mittels *Red Blood Cell Lysis Buffer* (RBC-Lysepuffer). Hierzu wurden die Zellen mit 5–10 ml Lysepuffer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 40 ml IMDM verdünnt und erneut bei 300G für 8 min zentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml IMDM resuspendiert und die Zellzahl wurde automatisiert bestimmt. Nur Zellpräparationen mit > 90 % Vitalität wurden weiterverwendet. Anschließend erfolgte das Ausplattieren in sterilen Petrischalen mit einer Zelldichte von 2×10^6 lebenden Zellen pro Schale. Das Kulturmedium bestand aus IMDM ohne Phenolrot, ergänzt mit o.g. Supplementen und 25 ng/ml murinem M-CSF als Wachstumsfaktor.

Am vierten Tag wurde die Hälfte des Mediums gegen frisches Medium mit erneutem Zusatz von 25 ng/ml M-CSF ausgetauscht. Nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen lagen differenzierte, adhärente Makrophagen vor.

Zur funktionellen Polarisierung wurden die differenzierten Makrophagen 24 h unter folgenden Bedingungen inkubiert:

- M0-Makrophagen: 25 ng/ml M-CSF
- M1-Makrophagen: 0,1 µg/ml LPS + 50 ng/ml IFN-γ
- M2-Makrophagen: 20 ng/ml IL-4 + 20 ng/ml IL-13

Zum Ernten der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS + 10 mM EDTA inkubiert und die Petrischalen 15 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst und für die nachfolgenden Experimente weiterverarbeitet.

2.2.3 in vitro Zytotoxizität

Die Bestimmung der in-vitro-Zytotoxizität erfolgte mittels alamarBlue™-Assay (Thermo Fisher Scientific). Dieser basiert auf der Reduktion des blauen Redoxindikators Resazurin zu Resorufin, einem roten, stark fluoreszierenden Farbstoff. Die Umwandlung erfolgt NADH-abhängig in vitalen Zellen und erlaubt somit eine indirekte Quantifizierung der metabolischen Aktivität als Maß für die Zellvitalität.

Für den Assay wurden 5×10^3 Zellen pro Well auf einer 96-Well-Platte in 100 µl Kulturmedium (mit den jeweiligen Supplementen) ausgesät und 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Alendronat (AL), unbeladenem Nanopartikel (NP) und nanopartikulär gekoppeltem Alendronat (AL/NP) in ansteigenden Konzentrationen von 5 µM, 10 µM, 20 µM, 60 µM, 120 µM, 250 µM, 500 µM und 1000 µM (1 mM). Die Inkubation erfolgte über 48 h unter standardisierten Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂). Für jede getestete Konzentration wurden drei Wells mit jeweils 5000 Zellen ausgesät.

Im Anschluss wurden 20 µl alamarBlue™-Lösung (60 µg/ml) zugegeben, um eine Endkonzentration von 10 µg/ml Resazurin zu erreichen. Nach 2 h Inkubation wurden mögliche

Luftblasen durch kurzes Rütteln der Platte (10 s) entfernt und die Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ mit einem Infinite M200 Pro (Tecan) Spektralphotometer gemessen.

Zur Berechnung wurde jeweils der Mittelwert der drei Messwerte pro Konzentration gebildet und um die Hintergrundfluoreszenz von toten Zellen korrigiert. Als Referenz dienten fünf Wells mit je 5000 Zellen, die mit 100 % Ethanol behandelt wurden. Die Ergebnisse wurden anschließend normalisiert und die Standardabweichung berechnet.

2.2.3 RT-qPCR

Die *Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung und quantitativen Bestimmung von Nukleinsäuren. Dabei wird zunächst durch eine Reverse Transkriptase RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend erfolgt eine quantitative PCR unter Verwendung fluoreszierender Marker. Dieses Verfahren erlaubt eine hochsensitive und reproduzierbare Quantifizierung von Genexpressionsniveaus. (156, 157)

Zur Isolierung der RNA wurden die Zellen mit 1 ml Ribozol pro Well lysiert und mehrfach aspiriert. Nach einer Inkubation von etwa einer Minute wurde die Zell-Ribozol-Suspension in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt, die jeweils 200 μl Chloroform enthielten. Nach Homogenisierung und 15-minütiger Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 rpm für 15 min. Die obere, wässrige Phase, die die RNA enthält, wurde vorsichtig abpipettiert und in neue Röhrchen überführt. Anschließend wurden pro Probe 500 μl Isopropanol hinzugegeben, homogenisiert und erneut bei 4 °C und 12.000 rpm für 15 min zentrifugiert.

Das RNA-Pellet am Boden des Röhrchens wurde mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend unter einer sterilen Werkbank getrocknet. Danach wurden pro Probe 50 μl nukleasefreies Wasser (NF- H_2O) hinzugegeben und das Pellet resuspendiert. Die RNA-Konzentration und -Reinheit wurden anschließend mit einem Mikroplatten-Reader (Infinite M200 Pro, Tecan) bestimmt.

Die Umwandlung der isolierten RNA in cDNA erfolgte mit dem *cDNA SuperMix Reverse Transcription Kit* (siehe Materialien) gemäß Herstellerprotokoll. Nach erfolgter Synthese wurde die cDNA-Konzentration gemessen und mit NF- H_2O auf 200 ng/ μl verdünnt.

Die qPCR wurde mit fluoreszierenden SYBR-Green-Primern (siehe Materialien) durchgeführt. Zur Unterscheidung spezifischer Amplifikationssignale von Hintergrundrauschen wurde ein Schwellenwert (*Threshold*) definiert. Der *Threshold Cycle* (Ct-Wert) beschreibt den Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal diesen Schwellenwert erstmals überschreitet. Ein niedriger Ct-Wert entspricht einer höheren Ausgangsmenge des Zielgens. Zur Normalisierung wurden die Ct-Werte auf das Referenzgen GAPDH bezogen.

Einstellungen der PCR-Maschine:

1. Initiale Denaturierung: 10 min bei 95 °C
2. Primerhybridisierung (*Annealing*): 20 s bei 60 °C
3. Elongation: 10 s bei 72 °C

Diese Schritte wurden bis zum Erreichen eines Fluoreszenzsignals für maximal 45 Zyklen wiederholt. Für die Durchführung der qPCR wurde jeweils ein Master-Mix frisch angesetzt. Pro Probe wurden 12,5 μl in ein Well pipettiert, bestehend aus:

- 0,25 μl 5'-Primer
- 0,25 μl 3'-Primer
- 2 μl cDNA (entspricht 100 ng)

- 3,75 µl Diethyldicarbonat (DEPC)
- 6,25 µl Power SYBR Green PCR Master Mix

RNA-Extraktion aus Gewebe:

Für Gewebeproben wurde ein Gewebestück mit 1 ml Ribozol in ein 1,5 ml Röhrchen gegeben und mit dem *Tissue Lyser II* (siehe Geräte) homogenisiert. 100 µl der Suspension wurden mit 900 µl Ribozol in ein neues Röhrchen überführt und 200 µl Chloroform hinzugegeben. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben beschriebenen Protokoll.

2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist ein quantitatives Messverfahren, mit dem einzelne Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und der Expression spezifischer Oberflächenmarker oder intrazellulärer Proteine analysiert werden können. Die Abkürzung FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) bezeichnet ursprünglich ein patentiertes Verfahren der Firma Becton Dickinson, hat sich jedoch als allgemeine Bezeichnung für die Durchflusszytometrie etabliert. (158)

Die Methode basiert auf der Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei werden die zu detektierenden Zellbestandteile mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Die Zellen werden einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbeigeführt, dessen Wellenlänge auf die verwendeten Fluorophore abgestimmt ist. Durch die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben und geben bei Rückkehr in den Grundzustand Photonen ab. Ein Detektor erfasst die Intensität der emittierten Fluoreszenz, die proportional zur Menge der gebundenen Antikörper ist. Durch den Einsatz mehrerer Laser können verschiedene Fluorophore gleichzeitig gemessen werden. (158)

Für die Experimente wurden BMDM wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben gewonnen und nach einer Woche Differenzierung zu jeweils 300.000 – 1.000.000 Zellen pro Well in 6-well-Platten ausplattiert. Die Zellzahl variiert in Abhängigkeit von der individuellen Ausbeute pro Maus. Nach 24 h erfolgte die Polarisierung in M0-, M1- und M2-Makrophagen (siehe Kapitel 2.2.2). Weitere 24 h später wurden Alendronat (AL; 30 µM, 60 µM), unbeladene Nanopartikel (NP; äquivalent zu 60 µM AL) und nanopartikulär gekoppeltes Alendronat (AL/NP; 30 µM, 60 µM) hinzugegeben und die Zellen erneut 24 h inkubiert. Die Nanopartikel waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488 markiert.

Anschließend wurde das Zellmedium abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis mit 10 mM EDTA-PBS, um die Adhärenz zu lösen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vorsichtig abgelöst, mit 1 ml PBS gewaschen und in FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 400G für 8 min wurde der Überstand entfernt. Zum Ausschluss toter Zellen erfolgte eine extrazelluläre Färbung mit dem Vitalitätsfarbstoff eFluor 506 (0,5 µl auf 100 µl PBS) für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Zugabe von 1 ml PBS wurden die Proben erneut bei 400G für 8 min zentrifugiert, gewaschen und anschließend permeabilisiert.

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 1 h im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte eine Fixierung mit 4 % Formaldehyd für 15 min und zwei abschließende Waschschrte mit PBS.

Die Messung wurde am BD FACSCanto II durchgeführt. Pro Probe wurden 10.000 – 50.000 Zellen analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Open-Source-Software Flowing Software 2.5.0 (Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, Finnland). Die gewählte Gating-Strategie ist in im Anhang in Abbildung 27 – 28 dargestellt.

2.3 in vivo Methoden

2.3.1 Tierversuch

Alle im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Tierversuche wurden durch die Ethikkommission und das Landesuntersuchungsamt von Rheinland-Pfalz unter dem Tierversuchsvorhaben „*Mechanismen der Leberfibrose, antifibrotische Therapien und Fibrose-Bildgebung*“ unter der Nummer [REDACTED] genehmigt. Die Versuche wurden eigenständig durch mich unter Assistenz meines Betreuers [REDACTED] durchgeführt. Zur eigenständigen Durchführung wurde zuvor eine Ausnahmegenehmigung (Az.: [REDACTED]) nach §9 Abs. 1 Satz 4 TierSchG eingeholt.

Als Versuchstiere wurden acht Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse (Charles River Germany, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden unter einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus bei 25 °C Raumtemperatur und 40–60 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Pro Käfig wurden maximal fünf Tiere gehalten. Zur Identifikation erfolgte eine Markierung der Tiere mittels Ohrlochung.

Am Versuchsende wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion eines Ketamin/Rompun-Gemischs (100 mg/kg KG Ketamin und 5 mg/kg KG Xylazin) narkotisiert. Initial wurden 100 µl pro Maus appliziert. Die Narkosetiefe wurde durch Prüfung des Zwischenzehenreflexes kontrolliert und bei Bedarf durch eine weitere Gabe von 100 µl des Gemischs vertieft. Nach Erreichen der chirurgischen Narkosetiefe erfolgte eine kardiale Punktion zur Blutentnahme. Die Tötung der Tiere wurde durch zervikale Dislokation durchgeführt.

Im Anschluss wurden Leber und Milz entnommen und gewogen. Aliquote der rechten und linken Leberlappen wurden abhängig von der geplanten Untersuchungsmethode entweder schockgefroren oder formalinfixiert. Die Blutproben wurden zur Analyse in das Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz überführt und dort untersucht.

Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung der geltenden Tierschutzrichtlinien durchgeführt. Dabei wurde das 3R-Prinzip beachtet, um die Anzahl der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten und ihr Leiden auf das notwendige Minimum zu beschränken.

2.3.2 CCL₄ Fibrosemodell

Zur Induktion einer experimentellen Leberfibrose wurde das etablierte CCl₄-Modell verwendet. CCl₄ wurde unter einer Sicherheitswerkbank mit Abzug in Mineralöl gelöst und das Gemisch durch mehrfache Aspiration homogenisiert. Da CCl₄ eine hochgradig flüchtige und toxische Substanz ist, wurde stets zunächst die benötigte Menge Mineralöl aufgezogen, bevor CCl₄ zugesetzt wurde. Die fertige Stammlösung wurde anschließend in Insulinspritzen aufgezogen und per oraler Gavage in den Schlund der Tiere appliziert. Die Applikation erfolgte gewichtsadaptiert nach einem eskalierenden Dosisprotokoll: Die erste Gabe betrug 0,875 ml/kg CCl₄, die zweite und dritte Gabe 1,75 ml/kg, und ab der zweiten Woche wurden 2,5 ml/kg verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich Mineralöl.

Zur Überprüfung der Verträglichkeit erfolgte eine einmalige intravenöse (i.v.) Injektion von 125 µl einer Lösung von 5 mg/ml AL/NP (mit NIR-800RS fluoreszenzmarkiert, siehe Kapitel 2.3.3) über die Schwanzvene an sechs Mäusen ohne vorherige Fibroseinduktion. Die Tiere wurden anschließend über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Die Kontrollgruppe erhielt PBS in identischem Volumen. In einem Käfig kam es am Tag 12 nach Injektion zum unerwarteten Tod von drei Versuchstieren, darunter beide Tiere der PBS-Kontrolle. Obwohl somit toxische Effekte von AL/NP unwahrscheinlich erschienen, wurde aus Vorsichtsgründen dennoch die Dosierung für die nachfolgende zweiwöchige Therapiestudie und die Versuche zur Biodistribution reduziert. Abbildung 9 zeigt repräsentative IVIS-Aufnahmen beider Versuchsgruppen direkt nach i.v. Injektion sowie 30 Tage später. Mäuse ohne messbares Fluoreszenzsignal entsprechen den PBS-Kontrollen.

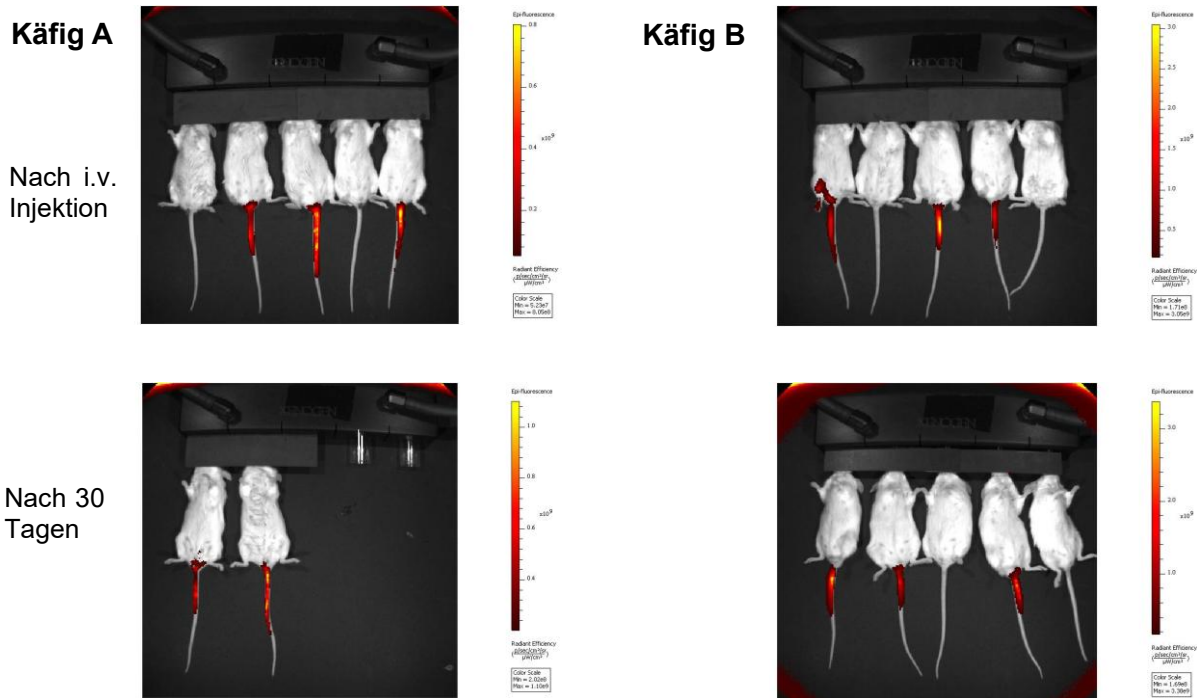


Abbildung 9: Testversuch mit einmaliger i.v. Injektion über die Schwanzvene von 5 mg/ml NIR-800RS markierten AL/NP. Bei Mäusen ohne Fluoreszenzsignal handelt es sich um PBS-Kontrollen. In Käfig A kam es 12 Tage nach i.v. Gabe zum Tod von drei Versuchstieren, hierunter beide PBS-Kontrollen.

Zur Untersuchung der Biodistribution wurde zunächst über vier Wochen eine Leberfibrose mittels CCl_4 nach dem Protokoll in Abb. 10 induziert. Anschließend erfolgte eine einmalige i.v.-Applikation von 4 mg/kg AL in 125 μl , NP oder AL/NP; die Negativkontrollgruppe erhielt PBS. 24 Stunden nach Injektion wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Organe zur weiteren Analyse aufbereitet.

Für den zweiwöchigen Therapieversuch erhielten die Tiere zusätzlich zur fortlaufenden CCl_4 -Gabe in Woche 4 und 5 intravenöse Injektionen von freiem Alendronat, nanopartikulär gekoppeltem Alendronat oder unbeladenen Nanopartikeln (Abb. 10). Die Applikation erfolgte in zwei Dosierungen: AL zu 0,8 mg/ml („low“) und 2 mg/ml („high“). Um mögliche Interaktionen zwischen CCl_4 und seinen Metaboliten zu vermeiden, erfolgte die orale CCl_4 -Gavage jeweils Montag, Mittwoch und Freitag, während die intravenösen Injektionen Dienstag, Donnerstag und Samstag durchgeführt wurden.

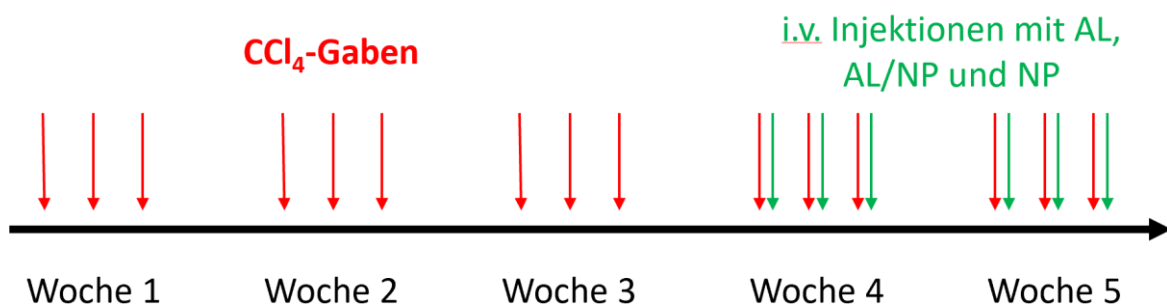


Abbildung 10: Schematische Darstellung CCl_4 -Fibrosemodell mit zweiwöchiger Therapie (modifiziert nach Fig. 3 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

2.3.3 Nahinfrarot-Bildgebung

Als Nahinfrarot (NIR) wird der Wellenlängenbereich von 780 nm bis 3000 nm bezeichnet. (159) Mit einem System zur Nahinfrarot-Bildgebung, hier dem *IVIS Spectrum Imaging System* (Caliper LifeSciences), ist durch Farbstoff-markierte Wirkstoffe ein *in vivo* Monitoring möglich.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden AL, NP und AL/NP durch die [REDACTED] (Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz) mit dem fluoreszierenden Nahinfrarotfarbstoff 800RS (NIR-800RS) markiert, um die Biodistribution der Wirkstoffe in gesunden und fibrotischen Mäusen zu analysieren. Vor jeder Anwendung wurde die Fluoreszenzintensität der Proben überprüft. Proben mit fehlender oder unzureichender Fluoreszenz wurden verworfen und nicht appliziert. In Abstimmung mit [REDACTED] konnten fehlerhaften Proben zeitnah ersetzt werden, sodass keine Tierversuche abgebrochen werden mussten. Abbildung 11 zeigt exemplarisch eine erfolgreiche (links) und eine fehlerhafte (rechts) Fluoreszenzmarkierung der Proben (AL, NP, AL/NP).

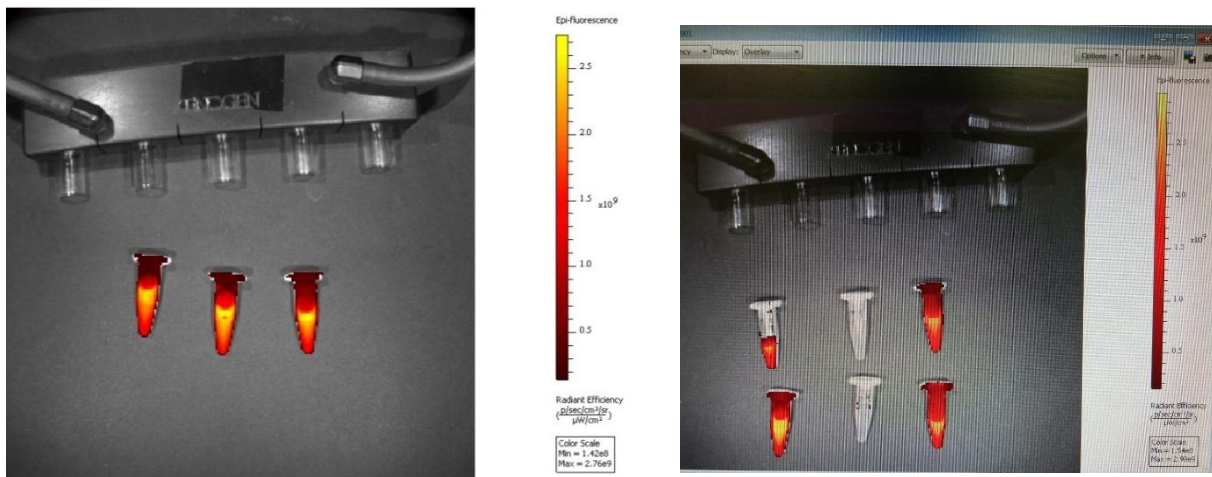


Abbildung 11: Testung der mit NIR-800RS markierten Wirkstoffe (AL, NP und AL/NP) vor *in vivo* Applikation. Links: erfolgreiche Markierung mit deutlichem Fluoreszenzsignal. Rechts: fehlerhafte Proben mit unzureichender Fluoreszenz.

Nach erfolgreicher Testung wurden 125 µl der mit NIR-800RS-markierten AL-, NP- und AL/NP-Proben in einer Konzentration von 2 mg/ml einmalig intravenös über die Schwanzvene appliziert. Für die *in vivo* Bildgebung wurden die Tiere kurzzeitig mit Isofluran narkotisiert und in die Bildkammer überführt. Über fünf oberhalb der Tiere angeordnete Glasröhren erfolgte die kontinuierliche Zufuhr isofluranhaltiger Raumluft zur Aufrechterhaltung der Narkose. Die Messungen wurden nach 1, 6, 24 und 48 Stunden durchgeführt. Die Belichtungszeit betrug 4 Sekunden bei einer Einstellung von 745/800 nm (excitation/emission).

Nach Abschluss der IVIS-Bildgebung wurden die Mäuse per zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden Lunge, Herz, Leber, Milz und Nieren entnommen und unmittelbar in der Bildkammer erneut vermessen. Für die *ex vivo*-Bildgebung wurden identische Geräteeinstellungen verwendet. Zur quantitativen Auswertung wurden „regions of interest“ (ROI) um die einzelnen Organe definiert, und die Analyse erfolgte mit der Gerätesoftware des Herstellers (*Living Image*, Caliper LifeSciences).

2.3.4 Intrazelluläre Aufnahme in vivo

Unmittelbar nach der *ex vivo*-Bildgebung der Organe wurde aus den Lebern der Tiere eine Einzelzellsuspension unter Verwendung des *Liver Dissociation Kit mouse* (Miltenyi Biotec, Deutschland) hergestellt. Dieses enthält durch den Hersteller nicht näher bezeichnete Ampullen mit gefriergetrocknetem Enzym A, D und R, die jeweils in DMEM resuspendiert werden. Von diesen Lösungen werden 20 µl Enzym A, 200 µl Enzym D und 100 µl Enzym R mit 4,7 ml DMEM vermengt zur Herstellung der fertigen Enzymlösung. Das Vorgehen erfolgte gemäß den Herstellerangaben (Protokoll abrufbar auf der Homepage des Herstellers, Stand September 2025). (160)

Zusammenfassend wurde die Gallenblase jeder Leber entfernt und das Lebergewebe anschließend mit PBS gewaschen. Die Lebern wurden daraufhin in der Enzymlösung des *Liver Dissociation Kit* inkubiert und mithilfe des *gentleMACS™ Dissociators* mechanisch homogenisiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde dieser Schritt einmal wiederholt. Die resultierende Zellsuspension wurde anschließend durch einen 100 µm-Filter filtriert und in neue Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 300 × g für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml *Red Blood Cell Lysis Solution* (Miltenyi Biotec) für fünf Minuten resuspendiert, um Erythrozyten zu lysieren. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit PBS.

Die intrazelluläre Aufnahme von NIR-markiertem Alendronat (NIR-AL), Nanopartikeln (NIR-NP) und nanopartikulär gekoppeltem Alendronat (NIR-AL/NP) wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das prinzipielle Vorgehen der Färbung und Messung entspricht dem in Kapitel 2.2.5 beschriebenen FACS-Protokoll. Die verwendeten Antikörper zur Identifikation von Makrophagen, Endothelzellen, Hepatozyten, T-Zellen, NK-T-Zellen, dendritischen Zellen und aktivierten HSC bzw. portalen Myofibroblasten sind im Kapitel 2.1 „Material“ aufgelistet. Zum Ausschluss toter Zellen wurde der Vitalitätsfarbstoff eFluor 506 verwendet.

Die Messungen erfolgten auf einem BD FACSCanto II Durchflusszytometer. Pro Probe wurden jeweils 10.000 Zellen analysiert. Die Datenauswertung und Gating-Strategie erfolgten mit der open-source Software Flowing Software 2.5.0 (Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, Finnland). Die Gating-Strategie ist in Abb. 29 gezeigt.

2.3.5 Hydroxyprolin-Bestimmung

Zur quantitativen Bestimmung des Kollagengehalts wurden 50–100 mg schwere Leberproben aus dem linken, mittleren und rechten Lappen unmittelbar nach der Organentnahme schockgefroren. Die Proben wurden in 3 ml 6 N Salzsäure homogenisiert und zur Hydrolyse über Nacht bei 110 °C im Ofen inkubiert. Nach dem Abkühlen erfolgte eine Zentrifugation bei 3.000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde in 1,5 ml Safe-Lock-Röhrchen überführt und erneut bei 11.000 rpm für 10 min zentrifugiert.

Anschließend wurden die Proben in Triplets à 5 µl auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden zusätzlich Hydroxyprolin-Standards in Konzentrationen von 10, 20, 40, 60, 80, 100 und 200 µg/ml in Triplets ausplattiert. Pro Well wurden 50 µl 0,1 M Citratpuffer (pH 6) und 100 µl Chloramin-T-Lösung zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte inkubiert. Danach wurden 100 µl eisgekühltes Ehrlich-Reagenz hinzugefügt und die Platte für 30 min bei 65 °C inkubiert.

Die Absorption wurde anschließend bei 550 nm mit dem Spektralphotometer *Infinite M200 Pro* (Tecan) gemessen. Der Hydroxyprolin-Gehalt der Proben wurde durch lineare Regression der Standardkurve ermittelt und als µg Hydroxyprolin pro mg Lebergewebe angegeben.

2.3.6 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Pikro-Siriusrot-Färbung ist eine histologische Methode zur Darstellung von Kollagenfasern in Geweben und dient damit der Beurteilung des Ausmaßes von Organfibrosen. Das Verfahren wurde erstmals 1968 beschrieben. (161)

Zur Vorbereitung wurden die Paraffinschnitte zunächst zur Deparaffinisierung für 60 min bei 65 °C erhitzt. Nach Verflüssigung des Paraffins erfolgte eine zweimalige Wäsche in Xylol (je 10 min), gefolgt von der Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe: zweimal 5 min in 100 % Ethanol, 5 min in 95 % Ethanol, 5 min in 70 % Ethanol und abschließend 5 min in destilliertem Wasser.

Die Färbung erfolgte durch Inkubation der Schnitte für 60 min in Pikro-Siriusrot-Färbelösung. Anschließend wurde überschüssige Lösung auf saugfähigem Papier abgetropft, und die Schnitte wurden zweimal für jeweils 30 s in angesäuertem Wasser gespült. Es folgten zwei Waschschrte in 100 % Ethanol (je 30 s) und eine abschließende Spülung in Xylol (1 min).

Zur Konservierung wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium Roti® Histokit II versehen und mit Deckgläsern abgedeckt. Diese wurden vorsichtig angedrückt, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden.

2.3.7 α -SMA-Färbung

Die α -SMA-Färbung ist eine immunhistochemische Methode zur Darstellung von Aktinfilamenten und dient als Marker für Myofibroblasten. Für die Färbung wurde ein *ready-to-use* Kit von BioVision verwendet, das alle benötigten Komponenten wie Puffer zur Verdünnung des primären Antikörpers, HRP-Polymer, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) sowie Waschpuffer enthält. Das Vorgehen orientierte sich an der Herstelleranleitung, wurde jedoch in einzelnen Schritten modifiziert.

Zunächst wurden die Gewebeschnitte entparaffinisiert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert, wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben. Anschließend wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit einem DAKO-Pen umrandet, um eine flüssigkeitsabweisende Barriere zu erzeugen, die den Antikörperverbrauch reduziert und während des gesamten Färbeprozesses stabil bleibt.

Darauf folgte die Antigendemaskierung durch Inkubation der Objektträger in Citratpuffer (pH 6) für 1 h in einem handelsüblichen Dampfkocher bei 95°C. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte mehrfach gewaschen: zunächst 10 min in destilliertem Wasser, anschließend 2× 5 min in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) mit 0,03 % Triton X (TX), gefolgt von 5 min in 0,3 % TX-TBS. Danach erfolgten weitere Waschschrte (5 min TBS; 2× 5 min 0,03 % TX-TBS). Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in 3 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂) inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Die 3 %-Lösung wurde stets frisch aus einer 30 %-Stammlösung (1:10) angesetzt. Nach erneuten Waschschrten (5 min H₂O; 2× 5 min 0,03 % TX-TBS) wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt und dort weiterbearbeitet.

Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen wurde eine Lösung aus 900 μ l Pferdeserum und 100 μ l 0,1 % Triton X für 30 min aufgetragen. Nach dem Abklopfen der Überschüsse erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper α -SMA (Abcam, ab5694) in einer 1:200-Verdünnung für 30 min. Es folgten Waschschrte (5 min TBS; 4× 5 min 0,03 % TX-TBS; 5 min 3 % H₂O₂; 5 min H₂O dest.). Danach wurden die Schnitte für 30 min mit dem One-Step HRP-Polymer aus dem Kit inkubiert, gefolgt von erneuten Waschschrten (5 min TBS; 2× 5 min 0,03 % TX-TBS).

Zur Chromogenreaktion wurde eine DAB-Arbeitslösung (50 μ l DAB + 1 ml Puffer/Substrat) aufgetragen und unter mikroskopischer Kontrolle 2–30 min inkubiert, bis eine deutliche

Braunfärbung sichtbar war. Anschließend wurde die Reaktion durch Waschen in destilliertem Wasser (2× 2 min) gestoppt.

Die Gegenfärbung erfolgte durch 15 s Inkubation in Hämatoxylin, gefolgt von Spülung unter fließendem Leitungswasser bis zur klaren Blaufärbung. Nach weiteren Waschschritten (2× 5 min 0,03 % TX-TBS; 5 min H₂O) wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 5 min) entwässert und in Xylol überführt. Abschließend wurden die Präparate mit Roti® Histokit II eingedeckt.

Zur Optimierung der Färbebedingungen wurden unterschiedliche Antigen-Retrieval-Puffer und Antikörperversdünnungen getestet, um das Hintergrundsignal („background staining“) zu minimieren. In Abb. 12 ist die Optimierungsreihe dargestellt. Die optimalen Parameter sind Citratpuffer pH 6, Antikörper 1:200 mit Pferdeserum als *protein blocking solution*.

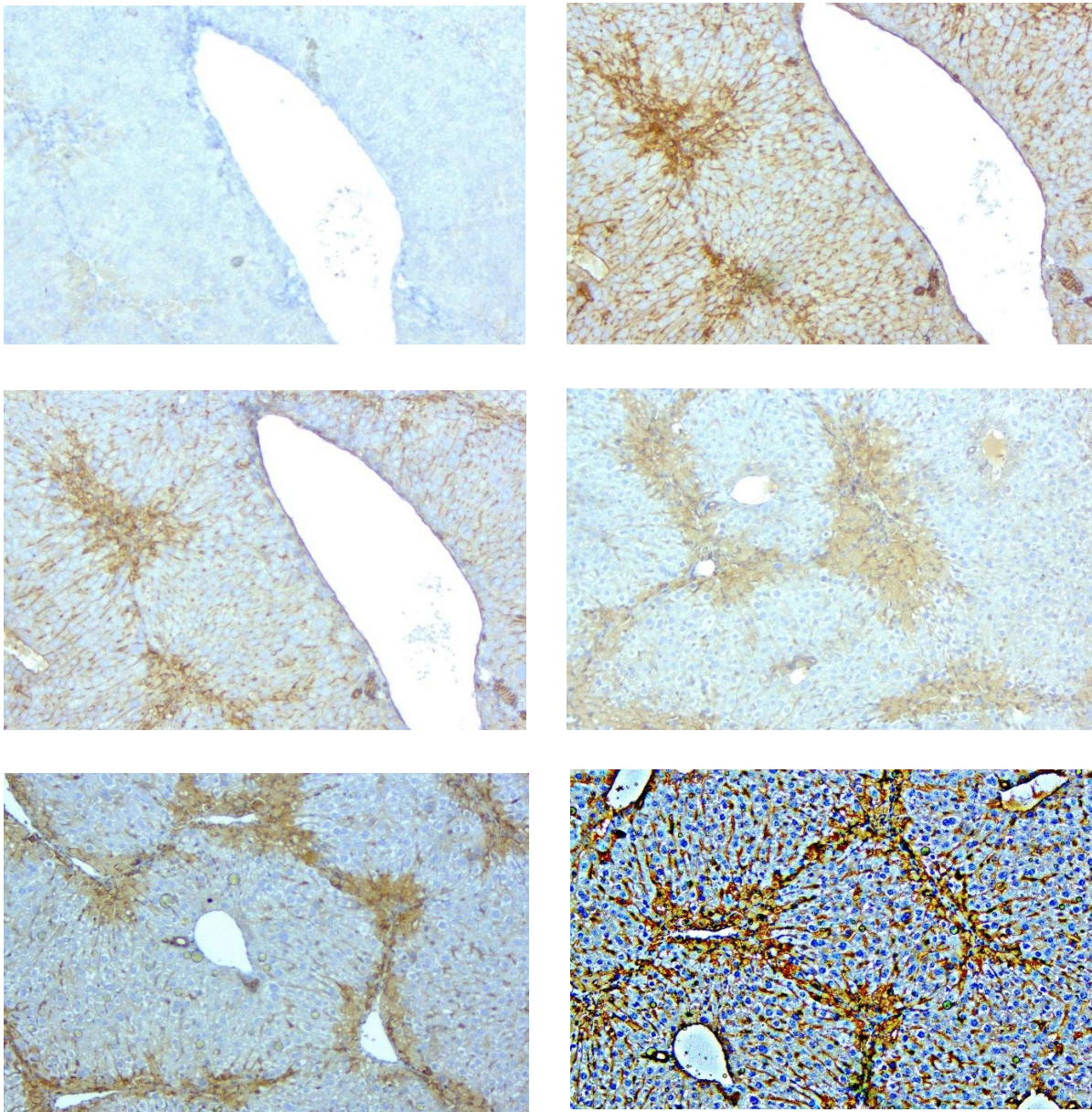


Abbildung 12: Etablierung der α -SMA-Färbung: Negativkontrolle ohne primären Antikörper oben links, Citratpuffer pH 9 mit Antikörper 1:100 oben rechts, Citratpuffer pH 9 mit Antikörper 1:200 mittig links, Citratpuffer pH 6 mit Antikörper 1:200 mittig rechts, Citratpuffer pH 6 mit Antikörper 1:200 und Pferdeserum als *protein blocking solution* unten links, repräsentativer Bildausschnitt unter optimierter Mikroskopeinstellung unten rechts

2.3.8 Auswertung der Färbungen mit ImageJ

Die Auswertung der Gewebeschnitte der Picro-Siriusrot- und der α -SMA-Färbung erfolgte mithilfe des Open-Source-Programms *ImageJ*. Pro Maus wurden je ein Schnitt aus dem linken und ein Schnitt aus dem rechten Leberlappen analysiert. Unter 20-facher Vergrößerung wurden aus jedem Schnitt fünf zufällig ausgewählte Areale aufgenommen und als Screenshots gespeichert.

Zur quantitativen Analyse wurden die Bilder in *ImageJ* geöffnet und über den Menüpfad *Image/Color/Colour Deconvolution* getrennt. Für die α -SMA-Färbung wurde als Vektor *H-DAB* gewählt, wodurch die braunen, DAB-gefärbten Bildanteile isoliert werden. Für die Picro-Siriusrot-Färbung wurde der Vektor *H&E* verwendet. Anschließend erfolgte die Schwellenwertanpassung über *Image/Adjust/Threshold*, um ein schwarz-weißes Bild zu erzeugen, siehe Abb. 13.

Nach Ausschluss von Gefäßen und Gallengängen wurde der prozentuale Anteil der schwarz markierten Fläche am Gesamtbild bestimmt und als Maß für den Färbungsanteil verwendet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung aus fünf Bildfeldern pro Schnitt berechnet.

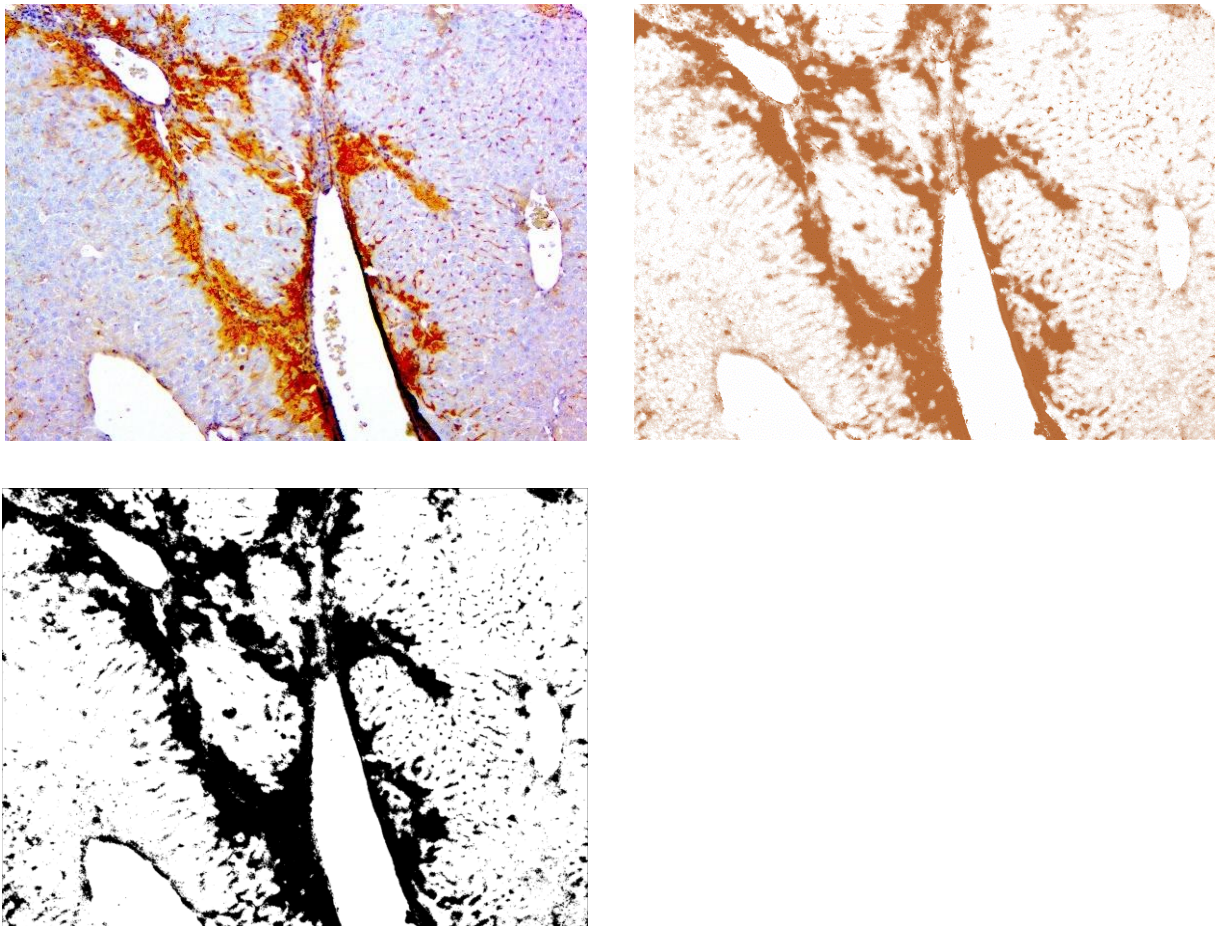


Abbildung 13: exemplarisches Vorgehen der morphometrischen Auswertung mittels *ImageJ*. Hier gezeigt ist ein Gewebeschnitt der CCI-4-Kontrollgruppe mit α -SMA-Färbung.

3 Ergebnisse

3.1 In vitro Zellkulturen

Die Zytotoxizität von Alendronat (AL), unbeladenen Nanopartikeln (NP) und nanopartikulär gekoppeltem Alendronat (AL/NP) wurde in aufsteigender Konzentration untersucht. Als Zellmodelle dienten murine 3T3-Fibroblasten, RAW-Makrophagen sowie Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow derived macrophages*, BMDM). Die BMDM differenzierten innerhalb von sieben Tagen aus wurden anschließend zu M0-, M1- und M2-Makrophagen polarisiert. Der exakte Versuchsaufbau und die anschließende Auswertung sind unter „Materialien und Methoden“ im Kapitel 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben.

Wie in Abb. 14 illustriert, zeigt sich für 3T3-Zellen und RAW-Makrophagen bei einer Wirkstoffkonzentration von 5 μM bis 1 mM keine Zytotoxizität. In den polarisierten Makrophagen (M0, M1, M2) war dagegen eine leichte, dosisabhängige Abnahme der Vitalität durch freies Alendronat erkennbar, während die Nanopartikel selbst nur eine sehr geringe Toxizität aufwiesen. Da die Zellvitalität selbst bei der höchsten getesteten Konzentration (1 mM) stets über 50 % lag, wurde auf die Berechnung einer IC_{50} verzichtet.

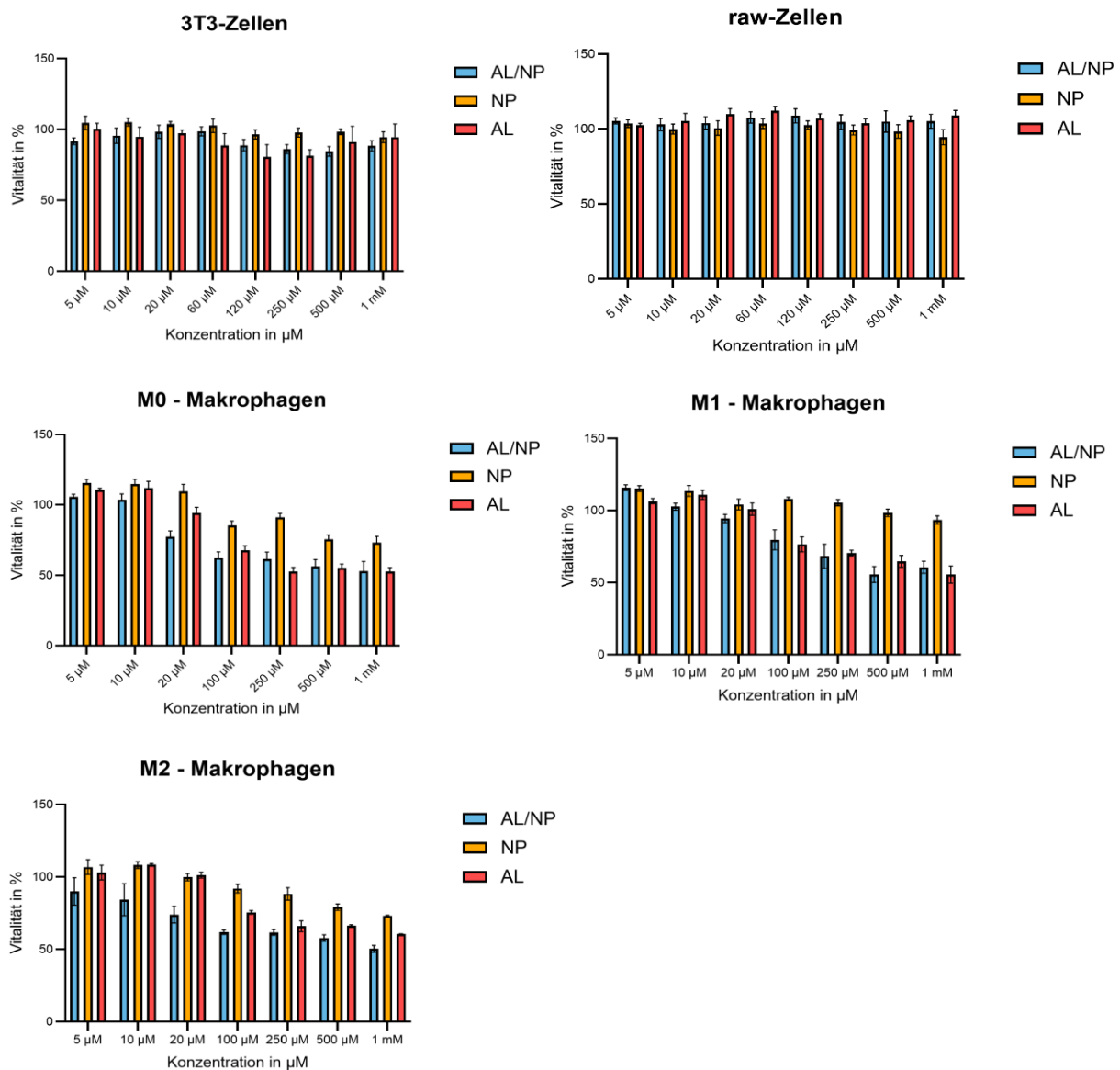


Abbildung 14: Zytotoxizität von AL, NP und AL/NP an 3T3-Zellen, raw-Zellen, sowie M0-, M1- und M2-Makrophagen; $n=1-2$. Bei den Zytotoxizitäts-Diagrammen mit M0, M1 und M2-Makrophagen handelt es sich um Bildzitate (modifiziert nach Fig. S26 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022).

Zur Überprüfung der Hypothese, dass Alendronat eine Repolarisation von M2- zu M1-Makrophagen induziert, wurde die Expression charakteristischer M1- und M2-Marker mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Zellmodell dienten aus BMDM differenzierte M2-Makrophagen, da diese auch in vivo dem therapeutischen Target nahekamen. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit den jeweiligen Substanzen erfolgte die Messung an 10.000–50.000 Zellen pro Probe. Die methodischen Details des FACS-Experiments sind im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschrieben.

Für den M2-Marker CD206 zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der Expression nach Behandlung mit AL/NP. Eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht (AL/NP 60 μ M vs. M2: $p = 0,1441$; AL/NP 30 μ M vs. M2: $p = 0,1653$; $n=3$; nicht illustriert).

Wie in Abb. 15 gezeigt, führte die Behandlung mit 30 μ M und 60 μ M AL bzw. AL/NP für den M2-Marker IL-10 zu einer signifikanten Reduktion der IL-10-Expression ($**p < 0,001$; $n = 3$). Die gewählte Gating-Strategie ist im Anhang in Abb. 27 gezeigt. Die Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) zeigte, dass die Einkapsulierung von Alendronat in den Nanopartikeln keinen Nachteil in der Effektivität der Umpolarisation erbrachte. Sowohl freies AL (30–60 μ M) als auch AL/NP (30–60 μ M) bewirkten eine vergleichbare Abnahme der MFI (AL/NP 30 μ M: 5,1–5,8; AL/NP 60 μ M: 4,5–5,5).

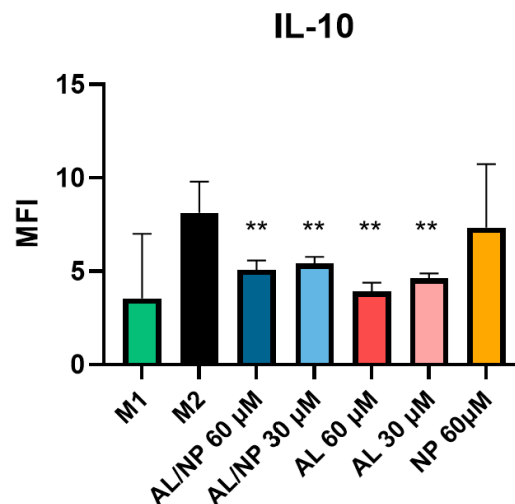


Abbildung 15: IL-10 Expression, gemessen anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in AL/NP (30 μ M, 60 μ M), AL (30 μ M, 60 μ M) und NP 60 μ M. Unbehandelte M1- und M2-Makrophagen dienen als Referenz. $**p < 0,001$; $n=3$ (modifiziert nach Fig. 2 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

Anschließend wurde die intrazelluläre Aufnahme der Nanopartikel untersucht. Hierfür wurden die Partikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green (OG) markiert. Während OG-markierte, unbeladene Nanopartikel (OG-NP) nur in sehr geringem Maße intrazellulär aufgenommen wurden (1–2 %), zeigten OG-markierte, Alendronat-gekoppelte Nanopartikel (OG-AL/NP) eine dosisabhängig signifikant erhöhte Aufnahme. So konnte für AL/NP 60 μ M eine intrazelluläre Aufnahme in 18–19 % und für AL/NP 30 μ M in 11–15 % der Makrophagen nachgewiesen werden ($n = 3$).

Auch die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als relatives Maß für die Menge eines Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel bestätigte diese Ergebnisse. Sowohl für OG-AL/NP 30 μ M als auch 60 μ M zeigte sich eine signifikant höhere MFI im Vergleich zu OG-NP 60 μ M ($**p < 0,001$ bzw. $***p < 0,0001$; $n = 3$, Abb. 16). Das dazugehörige Gating ist in im Anhang in Abb. 28 dargestellt.

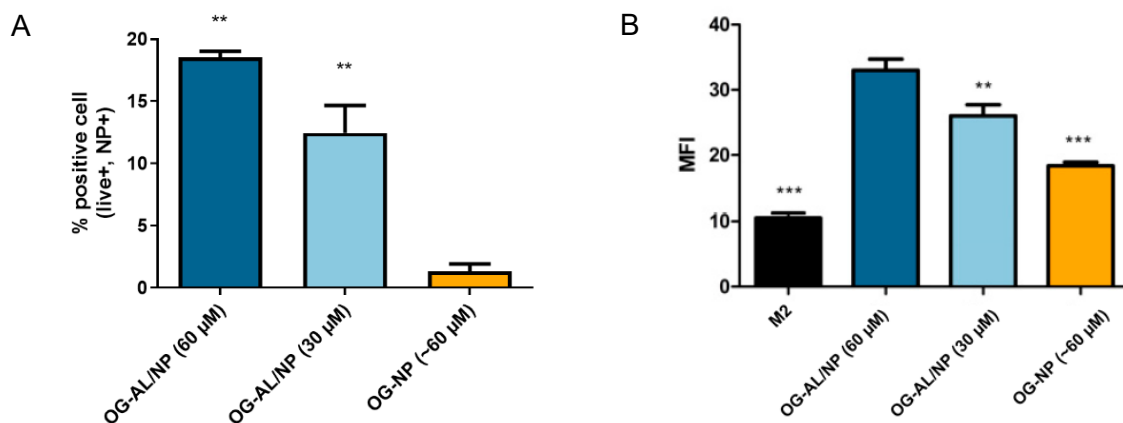


Abbildung 16: (A) prozentualer Anteil lebender Zellen mit intrazellulärem OG-AL/NP vs OG-NP. $**p < 0,001$; $n=3$ (B): intrazelluläre Aufnahme, gemessen als mean fluorescence intensity (MFI) in OG-AL/NP 30 und 60 µM und OG-NP 60 µM in M2-polarisierten Makrophagen. $**p < 0,001$; $***p < 0,0001$; $n=3$ ((B) modifiziert nach Fig. 2 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

Da in der Durchflusszytometrie lediglich für IL-10 eine statistisch signifikante Suppression nachgewiesen werden konnte, wurde die Hypothese einer durch Alendronat induzierten Repolarisation der Makrophagen durch eine quantitative PCR (qPCR) weiter überprüft. Ziel war es, die Expressionsveränderungen zentraler Marker auf Transkriptionsebene zu bestätigen. Die genaue Versuchsdurchführung ist im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschrieben.

Analysiert wurden die mRNA-Expressionsniveaus der antiinflammatorischen M2-Marker IL-10 und YM-1 sowie des proinflammatorischen M1-Markers CCL-2. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl freies Alendronat (AL) als auch nanopartikulär gekoppeltes Alendronat (AL/NP) zu einer signifikanten Reduktion der M2-assoziierten Marker IL-10 und YM-1 führten. Gleichzeitig konnte für CCL-2 eine signifikante Hochregulation nach Behandlung mit AL/NP in der Konzentration 60 µM im Vergleich zur M2-Kontrolle beobachtet werden (siehe Abb. 17).

Diese Ergebnisse bestätigen die durchflusszytometrischen Befunde und stützen die Annahme, dass Alendronat, insbesondere in nanopartikulärer Formulierung, eine Repolarisation von M2- zu M1-Makrophagen fördert. Damit konnte in vitro erstmals gezeigt werden, dass Alendronat das polarisationsabhängige Expressionsprofil von Makrophagen beeinflusst und somit potenziell antifibrotische Eigenschaften besitzt.

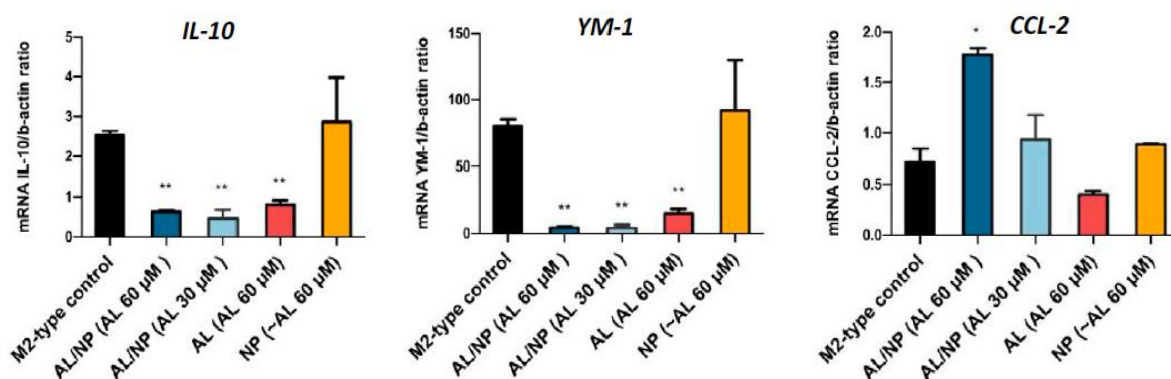


Abbildung 17: Expression des M1-Markers CCL2 und der M2-Marker IL-10 und YM-1 in der qPCR; $**p < 0,05$, $*p < 0,0001$; $n=3$ (modifiziert nach Fig. 2 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

3.2 In vivo Versuche

Zunächst wurde die Biodistribution von Alendronat, unbeladenen Nanopartikeln und nanopartikulär gekoppeltem Alendronat in gesunden Mäusen und in Mäusen mit Leberfibrose untersucht. Die Fibroseinduktion erfolgte über vier Wochen gemäß dem in Kapitel 2.3.2 beschriebenen CLL₄-Modell. Anschließend erhielten sowohl gesunde als auch fibrotische Tiere eine einmalige intravenöse Injektion der jeweiligen Substanzen. Für die Fluoreszenzmarkierung wurde der Nahinfrarotfarbstoff 800RS (NIR-800RS) verwendet. Das IVIS Imaging System diente zur Nahinfrarot-Bildgebung nach 1, 6, 24 und 48 Stunden.

NIR-markierte Nanopartikel zeigten keine organspezifische Anreicherung, sondern eine gleichmäßige Fluoreszenzverteilung über 48 Stunden. NIR-AL reicherte sich initial nach einer Stunde in der Leber an, verlor jedoch innerhalb von 48 Stunden nahezu vollständig seine Fluoreszenz, was der natürlichen Elimination von Alendronat entspricht. Im Gegensatz dazu zeigten NIR-AL/NP eine rasche und über den gesamten Messzeitraum von 48h stabile Akkumulation in der Leber. Nach der letzten Messung (48 h) wurden die Tiere getötet und die ex vivo Fluoreszenz der einzelnen Organe bestimmt. Dabei bestätigte sich die starke Anreicherung in der Leber bei gleichzeitig nur schwacher Signalausprägung in anderen Organen.

Abbildung 18 zeigt die mittlere Strahlungseffizienz (*radiant efficiency*) der einzelnen Organe fibrotischer Mäuse sowie den Vergleich zwischen gesunden und fibrotischen Tieren. Die Strahlungseffizienz für NIR-AL/NP war in der Leber signifikant höher als für NIR-AL und NIR-NP, ohne Unterschied zwischen gesunden und fibrotischen Mäusen.

Abbildungen 19 und 20 zeigen die *in vivo*- und *ex vivo*-IVIS-Aufnahmen in gesunden bzw. fibrotischen Mäusen.

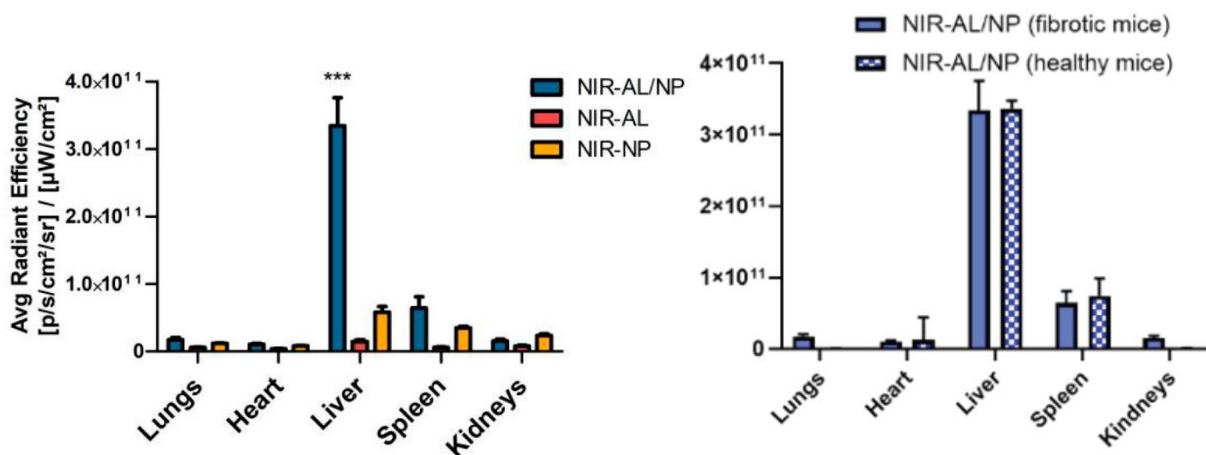
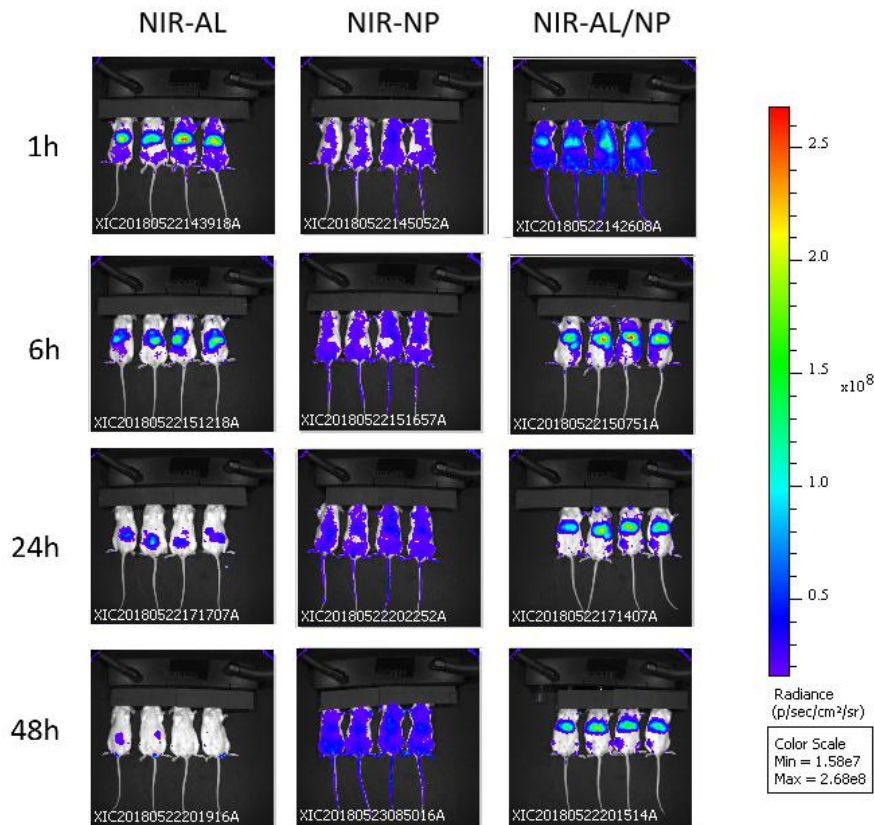


Abbildung 18: durchschnittliche Strahlungseffizienz (avg radiant efficiency) in $[p/s/cm^2/sr] / [\mu W/cm^2]$ der jeweiligen Organe in fibrotischen Mäusen links mit $***p < 0,0001$ für NIR-AL/NP in der Leber im Vergleich zu NIR-AL und NIR-NP. Rechts die Strahlungseffizienz für NIR-AL/NP in gesunden vs fibrotischen Mäusen. (modifiziert nach Fig. 3 und Fig. S28 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

in vivo - gesunde Mäuse



ex vivo - gesunde Mäuse

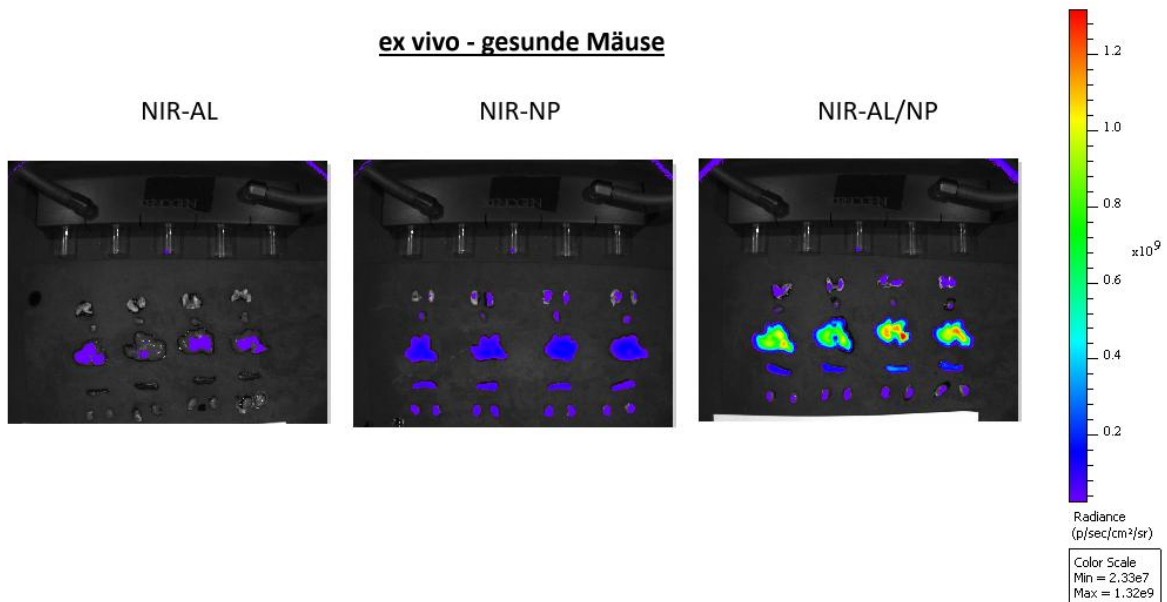
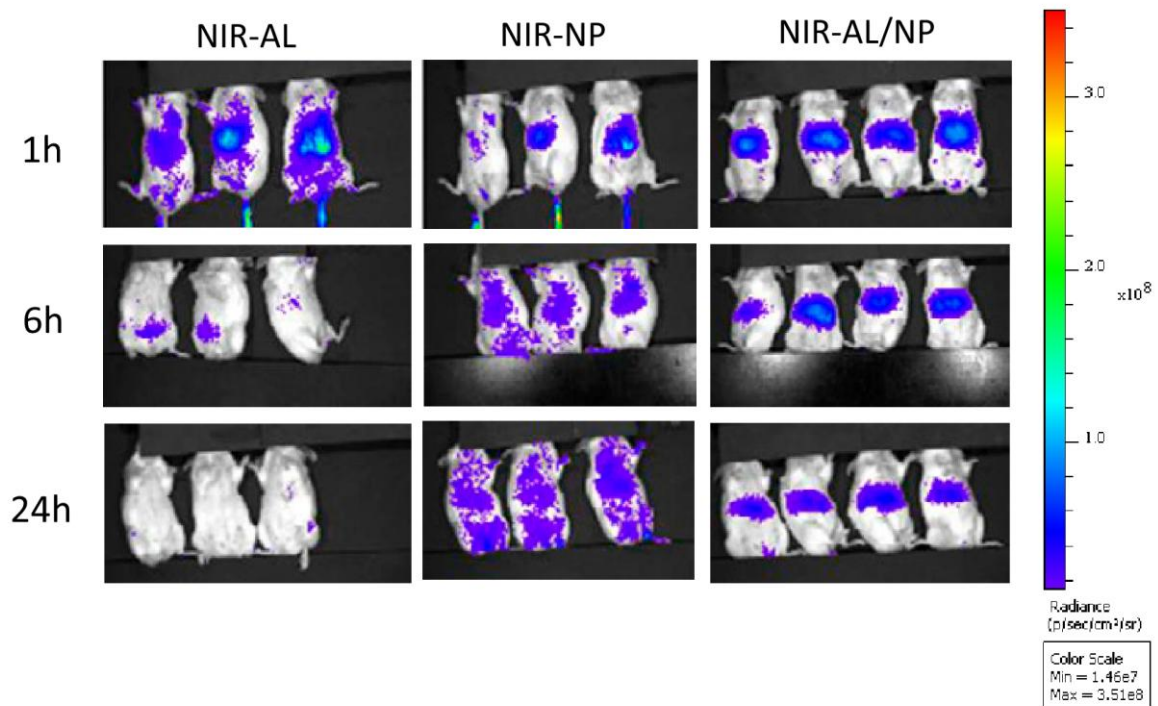


Abbildung 19: in vivo und ex vivo IVIS-Imaging von Nahinfrarotfarbstoff 800RS (NIR-800RS) markiertem AL, NP und AL/NP in gesunden Mäusen. Ex vivo sind die Organe von oben nach unten wie folgt angeordnet: Lungen, Herz, Leber, Milz und beide Nieren, n=4 (modifiziert nach Fig. S28 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

in vivo - fibrotische Mäuse



ex vivo - fibrotische Mäuse

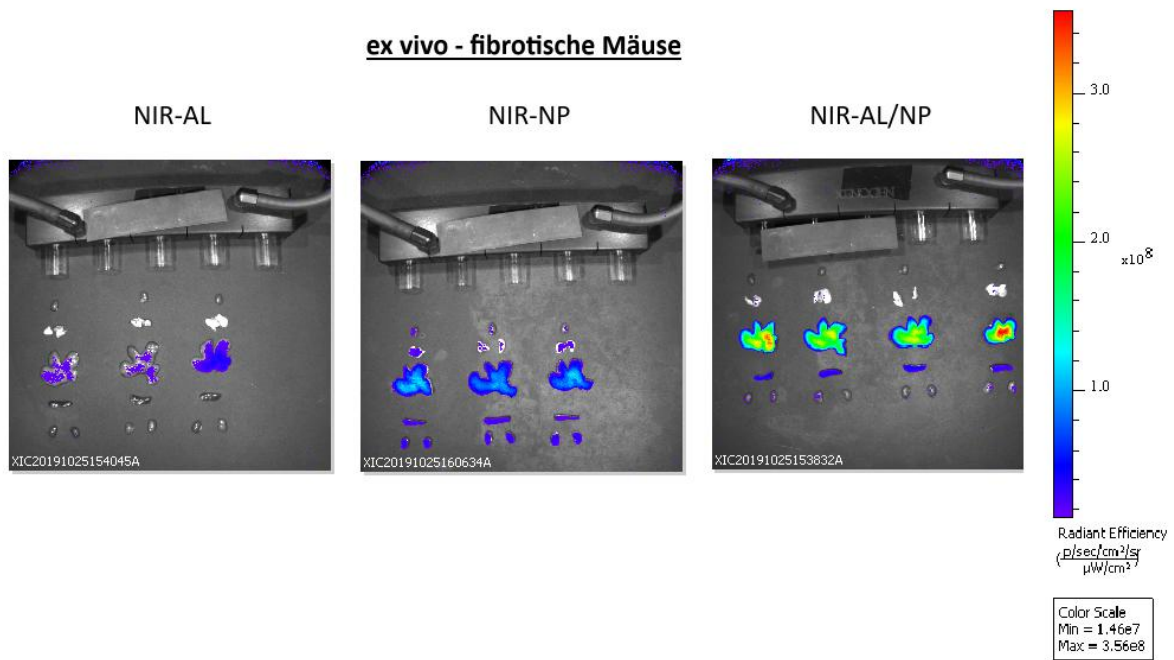


Abbildung 20: in vivo und ex vivo IVIS-Imaging von Nahinfrarotfarbstoff 800RS (NIR-800RS) markiertem AL, NP und AL/NP in fibrotischen Mäusen. Ex vivo sind die Organe von oben nach unten wie folgt angeordnet: Herz, Lunge, Leber, Milz und beide Nieren, $n=4$ (modifiziert nach Fig. 3 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

Zur weiteren Charakterisierung wurde die zelluläre Aufnahme in der Leber analysiert. Hierfür wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und die intrazelluläre Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie (FACS) quantifiziert. Zur Identifikation wurden Antikörper gegen Makrophagen (CD45, F4/80, CD11b), Endothelzellen (CD31), dendritische Zellen (CD3, F4/80, NK-1.1, CD45, CD11c), Hepatozyten (Albumin) und (portale) Myofibroblasten (CD90.2) verwendet. Während freies Alendronat und NP nur geringfügig intrazellulär aufgenommen wurden, zeigte AL/NP eine signifikant höhere Aufnahme, insbesondere durch nicht-parenchymale Zellen. Zwischen gesunden und fibrotischen Tieren bestand kein signifikanter Unterschied, siehe Abb. 21.

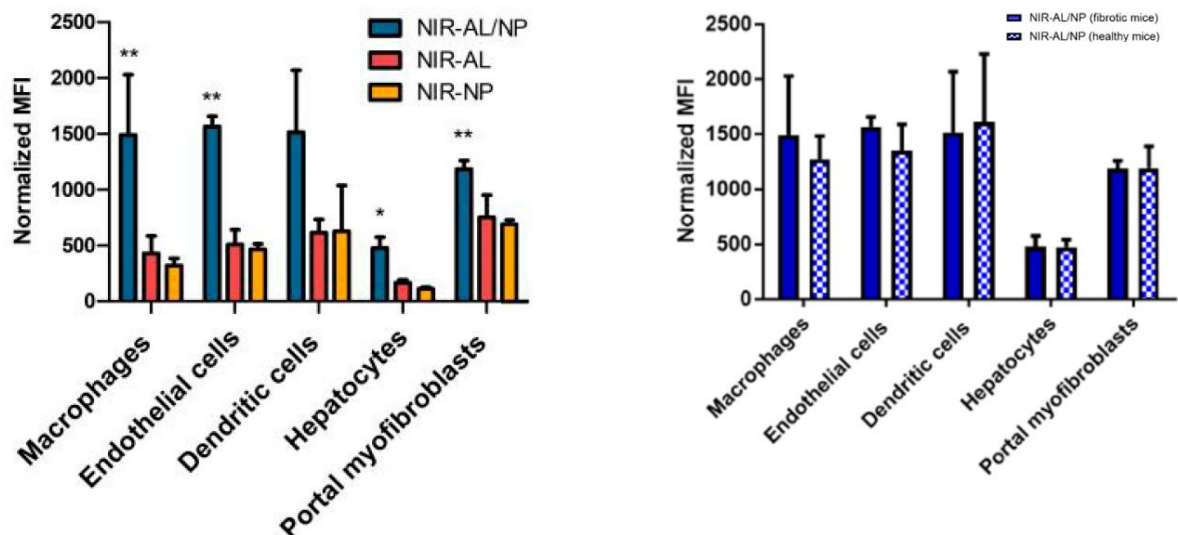


Abbildung 21: intrazelluläre Aufnahme von NIR-AL, NIR-NP und NIR-AL/NP in fibrotischen Mäusen links. Die Aufnahme von NIR-AL/NP ist in Makrophagen, Endothelzellen, Hepatozyten und portalen Myofibroblasten im Vergleich zu NIR-AL und NIR-NP signifikant erhöht mit $*p < 0,05$ und $**p < 0,0001$. Rechts im Vergleich die intrazelluläre Aufnahme von NIR-AL/NP in gesunden und fibrotischen Mäusen ohne erkennbaren signifikanten Unterschied. (modifiziert nach Fig. 3 und Fig. S28 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

Im Anschluss erfolgte der in vivo-Therapieversuch. Über fünf Wochen wurde bei BALB/c-Mäusen durch orale CCl_4 -Gabe eine Leberfibrose induziert. In den Wochen 4 und 5 erhielten die Tiere insgesamt sechs intravenöse Injektionen der Wirkstoffformulierungen (AL, NP, AL/NP). Als Kontrollen dienten unbehandelte fibrotische Tiere (CCl_4 -Kontrolle) und gesunde Tiere (Mineralöl-Kontrolle). Der genaue Ablauf ist in Kapitel 2.3.2 beschrieben.

Bezüglich der Vitalparameter zeigte sich infolge der Fibrose ein signifikant reduziertes Körpergewicht in allen Versuchsgruppen im Vergleich zur Mineralöl-Kontrolle. Das durchschnittliche Ausgangsgewicht in der Versuchsgruppe AL/NP 2 mg/kg war 4,8% niedriger im Vergleich zu AL/NP 4 mg/kg. Diese Differenz blieb mit Schwankungen über den gesamten Versuchszeitraum von 5 Wochen bestehen und betrug bei Versuchsende 7,5% zwischen diesen beiden Versuchsgruppen. Beim Lebergewicht ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Eine Splenomegalie wurde jedoch in CCl_4 -exponierten Gruppen beobachtet, mit statistischer Signifikanz bei AL/NP (2 mg/kg), AL (2 mg/kg) und NP (siehe Abb. 22).

Zur Beurteilung einer möglichen Toxizität wurden Leber- und Nierenwerte analysiert. Abb. 23 zeigt die Serumparameter 24 h nach einmaliger intravenöser Gabe von AL/NP (4 mg/kg) im Vergleich zur PBS-Kontrolle in fibrotischen Mäusen. Die Kreatininwerte lagen allesamt unter 1 mg/dl und die Harnstoffwerte lagen mit 42–62 mg/dl im Referenzbereich, sodass keine akute Nephrotoxizität vorlag. Auch die Leberwerte Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Glutamatdehydrogenase (GLDH) und Gamma-Glutamyltransferase (gamma-GT) lagen im Referenzbereich, sodass keine akute Hepatotoxizität vorlag.

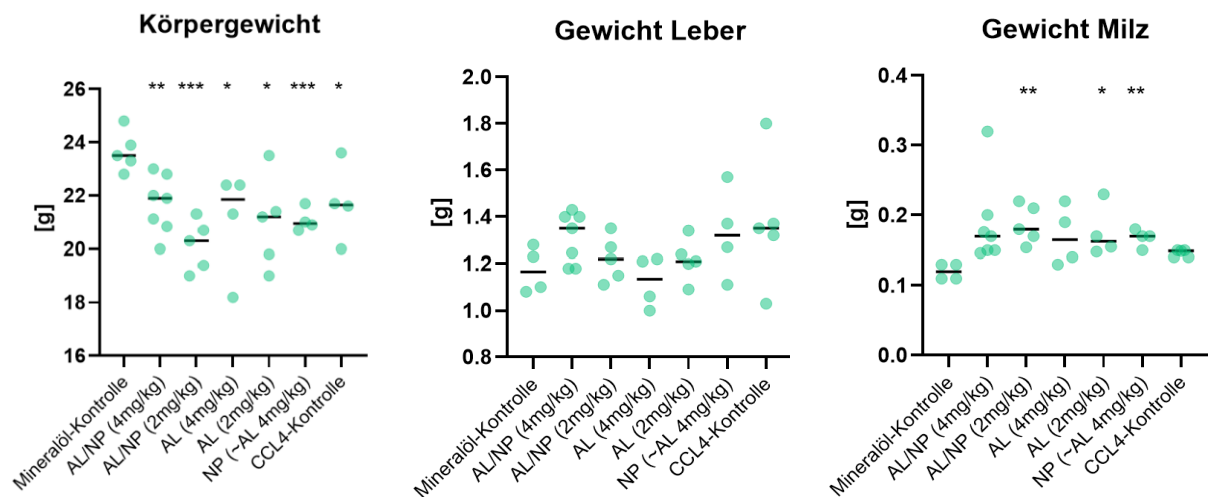


Abbildung 22: Körpergewicht, Gewicht Leber und Milz in [g]. Im Vergleich zur Mineralöl-Kontrolle (gesund) ist das Körpergewicht der Mäuse in allen Versuchsgruppen statistisch signifikant erniedrigt. Beim Lebergewicht zeigen sich keine statistischen Unterschiede. Das Milzgewicht ist im Vergleich zur Mineralöl-Kontrolle statistisch signifikant in AL/NP (2mg/kg), AL (2mg/kg) und NP erhöht. Die Menge an NP ist äquivalent zur benötigten Menge für AL 4mg/kg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$

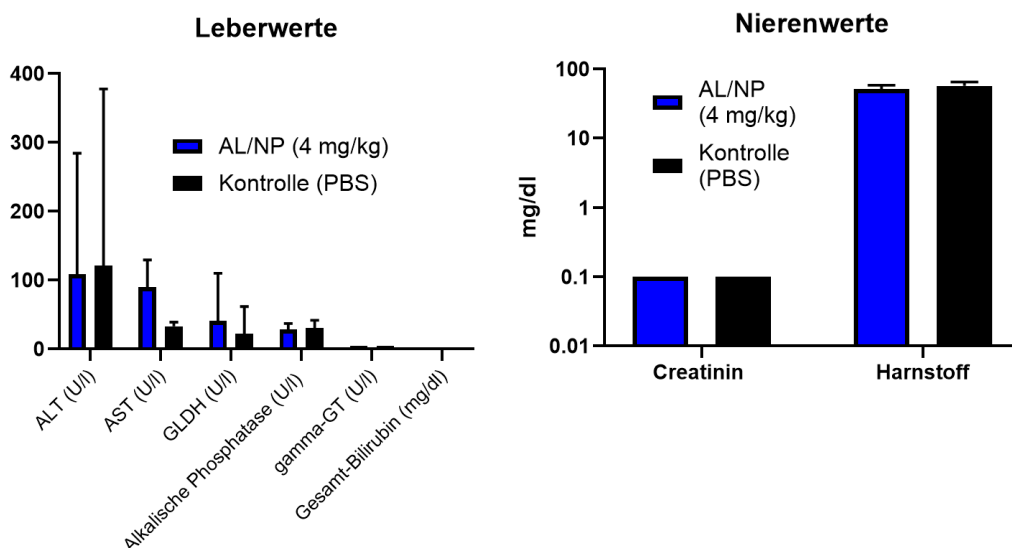


Abbildung 23: Leber- und Nierenwerte 24 h nach i.v. Gabe von AL/NP (4 mg/kg) und unbehandelten Kontrollen bei CCl_4 induzierter Leberfibrose. Abkürzungen der Leberwerte: Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Glutamatdehydrogenase (GLDH), Gamma-Glutamyltransferase (gamma-GT) (modifiziert nach Fig. S31 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

Abbildung 24 zeigt die Laborwerte nach dem zweiwöchigen Therapieversuch. Die Kreatinin-Werte bleiben im Mittel unter 1 mg/dl, sodass keine Nephrotoxizität festgestellt wurde.

Bei den Leberparametern zeigten sich infolge der CCl_4 -Gabe erwartungsgemäß schwere hepatotoxische Veränderungen mit stark erhöhte Transaminasen ohne klare Tendenz zwischen den Behandlungsgruppen. Die Serum-Glutamatdehydrogenase (GLDH) ist in der AL/NP (4 mg/kg)-Gruppe im Vergleich zur CCl_4 -Kontrolle statistisch signifikant erniedrigt.

Die Cholestaseparameter alkalische Phosphatase, γ -GT und Bilirubin lagen in allen Gruppen im niedrigen Bereich und ohne signifikante Unterschiede, mit Ausnahme statistisch signifikant erniedrigter Spiegel der alkalischen Phosphatase in der Versuchsgruppe AL/NP (4mg/kg) im Vergleich zur unbehandelten CCl_4 -Gruppe.

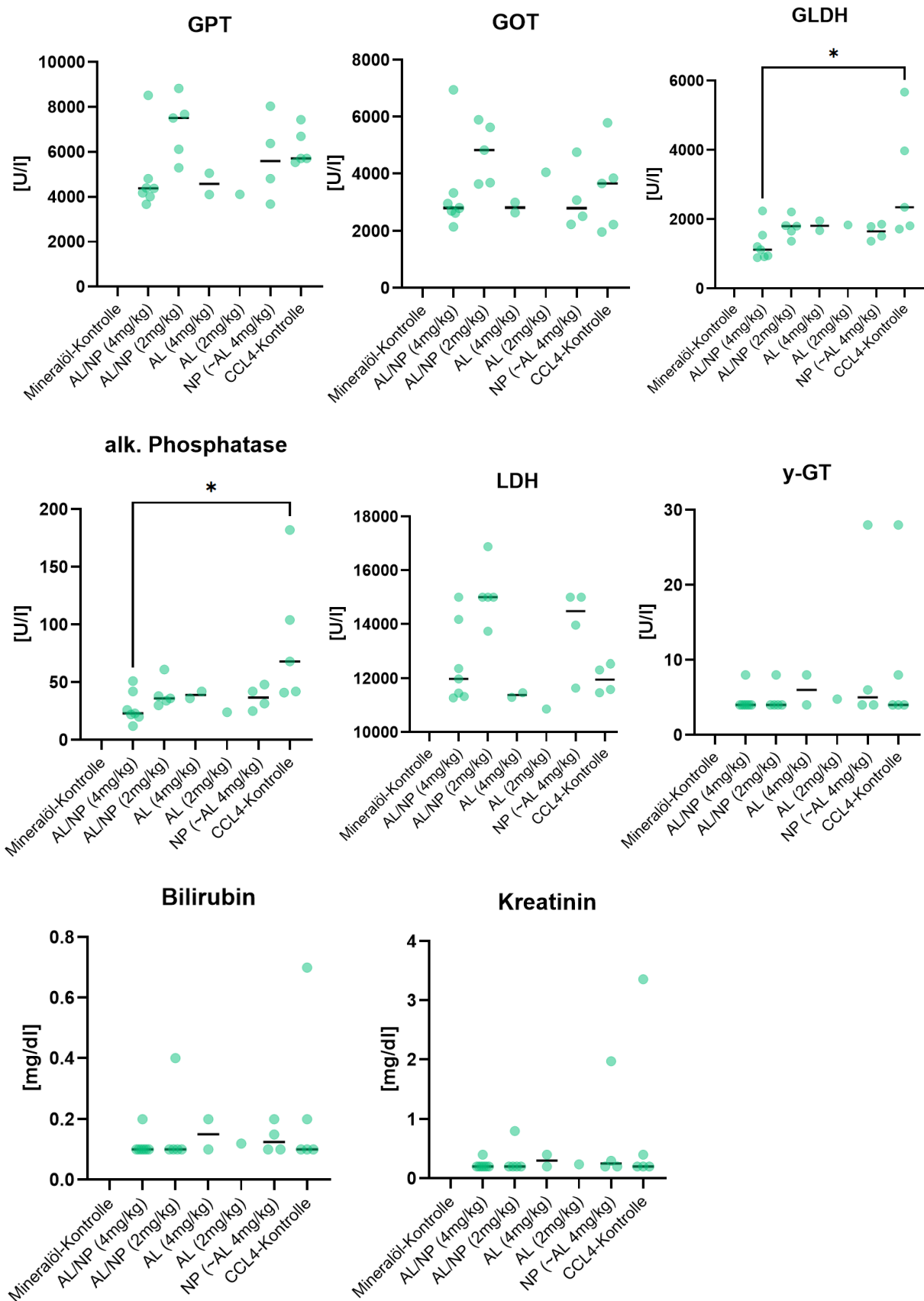


Abbildung 24: Leber- und Nierenwerte nach zweiwöchigem Therapieversuch bei CCL₄ induzierter Leberfibrose. GLDH und alk. Phosphatase sind statistisch signifikant erniedrigt in der Versuchsgruppe AL/NP (4mg/kg). * $p < 0,05$ Abkürzungen Laborwerte: Alanin-Aminotransferase (GPT), Aspartat-Aminotransferase (GOT), Glutamatdehydrogenase (GLDH), alkalische Phosphatase (alk. Phosphatase), Lacatdehydrogenase (LDH), Gamma-Glutamyltransferase (γ-GT)

Zur Untersuchung möglicher antifibrotischer Effekte wurde die Hydroxyprolinmenge in der Leber bestimmt. Hydroxyprolin ist eine post-translational modifizierte, nicht-essenzielle Aminosäure, die fast ausschließlich in Kollagen vorkommt und somit ein direkter Biomarker für fibrotische Umbauvorgänge. (162, 163) Es zeigt sich eine statistisch signifikante Reduktion des Hydroxyprolins sowohl relativ (pro 100 µg Leber) als auch gesamt (pro gesamter Leber) um bis zu 80 % für AL/NP (1) im Vergleich zur CCl₄-Kontrollgruppe, wohingegen freies Alendronat unwirksam ist. (Abb. 25 A).

Analog zu den *in vitro* Versuchen wurde auch *in vivo* mittels qPCR die Expression der M2-Marker IL-10 und CD 206, sowie des M1-Markers CCL-2 im Lebergewebe untersucht. Auf Transkriptionsebene zeigte sich eine statistisch signifikante niedrigere Expression für IL-10 für AL 4 mg/kg und AL/NP in beiden Dosierungen (2 und 4 mg/kg). Für CD 206 zeigte sich eine statistisch signifikante Reduzierung für beide Dosen von AL/NP. Alendronat allein bewirkte keine Reduktion. Für CCL-2 zeigte sich eine statistisch signifikante Hochregulation in der Gruppe AL/NP 4mg/kg (siehe Abb. 25 B).

Der antifibrotische Effekt wurde außerdem durch zwei histologische Färbungen belegt. Beide Färbeprotokolle sind in Kapitel 2.3.6 und 2.3.7 erklärt. Mit Sirius Red können Kollagenfibrillen angefärbt werden und es kann so morphometrisch das Ausmaß der Leberfibrose bestimmt werden. Es zeigte sich eine dosisabhängige, statistisch signifikante Reduktion des morphometrischen Kollagenanteils. Passend hierzu belegte auch die α-SMA-Färbung eine dosisabhängige Reduktion von α-SMA+ Myofibroblasten in beiden AL/NP-Gruppen. Der Nanopartikel ohne Wirkstoff wies in beiden Färbungen nur einen minimalen Effekt auf. Die Färbungen sind in Abb. 26 gezeigt.

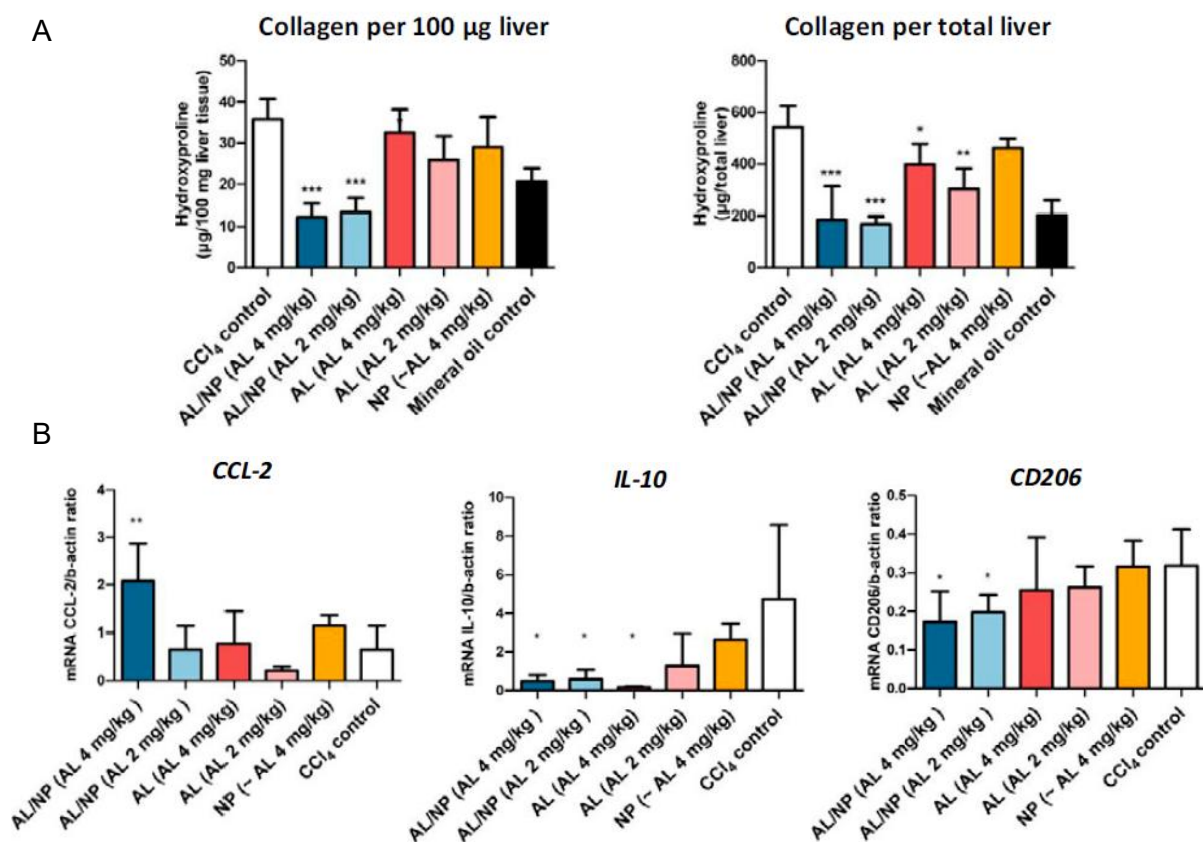


Abbildung 25: (A): Kollagen pro 100 µg Leber und in gesamter Leber, gemessen durch den biochemisch bestimmten Hydroxyprolinegehalt in [µg]. n= 5-7 in Wirkstoffgruppen, n=4 Mineralöl, *p < 0,05, **p < 0,001, ***p < 0,0001 (modifiziert nach Fig. 4 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022) (B): *in vivo* Expression des M1-Markers CCL-2 und der M2-Marker IL-10 und CD 206, *p < 0,05, **p < 0,001 (modifiziert nach Fig. 6 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

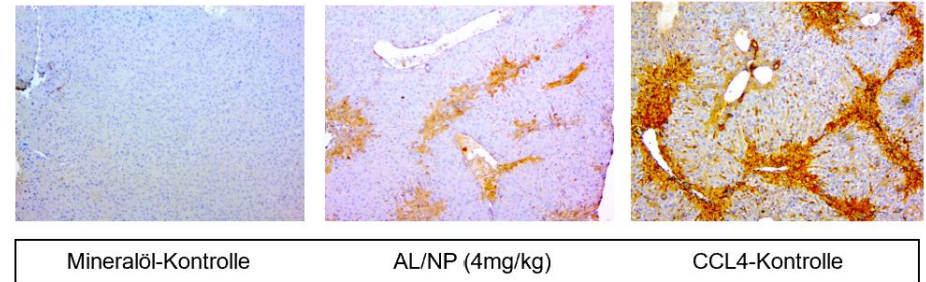
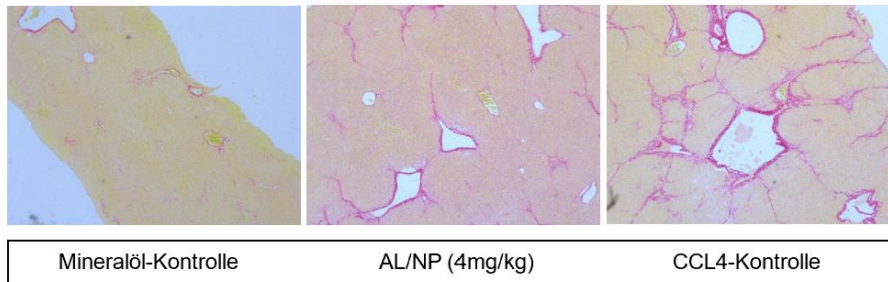
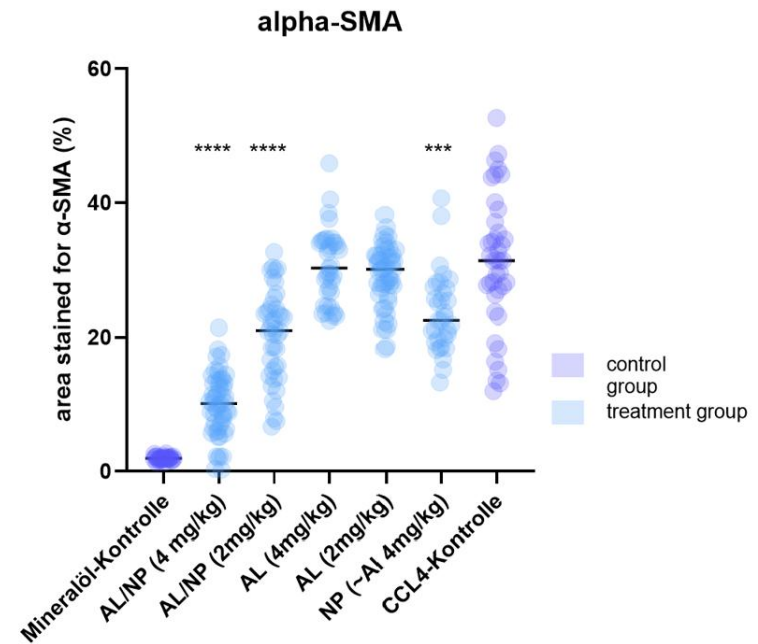
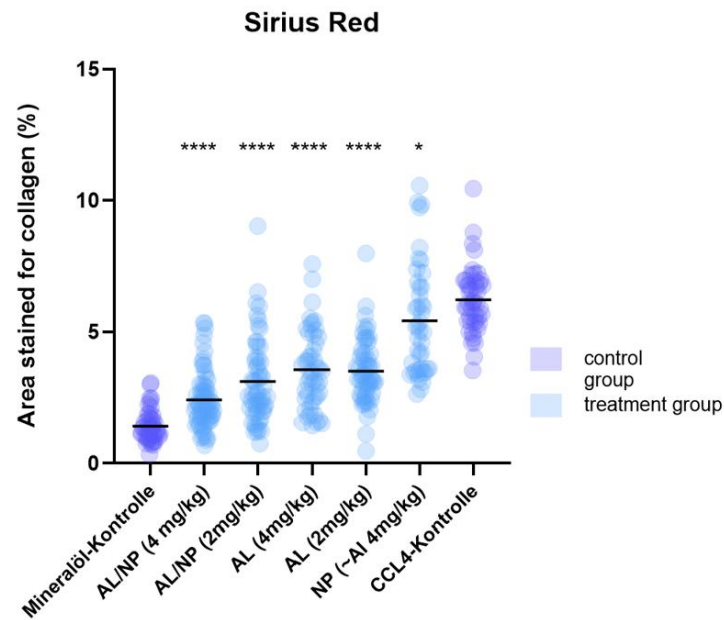


Abbildung 26: exemplarische Darstellung von Übersichtsaufnahmen bei 4x Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop von mittels Sirius Red angefärbtem Kollagen und von α -SMA positiven Myofibroblasten mit anschließender morphometrischer Auswertung. Es zeigt sich eine dosisabhängige Reduktion mit hoher statistischer Signifikanz. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, $n=5-7$ Mäuse in Versuchsgruppen, $n=4$ Mäuse in Mineralöl-Kontrolle

4 Diskussion

4.1 Diskussion der in vitro-Ergebnisse

4.1.1 Zytotoxizität

In den Zellkulturversuchen zeigte sich, dass weder freies Alendronat noch unbeladene Nanopartikel, oder nanopartikulär gekoppeltes Alendronat in den getesteten Konzentrationen eine relevante Zytotoxizität gegenüber 3T3-Fibroblasten oder RAW-Makrophagen induzierten. Erst bei den BMDM-Zellen war eine dosisabhängige Abnahme der Zellvitalität zu beobachten, wobei diese selbst bei einer Konzentration von 1 mM stets oberhalb von 50 % blieb. Dieser Befund spricht für eine insgesamt gute zelluläre Verträglichkeit der getesteten Substanzen, insbesondere in Zelltypen mit niedriger Phagozytoseaktivität.

Die Zytotoxizität von Nanopartikeln wird maßgeblich durch physikochemische Eigenschaften wie Größe, Oberflächenladung, Zusammensetzung, Form und Oberflächenmodifikation beeinflusst. (164–166) Besonders kleine Nanopartikel (< 50 nm) zeigen in mehreren Studien eine erhöhte intrazelluläre Aufnahme, die jedoch häufig mit einer gesteigerten Zytotoxizität korreliert. (167, 168)

Oberflächenmodifikationen, wie beispielsweise mit Aminen, die Einbindung biokompatibler Polymere, oder eine PEGylierung gehen hingegen oft mit einer guten Verträglichkeit und reduzierter Hämolyse einher. (101, 105, 106, 166, 169)

Beobachtungen dieser Arbeit stimmen mit früheren Arbeiten überein, die eine moderate bis geringe Zytotoxizität polymerbasierter Nanopartikel in Makrophagenkulturen beschrieben, sofern keine stark positiv geladenen oder reaktiven Oberflächengruppen vorhanden sind. (170, 171)

Die erhöhte Sensitivität der BMDM im Vergleich zu 3T3- oder RAW-Zellen lässt sich durch ihre ausgeprägte Phagozytoseaktivität erklären, die zu einer höheren intrazellulären Exposition gegenüber den getesteten Substanzen führt. Unterschiede zwischen RAW- und BMDM-Zellen sind durch den Charakter der RAW-Zelllinie erklärbar. RAW-Makrophagen sind eine immortalisierte Zelllinie und weisen eine veränderte Expression phagozytoseassoziiierter Rezeptoren auf. Guo et al. zeigten mittels Proteomanalyse, dass RAW-Makrophagen im Vergleich zu BMDM eine signifikant geringere Phagozytoserate, ein verändertes Rezeptorprofil und eine niedrigere Expression des Mannose-Rezeptors CD206 besitzen, (172) der ein therapeutisches Ziel aktueller translationaler Forschung darstellt. (173–175)

Das im Rahmen der Experimente verwendete alamarBlue™-Assay basiert auf der Reduktion von Resazurin zu Resorufin unter NADH-Verbrauch und erfasst somit die metabolische Aktivität der Zellen. Eine reduzierte Fluoreszenzintensität spiegelt daher primär eine verminderte Stoffwechselaktivität wider und ist nicht zwingend gleichzusetzen mit Zelltod. Zellen können in einen metabolisch inaktiven, aber reversiblen Ruhezustand („*cell dormancy*“) übergehen, in dem der Energieumsatz deutlich reduziert ist. (176–178) Eine alleinige Bewertung der Zytotoxizität auf Basis des Stoffwechselumsatzes kann somit theoretisch zu einer Überschätzung der Effekte führen. Trotz dieser hypothetischen Einschränkung handelt es sich beim alamarBlue™-Assay um einen seit über 50 Jahren etablierten Assay, der in über 1000 Publikationen eingesetzt wurde und eine valide und eher konservative Einschätzung der Zytotoxizität erlaubt. (179)

Die Wahl des Assays hat daher einen entscheidenden Einfluss auf die Interpretation der Ergebnisse. Braun et al. verglichen vier verschiedene Verfahren zur Bestimmung der Zytotoxizität von Siliziumdioxid-Nanopartikeln und beobachteten, dass insbesondere der MTT-Assay, der ähnlich dem alamarBlue™-Assay die Stoffwechselaktivität misst, eine systematische Überschätzung der Zytotoxizität in niedrigen und mittleren Konzentrationsbereichen ergab. (180) Die Kombination verschiedener Assays, etwa durch die parallele Bestimmung der LDH-Freisetzung, Annexin-V-Bindung oder eine ATP-

Quantifizierung, wird daher empfohlen, um die Validität der Ergebnisse zu erhöhen. (181–183) Bei der Wahl des Assays sollte jedoch eine Kosten-Nutzen-Abwägung erfolgen. (184)

Interessanterweise zeigten polarisierte BMDM in niedrigen Konzentrationen von AL, NP und AL/NP eine über 100 % liegende relative Vitalität gegenüber der PBS-Kontrolle (vgl. Abb. 15). Dies könnte Ausdruck einer induzierten proliferativen Aktivierung der Makrophagen sein, was mit einer gesteigerten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und einem erhöhten Stoffwechselumsatz einhergeht (49, 158), bevor in höheren Konzentrationen toxische Effekte von Alendronat und Nanopartikeln in den Vordergrund treten.

Lipidbasierte Nanopartikel, wie sie beispielsweise in mRNA-basierten Impfstoffen oder für siRNA eingesetzt werden, können durch endosomale Membranschäden, die bei der RNA-Freisetzung entstehen, selbst eine inflammatorische Antwort induzieren. (185–187) Analog dazu besitzen Bisphosphonate wie Alendronat starke immunmodulatorische Eigenschaften, indem sie eine Repolarisation von M2- zu M1-Makrophagen fördern. (84, 88, 89). Gleichzeitig wurden in der Literatur Tanninsäure-basierte Nanogelee beschrieben, die durch die Reduktion proinflammatorischer Zytokine und reaktiver Sauerstoffspezies antiinflammatorische Effekte vermitteln. (188)

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Limitationen von *in vitro* Zytotoxizitätsassays. Neben methodischen Unsicherheiten bleibt die Übertragbarkeit der Befunde auf *in vivo* Verhältnisse eingeschränkt. Dennoch liefern die durchgeführten Experimente wichtige Hinweise auf die grundsätzliche Verträglichkeit im Verhältnis zur therapeutischen Effektivität der getesteten Substanzen und dienen als Grundlage für weiterführende *in vivo* Untersuchungen.

4.1.2 Makrophagenpolarisation

Die FACS-Analysen ergaben eine dosisabhängige Verminderung des M2-Markers CD206 und eine statistisch signifikante Reduktion von IL-10 nach Behandlung mit AL/NP. Dies deutet auf eine Repolarisation von M2- zu einem M1-Phänotypen hin. Solche immunmodulatorischen Effekte von Bisphosphonaten auf Makrophagen, namentlich eine Förderung M1-assoziiierter Merkmale, sind bereits in mehreren Arbeiten beschrieben worden und werden durch eine verstärkte Prenylierung, TLR-4-vermittelte Immunantwort sowie die Aktivierung der NLRP3-Signalkaskade diskutiert. (79–83)

Dass in einzelnen Messreihen Signifikanzen ausblieben, lässt sich methodisch z. B. durch geringe Fallzahlen (n=3), biologische Variabilität der BMDM und Heterogenität der Aufnahme erklären. Eine stärkere Replikation und kontrollierte Standardisierung würden die Robustheit der Befunde verbessern.

Die Zuordnung der Polarisationsmarker folgt dabei der historisch gewachsenen Klassifikation von M0-, M1- und M2-Makrophagen. (55, 59) Die mittlerweile bekannten Unterkategorien M2a, M2b, M2c und M2d spielen bei *in vitro* Versuchen keine Rolle, da auch *in vivo* nicht davon ausgegangen werden kann, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt nur ein einziger Subtyp der M2-Makrophagen Zielorgan aktiv ist. (189) Die *in vitro* mittels IL-4 und IL-13 induzierte M2-Polarisation entspricht dabei dem M2a-Subtyp.

Immunologische Prozesse unterliegen dabei einer ständigen Dynamik. Es existiert daher auch ein Konzept, das besagt, dass der Phänotyp eines aktivierten Makrophagen zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht unbedingt etwas über dessen Funktion aussagt. (190) Wie ausgesprochen variabel dabei Makrophagen sind, konnten Liu et al 2020 in einer Studie zeigen. Makrophagen wurden zunächst in Richtung M1 und M2 polarisiert und anschließend von M1 zu M2 und umgekehrt repolarisiert. Mittels Transkriptomanalyse konnte gezeigt werden, dass die Repolarisation problemlos möglich war und keine molekulargenetischen Genese zugrunde liegt, sondern ausschließlich das momentane zelluläre Mediator-Mikromilieu für den Polarisationszustand entscheidend ist. (191)

In Konsequenz daraus wird deutlich, wie sehr die Arbeit mit den Zellen in der Zellkultur selbst also Auswirkungen auf sich anschließende *in vitro* Versuche hat. Durch Pipettierfehler und unterschiedliche Kulturbedingungen können kleinste Unterschiede entstehen, die sich auf den Polarisationszustand der Makrophagen auswirken. Laut Murray besteht daher auch eine Variabilität im Ringversuch und Ergebnisse sind in unterschiedlichen Laboren nicht unbedingt reproduzierbar. (190)

So kommt es beispielsweise unter hypoxischen Kulturbedingungen zu einem Anstieg der CD206 Expression in Makrophagen und damit einem Shift in Richtung M2-Polarisation. Die Kulturbedingungen entsprechen dabei der relativen Hypoxie im Mikromilieu von Tumoren. (192, 193)

Zum besseren Verständnis der *in vitro* Polarisationszustände von Makrophagen können verfeinerte Protokolle beitragen, die zum Beispiel mittels Transkriptomanalyse eine präzise Unterscheidung der einzelnen M2-Subtypen in Zellkultur ermöglichen. (194, 195) Eine große Einschränkung ist zudem die fragliche vollständige Übertragbarkeit der in murinen Tiermodellen etablierten Marker auf humane Makrophagen. (195, 196)

4.1.3 intrazelluläre Aufnahme der Nanogelee

Die mit Oregon Green markierten, Alendronat-beladenen Nanogelee (OG-AL/NP) zeigten eine deutlich erhöhte intrazelluläre Aufnahme im Vergleich zu unbeladenen Nanogeleen (OG-NP). In den FACS-Analysen konnten in 11–19 % der untersuchten Zellen OG-AL/NP detektiert werden, während OG-NP lediglich eine Aufnahme von 1–2 % zeigten. Dieses Ergebnis spricht für eine verbesserte zelluläre Adressierung und Aufnahme durch die kovalente Kopplung von Alendronat an das Nanogel. Kaps et al. bestätigte dieses Ergebnis mittels Fluoreszenzmikroskopie. (1)

Die erhöhte Aufnahme lässt sich möglicherweise durch eine veränderte Proteinkorona erklären, die infolge der Alendronat-Kopplung entsteht. Diese Korona kann die Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren modifizieren und dadurch die Endozytose erleichtern. (197, 198) Besonders in M2-Makrophagen, die eine hohe Dichte an Scavenger-Rezeptoren exprimieren, wird die Aufnahme negativ geladener Makromoleküle begünstigt. (199) Das Zeta-Potenzial der AL/NP betrug –26 mV verglichen mit –4 mV der unbeladenen NP (vgl. Abb. 8F). Die negativ geladenen Phosphatgruppen des Alendronats fördern daher vermutlich die Bindung an diese Rezeptoren und damit die zelluläre Aufnahme. (1, 200–203)

Die Zusammensetzung der Proteinkorona ist dabei stark vom biologischen Milieu abhängig. Während *in vitro* vor allem Serumproteine der Kulturmedien adsorbieren, bildet sich *in vivo* eine komplexe Korona aus Albumin, Apolipoproteinen und Komplementfaktoren, die die Biokompatibilität und Aufnahmeeffizienz wesentlich beeinflussen. (204, 205) Auch das Zeta-Potenzial bestimmt die Zusammensetzung der Proteinkorona und beeinflusst so die intrazelluläre Aufnahme von Nanopartikeln. (206) Diese Unterschiede sind entscheidend, da sie die Übertragbarkeit von *in vitro*-Befunden auf *in vivo*-Modelle limitieren können.

Ein weiterer zentraler Einflussfaktor ist die Stabilität der Nanogelee und ihrer Fluoreszenzmarkierung. Die Synthese, chemische Kopplung von Alendronat sowie die Konjugation des Farbstoffs wurden durch [REDACTED] am Max-Planck-Institut für Polymerforschung durchgeführt. Vor jeder Versuchsreihe erfolgte eine Kontrolle der Fluoreszenzintensität mittels IVIS-Messung. In einem Fall wurde eine Zersetzung des Fluoreszenzfarbstoffs festgestellt, was auf eine fehlerhafte Pufferlösung zurückzuführen war (vgl. Abb. 11). Dieses Ereignis verdeutlicht die Empfindlichkeit nanotechnologischer Systeme gegenüber Variationen in der Herstellung oder Handhabung.

Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit wurden die Nanogelee umfassend charakterisiert. Kaps et al. beschrieben in ihrer Arbeit die chemischen und technischen Analyseverfahren zur

Bestätigung der Alendronat-Kopplung und Partikelhomogenität, die entscheidend für die Validität der durchgeführten Experimente sind. (1)

Die *in vitro* beobachtete verstärkte intrazelluläre Aufnahme legt nahe, dass die Nanogelee auch *in vivo* eine erhöhte Leberakkumulation und zelluläre Internalisierung zeigen könnten, ein Aspekt, der in den folgenden Experimenten zur Biodistribution detailliert untersucht wurde.

4.1.4 Genexpressionsanalyse

Die RT-qPCR-Analysen bestätigten die zellulären Befunde auf Transkriptionsebene. Sowohl freies AL als auch nanopartikulär gekoppeltes AL/NP führten zu einer signifikanten Reduktion der M2-assoziierten Gene IL-10 und YM-1, während der M1-Marker CCL-2 insbesondere nach Behandlung mit AL/NP deutlich hochreguliert war. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den FACS-Daten und belegen eine Polarisationsverschiebung von anti-inflammatorischen M2- zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen.

Die Übereinstimmung der Resultate auf Protein- (FACS) und mRNA-Ebene (RT-qPCR) stärkt die Hypothese, dass AL durch die Hemmung des Mevalonat-Stoffwechselwegs und die Verstärkung proinflammatorischer Signalwege (u.a. NLRP3-Inflammasom, TLR-4-Signalkaskade) eine funktionelle Repolarisation der Makrophagen induzieren kann. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass Transkriptions- und Proteindynamiken zeitlich asynchron verlaufen können und somit Unterschiede in der Expressionsstärke nicht zwingend eine Diskrepanz, sondern eine zeitliche Verschiebung der Aktivierung widerspiegeln.

Die Kombination beider Methoden erlaubt daher eine robustere Beurteilung der makrophagenvermittelten Immunmodulation. Die konsistenten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kopplung von Alendronat an Nanogelee die biologische Aktivität des Wirkstoffs *in vitro* nicht mindert, sondern insbesondere *in vivo* seine zielgerichtete Wirkung auf M2-Makrophagen im Sinne einer immunologischen Reprogrammierung a.e. durch das Mikromilieu-Targeting in der Leber sogar verstärkt.

Trotz der hohen Sensitivität und Spezifität der RT-qPCR ist bei der Interpretation der Ergebnisse methodischen Limitationen Rechnung zu tragen. Schwankungen in der RNA-Qualität, unvollständige cDNA-Synthese oder variable Effizienzen der Primeramplifikation können die quantitative Genauigkeit beeinflussen. Auch die Wahl des Referenzgens ist entscheidend, da Expressionsänderungen selbst klassischer Housekeeping-Gene unter bestimmten Stimulationsbedingungen auftreten können. (157, 207, 208) Schließlich bildet die RT-qPCR lediglich einen Momentzustand der Genexpression ab und erlaubt keine direkte Aussage über posttranslationale Modifikationen oder Proteinaktivität.

4.2 Diskussion der in-vivo-Ergebnisse

Die *in vitro*-Ergebnisse legten nahe, dass AL und AL/NP immunmodulatorische Effekte auf Makrophagen ausüben und eine Repolarisation von M2- zu M1-Phänotypen induzieren können. Um diese Befunde im physiologischen Kontext zu überprüfen, wurden im nächsten Schritt *in vivo*-Versuche in unserem optimierten CCl₄-basierten Mausmodell der parenchymatösen Leberfibrose durchgeführt.

Die Untersuchungen umfassten sowohl pharmakokinetische Analysen der Biodistribution als auch funktionelle Wirksamkeitsprüfungen nach wiederholter intravenöser Gabe der Wirkstoffformulierungen. Dabei stand die Frage im Mittelpunkt, ob AL/NP gezielt in fibrotischem Lebergewebe akkumulieren, intrazellulär aufgenommen werden und dort antifibrotische Effekte vermitteln können, ohne systemische Toxizität zu verursachen.

Zur Beurteilung dieser Aspekte wurden neben der *in vivo*-Bildgebung mittels Nahinfrarot-Fluoreszenz (IVIS) auch ex vivo Analysen, Durchflusszytometrie, Transkriptomanalysen und

biochemische sowie histologische Parameter herangezogen. Die Ergebnisse erlauben eine integrative Bewertung von Wirksamkeit, Sicherheit und Zielorganspezifität der Nanogel-basierten Alendronat-Formulierung.

4.2.1 Biodistribution

Die *in vivo*-Untersuchungen mittels Nahinfrarot-Fluoreszenzbildgebung zeigten eine deutliche Anreicherung der NIR-markierten AL/NP in der Leber, während freies Alendronat (NIR-AL) und die unbeladenen Nanogelee (NIR-NP) keine vergleichbare Organpräferenz aufwiesen. Die Fluoreszenz blieb bei AL/NP über 48 Stunden stabil erhöht, was auf eine verlängerte Retention, prominent in der Leber, und damit eine effektive Geweheadressierung hinweist. Im Gegensatz dazu zeigten NIR-AL eine rasche Abnahme des Signals, was der bekannten schnellen renalen Elimination von Alendronat entspricht. (70, 85)

Die *ex vivo*-Bildgebung bestätigte diese Befunde mit einer klaren Dominanz der Fluoreszenz in der Leber und nur geringen Signalen in anderen Organen. Dies belegt eine bevorzugte Aufnahme bzw. Retention von AL/NP im Zielorgan und spricht für eine effiziente extraskellettale Umverteilung des Wirkstoffs. Die vergleichbare Strahlungseffizienz zwischen gesunden und fibrotischen Tieren lässt darauf schließen, dass die Fibrose-induzierte Gewebeveränderung zwar die Mikroumgebung der Leber modifiziert, in diesem Fall jedoch keine signifikante Barriere für die Partikelaufnahme darstellte. Je nach Ausmaß des fibrotischen Umbaus, der Partikelgröße und der Ligandenbindung ist in der Literatur allerdings auch eine veränderte Pharmakokinetik *in vivo* zwischen gesunden und fibrotischen Tieren beschrieben. (209, 210)

Die Mehrheit der Nanopartikel akkumuliert in der Leber, was hier ein großer Vorteil ist, beim gezielten Targeting anderer Organsysteme jedoch eine Herausforderung darstellen kann. Dies ist primär der physiologischen Funktion der Leber als zentrales Clearance-Organ geschuldet. Kupffer-Zellen machen etwa 80–90 % aller gewebeständigen Makrophagen der Leber aus und besitzen die höchste Phagozytoserate im Körper (37, 199). Zudem ist der Blutfluss in den Lebersinusoiden stark verlangsamt, was die Bindung und Aufnahme von Nanopartikeln zusätzlich begünstigt (199). Interessanterweise zeigten die unbeladenen Nanogelee keine Organpräferenz, sodass die Kopplung von Alendronat neben dem passiven auch ein zusätzliches „aktives Targeting“ ermöglichte. Wie bereits in Kapitel 4.1.3 diskutiert, könnten die negativ geladenen Phosphatgruppen des Alendronats die Bindung an Scavenger-Rezeptoren verstärken. (1, 200–203)

In anderen Zelltypen und teils auch in Makrophagen erfolgt die Internalisierung polymerer Nanopartikel überwiegend über Clathrin- oder Caveolin-vermittelte Endozytose, teilweise ergänzt durch Makropinozytose. Welche Route überwiegt, hängt von Partikelgröße, Oberflächenladung und dem Proteinkorona-Profil ab. (211–213) Darüber hinaus ist bekannt, dass fibrotisches Lebergewebe durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität charakterisiert ist, was die Aufnahme von kleineren Nanopartikeln zusätzlich begünstigen kann. (214)

Die Ergebnisse der Fluoreszenzbildgebung stehen somit im Einklang mit der Hypothese, dass AL/NP bevorzugt in die Leber und insbesondere in nicht-parenchymale Zellen gelangen. Dies wurde durch FACS-Analysen auf Einzelzellebene bestätigt, bei denen eine signifikant höhere intrazelluläre Fluoreszenz in Makrophagen, Endothelzellen und portalen Myofibroblasten nachgewiesen wurde. Die geringe Fluoreszenz in Hepatozyten lässt sich mit ihrer geringen Endozytoseaktivität erklären. (215, 216) Somit bestätigt sich, dass die AL/NP-Nanogelee gezielt in jene Zelltypen aufgenommen werden, die an den immunregulatorischen und fibrogenetischen Prozessen der Leber beteiligt sind.

Insgesamt zeigen die Biodistributionsdaten, dass die Nanogel-Formulierung die pharmakokinetischen Limitationen von freiem Alendronat überwindet, indem sie eine verlängerte systemische Zirkulation und eine selektive Leber- und Makrophagenanreicherung ermöglicht, ohne dass es zu einer unspezifischen Organakkumulation kommt.

4.2.2 Therapieeffekte und funktionelle Parameter

Die Behandlung fibrotischer Mäuse mit nanopartikulär gekoppeltem Alendronat führte zu einer signifikanten Verbesserung mehrerer funktioneller und morphologischer Parameter. Während freies Alendronat und die unbeladenen Nanogelee nur geringe Effekte zeigten, war insbesondere die Gruppe AL/NP (4 mg/kg) durch eine ausgeprägte Reduktion fibrotischer Marker gekennzeichnet.

Beim Körpergewicht zeigte sich infolge der CCl₄-induzierten Leberfibrose ein signifikanter Gewichtsverlust in allen behandelten Gruppen im Vergleich zur Mineralöl-Kontrolle. Diese Reduktion spiegelt die systemische Belastung durch die chronische Leberschädigung wider. In den Gruppen, die mit AL/NP behandelt wurden, kam es zu keiner weiteren Gewichtsabnahme, was auf eine gute allgemeine Verträglichkeit der Therapie hinweist. Shao et al. beschrieben, dass das Zeta-Potenzial polymerer Nanopartikel einen unabhängigen Einfluss auf deren Zytotoxizität ausübt. (217) Das hier gemessene negative Zeta-Potenzial von -26 mV könnte somit zu der beobachteten guten in vivo-Verträglichkeit und zum spezifischen Leber- und Makrophagentargeting beigetragen haben.

Die Laborparameter stützen diese Beobachtungen. Weder nach einmaliger Applikation (Biodistribution) noch nach sechsmaliger intravenöser Gabe zeigten sich innerhalb von 14 Tagen pathologische Veränderungen der Nierenfunktionswerte, was auf eine gute systemische Verträglichkeit und das Fehlen einer Nephrotoxizität hinweist. Die Leberwerte waren erwartungsgemäß infolge der CCl₄-Exposition stark erhöht. Entscheidend ist jedoch, dass sich keine weitere Erhöhung zeigte, somit keine zusätzliche hepatotoxische Wirkung durch die Wirkstoffe eintrat. Im Gegenteil, in der Gruppe AL/NP (4mg/kg) zeigt sich eine signifikante Abnahme der GLDH-Aktivität und der alkalischen Phosphatase. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Datenqualität aufgrund der geringen Fallzahl reduziert ist.

Auf biochemischer Ebene bestätigte die Hydroxyprolin-Bestimmung eine signifikante Verminderung des Kollagengehalts in der Leber um bis zu 80 % in der Gruppe AL/NP (4 mg/kg). Hydroxyprolin ist ein etablierter Marker der Kollagenakkumulation und erlaubt eine quantitative Einschätzung des Fibrosegrades. (162, 163) Diese deutliche Reduktion weist auf einen robusten antifibrotischen Effekt hin, der mit den histologischen Ergebnissen korreliert. In der Sirius-Rot-Färbung zeigten sich dosisabhängig reduzierte Kollagendepositionen mit verbesserter Leberarchitektur und die α -SMA-Färbung belegte eine Abnahme der aktivierten Myofibroblasten.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die antifibrotische Wirkung primär auf einer Immunmodulation durch Makrophagenrepolarisation beruht, die sekundär die fibrogenetische Signalwege in Myofibroblasten beeinflusst. Unterstützt wird dies durch die parallele Abnahme von IL-10 und CD-206 sowie die Hochregulation von CCL-2. (55, 63) Kaps et al. untersuchten die immunmodulatorische Wirkung von AL/NP zusätzlich mittels quantitativer Immunhistochemie für M1- und M2-Makrophagenmarker sowie einer Transkriptom- und Proteomanalyse der Leber und konnte die Hochregulation klassisch proinflammatorischer, M1-assoziiierter und damit primär fibrolytischer Gene bestätigen. (1) Besonders hervorzuheben ist die vermehrte Expression von Interleukin-1 β , einem zentralen Mediator des NLRP3-Signalwegs, was den postulierten Mechanismus der Bisphosphonat-induzierten Makrophagenrepolarisation stützt. (76–81)

Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass nanopartikulär gekoppeltes Alendronat in diesem Modell eine signifikante antifibrotische Wirkung entfaltet, ohne systemische Toxizität zu verursachen.

4.3 Limitationen und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen das Potenzial nanopartikulär gekoppelter Bisphosphonate als antifibrotische Therapieoption, unterliegen jedoch mehreren Limitationen, die bei der Interpretation berücksichtigt werden müssen.

Zunächst ist die Übertragbarkeit von *in vitro* auf *in vivo* eingeschränkt. Zellkulturmodelle bieten eine kontrollierte Umgebung, bilden jedoch die komplexe Immunzell- und Matrixinteraktion des fibrotischen Lebergewebes nur unzureichend ab. Zudem reagieren primäre murine Makrophagen anders als humane Zellen auf inflammatorische Stimuli, sodass funktionelle Effekte nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind. (195, 196) Auch können Wirkstoffkonzentrationen zwischen *in vitro* und *in vivo* nicht direkt miteinander verglichen werden, da Unterschiede in Proteinbindung, Gewebeverteilung und Metabolisierung bestehen. Zudem repräsentiert die *in vitro* mit IL-4/IL-13 induzierte Makrophagenpolarisation nicht das Spektrum der fibrogenen M2-typischen Polarisationen, die *in vivo* bei der Fibrogenese wirksam sind.

Ein weiterer methodischer Aspekt betrifft die geringe Fallzahl *in vitro* (n=3), die insbesondere bei den FACS-Analysen und qPCR-Experimenten die Aussagekraft limitiert. Die teilweise verfehlte statistische Signifikanz könnte damit nicht nur biologische, sondern auch methodische Ursachen haben. Größere Kohorten und technische Replikate würden hier die Robustheit und Reproduzierbarkeit der *in vitro* Daten erhöhen.

Auch das Tiermodell stellt eine Limitation dar. Das CCl₄-Modell erlaubt eine standardisierte und reproduzierbare Induktion der Leberfibrose, spiegelt jedoch vor allem toxisch-oxidative Schädigungsmechanismen wider. (133–135) Eine Validierung in nutritiven Tiermodellen, etwa der CDAA-Diät (218) wäre daher sinnvoll, um die Generalisierbarkeit der Ergebnisse zu prüfen und die klinische Relevanz zu stärken, da dieses und verwandte Modelle als Goldstandard in der präklinischen MASH-Forschung gelten. (152)

Zudem bestehen technische Limitationen beim Applikationsweg. In Mäusen können trotz größter Sorgfalt durch wiederholte Punktionen der Schwanzvene Paravasate entstehen und dadurch variable Wirkstoffmengen freigesetzt werden. So zeigt Abbildung 9 exemplarisch persistierende Fluoreszenzsignale in Mausschwänzen 30 Tage nach Injektion, was auf eine lokale Retention hinweist. Selbst geringe Injektionsverluste pro Applikation könnten bei sechsmaliger Gabe zu kumulativen Dosisabweichungen führen.

Langzeituntersuchungen zur Wirkstoffapplikation fehlen bislang. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit keine akute und subakute Toxizität nachgewiesen wurde, bleibt unklar, ob bei langfristiger Gabe eine chronische Akkumulation von AL/NP in der Leber auftritt. Hierzu wären pharmakokinetische Studien mit längerer Nachbeobachtung sowie histopathologische Analysen nach langfristiger Gabe erforderlich.

Im Hinblick auf die Translation in die Klinik ergeben sich mehrere Perspektiven. Eine gezielte Oberflächenmodifikation der Nanogelee könnte die selektive Aufnahme in spezifische Zielzellpopulationen, insbesondere Makrophagen oder Myofibroblasten, weiter verbessern, beispielsweise durch Ligandenbindung an CD206 (Makrophagen), Integrin $\alpha\beta6$ (Myofibroblasten) oder andere Oberflächenrezeptoren. (173, 174, 219)

Aktuell stellt Resmetirom, ein selektiver Agonist des Schilddrüsenhormon-Rezeptors β (THR- β), den am weitesten entwickelten antifibrotischen Wirkstoffkandidaten dar. In der Phase-3-Studie *MAESTRO-NASH* konnte eine signifikante Verbesserung von Steatose, Entzündung und Fibrose ohne relevante Hepatotoxizität gezeigt werden. (220) Im Juni 2025 erteilte die Europäische Arzneimittelagentur eine bedingte Marktzulassung (*conditional marketing authorisation*), obwohl finale Langzeitergebnisse noch ausstehen (221, 222) Dies markiert einen wichtigen Meilenstein in der MASH-Therapie. Es verdeutlicht jedoch zugleich aufgrund der vielfältigen pathogenetischen Ursachen von Leberfibrose die weiterhin bestehende Notwendigkeit wirksamer antifibrotischer Strategien, wobei zwischen primär metabolisch

wirksamen Medikamenten wie Resmetirom (*indirect antifibrotics*) und direkt antifibrotischen Wirkstoffkandidaten unterschieden werden muss. Letztere zielen beispielsweise auf die Hemmung der Myofibroblastenaktivierung oder auf eine Repolarisation der M2-Makrophagen.

Die Kombination von Resmetirom mit immunmodulatorischen Ansätzen wie nanopartikulär gekoppeltem Alendronat könnte somit perspektivisch einen komplementären Therapieansatz bei fibrotischer MASH darstellen, der in diesem Fall metabolische und direkt Fibrose-assoziierte immunologische Signalwege kombiniert.

5 Zusammenfassung

Meine Dissertation hat sich der Fragestellung gewidmet, ob durch die Adressierung von Lebermakrophagen mittels nanopartikulär gekoppeltem Alendronat ein antifibrotischer Effekt erzielt werden kann und so eine neue Therapieoption zur Behandlung der Leberfibrose aufgezeigt werden kann.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Hypothese bestätigt werden kann und nanopartikulär gekoppeltes Alendronat (AL/NP) in der Tat eine vielversprechende Strategie zur gezielten Modulation der Leberfibrose darstellt. Durch die Kombination des etablierten Wirkstoffs Alendronat mit einem biokompatiblen Nanogelträger konnte eine deutlich verbesserte Gewebeadressierung und verlängerte Retention in der Leber erzielt werden. Die *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnisse deuten darauf hin, dass AL/NP nicht nur eine gute zelluläre Verträglichkeit aufweist, sondern zugleich eine immunmodulatorische Wirkung entfaltet, die über die klassischen Mechanismen des Knochen-Targeting und der Osteoklastenhemmung hinausgeht.

Auf zellulärer Ebene zeigte sich eine dosisabhängige Repolarisation von M2- zu M1-Makrophagen, bestätigt durch eine Reduktion der M2-assoziierten Marker CD206, IL-10 und YM-1 sowie eine Hochregulation des eher klassisch proinflammatorischen Chemokins CCL-2. Parallel konnte *in vivo* eine ausgeprägte Anreicherung von AL/NP in der Leber und insbesondere in nicht-parenchymalen Zellpopulationen, primär Makrophagen, nachgewiesen werden, ohne dass eine systemische Toxizität oder nephrotoxische Effekte auftraten.

Funktionell führte die Behandlung fibrotischer Mäuse mit AL/NP zu einer signifikanten Abnahme von Hydroxyprolin und einer Reduktion der α -SMA-Expression, was auf einen Rückgang des kollagenreichen Narbengewebes und der Aktivität von Myofibroblasten, den Haupteffektorzellen der Fibrogenese, hinweist. Diese antifibrotischen Effekte sind konsistent mit der beobachteten Immunrepolarisation und deuten auf eine zentrale Rolle M2-typischer Makrophagen als Aktivatoren fibrogener Prozesse hin.

Obwohl die Ergebnisse ermutigend sind, bleibt die Translation in die Klinik eine Herausforderung. Unterschiede zwischen murinen und humanen Immunzellen, speziell auch der Makrophagen, die Limitierung des CCl₄-Modells sowie die geringe Fallzahl erfordern eine vorsichtige Interpretation. Weitere präklinische Studien in alternativen Fibrosemodellen, insbesondere der biliären und MASH-induzierten Leberfibrose, pharmakokinetische Langzeituntersuchungen und ggf. die Kombination mit bestehenden, potenziell antifibrotischen Wirkstoffen erscheinen vielversprechend, um die Wirksamkeit und Sicherheit von AL/NP weiter zu validieren.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die Kopplung von Alendronat an Nanogele eine innovative Möglichkeit bietet, das pharmakologische Profil von Bisphosphonaten gezielt zu erweitern, wodurch ein neuer, translationaler Therapieansatz für chronische Lebererkrankungen entsteht.

6 Literatur

1. Kaps L, Huppertsberg A, Choteschovsky N, Klefenz A, Durak F, Schrörs B et al. pH-degradable, bisphosphonate-loaded nanogels attenuate liver fibrosis by repolarization of M2-type macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; 119(12):e2122310119. doi: 10.1073/pnas.2122310119.
2. Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021; 18(3):151–66. doi: 10.1038/s41575-020-00372-7.
3. Popov Y, Schuppan D. Targeting liver fibrosis: strategies for development and validation of antifibrotic therapies. *Hepatology* 2009; 50(4):1294–306. doi: 10.1002/hep.23123.
4. Sun Y, Wu X, Zhou J, Meng T, Wang B, Chen S et al. Persistent Low Level of Hepatitis B Virus Promotes Fibrosis Progression During Therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020; 18(11):2582-2591.e6. doi: 10.1016/j.cgh.2020.03.001.
5. Revill PA, Chisari FV, Block JM, Dandri M, Gehring AJ, Guo H et al. A global scientific strategy to cure hepatitis B. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2019; 4(7):545–58. doi: 10.1016/S2468-1253(19)30119-0.
6. McCaughan GW, George J. Fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection. *Gut* 2004; 53(3):318–21. doi: 10.1136/gut.2003.026393.
7. Sebastiani G, Gkouvatsos K, Pantopoulos K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20(32):11033–53. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11033.
8. Lackner C, Tiniakos D. Fibrosis and alcohol-related liver disease. *J Hepatol* 2019; 70(2):294–304. doi: 10.1016/j.jhep.2018.12.003.
9. Deutsche Diabetes-Gesellschaft. NAFLD wird zur MASLD, NASH wird zur MASH; 2025 [Stand: 17.03.2025]. Verfügbar unter: <https://www.ddg.info/pressebereich/ddg-7-8/2023/xxx-3>.
10. Trivella J, John BV, Levy C. Primary biliary cholangitis: Epidemiology, prognosis, and treatment. *Hepatol Commun* 2023; 7(6). doi: 10.1097/HC9.000000000000179.
11. Karlsen TH, Folseraas T, Thorburn D, Vesterhus M. Primary sclerosing cholangitis - a comprehensive review. *J Hepatol* 2017; 67(6):1298–323. doi: 10.1016/j.jhep.2017.07.022.
12. Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose E, Kamath PS. Global burden of liver disease: 2023 update. *J Hepatol* 2023; 79(2):516–37. doi: 10.1016/j.jhep.2023.03.017.
13. Pimpin L, Cortez-Pinto H, Negro F, Corbould E, Lazarus JV, Webber L et al. Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *J Hepatol* 2018; 69(3):718–35. doi: 10.1016/j.jhep.2018.05.011.
14. Loomba R, Lim JK, Patton H, El-Serag HB. AGA Clinical Practice Update on Screening and Surveillance for Hepatocellular Carcinoma in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Expert Review. *Gastroenterology* 2020; 158(6):1822–30. doi: 10.1053/j.gastro.2019.12.053.
15. Roeb E, Canbay A, Bantel H, Bojunga J, Laffolie J de, Demir M et al. Aktualisierte S2k-Leitlinie nicht-alkoholische Fettlebererkrankung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) – April 2022 – AWMF-Registernummer: 021–025. *Z Gastroenterol* 2022; 60(9):1346–421. doi: 10.1055/a-1880-2283.
16. Selicean S, Wang C, Guixé-Muntet S, Stefanescu H, Kawada N, Gracia-Sancho J. Regression of portal hypertension: underlying mechanisms and therapeutic strategies. *Hepatol Int* 2021; 15(1):36–50. doi: 10.1007/s12072-021-10135-4.

-
17. Iwakiri Y, Trebicka J. Portal hypertension in cirrhosis: Pathophysiological mechanisms and therapy. *JHEP Rep* 2021; 3(4):100316. doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100316.
 18. Sanyal AJ, Shah VH. Portal Hypertension. Totowa, NJ: Humana Press; 2005.
 19. Hartleb M, Gutkowski K, Milkiewicz P. Nodular regenerative hyperplasia: evolving concepts on underdiagnosed cause of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2011; 17(11):1400–9. doi: 10.3748/wjg.v17.i11.1400.
 20. Issa G, Shang Y, Strandberg R, Hagström H, Wester A. Cause-specific mortality in 13,099 patients with metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease in Sweden. *J Hepatol* 2025. doi: 10.1016/j.jhep.2025.03.001.
 21. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334(11):693–9. doi: 10.1056/NEJM199603143341104.
 22. Statistiken zur Organspende für Deutschland und Europa [Stand: 18.03.2025]. Verfügbar unter: <https://www.organspende-info.de/zahlen-und-fakten/statistiken/>.
 23. Acharya P, Chouhan K, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Cellular Mechanisms of Liver Fibrosis. *Front Pharmacol* 2021; 12:671640. doi: 10.3389/fphar.2021.671640.
 24. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008; 371(9615):838–51. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60383-9.
 25. Schuppan D, Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis. *J Clin Invest* 2013; 123(5):1887–901. doi: 10.1172/JCI66028.
 26. Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol* 2015; 62(1 Suppl):S15–24. doi: 10.1016/j.jhep.2015.02.039.
 27. Schuppan D, Ashfaq-Khan M, Yang AT, Kim YO. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. *Matrix Biol* 2018; 68–69:435–51. doi: 10.1016/j.matbio.2018.04.006.
 28. Schuppan D. Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015; 39 Suppl 1:S51–9. doi: 10.1016/j.clinre.2015.05.005.
 29. Seki E, Minicis S de, Inokuchi S, Taura K, Miyai K, van Rooijen N et al. CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 2009; 50(1):185–97. doi: 10.1002/hep.22952.
 30. Yang YM, Seki E. TNF α in liver fibrosis. *Curr Pathobiol Rep* 2015; 3(4):253–61. doi: 10.1007/s40139-015-0093-z.
 31. Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3:S84–7. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04584.x.
 32. Ramos-Tovar E, Muriel P. Molecular Mechanisms That Link Oxidative Stress, Inflammation, and Fibrosis in the Liver. *Antioxidants (Basel)* 2020; 9(12). doi: 10.3390/antiox9121279.
 33. Sprenger Hea. Differential expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in transforming rat hepatic stellate cells. *J Hepatol*; (Volume 30, Issue 1):88–94.
 34. Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol* 2016; 64(6):1403–15. doi: 10.1016/j.jhep.2016.02.004.
 35. Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, Nattermann J, Luedde T, Trautwein C et al. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One* 2011; 6(6):e21381. doi: 10.1371/journal.pone.0021381.
 36. Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJP et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is

-
- mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277(13):11069–76. doi: 10.1074/jbc.M111490200.
37. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol* 2015; 44-46:247–54. doi: 10.1016/j.matbio.2015.03.005.
 38. Hammerich L, Tacke F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2023; 20(10):633–46. doi: 10.1038/s41575-023-00807-x.
 39. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112(12):1776–84. doi: 10.1172/JCI20530.
 40. Gomperts BN, Strieter RM. Fibrocytes in lung disease. *J Leukoc Biol* 2007; 82(3):449–56. doi: 10.1189/jlb.0906587.
 41. Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2017; 17(5):306–21. doi: 10.1038/nri.2017.11.
 42. Wen Y, Lambrecht J, Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities. *Cell Mol Immunol* 2021; 18(1):45–56. doi: 10.1038/s41423-020-00558-8.
 43. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol* 2009; 51(1):212–23. doi: 10.1016/j.jhep.2009.03.008.
 44. Dooley S, Dijke P ten. TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res* 2012; 347(1):245–56. doi: 10.1007/s00441-011-1246-y.
 45. Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(24):9448–53. doi: 10.1073/pnas.1201840109.
 46. Carpino G, Del Ben M, Pastori D, Carnevale R, Baratta F, Overi D et al. Increased Liver Localization of Lipopolysaccharides in Human and Experimental NAFLD. *Hepatology* 2020; 72(2):470–85. doi: 10.1002/hep.31056.
 47. Liu C, Chen X, Yang L, Kisseleva T, Brenner DA, Seki E. Transcriptional repression of the transforming growth factor β (TGF- β) Pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) by Nuclear Factor κ B (NF- κ B) p50 enhances TGF- β signaling in hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2014; 289(10):7082–91. doi: 10.1074/jbc.M113.543769.
 48. Park BS, Lee J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med* 2013; 45(12):e66. doi: 10.1038/emmm.2013.97.
 49. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(3):181–94. doi: 10.1038/nri3623.
 50. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 2009; 50(1):261–74. doi: 10.1002/hep.22950.
 51. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med* 2017; 214(8):2387–404. doi: 10.1084/jem.20162152.
 52. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* 2010; 184(7):3964–77. doi: 10.4049/jimmunol.0903356.
 53. Huang R, Fu P, Ma L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 8(1):129. doi: 10.1038/s41392-023-01379-7.

-
54. Li H, You H, Fan X, Jia J. Hepatic macrophages in liver fibrosis: pathogenesis and potential therapeutic targets. *BMJ Open Gastroenterol* 2016; 3(1):e000079. doi: 10.1136/bmjgast-2016-000079.
 55. Chen S, Saeed AFUH, Liu Q, Jiang Q, Xu H, Xiao GG et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 8(1):207. doi: 10.1038/s41392-023-01452-1.
 56. Binatti E, Gerussi A, Barisani D, Invernizzi P. The Role of Macrophages in Liver Fibrosis: New Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci* 2022; 23(12). doi: 10.3390/ijms23126649.
 57. Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol* 2013; 93(6):875–81. doi: 10.1189/jlb.1012512.
 58. Gharavi AT, Hanjani NA, Movahed E, Doroudian M. The role of macrophage subtypes and exosomes in immunomodulation. *Cell Mol Biol Lett* 2022; 27(1):83. doi: 10.1186/s11658-022-00384-y.
 59. Luo M, Zhao F, Cheng H, Su M, Wang Y. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases. *Front Immunol* 2024; 15:1352946. doi: 10.3389/fimmu.2024.1352946.
 60. van Overmeire E, Stijlemans B, Heymann F, Keirsse J, Morias Y, Elkrim Y et al. M-CSF and GM-CSF Receptor Signaling Differentially Regulate Monocyte Maturation and Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* 2016; 76(1):35–42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0869.
 61. Kang Q, Li L, Pang Y, Zhu W, Meng L. An update on Ym1 and its immunoregulatory role in diseases. *Front Immunol* 2022; 13:891220. doi: 10.3389/fimmu.2022.891220.
 62. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado JdD, Popovich PG, Partida-Sanchez S et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One* 2015; 10(12):e0145342. doi: 10.1371/journal.pone.0145342.
 63. Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015; 2015:816460. doi: 10.1155/2015/816460.
 64. Ma P-F, Gao C-C, Yi J, Zhao J-L, Liang S-Q, Zhao Y et al. Cytotherapy with M1-polarized macrophages ameliorates liver fibrosis by modulating immune microenvironment in mice. *J Hepatol* 2017; 67(4):770–9. doi: 10.1016/j.jhep.2017.05.022.
 65. Bahram Yazdroudi F, Malek A. Reducing M2 macrophage in lung fibrosis by controlling anti-M1 agent. *Sci Rep* 2025; 15(1):4120. doi: 10.1038/s41598-024-76561-0.
 66. Diel IJ. Die Entdeckung der Bisphosphonate (Prof. Dr. Ingo J. Diel). *Osteologie* 2021; 30(01):82–7. doi: 10.1055/a-1351-8576.
 67. Salzer T. Ueber eine eigenthümliche Phosphorsäure des Handels. *Pharm Ztg* 1894; 39:262.
 68. Bauss F. Entwicklung der Bisphosphonate bis zur klinischen Anwendung. In: Kurth AA, Hovy L, Hennigs T, Hrsg. *Bisphosphonattherapie von Knochenerkrankungen*. Heidelberg: Steinkopff; 2001. S. 1–10.
 69. Barbosa JS, Almeida Paz FA, Braga SS. Bisphosphonates, Old Friends of Bones and New Trends in Clinics. *J Med Chem* 2021; 64(3):1260–82. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01292.
 70. Russell RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008; 19(6):733–59. doi: 10.1007/s00198-007-0540-8.

-
71. Cummings SR, Santora AC, Black DM, Russell RGG. History of alendronate. *Bone* 2020; 137:115411. doi: 10.1016/j.bone.2020.115411.
 72. Thomasius. S3_Prophylaxe-Diagnostik-Therapie-der-Osteoporose_2023-11.
 73. Park J, Pandya VR, Ezekiel SJ, Berghuis AM. Phosphonate and Bisphosphonate Inhibitors of Farnesyl Pyrophosphate Synthases: A Structure-Guided Perspective. *Front Chem* 2020; 8:612728. doi: 10.3389/fchem.2020.612728.
 74. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
 75. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(9):1032–45. doi: 10.4065/83.9.1032.
 76. Akula MK, Ibrahim MX, Ivarsson EG, Khan OM, Kumar IT, Erlandsson M et al. Protein prenylation restrains innate immunity by inhibiting Rac1 effector interactions. *Nat Commun* 2019; 10(1):3975. doi: 10.1038/s41467-019-11606-x.
 77. Skinner OP, Jurczyluk J, Baker PJ, Masters SL, Rios Wilks AG, Clearwater MS et al. Lack of protein prenylation promotes NLRP3 inflammasome assembly in human monocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2019; 143(6):2315-2317.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2019.02.013.
 78. Jin C, Flavell RA. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Immunol* 2010; 30(5):628–31. doi: 10.1007/s10875-010-9440-3.
 79. Kaneko J, Okinaga T, Hikiji H, Ariyoshi W, Yoshiga D, Habu M et al. Zoledronic acid exacerbates inflammation through M1 macrophage polarization. *Inflamm Regen* 2018; 38:16. doi: 10.1186/s41232-018-0074-9.
 80. Dunford JE, Rogers MJ, Ebetino FH, Phipps RJ, Coxon FP. Inhibition of protein prenylation by bisphosphonates causes sustained activation of Rac, Cdc42, and Rho GTPases. *J Bone Miner Res* 2006; 21(5):684–94. doi: 10.1359/jbmr.060118.
 81. Zhang J, Liu X, Wan C, Liu Y, Wang Y, Meng C et al. NLRP3 inflammasome mediates M1 macrophage polarization and IL-1 β production in inflammatory root resorption. *J Clin Periodontol* 2020; 47(4):451–60. doi: 10.1111/jcpe.13258.
 82. Zhu W, Xu R, Du J, Fu Y, Li S, Zhang P et al. Zoledronic acid promotes TLR-4-mediated M1 macrophage polarization in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *FASEB J* 2019; 33(4):5208–19. doi: 10.1096/fj.201801791RR.
 83. Bando K, Endo Y. Zoledronate enhances lipopolysaccharide-induced inflammation via toll-like receptor 4 upregulation. *Journal of Dental Sciences* 2025. doi: 10.1016/j.jds.2025.06.004.
 84. Weber M, Homm A, Müller S, Frey S, Amann K, Ries J et al. Zoledronate Causes a Systemic Shift of Macrophage Polarization towards M1 In Vivo. *Int J Mol Sci* 2021; 22(3). doi: 10.3390/ijms22031323.
 85. Porras AG, Holland SD, Gertz BJ. Pharmacokinetics of alendronate. *Clin Pharmacokinet* 1999; 36(5):315–28. doi: 10.2165/00003088-199936050-00002.
 86. Macedo F, Ladeira K, Pinho F, Saraiva N, Bonito N, Pinto L et al. Bone Metastases: An Overview. *Oncol Rev* 2017; 11(1):321. doi: 10.4081/oncol.2017.321.
 87. O'Carrigan B, Wong MH, Willson ML, Stockler MR, Pavlakis N, Goodwin A. Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 10(10):CD003474. doi: 10.1002/14651858.CD003474.pub4.
 88. Coscia M, Quagliano E, Iezzi M, Curcio C, Pantaleoni F, Riganti C et al. Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *J Cell Mol Med* 2010; 14(12):2803–15. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00926.x.

-
89. Rogers TL, Holen I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *J Transl Med* 2011; 9:177. doi: 10.1186/1479-5876-9-177.
 90. Veltman JD, Lambers MEH, van Nimwegen M, Hendriks RW, Hoogsteden HC, Hegmans JPJJ et al. Zoledronic acid impairs myeloid differentiation to tumour-associated macrophages in mesothelioma. *Br J Cancer* 2010; 103(5):629–41. doi: 10.1038/sj.bjc.6605814.
 91. Axon. Spektrum.de 18.06.2007 [Stand: 28.03.2025]. Verfügbar unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/axon/6598>.
 92. National Nanotechnology Initiative. Size of Nanoscale [Stand: 28.03.2025]. Verfügbar unter: <https://www.nano.gov/nanotech-101/what/nano-size>.
 93. Freestone I, Meeks N, Sax M, Higgitt C. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bull* 2007; 40(4):270–7. doi: 10.1007/BF03215599.
 94. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* 2019; 25(1). doi: 10.3390/molecules25010112.
 95. Feynman RP. There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics.: Vortrag gehalten am 29. Dezember 1959 beim Jahresmeeting der American Physical Society am California Institute of Technology; veröffentlicht in. *Engineering & Science* 1960; 23(5):22–36.
 96. IBM Newsroom. IBM Unveils World's First 2 Nanometer Chip Technology, Opening a New Frontier for Semiconductors; 2025 [Stand: 28.03.2025]. Verfügbar unter: <https://newsroom.ibm.com/2021-05-06-IBM-Unveils-Worlds-First-2-Nanometer-Chip-Technology,-Opening-a-New-Frontier-for-Semiconductors>.
 97. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2021; 20(2):101–24. doi: 10.1038/s41573-020-0090-8.
 98. Eker F, Duman H, Akdaşçı E, Bolat E, Sarıtaş S, Karav S et al. A Comprehensive Review of Nanoparticles: From Classification to Application and Toxicity. *Molecules* 2024; 29(15). doi: 10.3390/molecules29153482.
 99. Altammar KA. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Front Microbiol* 2023; 14:1155622. doi: 10.3389/fmicb.2023.1155622.
 100. Jeon M, Halbert MV, Stephen ZR, Zhang M. Iron Oxide Nanoparticles as T1 Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: Fundamentals, Challenges, Applications, and Prospectives. *Adv Mater* 2021; 33(23):e1906539. doi: 10.1002/adma.201906539.
 101. Calzoni E, Cesaretti A, Polchi A, Di Michele A, Tancini B, Emiliani C. Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies. *J Funct Biomater* 2019; 10(1). doi: 10.3390/jfb10010004.
 102. Zhang D, Liu L, Wang J, Zhang H, Zhang Z, Xing G et al. Drug-loaded PEG-PLGA nanoparticles for cancer treatment. *Front Pharmacol* 2022; 13:990505. doi: 10.3389/fphar.2022.990505.
 103. Rafiei P, Haddadi A. Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile. *Int J Nanomedicine* 2017; 12:935–47. doi: 10.2147/IJN.S121881.
 104. Graf N, Bielenberg DR, Kolishetti N, Muus C, Banyard J, Farokhzad OC et al. $\alpha(V)\beta(3)$ integrin-targeted PLGA-PEG nanoparticles for enhanced anti-tumor efficacy of a Pt(IV) prodrug. *ACS Nano* 2012; 6(5):4530–9. doi: 10.1021/nn301148e.
 105. Calabresi PA, Kieseier BC, Arnold DL, Balcer LJ, Boyko A, Pelletier J et al. Pegylated interferon beta-1a for relapsing-remitting multiple sclerosis (ADVANCE): a randomised,

-
- phase 3, double-blind study. *The Lancet Neurology* 2014; 13(7):657–65. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70068-7.
106. Molineux G. Pegylation: engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy. *Cancer Treat Rev* 2002; 28 Suppl A:13–6. doi: 10.1016/s0305-7372(02)80004-4.
107. Jo DH, Kim JH, Lee TG, Kim JH. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine* 2015; 11(7):1603–11. doi: 10.1016/j.nano.2015.04.015.
108. Saunders C, Villiers CA de, Stevens MM. Single Particle Chemical Characterisation of Nanoformulations for Cargo Delivery. *AAPS J* 2023; 25(6):94. doi: 10.1208/s12248-023-00855-w.
109. Soni KS, Desale SS, Bronich TK. Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *J Control Release* 2016; 240:109–26. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.11.009.
110. Vashist A, Perez Alvarez G, Andion Camargo V, Raymond AD, Arias AY, Kolishetti N et al. Recent advances in nanogels for drug delivery and biomedical applications. *Biomater Sci* 2024; 12(23):6006–18. doi: 10.1039/d4bm00224e.
111. Huppertsberg A, Kaps L, Zhong Z, Schmitt S, Stickdorn J, Deswarte K et al. Squaric Ester-Based, pH-Degradable Nanogels: Modular Nanocarriers for Safe, Systemic Administration of Toll-like Receptor 7/8 Agonistic Immune Modulators. *J Am Chem Soc* 2021; 143(26):9872–83. doi: 10.1021/jacs.1c03772.
112. Yin Y, Hu B, Yuan X, Cai L, Gao H, Yang Q. Nanogel: A Versatile Nano-Delivery System for Biomedical Applications. *Pharmaceutics* 2020; 12(3). doi: 10.3390/pharmaceutics12030290.
113. Schmitt S, Huppertsberg A, Klefenz A, Kaps L, Mailänder V, Schuppan D et al. Fluorescence Correlation Spectroscopy Monitors the Fate of Degradable Nanocarriers in the Blood Stream. *Biomacromolecules* 2022; 23(3):1065–74. doi: 10.1021/acs.biomac.1c01407.
114. Eckmann DM, Composto RJ, Tsourkas A, Muzykantov VR. Nanogel Carrier Design for Targeted Drug Delivery. *J Mater Chem B* 2014; 2(46):8085–97. doi: 10.1039/C4TB01141D.
115. Negwer I, Best A, Schinnerer M, Schäfer O, Capeloa L, Wagner M et al. Monitoring drug nanocarriers in human blood by near-infrared fluorescence correlation spectroscopy. *Nat Commun* 2018; 9(1):5306. doi: 10.1038/s41467-018-07755-0.
116. Caparrotta TM, Antoine DJ, Dear JW. Are some people at increased risk of paracetamol-induced liver injury? A critical review of the literature. *Eur J Clin Pharmacol* 2018; 74(2):147–60. doi: 10.1007/s00228-017-2356-6.
117. Hadem J, Tacke F, Bruns T, Langgartner J, Strnad P, Denk GU et al. Etiologies and outcomes of acute liver failure in Germany. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10(6):664-9.e2. doi: 10.1016/j.cgh.2012.02.016.
118. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. Information von Pharma Deutschland: Gefährliche „Paracetamol Challenge“. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft 11.02.2025 [Stand: 14.05.2025]. Verfügbar unter: <https://www.akdae.de/arzneimittelsicherheit/drug-safety-mail/newsdetail/drug-safety-mail-2025-07>.
119. K. Faber, C. Reichert, Ch. Rauber-Lüthy, C.Degrandi. Akute Paracetamolvergiftung. *Tox Info Suisse* 2024.

-
120. Bai Q, Yan H, Sheng Y, Jin Y, Shi L, Ji L et al. Long-term acetaminophen treatment induced liver fibrosis in mice and the involvement of Egr-1. *Toxicology* 2017; 382:47–58. doi: 10.1016/j.tox.2017.03.008.
121. Tropkaya NS, Kislyakova EA, Vilkova IG, Kislitsyna OS, Gurman YV, Popova TS et al. Experimental Model of Cirrhosis of the Liver. *Bull Exp Biol Med* 2020; 169(3):416–20. doi: 10.1007/s10517-020-04899-2.
122. Jakszyn P, Gonzalez C-A. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol* 2006; 12(27):4296–303. doi: 10.3748/wjg.v12.i27.4296.
123. Keszei AP, Goldbohm RA, Schouten LJ, Jakszyn P, van den Brandt PA. Dietary N-nitroso compounds, endogenous nitrosation, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study. *Am J Clin Nutr* 2013; 97(1):135–46. doi: 10.3945/ajcn.112.043885.
124. Song P, Wu L, Guan W. Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Nutrients* 2015; 7(12):9872–95. doi: 10.3390/nu7125505.
125. La Monte SM de, Tong M. Mechanisms of nitrosamine-mediated neurodegeneration: potential relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 17(4):817–25. doi: 10.3233/JAD-2009-1098.
126. Lutterotti N von. Ein Arzneimittelskandal um Valsartan und kein Ende. *Frankfurter Allgemeine Zeitung* 21.04.2019 [Stand: 14.05.2025]. Verfügbar unter: <https://www.faz.net/aktuell/wissen/ein-arzneimittelskandal-um-valsartan-und-kein-ende-16143021.html>.
127. Tolba R, Kraus T, Liedtke C, Schwarz M, Weiskirchen R. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Lab Anim* 2015; 49(1 Suppl):59–69. doi: 10.1177/0023677215570086.
128. Ding Y-F, Wu Z-H, Wei Y-J, Shu L, Peng Y-R. Hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis in the rat hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017; 143(5):821–34. doi: 10.1007/s00432-017-2364-z.
129. Ezhilarasan D. Molecular mechanisms in thioacetamide-induced acute and chronic liver injury models. *Environ Toxicol Pharmacol* 2023; 99:104093. doi: 10.1016/j.etap.2023.104093.
130. Popov Y, Sverdlov DY, Sharma AK, Bhaskar KR, Li S, Freitag TL et al. Tissue transglutaminase does not affect fibrotic matrix stability or regression of liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2011; 140(5):1642–52. doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.040.
131. Doherty RE. A History of the Production and Use of Carbon Tetrachloride, Tetrachloroethylene, Trichloroethylene and 1,1,1-Trichloroethane in the United States: Part 1--Historical Background; Carbon Tetrachloride and Tetrachloroethylene. *Environmental Forensics* 2000; 1(2):69–81. doi: 10.1006/enfo.2000.0010.
132. Handbook for the Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. Fourteenth edition (2020).
133. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2007; 25(3):185–209. doi: 10.1080/10590500701569398.
134. Shu Dong. Mechanisms of CCl₄-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis. *The Journal of Toxicological Sciences*; 2016(Vol 41).
135. Weber LWD, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33(2):105–36. doi: 10.1080/713611034.

-
136. Fareed MM, Khalid H, Khalid S, Shityakov S. Deciphering Molecular Mechanisms of Carbon Tetrachloride- Induced Hepatotoxicity: A Brief Systematic Review. *Curr Mol Med* 2024; 24(9):1124–34. doi: 10.2174/0115665240257603230919103539.
137. US EPA ORD NCEA Integrated Risk Information System. Toxicological Review of Carbon Tetrachloride (CAS No. 56-23-5).
138. Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, Tacke F. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab Anim* 2015; 49(1 Suppl):12–20. doi: 10.1177/0023677215572841.
139. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 1992; 90(1):196–203. doi: 10.1172/JCI115836.
140. Trautwein C, Rakemann T, Malek NP, Plümpe J, Tiegs G, Manns MP. Concanavalin A-induced liver injury triggers hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1998; 101(9):1960–9. doi: 10.1172/JCI504.
141. Liu Y, Hao H, Hou T. Concanavalin A-induced autoimmune hepatitis model in mice: Mechanisms and future outlook. *Open Life Sci* 2022; 17(1):91–101. doi: 10.1515/biol-2022-0013.
142. Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 1995; 21(1):190–8. doi: 10.1016/0270-9139(95)90428-x.
143. Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y. Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. *J Immunol* 1997; 159(3):1418–28.
144. Rani R, Tandon A, Wang J, Kumar S, Gandhi CR. Stellate Cells Orchestrate Concanavalin A-Induced Acute Liver Damage. *Am J Pathol* 2017; 187(9):2008–19. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.05.015.
145. Salah MM, Ashour AA, Abdelghany TM, Abdel-Aziz A-AH, Salama SA. Pirfenidone alleviates concanavalin A-induced liver fibrosis in mice. *Life Sci* 2019; 239:116982. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116982.
146. Tag CG, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, Borkham-Kamphorst E, Tolba RH, Tacke F et al. Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. *J Vis Exp* 2015; (96). doi: 10.3791/52438.
147. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984; 65(3):305–11.
148. Yang Y, Chen B, Chen Y, Zu B, Yi B, Lu K. A comparison of two common bile duct ligation methods to establish hepatopulmonary syndrome animal models. *Lab Anim* 2015; 49(1):71–9. doi: 10.1177/0023677214558701.
149. Hasegawa M, Kawai K, Mitsui T, Taniguchi K, Monnai M, Wakui M et al. The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 405(3):405–10. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.01.042.
150. Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T et al. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441(1):230–5. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.040.
151. Popov Y, Patsenker E, Fickert P, Trauner M, Schuppan D. Mdr2 (Abcb4)-/- mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *J Hepatol* 2005; 43(6):1045–54. doi: 10.1016/j.jhep.2005.06.025.
152. Farrell G, Schattenberg JM, Leclercq I, Yeh MM, Goldin R, Teoh N et al. Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to

-
- Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 2019; 69(5):2241–57. doi: 10.1002/hep.30333.
153. Chen Y-J-N, Shi R-C, Xiang Y-C, Fan L, Tang H, He G et al. Malate initiates a proton-sensing pathway essential for pH regulation of inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2024; 9(1):367. doi: 10.1038/s41392-024-02076-9.
154. Wu S, Wang X, Xing W, Li F, Liang M, Li K et al. An update on animal models of liver fibrosis. *Front Med (Lausanne)* 2023; 10:1160053. doi: 10.3389/fmed.2023.1160053.
155. Scholten D, Trebicka J, Liedtke C, Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim* 2015; 49(1 Suppl):4–11. doi: 10.1177/0023677215571192.
156. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
157. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4):611–22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
158. Becton Dickinson Biosciences. *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide: First principles*. 2nd ed. San Jose, CA: BD Biosciences; 2002.
159. Centrum für Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut - Charité – Universitätsmedizin Berlin. Glossar: Charité – Universitätsmedizin Berlin; 2025 [Stand: 13.09.2025]. Verfügbar unter: <https://ccp.charite.de/metast/glossar/begriff/nir>.
160. Miltenyi Biotec. Liver Dissection kit mouse: Datasheet & Protocol [Stand: 14.09.2025]. Verfügbar unter: https://static.miltenyibiotec.com/asset/150655405641/document_9cht3naio56enbb66ujsp4uk7f?content-disposition=inline.
161. Constantine VS, Mowry RW. Selective staining of human dermal collagen. II. The use of picosirius red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol* 1968; 50(5):419–23 [Stand: 03.04.2025]. Verfügbar unter: [https://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(15\)47504-9/pdf](https://www.jidonline.org/article/S0022-202X(15)47504-9/pdf).
162. Gabr SA, Alghadir AH, Sherif YE, Ghfar AA. Hydroxyproline as a Biomarker in Liver Disease. In: Patel VB, Preedy VR, Hrsg. *Biomarkers in Liver Disease*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2017. S. 471–91 (Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications).
163. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3):351–72. doi: 10.1055/s-2001-17556.
164. Grabowski N, Hillaireau H, Vergnaud J, Tsapis N, Pallardy M, Kerdine-Römer S et al. Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages. *Int J Pharm* 2015; 482(1-2):75–83. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.11.042.
165. Piotrowski-Daspit AS, Bracaglia LG, Eaton DA, Richfield O, Binns TC, Albert C et al. Enhancing in vivo cell and tissue targeting by modulation of polymer nanoparticles and macrophage decoys. *Nat Commun* 2024; 15(1):4247. doi: 10.1038/s41467-024-48442-7.
166. Niu Y, Tang M. In vitro review of nanoparticles attacking macrophages: Interaction and cell death. *Life Sci* 2022; 307:120840. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120840.
167. Bhattacharjee S, Ershov D, Fytianos K, van der Gucht J, Alink GM, Rietjens IMCM et al. Cytotoxicity and cellular uptake of tri-block copolymer nanoparticles with different size and surface characteristics. *Part Fibre Toxicol* 2012; 9:11. doi: 10.1186/1743-8977-9-11.
168. Caster JM, Yu SK, Patel AN, Newman NJ, Lee ZJ, Warner SB et al. Effect of particle size on the biodistribution, toxicity, and efficacy of drug-loaded polymeric nanoparticles in chemoradiotherapy. *Nanomedicine* 2017; 13(5):1673–83. doi: 10.1016/j.nano.2017.03.002.

-
169. Yu T, Malugin A, Ghandehari H. Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity. *ACS Nano* 2011; 5(7):5717–28. doi: 10.1021/nn2013904.
170. Wang J, Li Y, Nie G. Multifunctional biomolecule nanostructures for cancer therapy. *Nat Rev Mater* 2021; 6(9):766–83. doi: 10.1038/s41578-021-00315-x.
171. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2012; 7:5577–91. doi: 10.2147/IJN.S36111.
172. Guo M, Härtlova A, Dill BD, Prescott AR, Gierliński M, Trost M. High-resolution quantitative proteome analysis reveals substantial differences between phagosomes of RAW 264.7 and bone marrow derived macrophages. *Proteomics* 2015; 15(18):3169–74. doi: 10.1002/pmic.201400431.
173. Kaps L, Leber N, Klefenz A, Choteschovsky N, Zentel R, Nuhn L et al. In Vivo siRNA Delivery to Immunosuppressive Liver Macrophages by α -Mannosyl-Functionalized Cationic Nanohydrogel Particles. *Cells* 2020; 9(8). doi: 10.3390/cells9081905.
174. Leber N, Kaps L, Yang A, Aslam M, Giardino M, Klefenz A et al. α -Mannosyl-Functionalized Cationic Nanohydrogel Particles for Targeted Gene Knockdown in Immunosuppressive Macrophages. *Macromol Biosci* 2019; 19(7):e1900162. doi: 10.1002/mabi.201900162.
175. Singh A, Chakraborty S, Wong SW, Hefner NA, Stuart A, Qadir AS et al. Nanoparticle targeting of de novo profibrotic macrophages mitigates lung fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; 119(15):e2121098119. doi: 10.1073/pnas.2121098119.
176. Phan TG, Croucher PI. The dormant cancer cell life cycle. *Nat Rev Cancer* 2020; 20(7):398–411. doi: 10.1038/s41568-020-0263-0.
177. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(11):834–46. doi: 10.1038/nrc2256.
178. Kalamakis G, Brüne D, Ravichandran S, Bolz J, Fan W, Ziebell F et al. Quiescence Modulates Stem Cell Maintenance and Regenerative Capacity in the Aging Brain. *Cell* 2019; 176(6):1407–1419.e14. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.040.
179. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)* 2012; 12(9):12347–60. doi: 10.3390/s120912347.
180. Braun K, Stürzel CM, Biskupek J, Kaiser U, Kirchhoff F, Lindén M. Comparison of different cytotoxicity assays for in vitro evaluation of mesoporous silica nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 2018; 52:214–21. doi: 10.1016/j.tiv.2018.06.019.
181. Hsiao SC, Liu H, Holstlaw TA, Liu C, Francis CY, Francis MB. Real time assays for quantifying cytotoxicity with single cell resolution. *PLoS One* 2013; 8(6):e66739. doi: 10.1371/journal.pone.0066739.
182. Cho M-H, Niles A, Huang R, Inglese J, Austin CP, Riss T et al. A bioluminescent cytotoxicity assay for assessment of membrane integrity using a proteolytic biomarker. *Toxicol In Vitro* 2008; 22(4):1099–106. doi: 10.1016/j.tiv.2008.02.013.
183. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184(1):39–51. doi: 10.1016/0022-1759(95)00072-i.
184. Riss T, Niles A, Moravec R, Karassina N, Vidugiriene J. Assay Guidance Manual: Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. Bethesda (MD); 2004.
185. Moghimi SM, Simberg D. Pro-inflammatory concerns with lipid nanoparticles. *Mol Ther* 2022; 30(6):2109–10. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.04.011.

-
186. Chen SP, Blakney AK. Immune response to the components of lipid nanoparticles for ribonucleic acid therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 2024; 85:103049. doi: 10.1016/j.copbio.2023.103049.
187. Omo-Lamai S, Wang Y, Patel MN, Milosavljevic A, Zuschlag D, Poddar S et al. Limiting endosomal damage sensing reduces inflammation triggered by lipid nanoparticle endosomal escape. *Nat Nanotechnol* 2025; 20(9):1285–97. doi: 10.1038/s41565-025-01974-5.
188. Yeo J, Lee J, Yoon S, Kim WJ. Tannic acid-based nanogel as an efficient anti-inflammatory agent. *Biomater Sci* 2020; 8(4):1148–59. doi: 10.1039/c9bm01384a.
189. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010; 11(10):889–96. doi: 10.1038/ni.1937.
190. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol* 2017; 79:541–66. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
191. Liu SX, Gustafson HH, Jackson DL, Pun SH, Trapnell C. Trajectory analysis quantifies transcriptional plasticity during macrophage polarization. *Sci Rep* 2020; 10(1):12273. doi: 10.1038/s41598-020-68766-w.
192. Raggi F, Pelassa S, Pierobon D, Penco F, Gattorno M, Novelli F et al. Regulation of Human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. *Front Immunol* 2017; 8:1097. doi: 10.3389/fimmu.2017.01097.
193. Ke X, Chen C, Song Y, Cai Q, Li J, Tang Y et al. Hypoxia modifies the polarization of macrophages and their inflammatory microenvironment, and inhibits malignant behavior in cancer cells. *Oncol Lett* 2019; 18(6):5871–8. doi: 10.3892/ol.2019.10956.
194. Li P, Ma C, Li J, You S, Dang L, Wu J et al. Proteomic characterization of four subtypes of M2 macrophages derived from human THP-1 cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 2022; 23(5):407–22. doi: 10.1631/jzus.B2100930.
195. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014; 41(1):14–20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
196. Saas P, Chagué C, Maraun M, Cherrier T. Toward the Characterization of Human Pro-Resolving Macrophages? *Front Immunol* 2020; 11:593300. doi: 10.3389/fimmu.2020.593300.
197. Xiao B, Liu Y, Chandrasiri I, Overby C, Benoit DSW. Impact of Nanoparticle Physicochemical Properties on Protein Corona and Macrophage Polarization. *ACS Appl Mater Interfaces* 2023; 15(11):13993–4004. doi: 10.1021/acsami.2c22471.
198. Rampado R, Crotti S, Caliceti P, Pucciarelli S, Agostini M. Recent Advances in Understanding the Protein Corona of Nanoparticles and in the Formulation of "Stealthy" Nanomaterials. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8:166. doi: 10.3389/fbioe.2020.00166.
199. Labonte AC, Sung S-SJ, Jennelle LT, Dandekar AP, Hahn YS. Expression of scavenger receptor-AI promotes alternative activation of murine macrophages to limit hepatic inflammation and fibrosis. *Hepatology* 2017; 65(1):32–43. doi: 10.1002/hep.28873.
200. Warnecke A, Abele S, Musunuri S, Bergquist J, Harris RA. Scavenger Receptor A Mediates the Clearance and Immunological Screening of MDA-Modified Antigen by M2-Type Macrophages. *Neuromolecular Med* 2017; 19(4):463–79. doi: 10.1007/s12017-017-8461-y.
201. Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(9):621–34. doi: 10.1038/nri3515.

-
202. Peiser L, Gordon S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect* 2001; 3(2):149–59. doi: 10.1016/s1286-4579(00)01362-9.
203. Doi T, Higashino K, Kurihara Y, Wada Y, Miyazaki T, Nakamura H et al. Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 1993; 268(3):2126–33.
204. Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol* 2012; 7(12):779–86. doi: 10.1038/nnano.2012.207.
205. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol* 2013; 8(10):772–81. doi: 10.1038/nnano.2013.181.
206. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(38):14265–70. doi: 10.1073/pnas.0805135105.
207. Tanaka A, To J, O'Brien B, Donnelly S, Lund M. Selection of reliable reference genes for the normalisation of gene expression levels following time course LPS stimulation of murine bone marrow derived macrophages. *BMC Immunol* 2017; 18(1):43. doi: 10.1186/s12865-017-0223-y.
208. Huggett JF. The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clin Chem* 2020; 66(8):1012–29. doi: 10.1093/clinchem/hvaa125.
209. Balaji A, Bell CA, Houston ZH, Bridle KR, Genz B, Fletcher NL et al. Exploring the impact of severity in hepatic fibrosis disease on the intrahepatic distribution of novel biodegradable nanoparticles targeted towards different disease biomarkers. *Biomaterials* 2023; 302:122318. doi: 10.1016/j.biomaterials.2023.122318.
210. Jiménez Calvente C, Sehgal A, Popov Y, Kim YO, Zevallos V, Sahin U et al. Specific hepatic delivery of procollagen $\alpha 1(I)$ small interfering RNA in lipid-like nanoparticles resolves liver fibrosis. *Hepatology* 2015; 62(4):1285–97. doi: 10.1002/hep.27936.
211. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today* 2015; 10(4):487–510. doi: 10.1016/j.nantod.2015.06.006.
212. Kuhn DA, Vanhecke D, Michen B, Blank F, Gehr P, Petri-Fink A et al. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *Beilstein J Nanotechnol* 2014; 5:1625–36. doi: 10.3762/bjnano.5.174.
213. Furumoto K, Nagayama S, Ogawara K-I, Takakura Y, Hashida M, Higaki K et al. Hepatic uptake of negatively charged particles in rats: possible involvement of serum proteins in recognition by scavenger receptor. *J Control Release* 2004; 97(1):133–41. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.03.004.
214. Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009; 50(3):604–20. doi: 10.1016/j.jhep.2008.12.011.
215. Li J, Chen C, Xia T. Understanding Nanomaterial-Liver Interactions to Facilitate the Development of Safer Nanoapplications. *Adv Mater* 2022; 34(11):e2106456. doi: 10.1002/adma.202106456.
216. Foroozandeh P, Aziz AA. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 2018; 13(1):339. doi: 10.1186/s11671-018-2728-6.

-
217. Shao X-R, Wei X-Q, Song X, Hao L-Y, Cai X-X, Zhang Z-R et al. Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Prolif* 2015; 48(4):465–74. doi: 10.1111/cpr.12192.
218. Fraser DA, Wang X, Lund J, Nikolić N, Iruarizaga-Lejarreta M, Skjaeret T et al. A structurally engineered fatty acid, icosabutate, suppresses liver inflammation and fibrosis in NASH. *J Hepatol* 2022; 76(4):800–11. doi: 10.1016/j.jhep.2021.12.004.
219. Kaps L, Schuppan D. Targeting Cancer Associated Fibroblasts in Liver Fibrosis and Liver Cancer Using Nanocarriers. *Cells* 2020; 9(9). doi: 10.3390/cells9092027.
220. Harrison SA, Bedossa P, Guy CD, Schattenberg JM, Loomba R, Taub R et al. A Phase 3, Randomized, Controlled Trial of Resmetirom in NASH with Liver Fibrosis. *N Engl J Med* 2024; 390(6):497–509. doi: 10.1056/NEJMoa2309000.
221. European Medicines Agency (EMA). Rezdiffra | European Medicines Agency (EMA); 2025 [Stand: 28.10.2025]. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rezdiffra>.
222. BfArM. Bedingte Zulassung (Conditional Marketing Authorisation); 2025 [Stand: 28.10.2025]. Verfügbar unter: https://www.bfarm.de/DE/Das-BfArM/EU-und-Internationales/Onkologie-in-der-EU/Infothek-Onkologie/_docs/2025-06-Bedingte-Zulassung.html.

7 Anhang

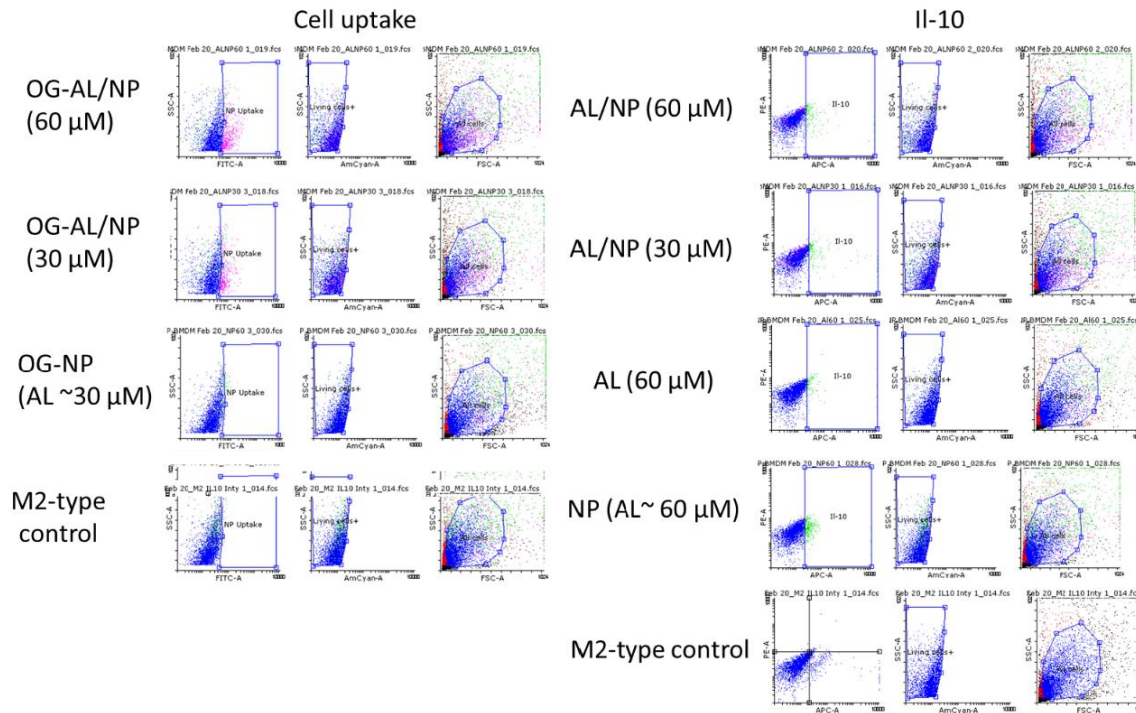


Abbildung 27: Gating-Strategie für die zelluläre Aufnahme *in vitro* links und IL-10-Expression *in vitro* rechts. (modifiziert nach Fig. S27 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

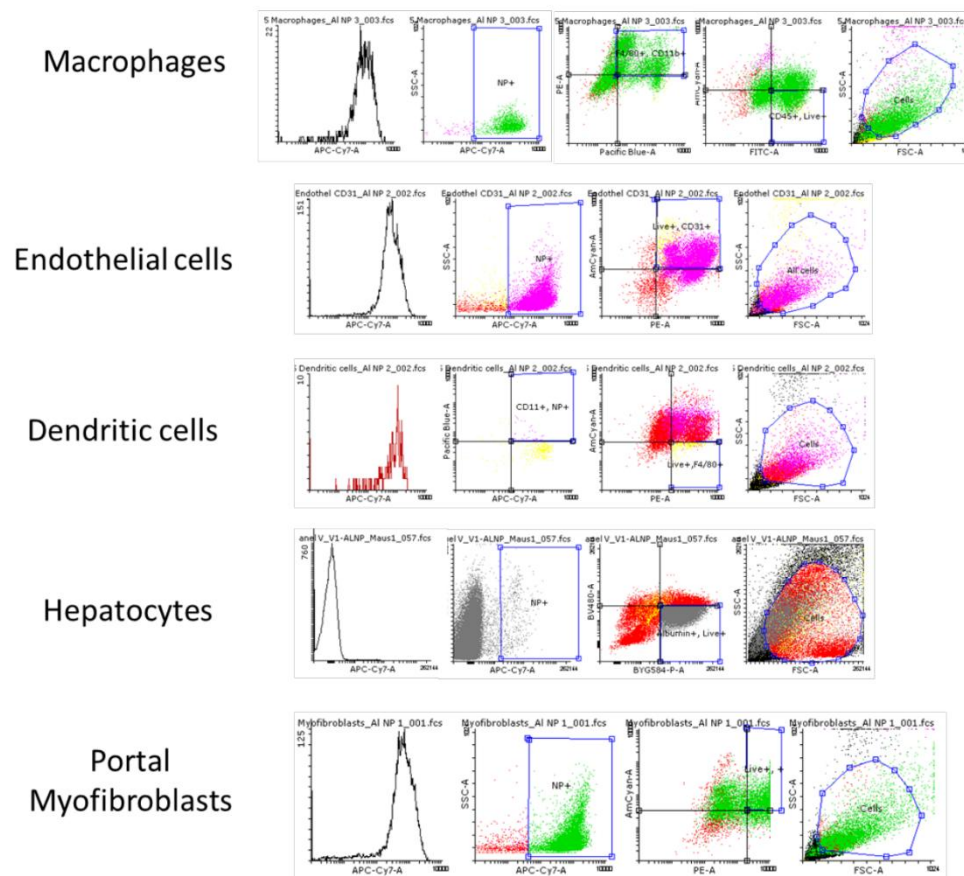


Abbildung 28: Gating-Strategie für die zelluläre Biodistribution *in vivo* (modifiziert nach Fig. S29 in Kaps, Huppertsberg et al PNAS 2022)

8 Danksagung

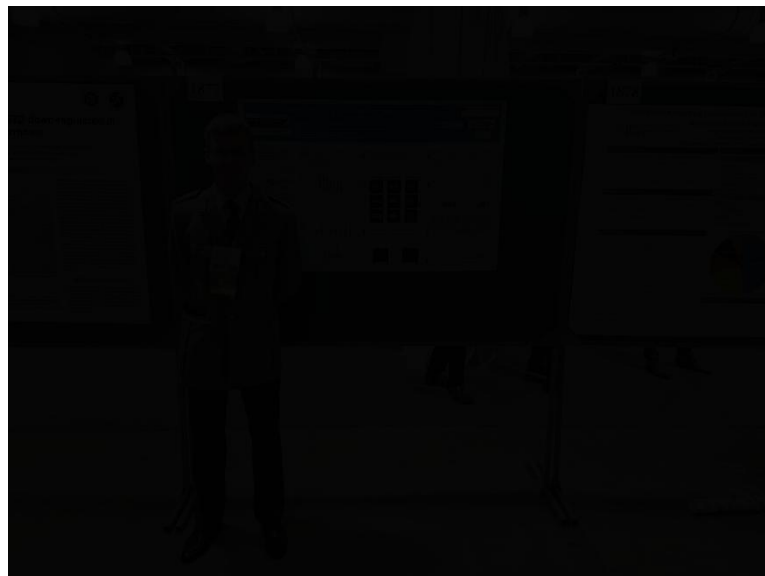
Mein aufrichtiger Dank gilt an erster Stelle [REDACTED], für die Möglichkeit in seinem Institut für translationale Immunologie promovieren zu dürfen und [REDACTED] für die Betreuung meiner Promotion. Es war eine sehr vertrauensvolle Zusammenarbeit. Ich konnte mich immer bei Fragen jedweder Art an beide wenden und habe stete Unterstützung erfahren. Danke [REDACTED] für manches Wochenende, dass du dir trotz Diensten in der Klinik Zeit genommen hast!

Meine Promotion war Teil eines interdisziplinären Projekts, an dessen Gelingen [REDACTED] großen Anteil hatte. Auch hier kann ich mich nur für die gute Zusammenarbeit bedanken. Der Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts, die an der Synthese und Validierung der Nanogele beteiligt waren.

Darüber hinaus möchte ich [REDACTED] meinen Dank aussprechen, die mich als leitende MTA des Instituts aufgenommen hat und mir die Grundlagen des experimentellen Arbeitens in der Zellkultur beigebracht hat.

Einen erheblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte [REDACTED] die mir die Anfertigung von histologischen Färbungen beigebracht hat und mir aufopferungsvoll mit Rat und Tat zur Seite stand. Tausend Dank dafür!

Abschließend möchte ich allen namentlich nicht genannten Mitarbeitern des Instituts für translationale Immunologie danken für die Aufnahme und Integration ins Team, sowie Unterstützung bei Labortätigkeiten.



Posterpräsentation Liver Meeting in Boston, USA 2019

9 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Niklas Choteschovsky

Adresse:

Telefon:

E-Mail:

Geburtsdatum:

Geburtsort:

Familienstand:

Staatsangehörigkeit:



BILDUNGSWEG

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

BERUFSERFAHRUNG

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

FORTBILDUNGEN

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[illegible]

Kaps L, Huppertsberg A, Choteschovsky N, Klefenz A, Durak F, Schrörs B, Diken M, Eichler E, Rosigkeit S, Schmitt S, Leps C, Schulze A, Foerster F, Bockamp E, De Geest BG, Koynov K, Räder HJ, Tenzer S, Marini F, Schuppan D, Nuhn L. **pH-degradable, bisphosphonate-loaded nanogels attenuate liver fibrosis by repolarization of M2-type macrophages**. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022

Huppertsberg A, Kaps L, Zhong Z, Schmitt S, Stickdorn J, Deswarte K, Combes F, Czysch C, De Vrieze J, Kasmi S, Choteschovsky N, Klefenz A, Medina-Montano C, Winterwerber P, Chen C, Bros M, Lienenklaus S, Sanders NN, Koynov K, Schuppan D, Lambrecht BN, David SA, De Geest BG, Nuhn L. **Squaric Ester-Based, pH-Degradable Nanogels: Modular Nanocarriers for Safe, Systemic Administration of Toll-like Receptor 7/8 Agonistic Immune Modulators**. J Am Chem Soc. 2021

Kaps L, Leber N, Klefenz A, Choteschovsky N, Zentel R, Nuhn L, Schuppan D. **In Vivo siRNA Delivery to Immunosuppressive Liver Macrophages by α -Mannosyl-Functionalized Cationic Nanohydrogel Particles**. Cells. 2020

Leber N, Kaps L, Yang A, Aslam M, Giardino M, Klefenz A, Choteschovsky N, Rosigkeit S, Mostafa A, Nuhn L, Schuppan D, Zentel R. **α -Mannosyl-Functionalized Cationic Nanohydrogel Particles for Targeted Gene Knockdown in Immunosuppressive Macrophages**. Macromol Biosci. 2019

Publizierte Abstracts

L. Kaps, N. Choteschovsky, L. Nuhn, A. Klefenz, D. Schuppan. **Nanoparticulate bisphosphonate to selectively target and repolarize liver macrophages for anti-fibrotic treatment**, ZEITSCHRIFT FÜR GASTROENTEROLOGIE 58(01). 2020

L. Kaps, A. Klefenz, D. Castven, JU. Marquardt, N. Choteschovsky, MA. Khan, D. Schuppan. **Generation of syngeneic murine hepatoma cells bearing features of human HCC for rapid anti-HCC drug screening**, ZEITSCHRIFT FÜR GASTROENTEROLOGIE 58(1). 2020

L. Kaps, L. Nuhn, N. Choteschovsky, A. Klefenz, M. Aslam, R. Zentel, D. Schuppan. **Nanoparticulate bisphosphonate to selectively target and repolarize liver macrophages for anti-fibrotic responses**, HEPATOLOGY 70 (01) SUPPL, 2019

L. Kaps, D. Schuppan, L. Nuhn, MA Khan, M. Aslam, A. Klefenz, N. Choteschovsky. **THU-469-Nanoparticulate bisphosphonate to selectively target and repolarize liver macrophages for efficient anti-tumour response** JOURNAL OF HEPATOLOGY 70(1). 2019