

Aus dem Lehrstuhl
für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie
Prof. Dr. Christof Schmid
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Die Wirkung der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren
Dasatinib, Nilotinib und Imatinib
auf die Proliferation von Fibroblasten
im Zellkulturmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät der Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Manuela Maria Johanna Weps

2023

Aus dem Lehrstuhl
für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie
Prof. Dr. Christof Schmid
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Die Wirkung der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren
Dasatinib, Nilotinib und Imatinib
auf die Proliferation von Fibroblasten
im Zellkulturmodell**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät der Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Manuela Maria Johanna Weps

2023

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

PD Dr. Marietta von Süßkind-Schwendi

2. Berichterstatter:

PD Dr. Elke Eggenhofer

Tag der mündlichen Prüfung

20. März 2024

Inhalt

1	Einleitung	8
1.1	Lungentransplantation damals und heute.....	8
1.2	<i>Chronic lung allograft dysfunction</i>	8
1.3	Therapiemöglichkeiten von CLAD und experimentelle Ansätze	12
1.4	Das Rattenmodell (F344[RT1 ^{lv}] → WKY[RT1 ^l]).....	14
1.5	Antifibrotika im Tiermodell	14
1.6	Zellkultur als ressourcenschonendes Verfahren.....	16
1.7	Ziele der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Laborgeräte.....	19
2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	19
2.1.3	Chemikalien	19
2.1.4	Medikamente	20
2.1.5	Zellkulturmedien.....	21
2.1.6	Rattenstämme.....	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	Rattenmodell.....	21
2.2.2	Zellkultur	23
2.2.3	Messverfahren	31
2.2.4	Übersicht der Zellpräparationen.....	35
2.2.5	Software und Statistik	37
3	Ergebnisse der Fibroblasten-Präparation.....	39
3.1	Nativzellzahlen	39
3.2	Zellproliferation.....	40
3.3	Wachstumsdauer.....	40

3.4	Konzentration auf Fibroblasten.....	41
4	Ergebnisse aus MTS.....	42
4.1	Änderungen der Versuchsbedingungen	42
4.1.1	Auswirkung der Zellzahl auf gemessene Absorptionswerte.....	42
4.1.2	MTS-Messungen auf zwei Geräten.....	44
4.2	MTS-Pharmakokinetik	45
4.2.1	Dasa	45
4.2.2	Nilo.....	50
4.2.3	Ima.....	53
4.2.4	MTS-Pharmakokinetik aller eingesetzten RTKIs.....	56
5	Ergebnisse aus Glo.....	58
5.1	Änderungen der Versuchsbedingungen	58
5.2	Glo-Pharmakokinetik	60
5.2.1	Dasa	60
5.2.2	Nilo.....	64
5.2.3	Ima.....	67
5.2.4	Glo-Pharmakokinetik aller eingesetzten RTKIs.....	70
5.3	Pharmakokinetik aller eingesetzten RTKIs beider Messmethoden.....	71
6	Diskussion.....	74
6.1	Die Isolierung von Fibroblasten aus nativen und abgestoßenen, transplantierten Lungen lieferte ausreichend Zellmaterial	74
6.2	Untersuchung der Pharmakokinetik verschiedener RTKIs mittels Photometrie und Lumineszenz möglich.....	76
6.3	RTKIs zeigen einen signifikanten Unterschied in der Proliferationshemmung von Lungenfibroblasten, unabhängig von der Herkunft und der Passagenzahl	79
7	Zusammenfassung und Ausblick	85
8	Anhang.....	87
8.1	Zellkulturflächen und Reagenzien	87

8.2	Zellkulturverlauf	87
8.2.1	Ratte 1	88
8.2.2	Ratte 2	89
8.2.3	Ratte 3	90
8.2.4	Ratte 4	91
8.3	Übersicht der Kulturen.....	91
8.4	MTS-Kurvenscharen.....	93
8.4.1	Dasa	94
8.4.2	Nilo.....	95
8.4.3	Ima.....	96
8.5	Glo-Kurvenscharen.....	97
8.5.1	Dasa	97
8.5.2	Nilo.....	100
8.5.3	Ima.....	101
8.6	Pharmakokinetische Daten MTS	102
8.6.1	Dasa	102
8.6.2	Nilo.....	103
8.6.3	Ima.....	104
8.7	Pharmakokinetische Daten Glo	104
8.7.1	Dasa	104
8.7.2	Nilo.....	105
8.7.3	Ima.....	106
9	Tabellenverzeichnis	107
10	Abbildungsverzeichnis	108
11	Literaturverzeichnis.....	110

Abstract

Background The long-term outcome of lung transplantation (ltx) is majorly impaired by the development of chronic lung allograft dysfunction (CLAD), a disease, for which fibroproliferative changes in the small airways and vessels of the lung are characteristic. Antifibrotic drugs were shown to influence significantly the development of lung fibrosis, *in vitro* and *in vivo*. Therefore they are used for therapy.

Objectives This study was performed to investigate the effect of receptor tyrosine kinase inhibitors (RTKIs) Imatinib, Dasatinib and Nilotinib on the proliferation of fibroblasts in cell culture.

Methods Minor histoincompatible rats (F344-to-WKY) underwent unilateral, orthotopic, left ltx. The harvest of lungs occurred after 60 days. Fibroblasts, from the right native and the left transplanted lung, respectively, were cultured. Cell vitality and viability were tested after 72 h incubation with the antiproliferative RTKIs via MTS (photometrics) and RealTime Glo (luminometrics).

Results No difference between the viability of fibroblasts originating from the left and right lungs could be detected. Similar was observed between early (p1-2) and late (p3-4) passages. The EC50 of Dasatinib (approx. 0,05 μM) was significantly lower compared to EC50 of Nilotinib and Imatinib (approx. 7 μM). After incubation for 72 h, the fibroblasts treated with the highest concentration of Imatinib showed no vitality. At maximum concentration of Dasatinib fibroblasts were inactive, but still vital. No difference between photometric- and luminometric-based method was observed.

Conclusions This study demonstrated a clear effect of RTKIs on the proliferation of fibroblasts in cell culture, with Dasatinib being already able to minimize cell growth at lower concentrations than Imatinib or Nilotinib. Our findings provide evidence for using RTKIs as valid candidates to combat CLAD.

Zusammenfassung

Hintergrund Das Langzeitüberleben von Lungentransplantationen (LTx) liegt nach wie vor deutlich hinter dem von anderen soliden Organen. Als Hauptursache zeigt sich *chronic lung allograft dysfunction* (CLAD), eine fibroproliferative Erkrankung, die vor allem die kleinen Atemwege und Gefäße der Lunge befällt. Antifibrotika haben in-vitro und in-vivo einen erheblichen Einfluss auf die Lungenfibrose, sodass sie zur Behandlung dessen zugelassen sind. Ziel der Studie war es, die Wirkung der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren (RTKIs) Imatinib, Dasatinib und Nilotinib auf die Proliferation und Vitalität von Fibroblasten in Zellkultur zu untersuchen.

Methoden Geringfügig histoinkompatible Ratten (F344-to-WKY) erhielten eine unilaterale, orthotope, linksseitige LTx. Nach 60 Tagen wurden die Lungen entnommen. Daraus erfolgte die Herstellung von Fibroblastenzellkulturen, separiert nach Zellen aus den nativen rechten und den transplantierten linken Lungen. Nach 72-stündiger Inkubation mit den RTKIs wurden die Zellaktivität und -vitalität mittels MTS (Photometrie) und RealTime Glo (Lumineszenz) gemessen.

Ergebnisse Es konnte kein Proliferationsunterschied zwischen den Fibroblasten aus der nativen Lunge und dem Allograft festgestellt werden, ebenso nicht zwischen Zellen in niedriger (p1-2) und hoher Passage (p3-4). Der EC50 von Dasatinib (circa 0,05 µM) lag deutlich niedriger als der von Nilotinib und Imatinib (circa 7 µM). Nach 72 Stunden Inkubation zeigten die Fibroblasten unter hoher Imatinib-Konzentration keine Vitalität mehr. Maximale Dasatinib-Konzentration führte zu vitalen, aber Stoffwechsel-inaktiven Fibroblasten. Beiden Messmethoden zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Schlussfolgerung Diese Studie zeigte den antiproliferativen Effekt von RTKIs auf Fibroblasten in Zellkultur. Dasatinib konnte bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen als Imatinib und Nilotinib die Proliferation effektiv hemmen. Das deutet darauf hin, dass es sich bei RTKIs um vielversprechende Kandidaten zur Entwicklung einer neuen Therapie von CLAD handelt.

1 Einleitung

1.1 Lungentransplantation damals und heute

Die erste dokumentierte, experimentelle Lungentransplantation (LTx) am Menschen wurde vor 60 Jahren in Jackson (Mississippi/USA) durchgeführt. Das Team um den amerikanischen Chirurgen James Hardy transplantierte die linke Lunge eines just infolge Myokardinfarkts verstorbenen Patienten an einen präterminalen 58-jährigen mit Lungenkarzinom. Eine Immunsuppression erfolgte mit Azathioprin, Prednison und mediastinaler Bestrahlung. Der Patient verstarb nach 18 Tagen (HARDY et al. 1964), letztendlich an Nierenversagen und einer Infektion (Venuta und van Raemdonck 2017).

Seither wurden sehr viele Fortschritte in allen Teilbereichen der Transplantation solider Organe gemacht: unter anderem erfolgten eine Revolution der Hygienestandards, die Entwicklung von besseren Immunsuppressiva und eine evidenzbasierte Festlegung von Kriterien für eine Transplantation (Swaminathan et al. 2021; Chambers et al. 2019). Durch all diese und weitere Entwicklungen stellt die LTx heute eine etablierte und effektive Therapiemöglichkeit für Patienten mit chronischer Lungenerkrankung im Endstadium dar. Die *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) sah auch in den letzten 20 Jahren nochmal eine deutliche Verbesserung der Überlebensrate: Lag bei den erwachsenen Patienten, die zwischen 1992 und 2001 eine LTx erhalten haben, das mediane Überleben noch bei 4,7 Jahre, konnte bei den Verpflanzungen zwischen 2010 und 2017 dieses im Median bereits um ganze 2 Jahre verlängert werden. Bei Patienten, die das erste Jahr nach Transplantation überlebt haben, stieg es wiederum auf 8,9 Jahre an (Chambers et al. 2019). Hierbei ist allerdings anzumerken, dass sich das mediane Überleben auf Grund der jeweiligen Grunderkrankungen unterscheidet und auch mit der Erfahrung des jeweiligen Zentrums divergiert (Bos et al. 2020).

1.2 *Chronic lung allograft dysfunction*

Trotz all der Fortschritte unterliegt der Langzeiterfolg von LTx weit dem von anderen soliden Organen in Bezug auf das Überleben nach dem Eingriff (Verleden et al. 2015; Gauthier et al. 2016; Sayegh und Carpenter 2004). 2014 berichtete die ISHLT, dass das 5-Jahres-Überleben nach LTx bei lediglich 58 % liegt, wobei das Hauptproblem in der Entwicklung eines chronischen Allograftversagens (*chronic lung allograft*

Einleitung

dysfunction, CLAD) gesehen wird. Bei 30 % der Patienten wird es innerhalb von 3 bis 5 Jahren nach Transplantation diagnostiziert, nach 5 Jahren bereits bei 50 % (Yusen et al. 2014). CLAD ist ein Überbegriff für alle Formen der chronischen Lungenfunktionsverschlechterung mit oder ohne bekannter Ursache. Beispiele für identifizierbare Gründe wären so beispielsweise Anastomoseninsuffizienz, Infektion oder auch akute Abstoßung (Verleden et al. 2019b). CLAD ohne erkennbare Gründe lässt sich in verschiedene Subformen unterteilen. Die vorherrschende ist hierbei das *Bronchiolitis obliterans*-Syndrom (BOS), die zweithäufigste Subform wird als Restriktives Allograft-Syndrom (RAS) bezeichnet. Wie der jeweilige Name schon vermuten lässt, dominiert bei BOS eine obstruktive und bei RAS eine restriktive Komponente, wobei letzteres mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden ist (Sato 2020). Beide schränken die Lebensqualität der Patienten ein (van der Ploeg et al. 2021) und sind mit fibroproliferativen Eigenschaften assoziiert, welche auf eine Proliferation der Fibroblasten in den Atemwegen durch die erhöhte Freisetzung von Wachstumshormonen wie *fibroblast growth factor* (FGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zurückzuführen ist (Aris et al. 2002; Hertz et al. 1992; Kallio et al. 1999; Lappi-Blanco et al. 2002). Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung von BOS gilt die akute Abstoßungsreaktion (Knoop und Estenne 2006). Nach aktuellem Konsensus der ISHLT wurde festgelegt, dass es sich um definitives CLAD handelt, wenn ein persistenter Abfall des Einsekundenvolumens (FEV1) um 20 % oder mehr des Referenzwertes auftritt und trotz Ursachenforschung und Behandlung für mehr als 3 Monate besteht (Verleden et al. 2019a).

Die genauen Ursachen für die Entstehung von CLAD sind nicht endgültig verstanden. Während sich RAS als diffuser fibrotischer Prozess zeigt, der in verschiedenen anatomischen Kompartimenten der Lunge auftreten kann, findet BOS vor allem an den kleinen Luftwegen statt. Es wird davon ausgegangen, dass BOS durch einen multifaktoriellen, zweistufigen Prozess (Tikkanen et al. 2006) entsteht: Externe Stimuli (wie Aspiration, Infektion oder Luftverschmutzung), allo- (z.B. Mismatch der *anti-human leukocyte antigen*, HLAs) und autoimmune (z.B. Auto-Antikörper zu Collagen V) Reaktionen, sowie Ischämie bedingen eine Irritation des respiratorischen Flimmerepithels. Dies führt dazu, dass Entzündungszellen, sowie Zellen der adaptiven Immunabwehr (Laohaburanakit et al. 2003) in das entsprechende Areal rekrutiert werden und dort eine Entzündung der kleinen Atemwege triggern (Sato 2020). In

Einleitung

dieser inflammatorischen Phase kommt es zu einer Destruktion des Bronchialepithels, wodurch massiv Zytokine, Chemokine und Mediatoren des oxidativen Stresses (Laohaburanakit et al. 2003; Madill et al. 2009) freigesetzt werden, was eine Chronifizierung der Entzündungsreaktion stimuliert. Infolge der chronischen Inflammation und der Freisetzung von Wachstumshormonen werden unter anderem Fibroblasten, Myofibroblasten und glatte Muskelzellen zur Proliferation angeregt, was die fibroproliferative Phase induziert (Bonner 2004; Lappi-Blanco et al. 2002; Verleden et al. 2009). Die Myofibroblasten spielen eine essentielle Rolle im fibroproliferativen Umbau der Atemwege nach LTx, weil sie exzessiv Extrazellulärmatrix produzieren (Yoshiyasu und Sato 2020) und dadurch zur Obstruktion der Bronchioli-Lumen beitragen (van der Ploeg et al. 2021). Durch die Schädigung kommt es zudem zu einer Ablagerung von Fibrin in den Atemwegen (Werlein et al. 2021), sodass BOS in einem fibrösen Verschluss von Bronchiolen und Gefäßen endet (Belperio et al. 2009) und das Vollbild der *vanishing airway disease* bildet. Im gesunden Gewebe erfolgt dann eine Apoptose der Myofibroblasten, welche anschließend von Makrophagen abgeräumt werden, um eine Reepithelialisierung zu ermöglichen. Bei BOS entstehen allerdings auf Grund von dysregulierten Wundheilungsprozessen seneszente Myofibroblasten, die über Vernarbungen in den kleinen Atemwegen und Gefäßen zu einer Gewebsfibrosierung führen (Waters et al. 2018; Estenne und Hertz 2002). Diese exzessive Parenchymfibrose zerstört die Gewebearchitektur und mündet in einer Dysfunktion des betroffenen Organs (Weisberg et al. 2020).

Einleitung

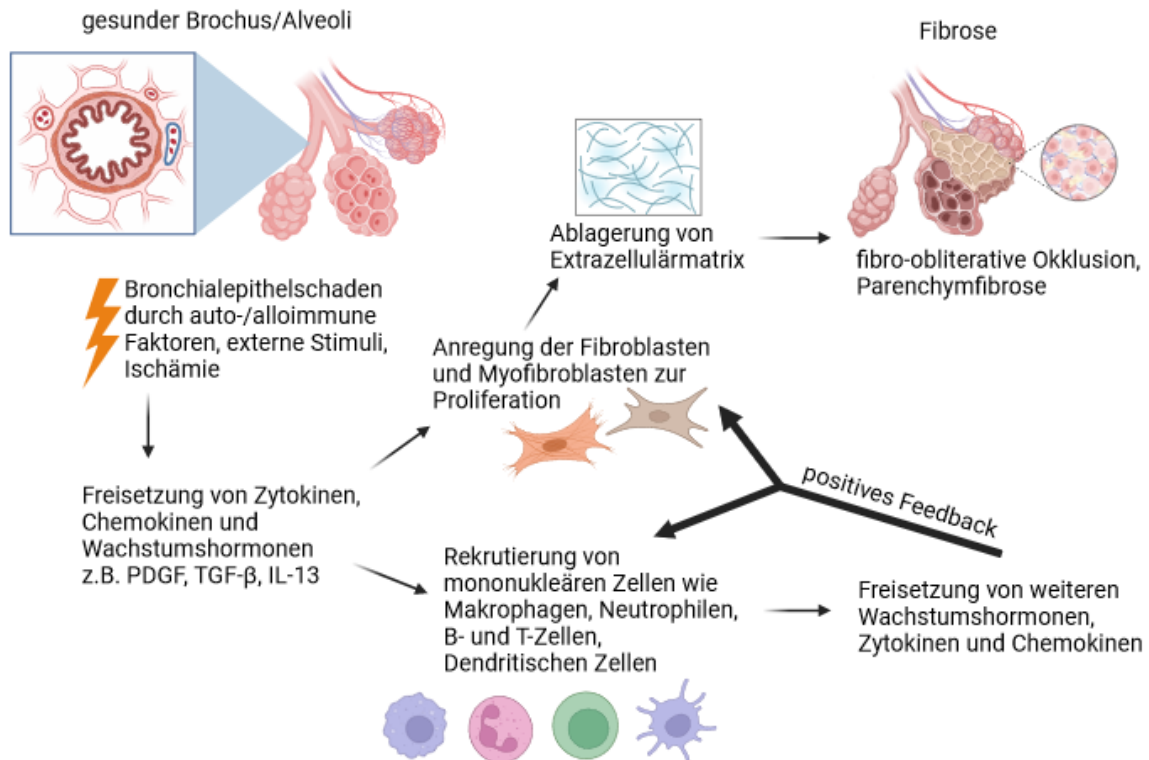


Abbildung 1 Pathomechanismus des Bronchiolitis obliterans-Syndroms
 Basierend auf und modifiziert nach Belperio, Sato und Laohabaranakit, erstellt mit BioRender.com.

Als Beispiel für eine solche eben genannte Wachstumshormonfreisetzung wäre *transforming growth factor beta* (TGF- β) zu nennen, das eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) Typ 2 des Bronchialepithels bewirkt, sodass dieses ein fibroblastenartigen Phänotyp annimmt, wodurch diese Zellen Migrationspotential entwickeln und Extrazellulärmatrixproteine sezernieren können (Borthwick et al. 2010; Jolly et al. 2018; Kalluri und Weinberg 2009; Hinz 2012). Außerdem inhibiert es die Apoptose von Myofibroblasten und fördert das nachhaltige Überleben des profibrotischen Phänotyps (Vittal et al. 2005). Damit TGF- β die Aktivierung von Fibroblasten und die Differenzierung von Myofibroblasten induzieren kann, sind unter anderem Src-Kinasen notwendig. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Nonrezeptor-Tyrosinkinasen, die eine Vielzahl an zellulären Funktionen, wie Migration, Invasion, Differenzierung, Aktivierung und Wachstum regulieren (Hu et al. 2014; Lu et al. 2017). Ebenso ist PDGF essenziell in der Pathogenese, da es Fibrozyten mobilisiert und (Myo-)Fibroblasten durch Hochregulierung der Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche proliferieren lässt (Aono et al. 2014; Homsí und Daud 2007; Bonner 2004). Bindet dieser Mediator, wird in der Zelle eine Kaskade aktiviert, die zur Freisetzung weiterer Wachstumsfaktoren, wie z.B. Src, und zur Sekretion von unter

anderem Extrazellulärmatrix und Fibronectin führt (Heldin und Westermark 1999; Tallquist und Kazlauskas 2004; Grimminger et al. 2010; Skhirtladze et al. 2008). Fibronectin rekrutiert weitere Fibroblasten und induziert deren Proliferation (Sheppard und Harrison 1992). PDGF wird zudem als essenziell für die Wundheilung betrachtet, da es den Prozess initiiert und die Abläufe dabei dirigiert (Pierce et al. 1991). Außerdem reguliert PDGF indirekt die Angiogenese, da es die Transkription und Sekretion von VEGF, dem eine Schlüsselrolle bei der Angiogenese zugesprochen wird, induziert. VEGF schützt neu gebildete Gefäße vor Apoptose und bewirkt eine Proliferation, Differenzierung und Migration von Endothelzellen, was die Gefäßpermeabilität erhöht (Homsí und Daud 2007; Lappi-Blanco et al. 2002). In Kombination mit FGF treten synergistische Effekte bei der Induktion von Angiogenese *in vitro* und *in vivo* auf. FGF regt außerdem die Endothelzellproliferation an (Lappi-Blanco et al. 2002).

1.3 Therapiemöglichkeiten von CLAD und experimentelle Ansätze

Eine frühzeitige Detektion von CLAD ist entscheidend, um eine weitere Verschlechterung und letztendlich Tod mittels Therapieoptimierung möglichst zu verhindern (van der Ploeg et al. 2021; Meyer et al. 2014; Sun et al. 2022). Die Erhaltungstherapie nach LTx besteht klassischerweise aus einer Kombination aus einem Glucocorticoid, einem Calcineurin-Inhibitor und einem Nukleotid-Biosynthese-Inhibitor (Gauthier et al. 2016). Bei Auftreten von CLAD ist nach Ausschluss von beherrschbaren Ursachen zuerst ein Wechsel der Medikamente innerhalb der Wirkungsgruppe oder die Umstellung von Cyclosporin zu Tacrolimus, Sirolimus oder Everolimus möglich (Gauthier et al. 2016). Als weitere medikamentöse Therapie-Eskalationen sind Azathioprin, Montelukast oder aerolisiertes Cyclosporin zu nennen. Außerdem stehen Therapiemethoden wie die immunmodulatorische *extracorporeal photophoresis* (ECP) und für medikamentös refraktäre Fälle auch die *total lymphoid irradiation* (TLI) zur Verfügung. Dennoch zeigt keine dieser Therapien langfristig eine so gute Wirksamkeit, dass das Überleben der Patienten gesteigert werden kann. Als letzte Möglichkeit ist für ausgewählte Patienten eine Retransplantation in Betracht zu ziehen, was allerdings mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit (50 % nach 5 Jahren) für ein Wiederauftreten von BOS assoziiert ist (Meyer et al. 2014). Es scheint zudem, als würde eine Eskalation der immunsuppressiven Therapie in der fibroproliferativen Phase von BOS kein Ansprechen der Läsionen bewirken (Tikkanen et al. 2006).

Einleitung

Übermäßige Immunsuppression resultiert sogar in einem Ansteigen der Morbidität und Mortalität durch Infektionen (Nakajima et al. 2011).

Aufgrund der Erkenntnis, dass CLAD vordergründig auf fibroproliferativen Prozessen basiert und so eine gewisse Relation zu anderen fibrotischen Erkrankungen der Lunge besteht, sind Antifibrotika zuletzt vermehrt in den Fokus der Forschung getreten. So ist für die Therapie von ideopathischer Lungenfibrose (*ideopathic pulmonary fibrosis*, IPF) seit fast einer Dekade bereits Pirfenidon zugelassen. Es hat antifibrotische, antiinflammatorische und antioxidative Wirkung, indem es unter anderem die Expression von TGF- β und somit die Proliferation von Fibroblasten und die Differenzierung von Myofibroblasten hemmt (Meyer und Decker 2017; Bos et al. 2021). Auch Nintedanib ist für die Therapie von IPF zugelassen. Hierbei handelt es sich um einen intrazellulären Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor (RTKI), der auf die Rezeptoren von VEGF (VEGFR), FGF (FGFR) und PDGF (PDGFR) abzielt. Damit werden nicht nur (Myo-)Fibroblasten, sondern auch eine potentielle Angiogenese gehemmt (Wollin et al. 2019; McCormack 2015; Bos et al. 2021). Es konnte in Studien gezeigt werden, dass beide Medikamente das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen und das Zeitintervall bis zur Progression verlängern. Unter Pirfenidon konnte sogar eine Risikoreduktion für die IPF-bezogenen Mortalität beobachtet werden (Bos et al. 2021). Auch bei anderen interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD), die nicht durch IPF bedingt sind, aber die ebenso durch progressive Fibrosierung respiratorische Einschränkungen bis hin zur Lungenfunktionsverschlechterung auslösen, wurden Antifibrotika in Studien verwendet. So zeigte Nintedanib bei der Systemischen Sklerose-assoziierten ILD (SSc-ILD) eine Reduktion der Progressionsrate (Distler et al. 2019), was zu einer zusätzlichen Zulassung des Medikaments für diese Erkrankung führte (Bos et al. 2021).

Aktuell sind mehrere klinische Studien in Gange, die die Wirkung von Antifibrotika auf CLAD nach LTx betrachten (Bedair und Hachem 2021; Collins und Raghu 2019; Glanville et al. 2022). Bei STOP-CLAD (*Studying the Treatment Effect of Pirfenidone in Chronic Lung Allograft Dysfunction*, NCT03473340) handelt es sich um eine randomisierte, doppelblinde, Plazebo-kontrollierte Phase-II-Studie in den USA, die den Effekt von Pirfenidon auf CLAD nach LTx untersucht. Ein europäisches Pendant hierzu bildet EPOS (*European Trial of Pirfenidone in BOS, A European Multi-center Study*, NCT02262299), eine randomisierte, doppelblinde, multizentrale Studie, die die

Wirkung von Pirfenidon gegen Plazebo auf BOS Grad 1 bis 3 in Lungentransplantierten betrachtet. Es konnten bei der 2019 beendeten Studie keine signifikanten Effekte auf den FEV1-Abfall der Probanden beobachtet werden (Perch et al. 2020). Auch Nintedanib wird aktuell für die Behandlung von BOS post-LTx klinisch getestet. Mit INFINITx-BOS (*Nintedanib in Lung Transplant Recipients With Bronchiolitis Obliterans Syndrome Grade Op-1-2*, NCT03283007) soll die Wirkung des RTKIs an Lungentransplantierten mit BOS bis Grad 2 in einer randomisierten, doppelblinden, multizentralen Studie untersucht werden.

1.4 Das Rattenmodell (F344[RT1^{lv1}] → WKY[RT1^l])

Vor Einsatz von Medikamenten am Patienten ist es nötig, die Wirksamkeit im Tiermodell bestätigt zu sehen. Hierfür sollen die Zustände der jeweiligen Erkrankung so nahe am Menschen wie möglich reproduziert werden. Es sind eine Vielzahl an verschiedenen Modellen für die Untersuchung der chronischen Lungentransplantatsabstoßung, respektive CLAD und BOS, im Tiermodell vorhanden. Sowohl orthotope mit höherer physiologischer Nähe zum Menschen als auch heterotope sind etabliert. Zwar konnten in einigen Modellen Ischämien und die verschiedenen Ausprägungen der akuten Abstoßungsreaktion (AR) gezeigt werden, aber meist endeten diese in Nekrose und einem kompletten Verlust des Transplantates (Sato et al. 2009). Unter Immunsuppression wurde nur eine geringgradige chronische Abstoßung ohne das Vollbild des BOS beobachtet (Atanasova et al. 2013).

Das änderte sich mit dem Modell der unilateralen, orthotopen, linksseitigen Lungentransplantation zwischen zwei nur geringfügig histoinkompatiblen Rattenstämmen (F344[RT1^{lv1}] → WKY[RT1^l]). Es ist das Einzige, bei dem sowohl eine AR als nach zwei bis drei Monaten das Vollbild der chronischen Lungentransplantatsabstoßung mit der Ausprägung als BOS-ähnlichen Läsionen im Tiermodell ohne Gabe von Immunsuppression beobachtet werden kann (Matsumura et al. 1995). Zudem besteht eine starke physiologische Nähe zum Menschen, die chirurgischen Vorgehensweisen sind ähnlich und das Organ ist nach Transplantation sowohl vaskularisiert als auch am Luftaustausch beteiligt (Jungraithmayr et al. 2013).

1.5 Antifibrotika im Tiermodell

Die Wirksamkeit von Antifibrotika auf die Progression von BOS wurde auch in diesem Tiermodell betrachtet. Es wurde eine Reduktion der Wachstumshormone PDGF und

Einleitung

VEGF ebenso wie ihrer Rezeptoren bei Ratten unter Nintedanib-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren nachgewiesen, wobei allerdings keine histologische Reduktion der Fibrose beobachtet wurde (Suesskind-Schwendi et al. 2017). Der Einsatz von Pirfenidon konnte im BOS-Tiermodell signifikant die interstitielle Fibrose und die chronische Abstoßung (CR) in den Luftwegen reduzieren. In Kombination mit Everolimus, einem antiproliferativ wirkenden mTOR-Inhibitor, konnte der Effekt noch verstärkt und darüber hinaus auch eine Verminderung der Vaskulopathie erzielt werden (Suesskind-Schwendi et al. 2016). Ein anderer RTKI, der ebenso im diesem Rattenmodell verwendet wurde, ist Imatinib (Ima). Dieser blockiert unter anderem den c-Abl- und den PDGF-Signalweg. Unter Monotherapie mit dem Antifibrotikum allein fanden sich Tiere ohne Zeichen der chronischen Abstoßung in der Kohorte. Kombination aus Everolimus und Ima zeigte eine signifikant verminderte AR, bei der die Hälfte der Versuchstiere keinerlei Anzeichen für BOS oder Vaskulopathie nach Ende der Versuche aufwies (Suesskind-Schwendi et al. 2013a). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass der RTKI Vatalanib CR dämpfen kann, und in Kombination mit Ima CR in den Bronchiolen und interstitielle Fibrose signifikant reduziert wurde. Die Dreifachkombination aus Vatalanib, Ima und Everolimus konnte die eben genannten Effekte noch verstärken (Keil et al. 2019). Die Verminderung von Luftwegsobliteration durch die die RTKIs Ima und Vatalanib konnte davor bereits in heterotoper Trachealtransplantation gezeigt werden (Tikkanen et al. 2006). Die protektiven Effekte von Pirfenidon auf Bleomycin-induzierte Lungenfibrose durch Reduktion von PDGF wurde auch im Hamstermodell nachgewiesen (Gurujeyalakshmi et al. 1999). Im SSc-Mausmodell konnte ein Fortschreiten der Fibrosierung durch Therapie mit Ima über PDGFR- und c-Abl-Hemmung inhibiert und eine präexistente Fibrose sogar reduziert werden (Akhmetshina et al. 2009). Die Entdeckungen von Abdollahi und Kollegen mit unter anderem Ima im Mäusemodell mit Strahlen-induzierten Lungenschädigungen legen zudem nahe, dass die Inhibierung der Fibrose über den PDGF-Signalweg wichtiger als die der Inflammation für die antifibrotische Therapie ist (Abdollahi et al. 2005).

Nachdem sich Antifibrotika als sehr guter Angriffspunkt zur Bekämpfung einer Organfibrose im Tiermodell gezeigt haben und vor allem bei RTKIs gute Resultate vermerkt werden konnten, scheint es als logischer nächster Schritt, diese Medikamentengruppe intensiver zu Betrachten. Bei Ima handelt es sich um einen RTKI der ersten Generation, der ursprünglich zur Therapie von Chronisch Myeloischer

Einleitung

Leukämie (CML) entwickelt wurde. Er hemmt hauptsächlich die Kinasen von PDGFR und c-Abl, Bcr-Abl und c-Kit (Aono et al. 2005; Daniels et al. 2004; Manley et al. 2002; Deininger et al. 2005; Al-Share et al. 2021). Auf Grund der Resistenzbildung einiger CML-Patienten gegenüber dieser Substanz, erfolgte die Entwicklung von RTKIs der zweiten Generation. Einerseits Dasatinib (Dasa), das spezifisch diverse Kinasen, vor allem Bcr-Abl, Src, c-Kit und PDGFR hemmt (Lombardo et al. 2004; Steinberg 2007; Virakul et al. 2014) und andererseits Nilotinib (Nilo), das sich strukturell kaum von Ima unterscheidet, aber selektiver wirkt und vor allem Bcr-Abl und PDGFR inhibiert (Weisberg et al. 2005; Kantarjian et al. 2006; Deininger 2008).

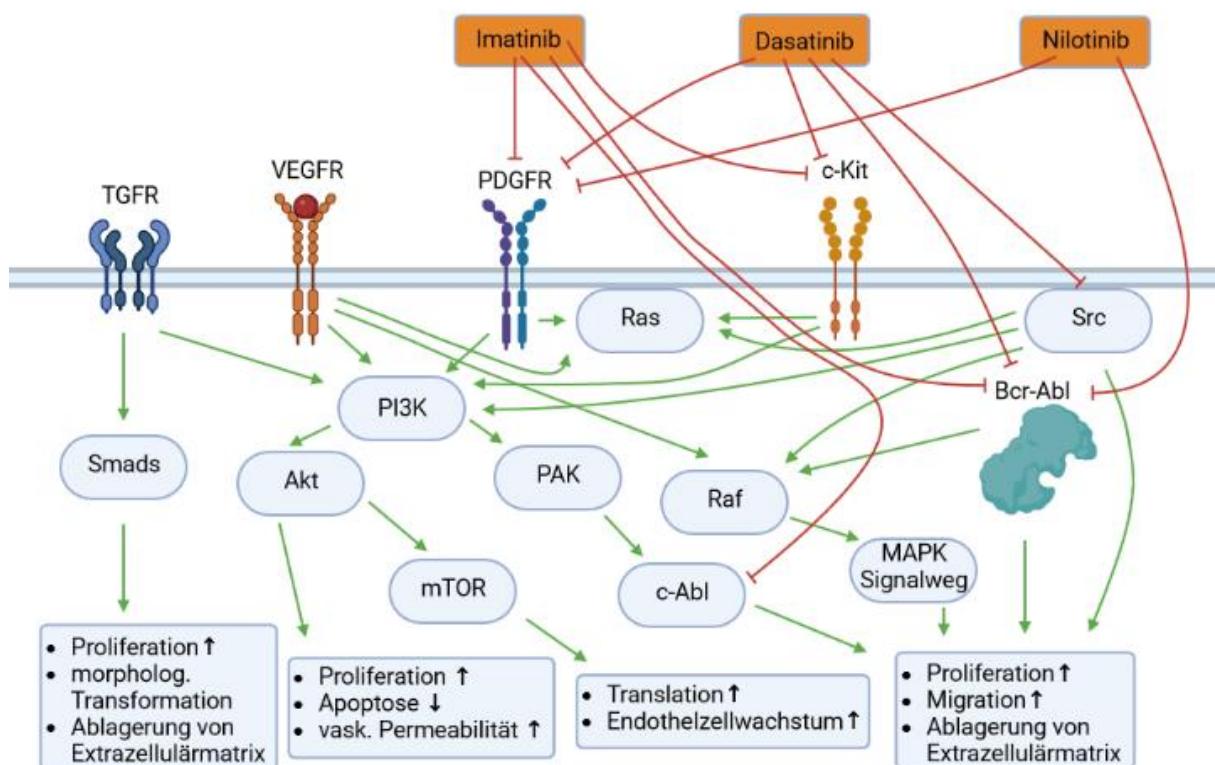


Abbildung 2 Schematischer Überblick über die Wirkung der RTKIs
Basierend auf und modifiziert nach Manoucherhi, Al-Share und Grimminger. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

1.6 Zellkultur als ressourcenschonendes Verfahren

Da pro Tier nur ein Wirkstoff beziehungsweise eine Stoffkombination getestet werden kann und auch Kontrolltiere benötigt werden, ist die Durchführung des Modells sehr aufwendig und erfordert zahlreiche Ressourcen. Gemäß dem 3R-Prinzip (*reduction, refinement, replacement*) ist der Schritt naheliegend, die Versuche in Zellkultur zu verlegen. So können aus wenigen Tieren eine Vielzahl an Kulturen generiert werden, die eine Vermehrung der Zellen zulassen. Mithilfe der so gewonnenen Kulturen ist es

Einleitung

möglich, die Effekte mehrerer Medikamente auf eine Zellart zu untersuchen. Nachdem die Lungenfibroblasten als zentrales Element in der Entstehung der CLAD identifiziert wurden, bietet es sich an, die Wirkung der oben genannten RTKIs auf diese Zellen zu beobachten.

Es gibt diverse Studien, die belegen, dass sich Zellen aus erkrankten Individuen anders verhalten als die aus Kontrollen: Schon die Zusammensetzung des Parenchyms unterscheidet sich anhand der vorherrschenden Zellen. Aono und Kollegen konnten die vorbeschriebene Migration von zirkulierenden Fibrozyten in verletzte Lungen und die dadurch begünstigte Fibrogenese im Mäusemodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose nachbilden. Es fanden sich zahlenmäßig mehr Fibrozyten in den verletzten Lungen als in den gesunden Kontrollen (Aono et al. 2014). Bei der SSc-ILD wurde von Valenzi und Kollegen gezeigt, dass sich der Anteil der einzelnen Zellpopulationen im Gewebe aus erkrankten Patienten zu denen aus gesunden Vergleichsprobanden unterschied. So wurden bei SSc-ILD-Lungen signifikant mehr glatte Muskelzellen, Perizyten und proliferierende Makrophagen, dafür aber weniger Monozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gesehen als bei den Kontrollen. Bei dem Vergleich der genetischen Expression in den mesenchymalen Zellpopulationen zeigte sich zudem, dass Myofibroblasten aus SSc-ILD-Lungen im Vergleich zu den aus gesunden stärker verändert sind, sodass eine Hochregulierung der Kollagenexpression und anderer profibrotischer Gene erfolgte (Valenzi et al. 2019). Sugiura und Kollegen konnten im Mausmodell zeigen, dass sich der Phänotyp von Fibroblasten aus chronisch Ovalbumin-sensibilisierten (OVA) „asthmatischen“ Mäusen deutlich von dem aus Kontrollen unterscheidet. Zudem war die Freisetzung von TGF- β , Fibronectin und VEGF erhöht und die parenchymalen Fibroblasten aus OVA-Mäusen proliferierten schneller als die aus den Kontrollen (Sugiura et al. 2007). Auch die Reaktion von Fibroblasten aus IPF-Lungen auf Wachstumsfaktoren divergiert stark im Vergleich zu Kontrollen. Während die Zellen aus gesunden Probanden vor allem eine Proliferation zeigten, wurde bei den IPF-Fibroblasten hauptsächlich eine Synthese von Fibronectin beobachtet (Hetzl et al. 2005). Es wurde demonstriert, dass es sich bei IPF-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen um funktionell veränderte Zellen mit einer abnormalen Proliferation handelt (Mio et al. 1992). Nachdem sich herauskristallisiert, dass sich Fibroblasten aus erkrankten Lungen anders verhalten als solche aus gesunden Kontrollen, liegt die Vermutung nahe, dass sie sich auch

pharmakokinetisch anders verhalten, also ein deutlicher Unterschied im Ansprechen auf Medikamente erkennbar ist.

1.7 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung der RTKIs Dasa, Nilo und Ima auf Rattenfibroblasten aus nativen und transplantierten Lungen in Zellkultur betrachtet werden. Die Quantifizierung der Proliferationshemmung der Medikamente erfolgte mittels MTS (Photometrie) und RealTime Glo (Lumineszenz).

Folgende Fragestellungen sollten untersucht werden:

1. Gibt es einen Unterschied in der Proliferation zwischen den Fibroblasten aus den nativen Lungen und den Allografts in diesem Rattenmodell in Bezug auf die Wirkung der Medikamente?
2. Welche Methode eignet sich besser zur Messung der Proliferationshemmung?
3. Können die Medikamente Dasa, Nilo und Ima die Proliferation der Fibroblasten hemmen und welches eignet sich dafür am besten?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Name	Hersteller	Ort
Brutschrank Inco2	Memmert	Schwabach (D)
Brutschrank CO ₂ Auto Zero	Heraeus Holdings GmbH	Hanau (D)
CASY TTC® Cell Counter and Analyser System	Innovatis, Roche	Mannheim (D)
Eppendorf Research Pipetten 10µl-1000µl	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf (D)
Kamera Olympus E450	Olympus Deutschland GmbH	Hamburg (D)
Keyence Fluoreszenz-Mikroskop BZ 8100 E	Keyence Deutschland GmbH	Neu-Isenburg (D)
Mikroskop Leitz Fluovert FU	Leitz	Wetzlar (D)
Pipetboy accuJet	Integra Bioscience	Fernwald (D)
SOFTmax EMax precision microplate reader	Molecular Devices, LLC.	San Jose (USA)
Sterilbank Laminair Heraeus	Heraeus Holdings GmbH	Hanau (D)
Tecan Infinite®	Tecan Group, Ltd.	Männedorf (CH)
Varioskan LUX Multimodus-Mikrotiterplatten-Lesegerät	Thermo Fisher Scientific	Schwerte (D)
Vortex	Heidolph	Schwabach (D)
Julabo SW 20c Schüttelwasserbad	GFL	Burgwedel (D)
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1L-R	Thermo Fisher Scientific	Schwerte (D)

Tabelle 1 Auflistung der verwendeten Gerätschaften

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller	Ort
1,5ml-/2ml-Reagenzgefäße	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf (D)
15ml/50ml Corning CentiStar Zentrifugen-Röhrchen	Corning	Amsterdam (NL)
20µl-1000µl Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen (D)
6-/24-/96-well-Platten mit transparentem Boden	Nunc	Wiesbaden (D)
96-well Flachboden-Platten mit transparentem Boden	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen (D)
Cellstar Kunststoffpipetten für Pipetboy	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen (D)
Corning Falcon Standard Gewebekulturschalen	Thermo Fisher Scientific	Schwerte (D)
Einmalskalpelle Feather No. 22	PFM	Köln (D)
Petrischalen	Nunc	Wiesbaden (D)
Sterilfilter 0,22µm pore size	Corning	Amsterdam (NL)
T25-/t75-Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen (D)

Tabelle 2 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Chemikalien

Name	Konzentration	Hersteller	Ort
Amphotericin	250 µg/ml	Invitrogen	Darmstadt (D)
BSA (Bovines Serumalbumin)		Carl Roth	Karlsruhe (D)
CASYton-Lösung		Innovatis Roche	Mannheim (D)

Material und Methoden

Dasatinib (CAS Nr. 302962-49-8)	10 mmol/l	Selleckchem	Houston (USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)		Sigma	München (D)
DMEM		Sigma	München (D)
Endothelzell-Supplement		Promocell	Heidelberg (D)
Ethanol	>95 % (vol.)	Merck	Darmstadt (D)
FKS (Fetales Kälberserum)	100 % Serum	Sigma	München (D)
Gentamycin	50 mg/ml	Sigma	München (D)
Imatinib Mesylat (CAS Nr. 220127-57-1)	100 mmol/l	Selleckchem	Houston (USA)
L-Glutamin	200 mM	Sigma	München (D)
HEPES	1 M	Sigma	München (D)
Kollagenase A	0,1 % Kollagenase	Roche	Mannheim (D)
M199		Sigma	München (D)
MTS (Cell Titer 96 AQueous Cell Proliferation Assay)		Promega	Madison (USA)
Nilotinib (CAS Nr. 641571-10-0)	50 mmol/l	Selleckchem	Houston (USA)
RealTime Glo (NanoLuc Luciferase, MT Cell Viability Substrate)	1:1500 in DMEM	Promega	Madison (USA)
Trypsin-EDTA 0,5 %	0,5 % Trypsin 0,2 % EDTA	Sigma	München (D)

Tabelle 3 Auflistung der verwendeten Reagenzien

Die in der Tabelle genannten Konzentrationen werden im Folgenden als bekannt angenommen und nicht erneut angeführt.

2.1.4 Medikamente

Die pharmakokinetische Aktivität von drei Medikamenten wurde in dieser Arbeit näher betrachtet: Ima (European Medicines Agency 2013), Dasa (European Medicines Agency 2019) und Nilo (European Medicines Agency 2018). Bei den eingesetzten Substanzen handelt es sich um verschiedene Proteinkinase-Inhibitoren, die allesamt als spezifische Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren zu klassifizieren sind.

Name	Entwickler	Zulassung (D)	Wirkung	Eingesetzte Konz.
Imatinib (alternativ Glivec®, Gleevec®)	Novartis	2001 für CML, 2002 für Gastrointestinale Stromatumore (GIST)	Multi-target-Inhibitor von PDGFR, c-Abl, Bcr-Abl, c-Kit	0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM
Dasatinib (alternativ Sprycel®)	Bristol-Myers Squibb	2006 für CML	Multi-target-Inhibitor von Bcr-Abl, Src, c-Kit, PDGFR	0,001 µM, 0,01 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,3 µM, 0,6 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM
Nilotinib (alternativ Tasigna®)	Novartis	2008 für CML	selektiver PDGFR- und Bcr-Abl-Inhibitor	0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM

Tabelle 4 Auflistung der verwendeten Medikamente

Die eingesetzten RTKIs haben eine schlechte Löslichkeit in wässrigen Lösungen (Selleckchem; Selleckchem; Selleckchem), sind jedoch gut in DMSO löslich, sodass initial eine Stammlösung damit hergestellt wurde. Diese wurde weiterführend für die seriellen Medikamentenverdünnungsreihen so mit Kulturmedium und DMSO verdünnt, dass die Endkonzentration von DMSO bei 0,1 % lag.

2.1.5 Zellkulturmedien

Es wurde mit zwei verschiedenen Zellkulturmedien gearbeitet: Modifiziertes M199 (mM199) kam für das Bebrüten der Endothelzellkulturen zum Einsatz. Modifiziertes DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, mDMEM) diente der Bebrütung der Fibroblasten. Beide Medien enthielten unter anderem neben Glutamin als Grundlage der Zellproliferation auch Amphotericin als Fungizid und Gentamycin als Antibiotikum.

Modifiziertes M199 (mM199)	Modifiziertes DMEM (mDMEM)
Für Endothelzellen	Für Fibroblasten
500 ml M199	500 ml DMEM
+ 100 ml Fetales Kälberserum (20 % FKS)	+ 50 ml Fetales Kälberserum (10 % FKS)
+ 500 µl Gentamycin (0,1 % Genta)	+ 500 µl Gentamycin (0,1 % Genta)
+ 1 ml Amphotericin (0,2 % Ampho)	+ 1 ml Amphotericin (0,2 % Ampho)
+ 10 ml EC-Supplementmix (2 % Supp)	+ 5 ml 200 mM L-Glutamin (1 % Glu)
+ 5 ml 200 mM L-Glutamin (1 % Glu)	

Tabelle 5 Auflistung der verwendeten Zellkulturmedien
Neben der konkreten Menge der zugefügten Inhaltsstoffe sind zusätzlich die prozentualen Anteile der jeweiligen Substanz am Gesamtmedium in Klammern angegeben.

2.1.6 Rattenstämme

Es wurden männliche Fischer- (F344) und männliche Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) verwendet. Bezogen wurden die Tiere von Charles River Laboratories (Sulzfeld/Deutschland).

2.2 Methoden

2.2.1 Rattenmodell

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der orthotopen unilateralen LTx bei Ratten herangezogen, das schon seit mehreren Jahren in der Arbeitsgruppe etabliert ist (Süßkind-Schwendi et al. 2012a), das auf dem Modell von Matsumura und Kollegen basiert (Matsumura et al. 1995) und nach den Grundlagen der Operationstechnik nach Hirt et al. (Hirt et al. 1999) durchgeführt wird. Dabei wird einer männlichen, schwach allogenen Fischer-Ratte (F344[RT1^{lv1}]) die linke Lunge entnommen und als Allograft orthotop auf eine männliche Wistar-Kyoto-Ratte (WKY[RT1]^l) unter hygienisch sauberen Bedingungen verpflanzt. Es handelt sich hierbei um speziell gezüchtete

Material und Methoden

Inzuchtstämme, die nur schwach immunogenetische Unterschiede zwischen den MHC-I-Klassen besitzen. Dadurch kann relativ gut die klinische Präsentation eines Patienten nach LTx nachgebildet werden.

Bereits am 60. postoperativen Tag (POD) finden sich in der transplantierten Lunge Zeichen der chronischen Abstoßung, die sich in ihrer Maximalform als Fibrose perivaskulär mit Obstruktion oder Verschluss der kleinen Gefäße und peribronchial mit Obliteration der Bronchioli präsentiert (Suesskind-Schwendi et al. 2017).

Die Extraktion von Endothelzellen und Fibroblasten erfolgte aus den rechten, nativen und den korrespondierenden linken, transplantierten Lungen von vier WKY-Ratten. Da es sich um Kontrolltiere aus einer bereits laufenden Studie (Ethik-Antragsnummer: 54-2532.1_16/12) handelte, wurden keine zusätzlichen Tiere operiert. Es erfolgte eine Entnahme des Gewebes für die Zellpräparation aus dem vorhandenen Bestand.

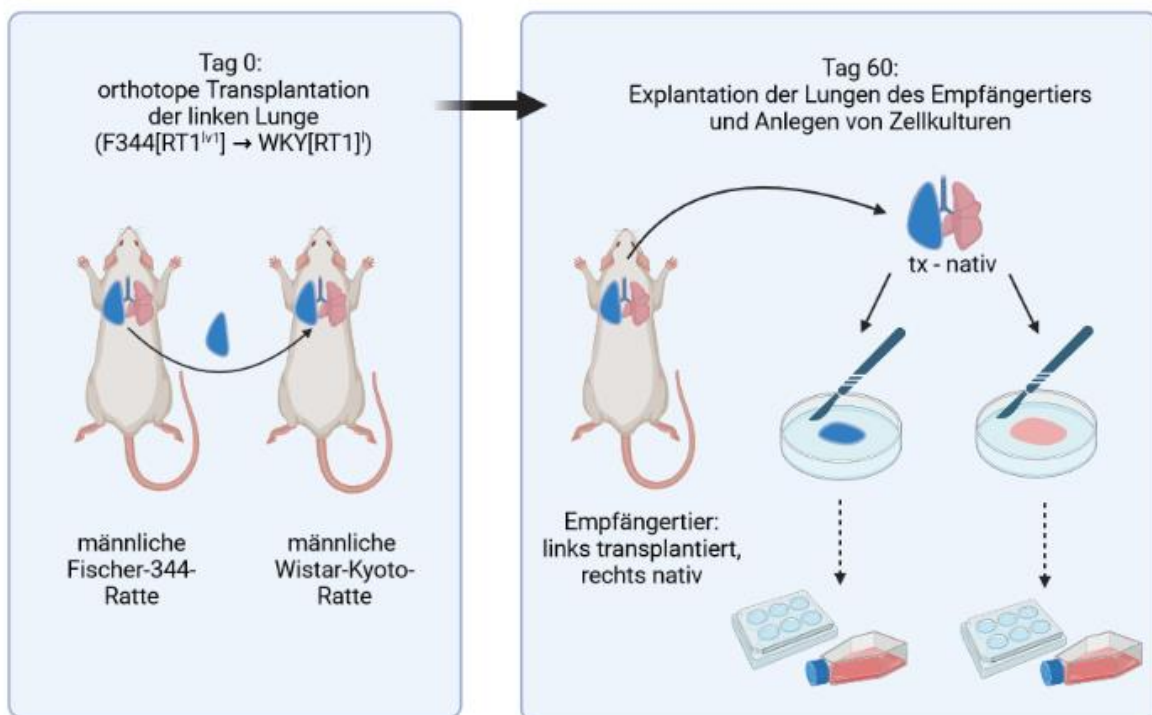


Abbildung 3 Schematischer zeitlicher Ablauf des Rattenmodells
Schemazeichnung erstellt mittels BioRender.com.

Die Transplantationen erfolgten im Tierlabor des Universitätsklinikums Regensburg, die Explantation der Lungen fand nach 60 Tagen statt. Die Tiere wurden entsprechend der Richtlinien der Europäischen Union von 22.09.2010 (EU 2010/63/EU) untergebracht und so bei konventioneller Standardumgebung und angepasstem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Extraktion der Zellen

Es erfolgte eine sterile Entnahme der Lungen mit direkt anschließender Aufarbeitung unter der Sterilbank. Nach dem Aufteilen des Gewebes auf die verschiedenen Projekte wurden die Zellen aus dem hierfür vorgesehenen Parenchym extrahiert.

Abfolge der Präparation:

1. Waschen: Lunge mehrfach in PBS-Puffer zur Entfernung von Blutresten und sonstigen Verunreinigungen waschen
2. Schneiden: Lunge in Petrischale mit Skalpell in circa 1 mm³-große Würfel schneiden, eventuell etwas PBS-Puffer hinzugeben, falls Austrocknung des Parenchyms droht
3. Kollagenase: Parenchymwürfel in 15 ml-Falcon mit 5 ml Kollagenase geben, mit Parafilm umwickeln, für 5 min bei 37°C in Schüttelwasserbad inkubieren
4. Abstoppen: Reaktion im Eisbad abstoppen, Falcon auspacken, mit Ethanol abwischen, mit circa 35 ml mM199 abstoppen
5. Abpipettieren: entstehende Zellsuspension durch Zellfilter in 50 ml-Falcon pipettieren (weiteres Verfahren mit Parenchym auf Zellfilter siehe Schritt 9)
6. Zentrifugieren: Suspension abzentrifugieren (4°C, 8 min, 300x g), Überstand bis auf circa 0,3 ml verwerfen
7. Zellzahl bestimmen: Mit 1 ml mM199 resuspendieren, 40 µl der Suspension in 4 ml CASYton geben und mit CASY TTC[®] Zellzahl (ZZ) bestimmen (Beschreibung des Verfahrens unter 2.2.2.2)
8. Zellkulturen anlegen: Je nach ZZ Kulturen mit mM199 anlegen (siehe 2.2.2.3)
9. Kollagenase: Parenchymwürfel aus dem Zellfilter in 15 ml-Falcon mit 5 ml Kollagenase geben, mit Parafilm umwickeln, 10 min bei 37°C in Schüttelwasserbad inkubieren
10. Abstoppen: Falcon auspacken, desinfizieren, mit circa 35 ml mDMEM abstoppen, entstehende Zellsuspension durch Zellfilter in 50 ml-Falcon pipettieren
11. Zentrifugieren (siehe Schritt 6)
12. Zellzahl bestimmen (siehe Schritt 7)
13. Zellkulturen anlegen: Je nach ZZ, mit mDMEM
14. Schritt 9 bis 13 ein bis zweimal wiederholen

Material und Methoden

15. Gewebekulturen: Parenchymwürfel aus Zellfilter in t25 mit 2,5 ml mDMEM bebrüten

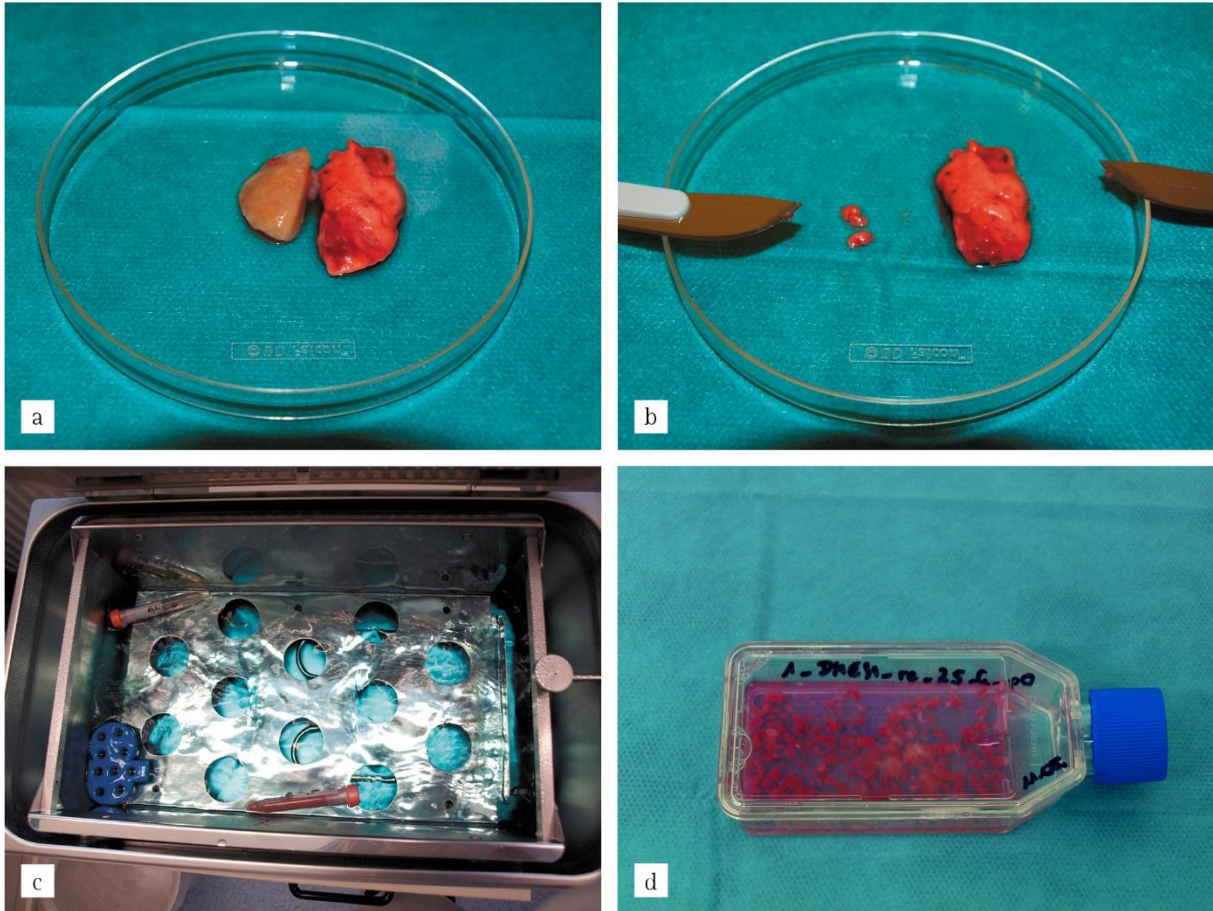


Abbildung 4 Beispielbilder des Zellpräparationsablaufs

Die Bilder sind bei Präparation der transplantierten und nativen Lunge einer Ratte entstanden. a. linke, transplantierte Lunge (auf dem Bild links) und rechte, native Lunge (rechts) in einer sterilen Petrischale zum Vergleich; b. repräsentatives Abschneiden von circa 1 mm³-großen Stücken von der rechten Lunge (Schritt 2); c. Inkubieren der 15 ml-Falcons mit den Parenchymwürfeln und der Kollagenase bei 37°C im Schüttelwasserbad (Schritt 3 und 9); d. Anlegen einer t25-Gewebe-Zellkultur mit den Parenchymresten (Schritt 15).

Der 5 min- (5') Kollagenase-Punkt (Schritt 3 bis 8) wurde zur Extraktion von Endothelzellen durchgeführt, die oberflächlicher im Parenchym liegen und dadurch in kürzerer Zeit durch die Protease herausgelöst werden sollten. Die extrahierten Zellen wurden auf vorher gelatinisierten Platten ausgesät, da Endothelzellen auf unbeschichteten Platten schlecht adhäreren. Die Bebrütung erfolgte mit mM199 bei 37°C in 5 %-igem CO₂-Milieu.

Die nachfolgenden 15 min- (15')/25 min- (25')/35 min- (35') Kollagenase-Punkte (Schritt 9 bis 14) dienten der Präparation von Fibroblasten. Da diese tiefer im Parenchym eingebettet liegen, wurde länger mit der Protease inkubiert. Die Einteilung der Inkubationszeit in 10 min-Abstände wurde gewählt, um eine Schädigung der

bereits herausgelösten Fibroblasten durch die Kollagenase abzuschwächen. Die so gewonnenen Zellen wurden in mDMEM bei 37°C und 9 %-igem CO₂-Milieu inkubiert. Eine Gelatinierung der Zellkulturplatten war nicht erforderlich.

Zur Maximierung der Zellausbeute wurden die verbleibenden Gewebereste (Schritt 15) schließlich noch in 2,5 ml mDMEM inkubiert. So bestand die Möglichkeit, dass noch nicht komplett herausgelöste Zellverbände auswachsen, sich auf der Zellkulturfläche absetzen und kultiviert werden können.

Bei den Tieren 1 bis 3 ist die längste Protease-Inkubationszeit 25', bei der vierten Ratte wurde die Inkubation auf 35' verlängert, um die Zellausbeute zu maximieren.

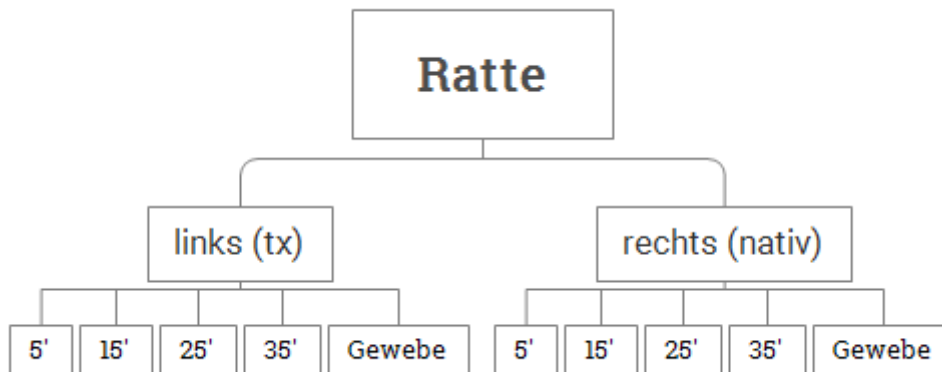


Abbildung 5 Generelles Präparationsschema

Jede Ratte lieferte eine linke, transplantierte (tx) und eine rechte, native Lunge. Diese wurden getrennt voneinander für 5 min (5'), 15 min (15'), 25 min (25') und 35 min (35') mit Kollagenase inkubiert. Mit den so extrahierten Zellen erfolgte das Anlegen von Kulturen. Das verbleibende Parenchym wurde jeweils als Gewebekultur inkubiert.

Eine komplette Übersicht, welche Kulturen entstanden, passagiert, in Versuch gegangen und verworfen worden sind, finden sich als Abbildung 47 bis Abbildung 54 im Anhang wieder.

2.2.2.2 Zellzahlmessung mittels CASY

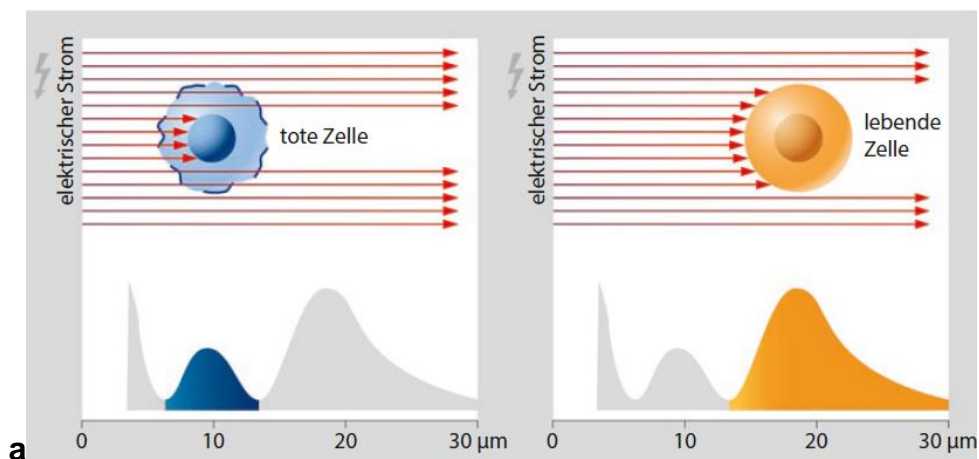
Um die Zellzahlen in den vorliegenden Zellsuspensionen messen zu können, wurde ein automatischer Zellzähler, CASY TTC® (Cell Counter and Analyser System, kurz CASY) verwendet. Dabei handelt es sich um ein nichtinvasives Messverfahren, das Zellen mittels Kombination aus elektrischer Widerstandsmessung und Echtzeitsignalauswertung detektiert. Hierzu werden in der Regel 5 ml CASYton-Lösung mit Zellsuspension in einem Messgefäß vermischt und unter die Messkapillare gestellt. Diese nimmt automatisch CASYton-Zellsuspensionsgemisch auf und führt dieses durch Messkanäle mit Messporen. Sobald intakte Zellen durch eine Messpore

Material und Methoden

treten, schließen sie den Strom aus (sog. Stromausschlussverfahren, ECE, electrical current exclusion) und die Zelle wird detektiert. Dies führt zu einem Signal, das abhängig vom Volumen der Zelle ist. Beschädigte Zellen haben keine intakte Zellmembran und können den Strom nicht mehr ausschließen, da das Zytoplasma leitfähig ist. Sie werden daher mit dem Volumen ihres Zellkerns detektiert. Einerseits können so verlässlich vitale von avitalen Zellen getrennt detektiert werden und andererseits auch Zelldebris bis hin zu ganzen Zellclustern erfasst werden, wie in Abbildung 6 dargestellt ist.

CASY verfügt über eine sogenannte „Pulsflächenanalyse“, einer Echtzeitsignalauswertung, mit der die Signale von einer Million Messpunkte pro Sekunde digital ausgewertet werden können. Dies ermöglicht eine sehr breite Messbereichabdeckung innerhalb von nur einer Messung (Gstraunthaler und Lindl 2021).

Die Konzentration der eingegebenen Zellsuspension darf nicht zu hoch sein, sonst muss eine erneute Verdünnung durchgeführt und die Messung wiederholt werden. Durch CASY werden die Zellzahlen pro ml ausgegeben, sodass nachfolgend eine Aussaat mit standardisierter Konzentration erfolgen kann.



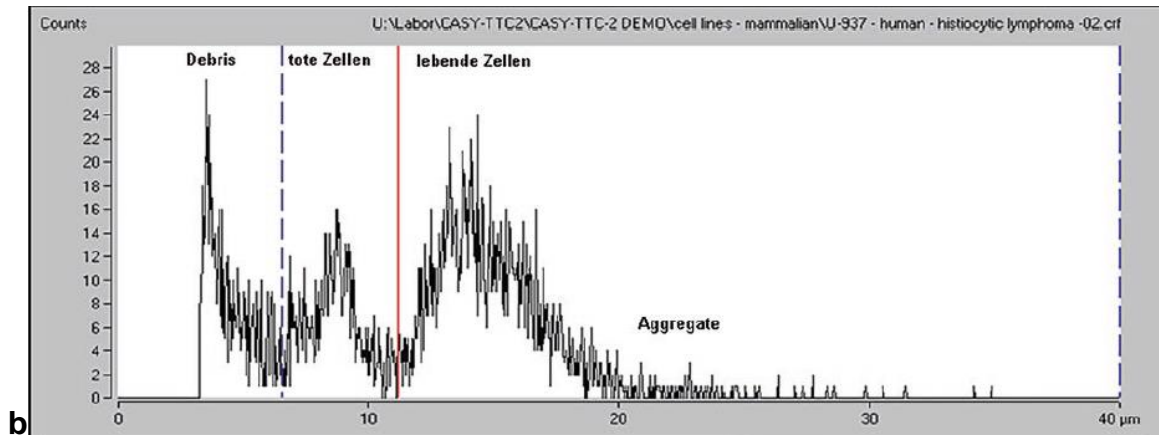
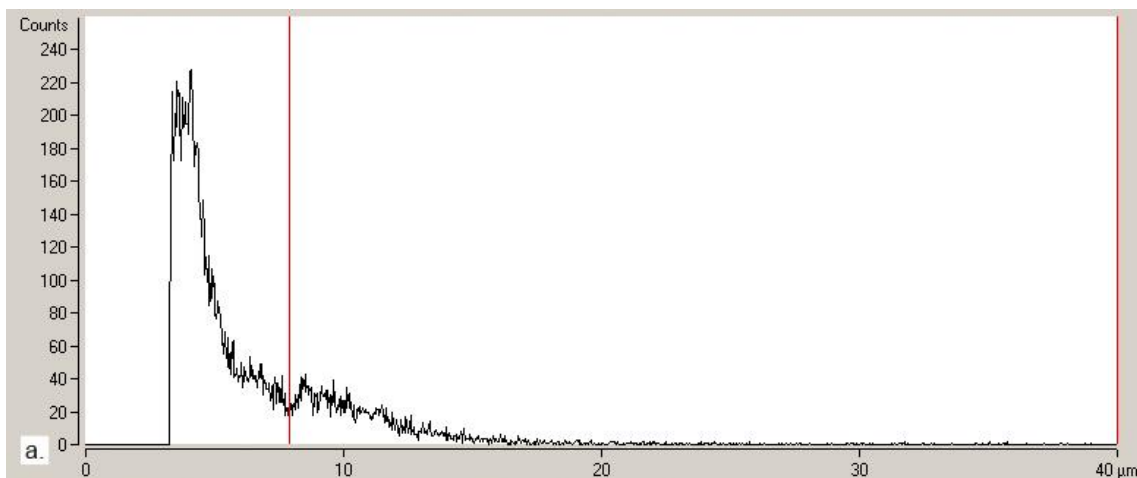


Abbildung 6 Einfluss der Zellvitalität auf die Zellzahlmessung mittels CASY TTC®
a. Entstehung der einzelnen Peaks im Histogramm durch avitale und intakte Zellen per Stromausschlussverfahren; b. Beispiel eines Histogramms anhand einer Lymphomazelllinie. Abbildungen entnommen aus Gstraunthaler und Lindl, 2021 unter Lizenz 5770930432792 'reproduced by Springer Nature', https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-62606-1_12.

2.2.2.3 Anlegen von Zellkulturen

Die Problematik der Zellzahlbestimmung bei den Nativzellen (Passage p0) wird im Histogramm deutlich. Im Gegensatz zu den kultivierten Zellen waren bei den Nativzellen durch die Zelltrümmer keine eindeutigen Verteilungskurven nachweisbar.



Material und Methoden

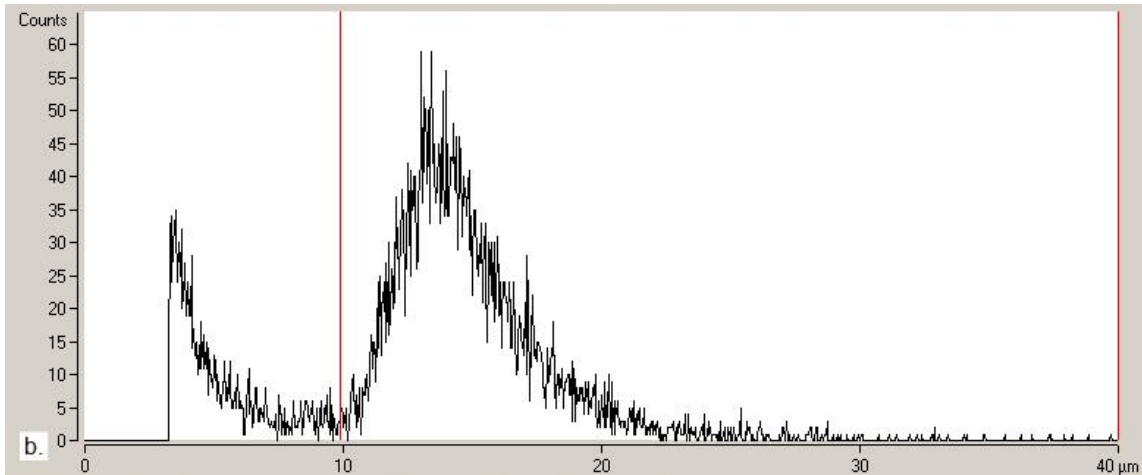


Abbildung 7 Histogramme bei Zellzahlmessung mit CASY TTC®

Der vertikale Balken markiert den Beginn des Peaks durch vitale Zellen in Abgrenzung zu avitalen Zellen und Debris links davon. a. Histogramm bei Nativ-Zellzahlmessung (4_li_25_nativ); b. Histogramm bei Zellzahlmessung höherer und damit sauberer Passagen (4_li_Gewebe_p3).

Es erfolgte eine Aussaat der Kulturen mit standardisierter Zellzahl je nach Passage: Bei Aussaat der Nativzellen in Passage 0 (p0) wurde eine um den Faktor 30 höhere Zellzahl verwendet als für die Folgepassagen (p1 für Endothelzellen, Abbildung 8a; p1-3 für Fibroblasten, Abbildung 8b). Dies geschah in der Annahme, dass bei der Nativ-Zellzahlmessung viele beschädigte oder tote Zellen ebenso detektiert werden wie vitale Zellen und Zellverbände und sich somit fälschlicherweise eine zu hohe Ausbeute ergibt. Darüber hinaus muss davon ausgegangen werden, dass sich nicht alle unbeschädigten Zellen absetzen und proliferieren.

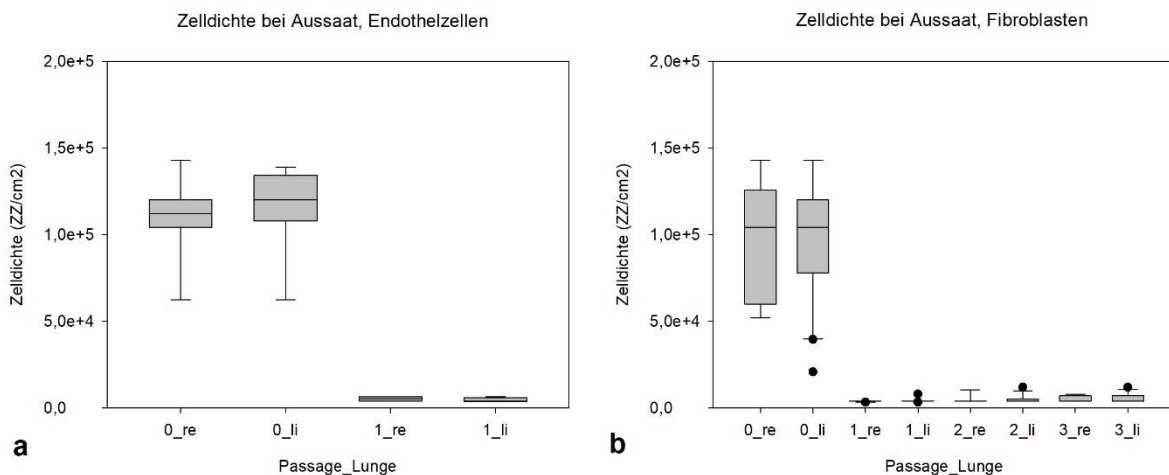


Abbildung 8 Zelldichte bei Aussaat

Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken bei 10/90-Perzentile und Ausreißer. Es handelt sich um einen Vergleich zwischen Endothelzell- und Fibroblastenkulturen, jeweils nach Lungenseite aufgetrennt. a. Zelldichte bei Aussaat der Endothelzellen in p0 und p1; b. Zelldichte bei Aussaat der Fibroblasten in p0 bis p3.

Material und Methoden

In Tabelle 18 im Anhang findet sich eine Aufstellung, über welche Fläche in cm² die Zellkulturtypen verfügen und zudem welche Mengen an Substanzen wie Medium oder Trypsin pro Zellkulturgröße benötigt werden.

2.2.2.4 Passagieren der Zellen

Die Zellen wachsen adhärent und bilden Zellrasen in Zellkulturflaschen. Medienwechsel erfolgte initial alle 2 Tage, nach Etablierung der Kultur Erweiterung auf 3 bis 4 Tage.

Zur Veranschaulichung der subjektiven Bewertung des Wachstums sind folgend Beispielbilder von Fibroblasten-Kulturen in verschiedenen Wachstumsstadien aufgeführt. Bei einer subjektiven „Konfluenz“ von über 85 % hatte sich ein relativ lückenloser Zellrasen gebildet und daher waren die Kulturen bereit zum Umplattieren und Passagieren.

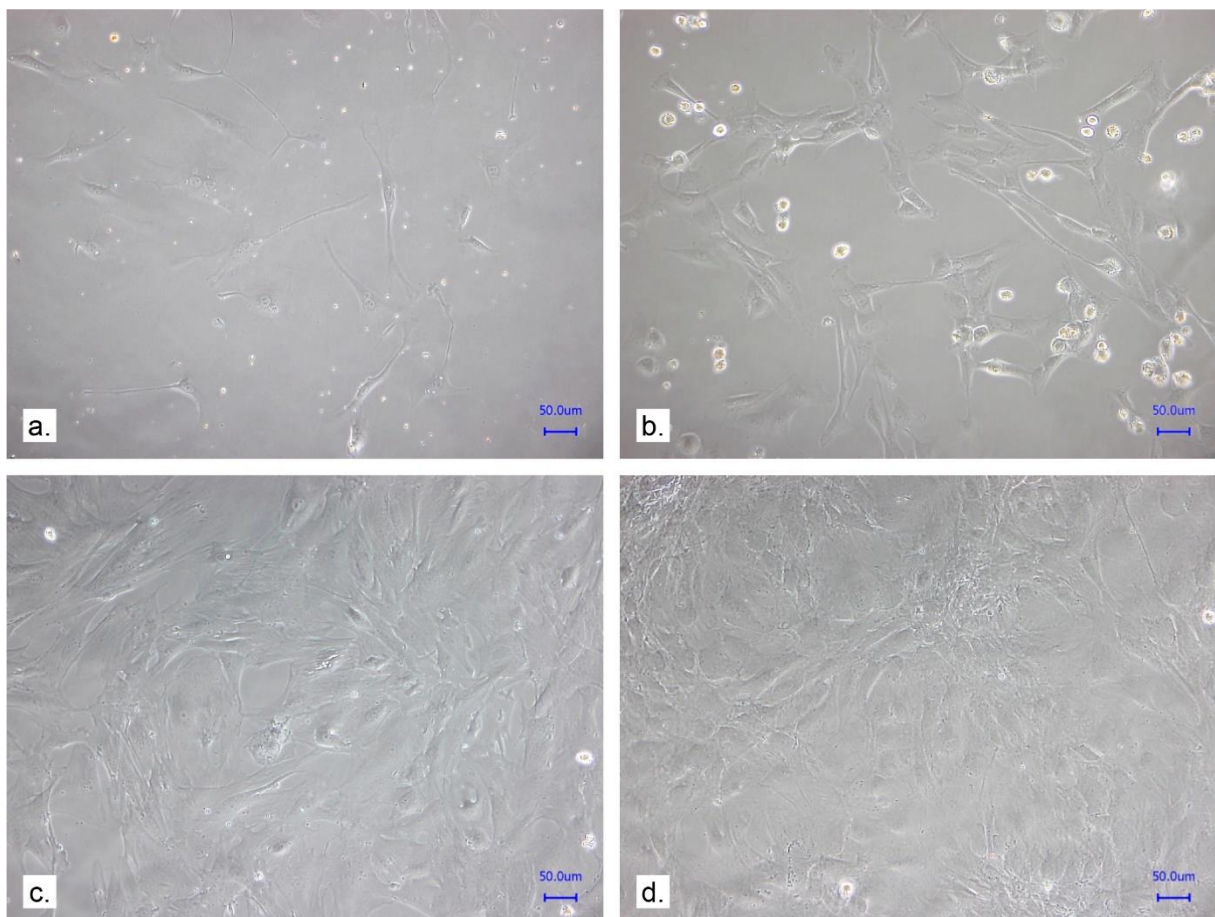


Abbildung 9 Beurteilung des prozentualen Bewuchses
Erläuterung mittels Beispielbildern aus Fibroblastenkulturen (Phasenkontrast). Bewuchs von a. circa 10 %; b. circa 30 %; c. circa 70 %; d. circa 90 %. Bilder aufgenommen mittels Keyence, 10-fache Vergrößerung.

Material und Methoden

Zum Umplattieren wurden die angewachsenen Zellen mit Hilfe von Trypsin (Einwirkzeit 1 min bei 37°C, Menge siehe Tabelle 18) von der Kulturfläche abgelöst. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte stets mit CASY. Die Zellen wurden zum einen weiter passagiert, zum anderen weggefroren, um gegebenenfalls weitere Analysen zu späteren Zeitpunkten zu ermöglichen. Ziel des Passagierens ist die Vermehrung der Zellen und das Erreichen eines gleichmäßigen Wachstumsmusters.

In p0 wurde eine Konfluenz nicht erreicht, da durch die Präparationsmethode neben einzelnen Zellen auch Zellverbänden aus dem Parenchym herausgelöst werden. Diese bilden in der Zellkultur Kolonien aus, in deren Zentrum innerhalb von wenigen Tagen zu viele Fibroblasten auf zu wenig Raum wachsen, sodass die Zellen absterben. Die Zellernte erfolgte in p0 also sobald sich subjektiv vermehrt abgekugelte, apoptotische Zellen im Überstand befanden, was nicht unbedingt einer geschätzten Flächendeckung von 85 % entsprach.

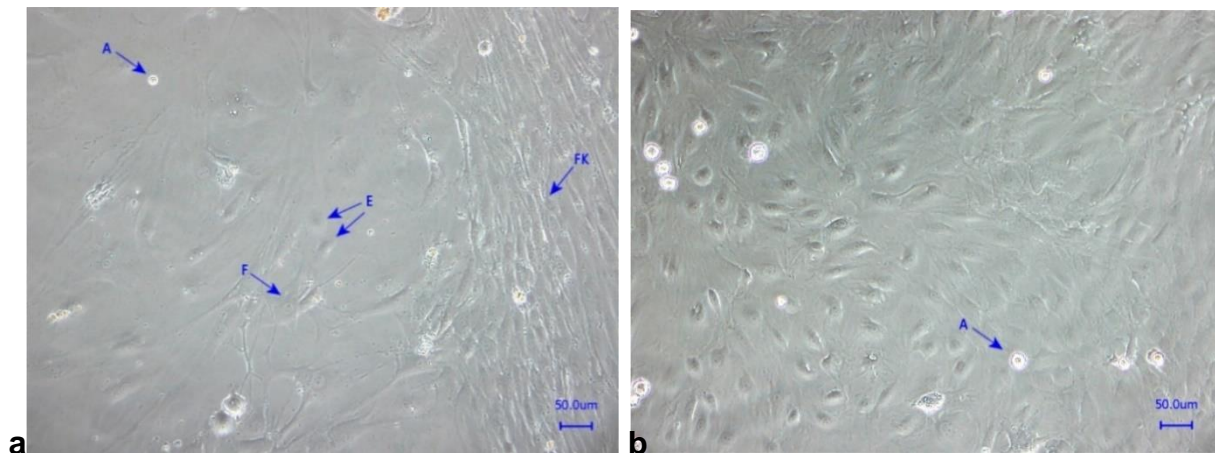


Abbildung 10 Unterschiedliches Wachstumsmuster

Es handelt sich um Zellkulturen unter Vergrößerung, die aus der linken, transplantierten Lunge der Ratte 1 stammen. Der Unterschied im Wachstumsmuster zwischen Endothelzell- und Fibroblastenkulturen wird gezeigt. a. Nativzellkultur (p0) aus 5'-Schritt der Zellpräparation (1_liA_5_p0), Mischkultur aus Endothelzellen und Fibroblasten, ungleichmäßiges Wachstum durch Koloniebildung; b. Fibroblastenkultur mit gleichmäßigem Wachstumsmuster in p1 (1_liB_25_p1). A: Apoptosefigur; E: Endothelzelle; F: Fibroblast; FK: Fibroblastenkolonie. Bilder aufgenommen mittels Keyence, 10-fache Vergrößerung.

Die 5'- als auch die 15'-Kulturen in p0 sind immer als Mischkulturen aus Fibroblasten und Endothelzellen zu klassifizieren, wobei in ersterer die Endothelzellen überwiegen und in letzterer die Fibroblasten. Eine Quantifizierung über die Morphologie war nicht möglich. Mit steigender Passage werden die stressanfälligeren Endothelzellen jedoch von den robusten, schneller und flächiger wachsenden Fibroblasten überwuchert, sodass die Reinheit der 5'-(Endothelzell-)Kultur tendenziell ab- und die der 15'-(Fibroblasten-)Kultur hingegen zunahm.

2.2.2.5 Kryokonservierung

Erst bei einer ausreichend hohen ZZ von mehreren Millionen Zellen sollte ein Einfrieren erwogen werden, da mit einem Verlust beim Wiederauftauen gerechnet werden muss.

Das Einfriermedium bestand aus 20 % DMSO, 10 % HEPES (Puffer) und 70 % Medium. Um das Lysieren der Zellen zu vermeiden und die Wirksamkeit von DMSO zu erhöhen, wurden die Zellen in Zwischenschritten von Raumtemperatur über 4°C für 30 min und -80°C für 48 Stunden schließlich in flüssigem Stickstoff weggefroren.

2.2.3 Messverfahren

Die Wirkung der drei RTK-Inhibitoren auf die Stoffwechsellistung der Zellen und Zellvitalität wurde mit zwei Messverfahren untersucht: das MTS-Verfahren und die RealTime Glo-Messung (kurz: Glo).

2.2.3.1 MTS

MTS steht für *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt* (Buttke et al. 1993). Es handelt sich um ein farbloses Tetrazolium-Salz, das in Anwesenheit von stoffwechselaktiven Zellen durch die mitochondriale Reduktase in einer Redoxreaktion zu dem gefärbten Salz Formazan umgewandelt wird. Der Nachweis des umgesetzten Salzes erfolgt über photometrische Messung bei 490 und 650 nm Wellenlänge. Es handelt sich um eine Endpunktmessung. Der Test dient der Quantifizierung des Metabolismus und damit auch indirekt der Vitalität von Zellen *in vitro* (Terry L Riss et al. 2016).

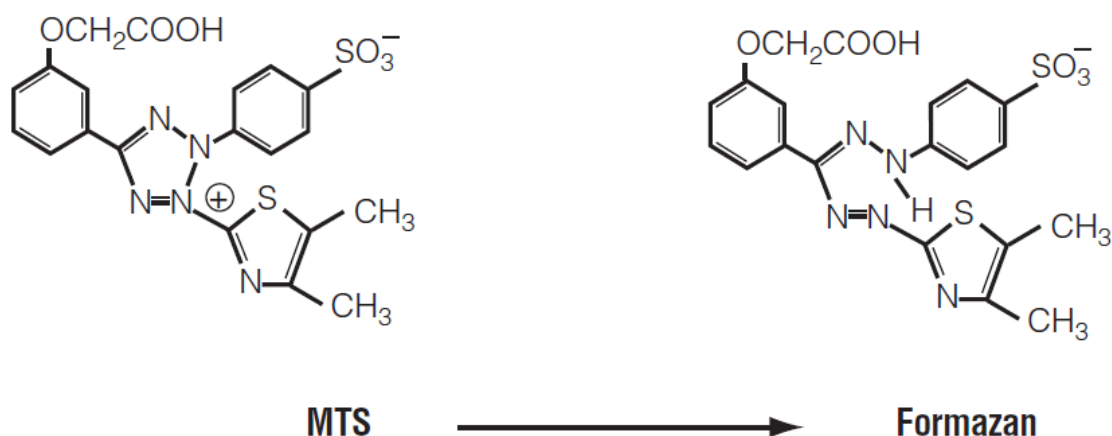


Abbildung 11 Schematischer Ablauf der MTS-Reaktion

Hierbei entsteht aus dem Tetrazolium-Salz *in vitro* durch Einwirken der mitochondrialen Reduktase ein Formazan-Salz, was photometrisch nachgewiesen werden kann (Abbildung aus Herstellerprotokoll, Technical Bulletin TB245, 12/12, Seite 2).

Material und Methoden

Es wurden Flachboden-96-well-Platten mit weißen Wänden und durchsichtigem Boden verwendet, da es sich um eine photometrische Bestimmung handelt. Zellen (Fibroblasten initial 3000, später 1000, final 500 Zellen pro well [Z/well]; Endothelzellen 750 Z/well) wurden in einem Volumen von 150 µl Kulturmedium pro well ausgesät und zum Anwachsen der Zellen für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Erfahrungen in der Arbeitsgruppe zeigten, dass die ausgesäten Fibroblasten die ersten 24 Stunden nach Aussaat benötigen, um sich abzusetzen und zu etablieren (sogenannte Lag-Time). Erst dann erfolgt eine Ausbreitung durch Erreichen der Wachstumsphase. Anschließend wurden die Kulturen serumfrei gesetzt (durch den Austausch von FKS-haltigem durch BSA-haltiges Medium) und für weitere 16 bis 20 Stunden bebrüht. Dies führt zu einem Arrest der Zellproliferation (mit dem Serumentzug werden auch die Wachstumsfaktoren im Serum entfernt) und es tritt keine Interferenz zwischen dem im Medium enthaltenen FKS mit den Medikamenten oder dem Messverfahren auf (Funk et al. 2007; Huang et al. 2004). Dazu wurde modifiziertes mDMEM verwendet, das zusätzlich zu Glutamin, Gentamycin und Amphotericin statt FKS noch 1 % BSA enthält. Es wurde pro well 120 µl des serumfreien Mediums eingesetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den unterschiedlichen Konzentrationen der RTKIs für weitere 72 Stunden im Brutschrank (in Dreifachbestimmung). Nach Beendigung des Experiments erfolgte eine Endpunktmessung.

Zusätzlich wurden folgende Kontrollen mitgeführt:

- Blank: „Hintergrundrauschen“, nur Medium und alle weiteren zugegebenen Substanzen (z.B. Glo-Substrat, Puffer), aber keine Zellen
- DMSO-Kontrolle (0,1 % DMSO): enthält Zellen, Medium, DMSO, aber keine Medikamente
- Medium-Kontrolle: enthält Zellen und Medium, aber kein DMSO und keine Medikamente

Die Medium-Kontrolle wurde bei den ersten drei Versuchen mit eingesetzt, da es sich bei DMSO um ein Zellgift handelt, dessen Einfluss auf das Outcome des Versuches abgeschätzt werden sollte. DMSO ist trotz seiner toxischen Wirkung bei den Versuchen aber als Lösungsmittel essenziell, vor allem für die schwer löslichen RTKIs. Da sich bei diesen Versuchen kein Unterschied zwischen der Medium-Kontrolle und der DMSO-Kontrolle zeigte, wurden folgend nur noch je 3 wells mit DMSO-Kontrolle inkubiert und auf die Medium-Kontrolle verzichtet.

Der Ablauf der Endpunktmessung erfolgte laut Herstellerangaben (Promega Corporation):

1. MTS ansetzen: Entsprechende Menge MTS in modifiziertem mDMEM lösen (mDMEM mit Glutamin, Gentamycin, Amphotericin, aber ohne FKS), sodass 120 µl/well auf den 96-well Platten erreicht werden
2. Medikamenten-haltiges Medium entleeren
3. Platten mit PBS vorsichtig waschen: 250 µl/well
4. MTS-Verdünnung aufpipettieren: 120 µl/well
5. Inkubieren: 1 Stunde bei 37°C und 9 % CO₂
6. Absorptionsmessung bei 490 nm und 650 nm Wellenlänge

Die Messung der Absorption bei MTS erfolgte mit Varioskan. Durch einen technischen Defekt wurde vorübergehend auf SOFTmax umgestellt (zur Vergleichbarkeit der Messwerte siehe 4.1.2).

2.2.3.2 RealTime Glo

Bei dem Glo-Assay von Promega handelt es sich um eine nicht-lytische und auf Biolumineszenz basierende Messmethode, die laut Herstellerangaben (Promega Corporation) in Echtzeit eine Veränderung der Zellvitalität wiedergeben kann. Der Test beruht darauf, dass er die Zahl der lebenden Zellen in einer Probe durch Messung ihres Reduktionspotenzials, also ihres Metabolismus und damit ihrer Vitalität bestimmt. Das Assay kann sowohl als Endpunktmessung als auch als kontinuierliche Messmethode während des gesamten Versuchs in Echtzeit genutzt werden, da es sich um einen nicht-lytischen Test handelt und das Enzym und das Prosubstrat laut Herstellerangaben im Zellkulturmedium bei 37°C über mindestens 72 Stunden stabil sind (Terry L Riss et al. 2016).

Um eine Messung zu ermöglichen, werden wie in Abbildung 12 beschrieben eine Luciferase (NanoLuc[®]) und ein zellpermeables Prosubstrat (*MT Cell Viability Substrate*) zu einer Zellkultur gegeben. Lebende Zellen stellen aus dem Prosubstrat ein Substrat her, das aus der Zelle in das umliegende Zellmedium diffundiert und dort von der Luciferase verwendet wird, um ein Lumineszenz-Signal zu generieren.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Endpunktmessung gewählt und nach Herstellerangaben durchgeführt.

Material und Methoden

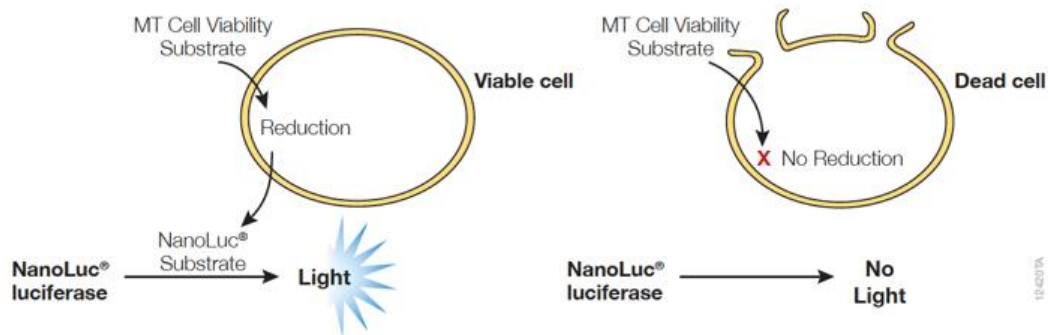


Abbildung 12 Schematischer Ablauf des RealTime Glo-Assays

Unterschied zwischen lebender (links) und toter (rechts) Zelle. Die vitale Zelle setzt das Prosubstrat (MT Cell Viability Substrate) durch Reduktion in das Substrat der NanoLuc®-Luciferase um, sodass ein Lumineszenz-Signal generiert werden kann. Die tote Zelle reduziert das Prosubstrat nicht, es entsteht kein Lichtsignal (Bild aus Herstellerprotokoll, Technical Manual TM431, 9/14, Seite 2).

Auf 96-well-Flachbodenplatten mit weißen Wänden wurden auf 150 µl Kulturmedium anfangs 3000, später 1000, am Ende 500 Z/well ausgesät, da die Fibroblasten zu schnell konfluierend gewachsen sind und daher zu früh im Reaktionsverlauf eine statische Wachstumsphase erreichten. Durch Reduktion der Zellzahl auf 500 Z/well erfolgte eine „Entzerrung“ des Reaktionsablaufs. Zudem konnte so Zellmaterial eingespart werden, da es sich bei Glo um eine sehr sensitive Messmethode handelt und weniger eingesetzte Zellen notwendig sind, um ein gutes Lumineszenzsignal zu erhalten. Bei den langsam wachsenden Endothelzellkulturen wurden immerzu 750 Z/well ausgesät. Im Gegensatz zu MTS erfolgte keine 3-fach, sondern lediglich eine 2-fach-Bestimmung.

Im Brutschrank wurden die Platten analog zu den MTS-Flachbodenplatten für 48 Stunden inkubiert, danach zum Arrest der Zellproliferation mit 120 µl/well BSA-haltigem Medium serumfrei gesetzt und weitere 16 bis 20 Stunden bebrütet. Nachfolgend wurden die Platten mit je 100 µl der Verdünnungen der RTKIs und der Kontrollen (Blank und DMSO-Kontrolle) bestückt. In jedes befüllte well auf den Versuchsplatten wurde zusätzlich noch 10 µl/well der Glo-Mischung (1:1 = NanoLuc-Luciferase : MT Cell Viability Substrate) gegeben. Nach einer Inkubation von 72 Stunden im Brutschrank erfolgte die Endpunktmessung.

Die Lumineszenz-Messung nach 72 Stunden erfolgte vorwiegend mithilfe des Varioscans und musste aufgrund technischer Probleme zwischenzeitlich durch einen Tecan erfolgen (zur Vergleichbarkeit der Messgeräte siehe 5.1).

2.2.4 Übersicht der Zellpräparationen

Insgesamt wurden 5 Endothelzell- und 38 Fibroblastenkulturen aus 4 verschiedenen Tieren (aus linker und rechter Lunge) präpariert und gingen in Versuch. Dieses Missverhältnis resultierte daraus, dass die Endothelzellpräparationen häufig, wie oben bereits beschrieben, in Mischkulturen endeten. Bei einer Weiterkultivierung hätten dann die Verunreinigungen (v.a. Fibroblasten) die Oberhand gewonnen und die Endothelzellen überwachsen (Erfahrungen aus früheren Endothelzellpräparationen). Zudem lag der Fokus auf der Untersuchung von Fibroblasten, also den Zellen, die für die Fibrosierung der Lunge verantwortlich gemacht werden. In den folgenden Tabellen sind die Kulturen aufgelistet, bei denen die Pharmakokinetik der Medikamente (RTKIs) untersucht wurde. Eine Komplettauflistung findet sich als Tabelle 19 im Anhang wieder.

Bei der Präparation der Ratte 1 kam es zu einer möglichen Verunreinigung eines Teils der linken, transplantierten Lunge. Zur Vermeidung eines kompletten Verlustes der linken Lunge wurde sie vorsichtshalber in einen Teil A (möglicherweise verunreinigt) und einen Teil B (weiterhin steril) geteilt. Anschließend wurde weiter nach Protokoll verfahren.

Nr.	Ratte	Name	p	Seite	ZZ [1/well]	Medikamente
14	2	2_M199_li_5	2	links	750	Dasa
20	3	3_M199_re_5	1	rechts	750	Dasa
23	3	3_M199_li_5	1	links	750	Dasa
30	4	4_M199_re_5	1	rechts	750	Dasa
37	4	4_M199_li_5	1	links	750	Dasa

Tabelle 6 Zusammenfassung der Endothelzellkulturen

Endothelzellkulturen, die in Versuch gegangen sind, geordnet nach Versuchsnummer und Ratte, aus der die Zellen stammen. Nr.: Versuchsnummer; p: Passage; ZZ [1/well]: ausgesäte Zellzahl pro well.

Nr.	Ratte	Name	p	Seite	ZZ [1/well]	Medikamente
1	1	1_DMED_re_15	4	rechts	3000	Dasa/Nilo/Ima
2	1	1_DMED_re_25	4	rechts	3000	Dasa/Nilo/Ima
3	1	1_DMED_liB_25	4	links	3000	Dasa/Nilo/Ima
4	1	1_DMED_liA_25	4	links	1000	Dasa/Nilo/Ima
5	1	1_DMED_liB_15	2	links	1000	Dasa
6	1	1_DMED_liA_15	3	links	1000	Dasa
7	1	1_DMED_liA_G	2	links	500	Dasa
8	1	1_DMED_liA_15	4	links	1500	Dasa
9	1	1_DMED_liA_G	4	links	500	Dasa/Nilo/Ima
10	2	2_DMED_re_25	2	rechts	500	Dasa
11	2	2_DMED_re_25	4	rechts	500	Dasa/Nilo/Ima
12	2	2_DMED_re_G	1	rechts	500	Dasa
13	2	2_DMED_re_G	4	rechts	500	Dasa/Nilo/Ima
15	2	2_DMED_li_25	1	links	1000	Dasa
16	2	2_DMED_li_25	2	links	500	Dasa
17	2	2_DMED_li_25	4	links	500	Dasa/Nilo/Ima
18	2	2_DMED_li_G	1	links	500	Dasa

Material und Methoden

19	2	2_DMEM_li_G	4	links	500	Dasa/Nilo/Ima
21	3	3_DMEM_re_25	2	rechts	500	Dasa
22	3	3_DMEM_re_25	4	rechts	500	Dasa/Nilo/Ima
24	3	3_DMEM_li_15	1	links	1000	Dasa
25	3	3_DMEM_li_25	1	links	1000	Dasa
26	3	3_DMEM_li_25	2	links	500	Dasa
27	3	3_DMEM_li_25	4	links	500	Dasa/Nilo/Ima
28	3	3_DMEM_li_G	1	links	500	Dasa
29	3	3_DMEM_li_G	4	links	500	Dasa/Nilo/Ima
31	4	4_DMEM_re_15	1	rechts	500	Dasa
32	4	4_DMEM_re_25	1	rechts	500	Dasa
33	4	4_DMEM_re_35	1	rechts	500	Dasa
34	4	4_DMEM_re_25	4	rechts	500	Dasa/Nilo/Ima
35	4	4_DMEM_re_G	1	rechts	500	Dasa
36	4	4_DMEM_re_G	4	rechts	500	Dasa/Nilo/Ima
38	4	4_DMEM_li_15	1	links	500	Dasa
39	4	4_DMEM_li_25	1	links	500	Dasa
40	4	4_DMEM_li_35	1	links	500	Dasa
41	4	4_DMEM_li_25	4	links	500	Dasa/Nilo/Ima
42	4	4_DMEM_li_G	1	links	500	Dasa
43	4	4_DMEM_li_G	4	links	500	Dasa/Nilo/Ima

Tabelle 7 Zusammenfassung der Fibroblastenkulturen

Alle Fibroblastenkulturen, die in Versuch gegangen sind, geordnet nach Versuchsnummer und Ratte, aus der die Zellen stammen. Nr.: Versuchsnummer; p: Passage; ZZ [1/well]: ausgesäte Zellzahl pro well; Dasa: nur mit Dasa behandelt; Dasa/Nilo/Ima: mit allen 3 RTKIs behandelt.

Während die wenigen Endothelzellkulturen in Passage 1 und 2 in Versuch gesetzt wurden, stieg die Passagenzahl bei den Fibroblasten bis auf Passage 4. Aus den Lungen der 4 Tiere entstanden insgesamt 21 Präparationen, die z. T. in unterschiedlichen Passagen in Versuch gingen (z. B. 2_DMEM_li_25, Passage 1, 2 und 4). 16 der 21 Präparationen (76 %) wurden in Passage 4 untersucht. Die isolierte Betrachtung der Fibroblastenkulturen (siehe Tabelle 7) berücksichtigt diese Einteilung nicht. Es wird von 38 Fibroblastenkulturen ausgegangen.

Tabelle 8 zeigt, dass 74 % der Kulturen mit 500 Z/well ausgesät wurden. Pro Tier wurden ungefähr gleich viele Kulturen getestet (24/24/21/31 %). Aus den transplantierten Allografts gingen jedoch mehr Fibroblastenkulturen in Versuch (63 %) als aus den nativen rechten Lungen (37 %). Final wurden 28 späte (p3 und p4) und 20 frühe (p1 und p2) Passagen untersucht. Der Anteil an rechten Fibroblastenkulturen lag bei 25 % beziehungsweise. 35 %.

Bei allen 38 Kulturen wurde die Wirkung von Dasa untersucht, während bei 16 Kulturen alle drei Substanzen getestet wurden. Die meisten Untersuchungen (n=28; 74 %) wurden mit 500 Z/well durchgeführt, wovon alle mit Dasa und 12 (43 %) mit allen Medikamenten behandelt wurden. Letzteres erlaubte einen paarweisen statistischen Vergleich (siehe später).

Material und Methoden

					Summe	
ZZ/well	3000	1500	1000	500		
n	3	1	6	28	38	
Tiernummer	1	2	3	4	4	
n	9	9	8	12	38	
links/Tier	7	5	6	6	24	
rechts/Tier	2	4	2	6	14	
Passagen/Tier	1	2	3	4		
p4, li/re	4 / 2	2 / 2	2 / 1	2 / 2	10 / 7	spät
p3, li/re	1 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	1 / 0	spät
spät, li/re	5 / 2	2 / 2	2 / 1	2 / 2	11 / 7	
p2, li/re	2 / 0	1 / 1	1 / 1	0 / 0	4 / 2	früh
p1, li/re	0 / 0	2 / 1	3 / 0	4 / 4	9 / 5	früh
früh, li/re	2 / 0	3 / 2	4 / 1	4 / 4	13 / 7	

Tabelle 8 Details zu den 38 Fibroblastenkulturen

Aufteilung nach ausgesäten Zellzahlen (ZZ/well), Tiernummer, Herkunft (li: links / re: rechts), Passagen/Tier, frühe Passagen (p1 und p2), späte Passagen (p3 und p4).

2.2.5 Software und Statistik

Alle Graphen (Boxplots, Balkendiagramme, Kurvenscharen, Übergangskurven) in dieser Arbeit wurden mit Sigmaplot 13.0 erstellt, insofern nicht anders angegeben. Die Flussdiagramme zu den Präparationen (Abbildung 5, sowie Abbildung 47 bis Abbildung 54) entstanden durch Einsatz der XMind 7-Software.

Name	Hersteller	Ort
Sigmaplot 13.0	Systat Software GmbH	Erkrath (D)
XMind 7	XMind Ltd.	Hongkong (C)

Tabelle 9 Auflistung der verwendeten Software

Mithilfe von Sigmaplot wurden aus den einzelnen Messungen Übergangskurven erstellt. Durch die Annäherung an die Formel $f1 = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC50)^{(-Hillslope)})$ wurden für jede Messung je drei Parameter ermittelt: Minimalwert und Maximalwert der pharmakokinetischen Aktivität eines Stoffes und EC50-Wert. EC50 steht für „Median Effective Concentration“ und bezeichnet die Konzentration eines Wirkstoffs, bei der die Hälfte der maximalen pharmakologischen Aktivität erreicht wird. Der Wert kann also genutzt werden, um die Potenz eines Wirkstoffes zu quantifizieren.

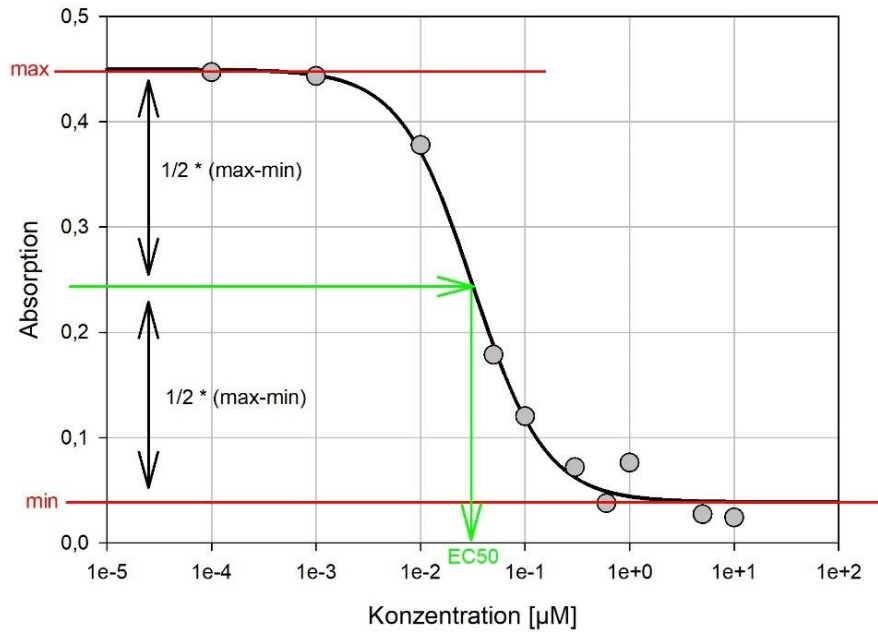


Abbildung 13 Schematische Übergangskurve

Hier am Beispiel der MTS-Messung von Kultur 43, Messwert 1 von 3, Dasa. Es wurde die gemessene Absorption gegen die Dasa-Konzentration aufgetragen. Angegeben sind nebst Messwerten auch die angenäherte Kurve mit Erklärungen zum Erlangen von Minimal-, Maximal- und EC50-Wert.

In dieser Arbeit wurden aus den Zwei- beziehungsweise Dreifachbestimmungen Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet und als „Mittelwert \pm Standardabweichung“ angeführt. Bei allen weiteren Analysen wurden stets die Mediane mit Perzentilen in folgendem Stil angegeben: „Median [25-Prozent-Perzentile/75-Prozent-Perzentile]“. Statistische Analysen wurden mit Sigmaplot durchgeführt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Es fanden der t-Test, der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test (auch Rank-Sum-Test) und die ein- beziehungsweise zweifaktorielle Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) mit Holm-Sidak-Methode Anwendung.

3 Ergebnisse der Fibroblasten-Präparation

3.1 Nativzellzahlen

Als Nativzellen wurden die Zellen gewertet, die durch die Behandlung mit Kollagenase aus dem Parenchym gelöst wurden. Fasst man alle detektierten Zellen einer Präparation zusammen, so lag die Zellausbeute der linken Lungen stets höher als die der rechten Lungen. Eine Ausnahme hiervon bildeten die Kulturen der Ratte 1 (links circa 2,3 Mio. Zellen, rechts etwa Faktor 3 mehr). Aus dem Tier 2 wurden rechts circa 7,0 Mio. und links etwa 12,5 Mio. Zellen isoliert. Bei der Ratte 3 ließen sich rechts circa 5,0 Mio. Zellen herauslösen, links hingegen etwa 5-mal mehr. Die rechte Lunge von Tier 4 brachte circa 11,0 Mio. Zellen hervor, die linke circa doppelt so viele.

Bei Betrachtung der Einzelpräparationen (Abbildung 14) wird deutlich, dass der 5'-Kollagenase-Schritt bei allen Tieren außer 1 die mit Abstand höchste Zellzahlausbeute lieferte. Bei der Präparation der Ratte 1 wurde bei dem Allograft (links) in etwa eine genauso hohe Ausbeute erreicht wie bei den 15'- beziehungsweise 25'-Schritten, bei der rechten Lunge sogar erheblich weniger als bei den beiden anderen Kollagenase-Zeiten.

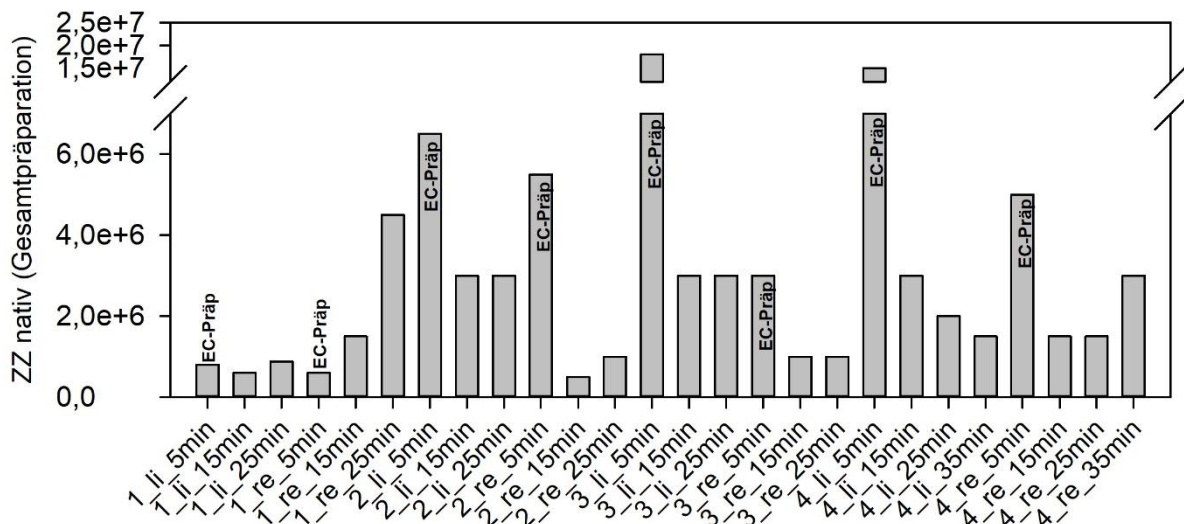


Abbildung 14 Nativzellzahlen aus der Zellpräparation

Dargestellt ist ein Balkendiagramm mit der Zellausbeute nach Tier, Lunge und Inkubationsschritt. 1_re: 2,2 Mio. Zellen; 1_li: 0,76 Mio. Zellen; 2_re: 2,3 Mio. Zellen; 2_li: 4,2 Mio. Zellen; 3_re: 1,7 Mio. Zellen; 3_li: 8,0 Mio. Zellen; 4_re: 2,8 Mio. Zellen; 4_li: 5,4 Mio. Zellen. ZZ: Zellzahl, EC-Präp: Endothelzellpräparation; li: links; re: rechts.

3.2 Zellproliferation

Zur Beurteilung des Wachstums wurde der Quotient aus der ZZ bei Ernte und der ZZ bei Aussaat gebildet. Diese als Wachstumsfaktor (WF) bezeichnete Variable zeigt an, ob eine Proliferation der Zellen erfolgt ist ($WF > 1$), ob ein theoretischer Erhalt der vitalen Zellen passiert ($WF = 1$) oder ob es sogar zu einer Abnahme der ZZ über die Inkubationsdauer hinweg kommt ($WF < 1$). So kann ein Rückschluss auf das Ausmaß des Wachstums der Zellen gezogen werden.

Der WF bei den Endothelzellen ist für linke und rechte Lungen in p0 in etwa gleich groß (Daten nicht dargestellt) und beträgt im Median 0,33 [0,18/1,10]. Die Zellzahl nimmt also über die Dauer der Inkubation hinweg ab. In der darauffolgenden Passage p1 beträgt der WF für die Endothelzellen aus dem Allograft ebenso wie für die aus der nativen rechten Lunge im Median 4,13 [1,58/10,67]. Dies spiegelt, laut Definition, eine Zellproliferation wider.

Bei den Fibroblasten kann derselbe Effekt beobachtet werden: In keiner Passage unterscheidet sich der WF der Zellen aus dem Allograft von dem der Fibroblasten aus der nativen Lunge (Abbildung 15b). Allerdings weicht der WF in p0 (0,48 [0,31/0,76]) deutlich von denen aus der Passage p1 bis p3 (7,00 [4,50/9,50]) ab.

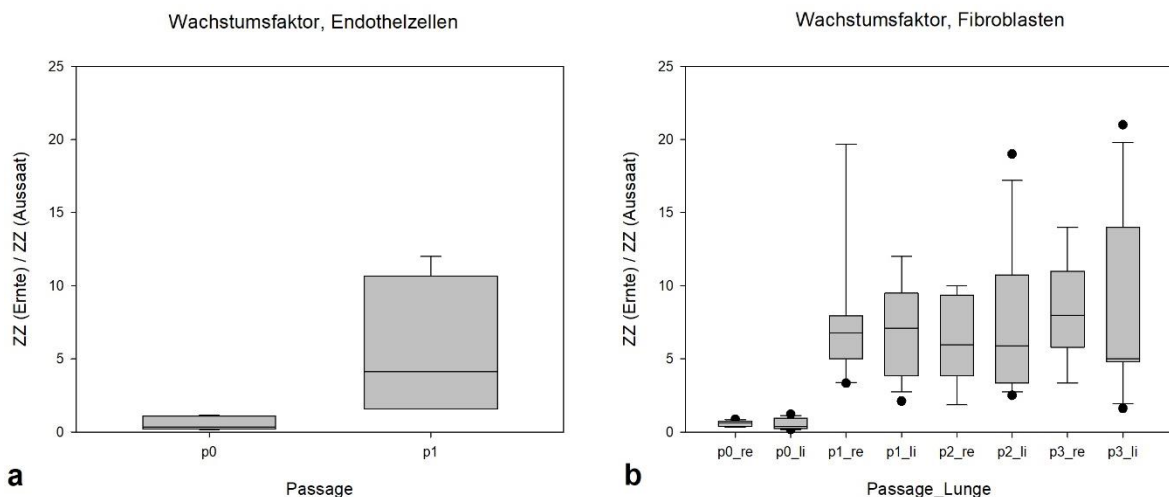


Abbildung 15 Wachstumsfaktorunterschied zwischen p0 und p1-p3
 Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Der WF ist der Quotient aus Zellzahl bei Ernte und bei Aussaat. a. WF für Endothelzellen in p0 und p1; b. WF für Fibroblasten in p0 bis p3, jeweils nach links und rechts aufgeteilt. ZZ: Zellzahl; p: Passage; li: links; re: rechts.

3.3 Wachstumsdauer

Zur zeitlichen Beurteilung des Wachstums wird die Wachstumsdauer (WD) herangezogen, welche die Zeit zwischen Zellaussaat und Zellernte in Tagen (d)

Ergebnisse der Fibroblasten-Präparation

bezeichnet. Es zeigt sich ebenso wie bei dem WF kein Unterschied zwischen den Zellen aus der linken Lunge im Vergleich zu denen aus der rechten (gezeigt für Fibroblasten in Abbildung 16b). Hingegen zeigt sich aber sehr wohl eine Differenz zwischen der Wachstumsdauer der Endothelzellen in der Passage p0 (21d [11d/29d]) und in der Passage p1 (7d [3d/10d]). Eine solche Differenz ist auch bei den Fibroblasten zu beobachten: Die Zellen verbleiben deutlich länger in p0 (10d [10d/11d]) als in p1 bis p3 (6d [5d/8d]).

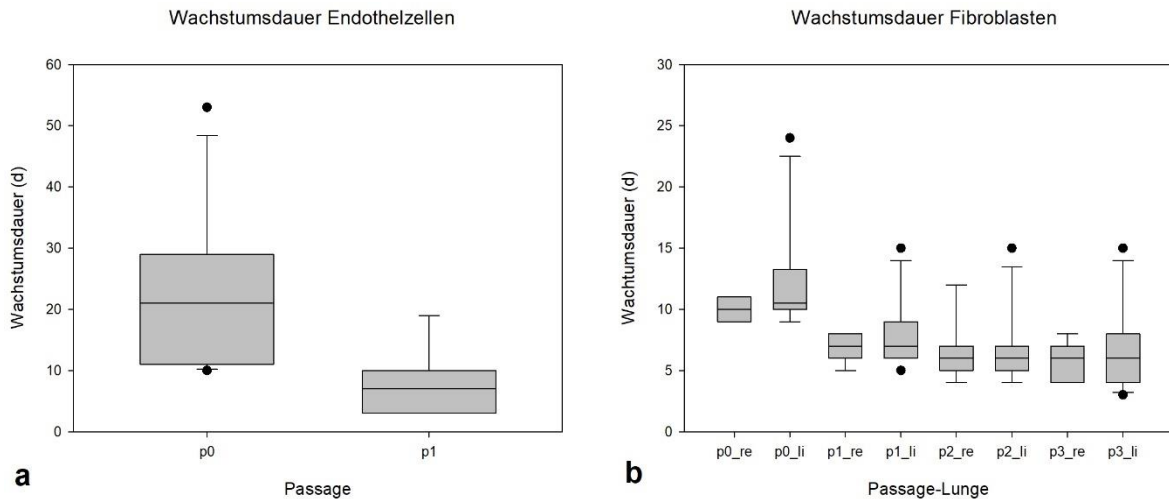


Abbildung 16 Wachstumsdauer der Zellkulturen
Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentile, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentile und Ausreißer. a. Wachstumsdauer der Endothelzellen in p0 und p1; b. Wachstumsdauer der Fibroblasten in p0 bis p3, nach links und rechts aufgeteilt.

3.4 Konzentration auf Fibroblasten

In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Betrachtung der Fibroblasten, da diese als Treiber der Fibrosierung und damit der Abstoßungsreaktion in den Lungenpräparaten angenommen werden. Die pharmakokinetischen Betrachtungen der RTKIs erfolgte in der vorliegenden Arbeit daher auch nur an den Fibroblasten, nicht an den Endothelzellen. Diese wurden der Vollständigkeit halber erwähnt. Die im Folgenden genannten Experimente sind dennoch auch an den Endothelzellen durchgeführt worden, die Ergebnisse hiervon sollen allerdings nicht näher betrachtet werden.

4 Ergebnisse aus MTS

4.1 Änderungen der Versuchsbedingungen

Wie bereits unter 2.2.4 angesprochen, lag eine Überrepräsentation bestimmter Zellgruppen vor, die zum Teil unter unterschiedlichen Bedingungen in die Experimente einfließen:

- So wurden 21 Fibroblastenpräparationen (15', 25', 35', Gewebe-Kulturen, je rechts und links) hergestellt, woraus 38 Kulturen in unterschiedlichen Passagen in Versuch gingen.
- Die Anzahl der Kulturen aus linken Lungen dominierte.
- Es gab eine zahlenmäßige Dominanz der Kulturen in Passage 4.
- Weiterhin wurden unterschiedliche Zellzahlen pro well ausgesät, um das Wachstum beziehungsweise die Stoffwechsellistung zellzahlabhängig zu untersuchen. Schließlich gingen 28 der 38 Kulturen mit 500 Z/well in Versuch.
- Zudem änderte sich der Konzentrationsbereich der untersuchten Medikamente. Zuerst wurde Dasa zwischen 0,001 und 1 μM , Nilo zwischen 0,01 und 20 μM und Ima zwischen 0,01 und 20 μM eingesetzt (Versuch 1-3). Die hemmende Wirkung bei den höchsten Konzentrationen blieb aus (siehe unten), sodass höhere Konzentrationen eingesetzt werden mussten: Dasa (0,001-10 μM), Nilo (0,01-50 μM), Ima (0,01-100 μM).
- Es kamen zwei unterschiedliche Messgeräte zum Einsatz.

4.1.1 Auswirkung der Zellzahl auf gemessene Absorptionswerte

Es wurden zwischen 3000 und 500 Z/well ausgesät. Bei hoher Zellzahl wurde die Konfluenz schneller erreicht, sodass die Zellen eher in der statischen Wachstumsphase vorlagen, wenn sie mit den Medikamenten behandelt wurden. Bei den niedrigeren Zellzahlen wurde die Konfluenz nicht erreicht. Das Problem war, dass für die MTS-Reaktion eine genügend hohe Zellzahl vorhanden sein muss, da ansonsten die Absorption zu klein war, um eine Proliferationshemmung durch die Medikamente sichtbar machen zu können.

Die Kontrollen (sog. DMSO-Kontrolle, ohne Medikament) wurden auf jeder MTS-Platte mitgeführt. Stellt man die Mittelwerte der MTS-Werte der Kontrollen für Dasa, Nilo und Ima gegenüber, so erhält man annähernd eine lineare Abhängigkeit mit einer Steigung

Ergebnisse aus MTS

von 1 (Abbildung 17). Das heißt mehrere Kontrollwerte aus einem Versuch stimmen überein. Die Kontrollen pro Versuch wurden dann gemittelt.

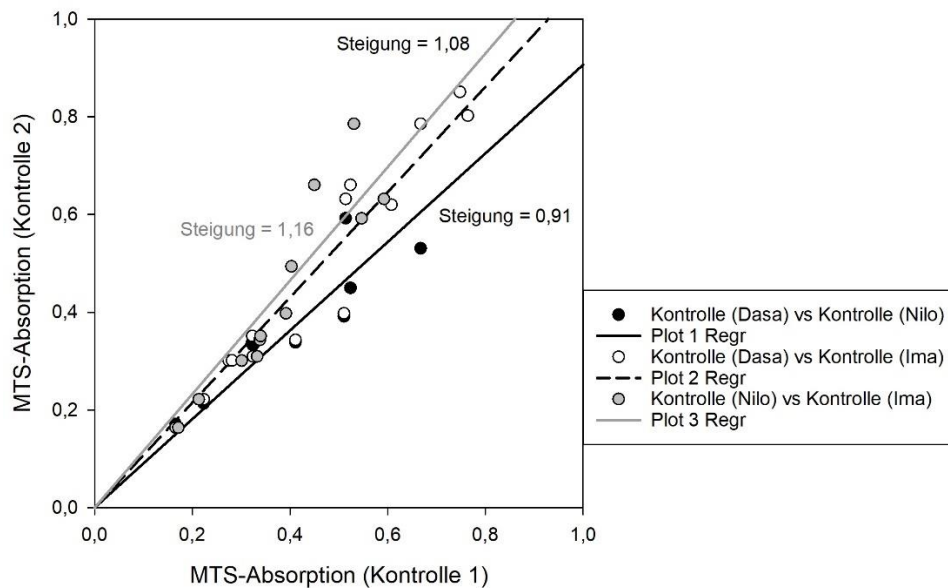


Abbildung 17 MTS-Absorptionen der Kontrollen pro Kultur sind vergleichbar. Die Kontrollen aus den einzelnen Kulturen wurden gegenübergestellt. Es konnte jeweils ein Graph mit einer Steigung nahe 1 durch die einzelnen Punkte gelegt werden, was zeigt, dass es möglich war, die Werte pro Kultur zu mitteln.

Der Einfluss der ausgesäten Zellzahl auf die MTS-Absorption kann mit den gemittelten DMSO-Kontrollen dargestellt werden.

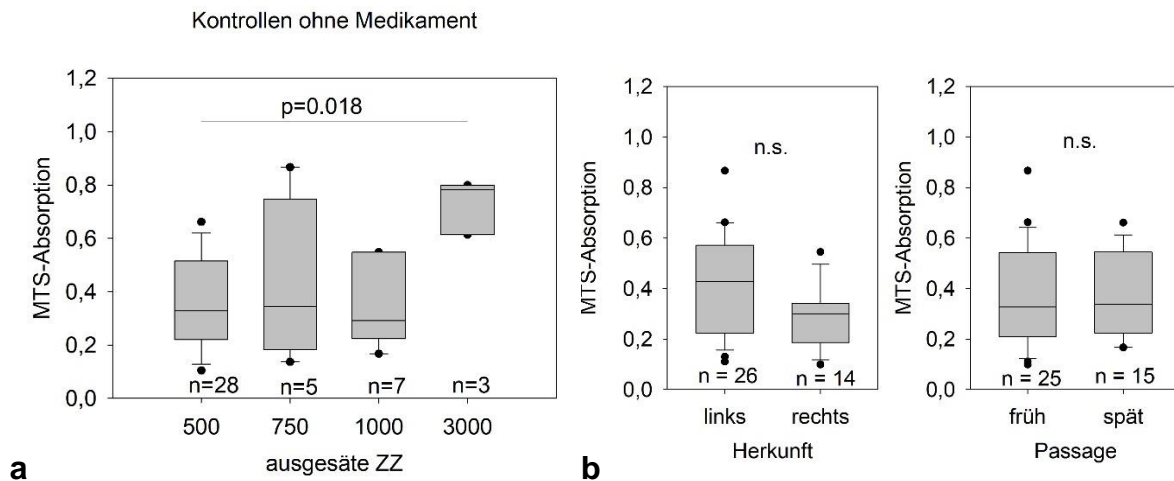


Abbildung 18 Zellzahlabhängigkeit der MTS-Absorption. Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentile, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentile und Ausreißer. Es sind die Absorptionen der Kontrollen aufgetragen. a. Absorption aufgetragen nach der ausgesäten Zellzahl; b. Absorption der Kulturen, die mit 500, 750 oder 1000 Z/well ausgesät wurden, aufgetragen nach Herkunft (links oder rechts) und Passage (früh oder spät).

Bei den 28 Kulturen mit 500 Z/well lag der Median der Absorption der Kontrollen bei 0,33 [0,22/0,51]. Ähnlich dazu waren die 5 Kulturen mit 750 Z/well mit 0,35 [0,18/0,75]

Ergebnisse aus MTS

und die 7 Kulturen mit 1000 Z/well mit 0,29 [0,22/0,55]. Bei den 3 Kulturen mit 3000 Z/well zeigte sich ein signifikant höherer Median von 0,78. Die Streuung der Absorptionswerte war hoch, allerdings lagen die Werte für 3000 Z/well signifikant höher als für die anderen Zellzahlen. Aufgrund des statistischen Unterschiedes in der Absorption bei unterschiedlichen Zellzahlen, wurden die 3 Kulturen mit 3000 Z/well ausgenommen für die Analysen bei Abbildung 18b. Bei der Betrachtung der linken Lungen zeigte sich ohne die 3000 Z/well-Kulturen ein Median von 0,43 [0,22/0,57], dagegen rechts von 0,30 [0,19/0,34]. Aufgetrennt nach Passage zeigten die Nicht-3000 Z/well-Kulturen in den frühen Passagen einen Median von 0,33 [0,22/0,54], was fast identisch zu dem der späten mit 0,34 [0,22/0,54] war. Es konnte somit kein Unterschied zwischen linken und rechten Kulturen beziehungsweise frühen und späten Passagen ermittelt werden. Das Wachstum beziehungsweise die Stoffwechselleistung der Zellen im Versuchszeitraum ist also unabhängig von der Herkunft der Zellen (linke oder rechte Lunge) und von der Passage (früh oder spät).

4.1.2 MTS-Messungen auf zwei Geräten

Aufgrund eines technischen Defektes (Varioskan) mussten einzelne Versuche mit einem zweiten Messgerät (SOFTmax) vermessen werden. Um die Übereinstimmung beider Messverfahren zu überprüfen, wurde die MTS-Absorption bei einzelnen Kulturen (V 1, 2, 3, 4, 5, 6, 15, 24, 25) mit beiden Geräten bestimmt.

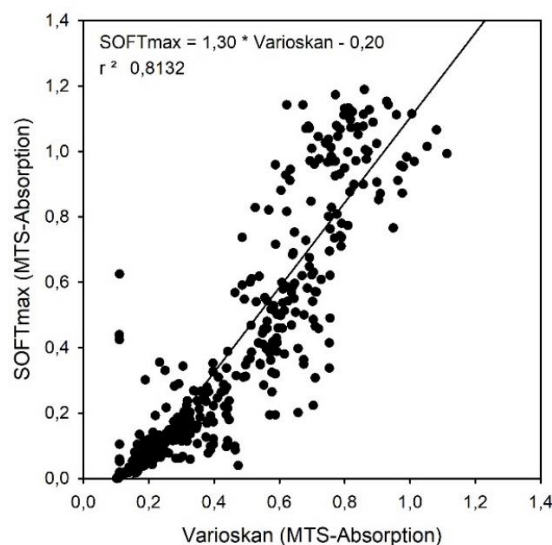


Abbildung 19 Lineare Abhängigkeit der Absorptionswerte
Gegenüberstellung der Absorptionswerte gemessen durch zwei verschiedene Geräte. Es ergibt sich die lineare Formel $\text{SOFTmax} = 1,3 * \text{Varioskan} - 0,2$ mit einem Regressionsfaktor r^2 von circa 0,8.

$$\text{Varioskan} = 0,77 * \text{SOFTmax} + 0,15$$

Ergebnisse aus MTS

Gemessener SOFTmax-Wert	Errechneter Varioskan-Wert	Abweichung zu Messwert
0,20	0,31	55 %
0,50	0,54	8 %
0,80	0,77	- 4 %
1,20	1,08	- 10 %

Tabelle 10 Lineare Abhängigkeit der Absorptionswerte

Bei Messung derselben Kultur mit unterschiedlichen Messgeräten hängen die Absorptionswerte linear voneinander ab. Anhand der oben bestimmten Gleichung wird mittels Beispielwerten gezeigt, dass eine gute Vergleichbarkeit der mit den beiden Geräten gemessenen Werte vorliegt, vor allem bei höheren Absorptionen. Bei kleinen Absorptionen weichen die SOFTmax-Werte stärker von den errechneten Werten ab.

Es konnten beide Messverfahren verwendet werden, da immer die komplette Kultur mit einem Verfahren gemessen und die Pharmakokinetik stets auf die mitgeführte Kontrolle derselben Kultur bezogen wurde. Problematisch waren allerdings kleine Absorptionswerte. Bei niedrigen Absorptionen nahm die Vergleichbarkeit ab, da die Streuung der gemessenen Werte stark anstieg.

4.2 MTS-Pharmakokinetik

4.2.1 Dasa

Alle 38 Fibroblastenkulturen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dasa behandelt und die Stoffwechselleistung bestimmt. Die MTS-Absorption nahm mit steigender Konzentration ab. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch Kurvenverläufe in Abhängigkeit von der ausgesäten Zellzahl.

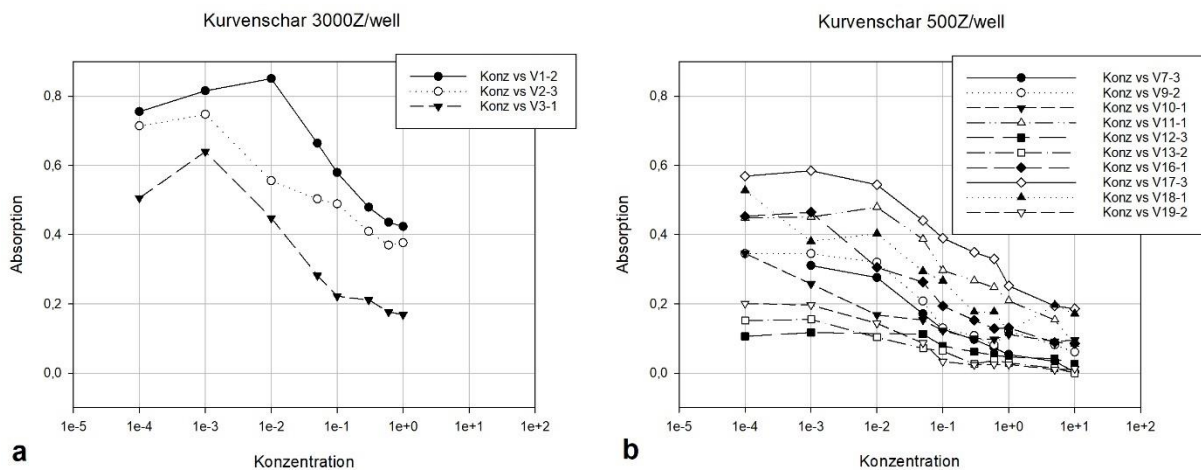


Abbildung 20 Exemplarische Absorptionskurvenscharen, Dasa

Aufgeteilt nach Zellzahlen, maximal eine Kurve pro Kultur. a. Kurven der Kulturen mit 3000 Z/well; b. Kurven aus Kulturen mit 500 Z/well.

Wie zu erwarten, lagen die MTS-Werte von Kultur 1 bis 3 mit 3000 Z/well über den Werten der anderen Kulturen. Auffallend war, dass bei 500 Z/well die Absorptionswerte bei kleinen Konzentrationen (und der DMSO-Kontrolle) stark

Ergebnisse aus MTS

variierten. Sie schwankten zwischen 0,1 und 0,8 je nach Kultur. Ob es sich dabei um unterschiedlich schnell wachsende Kulturen handelt, kann hier nicht beantwortet werden.

Alle Kulturen wurden in 3-fach-Bestimmung angesetzt, die jeweils eine Kinetik ergaben. Es entstanden also maximal 3 Werte pro Kultur. Neben dem reinen Zahlenwert der Minimal- und Maximalabsorption, sind diese auch noch in Prozent angeben, wobei die jeweils zugehörige Kontrolle als 100 % fungiert. Die Auswertung und die graphische Darstellung der MTS-Daten erfolgte dennoch mit dem realen Absorptionswert, um die Streuung der Daten besser zeigen zu können. Es wurden danach jeweils die pharmakokinetischen Daten pro Kultur gemittelt und die Standardabweichung bestimmt (Tabelle 20 im Anhang).

ZZ	MW, min	SD, min	MW, min %	SD, min %	MW, max	SD, max	MW, max %	SD, max %	MW, EC50	SD, EC50
3000	0,321	0,108	50,7	10,7	0,679	0,120	106	2	0,045	0,030
1000	0,082	0,049	26,0	5,6	0,347	0,211	104	5	0,065	0,022
500	0,069	0,057	20,7	9,4	0,324	0,167	103	5	0,058	0,054

Tabelle 11 Pharmakokinetische MTS-Dasa-Daten

Nach der Mittelung der 3-fach-Bestimmungen pro Kultur, wurden die Werte der Kulturen mit gleicher Zellzahl gemittelt und zusammen mit der Standardabweichung in dieser Tabelle angegeben. Grau: Werte aus 3000 Z/well-Kulturen, fett: Werte aus 500 Z/well-Kulturen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min: Minimalwert, max: Maximalwert; ZZ: Zellzahl.

Die pharmakokinetische Analyse der Kulturen mit 3000 Z/well lieferte maximale MTS-Werte. Bei hohen Dasa-Konzentrationen (minimale Absorptionswerte) entsprachen die MTS-Werte $50,7 \pm 10,7$ % der Kontrollwerte. Der mittlere EC50 lag bei $0,045 \pm 0,030$ μM . Bei 1000/1500 Z/well war die minimale Absorption $26,0 \pm 5,6$ % und der mittlere EC50 $0,065 \pm 0,022$ μM . Bei 500 Z/well lag der MTS-Wert bei hohen Konzentrationen bei $20,7 \pm 9,4$ % und der mittlere EC50 bei $0,058 \pm 0,054$ μM . Während die EC50-Werte unabhängig von der ausgesäten Zellzahl waren ($p=0,303$), war die verbleibende MTS-Reaktion bei den 3000 Z/well signifikant höher als bei den 1000/1500 beziehungsweise 500 Z/well ($p<0,001$, jeweils). Abbildung 21 zeigt eine Übersicht der Daten nach Inkubation mit Dasa.

Ergebnisse aus MTS

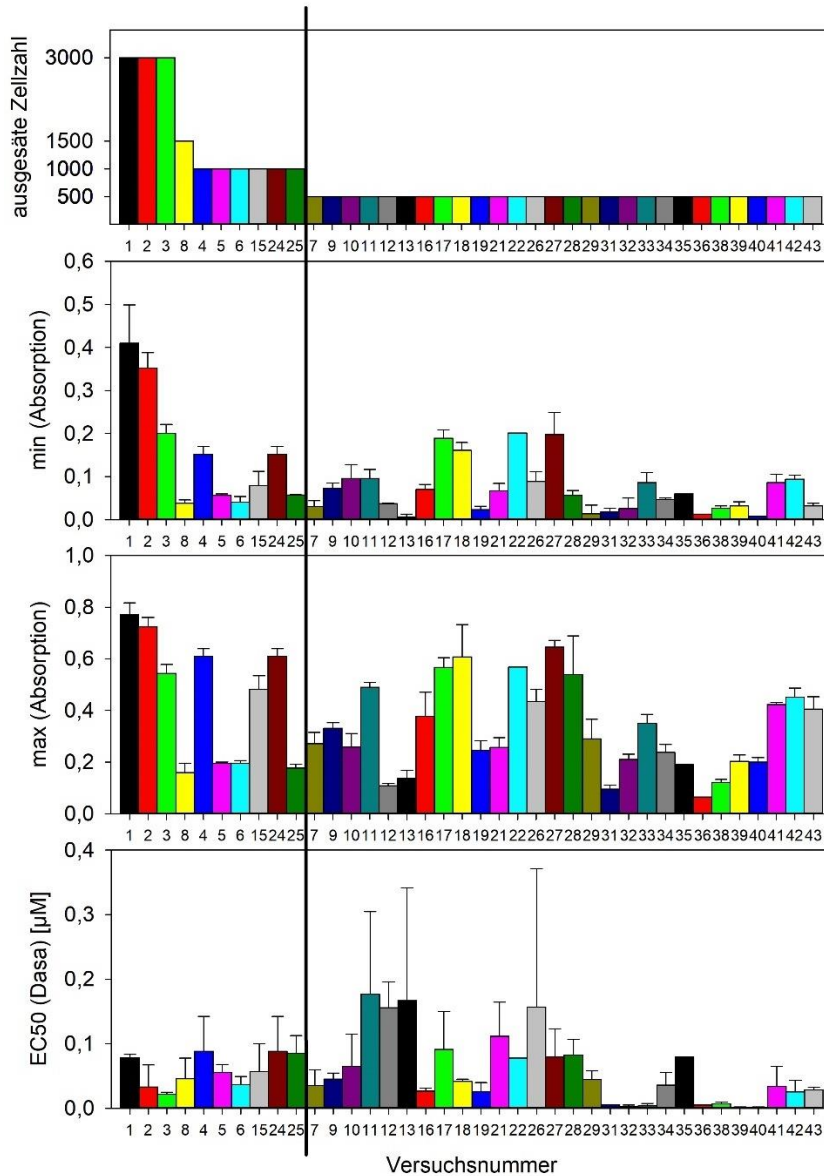


Abbildung 21 Pharmakokinetischen MTS-Dasa-Daten aller Kulturen

Es handelt sich um Balkendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus den 3-fach-Bestimmungen der einzelnen Kulturen. Zur Veranschaulichung wurde ein vertikaler Balken als Abgrenzung zwischen den Kulturen mit 500 Z/well (rechts des Balkens) und denen mit höherer ausgesäter Zellzahl eingefügt.

Einige der abgebildeten Fibroblastenkulturen stammen aus jeweils einer Präparation, wurden aber in verschiedenen Passagen in Versuch genommen. Im Folgenden sind die Pharmakokinetik-Daten in Abhängigkeit der Präparation dargestellt, aufgeteilt nach der Passagenzahl. Kulturen ausgehend von derselben Präparation aber in unterschiedlichen Passagen (z.B. 3_DMED_li_25 in p1, p2 und p4) lieferten voneinander abweichende minimale, maximale Absorptionen und EC50-Werte (exemplarisch dargestellt anhand EC50 in Abbildung 22). Um bei dem Beispiel mit Fibroblasten der Ratte 3 aus der linken Lunge nach 25 min Kollagenase-Zeit zu

Ergebnisse aus MTS

bleiben: Der EC50-Wert in Passage 1 lag bei $0,085 \pm 0,027 \mu\text{M}$, in Passage 2 dagegen bei $0,1571 \pm 0,2135 \mu\text{M}$ und in Passage 4 bei $0,079 \pm 0,044 \mu\text{M}$.

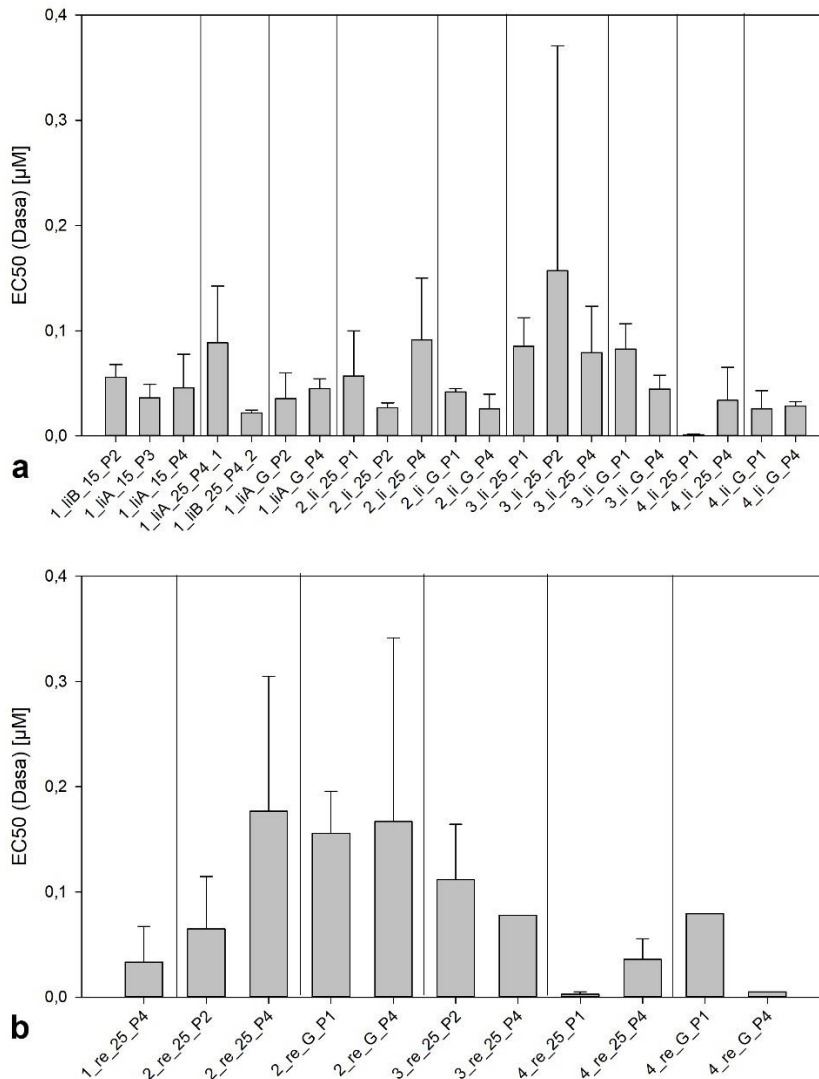


Abbildung 22 Uneinheitliche EC50 bei gleichen Präparationen in unterschiedlichen Passagen
 Es sind Balkendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus den 3-fach Bestimmungen angegeben. a. Präparationen aus linken Lungen, die in verschiedenen Passagen vorlagen; b. Präparationen aus rechten Lungen in verschiedenen Passagen. Durch die Balken erfolgt die Abtrennung der jeweils gleichen Präparation in unterschiedlichen Passagen zu anderen. Eine hohe Passagenzahl bedeutet nicht, dass die Zellen besser wachsen.

Um möglichst wenig statistische Cofaktoren zu inkludieren und damit die potenzielle Fehlerrate zu reduzieren, wurden im Folgenden nur noch die Kulturen mit 500 Z/well pharmakokinetisch ausgewertet.

Bei der statistischen Betrachtung der minimalen Absorption zwischen Präparationen aus der linken oder rechten Lunge zeigten sich keine Unterschiede. Dasselbe gilt für die EC50-Werte. Die maximale Absorption lag bei den linken Lungen etwas höher als

Ergebnisse aus MTS

bei den rechten. Auffällig ist die hohe Streuung. Während der minimale Absorptionswert für die Fibroblasten aus der linken Lunge bei einem Median von 0,06 [0,03/0,09] lag, betrug er bei denen aus der rechten Lunge 0,05 [0,02/0,09]. Bei der maximalen Absorption konnte links im Median 0,39 [0,25/0,52] gemessen werden, rechts hingegen 0,22 [0,12/0,33], was statistisch signifikant war. Während der mediane EC50-Wert links 0,0347 [0,0257/0,0707] μM betrug, sind rechts Werte um 0,0714 [0,0051/0,1448] μM aufgetreten.

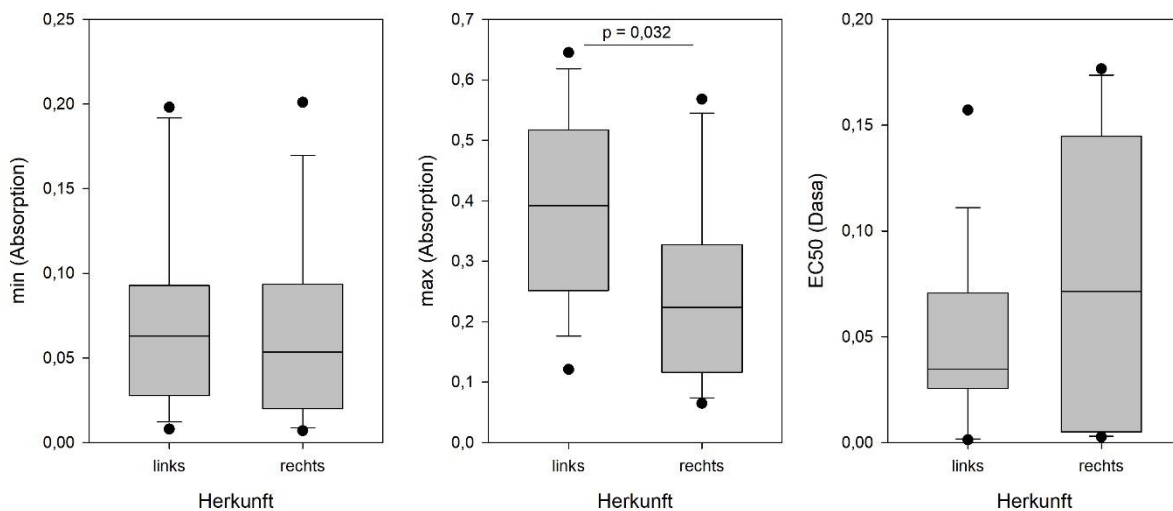


Abbildung 23 MTS-Dasa-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Herkunft

Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Betrachtet wurden die Kulturen mit 500 Z/well, aufgetrennt nach Herkunft der Fibroblasten, also ob aus rechter oder linker Lunge. Auffallend ist auch hier die große Streuung.

Bei der Betrachtung der frühen versus der späten Passagen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich minimaler und maximaler Absorption und EC50-Wert beobachtet werden. Wie bereits oben beschrieben, wurden als frühe Passage p1 und p2 angesehen, unter späte Passage sind p3 und p4 zusammengefasst worden. Bei der minimalen Absorption erreichten die Fibroblasten in den frühen Passagen im Median 0,06 [0,03/0,09], die aus den späten 0,06 [0,02/0,17]. Die maximale Absorption bei p1 und p2 lag bei 0,26 [0,19/0,42], die aus p3 und p4 bei 0,37 [0,24/0,55]. Die Fibroblasten aus den frühen Passagen erreichten einen mittleren EC50 von 0,0311 [0,0051/0,0801] μM , die aus den späten 0,0449 [0,0299/0,0883] μM .

Ergebnisse aus MTS

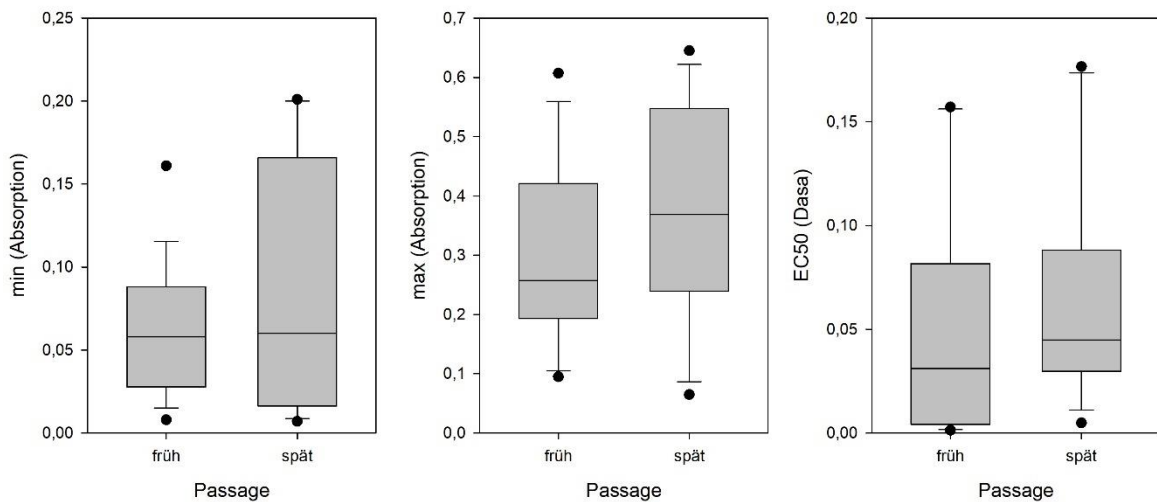


Abbildung 24 MTS-Dasa-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Passage

Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Frühe beziehungsweise späte Passage fasst die Ergebnisse aus p1 und p2 beziehungsweise p3 und p4 zusammen. Vergleicht man die pharmakokinetischen Daten in Abhängigkeit früher mit später Passage, so ergaben sich keine Unterschiede bei den Kulturen mit 500 Z/well. Auffallend ist auch hier die große Streuung

4.2.2 Nilo

16 Fibroblastenkulturen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Nilo behandelt und die Stoffwechselleistung bestimmt. Die MTS-Absorption nahm mit steigender Konzentration ab. Die folgenden Abbildungen zeigen Kurvenverläufe in Abhängigkeit von der ausgesäten Zellzahl.

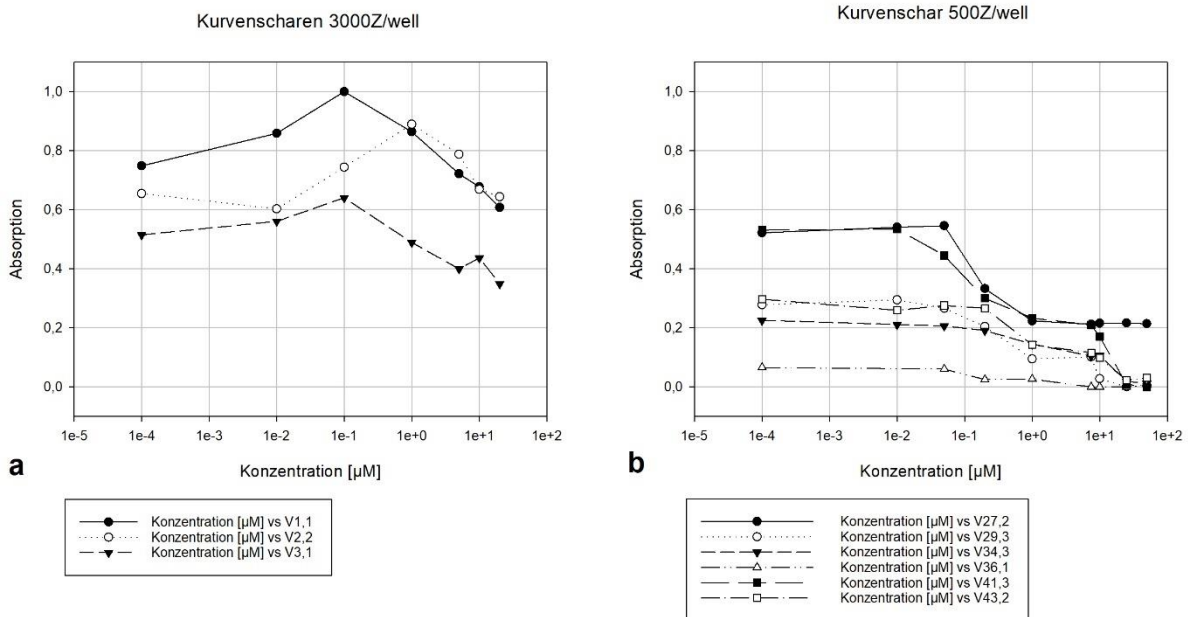


Abbildung 25 Exemplarische Absorptionskurvenscharen, Nilo

Aufgeteilt nach Zellzahlen, maximal eine Kurve pro Kultur. a. Kurven der Kulturen mit 3000 Z/well; b. Kurven aus Kulturen mit 500 Z/well.

Ergebnisse aus MTS

Wie zu erwarten, lagen die MTS-Werte von Kulturen 1 bis 3 mit 3000 Z/well über den Werten der anderen Kulturen. Auffallend war, dass bei 500 Z/well die Absorptionswerte bei kleinen Konzentrationen (und der DMSO-Kontrolle) stark variierten. Sie schwankten zwischen 0,1 und 0,6 je nach Kultur. Ob es sich dabei um unterschiedlich schnell wachsende Kulturen handelt, kann hier nicht beantwortet werden.

Alle Kulturen wurden in 3-fach-Bestimmung angesetzt, die jeweils eine Kinetik ergeben konnten. So entstanden also maximal je 3 Werte für min, max und EC50 aus jeder Kultur. Neben dem reinen Zahlenwert der Minimal- und Maximalabsorption, sind diese auch noch in Prozent angegeben, wobei die jeweils zugehörige Kontrolle als 100 % fungiert. Nachfolgend wurden pro Kultur noch Mittelwerte und Standardabweichung gebildet und in Tabelle 21 aufgelistet.

ZZ	MW, min	SD, min	MW, min %	SD, min %	MW, max	SD, max	MW, max %	SD, max %	MW, EC50	SD, EC50
500	0,065	0,111	13,5	21,4	0,328	0,167	102	8	6,22	5,86

Tabelle 12 Pharmakokinetische MTS-Nilo-Daten

Nach der Mittelung der 3-fach-Bestimmungen pro Kultur, wurden die Werte der Kulturen mit gleicher Zellzahl gemittelt und zusammen mit der Standardabweichung in dieser Tabelle angegeben. Fett: Werte aus 500 Z/well-Kulturen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min: Minimalwert, max: Maximalwert; ZZ: Zellzahl.

Ausgewertet werden konnten hier nur die Kulturen mit 500 Z/well, die mit höherer Zellzahl nicht (V 1 bis 4). Bei hohen Konzentrationen an Nilo entsprachen die MTS-Werte $13,5 \pm 21,4$ % der Kontrolle. Der mittlere EC50 lag bei $6,22 \pm 5,86$ μ M. Die folgende Abbildung zeigt eine Übersicht der pharmakokinetischen Daten nach Inkubation mit Nilo.

Ergebnisse aus MTS

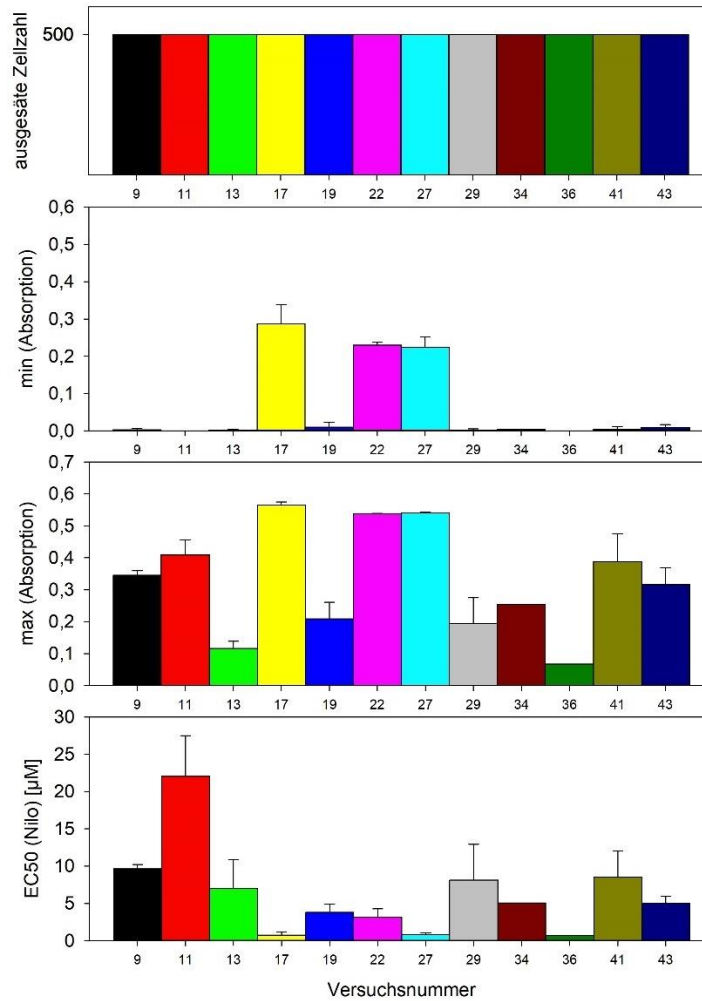


Abbildung 26 Pharmakokinetische MTS-Nilo-Daten aller 500 Z/well-Kulturen
Es handelt sich um Balkendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus den 3-fach-Bestimmungen der einzelnen Kulturen.

Trotz Aussaat gleicher Zellzahlen pro well (500 Z/well), erreichten die maximalen Absorptionen unterschiedliche Werte. Sie streuten stark zwischen 0,05 und 0,6 Absorptionen (Median 0,33 [0,20/0,51]). Die minimalen Absorptionen (gleichbedeutend mit der Stoffwechsellistung bei hohen Nilo-Konzentrationen) lagen bei 3 von 12 Kulturen im Median bei 0,23, bei den meisten Kulturen jedoch bei annähernd 0. Die EC50-Werte (5,04 [1,43/8,43] µM) streuten ebenfalls stark.

Ergebnisse aus MTS

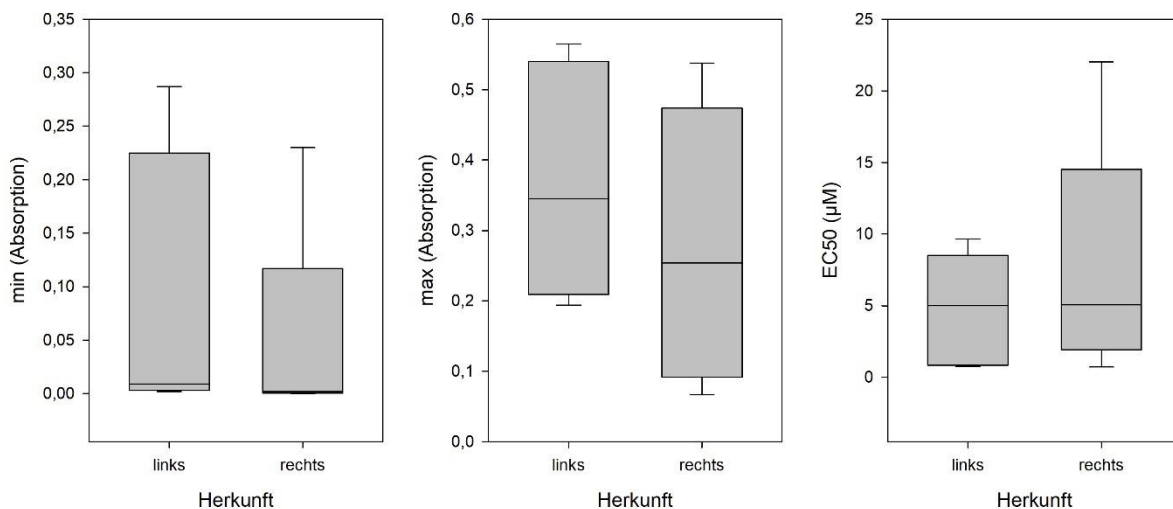


Abbildung 27 MTS-Nilo-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Herkunft

Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Betrachtet wurden die Kulturen mit 500 Z/well, aufgetrennt nach Herkunft der Fibroblasten, also ob aus rechter oder linker Lunge. Vergleicht man die pharmakokinetischen Daten, so ergaben sich keine Unterschiede. Auffallend ist auch hier die große Streuung.

Beim statistischen Vergleich der pharmakokinetischen Daten der linken und rechten Lunge zeigten sich keine Unterschiede. Die minimale Absorption lag links im Median bei 0,09 [0/0,23], rechts bei 0 [0/0,12]. Bei den linken Kulturen stieg die Absorption im Median bis auf 0,35 [0,21/0,54], bei den rechten auf 0,25 [0,09/0,47]. Die linken Lungen zeigten einen medianen EC50 von 5,02 [0,85/8,52] µM, die rechten 5,06 [1,94/14,51] µM.

Da nur Kulturen in später Passage mit Nilo und Ima behandelt wurden, konnte im Gegensatz zu Dasa kein Passagevergleich durchgeführt werden.

4.2.3 Ima

16 Fibroblastenkulturen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ima behandelt und die Stoffwechselleistung bestimmt. Die MTS-Absorption nahm mit steigender Konzentration ab. Die folgenden Abbildungen zeigen Kurvenverläufe in Abhängigkeit von der ausgesäten Zellzahl.

Ergebnisse aus MTS

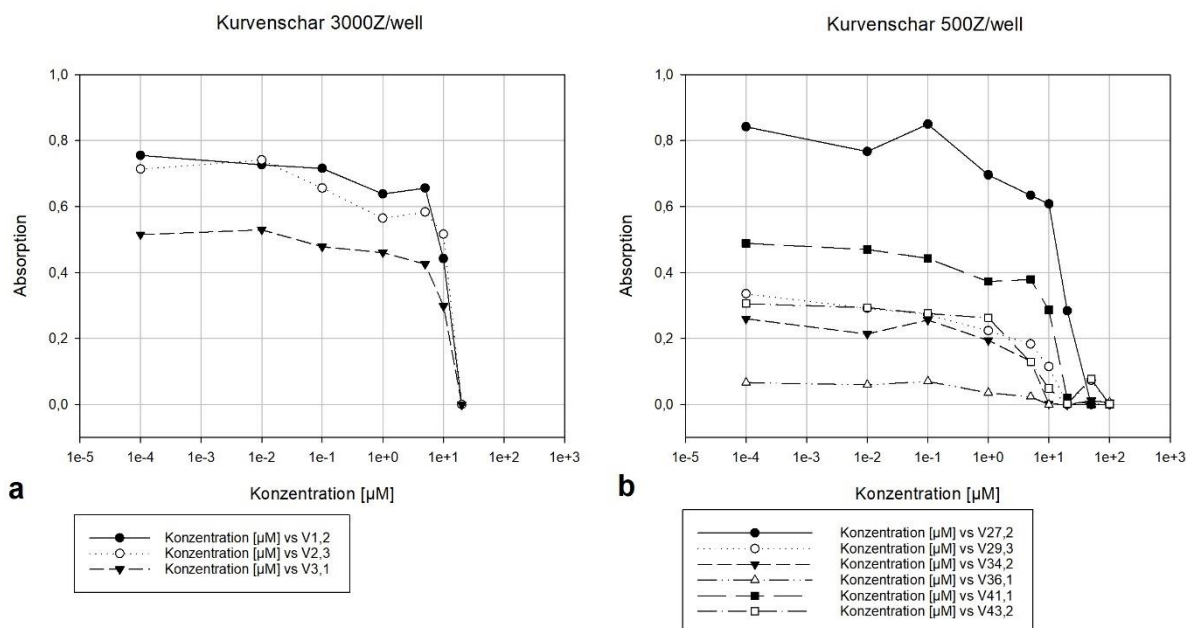


Abbildung 28 Exemplarische Absorptionskurvenscharen, Ima
Aufgeteilt nach Zellzahlen, maximal eine Kurve pro Kultur. a. Kurven der Kulturen mit 3000 Z/well; b. Kurven aus Kulturen mit 500 Z/well.

Die MTS-Werte von Kultur 1 bis 3 mit 3000 Z/well waren hoch. Auffallend war, dass bei 500 Z/well die Absorptionen bei kleinen Konzentrationen (und der DMSO-Kontrolle) stark variierten. Sie schwankten zwischen 0,1 und 0,9 je nach Kultur. Ob es sich dabei um unterschiedlich schnell wachsende Kulturen handelt, kann hier nicht beantwortet werden. Alle Kulturen wurden in 3-fach-Bestimmung angesetzt, die jeweils eine Kinetik ergeben konnten. Es sind also maximal 3 Werte pro Kultur bestimmt worden. Im Anschluss wurden pro Kultur noch Mittelwerte gebildet und Standardabweichung berechnet (siehe Tabelle 22).

ZZ	MW, min	SD, min	MW, min %	SD, min %	MW, max	SD, max	MW, max %	SD, max %	MW, EC50	SD, EC50
3000	0,000	0,000	0,00	0,00	0,600	0,150	97	1	10,22	0,59
500	0,000	0,001	0,20	0,60	0,395	0,211	100	6	8,35	4,44

Tabelle 13 Pharmakokinetische MTS-Ima-Daten

Nach der Mittelung der 3-fach-Bestimmungen pro Kultur, wurden die Werte der Kulturen mit gleicher Zellzahl gemittelt und zusammen mit der Standardabweichung in dieser Tabelle angegeben. Grau: Werte aus 3000 Z/well-Kulturen, fett: Werte aus 500 Z/well-Kulturen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min: Minimalwert, max: Maximalwert; ZZ: Zellzahl.

Die Kulturen mit 3000 Z/well lieferten hohe Maximalwerte ($0,60 \pm 0,15$). Bei hohen Ima-Konzentrationen wurde keine MTS-Reaktion mehr nachgewiesen, die minimale Absorptionen lagen also bei 0. Der EC50 bei 3000 Z/well lag bei $10,22 \pm 0,59 \mu\text{M}$ (allerdings nur 3 Kulturen!). Die maximalen MTS-Werte bei niedrigen Konzentrationen (beziehungsweise der Kontrollen) waren bei 500 Z/well um Faktor 2 niedriger als bei

Ergebnisse aus MTS

3000 Z/well. Der EC50 (Ima) lag bei 500 Z/well bei $8,35 \pm 4,44 \mu\text{M}$. Ein statistischer Vergleich wurde aufgrund der niedrigen Fallzahl für 3000 Z/well nicht durchgeführt. Die Auswertung der sich ergebenden pharmakokinetischen Daten erfolgte nachfolgend also ausschließlich mit den Kulturen mit 500 Z/well.

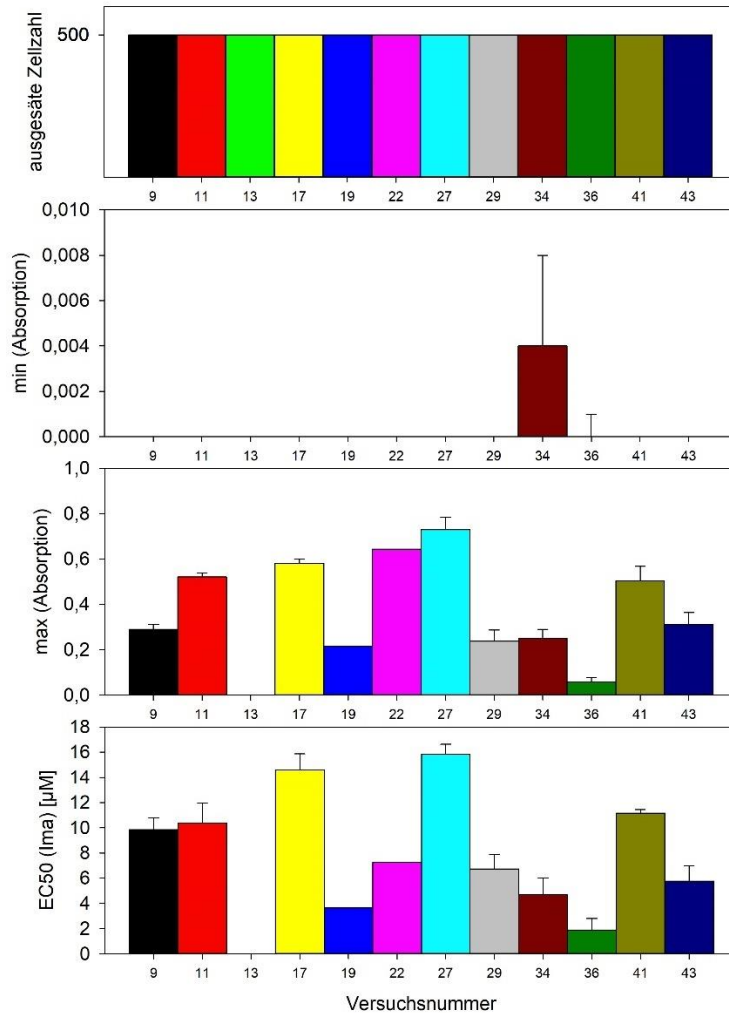


Abbildung 29 Pharmakokinetische MTS-Ima-Daten aller 500 Z/well-Kulturen
Es handelt sich um Balkendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus den 3-fach-Bestimmungen der einzelnen Kulturen.

Trotz Aussaat gleicher Zellzahlen pro well (500 Z/well), erreichte die maximale Absorption recht unterschiedliche Werte. Sie streuten stark zwischen 0,05 und 0,8 (Median 0,31 [0,24/0,58]). Die minimalen Absorptionen (gleichbedeutend mit der Stoffwechselleistung bei hohen Ima-Konzentrationen) lagen bei 0. Eine Kultur war nicht auswertbar (Versuch 13). Der EC50 zeigte ebenso eine starke Streuung (Median 7,26 [4,68/11,16] μM).

Ergebnisse aus MTS

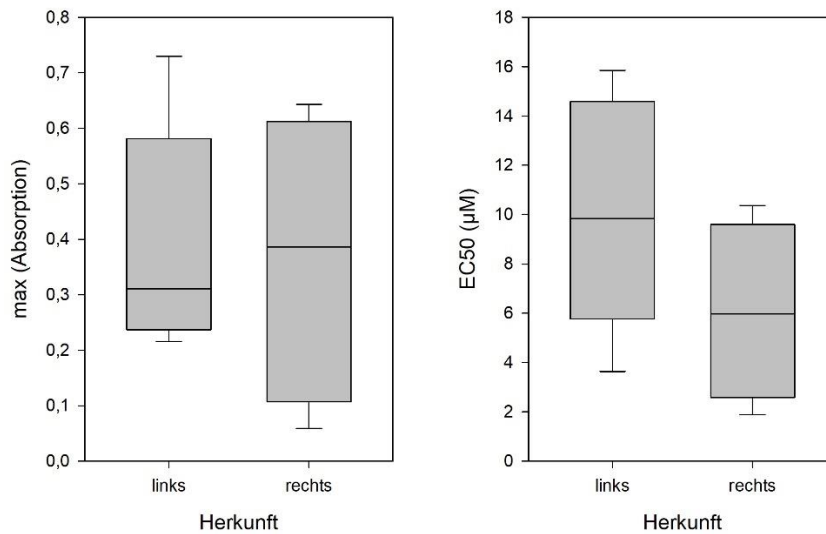


Abbildung 30 MTS-Ima-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Herkunft
Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Betrachtet wurden die Kulturen mit 500 Z/well, aufgetrennt nach Herkunft der Fibroblasten, also ob aus rechter oder linker Lunge. Vergleicht man die pharmakokinetischen Daten, so ergaben sich keine Unterschiede.

Da die minimalen Absorptionswerte mit einer Ausnahme stets bei 0 lagen, wird auf die Abbildung hiervon verzichtet. Die maximale Absorption lag links im Median bei 0,31 [0,24/0,58], rechts bei 0,39 [0,11/0,61]. Der mediane EC50 betrug links 9,84 [5,77/14,59] µM, rechts 5,97 [2,58/9,59] µM. Vergleicht man die pharmakokinetischen Daten, so ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den linken und rechten Lungen. Auffallend ist auch hier die große Streuung.

Ein Vergleich der pharmakokinetischen Daten der frühen und späten Passagen konnte nicht durchgeführt werden, da alle Kulturen, die mit Ima und Nilo behandelt wurden, in p4 vorlagen.

4.2.4 MTS-Pharmakokinetik aller eingesetzten RTKIs

Nach der Betrachtung der einzelnen RTKIs separat sollte nun auch noch ein Vergleich der Medikamente zueinander durchgeführt werden. Nur die 12 Kulturen mit eingesetzten 500 Z/well, die mit allen 3 Medikamenten behandelt wurden, sind in den statistischen Vergleich eingeflossen. Diese lagen alle in späten Passagen vor, 5 Kulturen waren aus den nativen Lungen hergestellt und 7 aus den Allografts.

Ergebnisse aus MTS

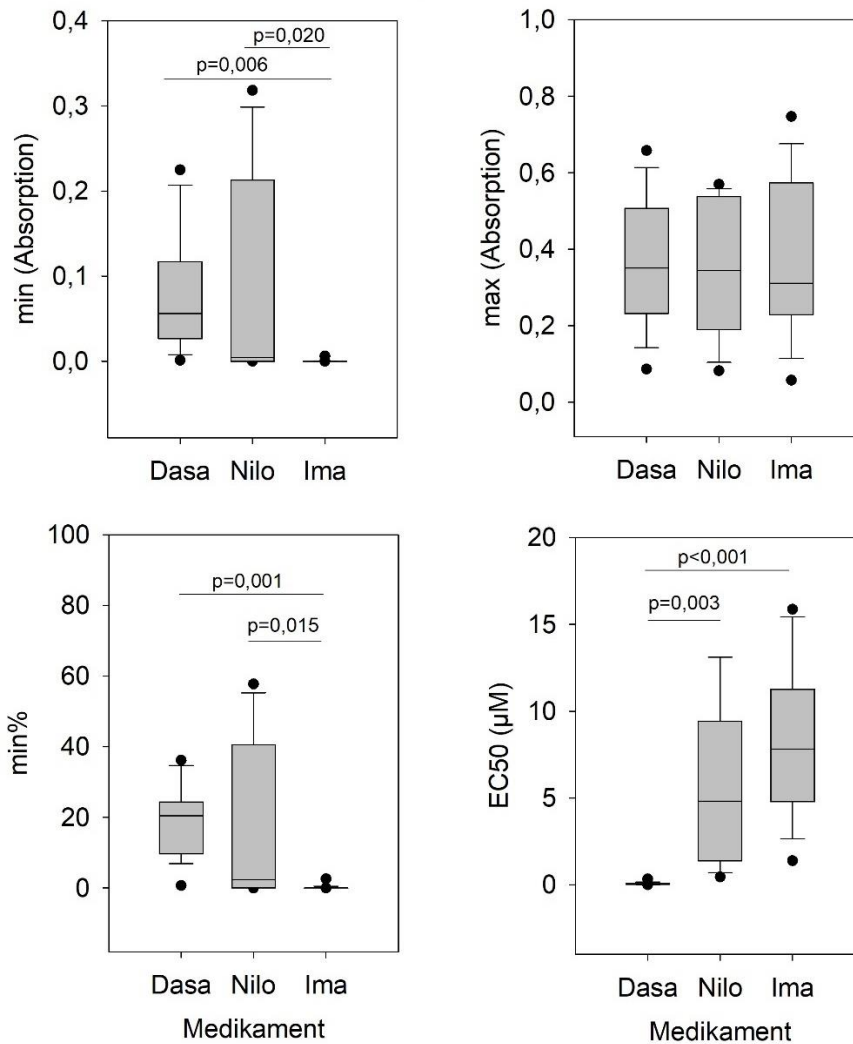


Abbildung 31 MTS-Pharmakokinetik der 500 Z/well-Kulturen mit 3 RTKIs

Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Es sind nur die 12 Kulturen dargestellt, die mit allen 3 Medikamenten behandelt und bei denen 500 Z/well eingesetzt wurden.

Bei hohen Konzentrationen (minimale Absorptionswerte) war bei Ima keine Stoffwechselleistung mehr nachweisbar, die Streuung für Nilo (Median 0,04 [0/0,17]) war hoch. Die Behandlung mit hohen Dasa-Konzentrationen lieferte eine messbare Restaktivität der Fibroblasten (Median 0,06 [0,02/0,17]). Die maximalen Absorptionswerten waren im Mittel für alle Medikamente gleich, für Ima im Median 0,31 [0,24/0,58], für Nilo 0,33 [0,20/0,51], für Dasa 0,37 [0,24/0,55]. Bei den EC50-Werten lagen die Werte für Dasa (Median 0,045 [0,030/0,088] μM) gegenüber Ima (Median 7,26 [4,68/11,16] μM) beziehungsweise Nilo (Median 5,04 [1,42/8,42] μM) signifikant niedriger ($p<0,001$ beziehungsweise $p=0,003$).

5 Ergebnisse aus Glo

5.1 Änderungen der Versuchsbedingungen

Die Pharmakokinetik der drei eingesetzten RTK-Inhibitoren wurde neben MTS auch mit Glo bestimmt. Es wurden die gleichen Kulturen in denselben Passagen gemessen, also 5 Endothelzell- und 38 Fibroblastenkulturen. Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Proliferationshemmung von Fibroblasten, weshalb im Folgenden die Analyse auf die Fibroblastenkulturen beschränkt ist. Zur Vergleichbarkeit der beiden Messmethoden wird sich ausschließlich auf die Endpunktmessung konzentriert, also die Abschlussmessung nach 72 Stunden.

Die einzelnen Versuche sind simultan für die beiden Messverfahren angesetzt worden, sodass die oben beschriebenen Änderungen der Versuchsbedingungen (siehe 4.1) auch für Glo gelten. Im Besonderen sind dabei die folgenden zwei Punkte hervorzuheben.

- Die eingesetzte Zellzahl wurde analog zu MTS schrittweise von 3000 auf 500 Z/well reduziert, um das Erreichen einer statischen Wachstumsphase zu verhindern.
- Aufgrund eines technischen Defektes musste zwischenzeitlich ein Messgerätewechsel erfolgen. Es wurden 21 der 38 Kulturen mit Varioskan und 17 mit Tecan gemessen; keine Kultur mit beiden Geräten.

Zellzahl [Z/well]	3000	1500/1000	500	Summe
Varioskan	3	6	12	21
li / re	1 / 2	6 / 0	7 / 5	14 / 7
früh / spät	0 / 3	4 / 2	5 / 7	9 / 12
Tecan	0	1	16	17
li / re	0 / 0	1 / 0	9 / 7	10 / 7
früh / spät	0 / 0	0 / 1	11 / 5	11 / 6

Tabelle 14 Details zu den stattgehabten Glo-Messungen

Auflistung der Anzahl der Kulturen nach Geräten (Varioskan/Tecan), eingesetzten Zellzahlen (3000, 1500/1000, 500 Z/well), Herkunft (links/rechts) und Passage (früh/spät).

Wie in Tabelle 14 gezeigt, wurden mit Tecan bis auf eine Ausnahme nur Kulturen gemessen, bei denen 500 Z/well eingesetzt wurden. Bei 59 % der Kulturen handelt es sich um Fibroblasten aus der linken Lunge, zu 65 % wurden frühe Passagen in Versuch genommen. Die Messung der Lumineszenz erfolgte mit Varioskan bei der Mehrheit (57 %) der Kulturen mit 500 Z/well, bei 3 mit 3000 Z/well und 6 mit

Ergebnisse aus Glo

1000 Z/well. Es handelte sich bei den Kulturen, die mit Varioskan gemessen wurden, häufiger um späte Passagen (57 %) und um Zellen aus den Allografts (67 %).

Es konnte keine Abhängigkeit der Lumineszenzwerte zwischen Varioskan und Tecan bestimmt werden, da keine Messung einer Kultur mit beiden Geräten erfolgt ist. Nachfolgend sind die durchschnittlichen Lumineszenzen aufgetrennt nach Messgerät und Medikament dargestellt. Es zeigte sich, dass bei der Messung mit Varioskan deutlich höhere Werte detektiert werden konnten. Hierbei handelte es sich um einen Faktor von durchschnittlich bis zu 22-fach (bei Dasa, bei Ima 16-fach, bei Nilo 13-fach) höhere Werte.

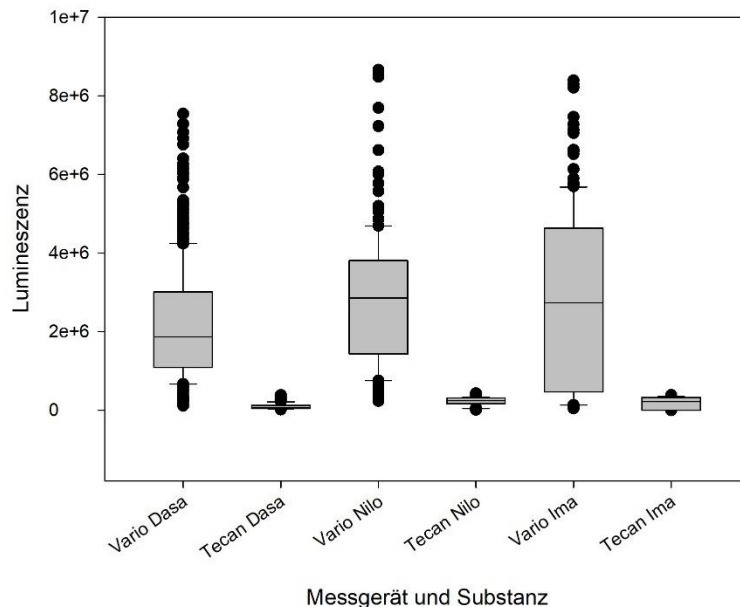


Abbildung 32 Sensitivitätsunterschied der Geräte hinsichtlich Lumineszenz

Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Es handelt sich um Glo-Endpunkt-Lumineszenzen, aufgetrennt nach Messgerät und Medikament. Die Lumineszenzen fielen bei Varioskan deutlich höher aus als bei Tecan. Varioskan Dasa: 1862960 [1086790/3007205], Tecan Dasa: 67273 [46698/124472], Varioskan Nilo: 2858015 [1436697/3806770], Tecan Nilo: 241835 [170311/305263], Varioskan Ima: 2737020 [462030/4628482], Tecan Ima: 222286 [1260/326439].

Die Auswertung wurde unter anderem auch prozentual auf die immer mitgeführten Kontrollen bezogen, was einen direkten Vergleich der Messwerte durch die beiden verschiedenen Geräte zulässt. Die errechneten EC50-Werte sind zudem durch ihren Bezug auf die Konzentration direkt miteinander vergleichbar ohne von der Sensitivität des Messgeräts abhängig zu sein. Die nachfolgenden pharmakokinetischen Analysen erfolgten daher alle mittels prozentualem Minimal- (min %) und Maximalwert (max %) und dem EC50.

Ergebnisse aus Glo

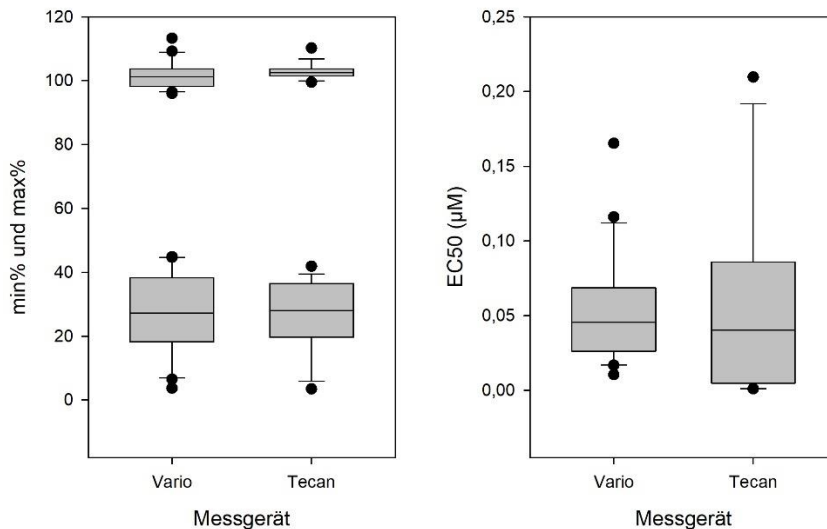


Abbildung 33 Kein Unterschied in der Glo-Dasa-Pharmakokinetik zwischen den Geräten
Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Es wurden die pharmakokinetischen Glo-Dasa-Daten, die durch Messung mit den beiden Geräten entstanden sind, gegenübergestellt. Dargestellt sind die mittleren minimalen Absorptionswerte in % (min %), die mittleren maximalen Absorptionswerte in % (max %) und EC50. Vario: min 27,2 [18,2/38,4] %, max 101,2 [98,2/103,6] %, EC50 0,046 [0,026/0,069] µM; Tecan: min 28,0 [19,7/36,5] %, max 102,5 [101,5/103,7] %, EC50 0,040 [0,005/0,086] µM.

Bei Betrachtung der analogen Werte zwischen beiden benutzten Messgeräten wurde deutlich, dass sich kein Unterschied zwischen den mit Varioskan und mit Tecan gemessenen Werten zeigte. Die Mediane der Boxplots waren fast identisch, die vorbeschriebene Streuung erneut sichtbar.

5.2 Glo-Pharmakokinetik

5.2.1 Dasa

Alle Kulturen sind in 2-fach Bestimmung angesetzt worden (Ausnahmen: V 1-3 in Dreifach- und V 21 nur in Einfachbestimmung). Exemplarisch wurden nachfolgend einige Kurven abgebildet.

Ergebnisse aus Glo

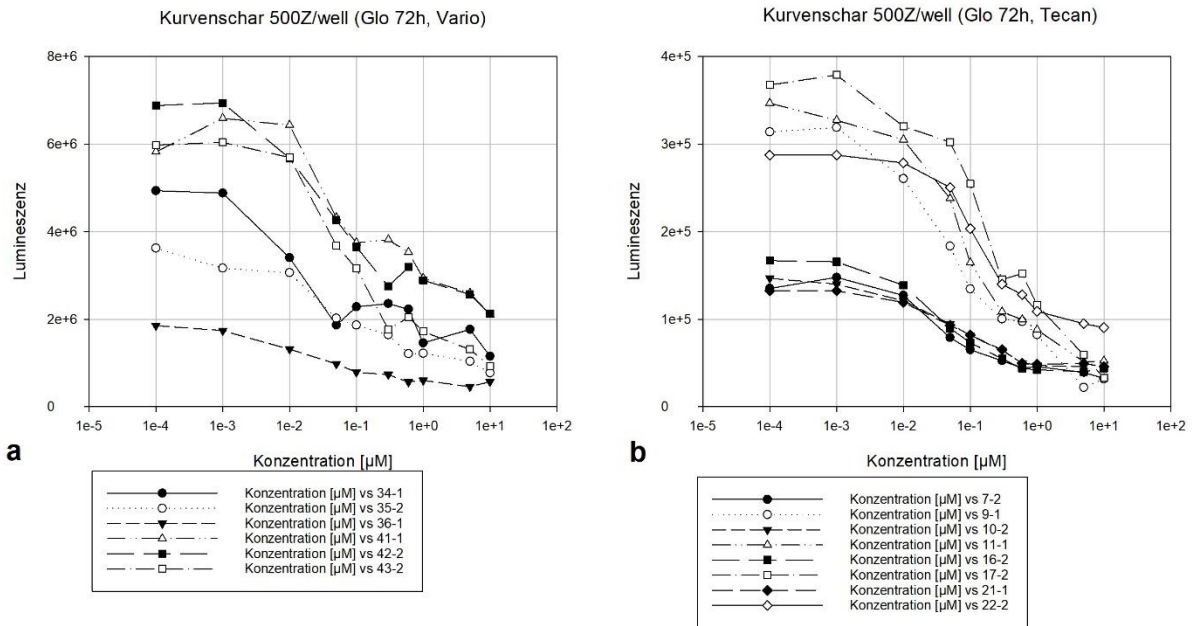


Abbildung 34 Exemplarische Lumineszenzkurvenscharen, Dasa
Beispielkurven mit 500 Z/well, maximal eine Kurve pro Kultur. a. Kurven mit Varioskan gemessen; b. Kurven mit Tecan gemessen. Die unterschiedliche Skalierung der Graphen zeigt nochmals die Diskrepanz der Sensitivität der Geräte hinsichtlich der Lumineszenz.

Aus den Mehrfachbestimmungen konnten mittels Übergangskurven die pharmakokinetischen Werte (min, max, EC50) berechnet werden. Durch die unterschiedliche Sensitivität der Messgeräte wurde neben den Absolutzahlen auch die prozentualen Werte (min %, max %) angegeben, um einen Vergleich zu ermöglichen.

Die Werte der Mehrfachbestimmungen wurden pro Kultur ebenso wie bei MTS gemittelt (siehe Tabelle 23). Anschließend erfolgte eine Mittelung der Werte der Kulturen mit gleicher Zellzahl und diese wurden mit Standardabweichung in folgender Tabelle aufgeführt.

Vario	MW min	SD min	MW min %	SD min %	MW max	SD max	MW max %	SD max %	MW EC50	SD EC50
3000	2168618	78782	44,3	2,1	4793220,6	222263	97,7	1,5	0,0382	0,0071
1000	688777	93769	30,7	3,2	2370160	187236	102,9	2,1	0,0770	0,0283
500	1015716	109976	21,2	2,6	4745422	208999	102,4	2,5	0,0470	0,0110
Tec.										
1000	25514		23,3		108199		99,0		0,0267	
500	48230	6506	26,0	3,2	220509	8077	102,8	1,4	0,0587	0,0083

Tabelle 15 Pharmakokinetische Glo-Dasa-Daten

Nach der Mittelung der Mehrfachbestimmungen pro Kultur, wurden die Werte der Kulturen mit gleicher Zellzahl gemittelt und zusammen mit der Standardabweichung in dieser Tabelle angegeben. Grau: Werte aus 3000 Z/well-Kulturen, fett: Werte aus 500 Z/well-Kulturen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min: Minimalwert, max: Maximalwert.

Ergebnisse aus Glo

Es handelte sich bei der überwiegenden Zahl der Versuche um Kulturen mit 500 Z/well. Ausnahme waren hiervon 1 Kultur (1000 Z/well) gemessen mit Tecan und 9 (3 mit 3000Z/well, 6 mit 1000 Z/well) mit Varioskan. Mit Tecan wurden 17 Kulturen gemessen, mit Varioskan 21. Um eine mögliche Verzerrung der pharmakokinetischen Analysen zu verhindern, wurde sich im Folgenden nur auf die Kulturen mit eingesetzten 500 Z/well konzentriert und dementsprechend statistisch ausgewertet.

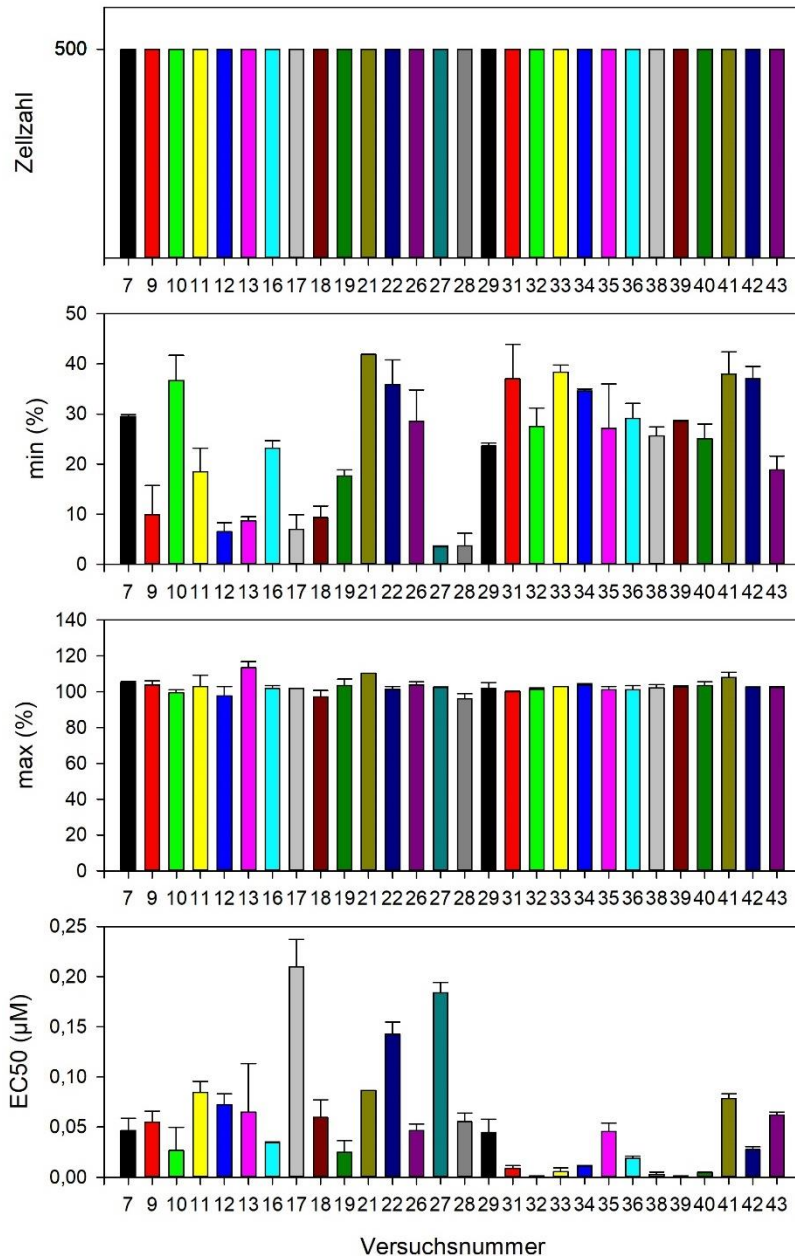


Abbildung 35 Pharmakokinetische Glo-Dasa-Daten aller 500 Z/well-Kulturen

Es handelt sich um Balkendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus den Mehrfach-Bestimmungen der einzelnen Kulturen. Dargestellt sind nur die Kulturen mit eingesetzten 500 Z/well. Die vorbeschriebene starke Streuung konnte vor allem bei der mittleren minimalen Absorption und beim EC50-Wert beobachtet werden: der minimale Absorptionswert in % (min %, Median 26,4 [11,8/35,6] %) lag zwischen 3,5 % und 41,9 %, der EC50 zwischen 0,001 µM und 0,210 µM (Median 0,046 [0,013/0,070] µM). Der

Ergebnisse aus Glo

mittlere max % lag im Median bei 102,4 [101,2/103,7] % und unterlag damit einer deutlich niedrigeren Streuung.

Analog zur Auswertung der MTS-Daten der mit Dasa behandelten Fibroblasten, wurden auch die Messwerte bei Glo nach Herkunft und nachfolgend nach Passage separat ausgewertet, um eventuelle Unterschiede zu ermitteln.

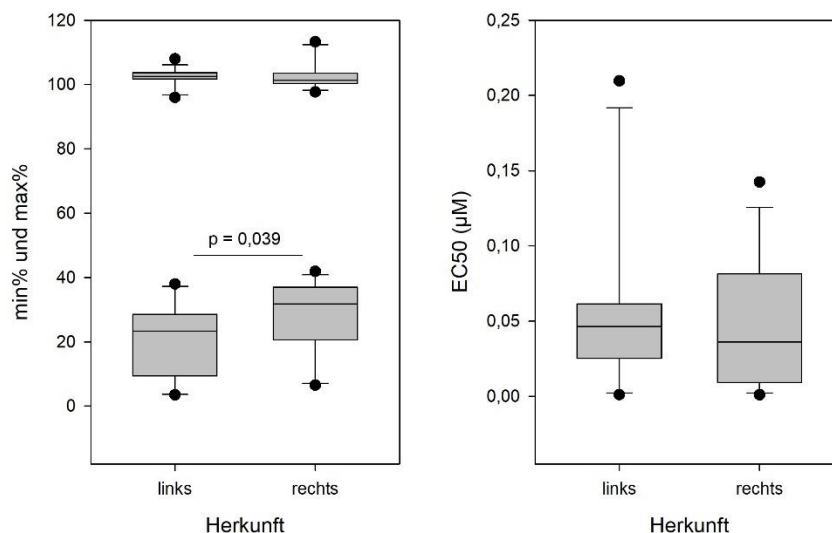


Abbildung 36 Glo-Dasa-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Herkunft

Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Betrachtet wurden die Kulturen mit 500 Z/well, aufgetrennt nach Herkunft der Fibroblasten, also ob aus rechter oder linker Lunge.

Wie in Abbildung 36 dargestellt, waren die mittleren prozentualen Minimalwerte (min %) in der Gegenüberstellung zwischen Fibroblasten aus linken und rechten Lungen unterschiedlich: Der mittlere min % lag bei den Kulturen aus den linken Lungen bei 23,4 [9,5/28,6] % und damit signifikant niedriger als bei den aus der rechten Lunge (31,9 [20,7/36,9] %). Weder bei dem mittleren max % (links 102,6 [101,8/103,7] %, rechts 101,4 [100,4/103,6] %) noch bei dem mittleren EC50 (links 0,046 [0,025/0,062] µM, rechts 0,036 [0,009/0,081] µM) konnten hingegen signifikante Unterschiede beobachtet werden.

Abbildung 37 zeigt den Vergleich zwischen den Kulturen aus den frühen und späten Passagen, die mit Dasa behandelt wurden. Es konnte hierbei ein signifikanter Unterschied festgestellt werden: Der EC50 stellte sich in den frühen Passagen bereits um 0,031 [0,005/0,053] µM ein, bei den späten erst bei Konzentrationen um 0,064 [0,030/0,128] µM. Ansonsten sind keine klaren Unterschiede nachzuweisen. Während der min % in den frühen Passagen bei 28,0 [23,7/36,9] % lag, war er bei den späten

Ergebnisse aus Glo

Passagen 18,7 [9,0/33,2] %. Der max % zeigte sich bei den Kulturen in den frühen Passagen 102,0 [99,7/103,3] %, bei den späten bei 102,7 [101,8/103,8] %.

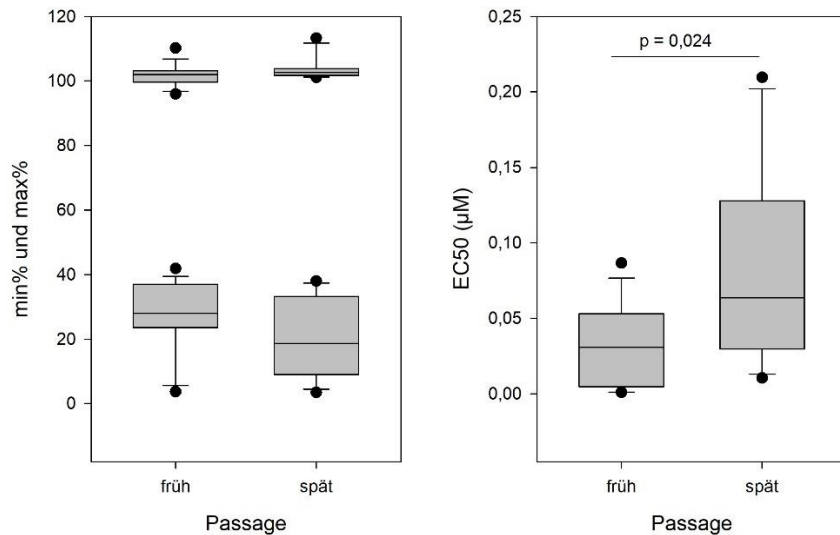


Abbildung 37 Glo-Dasa-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Passage
Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Angegeben sind Mediane und Perzentilen (mit Extremwerten). Es handelte sich nur um die Kulturen mit 500Z/well. Passagen 1 und 2 sind als frühe Passagen gewertet, 3 und 4 hingegen als späte.

5.2.2 Nilo

Es wurden 11 Kulturen mit Varioskan und 5 mit Tecan gemessen. Bei ersterem handelte es sich um 3 Kulturen mit 3000 Z/well, eine mit 1000 Z/well und 7 mit 500Z/well. Die eingesetzte Zellzahl bei Tecan lag bei allen 5 Kulturen bei 500 Z/well.

Ergebnisse aus Glo

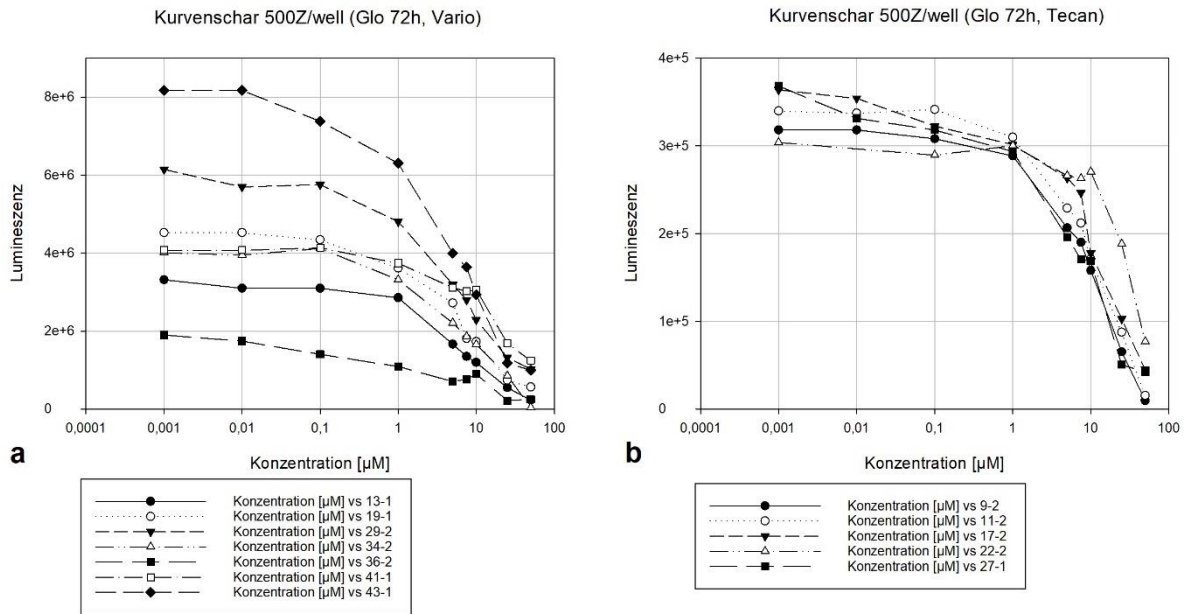


Abbildung 38 Exemplarische Lumineszenzkurvenscharen, Nilo
 Beispielkurven mit 500 Z/well, maximal eine Kurve pro Kultur. a. Kurven mit Varioskan gemessen; b. Kurven mit Tecan gemessen. Es sei nochmals auf die unterschiedliche Skalierung und damit Sensitivität der Geräte hinsichtlich der Lumineszenzdetektion hingewiesen.

Mittels Übergangskurven wurden aus den Mehrfachbestimmungen die pharmakokinetischen Werte (min, max, EC50) berechnet und im Bezug zur mitgeführten Kontrolle gesetzt (min %, max %), was einen Vergleich zwischen den Messgeräten ermöglichte.

Die Werte der Mehrfachbestimmungen wurden ebenso wie bei MTS erst pro Kultur (siehe Tabelle 24) und anschließend auf Kulturen mit derselben Zellzahl gemittelt. Die nachfolgende Tabelle enthält eine Übersicht über diese und die zugehörige Standardabweichung.

Vario	MW min	SD min	MW min %	SD min %	MW max	SD max	MW max %	SD max %	MW EC50	SD EC50
3000	3411619	74764	66,1	1,2	5233350	248585	101,3	2,2	0,0098	0,0009
1000	0		0,0		2440199		95,7		8,9896	
500	310933	147538	6,5	2,5	5042168	289571	99,9	2,8	7,3099	1,4089
Tecan										
500	17191	5266	5,3	1,9	321621	13680	95,4	2,9	14,5760	2,1337

Tabelle 16 Pharmakokinetische Glo-Nilo-Daten

Nach der Mittelung der Mehrfachbestimmungen pro Kultur, wurden die Werte der Kulturen mit gleicher Zellzahl gemittelt und zusammen mit der Standardabweichung in dieser Tabelle angegeben. Grau: Werte aus 3000 Z/well-Kulturen, fett: Werte aus 500 Z/well-Kulturen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min: Minimalwert, max: Maximalwert.

Ergebnisse aus Glo

Bei der Mehrzahl der Kulturen handelte es sich um welche mit 500 Z/well, daher wurden nur diese in der nachfolgenden statistischen Auswertung betrachtet. Die 4 Kulturen mit höherer Zellzahl wurden aus der Betrachtung exkludiert.

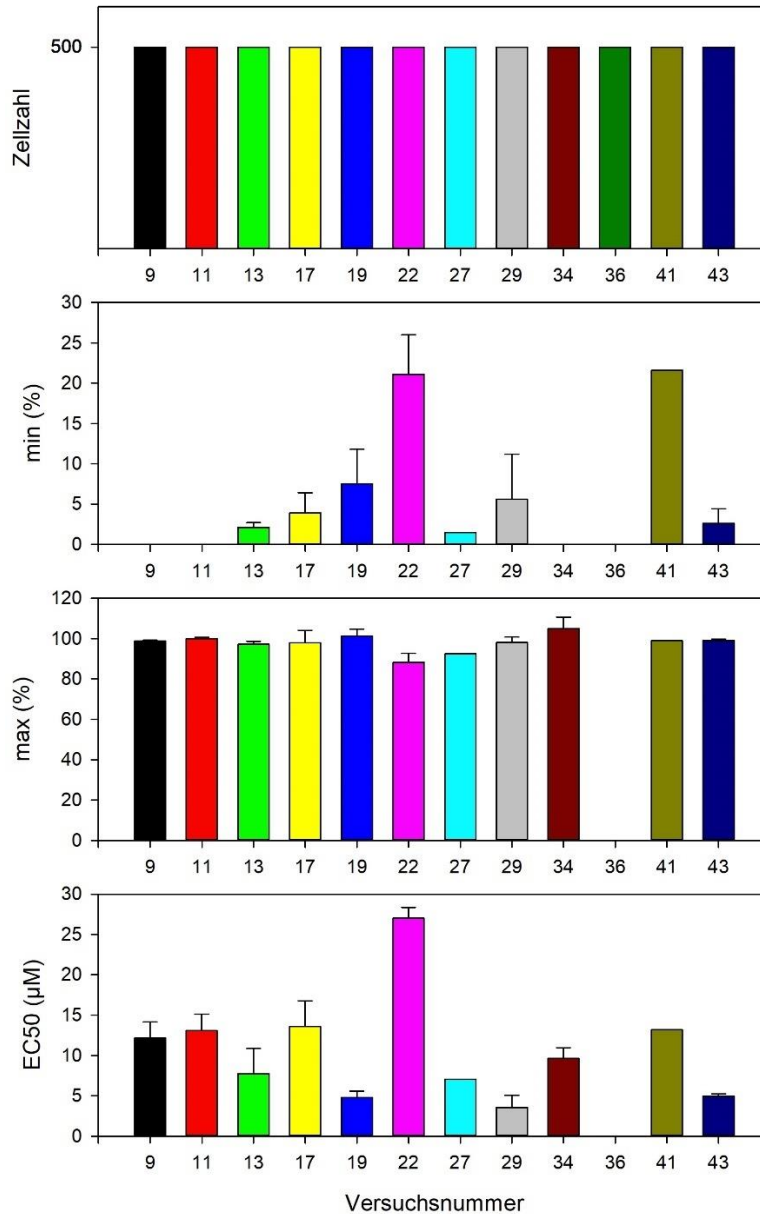


Abbildung 39 Pharmakokinetische Glo-Nilo-Daten aller 500 Z/well-Kulturen

Es handelt sich um Balkendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus den Mehrfachbestimmungen der einzelnen Kulturen. Dargestellt sind nur die Kulturen mit eingesetzten 500 Z/well. Die vorbeschriebene starke Streuung konnte vor allem bei der mittleren minimalen Absorption und beim EC50-Wert beobachtet werden. So lagen die Werte von min % zwischen 0 % und 21,6 % (Median 2,6 [0/7,5] %), max % zwischen 88,2 % und 104,9 % (Median 98,8 [97,2/100,0] %) und der EC50 zwischen 3,56 µM und 27,02 µM (Median 9,63 [4,95/13,18] µM).

Auch hier wurden statistische Vergleiche zwischen den Kulturen mit Zellen aus der rechten Lunge und aus dem Allograft durchgeführt. Es konnten keine statistische Signifikanzen gefunden werden.

Ergebnisse aus Glo

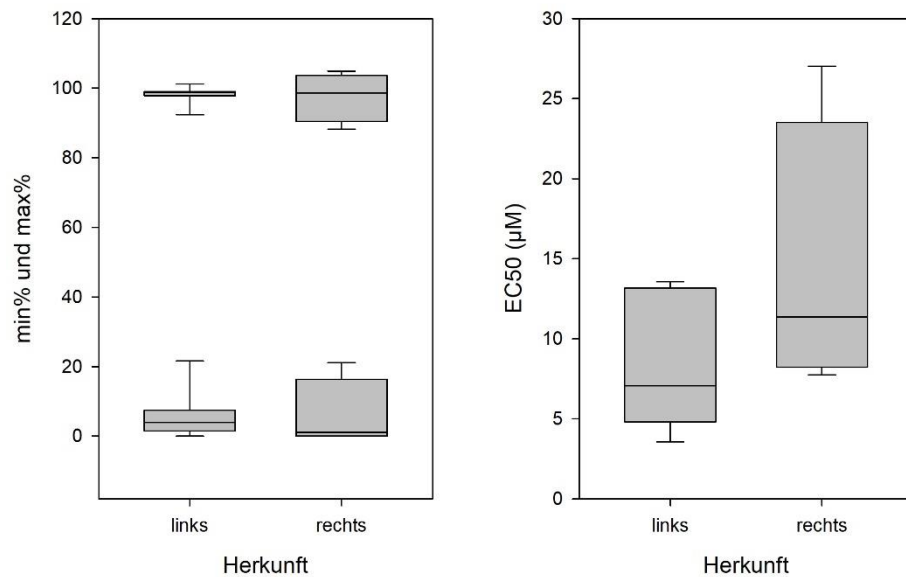


Abbildung 40 Glo-Nilo-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Herkunft
Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Betrachtet wurden die Kulturen mit 500 Z/well, aufgetrennt nach Herkunft der Fibroblasten, also ob aus rechter oder linker Lunge. Bei den linken Fibroblasten lag der min % im Median bei 3,9 [1,5/7,5] %, bei den rechten bei 1,1 [0,0/16,4] %. Der max % zeigte sich links bei 98,8 [97,9/99,0] %, rechts bei 98,6 [90,5/103,7] %. Der EC50 war bei den linken (Median 7,07 [4,80/13,18] µM) nicht-signifikant niedriger als bei den rechten Fibroblasten (Median 11,35 [8,21/23,53] µM).

Da sich alle Kulturen, die mit Nilo behandelt wurden, in p4 befanden, konnte kein Passagenvergleich wie bei Dasa durchgeführt werden.

5.2.3 Ima

Analog zu Nilo wurden 11 Kulturen mit Varioskan und 5 mit Tecan gemessen. Bei ersterem handelte es sich um 3 Kulturen mit 3000 Z/well, 1 mit 1000 Z/well und 7 mit 500 Z/well. Die eingesetzte Zellzahl bei Tecan lag bei allen 5 Kulturen bei 500 Z/well.

Ergebnisse aus Glo

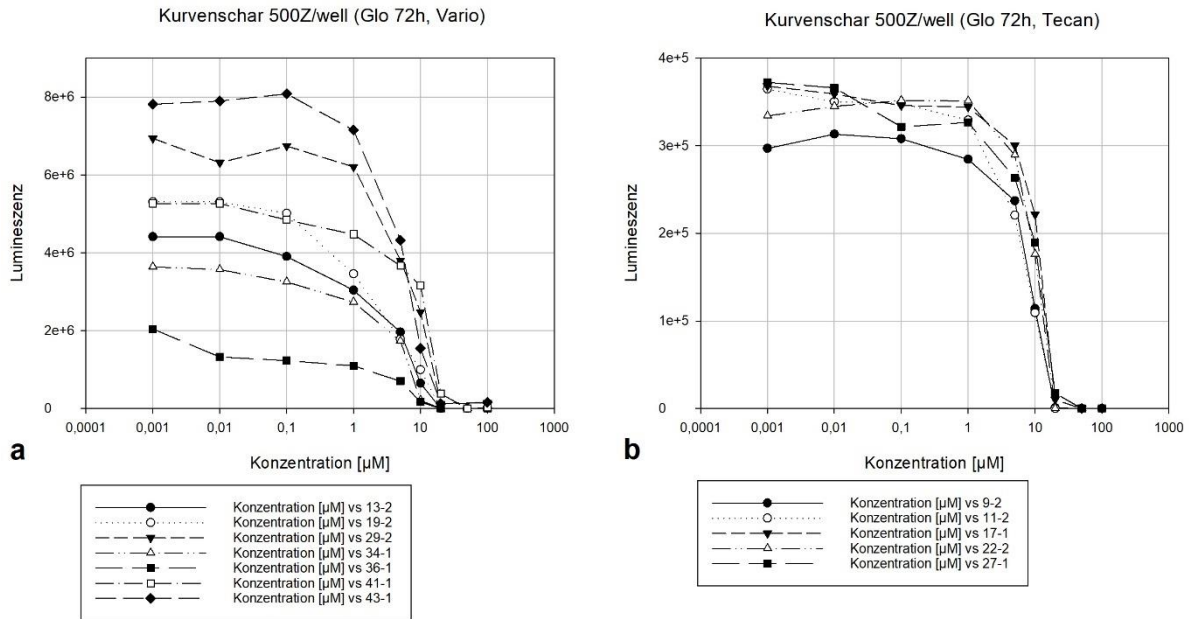


Abbildung 41 Exemplarische Lumineszenzkurvenscharen, Ima
Beispielkurven mit 500 Z/well, maximal eine Kurve pro Kultur. a. Kurven mit Varioskan gemessen; b. Kurven mit Tecan gemessen. Der Sensitivitätsunterschied der Messgeräte zeigte sich wieder in der unterschiedlichen Skalierung der Graphen.

Es wurden die pharmakokinetische Werte min, max, EC50 und durch Bezug auf die mitgeführte Kontrolle auch min % und max % durch die Bestimmung von Übergangskurven berechnet.

Ebenso wie bei MTS wurden die Werte der Mehrfachbestimmungen erst pro Kultur (siehe Tabelle 25) und anschließend auf Kulturen mit derselben Zellzahl gemittelt. Eine Übersicht über diese Mittelwerte und die zugehörige Standardabweichung wird in der nachfolgenden Tabelle gegeben.

Vario	MW min	SD min	MW min %	SD min %	MW max	SD max	MW max %	SD max %	MW EC50	SD EC50
3000	0	0	0,0	0,0	5090464	155879	98,6	1,4	11,8307	0,3455
500	0	0	0,0	0,0	4506302	285148	103,4	5,4	5,8184	1,0124
Tecan										
500	0	0	0,0	0,0	336441	9242	95,0	4,0	9,3626	0,7557

Tabelle 17 Pharmakokinetische Glo-Ima-Daten

Nach der Mittelung der Mehrfachbestimmungen pro Kultur, wurden die Werte der Kulturen mit gleicher Zellzahl gemittelt und zusammen mit der Standardabweichung in dieser Tabelle angegeben. Grau: Werte aus 3000 Z/well-Kulturen, fett: Werte aus 500 Z/well-Kulturen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min: Minimalwert, max: Maximalwert.

Wie unter Nilo bereits beschrieben, sind nur die Kulturen mit 500 Z/well zur statistischen Auswertung betrachtet worden.

Ergebnisse aus Glo

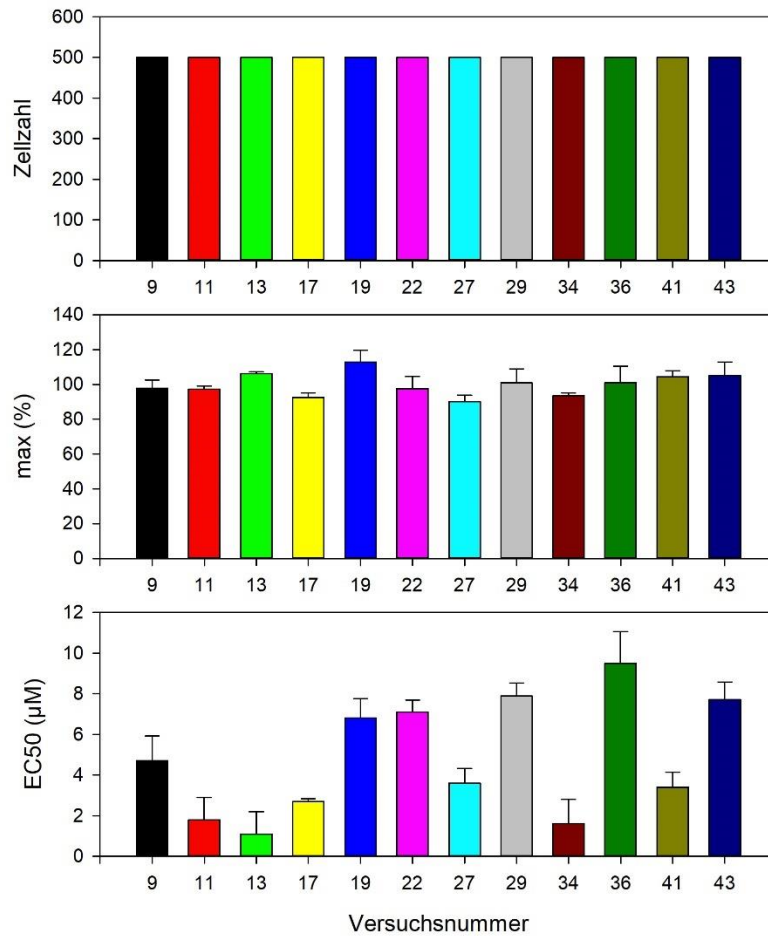


Abbildung 42 Pharmakokinetische Glo-Ima-Daten aller 500 Z/well-Kulturen

Es handelt sich um Balkendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus den Mehrfachbestimmungen der einzelnen Kulturen. Dargestellt sind nur die Kulturen mit eingesetzten 500 Z/well. Die vorbeschriebene starke Streuung konnte vor allem beim mittleren EC50-Wert beobachtet werden. Auf eine Darstellung der Minimal-Werte wurde verzichtet, da diese stets bei 0 lagen. Die Maximalwerte der Absorption in % lagen zwischen 90,1 % und 112,9 % (Median 99,4 [94,4/105,0] %), die EC50-Werte zwischen 3,12 µM und 12,17 µM (Median 6,73 [4,44/10,32] µM).

Analog zu den anderen beiden RTKIs wurden auch bei Ima Vergleiche zwischen den Kulturen mit Zellen aus den linken Lungen versus den rechten gezogen. Es konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

Ein Passagenvergleich wie bei Dasa konnte nicht durchgeführt werden, da sich alle Kulturen, die mit Ima behandelt wurden, in später Passage (p4) befanden.

Ergebnisse aus Glo

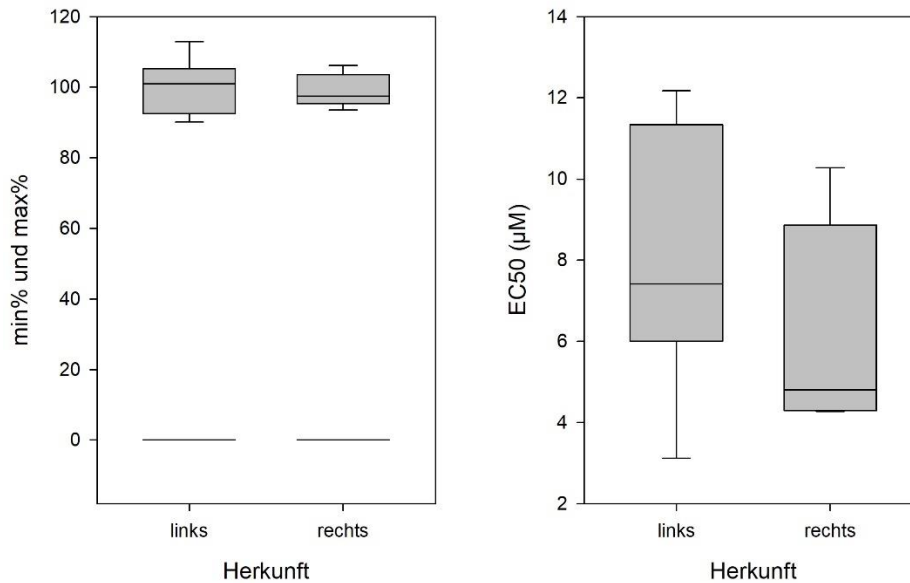


Abbildung 43 Glo-Ima-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Herkunft

Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Betrachtet wurden die Kulturen mit 500 Z/well, aufgetrennt nach Herkunft der Fibroblasten, also ob aus rechter oder linker Lunge. Wie oben bereits erwähnt, lag der Lumineszenzwert bei maximaler Ima-Konzentration (min %) stets bei 0 %. Der max % war links bei 101,0 [92,5/105,2] %, rechts bei 97,5 [95,4/103,5] %. Der mittlere EC50 lag links bei 7,41 [6,00/11,34] µM, rechts bei 4,80 [4,30/8,86] µM.

5.2.4 Glo-Pharmakokinetik aller eingesetzten RTKIs

Nach der separaten Betrachtung der einzelnen RTKIs erfolgte auch noch die gemeinsame Auswertung der pharmakokinetischen Daten, die sich bei der Glo-Messung ergaben. Der statistische Vergleich fand nur an den 12 Kulturen statt, die mit allen 3 Medikamenten behandelt wurden und bei denen 500 Z/well eingesetzt worden sind.

Wie in Abbildung 44 dargestellt, zeigte die statistische Auswertung, dass diverse signifikante Unterschiede zwischen den drei RTKIs vorhanden sind. Am deutlichsten wurde die Divergenz im EC50-Wert: während der EC50 für Dasa um 0,064 [0,030/0,128] µM lag, war er für Nilo bei 9,63 [4,95/13,18] µM und für Ima bei 6,73 [4,44/10,32] µM. Zudem präsentierten sich die Messungen bei Dasa-behandelten Zellen mit deutlich höheren min % (18,7 [9,0/33,2] %) als die beiden anderen Medikamente (Nilo 2,6 [0,0/7,5] % und Ima 0 %). Per definitionem zeigte dies, dass zum Ende des Versuches die Zellen nach Behandlung mit Dasa in eingesetzter Maximalkonzentration nur inaktiv, aber noch lebend waren. Im Gegensatz dazu waren die Zellen am Ende der Verdünnungsreihe bei Nilo überwiegend und bei Ima alle bereits tot.

Ergebnisse aus Glo

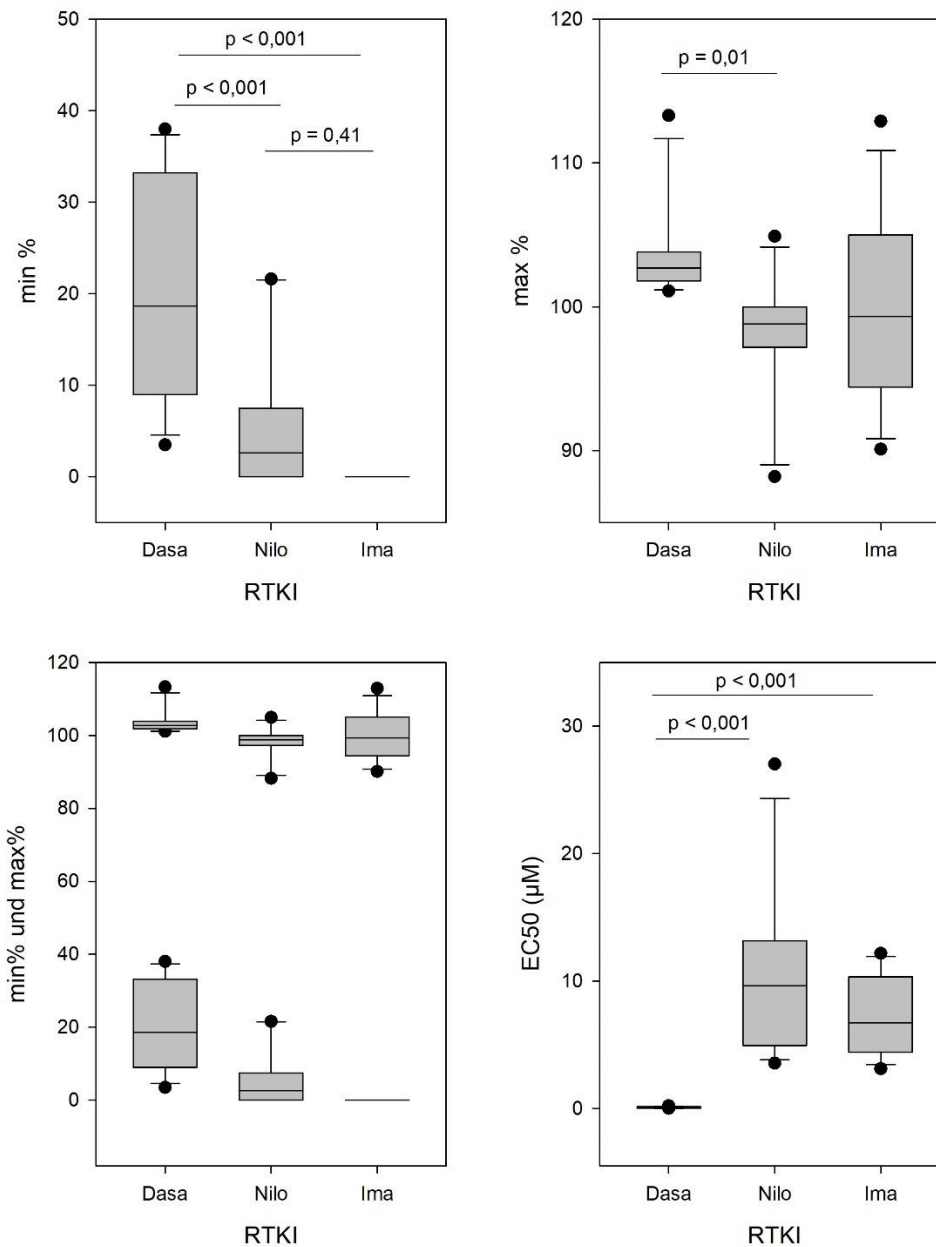


Abbildung 44 Glo-Pharmakokinetik der 500 Z/well-Kulturen mit 3 RTKIs
Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Es sind nur die 12 Kulturen dargestellt, die mit allen 3 Medikamenten behandelt und bei denen 500 Z/well eingesetzt wurden.

5.3 Pharmakokinetik aller eingesetzten RTKIs beider

Messmethoden

Nach der Betrachtung der Wirkung der Medikamente anhand der beiden Messmethoden separat, wurde im Folgenden auch noch ein Vergleich der sich ergebenden Pharmakokinetik zwischen MTS und Glo vollzogen.

Ergebnisse aus Glo

Um einen generellen Überblick über die Ergebnisse im Vergleich zu geben, wurden in der nachfolgenden Abbildung der mittlere EC50, sowie die prozentualen Minimal- und Maximalabsorptionen aus beiden Messmethoden in jeweils einem Boxplot dargestellt. Dies dient ausschließlich dem Überblick.

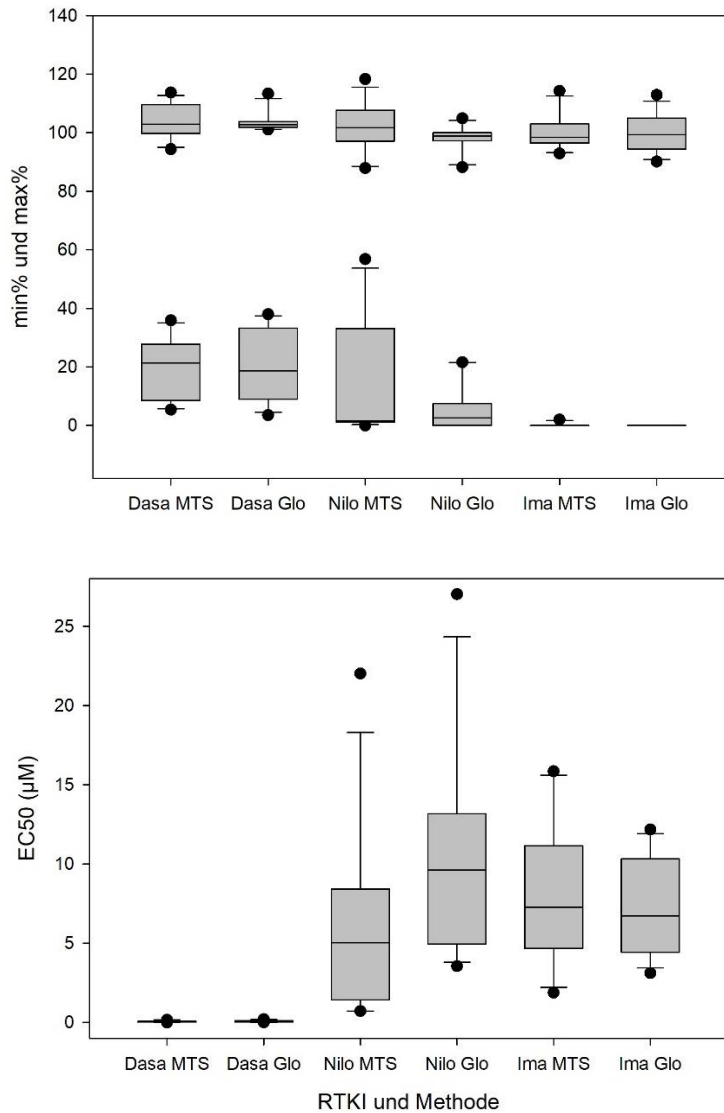


Abbildung 45 Pharmakokinetik aller drei RTKIs in beiden Messmethoden

Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Es wurden nur die 12 Kulturen betrachtet, die mit allen 3 Medikamenten behandelt und 500 Z/well ausgesät wurden. Dasa: MTS min % 21,4 [8,5/27,8] %, Glo min % 18,7 [9,0/33,2] %, MTS max % 103,0 [99,7/109,6] %, Glo max% 102,7 [101,8/103,8] %, MTS EC50 0,045 [0,030/0,088] µM, Glo EC50 0,064 [0,030/0,128] µM; Nilo: MTS min % 1,6 [1,1/33,1] %, Glo min % 2,6 [0,0/7,5] %, MTS max % 102,0 [97,2/107,7] %, Glo max % 98,8 [97,2/100,0] %, MTS EC50 5,04 [1,42/8,42] µM, Glo EC50 9,63 [4,95/13,18] µM; Ima: MTS min % 0 %, Glo min % 0 %, MTS max % 98,5 [96,4/103,0] %, Glo max % 99,4 [94,4/105,0] %, MTS EC50 7,26 [4,68/11,16] µM, Glo EC50 6,73 [4,44/10,32] µM

Zur genaueren Betrachtung der EC50-Werte der einzelnen Medikamente, gemessen mit den beiden Messmethoden, wurden diese in den nachfolgenden Boxplots nochmals separat graphisch dargestellt. Zwischen den beiden Messmethoden

Ergebnisse aus Glo

konnten im EC50 eines jeweiligen RTKIs keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Wie aber bei MTS durch Abbildung 31, bei Glo in Abbildung 44 und bei beiden Messmethoden analog in Abbildung 45 gezeigt, liegt bei Dasa der EC50 bei deutlich geringeren Konzentrationen als bei Nilo oder Ima. So ist die Beachtung der Skalierung bei der nachfolgenden Abbildung von großer Wichtigkeit.

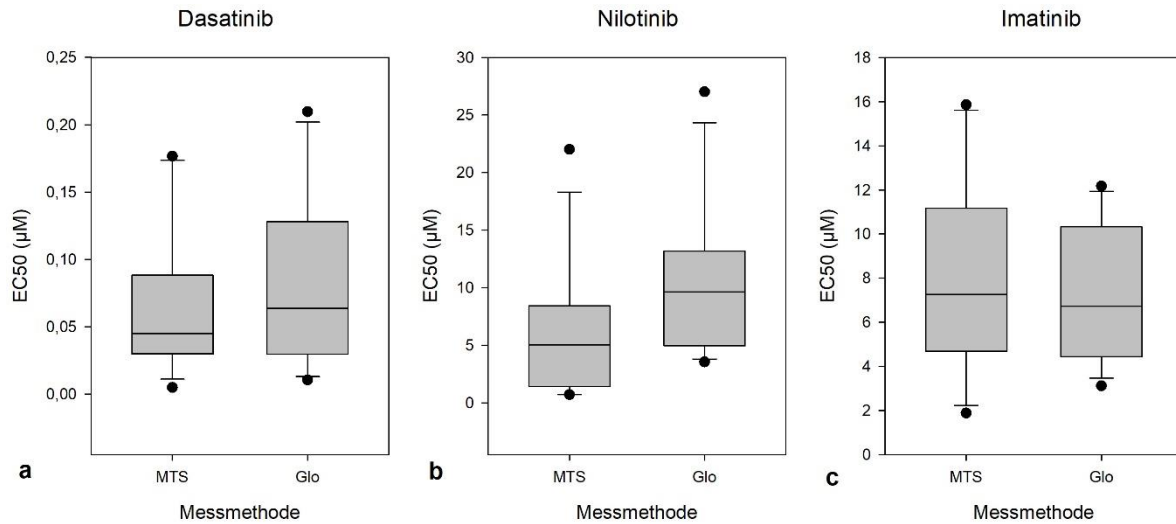


Abbildung 46 EC50-Vergleich der 500 Z/well-Kulturen mit 3 RTKIs
Dargestellt sind Boxplots mit Median, 25/75-Perzentilen, Fehlerbalken mit 10/90-Perzentilen und Ausreißer. Es sind nur die 12 Kulturen dargestellt, die mit allen 3 Medikamenten behandelt und bei denen 500 Z/well eingesetzt wurden. Die unterschiedliche Skalierung ist zu beachten.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der drei RTKIs Dasa, Nilo und Ima auf die Fibroblastenkulturen aus chronisch abgestoßenen versus aus nativen Rattenlungen betrachtet. Hierbei wurden die Kulturen mit den drei Medikamenten in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt, sodass deren Aktivität und Vitalität mittels MTS und Glo gemessen werden konnten. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen Zellen aus der nativen rechten und der abgestoßenen linken Lunge. Es konnte allerdings ein deutlicher Unterschied in der Wirksamkeit der drei Medikamente festgestellt werden, welcher durch den EC50-Wert deutlich gemacht wurde.

6.1 Die Isolierung von Fibroblasten aus nativen und abgestoßenen, transplantierten Lungen lieferte ausreichend Zellmaterial

Es wurde in der vorliegenden Arbeit mit primären Fibroblasten gearbeitet, die aus nativen rechten und abgestoßenen linken Lungen von lungentransplantierten Ratten stammten. Mit den vorhandenen Methoden war es möglich, die Zellen aus kleinen Lungensegmenten, die nicht für andere histologischen und biochemischen Analysen benötigt wurden, zu isolieren und zu kultivieren.

Hintergrund für diese aufwändige Isolierung waren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass Zellen aus pathologisch veränderten Geweben im Vergleich zu Zellen aus gesundem Gewebe ein unterschiedliches Wachstumsverhalten wie auch Funktionsunterschiede (bezüglich Reparatur und Remodelling) aufwiesen (Sugiura et al. 2007; Xu et al. 1998). Bei humanem Gewebe werden beispielsweise Biopsieproben verwendet, um Hautfibroblasten von SSC-Patienten beziehungsweise von gesunden Probanden zu gewinnen und zu kultivieren (Xu et al. 1998). Während Endothelin-1 (ET-1) bei normalen Hautfibroblasten zu einer konsistenten und dosisabhängigen Zunahme der DNA-Synthese führte, zeigten SSC-Fibroblasten ein reduziertes Wachstum und eine verminderte Kollagensynthese. Die Autoren spekulierten, dass diese Unterschiede für die Untersuchung neuer therapeutischer Ansätze für ET-Antagonisten verwendet werden könnten. Ein anderes Beispiel ist die Isolierung von Lungenfibroblasten aus einem Mausmodell für allergisches Asthma, die eine gesteigerte profibrotische Aktivität und verstärkte Reparaturantworten in verschiedenen Funktionsassays zeigten (Sugiura et al. 2007).

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Isolation von Lungenfibroblasten aus Ratten, bei denen eine unilaterale, orthotope, linksseitige LTx durchgeführt worden ist (Matsumura et al. 1995; Hirt et al. 1999; Hirt et al. 2013; Suesskind-Schwendi et al. 2012; Süßkind-Schwendi et al. 2012a). Hierbei wird jeweils einer männlichen Fischer-Ratte (F344) die linke Lunge entnommen und einer männlichen Wistar-Kyoto-Ratte (WKY) orthotop verpflanzt (F344[RT1^{lv1}] → WKY[RT1]). Damit verfügt diese dann über eine native rechte und eine transplantierte linke Lunge. Dieses Transplantationsmodell verzichtet komplett auf eine Immunsuppression. Innerhalb von 14 Tagen kann eine akute Abstoßung beobachtet werden, die dann im weiteren Verlauf (60 bis 100 Tage) zu einer chronischen Abstoßung führt (Matsumura et al. 1995; Süßkind-Schwendi et al. 2012b). Das Modell erlaubt damit die Untersuchung der Wirkung verschiedener Medikamente (Suesskind-Schwendi et al. 2013b; Suesskind-Schwendi et al. 2012; Lehle et al. 2012; Suesskind-Schwendi et al. 2013a; Hirt et al. 2013; Brunner et al. 2013; Suesskind-Schwendi et al. 2016; Suesskind-Schwendi et al. 2017; Keil et al. 2019; Boxhammer et al. 2020). Die Zellgewinnung erfolgte am Tag 60 nach LTx durch Töten der Tiere. Den Empfänger-WKY-Ratten wurden am POD 60 die nativen und transplantierten Lungen entnommen, präpariert und daraus separat Fibroblastenzellkulturen hergestellt. Zu diesem Zeitpunkt liegen bereits Zeichen der chronischen Abstoßung in Form von BO-Korrelaten in den Allografts vor (Hirt et al. 1999; Süßkind-Schwendi et al. 2012a; Suesskind-Schwendi et al. 2017). Um eine Aussage über die potenziell unterschiedliche Sensitivität der vorhandenen Fibroblasten auf diverse Stimuli machen zu können, wurden die Zellen aus den nativen Lungen mit denen aus den transplantierten direkt verglichen. Um interindividuelle Schwankungen zwischen den Tieren zu vermeiden, wurden die Fibroblasten zudem gematched, also linke und rechte Lunge aus demselben Tier verglichen.

Trotz der makroskopischen Beobachtungen, dass sich die explantierten Allografts deutlich in Form, Farbe und Größe von den nativen Lungen unterscheiden (Süßkind-Schwendi et al. 2012a) und der mikroskopisch identifizierten Fibrosierungen des Transplantats in Folge der Abstoßung, lassen sich die Zellen gut aus dem Präparat lösen. Allerdings war es teilweise schwierig, das knorpelige und harte Allograft-Gewebe zu zerkleinern. Die Kultivierung angedauter Gewebeteile rückte in den Hintergrund, da hier die Gefahr einer Pilz- oder Bakterieninfektion erhöht war. Es wurden größtenteils nur filtrierte Zellsuspensionen kultiviert. Vor allem bei den initialen 5'-Kollagenase-Schritten schien die Zellausbeute sehr hoch zu sein. Allerdings werden

durch die Proteasebehandlung neben Einzelzellen auch viele Gewebeaggregate und v. a. tote (abgekugelte) Zellen in die Kulturschale überführt, was zu einer Verfälschung der Messungen führt (Gstraunthaler und Lindl 2021). Die Präparation von Endothelzellen war wenig erfolgreich, da die mitosolierten Fibroblasten bereits in der Initialkultur, aber insbesondere nach dem Passagieren, meist zu einem Überwachsen der kopfsteinpflasterartig wachsenden Endothelzellen führte. Hier wäre eine kostspielige Einzelzellisolierung durch Antikörper-gebundene Beadisolierung oder Zellsortierung notwendig gewesen. Da allerdings der Fokus auf den Fibroblasten lag, da diese als Treiber der Fibrosierung und damit der Abstoßungsreaktion in den Lungenpräparaten vermutet werden, kam es zu keiner Weiterverfolgung der Endothelzellisolierung. Die Fibroblasten zeigten unabhängig vom Entnahmeort in den fortlaufenden Kulturen (bis Passage 4) ein gutes Proliferationsverhalten in annehmbarer Kulturzeit.

6.2 Untersuchung der Pharmakokinetik verschiedener RTKIs mittels Photometrie und Lumineszenz möglich

Die beiden eingesetzten Testsysteme – MTS und Glo – werden typischerweise zur Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Zellen (Zytotoxizität, Zellviabilität) verwendet, um Stoffeffekte oder die Auswirkung anderer Behandlungen zu beurteilen. Sie stellen bei der Suche nach neuen Therapeutika sowie zum weiteren Ausbau unseres Verständnisses der normalen Zellfunktion wertvolle Werkzeuge dar. Es werden zudem wenig Zellen benötigt, da im 96-well-Maßstab gemessen werden kann.

Bei MTS handelt es sich um ein klassisches Tetrazolium-Salz, das bereits länger etabliert ist (Promega Corporation). Es stellt die Weiterentwicklung von MTT dar, das als typische Methode in der Arzneimitteltoxizitätstestung (Stepanenko und Dmitrenko 2015) verwendet wird. Im Gegensatz zu MTT und XTT wird der Löslichkeitsschritt eradiziert, der sich als fehlerbelastet zeigt (Goodwin et al. 1995). Zudem wird MTS oft bevorzugt, da die Menge an Farbstoff proportional zur Zellzahl und der Inkubationszeit mit einem zu testenden Stoff ist (Cory et al. 1991). Die Methode ist sehr einfach, schnell und verlässlich (Mosmann 1983) durchzuführen, weshalb sie sich zum Standard unter den Vitalitätstestungen durchgesetzt hat. Hervorzuheben ist dabei auch die Verwendung dieses Testverfahrens bei Zytotoxizitätsuntersuchungen nach EN ISO 10993-5. Das Verfahren ist in so gut wie jedem Labor verfügbar und kostengünstig. Der Hersteller gibt online einen Preis von circa 302 Euro für 1000

Diskussion

Assays (also 0,30 €/Assay, Stand 09/23) an (Promega Corporation 2012). Dennoch ist die Photometrie ein relativ insensitives Verfahren, sodass die eingesetzte ZZ/well nicht zu gering ausfallen darf, da sonst sehr hohe Streuungen auftreten können. Auch in der vorliegenden Arbeit war die Zahl der ausgesäten Zellen entscheidend. Um Zellmaterial zu sparen und um beide Verfahren vergleichbar zu machen, wurde die Fibroblastenzahl schrittweise auf 500 Z/well reduziert, was zu einer hohen Streuung in der Dreifachbestimmung beim MTS-Test geführt hat. Teilweise lag nach Abzug des Hintergrundrauschens (Blank) die Absorption $< 0,01$.

Weitere Nachteile dieser Methodik: Die Reduktion des Tetrazolium-Salzes kann durch eine Reihe von Faktoren gestört werden, sodass es zu einer Fehlbestimmung der Zellvitalität kommt. Sims und Plattner haben gezeigt, dass Ima einen solchen Einfluss auf MTT besitzt, sodass dieses Verfahren allein nicht genutzt werden kann, um die Wirkung des Medikaments auf Zellen aus soliden Tumoren zu untersuchen. Statt wachstumsmindernde, proapoptotische und antiproliferative Wirkung wie in dem mitgeführten Vergleichsassay zu zeigen, waren die dosisabhängigen Ergebnisse mittels MTT konträr ausfallend (Sims und Plattner 2009). Appel und Kollegen setzten daher neben dem Tetrazolium-Assay ein weiteres Vitalitätsverfahren ein, um die Wirkung des RTKIs Dasa auf Zellen aus soliden Tumoren zu untersuchen (Appel et al. 2017). Die Ursache der Verfälschung des MTT, und im geringeren Ausmaß auch MTS, sehen Stepanenko und Dmitrenko zum einen im adaptiven metabolischen und mitochondrialen Reprogrammieren, das in Zellen erfolgt, die Stress durch Medikamente ausgesetzt sind. Andererseits könnte es sich dabei auch um einen ungewollten Effekt durch die RTKIs handeln (Stepanenko und Dmitrenko 2015). Das zeigt, wie wichtig die genaue Abwägung der Methode zur in-vitro Messung von Zellvitalität und -proliferation ist (Wang et al. 2010). Daher raten vorgenannte Autoren ebenso wie Batool und Kollegen dazu, bei Medikamenten, die einen Einfluss auf das Assay haben, eine weitere Messmethode zu verwenden (Batool et al. 2022). Im Speziellen wird häufig das RealTime Glo-Verfahren genannt.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der RTKIs mit zwei verschiedenen Methoden gemessen. Neben der MTS-Messung wurde zudem auch Glo verwendet. Entgegen der vorbeschriebenen Interaktion zwischen dem Tetrazolium-Salz und den RTKIs, konnten wir keine Verzerrung feststellen. Der Einsatz der Glo-Messung

Diskussion

bestätigte die erhobenen Daten aus dem MTS-Verfahren, sodass keine Unterschiede bezüglich der EC50-Werte festgestellt werden konnten (siehe unten).

Im Gegensatz zu MTS wird bei Glo mit Lumineszenz gearbeitet. Es handelt sich um ein neueres Verfahren, das entweder als kontinuierliche Messung über 72 Stunden oder wie hier als Endpunktbestimmung eingesetzt werden kann (Promega Corporation). Je nachdem für welche der beiden Varianten man sich entscheidet, kann man die nötigen Reagenzien bereits zu Anfang oder wahlweise zu jedem späteren Zeitpunkt (bis eine Stunde vor Ende, um ein valides Ergebnis zu bekommen) während des Versuchs zugeben. Entscheidet man sich für ersteres, erübrigt sich ein späteres Pipettieren und es kann am Ende des Versuchs bequem gemessen werden, ohne einen weiteren Arbeitsschritt ausführen zu müssen. Zudem ist die Abnahme im Lumineszenz-Signal bei Echtzeitmessung so sensibel, dass früh zytotoxische Vorkommnisse in Zellpopulationen, die mit Medikamenten behandelt werden, erkannt werden können (Terry L Riss et al. 2016). Die Beschränkung des Assays auf einen bestimmten Zeitrahmen kann auf die Limitation an Prosubstrat zurückgeführt werden. Metabolisch aktive Zellen setzen das Prosubstrat um, das für die Generierung des Lumineszenzsignals essenziell ist, sodass je nach Zellzahl nur eine bestimmte Zeit lang eine valide Messung durchgeführt werden kann (Terry L Riss et al. 2016). Ein weiteres Problem besteht darin, dass Geräte, die Lumineszenz detektieren können, nicht so häufig in Laboren vorhanden sind wie beispielsweise Photometer, sodass auf die richtige Ausrüstung der Einrichtung geachtet werden muss. Da es sich um ein sehr sensibles Verfahren handelt, ist der Einsatz an Zellmaterial deutlich geringer als bei MTS. Wie in dieser Arbeit gezeigt, musste die Zellzahl schrittweise auf 500 Z/well reduziert werden, um eine Aufrechterhaltung des Wachstums und Verhinderung des Erreichens einer statischen Phase während der 72 Stunden zu garantieren. Obwohl sich das Assay-Kit im Einkaufspreis initial als finanzielle Bürde gezeigt hat, sind die Kosten der Anschaffung in den letzten Jahren deutlich gesunken. Der Hersteller gibt an, dass 100 Assays für circa 122 Euro (also 1,22 €/Assay, Stand 09/23) erhältlich sind (Promega Corporation 2021), sodass es zu einem erschwinglicheren Verfahren geworden ist, auch wenn der Preis immer noch deutlich oberhalb dem des Tetrazolium-Salzes liegt. Dies macht auch laut Posimo und Kollegen das Glo-Verfahren mittlerweile auch attraktiver (Posimo et al. 2014). Einschränkend müssen natürlich auch die höheren Anschaffungskosten für das Messgerät berücksichtigt werden.

Welche Messmethode sich als beste für den jeweiligen Versuchsaufbau zeigt, ist also eine individuelle. Da MTS schnell, einfach und kostengünstig ist, bietet sich dieses Verfahren generell als Endpunktmessung an. Sollten aber nur beschränkt Zellmaterial vorliegen oder werden Medikamente betrachtet, die auf die Reduktion des Salzes Einfluss nehmen, ist ein anderes Verfahren zu bevorzugen. So würde sich beispielsweise Glo anbieten, falls eine Echtzeitmessung gewünscht ist und die finanziellen Ressourcen sowie die technische Ausstattung dies zulassen. Zudem kann diese Methode auch mit weniger Ausgangsmaterial durchgeführt werden als es bei MTS nötig ist, um verlässlich Ergebnisse generieren zu können.

Die MTS-Reaktion der Zellen auf die RTKIs war in der vorliegenden Arbeit unabhängig von der Herkunft (native oder abgestoßene Lunge) und der Passagenzahl (p1-2 versus p3-4). Auf eine niedrige Passagenzahl wird auch in anderen Arbeiten geachtet, um eine Entartung der Zellen durch zu häufiges Passagieren zu vermeiden (Sugiura et al. 2007). Allerdings konnte im vorliegenden Fall auch bei p1 oder p2 kein verändertes Wachstum der Zellen aus der abgestoßenen Lunge beobachtet werden (Xu et al. 1998). Inwieweit hier Kulturbedingungen (Verwendung von hohen FKS-Konzentrationen) einen Einfluss haben, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

6.3 RTKIs zeigen einen signifikanten Unterschied in der Proliferationshemmung von Lungenfibroblasten, unabhängig von der Herkunft und der Passagenzahl

Um eine vergleichbare Aussage über die Wirkung der drei verschiedenen RTKIs auf Fibroblasten in Zellkultur machen zu können, wurde auf den EC50, die halbmaximale Hemmkonzentration zurückgegriffen. Damit keine unnötigen Variablen (z. B. Zellzahl) berücksichtigt werden mussten, wurde die Auswertung auf die Kulturen beschränkt, bei denen alle 3 Medikamente verwendet worden sind und deren Aussaat mit 500 Z/well stattgefunden hat. Dies erlaubte zudem den direkten Vergleich der Messmethoden. Es wurde der EC50 berechnet, der als Mittelwert zwischen dem Minimal- und dem Plateau des Maximalwerts der sigmoidalen Übergangskurve lag (Sebaugh 2011). Bei den drei eingesetzten Substanzen konnten deutliche Unterschiede zwischen den ermittelten EC50-Werten festgestellt werden.

Diskussion

Ima ist ein RTKI der ersten Generation. Er hemmt hauptsächlich die Kinasen von PDGFR und c-Abl, BCR-Abl und c-KIT (Aono et al. 2005; Daniels et al. 2004; Manley et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnten ein medianer EC50 mittels MTS von **7,26 [4,68/11,16] μM** und durch Glo (Endpunktmessung nach 72h) von **6,73 [4,44/10,32] μM** bestimmt werden. Je nach Zelltyp und Assay sind in der Literatur verschiedene EC50-Werte bekannt: Kadivar und Kollegen testeten den antiproliferativen Effekte von Ima auf Brustkrebszell-Linien mittels MTS und erhielten nach 144 Stunden Werte von 5,5 μM bei der Linie MDA-MB-231 und 3,92 μM bei ZR-75-1 (Kadivar et al. 2018). Mit der Kristallviolett-Färbung testeten Johnson und Kollegen die Wirkung von Ima auf Zellen aus Kopf-Hals-Karzinomen (HNSCC), wobei sich Ima-Konzentrationen ergaben, bei denen das Wachstum der Zellen um 50 % inhibiert wurden. Diese Konzentration lag bei 3-10 μM (Johnson et al. 2005a). Anhand der Messung der De-novo-DNA-Synthese mittels Einbau von radioaktiven Thymidin-Nukleotiden zur Zellproliferationsquantifizierung haben Stahtea und Kollegen den wachstumshemmenden Effekt von Ima auf Fibroblasten aus humanen Colon-Karzinomen getestet. Nach Inkubation mit dem Medikament für 48 Stunden lagen die sich ergebenden Werte zwischen 0,3 und 3 μM . Speziell hervorgehoben wurde die Anmerkung, dass sich auch nach 48 Stunden Inkubation mit Ima 5 μM keine morphologischen Veränderungen an den Zellen zeigten (Stahtea et al. 2007). Ebenso testeten Fabarius und Kollegen den RTKI an humanen Hautfibroblasten (NHDF) auf seinen wachstumshemmenden Effekt anhand der Zellzahlen in Kultur. In diesem sogenannten *inhibitory assay* ergab sich ein Wert von 5 μM (Fabarius et al. 2008). Zhang und Kollegen wiesen auch eine wachstumshemmende Wirkung auf die Lungenkarzinom-Zellen A549 durch MTT-Messung bei einer mittleren Konzentration von 2-3 μM nach (Zhang et al. 2003). Bei allen vorgenannten Werten handelt es sich um in-vitro-generierte Werte. In-vivo sollte eine Konzentration von 6 μM nicht überschritten werden, da es ab dieser vermehrt zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen und daraus resultierend zu Therapieabbrüchen kommt (Zhang et al. 2003). Daher ist in-vivo bei SSc-ILD die Einnahme einer Maximaldosis von 600 mg/d empfohlen (Khanna et al. 2011).

Bei **Dasa** handelt es sich um einen RTKI der zweiten Generation, der erstmals bei Ima-resistenter CML zugelassen wurde und eine höhere Rate an komplettem zytogenetischem Ansprechen als dieses zeigt (Abbott 2012). Es ist ein potenter Inhibitor und hemmt spezifisch diverse Kinasen, vor allem BCR-Abl, Src, c-KIT und

Diskussion

PDGFR (Lombardo et al. 2004; Steinberg 2007; Virakul et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit lag der mediane EC50 bei MTS-Messung bei **0,045 [0,030/0,088] μM** , bei Bestimmung mit Glo bei **0,064 [0,030/0,128] μM** . In der Literatur sind je nach Zelltyp und verwendetem Assay unterschiedliche EC50-Werte publiziert: Fabarius und Kollegen haben einen wachstumshemmenden Effekt auf humane Hautfibroblasten (NHDF) im *inhibitory assay* beobachtet und einen Wert von 0,05 μM berechnet (Fabarius et al. 2008). Johnson et al. konnten ebenfalls für Dasa eine inhibitorische Wirkung für die Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie Tu167 bei 0,05 μM und für MDA1968 bei 0,06 μM mittels Kristallviolett-Färbung nachweisen (Johnson et al. 2005b). Eine Proliferationshemmung konnten Serrels und Kollegen bei Dasa-behandelten Colon-Karzinom-Zellen mittels MTT-Messung beobachten. Das Ansprechen variierte je nach Zelllinie stark, am sensitivsten stellten sich die WiDr- (0,03 μM) und HT29-Linie (0,05 μM) dar (Serrels et al. 2006).

Auch **Nilo** ist ein Zweitgenerations-RTKI und wurde ebenso wie Dasa zur Behandlung von Ima-Resistenz und -Intoleranz bei CML zugelassen. Strukturell unterscheidet es sich kaum von Ima, ist aber selektiver und hemmt vor allem BCR-Abl, PDGFR (Weisberg et al. 2005; Kantarjian et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden mediane EC50-Werte von **5,04 [1,42/8,42] μM** durch MTS und **9,63 [4,95/13,18] μM** durch Glo berechnet. In der gängigen Literatur sind durch unterschiedliche Zelltypen und diverse Messmethoden unterschiedliche EC50-Werte zu finden. Fabarius und Kollegen haben auch diesen RTKI 2008 an humanen Hautfibroblasten getestet und dabei zwar keinen wachstumshemmenden Effekt im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen bemerkt, es wird aber ein IC50 von 10 μM angegeben (Fabarius et al. 2008). Weisberg und Kollegen geben einen Wert von 0,01 μM bei der V561D-PDGFR α -Ba/F3-Zelllinie (Gastrointestinaler Stromatumor) durch Trypan-Blau-Färbung an (Weisberg et al. 2006). Manley und Kollegen betrachteten diverse Zelllinien und den inhibitorischen Effekt von Nilo auf diese. Dabei sind sehr unterschiedliche Werte je nach Linie aufgeführt. Am sensitivsten scheinen DDR-1 transfected HEK393 (3.7 \pm 1.2 μM) und DDR-2 transfected HEK393 (5.2 \pm 3.3 μM) zu sein (Manley et al. 2010). Im Gegensatz zu diesen in-vitro-Werten, stehen z.B. auch Fava und Kollegen, die zeigten, dass in der Therapie von CML-Patienten in-vivo-Konzentrationen von 3,6 μM erreicht werden (Fava et al. 2009).

Diskussion

Beim Vergleich der Wirksamkeit von Dasa auf Fibroblasten aus nativem beziehungsweise abgestoßenem Gewebe lag bei hohen Konzentrationen noch eine Restfunktion im Glo-Test von 32 % beziehungsweise 23 % ($p=0.039$) vor. Vergleicht man die Passagenzahl, so war hier bei frühen Passagen (p1-2) der EC50-Wert signifikant niedriger als bei höheren Passagen (p3-4) ($p=0.024$). Inwieweit diese Unterschiede auf die Herkunft beziehungsweise die Passagenzahl zurückzuführen sind, bleibt fraglich. Einschränkend muss jedoch berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Arbeit lediglich Kulturen aus 4 transplantierten Tieren untersucht wurden. Um die Unterschiede abzusichern, müssten die Anzahl der Versuche erhöht werden. Dies ist in Anbetracht der aufwändigen und risikobehafteten Operation nur bedingt möglich. Bei Nilo und Ima konnten keine entsprechenden Unterschiede beobachtet werden. Bei den Kulturen, die mit diesen beiden RTKIs behandelt wurden, erfolgten lediglich Versuche in hoher Passage (p4). Zwischen linker und rechter Lunge lag jeweils kein Unterschied in der Pharmakokinetik vor. Auch hier muss einschränkend berücksichtigt werden, dass nur wenige Kulturen für die Auswertung zur Verfügung standen.

Die pharmakokinetische Wirkung der RTKIs wurde auch in anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe untersucht. Niklas Bogovic hat mithilfe eines Scratch-Assays die Migration von aufgetauten Fibroblasten, die im Zuge der vorliegenden Arbeit präpariert und kryokonserviert wurden, durch dieselben drei RTKIs gehemmt. Im Vergleich wurden deutlich divergierende EC50-Werte bestimmt: Bogovics Experimente ergaben für Ima $2,07 \pm 0,85 \mu\text{M}$, für Dasa $0,05 \pm 0,15 \mu\text{M}$ und für Nilo $1,13 \pm 0,34 \mu\text{M}$ (Bogovic 2022). Auch Annet Kräuter hat den Einfluss derselben Substanzen auf Rattenfibroblasten in einem Kollagen-Kontraktionsassay untersucht. Auch sie hat deutlich andere EC50-Werte bestimmt, wie z.B. bei Dasa $2,4 \mu\text{M}$ (Kräuter 2021). Der Grund für die stark divergierenden Werte liegt in der Wahl der Assays und der Inkubationszeit. Während bei Kräuter die Fibroblasten in Kollagengelen integriert waren und damit eine eingeschränkte Zugänglichkeit des Medikaments vorlag, verwendete Bogovic die Zellen im hyperkonfluenten Zustand, wo durch das Scratch ein zellfreier Raum geschaffen wurde, in den die Zellen einwandern konnten. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Zellen dünn ausgesät und deren tatsächliche Proliferation gemessen.

Diskussion

Es wurden also deutlich unterschiedliche EC50-Werte mit den RTKIs erlangt. Während bei Nilo und Ima die EC50 in dieser Arbeit zwischen 5 und 10 μM lagen, war der Wert für Dasa mit knapp 0,05 μM deutlich niedriger ($p < 0,001$). Das zeigt, dass dieser RTKI deutlich potenter in seiner Hemmfähigkeit ist. Da höhere Dosen in-vivo auch potenziell schlechter vertragen werden, ist generell eine niedrigere Dosierung besser für Patienten, da es weniger häufig zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen kommt.

In den höheren Konzentrationen der RTKIs traten bei den hier vorliegenden Messungen ebenso unterschiedliche Reaktionen durch die Zellen auf: Während die maximalen Konzentrationen von Ima und Nilo zu einer minimalen Absorption führten, konnte bei Dasa noch eine deutliche Restaktivität festgestellt werden. Das wurde mittels Glo auch in der Lumineszenz bestätigt. Dies zeigt, dass die Fibroblasten bei hohen Konzentrationen von vor allem Ima (100 μM) abgestorben waren, bei Dasa (10 μM) hingegen noch vitale, wenn auch stoffwechsellinaktive Zellen vorlagen. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Toxizität durch Dasa deutlich später auftritt und daher eine höhere therapeutische Breite durch dieses Medikament gegeben ist.

Dies scheint darauf hinzuweisen, dass Dasa ein sehr vielversprechendes Medikament ist. Dennoch konnten von Fabarius und Kollegen ein Einfluss von RTKIs auf Stammzellen nachgewiesen werden. Sie behandelten diese über 3 Wochen hinweg mit Dasa, woraufhin sich chromosomale Abberationen und ein Rückgang an Mitosespindeln zeigten. Es konnten zudem G(1)-Phase-Arreste durch diese Substanz nachgewiesen werden, die unter Ima und Nilo nicht auftraten (Fabarius et al. 2008). Zudem wurde eine Teratogenität von RTKIs beschrieben, die wahrscheinlich auf die Hemmung von PDGFR während der Organogenese zurückzuführen ist. Es sind Fälle von Hydrops fetalis bei Einnahme von Dasa während des zweiten Trimesters bekannt. Daher sind RTKIs generell in der Schwangerschaft kontraindiziert (Hochhaus et al. 2020; Rambhatla et al. 2021). Außerdem können unter Ima-Therapie Fälle von Medikamenten-induzierter interstitieller Lungenerkrankung, einer seltenen, aber irreversiblen und schwer verlaufenden Form von Lungenfibrose, auftreten (Zhang et al. 2019). Es gibt Bestrebungen, Medikamente in Oberflächen-inerten Nanopartikel zu verpacken, um sie direkt an den Zielort zu bringen und unerwünschte Wirkungen außerhalb dessen zu minimieren. So stellten beispielsweise Pandolfi und Kollegen Ima-Gold-Nanopartikel her und verabreichten dies intratracheal im Mausmodell, was

Diskussion

unter anderen zu einer reduzierten Tracheallumenobliteration führte (Pandolfi et al. 2020).

Die eingesetzten RTKIs zeigen viele Vorzüge bei einer nicht unerheblichen Menge an unerwünschten Wirkungen. Dennoch sollte der Einsatz der Substanzen nicht kategorisch von der Hand gewiesen werden, da die Wissenschaft kontinuierlich Fortschritte und Weiterentwicklungen erlangt. So sind neben den in der vorliegenden Arbeit genannten RTKIs der ersten und zweiten auch bereits Drittgenerationen bekannt und im Einsatz. Ein Beispiel hierfür ist Ponatanib, das neben Ima, Dasa und Nilo als Erstlinienmedikament bei CML zugelassen wurde (Manouchehri et al. 2020). Es würde sich also anbieten, weiterhin mit neuen Generationen dieser vielversprechenden Substanzen zu versuchen, die chronische Lungentransplantatsabstoßung zu verhindern. Ansätze zur Behandlung von CLAD mittels Antifibrotika gibt es bereits in Form von Fallberichten und Beobachtungsstudien. Größere, randomisierte, multizentrale Studien befassen sich derzeit z.B. mit Pirfenidon (NCT03473340) und Nintedanib (NCT03283007). Ergebnisse hierzu stehen aber noch aus.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die LTx hat sich durch die massiven Fortschritte in den letzten 60 Jahren als echte Therapieoption für Patienten mit Lungenerkrankungen im Endstadium entwickelt. Dennoch liegt die LTx in Bezug auf Langzeitüberleben deutlich hinter dem von Transplantationen anderer solider Organe zurück (Gauthier et al. 2016). Die Hauptursache hierfür ist CLAD, mit seinem häufigsten Vertreter BOS. Dabei handelt es sich um eine ernst zu nehmende Erkrankung, die nach einer chronischen Inflammation in einer fibroproliferativen Veränderung des Organs mündet und bis zu einem Transplantatversagen führt (Belperio et al. 2009). Die Früherkennung und adäquate Behandlung von BOS sind essenziell. Allerdings fehlt es an effektiven und langfristigen Therapien.

Da BOS auf einem fibroproliferativen Prozess beruht, sind Antifibrotika zunehmend in den Fokus der aktuellen Forschung geraten. Bei anderen fibrotischen Lungenerkrankungen wie beispielsweise der IPF oder der SSc-ILD sind bereits sehr gute Ergebnisse mit antifibrotischen Medikamenten erzielt worden (Distler et al. 2019; Bos et al. 2021), sodass es zu einer Zulassung von Pirfenidon und Nintedanib zur Therapie eben genannter Erkrankungen kam. Erste größere Studien zum Einsatz von Antifibrotika bei CLAD (NCT03473340, NCT03283007) sind in Arbeit.

Auch im Tiermodell zeigen Pirfenidon und Nintedanib vielversprechende Ergebnisse bei CLAD. So konnte im Rattenmodell eine deutliche Reduktion von fibrotischen Veränderungen unter Pirfenidon nachgewiesen werden. Der Effekt wurde unter Kombinationstherapie mit Everolimus noch deutlicher (Suesskind-Schwendi et al. 2016). Ebenso erwirkte der gleichzeitige Einsatz von Everolimus und Ima im Rattenmodell eine signifikante Abnahme der AR. Die Hälfte der Tiere war zudem nach Abschluss der Versuche ohne Anzeichen für BOS. Bereits unter Monotherapie mit Ima fanden sich Ratten ohne Zeichen der CR in der Kohorte (Suesskind-Schwendi et al. 2013a). Diese Studien zeigen, dass der RTKI ein großes Potenzial bei der Bekämpfung der fibroproliferativen Organveränderung an Rattenlungen besitzt. Daher bietet sich die genauere Betrachtung der Proliferationshemmung von Fibroblasten unter RTKI an.

Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mittels den RTKIs Ima, Nilo und Dasa durchgeführt. Es erfolgte eine Betrachtung des Einflusses der Medikamente auf die Proliferation von Fibroblasten in Zellkultur. Nachdem verschiedene Arbeitsgruppen

Zusammenfassung und Ausblick

(Sugiura et al. 2007; Xu et al. 1998) festgestellt haben, dass sich Zellen aus erkranktem Gewebe anders verhalten als die aus gesundem, bot es sich an, ein Tiermodell zu wählen, in dem native und abgestoßene Fibroblasten vorliegen. Das Rattenmodell der unilateralen, orthotopen, linksseitigen LTx nach Matsumura und Kollegen (Matsumura et al. 1995) war naheliegend, da hierbei die rechten Lungen nativ im Tier verbleiben und die linken, transplantierten eine chronische Abstoßungsreaktion zeigen. Es muss zudem keine Immunsuppression gegeben werden.

Deshalb sind für die vorliegende Arbeit Fibroblasten präpariert worden, die aus verfügbarem Gewebe für andere Forschungszwecke stammten. Die Lungen wurden den Ratten 60 Tage nach LTx entnommen. Bei der Präparation entstanden Fibroblastenkulturen aus den nativen rechten und den transplantierten linken Lungen. Diese wurden in verschiedenen Passagen mit den RTKIs behandelt. Anschließend erfolgte eine Messung der Aktivität und Vitalität der Zellen mittels Photometrie (MTS) und Lumineszenz (Glo). Für die Auswertung wurde auf den EC50 zurückgegriffen.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied zwischen den Fibroblasten aus den linken und rechten Lungen gezeigt werden. Ebenso wurde beim Vergleich der frühen (p1-p2) und späten (p3-p4) Passagen keine Abweichung der Daten zueinander gesehen. Die beiden Messmethoden lieferten zudem ähnliche Werte, sodass auch kein Einfluss der RTKIs auf MTS nachgewiesen werden konnte. Ein großer Unterschied zeigte sich dennoch: Während die EC50 von Nilo und Ima bei Werten um 10 μM lagen, wurden für Dasa Werte um 0,05 μM bestimmt. Die Medikamente wurden in einem Konzentrationsbereich über 5 log-Stufen (Dasa 0,001-10 μM , Ima 0,01-100 μM) betrachtet, in dem jeweils die Bestimmung des EC50 erfolgte. Es konnte gezeigt werden, dass die Fibroblasten am oberen Ende der eingesetzten Konzentrationen von vor allem Ima (100 μM) bereits tot, bei Dasa (10 μM) zwar auch inaktiv, aber noch vital waren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die RTKIs Dasa, Nilo und Ima die Proliferation von Fibroblasten in Zellkultur hemmen können. Dasa bewerkstelligt dies bereits mit der niedrigeren Konzentration. Auch wenn es sich hierbei um Medikamente mit z.T. schweren unerwünschten Wirkungen (Fabarius et al. 2008; Zhang et al. 2019) handelt, sind die Ergebnisse vielversprechend, sodass sich weitere Studien mit RTKIs, vor allem mit Dasa, anbieten, da sie eine mögliche Therapieoption für BOS darstellen könnten.

8 Anhang

8.1 Zellkulturflächen und Reagenzien

Zum Passagieren der Zellen in Kultur waren verschiedene Reagenzien in den richtigen Mengen nötig. Die nachfolgende Tabelle dient zur Übersicht über die Fläche der verwendeten Zellkulturart und der Menge an jeweils benötigten Substanzen.

Name	Fläche [cm ²]	Medium [ml]	PBS-Puffer [ml]	Gelatine [ml]	Trypsin [ml]
24-well	1,8	0,5	2 x 1,0	0,2	0,2
12-well	3,5	1,0	2 x 1,0	0,5	0,5
6-well	9,6	3,0	2 x 3,0	1,0	1,0
t25	25	5,0	2 x 5,0	3,0	3,0
t75	75	15,0	2 x 10,0	6,0	6,0

Tabelle 18 Zellkulturflächen und Reagenzien-Menge

Aufstellung der Fläche und der benötigten Mengen an Medium zur Inkubation, an PBS-Puffer zum Waschen, an Gelatine zum Gelatinieren für Endothelzellkulturen und an Trypsin zum Ablösen der Zellen für die jeweiligen Zellkulturarten.

8.2 Zellkulturverlauf

Die nachfolgenden Flussdiagramme zeigen, welche Kulturen aus den einzelnen Rattenlungen entstanden und wie der weitere Verlauf der Zellkulturen war. Dabei sind je die Passage (p1 - p4) inklusive der Kulturgröße (z.B. t25, 6 well, etc.) aufgeführt. Mit Farbe wird verdeutlicht, welche Kulturen in welcher Passage in Versuch gegangen sind (gelb), welche Zellen eingefroren oder für andere Projekte verwendet wurden (blau) und welche Kulturen aufgelöst wurden, da Hindernisse wie Schimmelbildung oder Beschriftungsfehler aufgetreten sind (rot).

Bei der Präparation der Rattenlunge 1 kam es zu einer möglichen Verunreinigung eines Teils der linken, transplantierten Lunge. Zur Vermeidung eines kompletten Verlustes des Allografts wurde die Lunge vorsichtshalber in einen Teil A (möglicherweise verunreinigt) und einen Teil B (weiterhin steril) geteilt. Anschließend wurde weiter nach Protokoll verfahren.

8.2.1 Ratte 1

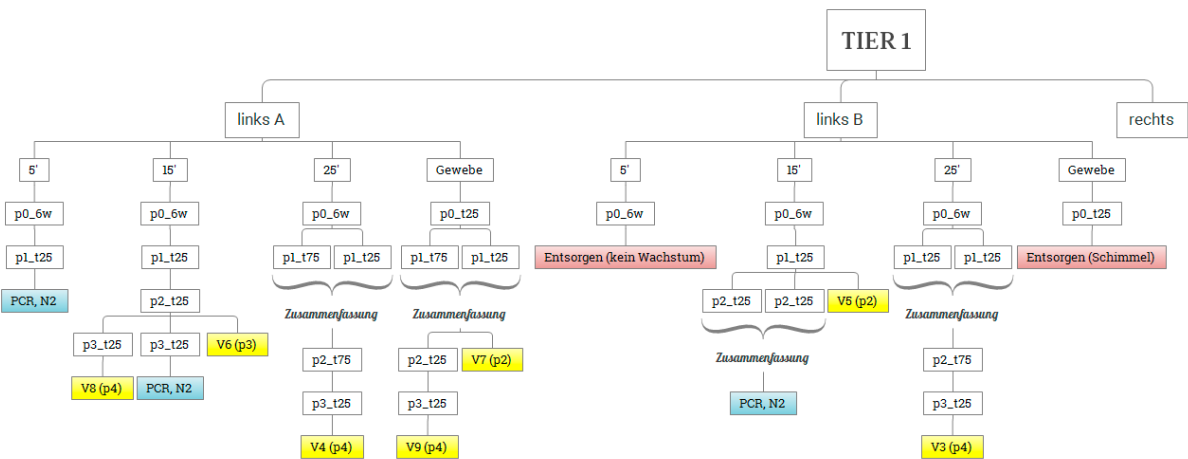


Abbildung 47 Flussdiagramm zur linken Lunge der Ratte 1
 Es wird die Abfolge der Zellkulturen aus der Präparation gezeigt. Aus den Fibroblasten aus dieser Lunge wurden 7 Kulturen in Versuch genommen, zwei Kulturen mussten verworfen werden. Die übrigen Zellen wurden kryokonserviert.

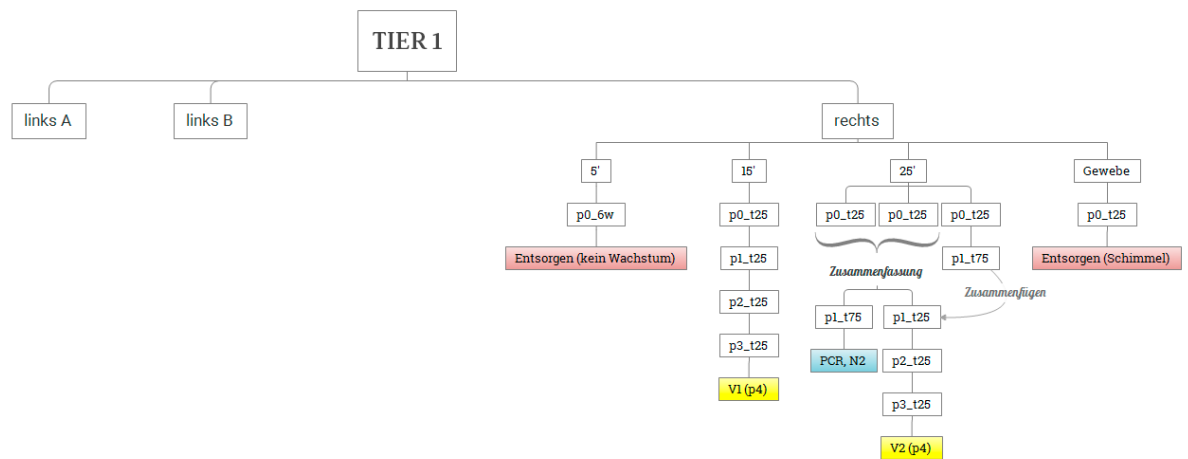


Abbildung 48 Flussdiagramm zur rechten Lunge der Ratte 1
 Es wird die Abfolge der Zellkulturen aus der Präparation gezeigt. Aus den Fibroblasten aus dieser Lunge wurden 2 Kulturen in Versuch genommen, zwei Kulturen mussten verworfen werden. Die übrigen Zellen wurden kryokonserviert.

8.2.2 Ratte 2

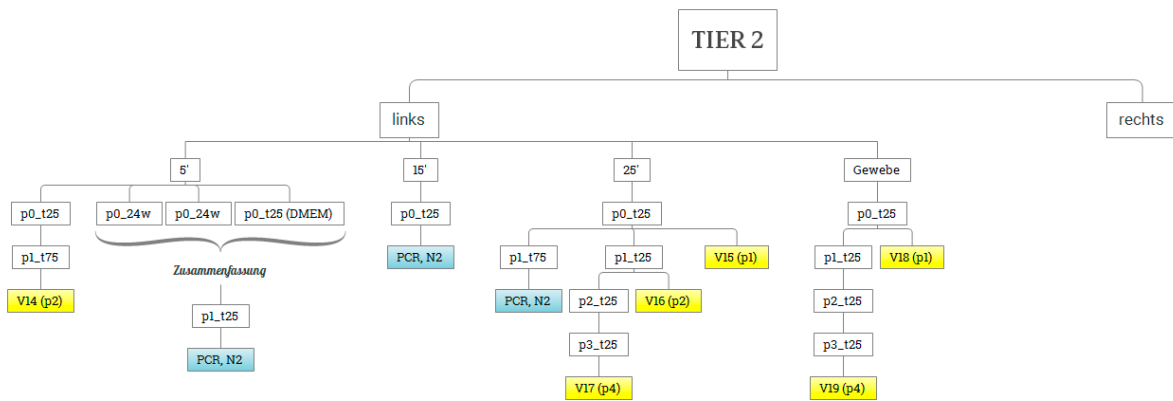


Abbildung 49 Flussdiagramm zur linken Lunge der Ratte 2
 Es wird die Abfolge der Zellkulturen aus der Präparation gezeigt. Aus den Fibroblasten aus dieser Lunge wurden 6 Kulturen in Versuch genommen. Die übrigen Zellen wurden kryokonserviert.

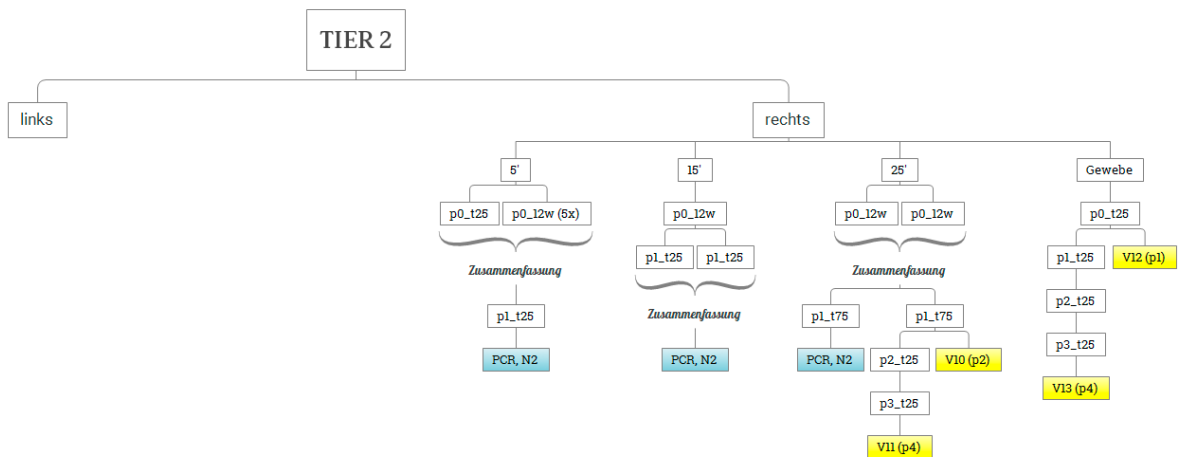


Abbildung 50 Flussdiagramm zur rechten Lunge der Ratte 2
 Es wird die Abfolge der Zellkulturen aus der Präparation gezeigt. Aus den Fibroblasten aus dieser Lunge wurden 4 Kulturen in Versuch genommen. Die übrigen Zellen wurden kryokonserviert.

8.2.3 Ratte 3

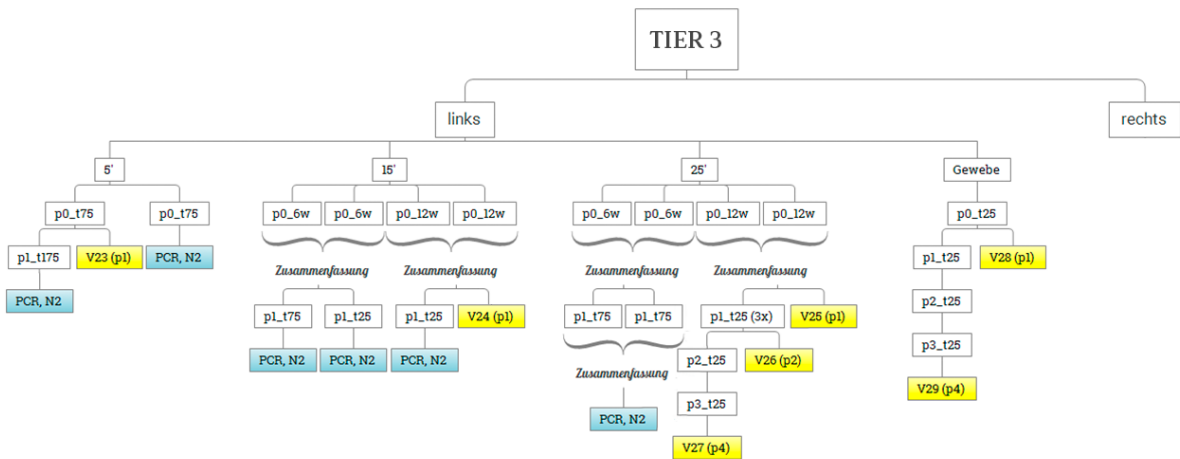


Abbildung 51 Flussdiagramm zur linken Lunge der Ratte 3
 Es wird die Abfolge der Zellkulturen aus der Präparation gezeigt. Aus den Fibroblasten aus dieser Lunge wurden 7 Kulturen in Versuch genommen. Die übrigen Zellen wurden kryokonserviert.

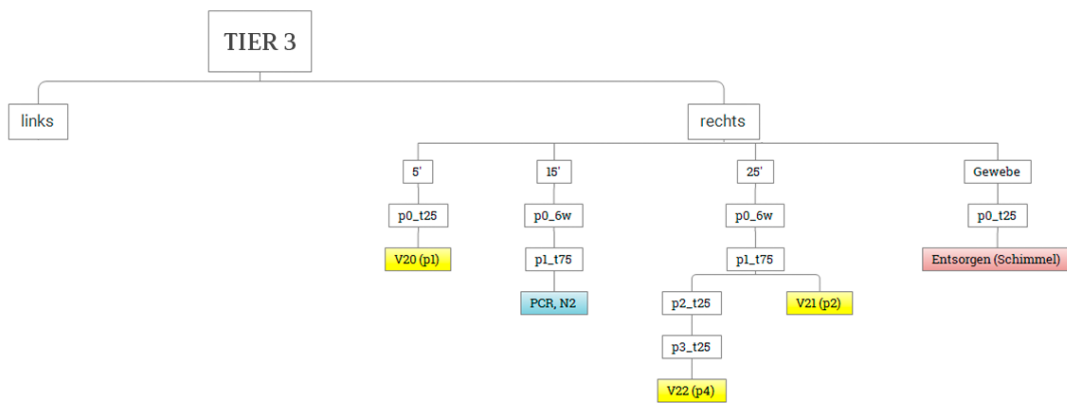


Abbildung 52 Flussdiagramm zur rechten Lunge der Ratte 3
 Es wird die Abfolge der Zellkulturen aus der Präparation gezeigt. Aus den Fibroblasten aus dieser Lunge wurden 3 Kulturen in Versuch genommen, eine Kultur mussten verworfen werden. Die übrigen Zellen wurden kryokonserviert.

8.2.4 Ratte 4

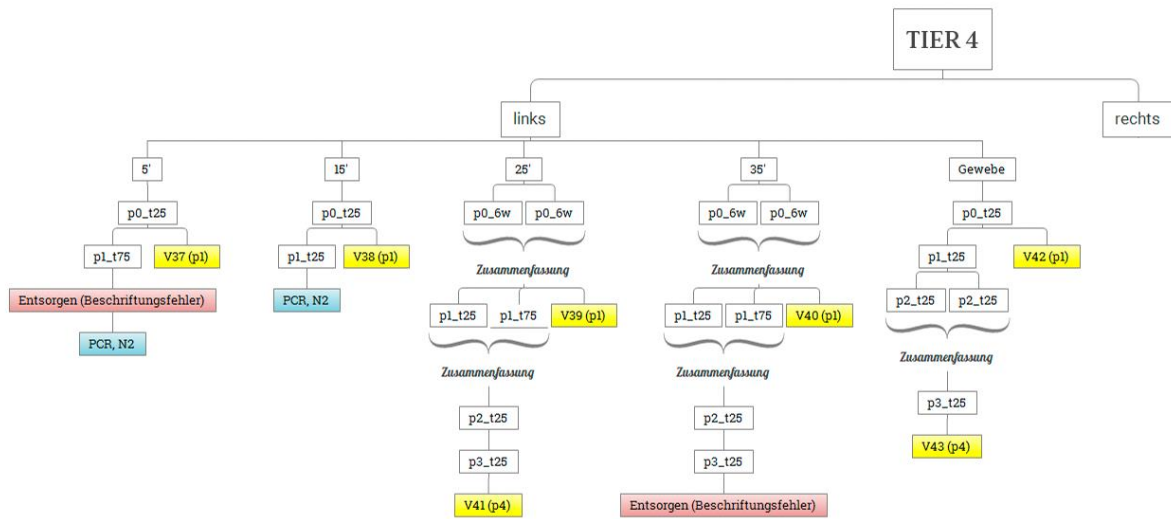


Abbildung 53 Flussdiagramm zur linken Lunge der Ratte 4
 Es wird die Abfolge der Zellkulturen aus der Präparation gezeigt. Aus den Fibroblasten aus dieser Lunge wurden 7 Kulturen in Versuch genommen, zwei Kulturen mussten verworfen werden. Die übrigen Zellen wurden kryokonserviert.

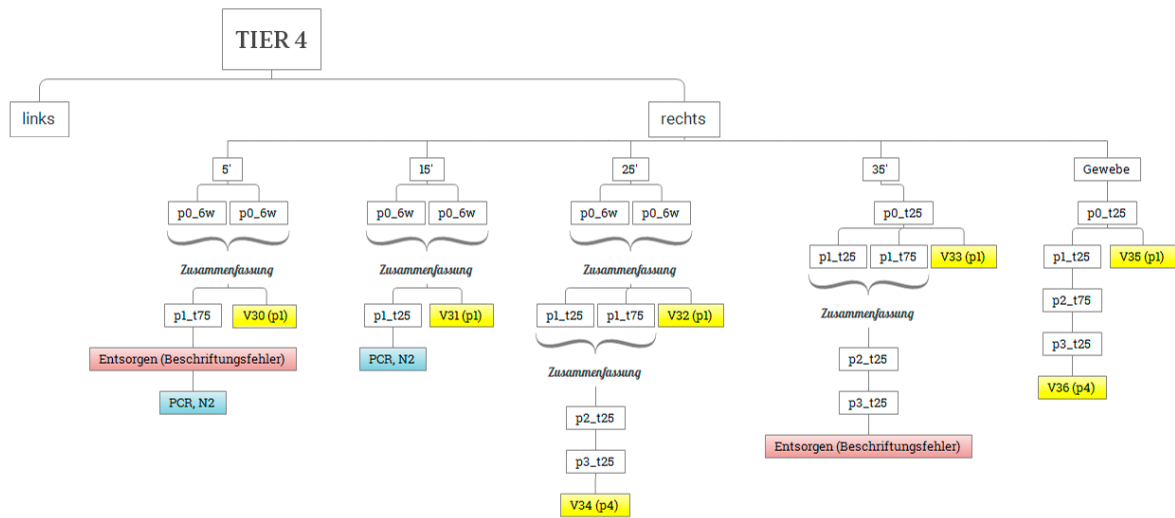


Abbildung 54 Flussdiagramm zur rechten Lunge der Ratte 4
 Es wird die Abfolge der Zellkulturen aus der Präparation gezeigt. Aus den Fibroblasten aus dieser Lunge wurden 7 Kulturen in Versuch genommen, zwei Kulturen mussten verworfen werden. Die übrigen Zellen wurden kryokonserviert.

8.3 Übersicht der Kulturen

Insgesamt wurden die proliferationshemmende Wirkung der 3 RTKIs an 43 (davon 5 Endothelzell- und 38 Fibroblasten-) Kulturen getestet. Die nachfolgende Tabelle dient der Übersicht über diese. Darin sind jeweils aufgeführt, aus welchem Tier und Lunge die Zellen stammen, aus welchem Präparationsschritt (Coll. [min]) sie kamen, mit

Anhang

welchem Medium sie kultiviert wurden, in welcher Passage (Pass.) sie in Versuch gingen, welche Zellzahl (ZZ/well) ausgesät und mit welchem Gerät die Proliferationshemmung welcher Medikamente (Med.) in welcher Verdünnung (Dasa [μ M], Nilo [μ M], Ima [μ M]) gemessen wurde.

Die Spalte „Gerät“ gibt an, welche Apparatur für die Messung verwendet wurde. Die Angabe erfolgt in Tabelle 19 im Stil „Gerät für die Absorptionsmessung / Gerät für die Lumineszenzmessung“. Die Absorptionsbestimmung erfolgte in 9 Kulturen sowohl mit Varioskan als auch mit SOFTmax (V+S), in 15 Kulturen ausschließlich mit Varioskan (V) und in 19 nur mit SOFTmax (S). Die Lumineszenz wurde bei 24 Kulturen mit Varioskan gemessen, bei den restlichen 19 wurde auf Tecan (T) zurückgegriffen.

KNr.	Kulturname	Tier	Lunge	p	ZZ/well	Medium	Coll. [min]	V.Datum	Gerät	Med.	Dasa [μ M]	Nilo [μ M]	Ima [μ M]
1	1_DMEM_re_15	1	re	4	3000	mDMEM	15	150429	V+S/V	DNI	1 - 0,001	20 - 0,01	20 - 0,01
2	1_DMEM_re_25	1	re	4	3000	mDMEM	25	150429	V+S/V	DNI	1 - 0,001	20 - 0,01	20 - 0,01
3	1_DMEM_liB_25	1	li	4	3000	mDMEM	25	150429	V+S/V	DNI	1 - 0,001	20 - 0,01	20 - 0,01
4	1_DMEM_liA_25	1	li	4	1000	mDMEM	25	150508	V+S/V	DNI	10 - 0,001	50 - 0,01	100 - 0,01
5	1_DMEM_liB_15	1	li	2	1000	mDMEM	15	150508	V+S/V	D	10 - 0,001		
6	1_DMEM_liA_15	1	li	3	1000	mDMEM	15	150508	V+S/V	D	10 - 0,001		
7	1_DMEM_liA_G	1	li	2	500	mDMEM	25	150515	S/T	D	10 - 0,001		
8	1_DMEM_liA_15	1	li	4	1500	mDMEM	15	150515	S/T	DNI	10 - 0,001		
9	1_DMEM_liA_G	1	li	4	500	mDMEM	25	150526	S/T	DNI	10 - 0,001	50 - 0,01	100 - 0,01
10	2_DMEM_re_25	2	re	2	500	mDMEM	25	150515	S/T	D	10 - 0,001		
11	2_DMEM_re_25	2	re	4	500	mDMEM	25	150526	S/T	DNI	10 - 0,001	50 - 0,01	100 - 0,01
12	2_DMEM_re_G	2	re	1	500	mDMEM	25	150601	V/V	D	10 - 0,001		
13	2_DMEM_re_G	2	re	4	500	mDMEM	25	150619	V/V	DNI	10 - 0,001	50 - 0,01	100 - 0,01
14	2_M199_li_5	2	li	2	750	mM199	5	150515	S/T	D	10 - 0,001		
15	2_DMEM_li_25	2	li	1	1000	mDMEM	25	150508	V+S/V	D	10 - 0,001		
16	2_DMEM_li_25	2	li	2	500	mDMEM	25	150515	S/T	D	10 - 0,001		
17	2_DMEM_li_25	2	li	4	500	mDMEM	25	150526	S/T	DNI	10 - 0,001	50 - 0,01	100 - 0,01
18	2_DMEM_li_G	2	li	1	500	mDMEM	25	150601	V/V	D	10 - 0,001		
19	2_DMEM_li_G	2	li	4	500	mDMEM	25	150619	V/V	DNI	10 - 0,001	50 - 0,01	100 - 0,01
20	3_M199_re_5	3	re	1	750	mM199	5	150515	S/T	D	10 - 0,001		

Anhang

21	3_DMEM_re_25	3	re	2	500	mDMEM	25	150515	S/T	D	10 - 0,001		
22	3_DMEM_re_25	3	re	4	500	mDMEM	25	150526	S/T	DNI	10 - 0,001	50 - 0,01	100 - 0,01
23	3_M199_li_5	3	li	1	750	mM199	5	150508	V/V	D	10 - 0,001		
24	3_DMEM_li_15	3	li	1	1000	mDMEM	15	150508	V+S/V	D	10 - 0,001		
25	3_DMEM_li_25	3	li	1	1000	mDMEM	25	150508	V+S/V	D	10 - 0,001		
26	3_DMEM_li_25	3	li	2	500	mDMEM	25	150515	S/T	D	10 - 0,001		
27	3_DMEM_li_25	3	li	4	500	mDMEM	25	150526	S/T	DNI	10 - 0,001	50 - 0,01	100 - 0,01
28	3_DMEM_li_G	3	li	1	500	mDMEM	25	150601	V/V	D	10 - 0,001		
29	3_DMEM_li_G	3	li	4	500	mDMEM	25	150619	V/V	DNI	10 - 0,001	50 - 0,01	100 - 0,01
30	4_M199_re_5	4	re	1	750	mM199	5	150601	V/V	D	10 - 0,001		
31	4_DMEM_re_15	4	re	1	500	mDMEM	15	150522	S/T	D	10 - 0,001		
32	4_DMEM_re_25	4	re	1	500	mDMEM	25	150522	S/T	D	10 - 0,001		
33	4_DMEM_re_35	4	re	1	500	mDMEM	35	150522	S/T	D	10 - 0,001		
34	4_DMEM_re_25	4	re	4	500	mDMEM	25	150606	V/V	D	10 - 0,001		
35	4_DMEM_re_G	4	re	1	500	mDMEM	35	150619	V/V	D	10 - 0,001		
36	4_DMEM_re_G	4	re	4	500	mDMEM	35	150713	V/V	DNI	10 - 0,001	50 - 0,01	100 - 0,01
37	4_M199_li_5	4	li	1	750	mM199	5	150601	V/V	D	10 - 0,001		
38	4_DMEM_li_15	4	li	1	500	mDMEM	15	150522	S/T	D	10 - 0,001		
39	4_DMEM_li_25	4	li	1	500	mDMEM	25	150522	S/T	D	10 - 0,001		
40	4_DMEM_li_35	4	li	1	500	mDMEM	35	150522	S/T	D	10 - 0,001		
41	4_DMEM_li_25	4	li	4	500	mDMEM	25	150606	V/V	DNI	10 - 0,001	50 - 0,01	100 - 0,01
42	4_DMEM_li_G	4	li	1	500	mDMEM	35	150606	V/V	D	10 - 0,001		
43	4_DMEM_li_G	4	li	4	500	mDMEM	35	150619	V/V	DNI	10 - 0,001	50 - 0,01	100 - 0,01

Tabelle 19 Kultur-Übersicht

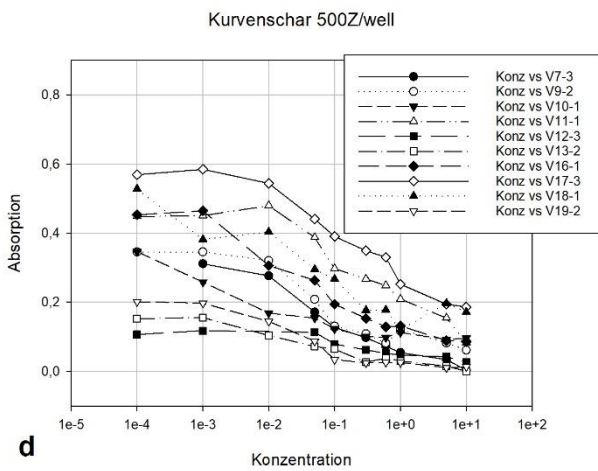
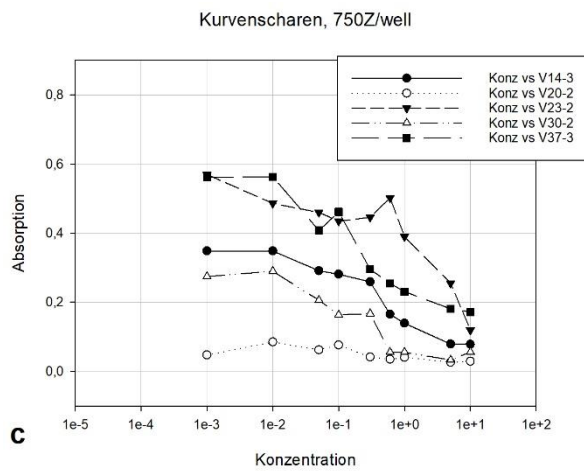
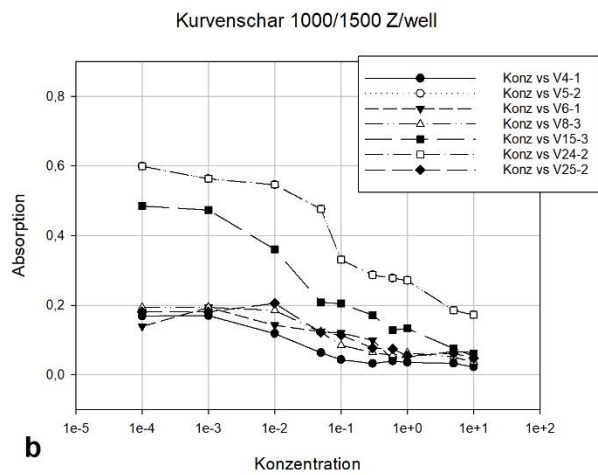
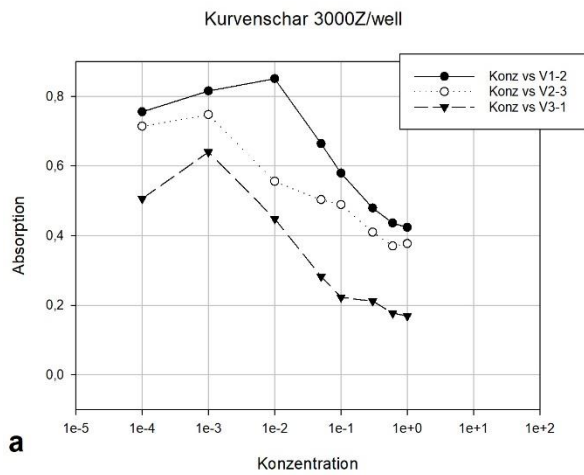
Tabellarische Auflistung über die Details zu den Kulturen 1 bis 43. KNr.: Kulturnummer; re: rechts; li: links; p: Passage; ZZ/well: eingesetzte Zellzahl pro well; Coll. [min]: Kollagenase-Einwirkzeit in min; V.Datum: Versuchsdatum; V: Varioskan; S: SOFTmax; T: Tecan; Med.: Medikamente; DNI: Dasa, Nilo, Ima; D: Dasa.

8.4 MTS-Kurvenscharen

In 4.2 wurden bereits einzelne Absorptionskurven gezeigt, der Vollständigkeit halber sind im Folgenden alle Kulturen mit jeweils einer Einzelbestimmungskurve aufgeführt.

8.4.1 Dasa

Alle Kulturen wurden unabhängig von Passage und eingesetzter Zellzahl mit Dasa behandelt. Bei den ersten drei Kulturen erfolgte eine Absorptionsmessung bei 3000 Z/well und einer Maximalkonzentration von Dasa von 1 μM . Die nachfolgenden Kulturen sind mit weniger Zellen und einer höheren Endkonzentration (10 μM) in Versuch genommen worden.



Anhang

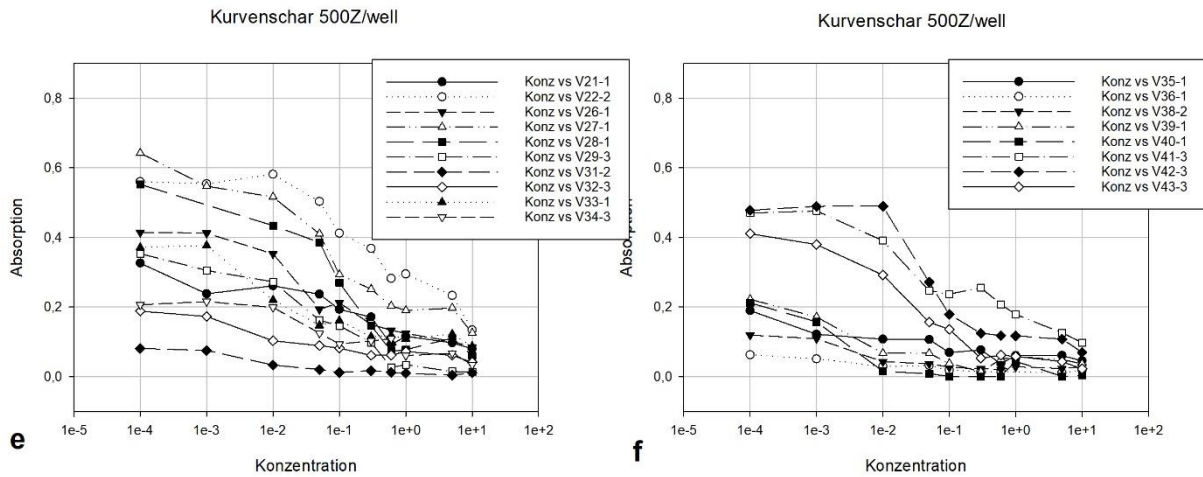
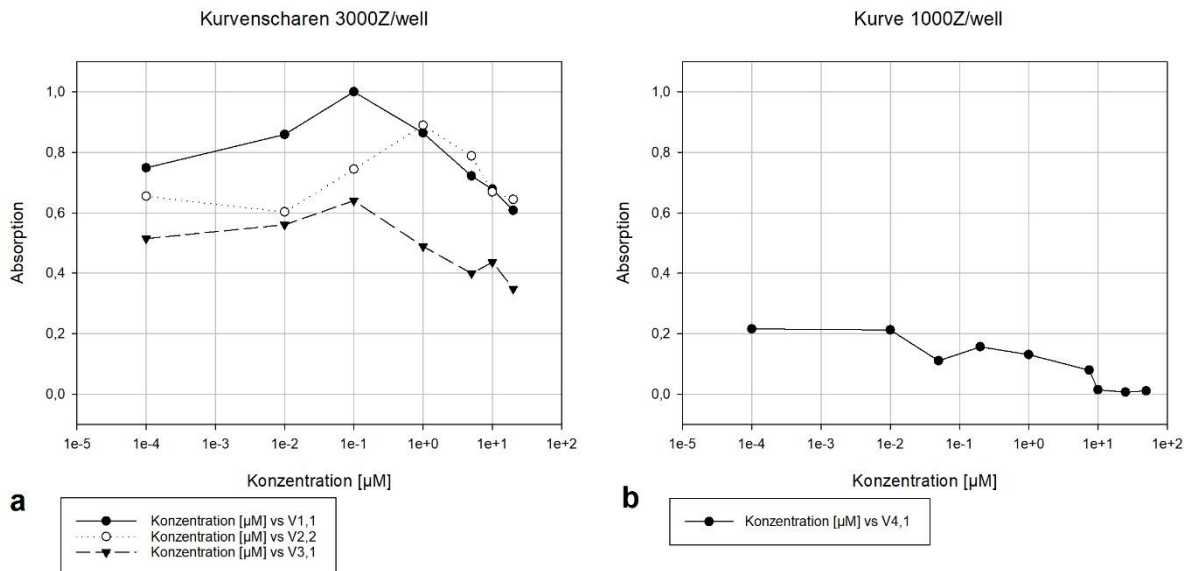


Abbildung 55 MTS-Dasa-Kurvenscharen

Graphische Darstellung der Absorption der einzelnen Kulturen nach Behandlung mit Dasa. Es handelt sich um maximal eine Kurve pro Kultur. a: Kulturen mit 3000 Z/well; b: Kulturen mit 1000 Z/well; c: Endothelzellkulturen mit 750 Z/well; d-f: Kulturen mit 500 Z/well, für die Übersichtlichkeit aufgetrennt in 3 Graphen.

8.4.2 Nilo

Nur Kulturen in später Passage wurden mit Nilo behandelt. Mit Ausnahme von 4 Kulturen (V1-4) lag die eingesetzte Zellzahl immerzu bei 500 Z/well. Die Absorptionsmessung an den ersten 3 Kulturen erfolgte zudem mit einer Maximalkonzentration von 20 μM Nilo, in den folgenden Versuchen wurde diese auf 50 μM erhöht.



Anhang

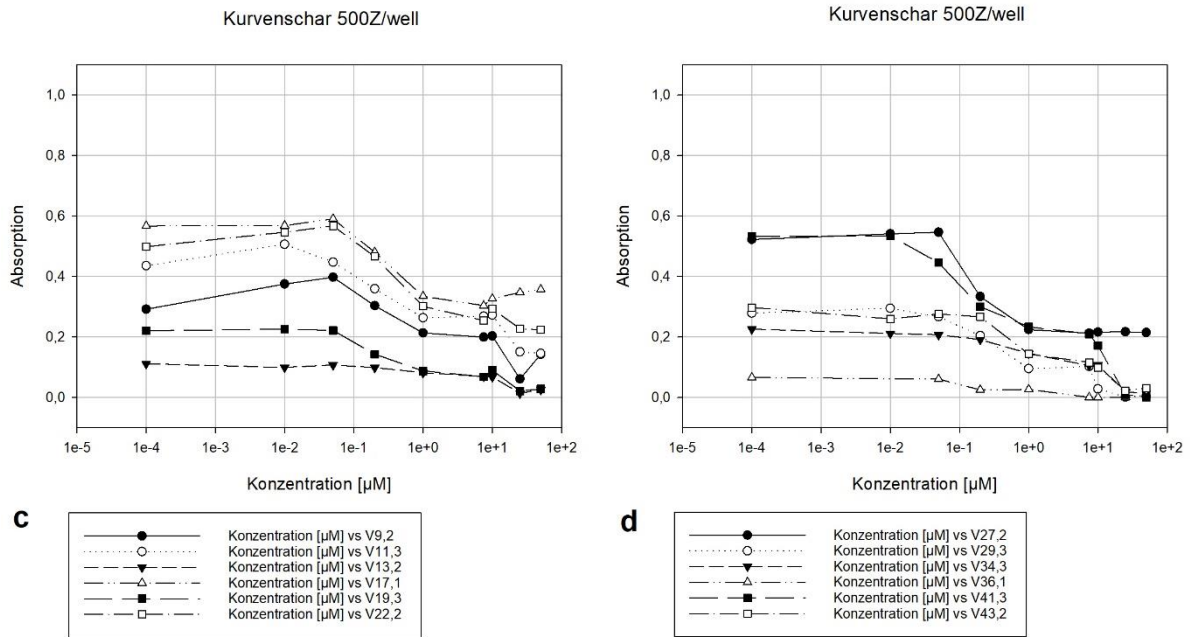
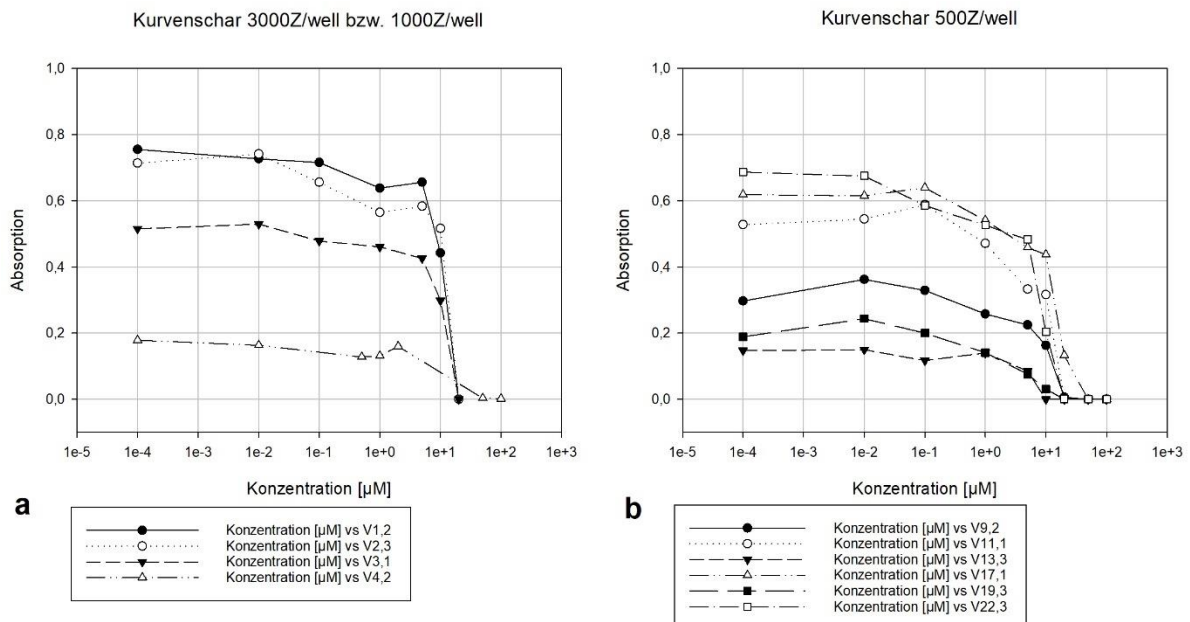


Abbildung 56 MTS-Nilo-Kurvenscharen
Graphische Darstellung der Absorption der einzelnen Kulturen nach Behandlung mit Nilo. Es handelt sich um maximal eine Kurve pro Kultur. a: Kulturen mit 3000 Z/well; b: Kultur mit 1000 Z/well; c+d: Kulturen mit 500 Z/well, für die Übersichtlichkeit aufgetrennt in 2 Graphen.

8.4.3 Ima

Ebenso wie bei Nilo wurden nur Kulturen in später Passage mit Ima behandelt, die Mehrzahl hiervon lagen mit 500 Z/well vor (Ausnahme V 1-4) und wurde mit einer Maximalkonzentration von 100 µM Ima angesetzt. Bei den ersten 3 Kulturen erfolgte die Messung der Absorption mit höchstens 20 µM des RTKIs.



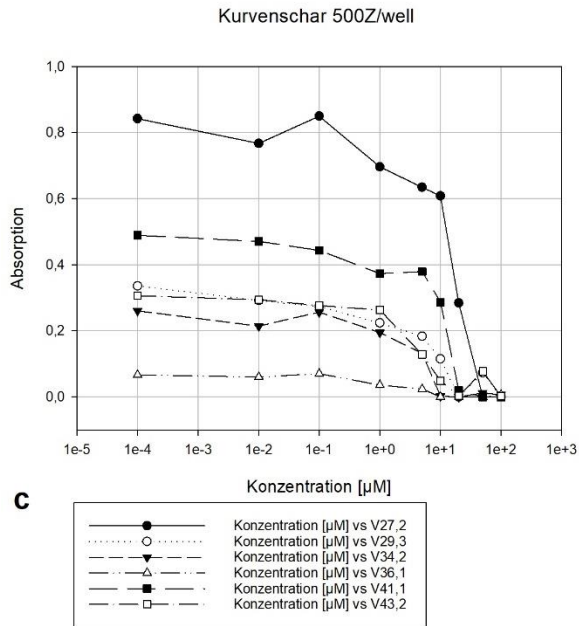


Abbildung 57 MTS-Ima-Kurvenscharen

Graphische Darstellung der Absorption der einzelnen Kulturen nach Behandlung mit Ima. Es handelt sich um maximal eine Kurve pro Kultur. a: Kulturen mit 3000 oder 1000 Z/well; b+c: Kulturen mit 500 Z/well, für die Übersichtlichkeit aufgetrennt in 2 Graphen.

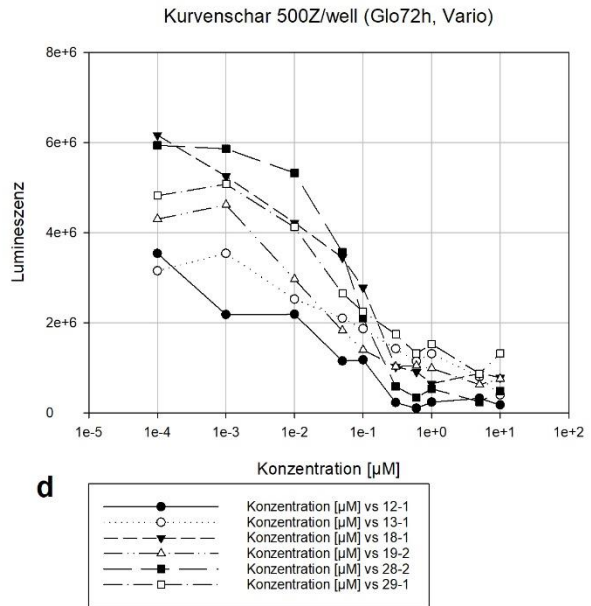
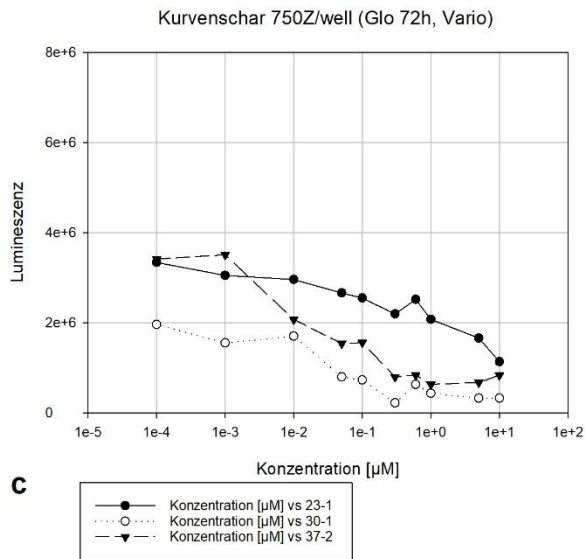
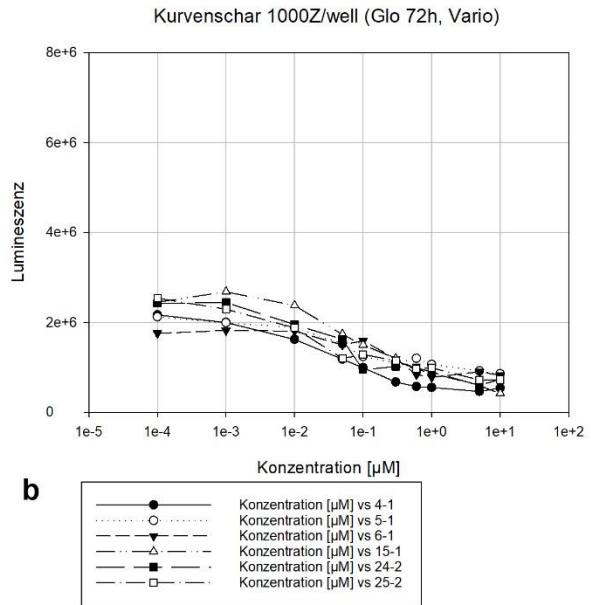
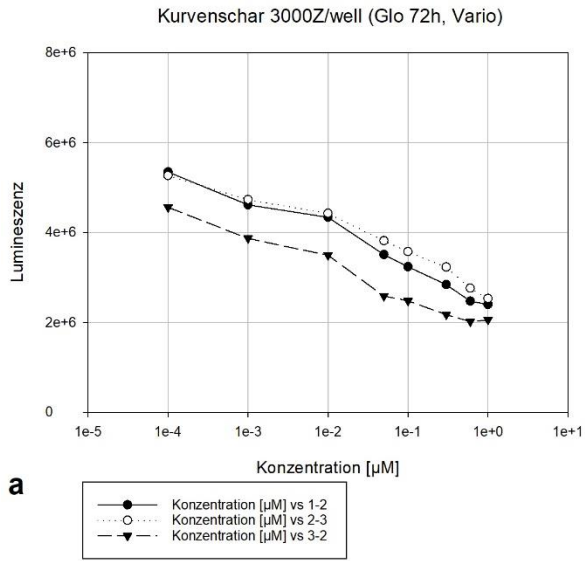
8.5 Glo-Kurvenscharen

Es wurden in 5.2 schon einzelne Lumineszenzkurven gezeigt. Zur Vervollständigung sind im Nachfolgenden je eine Einzelbestimmungskurve aller Kulturen aufgeführt. Durch den Einsatz zweier verschiedener Messgeräte mit deutlich divergierender Sensitivität und dementsprechend unterschiedlicher Lumineszenz, erfolgte eine Aufteilung der Kurvenscharen.

8.5.1 Dasa

Analog zu MTS wurden alle Kulturen unabhängig von Passage und ausgesäter Zellzahl mit Dasa behandelt. Die Mehrzahl der Kulturen lag mit 500 Z/well vor und die Lumineszenzmessung erfolgte mit maximal 10 µM RTKI (Ausnahme V 1-3). 24 Kulturen wurden mit Varioskan gemessen, 19 mit Tecan.

Anhang



Anhang

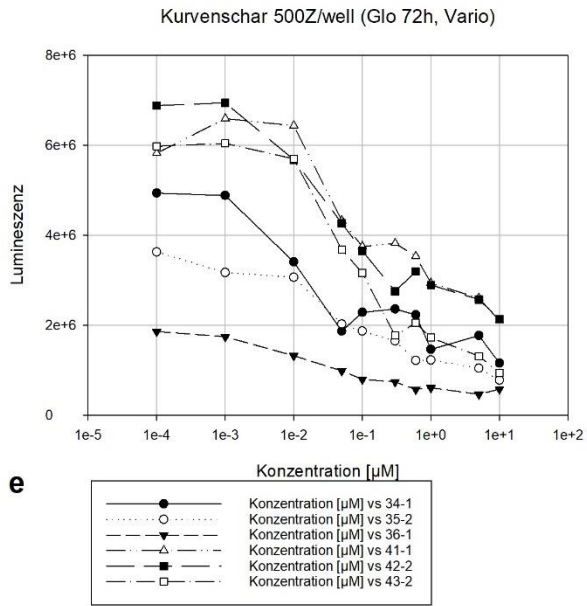
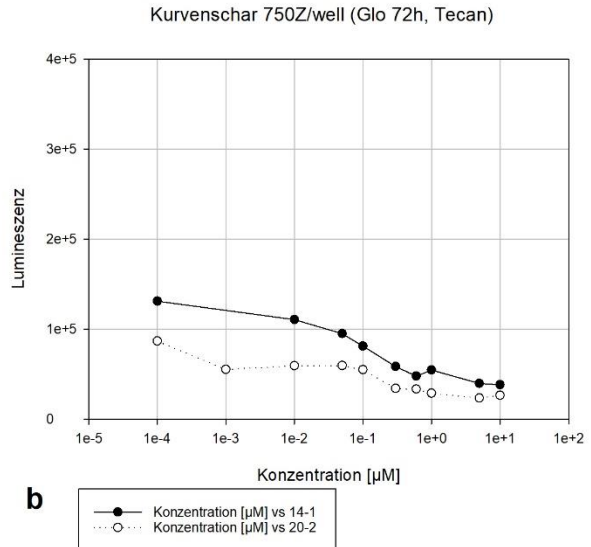
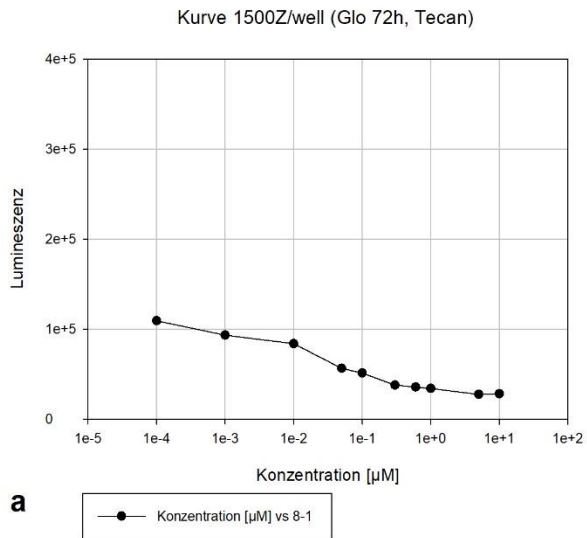


Abbildung 58 Glo-Dasa-Kurvenscharen, Vario
Graphische Darstellung der Lumineszenz der einzelnen Kulturen nach Behandlung mit Dasa. Es handelt sich um maximal eine Kurve pro Kultur. a: Kulturen mit 3000 Z/well; b: Kulturen mit 1000 Z/well; c: Endothelzellkulturen mit 750 Z/well; d+e: Kulturen mit 500 Z/well, für die Übersichtlichkeit aufgetrennt in 2 Graphen.



Anhang

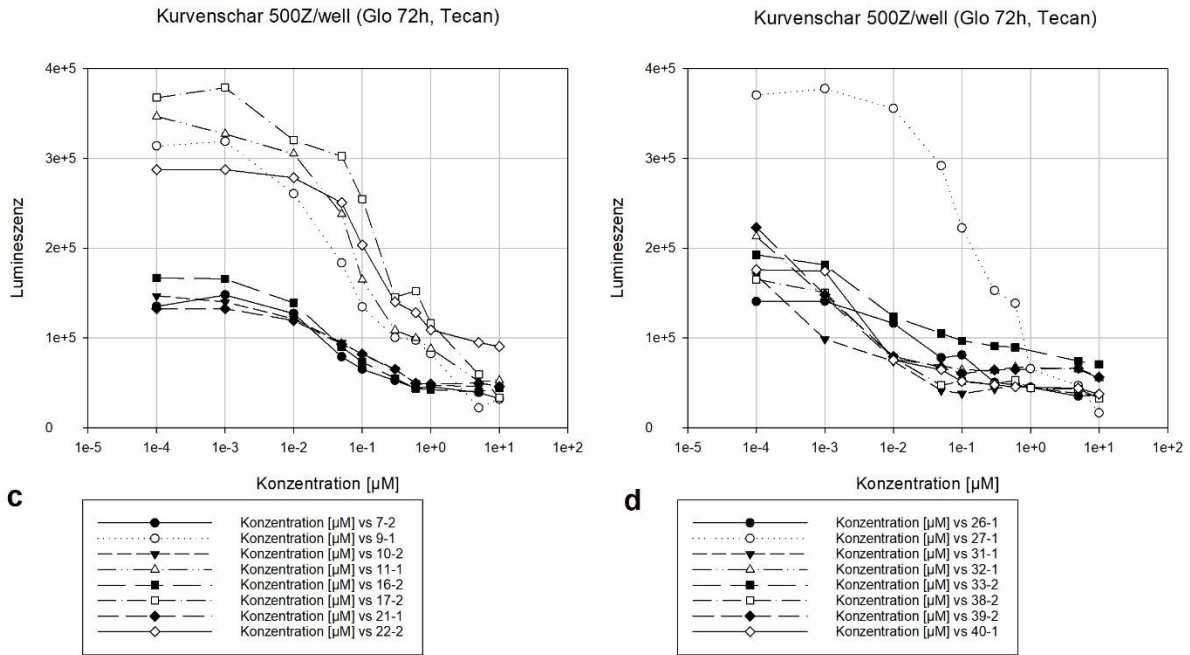


Abbildung 59 Glo-Dasa-Kurvenscharen, Tecan
 Graphische Darstellung der Lumineszenz der einzelnen Kulturen nach Behandlung mit Dasa. Es handelt sich um maximal eine Kurve pro Kultur. a: Kultur mit 1500 Z/well; b: Endothelzellkulturen mit 750 Z/well; c+d: Kulturen mit 500 Z/well, für die Übersichtlichkeit aufgetrennt in 2 Graphen.

8.5.2 Nilo

Genauso wie bei MTS wurden nur Kulturen in später Passage mit Nilo behandelt. Die Mehrheit hiervon lag mit 500 Z/well vor und wurde mit einer Maximalkonzentration von 50µM behandelt. Die Messung erfolgte bei 10 Kulturen mit Varioskan, bei 5 mit Tecan.

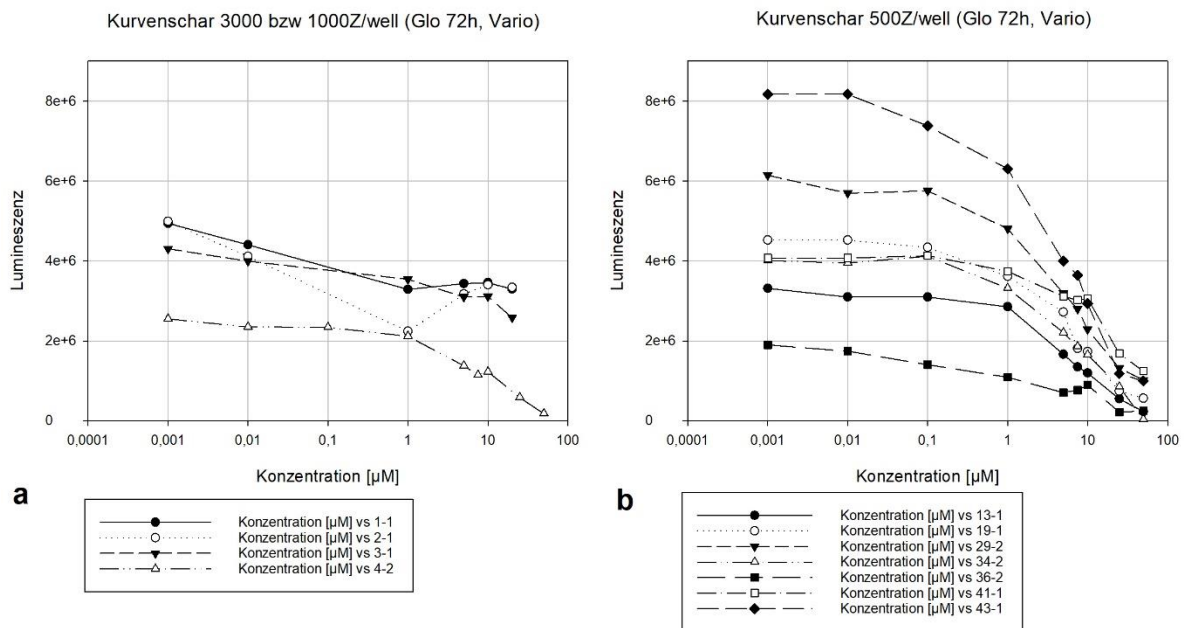


Abbildung 60 Glo-Nilo-Kurvenscharen, Vario
 Graphische Darstellung der Lumineszenz der einzelnen Kulturen nach Behandlung mit Nilo. Es handelt sich um maximal eine Kurve pro Kultur. a: Kulturen mit 3000 und 1000 Z/well; b: Kulturen mit 500 Z/well.

Anhang

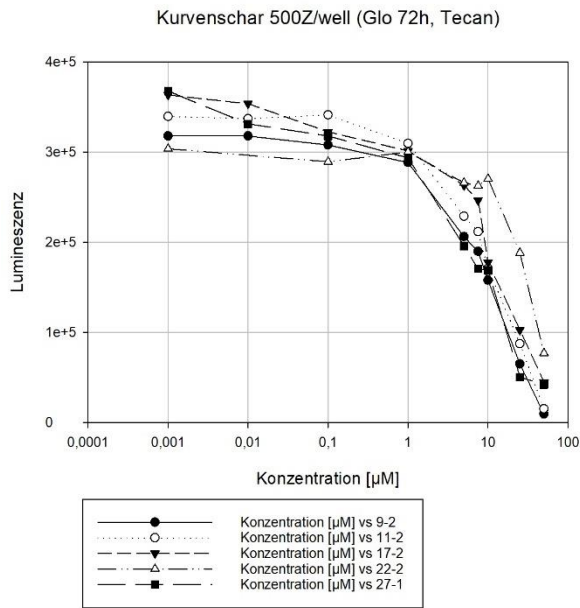


Abbildung 61 Glo-Nilo-Kurvenschar, Tecan

Graphische Darstellung der Lumineszenz der einzelnen Kulturen nach Behandlung mit Nilo. Es handelt sich um maximal eine Kurve pro Kultur, alle mit 500 Z/well.

8.5.3 Ima

Nur Kulturen in später Passage wurden mit Ima behandelt. Die Mehrzahl hiervon lag mit 500 Z/well vor. Die Lumineszenzmessung erfolgte bei 10 Kulturen mit Varioskan, bei 5 mit Tecan.

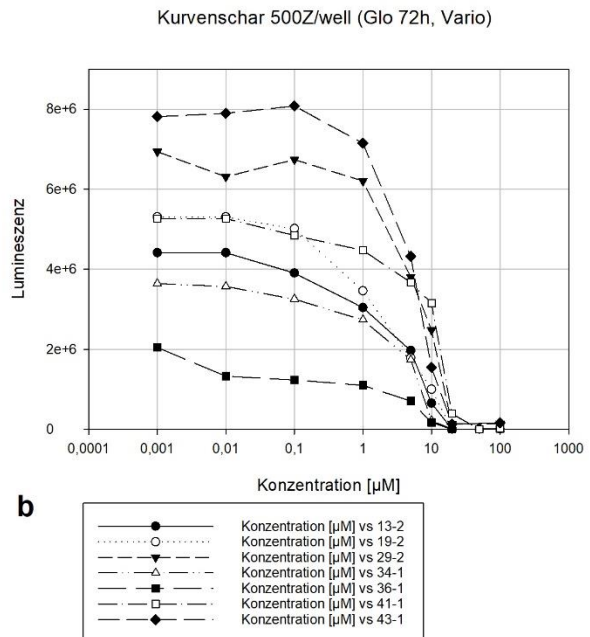
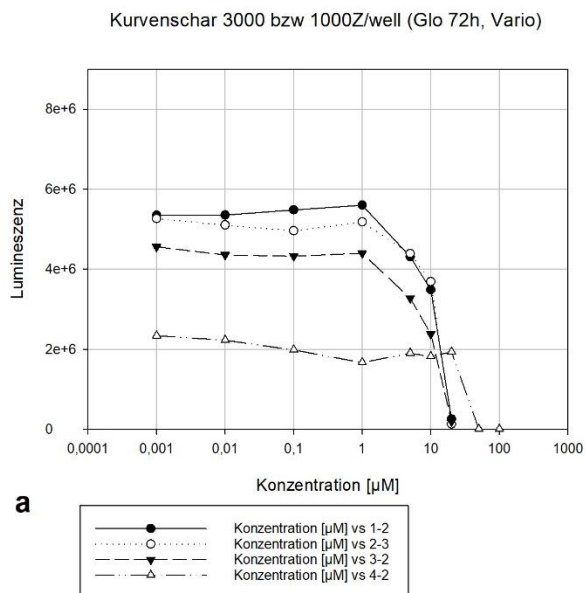


Abbildung 62 Glo-Ima-Kurvenscharen, Vario

Graphische Darstellung der Lumineszenz der einzelnen Kulturen nach Behandlung mit Ima. Es handelt sich um maximal eine Kurve pro Kultur. a: Kulturen mit 3000 und 1000 Z/well; b: Kulturen mit 500 Z/well.

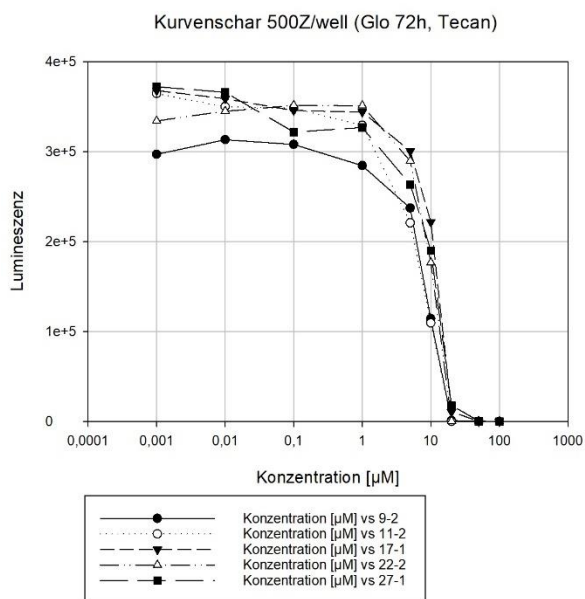


Abbildung 63 Glo-Ima-Kurvenschar, Tecan
 Graphische Darstellung der Lumineszenz der einzelnen Kulturen nach Behandlung mit Ima. Es handelt sich um maximal eine Kurve pro Kultur, alle mit 500 Z/well.

8.6 Pharmakokinetische Daten MTS

Die Messung der Absorption erfolgte in 3-fach-Bestimmung. Mithilfe von Sigmaplot wurden aus den einzelnen Messwerten jeweils Übergangskurven erstellt und 3 Parameter ermittelt: Minimalwert (min), Maximalwert (max) und EC50 in µM. Minimal- und Maximalwert wurden zudem noch in Bezug auf die mitgeführte Kontrolle gesetzt und prozentual dargestellt (min % und max %). Die Werte der Einzelbestimmungen wurden nachfolgend für jede Kultur gemittelt (MW) und mit Standardabweichung (SD) angegeben.

8.6.1 Dasa

Im Nachfolgenden finden sich die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Kultur, die mit Dasa behandelt wurde. Die Mehrzahl der Kulturen wurde mit 500 Z/well ausgesät. Ausnahme hiervon waren 3 Kulturen mit 3000 Z/well und 7 mit 1000 Z/well.

V	MW, min	SD, min	MW, min %	SD, min %	MW, max	SD, max	MW, max %	SD, max %	MW, EC50	SD, EC50
1	0,410	0,089	60,9	4,3	0,770	0,046	104	4	0,0784	0,0051
2	0,352	0,036	51,5	6,7	0,724	0,036	106	2	0,0332	0,0340
3	0,200	0,021	39,6	3,8	0,544	0,034	108	8	0,0221	0,0027
4	0,038	0,008	23,7	10,6	0,160	0,035	96	6	0,0458	0,0320
5	0,152	0,018	25,3	3,0	0,610	0,029	102	5	0,0886	0,0537
6	0,056	0,004	30,9	4,3	0,195	0,006	108	5	0,0557	0,0122
8	0,041	0,013	21,8	7,3	0,196	0,010	103	2	0,0363	0,0128
15	0,079	0,033	19,1	10,8	0,482	0,053	112	6	0,0570	0,0431
24	0,152	0,018	25,3	3,0	0,610	0,029	102	5	0,0886	0,0537
25	0,057	0,001	35,6	4,3	0,177	0,015	109	5	0,0854	0,0271

Anhang

7	0,030	0,014	12,0	6,7	0,271	0,044	104	2	0,0354	0,0245
9	0,073	0,012	22,5	3,0	0,331	0,022	102	2	0,0450	0,0095
10	0,096	0,032	38,1	5,7	0,259	0,052	105	1	0,0649	0,0499
11	0,096	0,021	21,4	4,6	0,490	0,018	109	4	0,1766	0,1282
12	0,037	0,002	33,5	1,2	0,109	0,008	101	9	0,1558	0,0398
13	0,007	0,006	6,7	5,1	0,137	0,031	114	12	0,1668	0,1745
16	0,070	0,012	19,2	4,8	0,378	0,093	101	7	0,0268	0,0047
17	0,189	0,019	33,3	3,2	0,567	0,037	99	6	0,0913	0,0588
18	0,161	0,018	30,7	9,7	0,607	0,126	111	10	0,0419	0,0030
19	0,023	0,008	10,1	3,3	0,245	0,038	111	9	0,0257	0,0140
21	0,067	0,017	24,4	0,2	0,256	0,039	95	11	0,1116	0,0526
22	0,201		35,9		0,568		101		0,0779	
26	0,089	0,022	20,8	6,5	0,435	0,047	100	4	0,1571	0,2136
27	0,198	0,051	29,5	6,6	0,645	0,026	97	1	0,0793	0,0440
28	0,056	0,012	11,4	4,7	0,539	0,150	102	8	0,0825	0,0243
29	0,014	0,020	5,4	7,6	0,290	0,076	95	5	0,0447	0,0132
31	0,018	0,009	18,1	7,3	0,095	0,016	103	1	0,0056	0,0002
32	0,026	0,024	14,0	12,8	0,210	0,021	109	6	0,0027	0,0022
33	0,086	0,024	25,5	4,2	0,350	0,035	107	2	0,0037	0,0037
34	0,047	0,003	21,3	4,4	0,238	0,031	107	3	0,0358	0,0198
35	0,060		29,7		0,191		95		0,0793	
36	0,013		20,9		0,065		104		0,0049	
38	0,027	0,005	24,0	2,3	0,121	0,012	110	10	0,0069	0,0027
39	0,032	0,010	16,3	2,6	0,203	0,025	103	2	0,0013	0,0008
40	0,008	0,000	3,9	0,6	0,200	0,018	103	4	0,0019	0,0002
41	0,086	0,019	22,0	2,7	0,423	0,009	110	9	0,0339	0,0313
42	0,094	0,010	21,5	1,7	0,452	0,034	104	4	0,0256	0,0175
43	0,032	0,006	8,0	0,6	0,406	0,047	100	1	0,0285	0,0040

Tabelle 20 Gemittelte pharmakokinetische MTS-Dasa-Daten

Die Werte der Mehrfachbestimmungen wurden gemittelt, es erfolgte zudem eine Bestimmung der Standardabweichung. Leere Felder bedeuten, dass ein Wert nicht bestimmbar war. Grau: Werte aus Kulturen mit 3000 Z/well; fett: Werte aus Kulturen mit 500 Z/well; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min: Minimalwert; max: Maximalwert.

8.6.2 Nilo

Folgende Tabelle beinhaltet die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Kultur, die mit Nilo behandelt wurde. Auf das Anführen der Kulturen, die nicht auswertbar waren, wurde verzichtet.

V	MW, min	SD, min	MW, min %	SD, min %	MW, max	SD, max	MW, max %	SD, max %	MW, EC50	SD, EC50
9	0,003	0,004	1,0	1,2	0,345	0,015	119	5	9,64	0,60
11	0,000	0,000	0,0	0,0	0,409	0,047	106	1	22,02	5,49
13	0,002	0,002	1,6	1,7	0,116	0,023	97	11	7,00	3,89
17	0,287	0,052	56,8	1,9	0,565	0,009	103	2	0,75	0,40
19	0,010	0,013	5,6	7,8	0,209	0,052	88	16	3,80	1,09
22	0,230	0,008	46,7	2,3	0,538	0,001	110	2	3,15	1,12
27	0,225	0,027	42,3	4,7	0,540	0,003	102	1	0,85	0,2101
29	0,002	0,004	1,5	2,5	0,194	0,081	97	3	8,14	4,81
34	0,004		1,4		0,254		90		5,06	
36	0,001		1,6		0,067		102		0,72	
41	0,004	0,008	1,0	1,7	0,388	0,087	99	5	8,52	3,51
43	0,009	0,008	3,1	2,7	0,316	0,053	109	15	5,02	0,94

Tabelle 21 Gemittelte pharmakokinetische MTS-Nilo-Daten

Anhang

Die Werte der Mehrfachbestimmungen wurden gemittelt, es erfolgte zudem eine Bestimmung der Standardabweichung. Leere Felder bedeuten, dass ein Wert nicht bestimmbar war. Fett: Werte aus Kulturen mit 500 Z/well; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min: Minimalwert; max: Maximalwert.

8.6.3 Ima

Die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Kultur, die mit Ima behandelt wurde, finden sich in der nachfolgenden Tabelle.

V	MW, min	SD, min	MW, min %	SD, min %	MW, max	SD, max	MW, max %	SD, max %	MW, EC50	SD, EC50
1	0,000	0,000	0,0	0,0	0,706	0,026	96	4	10,64	0,62
2										
3	0,000	0,000	0,0	0,0	0,493	0,006	98	2	9,81	1,14
4	0,000	0,000	0,0	0,0	0,218	0,010	103	7	4,59	1,18
9	0,000	0,000	0,0	0,0	0,290	0,021	97	7	9,84	0,96
11	0,000	0,000	0,0	0,0	0,521	0,018	105	4	10,37	1,61
13										
17	0,000	0,000	0,0	0,0	0,581	0,019	98	2	14,59	1,27
19	0,000		0,0		0,216		114		3,64	
22	0,000		0,0		0,643		97		7,26	
27	0,000	0,000	0,0	0,0	0,730	0,054	93	1	15,85	0,77
29	0,000	0,000	0,0	0,0	0,237	0,050	98	13	6,75	1,14
34	0,004	0,004	2,0	2,0	0,251	0,039	101	13	4,68	1,36
36	0,000	0,001	0,3	0,5	0,059	0,018	99	9	1,88	0,93
41	0,000	0,000	0,0	0,0	0,503	0,064	95	5	11,16	0,29
43	0,000	0,000	0,0	0,0	0,311	0,053	103	8	5,77	1,23

Tabelle 22 Gemittelte pharmakokinetische MTS-Ima-Daten

Die Werte der Mehrfachbestimmungen wurden gemittelt, es erfolgte zudem eine Bestimmung der Standardabweichung. Leere Felder bedeuten, dass ein Wert nicht bestimmbar war. Grau: Werte aus Kulturen mit 3000 Z/well; fett: Werte aus Kulturen mit 500 Z/well; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min: Minimalwert; max: Maximalwert.

8.7 Pharmakokinetische Daten Glo

Die Messung der Lumineszenz erfolgte in 2-fach-Bestimmung (Ausnahme Kultur 1 bis 3, hier 3-fach-Bestimmung). Mithilfe von Sigmaplot wurden aus den einzelnen Messwerten jeweils Übergangskurven erstellt und 3 Parameter ermittelt: Minimalwert (min), Maximalwert (max) und EC50 in μM . Minimal- und Maximalwert wurden zudem noch in Bezug auf die mitgeführte Kontrolle gesetzt und prozentual dargestellt (min % und max %). Da zwei verschiedene Messgeräte mit deutlich unterschiedlicher Sensitivität zum Einsatz kamen, ist eine Diskrepanz zwischen den reinen Zahlenwerten (min, max) zu beobachten.

8.7.1 Dasa

Im Nachfolgenden finden sich die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Kultur, die mit Dasa behandelt. Mit Varioskan wurden 21 Kulturen gemessen, mit Tecan 17. Die Mehrzahl der Kulturen wurde mit 500 Z/well ausgesät. Ausnahme hiervon bildeten 3 Kulturen mit 3000 Z/well und 7 mit 1000 Z/well.

Anhang

V	MW, min	SD, min	MW, min %	SD, min %	MW, max	SD, max	MW, max %	SD, max %	MW, EC50	SD, EC50
1	2243630	83623	43,4	0,6	5060833	235339	97,8	0,6	0,0401	0,0114
2	2291234	34178	44,5	1,9	4970392	215946	96,4	1,9	0,0559	0,0031
3	1970990	118546	44,9	3,6	4348436	215504	99,0	2,0	0,0186	0,0067
4	639515	275303	26,0	7,8	2371072	304998	98,5	1,4	0,0334	0,0034
5	847567	56748	38,7	4,5	2225939	151839	101,2	1,9	0,1160	0,0950
6	825471	27820	44,7	1,7	1860361	137006	100,6	0,2	0,1653	0,0386
7	39323	146	29,5	0,4	140562	3173	105,3	0,6	0,0466	0,0119
8	26454	1329	23,9	0,8	109147	1341	98,8	0,3	0,0265	0,0003
9	31289	18573	9,9	5,8	327572	4673	103,8	2,3	0,0548	0,0110
10	52459	5382	36,7	5,0	142601	2583	99,5	1,7	0,0265	0,0233
11	59266	9147	18,5	4,7	332269	12898	102,9	6,4	0,0844	0,0112
12	141873	40377	6,5	1,8	2128757	113378	97,7	5,2	0,0723	0,0108
13	299511	60957	8,7	0,8	3858154	513812	113,3	3,5	0,0650	0,0481
15	480366	109012	18,9	3,4	2764986	200363	109,2	3,0	0,0957	0,0266
16	38521	2797	23,2	1,5	169208	1353	101,8	1,6	0,0341	0,0012
17	24480	8958	7,0	2,9	361467	17483	101,8	0,1	0,2097	0,0276
18	562008	123491	9,3	2,3	5873738	73702	97,1	3,7	0,0595	0,0177
19	721306	98042	17,6	1,2	4255459	440807	103,5	3,5	0,0247	0,0117
21	46593		41,9		122436		110,2		0,0866	
22	103341	14255	35,9	4,9	291407	4924	101,4	1,6	0,1425	0,0120
24	666606	56948	29,9	0,9	2314986	243342	103,5	1,1	0,0351	0,0035
25	673136	36787	26,3	1,1	2683615	85868	104,6	4,9	0,0167	0,0028
26	40383	9025	28,6	6,2	146856	3421	103,8	1,6	0,0463	0,0068
27	12984	240	3,5	0,2	387689	11354	102,3	0,3	0,1841	0,0100
28	219604	139259	3,7	2,5	5855685	36485	96,0	3,0	0,0553	0,0086
29	1114208	59142	23,6	0,6	4811519	297644	101,8	3,3	0,0444	0,0134
31	33963	10450	37,0	6,9	90901	11313	100,1	0,1	0,0088	0,0027
32	59416	6507	27,5	3,7	219671	4205	101,3	0,8	0,0010	0,0004
33	78783	4017	38,4	1,4	210955	18131	102,8	0,1	0,0054	0,0039
34	1770052	73681	34,6	0,4	5318355	317914	103,8	0,8	0,0105	0,0012
35	884382	181134	27,2	8,8	3361601	361274	101,1	1,9	0,0457	0,0083
36	524827	33170	29,1	3,0	1827256	113003	101,1	2,3	0,0188	0,0021
38	45154	1011	25,6	1,8	181147	20174	102,2	1,7	0,0029	0,0023
39	62786	474	28,5	0,2	226441	2294	102,7	0,6	0,0011	0,0000
40	42945	6608	25,1	2,9	176962	3173	103,4	2,1	0,0046	0,0005
41	2288830	146085	38,0	4,4	6517650	163649	108,0	2,9	0,0784	0,0047
42	2550982	181902	37,0	2,5	7070682	4187	102,6	0,1	0,0275	0,0030
43	1111010	182474	18,8	2,8	6066212	72128	102,5	0,3	0,0622	0,0028

Tabelle 23 Gemittelte pharmakokinetische Glo-Dasa-Daten

Die Werte der Mehrfachbestimmungen wurden gemittelt, es erfolgte zudem eine Bestimmung der Standardabweichung. Leere Felder bedeuten, dass ein Wert nicht bestimmbar war. Grau: Werte aus 3000 Z/well-Kulturen; fett: Werte aus 500 Z/well-Kulturen; blau: mit Varioskan gemessen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min: Minimalwert, max: Maximalwert; ZZ: Zellzahl.

8.7.2 Nilo

Die nachfolgende Tabelle beinhaltet die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Kultur, die mit Nilo behandelt wurde. Mit Varioskan wurden 11 Kulturen gemessen, mit Tecan 5.

V	MW, min	SD, min	MW, min %	SD, min %	MW, max	SD, max	MW, max %	SD, max %	MW, EC50	SD, EC50
1	3424347	53074	66,2	1,7	5307855	349220	102,5	4,4	0,0111	0,0004
2	3398892	96454	65,9	0,7	5158845	147951	100,0	0,1	0,0084	0,0015

Anhang

3										
4	0		0,0		2440199		95,7		8,9896	
9	0	0	0,0	0,0	325871	17704	98,8	0,4	12,1588	1,9815
11	0	0	0,0	0,0	340670	3741	100,0	0,6	13,0635	2,0315
13	65970	21753	2,1	0,6	3113517	103352	97,2	1,5	7,7333	3,1337
17	13520	10327	3,9	2,5	320174	27800	97,9	6,2	13,5731	3,1890
19	360834	226874	7,5	4,3	4813158	496793	101,2	3,5	4,8023	0,7681
22	66790	10737	21,1	4,9	281258	5473	88,2	4,5	27,0180	1,3326
27	5644		1,5		340132		92,4		7,0667	
29	343072	338654	5,6	5,6	6220240	439284	98,1	2,7	3,5585	1,5168
34	0	0	0,0	0,0	3897657	214650	104,9	5,7	9,6306	1,3289
36										
41	880923		21,6		4031345		99,0		13,1801	
43	214799	150407	2,6	1,8	8177091	193776	99,0	0,8	4,9548	0,2970

Tabelle 24 Gemittelte pharmakokinetische Glo-Nilo-Daten

Die Werte der Mehrfachbestimmungen wurden gemittelt, es erfolgte zudem eine Bestimmung der Standardabweichung. Leere Felder bedeuten, dass ein Wert nicht bestimmbar war. Grau: Werte aus 3000 Z/well-Kulturen; fett: Werte aus 500 Z/well-Kulturen; blau: mit Varioskan gemessen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min: Minimalwert, max: Maximalwert; ZZ: Zellzahl.

8.7.3 Ima

Die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Kultur, die mit Ima behandelt wurde, finden sich in nachfolgender Tabelle. Mit Varioskan wurden 11 Kulturen gemessen, mit Tecan 5.

V	MW, min	SD, min	MW, min %	SD, min %	MW, max	SD, max	MW, max %	SD, max %	MW, EC50	SD, EC50
1	0	0	0,0	0,0	5210524	154165	100,7	1,2	11,3193	0,3277
2	0	0	0,0	0,0	4970404	157593	96,4	1,6	12,3421	0,3634
3	0	0	0,0	0,0	4274715	96632	97,4	1,2	9,9512	0,4058
4										
9	0	0	0,0	0,0	302898	4151	97,8	4,7	7,4122	1,2251
11	0	0	0,0	0,0	350206	1047	97,2	1,8	7,4449	1,1010
13	0	0	0,0	0,0	3581765	584660	106,1	1,1	4,2713	1,0957
17	0	0	0,0	0,0	351323	5734	92,5	2,7	11,3410	0,1442
19	0	0	0,0	0,0	4639403	505377	112,9	6,8	3,1184	0,9659
22	0	0	0,0	0,0	325162	23970	97,5	7,1	10,2737	0,5921
27	0	0	0,0	0,0	352619	11309	90,1	3,6	10,3411	0,7162
29	0	0	0,0	0,0	6445346	238499	101,0	7,9	6,0049	0,6362
34	0	0	0,0	0,0	3446366	4030	93,5	1,6	4,7977	1,2096
36	0	0	0,0	0,0	1359553	150648	100,9	9,5	4,3214	1,5565
41	0	0	0,0	0,0	4474908	235558	104,4	3,4	12,1710	0,7465
43	0	0	0,0	0,0	7596775	277264	105,2	7,7	6,0441	0,8767

Tabelle 25 Gemittelte pharmakokinetische Glo-Ima-Daten

Die Werte der Mehrfachbestimmungen wurden gemittelt, es erfolgte zudem eine Bestimmung der Standardabweichung. Leere Felder bedeuten, dass ein Wert nicht bestimmbar war. Grau: Werte aus 3000 Z/well-Kulturen; fett: Werte aus 500 Z/well-Kulturen; blau: mit Varioskan gemessen; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min: Minimalwert, max: Maximalwert; ZZ: Zellzahl.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auflistung der verwendeten Gerätschaften	19
Tabelle 2 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 3 Auflistung der verwendeten Reagenzien	20
Tabelle 4 Auflistung der verwendeten Medikamente	20
Tabelle 5 Auflistung der verwendeten Zellkulturmedien	21
Tabelle 6 Zusammenfassung der Endothelzellkulturen	35
Tabelle 7 Zusammenfassung der Fibroblastenkulturen	36
Tabelle 8 Details zu den 38 Fibroblastenkulturen	37
Tabelle 9 Auflistung der verwendeten Software	37
Tabelle 10 Lineare Abhängigkeit der Absorptionswerte	45
Tabelle 11 Pharmakokinetische MTS-Dasa-Daten.....	46
Tabelle 12 Pharmakokinetische MTS-Nilo-Daten	51
Tabelle 13 Pharmakokinetische MTS-Ima-Daten	54
Tabelle 14 Details zu den stattgehabten Glo-Messungen	58
Tabelle 15 Pharmakokinetische Glo-Dasa-Daten.....	61
Tabelle 16 Pharmakokinetische Glo-Nilo-Daten	65
Tabelle 17 Pharmakokinetische Glo-Ima-Daten	68
Tabelle 18 Zellkulturflächen und Reagenzien-Menge.....	87
Tabelle 19 Kultur-Übersicht	93
Tabelle 20 Gemittelte pharmakokinetische MTS-Dasa-Daten.....	103
Tabelle 21 Gemittelte pharmakokinetische MTS-Nilo-Daten	103
Tabelle 22 Gemittelte pharmakokinetische MTS-Ima-Daten	104
Tabelle 23 Gemittelte pharmakokinetische Glo-Dasa-Daten.....	105
Tabelle 24 Gemittelte pharmakokinetische Glo-Nilo-Daten	106
Tabelle 25 Gemittelte pharmakokinetische Glo-Ima-Daten	106

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Pathomechanismus des Bronchiolitis obliterans-Syndroms	11
Abbildung 2 Schematischer Überblick über die Wirkung der RTKIs	16
Abbildung 3 Schematischer zeitlicher Ablauf des Rattenmodells	22
Abbildung 4 Beispielbilder des Zellpräparationsablaufs	24
Abbildung 5 Generelles Präparationsschema.....	25
Abbildung 6 Einfluss der Zellvitalität auf die Zellzahlmessung mittels CASY TTC® ..	27
Abbildung 7 Histogramme bei Zellzahlmessung mit CASY TTC®	28
Abbildung 8 Zelldichte bei Aussaat.....	28
Abbildung 9 Beurteilung des prozentualen Bewuchses	29
Abbildung 10 Unterschiedliches Wachstumsmuster	30
Abbildung 11 Schematischer Ablauf der MTS-Reaktion.....	31
Abbildung 12 Schematischer Ablauf des RealTime Glo-Assays.....	34
Abbildung 13 Schematische Übergangskurve	38
Abbildung 14 Nativzellzahlen aus der Zellpräparation	39
Abbildung 15 Wachstumsfaktorunterschied zwischen p0 und p1-p3.....	40
Abbildung 16 Wachstumsdauer der Zellkulturen	41
Abbildung 17 MTS-Absorptionen der Kontrollen pro Kultur sind vergleichbar	43
Abbildung 18 Zellzahlabhängigkeit der MTS-Absorption	43
Abbildung 19 Lineare Abhängigkeit der Absorptionswerte	44
Abbildung 20 Exemplarische Absorptionskurvenscharen, Dasa.....	45
Abbildung 21 Pharmakokinetischen MTS-Dasa-Daten aller Kulturen.....	47
Abbildung 22 Uneinheitliche EC50 bei gleichen Präparationen in unterschiedlichen Passagen.....	48
Abbildung 23 MTS-Dasa-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Herkunft	49
Abbildung 24 MTS-Dasa-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Passage.....	50
Abbildung 25 Exemplarische Absorptionskurvenscharen, Nilo.....	50
Abbildung 26 Pharmakokinetische MTS-Nilo-Daten aller 500 Z/well-Kulturen	52
Abbildung 27 MTS-Nilo-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Herkunft	53
Abbildung 28 Exemplarische Absorptionskurvenscharen, Ima	54
Abbildung 29 Pharmakokinetische MTS-Ima-Daten aller 500 Z/well-Kulturen.....	55
Abbildung 30 MTS-Ima-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Herkunft	56
Abbildung 31 MTS-Pharmakokinetik der 500 Z/well-Kulturen mit 3 RTKIs.....	57
Abbildung 32 Sensitivitätsunterschied der Geräte hinsichtlich Lumineszenz.....	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 33 Kein Unterschied in der Glo-Dasa-Pharmakokinetik zwischen den Geräten.....	60
Abbildung 34 Exemplarische Lumineszenzkurvenscharen, Dasa	61
Abbildung 35 Pharmakokinetische Glo-Dasa-Daten aller 500 Z/well-Kulturen	62
Abbildung 36 Glo-Dasa-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Herkunft	63
Abbildung 37 Glo-Dasa-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Passage.....	64
Abbildung 38 Exemplarische Lumineszenzkurvenscharen, Nilo.....	65
Abbildung 39 Pharmakokinetische Glo-Nilo-Daten aller 500 Z/well-Kulturen	66
Abbildung 40 Glo-Nilo-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Herkunft	67
Abbildung 41 Exemplarische Lumineszenzkurvenscharen, Ima.....	68
Abbildung 42 Pharmakokinetische Glo-Ima-Daten aller 500 Z/well-Kulturen.....	69
Abbildung 43 Glo-Ima-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Herkunft	70
Abbildung 44 Glo-Pharmakokinetik der 500 Z/well-Kulturen mit 3 RTKIs.....	71
Abbildung 45 Pharmakokinetik aller drei RTKIs in beiden Messmethoden.....	72
Abbildung 46 EC50-Vergleich der 500 Z/well-Kulturen mit 3 RTKIs.....	73
Abbildung 47 Flussdiagramm zur linken Lunge der Ratte 1	88
Abbildung 48 Flussdiagramm zur rechten Lunge der Ratte 1	88
Abbildung 49 Flussdiagramm zur linken Lunge der Ratte 2	89
Abbildung 50 Flussdiagramm zur rechten Lunge der Ratte 2.....	89
Abbildung 51 Flussdiagramm zur linken Lunge der Ratte 3	90
Abbildung 52 Flussdiagramm zur rechten Lunge der Ratte 3.....	90
Abbildung 53 Flussdiagramm zur linken Lunge der Ratte 4	91
Abbildung 54 Flussdiagramm zur rechten Lunge der Ratte 4.....	91
Abbildung 55 MTS-Dasa-Kurvenscharen	95
Abbildung 56 MTS-Nilo-Kurvenscharen	96
Abbildung 57 MTS-Ima-Kurvenscharen.....	97
Abbildung 58 Glo-Dasa-Kurvenscharen, Vario	99
Abbildung 59 Glo-Dasa-Kurvenscharen, Tecan	100
Abbildung 60 Glo-Nilo-Kurvenscharen, Vario	100
Abbildung 61 Glo-Nilo-Kurvenscharen, Tecan.....	101
Abbildung 62 Glo-Ima-Kurvenscharen, Vario	101
Abbildung 63 Glo-Ima-Kurvenscharen, Tecan.....	102

11 Literaturverzeichnis

Abbott, Brian L. (2012): Dasatinib: from treatment of imatinib-resistant or -intolerant patients with chronic myeloid leukemia to treatment of patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. In: *Clinical therapeutics* 34 (2), S. 272–281. DOI: 10.1016/j.clinthera.2012.01.009.

Abdollahi, Amir; Li, Minglun; Ping, Gong; Plathow, Christian; Domhan, Sophie; Kiessling, Fabian et al. (2005): Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. In: *The Journal of experimental medicine* 201 (6), S. 925–935. DOI: 10.1084/jem.20041393.

Akhmetshina, Alfiya; Venalis, Paulius; Dees, Clara; Busch, Nicole; Zwerina, Jochen; Schett, Georg et al. (2009): Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. In: *Arthritis and rheumatism* 60 (1), S. 219–224. DOI: 10.1002/art.24186.

Al-Share, B.; Alloghbi, A.; Al, Hallak M. N.; Uddin, H.; Azmi, A.; Mohammad, R. M. et al. (2021): Gastrointestinal stromal tumor: a review of current and emerging therapies. In: *Cancer metastasis reviews* 40 (2). DOI: 10.1007/s10555-021-09961-7.

Aono, Y.; Kishi, M.; Yokota, Y.; Azuma, M.; Kinoshita, K.; Takezaki, A. et al. (2014): Role of platelet-derived growth factor/platelet-derived growth factor receptor axis in the trafficking of circulating fibrocytes in pulmonary fibrosis. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 51 (6). DOI: 10.1165/rcmb.2013-0455OC.

Aono, Y.; Nishioka, Y.; Inayama, M.; Ugai, M.; Kishi, J.; Uehara, H. et al. (2005): Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 171 (11). DOI: 10.1164/rccm.200404-531OC.

Appel, C. K.; Gallego-Pedersen, S.; Andersen, L.; Blanchefflor, Kristensen S.; Ding, M.; Falk, S. et al. (2017): The Src family kinase inhibitor dasatinib delays pain-related behaviour and conserves bone in a rat model of cancer-induced bone pain. In: *Scientific reports* 7 (1). DOI: 10.1038/s41598-017-05029-1.

Aris, Robert M.; Walsh, Sean; Chalermkulrat, Worakij; Hathwar, Vasantha; Neuringer, Isabel P. (2002): Growth factor upregulation during obliterative

bronchiolitis in the mouse model. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 166 (3), S. 417–422. DOI: 10.1164/rccm.2102106.

Atanasova, S.; Hirschburger, M.; Jonigk, D.; Obert, M.; Petri, K.; Evers, A. et al. (2013): A relevant experimental model for human bronchiolitis obliterans syndrome. In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 32 (11). DOI: 10.1016/j.healun.2013.07.016.

Batool, S.; Javaid, S.; Javed, H.; Laiba, Asim None; Shahid, I.; Khan, M.; Muhammad, A. (2022): Addressing artifacts of colorimetric anticancer assays for plant-based drug development. In: *Medical oncology (Northwood, London, England)* 39 (12). DOI: 10.1007/s12032-022-01791-z.

Bedair, B.; Hachem, R. R. (2021): Management of chronic rejection after lung transplantation. In: *Journal of thoracic disease* 13 (11). DOI: 10.21037/jtd-2021-19.

Belperio, John A.; Weigt, S. Samuel; Fishbein, Michael C.; Lynch, Joseph P. (2009): Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* 6 (1), S. 108–121. DOI: 10.1513/pats.200807-073GO.

Bogovic, Niklas (2022): Pharmakokinetische Untersuchung der Wirkung von Imatinib, Nilotinib und Dasatinib auf die Migration von Rattenlungenfibroblasten mittels in-vitro Scratch Assay. Online verfügbar unter <https://epub.uni-regensburg.de/52245/>.

Bonner, James C. (2004): Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. In: *Cytokine & growth factor reviews* 15 (4), S. 255–273. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.006.

Borthwick, L. A.; McIlroy, E. I.; Gorowiec, M. R.; Brodlie, M.; Johnson, G. E.; Ward, C. et al. (2010): Inflammation and epithelial to mesenchymal transition in lung transplant recipients: role in dysregulated epithelial wound repair. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10 (3), S. 498–509. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2009.02953.x.

Bos, S.; De, Sadeleer L. J.; Vanstapel, A.; Beeckmans, H.; Sacreas, A.; Yserbyt, J. et al. (2021): Antifibrotic drugs in lung transplantation and chronic lung allograft

dysfunction: a review. In: *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 30 (160). DOI: 10.1183/16000617.0050-2021.

Bos, S.; Vos, R.; Van, Raemdonck D. E.; Verleden, G. M. (2020): Survival in adult lung transplantation: where are we in 2020? In: *Current opinion in organ transplantation* 25 (3). DOI: 10.1097/MOT.0000000000000753.

Boxhammer, E.; Lehle, K.; Schmid, C.; von, Suesskind-Schwendi M. (2020): Anti-oxidative effect of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib: a potential therapy for chronic lung allograft dysfunction? In: *Experimental lung research* 46 (5). DOI: 10.1080/01902148.2020.1738594.

Brunner, Elisabeth; Lehle, Karla; Hirt, Stephan W.; Schmid, Christof; Suesskind-Schwendi, Marietta von (2013): Everolimus's influence on persistent acute rejection after experimental lung transplantation. In: *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University* 22 (3), S. 355–359.

Buttke, T. M.; McCubrey, J. A.; Owen, T. C. (1993): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. In: *Journal of immunological methods* 157 (1-2). DOI: 10.1016/0022-1759(93)90092-I.

Chambers, D. C.; Cherikh, W. S.; Harhay, M. O.; Hayes, D.; Hsich, E.; Khush, K. K. et al. (2019): The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult lung and heart-lung transplantation Report-2019; Focus theme: Donor and recipient size match. In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 38 (10). DOI: 10.1016/j.healun.2019.08.001.

Collins, B. F.; Raghu, G. (2019): Antifibrotic therapy for fibrotic lung disease beyond idiopathic pulmonary fibrosis. In: *European Respiratory Review* 28 (154). DOI: 10.1183/16000617.5022-2019.

Cory, A. H.; Owen, T. C.; Barltrop, J. A.; Cory, J. G. (1991): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. In: *Cancer communications* 3 (7). DOI: 10.3727/095535491820873191.

Literaturverzeichnis

Daniels, Craig E.; Wilkes, Mark C.; Edens, Maryanne; Kottom, Ted J.; Murphy, Stephen J.; Limper, Andrew H.; Leof, Edward B. (2004): Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. In: *The Journal of clinical investigation* 114 (9), S. 1308–1316. DOI: 10.1172/JCI19603.

Deininger, M. W. (2008): Nilotinib. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (13). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5015.

Deininger, Michael; Buchdunger, Elisabeth; Druker, Brian J. (2005): The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. In: *Blood* 105 (7), S. 2640–2653. DOI: 10.1182/blood-2004-08-3097.

Distler, O.; Highland, K. B.; Gahlemann, M.; Azuma, A.; Fischer, A.; Mayes, M. D. et al. (2019): Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. In: *The New England journal of medicine* 380 (26). DOI: 10.1056/NEJMoa1903076.

Estenne, Marc; Hertz, Marshall I. (2002): Bronchiolitis obliterans after human lung transplantation. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 166 (4), S. 440–444.

European Medicines Agency (2013): Glivec - European public assessment report (EPAR). Online verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glivec>, zuletzt geprüft am 07.09.2023.

European Medicines Agency (2018): Tasigna - European public assessment report. Online verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tasigna>, zuletzt geprüft am 07.09.2023.

European Medicines Agency (2019): Sprycel - European public assessment report. Online verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/sprycel>, zuletzt geprüft am 07.09.2023.

Fabarius, A.; Giehl, M.; Rebacz, B.; Krämer, A.; Frank, O.; Haferlach, C. et al. (2008): Centrosome aberrations and G1 phase arrest after in vitro and in vivo treatment with

the SRC/ABL inhibitor dasatinib. In: *Haematologica* 93 (8). DOI: 10.3324/haematol.12793.

Fava, C.; Kantarjian, H.; Cortes, J.; Jabbour, E. (2009): Development and targeted use of nilotinib in chronic myeloid leukemia. In: *Drug design, development and therapy* 2. DOI: 10.2147/dddt.s3181.

Funk, Dorothee; Schrenk, Hans-Hermann; Frei, Eva (2007): Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay. In: *BioTechniques* 43 (2), 178, 180, 182 passim. DOI: 10.2144/000112528.

Gauthier, Jason M.; Hachem, Ramsey R.; Kreisel, Daniel (2016): Update on Chronic Lung Allograft Dysfunction. In: *Current transplantation reports* 3 (3), S. 185–191. DOI: 10.1007/s40472-016-0112-y.

Glanville, A. R.; Benden, C.; Bergeron, A.; Cheng, G. S.; Gottlieb, J.; Lease, E. D. et al. (2022): Bronchiolitis obliterans syndrome after lung or haematopoietic stem cell transplantation: current management and future directions. In: *ERJ open research* 8 (3). DOI: 10.1183/23120541.00185-2022.

Goodwin, C. J.; Holt, S. J.; Downes, S.; Marshall, N. J. (1995): Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. In: *Journal of immunological methods* 179 (1), S. 95–103.

Grimminger, F.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A. (2010): Targeting non-malignant disorders with tyrosine kinase inhibitors. In: *Nature reviews. Drug discovery* 9 (12). DOI: 10.1038/nrd3297.

Gstraunthaler, Gerhard; Lindl, Toni (2021): Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 8. Aufl. 2021. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1901895>.

Gurujeyalakshmi, G.; Hollinger, M. A.; Giri, S. N. (1999): Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level. In: *The American journal of physiology* 276 (2). DOI: 10.1152/ajplung.1999.276.2.L311.

HARDY, J. D.; ERASLAN, S.; WEBB, W. R. (1964): Transplantation of the lung. In: *Annals of surgery* 160 (3). DOI: 10.1097/00000658-196409000-00008.

- Heldin, C. H.; Westermark, B. (1999): Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. In: *Physiological reviews* 79 (4). DOI: 10.1152/physrev.1999.79.4.1283.
- Hertz, M. I.; Henke, C. A.; Nakhleh, R. E.; Harmon, K. R.; Marinelli, W. A.; Fox, J. M. et al. (1992): Obliterative bronchiolitis after lung transplantation: a fibroproliferative disorder associated with platelet-derived growth factor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (21), S. 10385–10389. DOI: 10.1073/pnas.89.21.10385.
- Hetzel, M.; Bachem, M.; Anders, D.; Trischler, G.; Faehling, M. (2005): Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. In: *Lung* 183 (4). DOI: 10.1007/s00408-004-2534-z.
- Hinz, B. (2012): Mechanical aspects of lung fibrosis: a spotlight on the myofibroblast. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* 9 (3). DOI: 10.1513/pats.201202-017AW.
- Hirt, S. W.; Suesskind-Schwendi, M. von; Puehler, T.; Schmid, C.; Lehle, K. (2013): Early administration of FTY720 prevents chronic airway as well as vascular destruction in experimental rat lung transplantation. In: *Transplantation proceedings* 45 (2), S. 783–786. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.03.066.
- Hirt, S. W.; You, X. M.; Möller, F.; Boeke, K.; Starke, M.; Spranger, U.; Wottge, H. U. (1999): Development of obliterative bronchiolitis after allogeneic rat lung transplantation: implication of acute rejection and the time point of treatment. In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 18 (6), S. 542–548.
- Hochhaus, A.; Baccarani, M.; Silver, R. T.; Schiffer, C.; Apperley, J. F.; Cervantes, F. et al. (2020): European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. In: *Leukemia* 34 (4). DOI: 10.1038/s41375-020-0776-2.
- Homsí, J.; Daud, A. I. (2007): Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. In: *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 14 (3). DOI: 10.1177/107327480701400312.
- Hu, M.; Che, P.; Han, X.; Cai, G. Q.; Liu, G.; Antony, V. et al. (2014): Therapeutic targeting of SRC kinase in myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis. In:

The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 351 (1). DOI: 10.1124/jpet.114.216044.

Huang, K. T.; Chen, Y. H.; Am Walker (2004): Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids. In: *BioTechniques* 37 (3). DOI: 10.2144/04373ST05.

Johnson, F. M.; Saigal, B.; Donato, N. J. (2005a): Induction of heparin-binding EGF-like growth factor and activation of EGF receptor in imatinib mesylate-treated squamous carcinoma cells. In: *Journal of cellular physiology* 205 (2). DOI: 10.1002/jcp.20383.

Johnson, F. M.; Saigal, B.; Talpaz, M.; Donato, N. J. (2005b): Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11 (19 Pt 1). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0757.

Jolly, M. K.; Ward, C.; Eapen, M. S.; Myers, S.; Hallgren, O.; Levine, H.; Sohal, S. S. (2018): Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 247 (3). DOI: 10.1002/dvdy.24541.

Jungraithmayr, Wolfgang; Jang, Jae-Hwi; Schrepfer, Sonja; Inci, Ilhan; Weder, Walter (2013): Small animal models of experimental obliterative bronchiolitis. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 48 (6), S. 675–684. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0379TR.

Kadivar, A.; Ibrahim, Noordin M.; Aditya, A.; Kamalidehghan, B.; Davoudi, E. T.; Sedghi, R.; Akbari, Javar H. (2018): Antiproliferative effects of imatinib mesylate on ZR-75-1 and MDA-MB-231 cell lines via PDGFR- β , PDGF-BB, c-Kit and SCF expression. In: *International journal of molecular medicine* 42 (1). DOI: 10.3892/ijmm.2018.3590.

Kallio, E. A.; Koskinen, P. K.; Aavik, E.; Buchdunger, E.; Lemström, K. B. (1999): Role of platelet-derived growth factor in obliterative bronchiolitis (chronic rejection) in

the rat. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 160 (4), S. 1324–1332. DOI: 10.1164/ajrccm.160.4.9802006.

Kalluri, Raghu; Weinberg, Robert A. (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. In: *The Journal of clinical investigation* 119 (6), S. 1420–1428. DOI: 10.1172/JCI39104.

Kantarjian, Hagop; Giles, Francis; Wunderle, Lydia; Bhalla, Kapil; O'Brien, Susan; Wassmann, Barbara et al. (2006): Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. In: *The New England journal of medicine* 354 (24), S. 2542–2551. DOI: 10.1056/NEJMoa055104.

Keil, Laura; Schaub, Anna-Lena; Hirt, Stephan W.; Schmid, Christof; Lehle, Karla; Suesskind-Schwendi, Marietta von (2019): Synergism of imatinib, vatalanib and everolimus in the prevention of chronic lung allograft rejection after lung transplantation (LTx) in rats. In: *Histology and histopathology*, S. 18088. DOI: 10.14670/HH-18-088.

Khanna, D.; Saggar, R.; Mayes, M. D.; Abtin, F.; Clements, P. J.; Maranian, P. et al. (2011): A one-year, phase I/IIa, open-label pilot trial of imatinib mesylate in the treatment of systemic sclerosis-associated active interstitial lung disease. In: *Arthritis and rheumatism* 63 (11). DOI: 10.1002/art.30548.

Knoop, Christiane; Estenne, Marc (2006): Acute and chronic rejection after lung transplantation. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine* 27 (5), S. 521–533. DOI: 10.1055/s-2006-954609.

Kräuter, Anett (2021): Etablierung eines Kollagen-Kontraktionsassay zur Untersuchung der Wirkung von Imatinib, Nilotinib und Dasatanib auf die Kontraktionskraft von Rattenlungenfibroblasten. Online verfügbar unter <https://epub.uni-regensburg.de/46046/>.

Laohaburanakit, Petey; Chan, Andrew; Allen, Roblee P. (2003): Bronchiolitis obliterans. In: *Clinical reviews in allergy & immunology* 25 (3), S. 259–274. DOI: 10.1385/CRIAI:25:3:259.

Lappi-Blanco, E.; Soini, Y.; Kinnula, V.; Pääkkö, P. (2002): VEGF and bFGF are highly expressed in intraluminal fibromyxoid lesions in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. In: *The Journal of pathology* 196 (2). DOI: 10.1002/path.1038.

- Lehle, K.; von, Suesskind-Schwendi M.; Diez, C.; Michl, M.; Geissler, E. K.; Wottge, H. U. et al. (2012): Relevance of maintenance triple-drug immunosuppression to bridle the amplification of rat cytomegalovirus infection after experimental lung transplantation. In: *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 14 (6). DOI: 10.1111/j.1399-3062.2012.00751.x.
- Lombardo, L. J.; Lee, F. Y.; Chen, P.; Norris, D.; Barrish, J. C.; Behnia, K. et al. (2004): Discovery of N-(2-chloro-6-methyl- phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. In: *Journal of medicinal chemistry* 47 (27). DOI: 10.1021/jm049486a.
- Lu, Y. Y.; Zhao, X. K.; Yu, L.; Qi, F.; Zhai, B.; Gao, C. Q.; Ding, Q. (2017): Interaction of Src and Alpha-V Integrin Regulates Fibroblast Migration and Modulates Lung Fibrosis in A Preclinical Model of Lung Fibrosis. In: *Scientific reports* 7. DOI: 10.1038/srep46357.
- Madill, Janet; Aghdassi, Ellie; Arendt, Bianca; Hartman-Craven, Brenda; Gutierrez, Carlos; Chow, Chung-Wai; Allard, Johane (2009): Lung transplantation: does oxidative stress contribute to the development of bronchiolitis obliterans syndrome? In: *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)* 23 (2), S. 103–110. DOI: 10.1016/j.trre.2009.01.003.
- Manley, P. W.; Cowan-Jacob, S. W.; Buchdunger, E.; Fabbro, D.; Fendrich, G.; Furet, P. et al. (2002): Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 38 Suppl 5, S19-27.
- Manley, Paul W.; Stiefl, Nikolaus; Cowan-Jacob, Sandra W.; Kaufman, Susan; Mestan, Jürgen; Wartmann, Markus et al. (2010): Structural resemblances and comparisons of the relative pharmacological properties of imatinib and nilotinib. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 18 (19), S. 6977–6986. DOI: 10.1016/j.bmc.2010.08.026.
- Manouchehri, A.; Kanu, E.; Mauro, M. J.; Aday, A. W.; Lindner, JR; Moslehi, J. (2020): Tyrosine Kinase Inhibitors in Leukemia and Cardiovascular Events: From Mechanism to Patient Care. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 40 (2). DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.313353.

- Matsumura, Y.; Marchevsky, A.; Zuo, X. J.; Kass, R. M.; Matloff, J. M.; Jordan, S. C. (1995): Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation. In: *Transplantation* 59 (11), S. 1509–1517.
- McCormack, P. L. (2015): Nintedanib: first global approval. In: *Drugs* 75 (1). DOI: 10.1007/s40265-014-0335-0.
- Meyer, K. C.; Decker, C. A. (2017): Role of pirfenidone in the management of pulmonary fibrosis. In: *Therapeutics and clinical risk management* 13. DOI: 10.2147/TCRM.S81141.
- Meyer, K. C.; Raghu, G.; Verleden, G. M.; Corris, P. A.; Aurora, P.; Wilson, K. C. et al. (2014): An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. In: *The European respiratory journal* 44 (6). DOI: 10.1183/09031936.00107514.
- Mio, T.; Nagai, S.; Kitaichi, M.; Kawatani, A.; Izumi, T. (1992): Proliferative characteristics of fibroblast lines derived from open lung biopsy specimens of patients with IPF (UIP). In: *Chest* 102 (3). DOI: 10.1378/chest.102.3.832.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *Journal of immunological methods* 65 (1-2), S. 55–63.
- Nakajima, Takeshi; Palchevsky, Vyachesav; Perkins, David L.; Belperio, John A.; Finn, Patricia W. (2011): Lung transplantation: infection, inflammation, and the microbiome. In: *Seminars in immunopathology* 33 (2), S. 135–156. DOI: 10.1007/s00281-011-0249-9.
- Pandolfi, L.; Fusco, R.; Frangipane, V.; D'Amico, R.; Giustra, M.; Bozzini, S. et al. (2020): Loading Imatinib inside targeted nanoparticles to prevent Bronchiolitis Obliterans Syndrome. In: *Scientific reports* 10 (1). DOI: 10.1038/s41598-020-77828-y.
- Perch, M.; Besa, V.; Corris, P. A.; Iversen, M.; Kneidinger, N.; Leuckfeld, I. et al. (2020): A European Multi-Center, Randomized, Double-Blind Trial of Pirfenidone in Bronchiolitis-Obliterans-Syndrome Grade 1-3 in Lung Transplant Recipients

(European Trial of Pirfenidone in BOS (EPOS)). In: *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 39 (4, Supplement), S12. DOI: 10.1016/j.healun.2020.01.1130.

Pierce, G. F.; Mustoe, T. A.; Altrock, B. W.; Deuel, T. F.; Thomason, A. (1991): Role of platelet-derived growth factor in wound healing. In: *Journal of cellular biochemistry* 45 (4). DOI: 10.1002/jcb.240450403.

Posimo, J. M.; Unnithan, A. S.; Am Gleixner; Choi, H. J.; Jiang, Y.; Pulugulla, S. H.; Leak, R. K. (2014): Viability assays for cells in culture. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (83). DOI: 10.3791/50645.

Promega Corporation: CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Technical Bulletin TB245.

Promega Corporation: RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay. Technical Manual 2016.

Promega Corporation (2012): CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS). Online verfügbar unter https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-non_radioactive-cell-proliferation-assay-_mts_/?catNum=G5421, zuletzt aktualisiert am 2012, zuletzt geprüft am 12.09.2023.

Promega Corporation (2021): RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay. Online verfügbar unter https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/realtime_glo-mt-cell-viability-assay/?catNum=G9711, zuletzt aktualisiert am 2021, zuletzt geprüft am 12.09.2023.

Rambhatla, A.; Strug; De, Paredes J. G.; Cordoba, Munoz M. I.; Thakur, M. (2021): Fertility considerations in targeted biologic therapy with tyrosine kinase inhibitors: a review. In: *Journal of assisted reproduction and genetics* 38 (8). DOI: 10.1007/s10815-021-02181-6.

Sato, M. (2020): Bronchiolitis obliterans syndrome and restrictive allograft syndrome after lung transplantation: why are there two distinct forms of chronic lung allograft dysfunction? In: *Annals of translational medicine* 8 (6). DOI: 10.21037/atm.2020.02.159.

Sato, M.; Keshavjee, S.; Liu, M. (2009): Translational research: animal models of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. In: *American journal of*

transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 9 (9), S. 1981–1987. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2009.02770.x.

Sayegh, M. H.; Carpenter, C. B. (2004): Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. In: *The New England journal of medicine* 351 (26). DOI: 10.1056/NEJMon043418.

Sebaugh, J. L. (2011): Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. In: *Pharmaceutical statistics* 10 (2). DOI: 10.1002/pst.426.

Selleckchem: Dasatinib (BMS-354825) Datasheet. Online verfügbar unter <https://www.selleckchem.com/datasheet/Dasatinib-S102106-DataSheet.html>, zuletzt geprüft am 14.09.2023.

Selleckchem: Imatinib (STI571) Mesylate Datasheet. Online verfügbar unter <https://www.selleckchem.com/datasheet/Imatinib-Mesylate-S102606-DataSheet.html>, zuletzt geprüft am 14.09.2023.

Selleckchem: Nilotinib (AMN-107) Datasheet. Online verfügbar unter <https://www.selleckchem.com/datasheet/Nilotinib-S103308-DataSheet.html>, zuletzt geprüft am 14.09.2023.

Serreels, A.; MacPherson, I. R.; Evans, T. R.; Lee, F. Y.; Clark, E. A.; Sansom, O. J. et al. (2006): Identification of potential biomarkers for measuring inhibition of Src kinase activity in colon cancer cells following treatment with dasatinib. In: *Molecular cancer therapeutics* 5 (12). DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0382.

Sheppard, M. N.; Harrison, N. K. (1992): New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 1. Lung injury, inflammatory mediators, and fibroblast activation in fibrosing alveolitis. In: *Thorax* 47 (12). DOI: 10.1136/thx.47.12.1064.

Sims, Jonathan T.; Plattner, Rina (2009): MTT assays cannot be utilized to study the effects of STI571/Gleevec on the viability of solid tumor cell lines. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 64 (3), S. 629–633. DOI: 10.1007/s00280-009-1004-y.

Skhirtladze, C.; Distler, O.; Dees, C.; Akhmetshina, A.; Busch, N.; Venalis, P. et al. (2008): Src kinases in systemic sclerosis: central roles in fibroblast activation and in skin fibrosis. In: *Arthritis and rheumatism* 58 (5). DOI: 10.1002/art.23436.

Literaturverzeichnis

Stahtea, X. N.; Roussidis, A. E.; Kanakis, I.; Tzanakakis, G. N.; Chalkiadakis, G.; Mavroudis, D. et al. (2007): Imatinib inhibits colorectal cancer cell growth and suppresses stromal-induced growth stimulation, MT1-MMP expression and pro-MMP2 activation. In: *International journal of cancer* 121 (12). DOI: 10.1002/ijc.23029.

Steinberg, Michael (2007): Dasatinib: a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. In: *Clinical therapeutics* 29 (11), S. 2289–2308. DOI: 10.1016/j.clinthera.2007.11.005.

Stepanenko, A. A.; Dmitrenko, V. V. (2015): Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. In: *Gene* 574 (2), S. 193–203. DOI: 10.1016/j.gene.2015.08.009.

Suesskind-Schwendi, M. von; Heigel, E.; Pfaehler, S.; Haneya, A.; Schmid, C.; Hirt, S. W.; Lehle, K. (2016): Protective function of pirfenidone and everolimus on the development of chronic allograft rejection after experimental lung transplantation. In: *Histology and histopathology* 31 (7), S. 793–805. DOI: 10.14670/HH-11-712.

Suesskind-Schwendi, M. von; Valenti, Verena; Haneya, Assad; Pühler, T.; Bewig, B.; Schmid, C. et al. (2013a): Synergism of imatinib mesylate and everolimus in attenuation of bronchiolitis obliterans after rat LTX. In: *Histology and histopathology* 28 (10), S. 1273–1284. DOI: 10.14670/HH-28.1273.

Suesskind-Schwendi, Marietta von; Boxhammer, Elke; Hirt, Stephan W.; Schreml, Stephan; Schmid, Christof; Wollin, Lutz; Lehle, Karla (2017): The activity of nintedanib in an animal model of allogenic left lung transplantation resembling aspects of allograft rejection. In: *Experimental lung research* 43 (6-7), S. 259–270. DOI: 10.1080/01902148.2017.1354408.

Suesskind-Schwendi, Marietta von; Brunner, Elisabeth; Hirt, Stephan W.; Diez, Claudius; Ruummele, Petra; Puehler, Thomas et al. (2013b): Suppression of bronchiolitis obliterans in allogeneic rat lung transplantation--effectiveness of everolimus. In: *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 65 (4), S. 383–389. DOI: 10.1016/j.etp.2011.12.002.

Suesskind-Schwendi, Marietta von; Hirt, Stephan W.; Diez, Claudius; Ruetteme, Petra; Puehler, Thomas; Schmid, Christof; Lehle, Karla (2012): Impact of the severity of acute rejection in the early phase after rat lung transplantation on the effectiveness of mycophenolate mofetil to treat chronic allograft rejection. In: *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 42 (1), S. 142–148. DOI: 10.1093/ejcts/ezr277.

Sugiura, H.; Liu, X.; Duan, F.; Kawasaki, S.; Togo, S.; Kamio, K. et al. (2007): Cultured lung fibroblasts from ovalbumin-challenged "asthmatic" mice differ functionally from normal. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 37 (4). DOI: 10.1165/rcmb.2007-0089OC.

Sun, Haishuang; Deng, Mei; Chen, Wenhui; Liu, Min; Dai, Huaping; Wang, Chen (2022): Graft dysfunction and rejection of lung transplant, a review on diagnosis and management. In: *The clinical respiratory journal* 16 (1), S. 5–12. DOI: 10.1111/crj.13471.

Süßkind-Schwendi, M. von; Ruetteme, P.; Schmid, C.; Hirt, S. W.; Lehle, K. (2012a): Lung transplantation in the fischer 344-wistar kyoto strain combination is a relevant experimental model to study the development of bronchiolitis obliterans in the rat. In: *Experimental lung research* 38 (3), S. 111–123. DOI: 10.3109/01902148.2012.656820.

Süßkind-Schwendi, M. von; Ruetteme, P.; Schmid, C.; Hirt, S. W.; Lehle, K. (2012b): Lung transplantation in the fischer 344-wistar kyoto strain combination is a relevant experimental model to study the development of bronchiolitis obliterans in the rat. In: *Experimental lung research* 38 (3). DOI: 10.3109/01902148.2012.656820.

Swaminathan, A. C.; Todd, J. L.; Palmer, S. M. (2021): Advances in Human Lung Transplantation. In: *Annual review of medicine* 72. DOI: 10.1146/annurev-med-080119-103200.

Tallquist, M.; Kazlauskas, A. (2004): PDGF signaling in cells and mice. In: *Cytokine & growth factor reviews* 15 (4). DOI: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.003.

Terry L Riss; Richard A Moravec; Andrew L Niles; Sarah Duellman; H el ene A Benink; Tracy J Worzella; Lisa Minor (2016): Cell Viability Assays. In: Terry L. Riss, Richard A. Moravec, Andrew L. Niles, Sarah Duellman, H el ene A. Benink, Tracy J. Worzella

und Lisa Minor (Hg.): Assay Guidance Manual [Internet]: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.

Tikkanen, Jussi M.; Hollmén, Maria; Nykänen, Antti I.; Wood, Jeanette; Koskinen, Petri K.; Lemström, Karl B. (2006): Role of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor in obliterative airway disease. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 174 (10), S. 1145–1152. DOI: 10.1164/rccm.200601-044OC.

Valenzi, Eleanor; Bulik, Melissa; Tabib, Tracy; Morse, Christina; Sembrat, John; Bittar, Humberto Trejo et al. (2019): Single-cell analysis reveals fibroblast heterogeneity and myofibroblasts in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. In: *Annals of the rheumatic diseases* 78 (10), S. 1379–1387. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-214865.

van der Ploeg, E. A.; Melgert, B. N.; Burgess, J. K.; Gan, C. T. (2021): The potential of biomarkers of fibrosis in chronic lung allograft dysfunction. In: *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)* 35 (3). DOI: 10.1016/j.trre.2021.100626.

Venuta, Federico; van Raemdonck, Dirk (2017): History of lung transplantation. In: *Journal of thoracic disease* 9 (12), S. 5458–5471. DOI: 10.21037/jtd.2017.11.84.

Verleden, G. M.; Glanville, A. R.; Lease, E. D.; Fisher, A. J.; Calabrese, F.; Corris, P. A. et al. (2019a): Chronic lung allograft dysfunction: Definition, diagnostic criteria, and approaches to treatment-A consensus report from the Pulmonary Council of the ISHLT. In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 38 (5). DOI: 10.1016/j.healun.2019.03.009.

Verleden, Geert M.; Vos, Robin; Vanaudenaerde, Bart; Dupont, Lieven; Yserbyt, Jonas; van Raemdonck, Dirk; Verleden, Stijn (2015): Current views on chronic rejection after lung transplantation. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 28 (10), S. 1131–1139. DOI: 10.1111/tri.12579.

Verleden, Geert M.; Vos, Robin; Vleeschauwer, Stéphanie I. de; Willems-Widyastuti, Anna; Verleden, Stijn E.; Dupont, Lieven J. et al. (2009): Obliterative bronchiolitis

following lung transplantation: from old to new concepts? In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 22 (8), S. 771–779. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2009.00872.x.

Verleden, Stijn E.; Vos, Robin; Verleden, Geert M. (2019b): Chronic lung allograft dysfunction: light at the end of the tunnel? In: *Current opinion in organ transplantation* 24 (3), S. 318–323. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000632.

Virakul, Sita; Dalm, Virgil A. S. H.; Paridaens, Dion; van den Bosch, Willem A.; Hirankarn, Nattiya; van Hagen, P. Martin; Dik, Willem A. (2014): The tyrosine kinase inhibitor dasatinib effectively blocks PDGF-induced orbital fibroblast activation. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 252 (7), S. 1101–1109. DOI: 10.1007/s00417-014-2674-7.

Vittal, R.; Horowitz, J. C.; Moore, B. B.; Zhang, H.; Martinez, F. J.; Toews, G. B. et al. (2005): Modulation of prosurvival signaling in fibroblasts by a protein kinase inhibitor protects against fibrotic tissue injury. In: *The American journal of pathology* 166 (2). DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62260-2.

Wang, P.; Henning, S. M.; Heber, D. (2010): Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. In: *PLoS one* 5 (4). DOI: 10.1371/journal.pone.0010202.

Waters, David W.; Blokland, Kaj E. C.; Pathinayake, Prabuddha S.; Burgess, Janette K.; Mutsaers, Steven E.; Prele, Cecilia M. et al. (2018): Fibroblast senescence in the pathology of idiopathic pulmonary fibrosis. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 315 (2), L162-L172. DOI: 10.1152/ajplung.00037.2018.

Weisberg, E.; Manley, P. W.; Breitenstein, W.; Brügggen, J.; Cowan-Jacob, S. W.; Ray, A. et al. (2005): Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. In: *Cancer cell* 7 (2). DOI: 10.1016/j.ccr.2005.01.007.

Weisberg, E.; Parent, A.; Yang, P. L.; Sattler, M.; Liu, Q.; Wang, J. et al. (2020): Repurposing of Kinase Inhibitors for Treatment of COVID-19. In: *Pharmaceutical research* 37 (9). DOI: 10.1007/s11095-020-02851-7.

Weisberg, E.; Wright, R. D.; Jiang, J.; Ray, A.; Moreno, D.; Manley, P. W. et al. (2006): Effects of PKC412, nilotinib, and imatinib against GIST-associated PDGFRA mutants with differential imatinib sensitivity. In: *Gastroenterology* 131 (6). DOI: 10.1053/j.gastro.2006.09.017.

Werlein, C.; Ackermann, M.; Hoffmann, T. L.; Laenger, F.; Jonigk, D. (2021): [Fibrotic remodeling of the lung following lung and stem-cell transplantation]. In: *Der Pathologe* 42 (1). DOI: 10.1007/s00292-020-00898-2.

Wollin, Lutz; Distler, Jörg H. W.; Redente, Elizabeth F.; Riches, David W. H.; Stowasser, Susanne; Schlenker-Herceg, Rozsa et al. (2019): Potential of nintedanib in treatment of progressive fibrosing interstitial lung diseases. In: *The European respiratory journal* 54 (3). DOI: 10.1183/13993003.00161-2019.

Xu, S.; Denton, C. P.; Holmes, A.; Dashwood; Abraham, D. J.; Black, C. M. (1998): Endothelins: effect on matrix biosynthesis and proliferation in normal and scleroderma fibroblasts. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 31 Suppl 1. DOI: 10.1097/00005344-199800001-00101.

Yoshiyasu, N.; Sato, M. (2020): Chronic lung allograft dysfunction post-lung transplantation: The era of bronchiolitis obliterans syndrome and restrictive allograft syndrome. In: *World journal of transplantation* 10 (5). DOI: 10.5500/wjt.v10.i5.104.

Yusen, R. D.; Edwards, L. B.; Kucheryavaya, A. Y.; Benden, C.; Dipchand, A. I.; Dobbels, F. et al. (2014): The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation. In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 33 (10). DOI: 10.1016/j.healun.2014.08.004.

Zhang, P.; Gao, W. Y.; Turner, S.; Ducatman, B. S. (2003): Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect in vitro. In: *Molecular cancer* 2. DOI: 10.1186/1476-4598-2-1.

Zhang, Ping; Huang, Jingfeng; Jin, Fangfang; Pan, Jiaohai; Ouyang, Guifang (2019): Imatinib-induced irreversible interstitial lung disease: A case report. In: *Medicine* 98 (8), e14402. DOI: 10.1097/MD.00000000000014402.

Danksagung

Ich bedanke mich ausdrücklich bei Prof. Dr. Christof Schmid, dem Leiter der Klinik und Poliklinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg. An seinem Lehrstuhl und in seiner Forschungseinrichtung wurde die vorliegende Arbeit angefertigt.

Mein Dank geht zudem an PD Dr. med. vet. Marietta von Süßkind-Schwendi. Mit ihrer kompetenten, warmherzigen und unkomplizierten Art konnte sie mir mehrfach über schwierige Phasen in der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit helfen.

Ein besonderer Dank gebührt Prof. Dr. rer. nat. Karla Lehle, die immerzu als treibende Kraft hinter dem Projekt stand. Von ihr konnte ich immer ein offenes Ohr erhalten, sie stand stets mit fachlicher Unterstützung zu meiner Seite und half mir über mehrere Momente des Zweifels hinweg. Trotz einiger Rückschläge hat sie nicht aufgehört an die Fertigstellung des Projektes und an mich und meine Fähigkeiten zu glauben. Danke für die unglaubliche Geduld.

Auch den MT(L)As Katrin Bielenberg, Karin Hollnberger, Christina Leykauf, Angelika Urbanek und Eva Lesser sei herzlich gedankt an dieser Stelle. Ohne ihre fachliche und tatkräftige Unterstützung wäre die Umsetzung dieses Projektes nicht möglich gewesen.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch an meine Familie aussprechen. Stets haben sie an mich geglaubt und mich daran erinnert, dass jeder sein eigenes Tempo hat. Meinen Eltern, die mich erdeten, meinem Bruder Michael, der mich computertechnisch mit Rat und Tat unterstützte und meiner Schwester Monika, die mich organisatorisch beriet, danke ich sehr.

Ich möchte mich zudem bei Dr. med. Franciska Zeckai bedanken, ohne die ich nicht an dieses Projekt gelangt wäre und die als mentale Stütze sowohl im Arbeitsprozess als auch während des kompletten Studiums fungierte. Ebenso haben meine Freunde, die motivierend zu meiner Seite standen, meinen Dank.

Und zum Schluss geht mein spezieller Dank an dich, Patrick. Du warst nicht nur Quelle meiner Motivation, sondern so viel mehr. Sogar fachlich konnte ich auf dich zählen. Danke, dass du so überzeugt von meinen Fähigkeiten warst, dass ich nicht anders konnte, als selbst an sie zu glauben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit selbstständig und ohne weiterer, außer der angegebenen, Hilfsmitteln verfasst habe.

Alle Erkenntnisse, die aus Quellen direkt oder indirekt übernommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

Die entgeltliche Hilfe von Vermittlung- beziehungsweise Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) habe ich nicht in Anspruch genommen. Niemand hat von mir mittelbar oder unmittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht.

Außerdem versichere ich, dass diese Arbeit bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt wurde.