

Diplomarbeit

**Einsatz von Hanshiyi bei Covid-19:
Untersuchung einer Kräutermischung der Traditionellen
Chinesischen Medizin hinsichtlich ihrer modulierenden
Effekte auf die Muzinsynthese in normalen humanen
Epithelzellen.**

eingereicht von

Marlies Agnes Ponsold

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Drⁱⁿ. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Lehrstuhl für Zellbiologie, Histologie und Embryologie

unter der Anleitung von

Priv.-Doz. Dr.ⁱⁿ Dagmar Brislinger, MSc

Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Heinz Hutter

Graz, am 05. Dezember 2023

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, 05.12.2023

Marlies Agnes Ponsold eh.

Danksagungen

Zu allererst möchte ich mich bei meiner Betreuerin Priv.-Doz. Dr. MSc Dagmar Brislinger bedanken - ohne sie, wäre nichts von all dem hier möglich gewesen. Sie dient als Inspiration und Vorbild den Schritt zu wagen gerade als Frau in die Forschung zu gehen. Außerdem möchte ich die rein weibliche Forschungsgruppe hervorheben, die zeigt, wie produktive und konstruktive Zusammenarbeit aussieht.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei meinem Zweitbetreuer Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Heinz Hutter bedanken, der das ganze überhaupt erst „eingefädelt“ hat.

Auch geht mein Dank an Monika Sundl, die den Part der BEAS-2B Zellkultur für mich übernommen hat, sowie ganz speziell an Maike Demel, die mit Tatkraft und guten Nerven im Labor an meiner Seite gestanden ist.

Vielen lieben Dank an Mag. Stefanie Tiefenbacher, welche die Hanshiyi Dekokte zur Verfügung gestellt hat und an Univ.-Prof. Dr. Dr. Rudolf Bauer, der das gesamte Forschungsprojekt ins Leben gerufen hat.

Widmung

Ich möchte diese Arbeit meinem viel zu früh verstorbenen Altgriechisch Professor Josef „Pini“ Pfeifer widmen, der uns alle inspiriert hat, mehr in dieser Welt zu (be)staunen.

„Wir können den Wind nicht ändern, aber die Segel anders setzen.“

- Aristoteles

Zusammenfassung

Mit Beginn der Corona Pandemie forschte man weltweit an Therapiemöglichkeiten. Doch neben klassischen schulmedizinischen Ansätzen, kamen in China - einem Land mit langer Tradition für alternative Heilmethoden (vgl. Hays 2005 : 113-117) - auch TCM-Extrakte zum Einsatz (vgl. Guo et al. 2022). Den Erfolg dieser, bewies eine Reihe klinischer Studien (vgl. Tian et al. 2020; Xiong et al. 2020). Allerdings sind die Wirkmechanismen bis dato noch wenig verstanden und die Datenlage weitestgehend unzureichend (vgl. Qiu et al 2020).

Im Atemweg eines schwer an COVID-19 erkrankten männlichen Patienten konnte man Mukus reich an MUC5AC feststellen, währenddessen die Konzentration von MUC5B stark reduziert war (vgl. Yin et al. 2021). Neben der Menge an Muzin, dürfte also auch das Verhältnis unterschiedlicher Muzine für den Krankheitsverlauf von Bedeutung sein.

Ziel dieser Arbeit war es daher die Wirkung zweier Hanshiyi Dekokte in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Synthese der Muzinproteine MUC5AC und MUC5B in physiologischen humanen epithelialen Zellen (BEAS-2B) zu testen und sowohl qualitativ als auch quantitativ zu analysieren.

Nach dreitägiger Inkubation der BEAS-2B Zelllinie auf ALI-Kultur mit den jeweiligen Hanshiyi Dekokten konnten lediglich sieben der acht verwendeten Konzentrationen aufgrund von Kontamination weiter aufgearbeitet werden.

In den histologischen Schnittbildern zeigte sich ein sehr dichter Zellrasen, der sich teilweise oder vollständig von der perforierten Membran gelöst hatte. In der Immunhistochemie war eine deutliche Anfärbung für anti-MUC5B und eine geringer ausgeprägte für anti-MUC5AC ersichtlich - allerdings reichte dies nicht für eine computergestützte Auswertung.

Die durchgeführte qPCR lieferte in Zusammenschau mit der Immunhistochemie widersprüchliche Ergebnisse.

Abschließend ist festzuhalten, dass diese Arbeit als Beginn einer Forschungsreihe anzusehen ist und weitere vorrangig niedrigere Konzentrationen getestet werden sollten,

um ein genaues Bild der modulierenden Effekte der Hanshiyi Formel zu erhalten und die klinische Wirksamkeit besser zu verstehen.

Abstract

Since the beginning of the Corona pandemic the world searched for a possible cure. Beside conventional treatment, China - known for a long history of medical tradition (Hays 2005 : 113-117) - used herbal medicine (Guo et al. 2022). Successfully, as many studies show (Tian et al. 2020; X. Xiong et al. 2020). Nevertheless neither mode of action nor enough data is available yet (Qiu et al 2020).

A case report (Yin et al. 2021) performed in a critically ill COVID-19 male patient showed a high amount of MUC5AC containing mucus, while the level of MUC5B was significantly low. Which could implicate that not only the amount of mucus, but also the ratio of different mucin proteins would be crucial for the course of disease.

The aim of this study was to evaluate the effects of two Hanshiyi Dekokts - using concentrations - on the synthesis of mucoid proteins MUC5AC and MUC5B in Normal Human Epithelial cells (BEAS-2B) as well as performing a qualitative and quantitative analysis.

After a three day incubation some of the samples showed contamination, which forced to rule out one concentration.

Histological slides showed a very thick cell-layer, which detached partially or completely from the used porous membrane. Immunohistochemistry for anti-MUC5B showed a vivid red staining whilst anti-MUC5AC showed only a slightly reddish colouring - due to a lack of saturation in both a computer-based analysis could not be performed.

qPCR results in comparison to the immunohistochemistry have to be seen as inconclusive.

To conclude, this study should be the beginning of an ongoing research process, in which lower concentrations are to be tested to contribute to a better understanding of modulating effects as well as clinical potency of the Hanshiyi formula.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und deren Erklärung.....	1
Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	3
1 Einleitung	4
1.1 Das respiratorische Epithel.....	4
1.1.1 Zelluläre Bestandteile	4
1.1.2 Mukoziliäre Clearance (MCC) und Abwehrmechanismen	5
1.1.3 Muzine	6
1.2 Air-Liquid-Interface (ALI) Zellkultur.....	6
1.2.1 ALI Kultur des respiratorischen Epithels	7
1.3 COVID-19 - ein kurzer Überblick.....	7
1.4 Traditionelle Chinesische Medizin (TCM).....	9
1.4.1. Klinische Bedeutung in Bezug auf COVID-19	9
1.4.2. Hanshiyi Formula	10
1.5 Ziel der Arbeit	11
2 Materialien.....	12
3 Methoden.....	17
3.1 Kultur des respiratorischen Epithels.....	17
3.1.1 BEAS-2B Zellkultur	17
3.1.2 ALI-Kultur.....	17
3.1.3 Beimpfen und Ernte der Zellen mit Hanshiyin Dekokten	18
3.1.4 Ernte der beimpften Zellkultur	19
3.2 Histologische Aufarbeitung.....	20
3.2.1 Fixieren.....	20
3.2.2 Entwässern.....	21

3.2.3 Paraffin Einbettung.....	21
3.2.4 Schneiden	22
3.2.5 Anbacken	24
3.2.6 H.E. Färbung	24
3.2.7 Immunhistochemie (IHC).....	26
3.2.8 Bildakquisition	30
3.3 Molekularbiologische Aufarbeitung.....	30
3.3.1 RNA-Gewinnung.....	30
3.3.2 Messen von RNA	33
3.3.3 cDNA-Synthese	33
3.3.4 qPCR.....	34
4 Ergebnisse.....	36
4.1. Kontamination der Zellkultur	36
4.2 Unterschiedliche Färbeergebnisse	36
4.2.1 Kontrolle.....	37
4.2.2 Nature Dekokt	39
4.2.3 Frozen- & freeze-Dried Dekokt.....	41
4.3 Zufriedenstellende RNA-Messergebnisse	43
4.4 Inkongruente PCR-Ergebnisse	44
5 Diskussion	46
5.1 Versuchsaufbau	46
5.2 Beurteilung der veränderten Muzinproduktion	47
5.3 Einschränkungen	49
5.4 Schlussfolgerung und Ausblick.....	49
Quellenverzeichnis	51
Anhang	55
Herstellung von saurem Hämalun nach Mayer lt. Romeis	55

Abkürzungen und deren Erklärung

H.E.	Hämatoxylin Eosin Färbung
HSYF	Hanshiyi Formula
TCM	traditionelle chinesische Medizin
PCC	periziliäres Layer
MCC	mukoziliäre Clearance
ALI	Air-Liquid-Interface

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema respiratorisches Epithel Zusammensetzung	...	5
Abbildung 2: Schema der ALI-Kultur inkl. Beimpfen mit Hanshiyi Dekokt	...	17
Abbildung 3a: Schema „Nature“ Dekokt 0,016 g/ml des Trockenextrakts in Wasser	...	18
Abbildung 3b: Schema „frozen- & freeze-dried“ Dekokt 0,05g/ml des Trockenextrakts in DMSO	...	18
Abbildung 4a: Schema „Nature“ Dekokt nach drei Tagen Inkubation	...	19 / 46
Abbildung 4b: Schema „frozen- & freeze-dried“ Dekokt nach drei Tagen Inkubation	...	19 /46
Abbildung 5: Schema histologische Aufarbeitung	...	20
Abbildung 6: Schema RNA-Isolation - aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde manche Arbeitsschritte vereinfacht dargestellt (Details siehe Fließtext)	...	32
Abbildung 7a: Schema Protokoll MUC2 und MUC5AC	...	35
Abbildung 7b: Schema Protokoll MUC5B	...	35
Scans: Kontrolle Block „C1“ - ganze Membran wurde eingebettet	...	37
Scans: Kontrolle Block „C2“ - beide Membranhälften in eine Kassette	...	37
Scans: Positivkontrollen MUC5AC und MUC5B	...	38
Scans: nature 5µl bzw. 0,08mg/ml Block N5	...	39
Scans: nature 50µl bzw. 0,76mg/ml Block N50	...	39
Scans: nature 100µl bzw. 1,45mg/ml Block N100	...	40
Scan: frozen- & freeze-dried 1µl bzw. 0,05mg/ml Block „FD1“	...	41
Scan: frozen- & freeze-dried 1µl bzw. 0,05mg/ml Block „FD1 II“	...	41
Scan: frozen- & freeze-dried 10µl bzw. 0,5mg/ml Block „FD10“	...	42
Scan: frozen- & freeze-dried 10µl bzw. 0,5mg/ml Block „FD10 II“	...	42
Graphik: Ratio to Control “Nature” Dekokt	...	48
Graphik: Ratio to Control “frozen- & freeze-Dried” Dekokt	...	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhaltsstoffe Hanshiyi Formula (Tiefenbacher et al. 2021)	...	10-11
Tabelle 2: verwendete Materialien der Zellkultur	...	12
Tabelle 3: verwendete Geräte in der Zellkultur	...	12
Tabelle 4: verwendete Materialien für die histologische Aufarbeitung	...	13-14
Tabelle 5: verwendete Geräte für die histologische Aufarbeitung	...	14
Tabelle 6: verwendete Materialien für die molekularbiologische Aufarbeitung	...	15
Tabelle 7: verwendete Geräte für die molekularbiologische Aufarbeitung	...	16
Tabelle 8: histologische Proben	...	20-21
Tabelle 9: Anmerkungen zum Gießvorgang	...	22
Tabelle 10: Schneidvorgänge	...	24
Tabelle 11: Färbevorgänge	...	24-25
Tabelle 12: Entparaffinieren & Entwässern	...	25
Tabelle 13: H.E. Färbevorgang	...	25-26
Tabelle 14: IHC Planung	...	26
Tabelle 15: IHC Protokoll Anti-MUC5B	...	27-28
Tabelle 16: IHC Protokoll Anti-MUC5AC	...	29-30
Tabelle 17: RNA-Lyse Proben	...	30
Tabelle 18: qPCR MUC5AC	...	34
Tabelle 19: qPCR MUC5B	...	34-35
Tabelle 20: qPCR Einstellungen	...	35
Tabelle 21: RNA Messergebnisse	...	43
Tabelle 22: qPCR ACTB60 und MUC5AC	...	44
Tabelle 23: qPCR ACTB60 und MUC5B	...	45

1 Einleitung

1.1 Das respiratorische Epithel

Das mehrreihige respiratorische Epithel stellt ein hoch spezialisiertes Epithel dar. Seine Funktion beschränkt sich nicht nur auf Konduktion, sondern ist viel weitreichender: Mukoziliäre Clearance, Anfeuchten und Anwärmen der Atemluft, Immunabwehr, endokrine Funktionen sowie vermitteln von Schutzreflexen. Es stellt eine Barriere für inhalierten Noxen dar und erstreckt sich von der Nase bis hinein in Bronchi und Bronchioli. (vgl. Lüllmann-Rauch 2019 : 408 ff)

1.1.1 Zelluläre Bestandteile

Flimmerzellen dienen dem Abtransport von Schleim. Ausgestattet sind sie dafür mit Kinozilien sowie Mikrovilli (vgl. ebd.).

Becherzellen - im englischen goblet cells - sezernieren Schleim, werden aber mit zunehmender Tiefe der Atemwege und abnehmender konduktiven Funktion sukzessive weniger (vgl. ebd.).

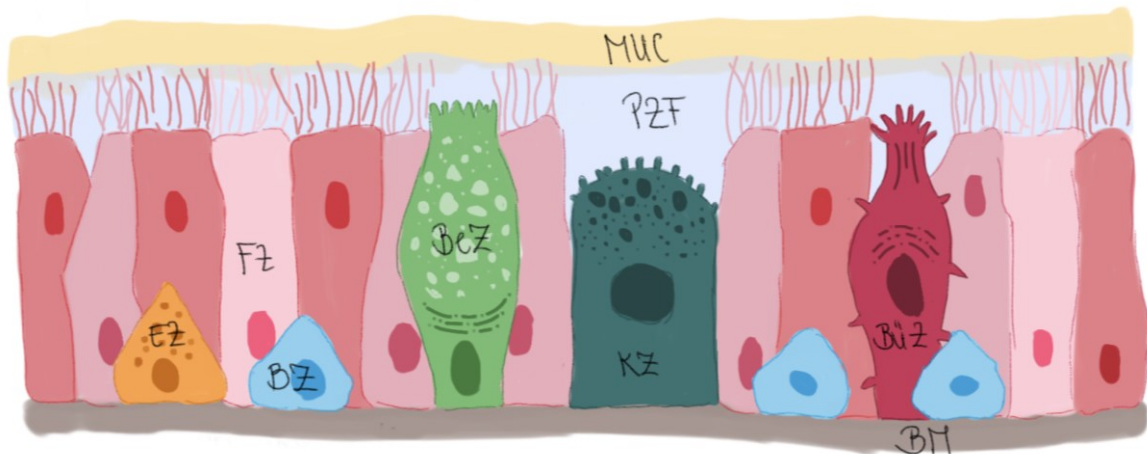
Basalzellen stellen das Bindeglied zwischen dem respiratorischen Epithel sowie der Basalmembran dar und sorgen für den nötigen Halt. Darüber hinaus dürften sie zumindest teilweise stammzellähnliche Funktionen innehaben und für die Zellneubildung zuständig sein (vgl. ebd.).

Bürstenzellen verfügen über kurze steife Mikrovilli. Sie dienen als Chemosensoren und wirken über Ausschüttung von Acetylcholin auf den Nervus vagus (vgl. ebd.).

Endokrine Zellen sind über den ganzen Atemtrakt hinweg disseminiert. Ihre Funktion ist noch nicht ausreichend verstanden (vgl. ebd.).

Keulenzellen - auch “club cells” genannt - sind in der Lage verschiedenste Proteine zu sezernieren und können damit einer überschießende Immunreaktion gegensteuern (vgl. ebd.).

Abbildung 1: Schema respiratorisches Epithel Zusammensetzung



EZ ... endokrine Zelle; FZ ... Flimmerzelle; BZ ... Basalzelle; BeZ ... Becherzelle; MUC ... Schleimteppich; PZF ... periziliäre Flüssigkeitsschicht; KZ ... Keulenzelle; BüZ ... Bürstenzelle; BM ... Basalmembran

1.1.2 Mukoziliäre Clearance (MCC) und Abwehrmechanismen

Die dem Atemtrakt zur Verfügung stehenden Abwehrmechanismen sind vielfältig. Im oberen Atemtrakt stehen neben Nieß- und Hustenreflex, die mukoziliäre Clearance, dendritische Zellen zum Antigen-Einfang, zahlreiche Immunzellen, IgA-Antikörper sowie weitere Abwehrstoffe im Mukus zur Verfügung. (vgl. Lüllmann-Rauch 2019 : 425)

Die mukoziliäre Clearance (MCC) wird durch zwei verschiedene Schichten um und auf den Zilien bewerkstelligt. Die periziliäre Flüssigkeitsschicht ist wesentlich wässriger und ermöglicht einen koordinierten Zilienschlag. Im darüberliegenden visköse Schleim bleiben größere Pathogene hängen, die in Richtung des Zilienschlags zum Rachen transportiert werden bis sie schließlich geschluckt oder abgehustet werden können. Während der visköse Schleim aus mit Wasser vollgesogenen Muzinen besteht und von Becherzellen

sowie seromukösen Drüsen sezerniert wird, wird die darunterliegende 5 µm dicke wässrige Schicht vom gesamten Epithel gebildet und in Homöostase gehalten. Zu beachten ist, dass die Zilienspitzen teilweise bis in die visköse Schicht hineinreichen und so der Schleimteppich durch metachrone Bewegung Stück für Stück weiter transportiert wird. (vgl. ebd.)

1.1.3 Muzine

Im Menschen findet man zumindest einundzwanzig bekannte Muzin Gene, 14 davon werden in den Atemwegen exprimiert. Eingeteilt können diese in sekretorische, zellgebundene sowie Gel-bildende Muzine werden. Zu den letzteren zählen MUC5B sowie MUC5AC, die von Becher- und Keulenzellen sezerniert werden (vgl. Whitsett 2018).

Die Rolle von MUC5B sowie MUC5AC wurde in Mausmodellen erforscht. MUC5B scheint essentiell für die mukoziliäre Clearance zu sein, und spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenkontrolle. Ein Ausschalten des Gens führte zu Sekretrückstau, bakteriellen Infektionen sowie Bakteriämie (vgl. Roy et al. 2013).

Dahingegen konnten nach Ausschalten des MUC5AC Gens positive Effekte in Bezug auf allergische Entzündungsreaktionen und Überempfindlichkeit des Immunsystems beobachtet werden (vgl. Evans et al. 2015).

Aufgebaut sind Gel-bildende Muzine aus einem Proteinfaden und daran aufgereihten Polysaccharid-Ketten. Die Quervernetzung geschieht durch Disulfidbrücken. Nach Exozytose kommen die Muzine mit Wasser in Kontakt und quellen rasch auf (vgl. Lüllmann-Rauch 2019 : 141).

1.2 Air-Liquid-Interface (ALI) Zellkultur

Die ALI-Zellkultur stellt eine Möglichkeit dar ein pseudostratifiziertes Epithel in vitro nachzubilden. Dabei bietet es den Vorteil auf Tiermodelle zu verzichten, die in ihrem Metabolismus zumeist nicht adäquat mit dem Menschen vergleichbar sind. Der Nachteil besteht darin, dass ein in vitro Versuch nie mit einem in vivo Versuch gleichzusetzen ist. (vgl. Bérubé et al. 2010 : 311ff.)

Herkömmliche Zellmodelle arbeiten mit von Medium umspülten Zellen, davon unterscheidet sich die ALI-Kultur grundlegend. Die Zellen werden zwar in einer

Kulturflasche herangezogen, dann aber in eine Well-Platte transferiert. Diese verfügt über Körbe, deren Boden eine poröse Membran darstellt. Für die ersten Tage (in der Regel dauert dies zwei bis vier Tage) appliziert man in die basal gelegenen Wells als auch auf die apikale Seite der Zellen ein Medium. Nach Bildung einer konfluenten Zellschicht nimmt man das Medium auf der apikalen Seite ab. (vgl. Stemcell Technologies 2021)

Von nun an sollte kein Medium mehr den Zellverband nach oben hin durchdringen und die Zellen werden ausschließlich durch Diffusion des basal gelegenen Mediums versorgt.

Nach einigen Wochen kommt es zur Differenzierung der Zellen und ein pseudostratifiziertes Epithel entsteht. (vgl. ebd.)

1.2.1 ALI Kultur des respiratorischen Epithels

Keine Zellkultur entspricht exakt dem menschlichen Organismus - sie kann lediglich als Annäherung daran betrachtet werden. Dennoch konnte in zahlreichen Studien bewiesen werden, dass mittels ALI-Kultur sowohl morphologisch (vgl. Ehrhardt et al. 2008 : 235ff.) als auch genetisch (vgl. Pezzulo et al. : 2011) die in vivo Bedingungen gut nachgestellt werden können.

Pezzulo et al. (vgl. 2011) verglichen dafür die Transkriptionsprofile von tracheal sowie bronchialen humanen respiratorischem Epithel in vivo mit dem von auf ALI kultiviertem primärem respiratorischen Epithel. Sie kamen zu dem Schluss, dass das ALI-Modell durchaus vergleichbare Ergebnisse lieferte.

Im Bezug auf Forschungen am Rhinovirus ist die ALI-Kultur von humanen Primärzellen dem Mausmodell teilweise überlegen, da 90% der Rhinovirus Serotypen nur an humanes ICAM-1 binden können (vgl. Bartlett et al. 2008).

Für die Hanshiyi-Versuchsreihe wurde eine BEAS-2B Zelllinie verwendet, die von normalen humanen Bronchialepithel abstammt und mittels B-myc/pS2neo Plasmid transfiziert wurde (vgl. ATCC 2023).

1.3 COVID-19 - ein kurzer Überblick

Das Virus SARS-CoV-2 ist der Erreger der Krankheit COVID-19. Im Laufe seiner Verbreitung entstanden verschiedene genetische Mutationen, die in entsprechende

Subtypen eingeteilt wurden. Fünf Varianten wurden von der WHO als “variants of concern” definiert: Alpha, Beta, Gamma, Delta und Omicron. Weltweit vorherrschend davon ist Omicron (vgl. The National Health Commission of People's Republic of China 2023).

Stand 23. September 2023 von der WHO (Coronavirus Dashboard) verlautbarte Zahlen sind 770.778.396 Fälle von COVID-19 weltweit registriert worden und 6.958.499 Menschen daran verstorben.

Als Infektionsquelle kommen sowohl an COVID-19 erkrankte als auch asymptomatische Personen in Frage. Infektiosität besteht während der 2 - 4 tägigen Inkubationszeit und erreicht ihr Maximum drei Tage nach Ausbruch der Krankheit. Transmissionswege stellen Tröpfcheninfektion, direkte Kontaktübertragung, selten auch Aerosole in unmittelbarer Umgebung sowie kontaminierte Gegenstände dar (vgl. The National Health Commission of People's Republic of China 2023).

Die klinische Manifestation erstreckt sich von Halsschmerzen bis hin zu Husten und Fieber. Es sind aber auch Muskelschmerzen, Anosmie beziehungsweise Dysgeusie, Schnupfen sowie atypische Symptome wie etwa Durchfall und Konjunktivitis möglich. Bei Krankheitsprogression kann eine Pneumonie mit Dyspnoe und/oder Hypoxie entstehen. Im weiteren Verlauf kann es zu einem ARDS, septischem Schock bis hin zum Multiorganversagen kommen. In wenigen Fällen findet sich eine ZNS-Beteiligung (vgl. ebd.).

Im Blutbild zeigt sich unspezifisch am ehesten im Sinne einer Infektion verändert. Zum Nachweis von SARS-CoV-2 können sowohl PCR, Antigen-Tests als auch Zellkultur-Isolationen zum Einsatz kommen. Serologisch lässt sich zu Beginn ein IgM- als auch IgG-Anstieg beobachten, übersteigt letztere den vierfachen Wert der Akutphase kann dies für eine Diagnose herangezogen werden (vgl. ebd.).

Das Lungenröntgen ist im Sinne einer interstitiellen Pneumonie verändert. Fortschreitend zeigen sich dichte Infiltrate und zunehmende Konsolidierung. Ein Pleuraerguss ist allerdings selten zu finden (vgl. ebd.).

Erhöhtes Risiko weisen laut The National Health Commission of People's Republic of China (vgl. 2023) folgende Personen auf:

- > 65 Jahre
- erhebliche Komorbiditäten
- Immundefizienz
- Adipositas
- Spätschwangerschaft und perinatale Phase
- Kettenraucher

Die Therapie richtet sich entsprechend der Schwere der Krankheit. Generell sollte best möglich symptomatisch therapiert werden und ein entsprechendes Monitoring erfolgen. Auch routinemäßige Laborkontrollen werden empfohlen. Es wird davon abgeraten vorschnell Breitbandantibiotika einzusetzen. Neben der symptomatischen Therapie stehen auch antivirale Medikamente per os so wie in intravenös zur Verfügung. Um eine überschießenden Immunantwort vorzubeugen, können kurzfristig auch Glukokortikoide sowie Interleukin-6-Inhibitoren zum Einsatz kommen. Auch therapeutische Dosen an Antikoagulantien können - sofern keine Kontraindikationen bestehen - zur Anwendung kommen. Bei schwer Erkrankten hat sich eine Bauchlagerung von mehr als zwölf Stunden täglich bewährt. In diesen Fällen soll eine best mögliche supportive Therapie durchgeführt werden, um Komplikationen vorzubeugen. Allenfalls ist eine psychologische Unterstützung bei Bedarf empfohlen (vgl. The National Health Commission of People's Republic of China 2023).

1.4 Traditionelle Chinesische Medizin (TCM)

1.4.1. Klinische Bedeutung in Bezug auf COVID-19

Traditionell Chinesische Medizin wird in China seit Jahrhunderten praktiziert (vgl. Hays 2005 : 113-117). So verwundert es kaum, dass diese auch zur Therapie von COVID-19 eingesetzt wird. Auch in der zehnten Version des “Diagnosis and treatment protocol for COVID-19 patients” findet sich ein Abschnitt, der detailliert den Einsatz des Qingfei Paidu Dekokts beschreibt (vgl. The National Health Commission of People's Republic of China 2023).

Das Vorgehen kann als evidence based medicine angesehen werden, da es durch die Kombination westlicher Medizin mit TCM nachweislich zur Symptombesserung (vgl. An

2021), Prävention der Krankheitsprogression (vgl. Zhang 2021) sowie Reduktion der Mortalität (vgl. Sun 2021) kam. Der Einsatz von rund 60 verschiedenen Rezepten (vgl. Chang-Liang 2022) zeigt die Breite des verwendeten Spektrums und führt die Diversität der Komponenten und ihrer Angriffspunkte vor Augen.

1.4.2. Hanshiyi Formula

Der Einsatz der Hanshiyi Formel wurde in einer retrospektiven Kohortenstudie analysiert. Dabei wurden 721 milde bis moderate Fälle von COVID-19 betrachtet, von denen 430 HSYF erhielten und 291 als Kontrollgruppe dienten. Als primärer Endpunkt wurde das Erreichen eines schweren Verlaufs angenommen. Nach der Durchführung eines Propensity Score Matchings unterschied sich die HYSF-Gruppe signifikant von der Kontrollgruppe um -4.7 % [95 % CI: (-8.2 %, -1.2 %)]. (vgl. Tian et al. 2020: 105ff.)

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten zwanzig Komponenten der Hanshiyi Formula gelistet - entnommen aus Tiefenbacher et al. 2021 “Development of HPTLC and UPLC methods for quality control of Hanshiyi formula”:

Tabelle 1: Inhaltsstoffe Hanshiyi Formula (Tiefenbacher et al. 2021)

Arecae semen	Jiao Binglang
Armeniacae amarum semen	Kuxingren
Atractylodis macrocephalae rhizoma	Sheng Baizhu
Atractylodis rhizoma	Cangzhu
Crataegi fructus	Jiao Shanzha
Cynanchi paniculati rhizoma	Xuchangqing
Lepidii semen	Tinglizi
Dryopteridis crassirhizomatis rhizoma	Guanzhong
Ephedrae herba	Sheng Mahuang
Eupatorii herba	Peilan
Gypsum fibrosum	Shigao
Hordei germinatus fructus	Jiao Maiya
Magnoliae cortex	Houpo
Massa medicata fermentata	Shenqu

Tabelle 1: Inhaltsstoffe Hanshiyi Formula (Tiefenbacher et al. 2021)

Notopterygii radix et rhizoma	Qianghuo
Pheretima	Dilong
Pogostemonis herba	Huoxiang
Poria	Fuling
Tsaoko fructus	Wei Caoguo
Ziingiberis rhizoma recens	Sheng Jiang

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es den Effekt zweier Hanshiyi Dekokte in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Synthese der Muzinproteine MUC5AC und MUC5B in physiologischen humanen epithelialen Zellen zu testen und sowohl qualitativ als auch quantitativ zu analysieren.

Die verwendete BEAS-2B Zelllinie wurde in einer ALI-Kultur gezogen und nach Bildung eines konfluenten Zellrasens mit den jeweiligen Mengen der Hanshiyi Dekokte für drei Tage inkubiert.

Für die Auswertung wurden die Proben sowohl histologisch (H.E. Färbung sowie Immunhistochemie: anti-MUC5AC sowie anti-MUC5B) als auch molekularbiologisch (cDNA-Synthese, qPCR) aufgearbeitet.

2 Materialien

Tabelle 2: Verwendete Materialien der Zellkultur

BEAS-2B Zelllinie	ATTC CRL-9609
DMEM/F-12	Gibco by Life Technologies
FCS	HyClone
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco by Life Technologies
L-Glutamine 200 mM Glutamin	Gibco by Life Technologies
Accutase	Avantor d. b. VWR Biowest #L0950-100
PneumaCult™-Ex Plus Medium #05040 Pneuma Cult™-Ex Plus Basalmedium PneumaCult™-Ex Plus 50X Supplement	STEMCELL Technologies
T75 flasks	Bartelt Thermo SCIENTIFIC (NUNV) #156499
12 mm Transwell® with 0.4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile #3401	Corning
Nature: 0,016 g/ml des Trockenextrakts in Wasser HSYF-Decoctium 100mg plants/ml water 17.11.22 ST	Mag. ^a Stefanie Tiefenbacher Naturwissenschaftliche Fakultät der Karl-Franzens-Universität Graz Institut für pharmazeutische Wissenschaften Universitätsplatz 1/I 8010 Graz
Freeze Dried: 0,05g/ml des Trockenextrakts in DMSO HYSF-frozen & freeze-dried decoctium 50mg/ml DMSO 17.11.22 ST	Mag. ^a Stefanie Tiefenbacher Naturwissenschaftliche Fakultät der Karl-Franzens-Universität Graz Institut für pharmazeutische Wissenschaften Universitätsplatz 1/I 8010 Graz

Tabelle 3: Verwendete Geräte in der Zellkultur

Brutschrank	Binder
Laborabzug (AC4.150.729.2.AZ01.1)	WALDNER
Eppendorf Research® plus - mechanische Pipette	Eppendorf
Cell Counter Casy	Schärfe System GmbH

Tabelle 4: Verwendete Materialien für die histologische Aufarbeitung

10% neutral buffered formalin #Q01022	DIAPATH
Reagenzien für Einbettautomaten	
Histolab-Clear	Sanova
96% Ethanol	AUSTRALC
60% Ethanol	Verdünnung mit WDC aus der Leitung
Paraffin 56°C #ATS200856	Sanova
Einbettkassetten	SANOVA
Ausgießformen	TURB FLOW
Paraffin 56°C #ATS-200856	SANOVA
Microtome Blades A35 Type #207500011	FEATHER®
SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger #J1800AMNZ	Epredia™
Tween 20 #8.22184.0500	Merck
Hilfmaterial	
Schraubenzieher	
Pinsel	
Präpariernadel	
Filterpapier	
Objektträgerständer aus Metall	
H.E. Färbereihe	
HistoLab Clear #14250	Sanova
99,9% Ethanol (100%) #SDB-001	AUSTRALC in entsprechender Verdünnung mit WDC aus der Leitung
96% Ethanol	
70% Ethanol	
50% Ethanol	
Ammoniumwasser 25% (2,5ml Ammoniak / 11 A. dest.) saures Hämalaun nach Mayer (lt. Romeis) siehe Anhang	Merck #105422
Eosin gelblich 1% (1gin 100ml A. dest.)	Merck #1041340025
Eindeckeln	
cover slips 20x20mm Approx. 200 +1	epredia
Tissue TEK	Satura
Filterpapier	Avantor d. b. VWR

Tabelle 4: Verwendete Materialien für die histologische Aufarbeitung

IHC: Kit & Reagenzien		
Ultra Vision Hydrogen Peroxide Block #TA-125-H2020		Thermo SCIENTIFIC
Ultra Vision LP Detection system HRP Polymer #TL-125-HL		Thermo SCIENTIFIC
Dako Antibody diluent with background-reducing components #S302283-2		Agilent
Large Volume AEC Chromogen Single Solution #TA-125-SA		Thermo SCIENTIFIC
Kaisers Glyceringelatine #9242		Merck
PAP Pen #AB2601		abcam
1x TBS / 0,05% Tween (TBS/T) Puffer		10x TBS (1 L) und 1x TBS-T (1 L) aus 10x TBS Citratpuffer AGR
Citratpuffer pH 6		
Antikörper Anti-MUC5B #ab77995		abcam
Antikörper Anti-MUC5AC #MA5-12178		Thermo SCIENTIFIC

Tabelle 5: Verwendete Geräte für die histologische Aufarbeitung

Eppendorf Research® plus - mechanische Pipette	Eppendorf
Kühlschrank 3°C	Liebherr
Excelsior™ AS Gewebereinbettautomat	Epredia™
TES Valida Modulares Paraffin-Einbettssystem	Medite SANOVA
Brutschrank 60°C	memmert
Paraffin Trimmer KP28080	KLINIPATH
Rotationsmikrotom HM355S	Thermo SCIENTIFIC
Heizplatte OT 40	MEDITE
Kühlplatte Para Cooler O	RWW Medizintechnik
Mikroskop Rotationsmikrotom 2	Histocom
H.E. Färbereihe/-becken #10-10	Bio Optica
Mikrowelle	MIELE
Combi-Spin FCL-2400N	bioSan
Eppendorf Research® - mechanische Pipette	Eppendorf
Laborabzug (AC4 150 930 3.AZ01.1)	WALDNER
Slide Scanner VS200	Olympus
Färbekammer StainTray™ Deckel schwarz, Passend für: 20 Objektträger	Carl Roth

Tabelle 6: Verwendete Materialien für die molekularbiologische Aufarbeitung

peqGOLD Total RNA Kit (Safety-Line) #12-6834-02 PerfectBind-RNA-Säulen Sammel-Tubes DNA Removing Säulen RNA Lysis Buffer T RNA Wash Buffer I RNA Wash Buffer II RNase-freies Wasser	VWR
Ethanol absolut 99,9% #SDB-001	AUSTRALCO
PBS pH 7.4 (1x) #100010-015	gibco
Eppendorf Tubes® Reaktionsgefäße 3810X, 1.5ml #0030 125.150	Eppendorf
Einwegskalpell	Avantor d. b. VWR #233-5525
qPCR RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1622	Thermo SCIENTIFIC
cDNA Synthese Primer MUC 5AC (R&F) MUC 5B (R&F) beta-actin R (#2656203) beta-actin F (#2656202) Water #W4502-1L iTaq Universal SYBR Green Supermix PCR Collection Tubes 0,2ml 8er strips	Thermo SCIENTIFIC Thermo Fisher SCIENTIFIC #MA5-12178 Invitrogen #PA5-82342 Microsynth Microsynth Sigma Aldrich Bio-Rad Biozym #710970

Tabelle 7: verwendete Geräte für die molekularbiologische Aufarbeitung

Eppendorf Research® plus - mechanische Pipette	Eppendorf
Thermo Scientific™ Pico™ 17 Mikrozentrifuge	Thermo SCIENTIFIC
NanoDrop One	thermoscientific
autoclavierbare Pipette 0,2-2µl	CAPP
Gesichtstücher #115-0600	VWR
CryoCube™ F570hw	Eppendorf
CF96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler	BIO-RAD
Combi-Spin FVL-2400N	LABConsulting.at

3 Methoden

3.1 Kultur des respiratorischen Epithels

Vorab ist anzumerken, dass die Zellkultur unter sterilen Kautelen erfolgte. Gearbeitet wurde unter einem Abzug unter Tragen von Einweghandschuhe, Desinfektion des Arbeitsbereiches mit Ethanol sowie Vermeidung von Luftzug beim Öffnen des Inkubators. Im Brutschrank (Fa. Binder) herrschte eine konstante Temperatur von 37°C, 5,0% CO₂ sowie hohe Luftfeuchtigkeit.

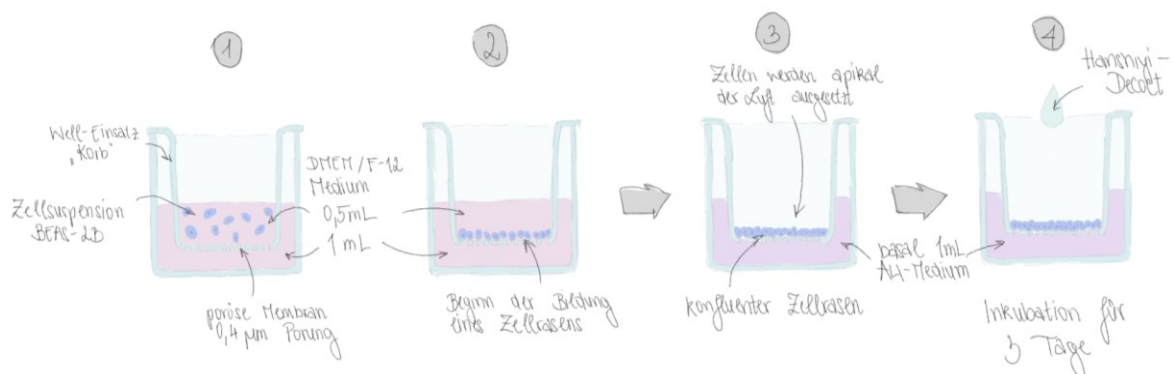
3.1.1 BEAS-2B Zellkultur

Die BEAS-2B p4 Zelllinie wurde aufgetaut und in 12ml DMEM/F-12 Medium unter Zusatz von 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin kultiviert. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Nachdem die Zellen am Tag darauf bereits einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten, erfolgte das Splitten der Zellen. Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 10ml PBS unter Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) gewaschen und anschließend mit 2ml Accutase für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert.

3.1.2 ALI-Kultur

Es wurden zwei 12-Well-Platten mit den entsprechenden Einsätzen der Fa. Corning verwendet. Dabei betrug die Porung der Polycarbonatmembran 0,4 µm und der Durchmesser belief sich auf 12mm.

Abbildung 2: Schema der ALI-Kultur inkl. Beimpfen mit Hanshiyi Dekokt



Nachdem Ernten wurden 400.000 Zellen - via cell counter gezählt - in 0,5ml Medium transferiert. In den basalen Bereich der Wells wurde 1ml Medium pipettiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

Nach dreitägiger Kultur wurde auf das ALI-Medium (PneumaCult-Ex Plus Medium) umgestellt, bestehend aus 19,6ml Pneuma Cult-Ex Plus Basalmedium sowie 0,4ml PneumaCult™-Ex Plus 50X Supplement. Ab diesem Zeitpunkt wurde nur mehr Medium in den basalen Teil der Wells appliziert. Die Membranoberseite wurden der Luft ausgesetzt. Von nun an erfolgte ein Austausch des basalen Mediums alle zwei Tage.

3.1.3 Beimpfen und Ernte der Zellen mit Hanshiyi Dekokten

Am Tag 16 der Kultur in den Wells - 11 Tage nachdem die Zellen einer Luftzufuhr ausgesetzt wurden - erfolgte ein letzter Mediumwechsel (basal 1ml) und anschließendes Beimpfen mit unterschiedlichen Mengen der beiden Hanshiyi-Dekokte.

Dafür wurden sowohl das „Nature“- als auch das „frozen-and-freeze-dried“ Dekokt (gelagert bei -20°C im Tiefkühlschrank) bei Raumtemperatur aufgetaut.

Vor jedem Pipettieren wurde das verwendete Dekokt geschwenkt und auch die jeweilige Pipettenspitze gewechselt. Drei Wells wurden als Kontrollgruppe ohne Dekokt belassen.

Abbildung 3a: Schema „Nature“

Dekokt

0,016 g/ml des Trockenextrakts in

Wasser



C ... Kontrollgruppe

µl ... hinzugefügtes Volumen von Dekokt

mg/ml ... errechnete Konzentration

Abbildung 3b: Schema „frozen- & freeze-dried“ Dekokt

0,05g/ml des Trockenextrakts in DMSO



µl ... hinzugefügtes Volumen von Dekokt

mg/ml ... errechnete Konzentration

In der Abbildung auf der vorherigen Seite sind die hinzugefügten Volumina bzw. Konzentrationen der unterschiedlichen Dekokte zu entnehmen.

3.1.4 Ernte der beimpften Zellkultur

Nach dreitägiger Inkubation entsprechend dem bereits beschriebenen Schemata wurden die Zellen geerntet. Es fand sich eine zumindest teilweise sichtbare Kontamination (trüblich verfärbtes Medium, teils Schlieren oder punktförmige Formationen). In fünf der 24 Proben war mit freiem Auge ein Ablösen des Zellrasens von der Membran zu erkennen. Auch ein Umschlag des Nährmediums ins diverse Gelb- als auch Rosétöne war ersichtlich. Dies hatte zur Folge, dass keine der „frozen- & freeze-dried“ 50µl bzw. 2,38mg/ml Proben für weitere Untersuchungen zur Verfügung standen.

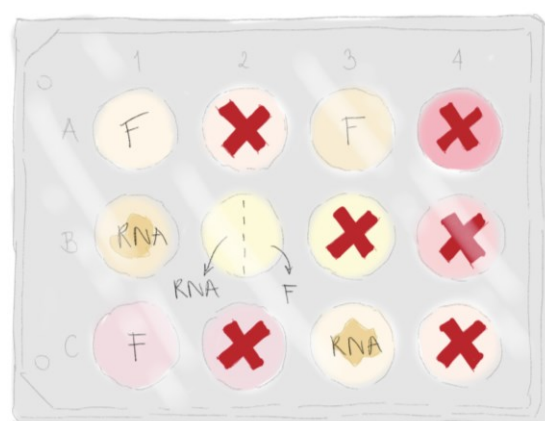
Wie im Schemata ersichtlich, wurden abgeschwommene Proben für eine RNA-Lyse verwendet. Die einzig übrig gebliebenen Proben „Natur“ 100µl bzw. 1,45mg/ml sowie die Probe „frozen- & freeze-dried“ 5µl bzw. 0,25mg/ml mussten mittels Skalpell halbiert, und die jeweilige Hälfte separat aufgearbeitet werden.

**Abbildung 4a: Schema „Nature“
Dekokt nach drei Tagen Inkubation**



F ... Formol fixiert
RNA ... für RNA Lyse verwendet
x ... kontaminiert
--- ... halbiert

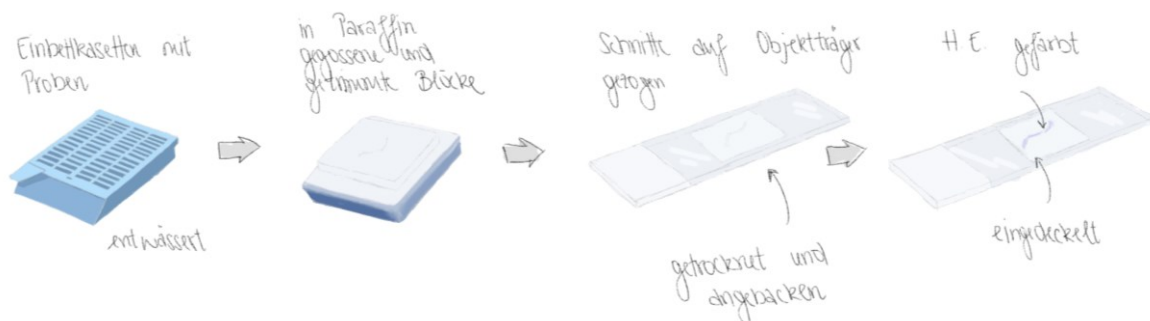
**Abbildung 4b: Schema „frozen- &
freeze-dried“ Dekokt nach drei Tagen
Inkubation**



F ... Formol fixiert
RNA ... für RNA Lyse verwendet
x ... kontaminiert
--- ... halbiert (separat aufgearbeitet)

3.2 Histologische Aufarbeitung

Abbildung 5: Schema histologische Aufarbeitung



3.2.1 Fixieren

Für die Probe 6 „Natur“ 100µl bzw. 1,45mg/ml sowie die Probe 7 „frozen- & freeze-dried“ 5µl bzw. 0,25mg/ml wurden die Membranen nach Spülen mit PBS 7,4 mittels eines Einmalskalpells halbiert und in Eppendorf Tubes 1,5ml transferiert.

Eine Hälfte der Membranen wurde in 1 ml 10% Formol fixiert (Probe 6F und 7F), die anderen Hälften wurde mit zweimal jeweils 100µl - in Summe also ebenfalls 200µl - des RNA Lysis buffers T überschüttet (weiteres Vorgehen siehe „molekularbiologische Aufarbeitung“).

Die für die Formolfixierung verbliebenen ganzen Membranen wurden nach Abpipettieren des Nährmediums mit PBS 7,4 gespült und anschließend in 1,5ml Formol direkt im Well fixiert. Nach einer halben Stunde wurden alle Proben - teilweise halbiert - in entsprechend große Einbettkassetten platziert (siehe nachfolgende Tabelle) und in PBS-Lösung 1x gelegt.

Anschließend wurden die Proben bei 3°C im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 8: Histologische Proben

Anzahl Kassetten	Dekokt	Menge (µl) / Konzentration (mg/ml)	Anmerkungen	Beschriftung
1	Nature	100 / 1,44	halbe Membran	(6) N 100 = 6F
1	frozen- & freeze-Dried	5 / 0,24	halbe Membran	(7) FD 5 = 7F
1	Kontrolle		ganze Membran	C1

Tabelle 8: Histologische Proben

1	Kontrolle		zwei Hälfte in eine Kasette	C2
2	Nature	5 / 0,08	je eine Hälfte pro Kasette	N 5/1
2	Nature	5 / 0,08	je eine Hälfte pro Kasette	N 5/2
2	Nature	50 / 0,75	je eine Hälfte pro Kasette	N 50
2	frozen- & freeze-Dried	1 / 0,04	je eine Hälfte pro Kasette	FD 1/1
2	frozen- & freeze-Dried	1 / 0,04	je eine Hälfte pro Kasette	FD 1/2
2	frozen- & freeze-Dried	10 / 0,4	je eine Hälfte pro Kasette	FD 10

* Zellrasen wirkte teilweise von der Membran abgelöst

3.2.2 Entwässern

Zum Entwässern der Proben wurde der Gewebeeinbettautomat Excelsior AS der Firma Epremedia verwendet.

Dabei wurden die für 2 Tage bei 3°C in PBS 1x gelagerten Proben vorsichtig gemeinsam mit weiteren Kassetten in den metallenen „Random-Korb“ geschichtet und der dazugehörige Metalldeckel daraufgelegt. Anzumerken ist hierbei, dass in der PBS 1x Lösung zum Teil Membranstücke geschwommen sind.

Die Funktionen „verzögerter Start“ sowie das „Routine-Nachtprogramm“ wurden gewählt. Somit startete das Gerät erst um 20:00h mitteleuropäischer Zeit und lief bis zum Folgetag 09:00h.

Nach Abschluss des Programmes wurde der Korb herausgehoben und die Kassetten unverzüglich in ein 60°C warmes Paraffinbad (TES Valida Modulares Paraffin-Einbettssystem - MEDITE Sanova) gelegt.

3.2.3 Paraffin Einbettung

Hierfür wurde das Modulare Paraffin-Einbettssystem TES Valida verwendet.

Nach der Wahl einer passenden erwärmten Ausgießform, wurde diese mit flüssigem Paraffin gefüllt, die Membran(hälfte) darin vertikal ausgerichtet und am Kühlfeld kurz gehärtet. In das noch weiche, aber nicht mehr flüssige Wachs wurde der jeweilige

Kassettenunterteil gedrückt, mit flüssigem Paraffin aufgefüllt und anschließend auf die Kühlplatte gelegt. Dort verblieben alle gegossenen Proben für mindestens eine Dreiviertelstunde.

Beim Ausgießen der Probe N 5/2 blieb die Membran beim Aushärten an der Pinzette haften. Erst nach erneutem Erwärmen im Brutschrank konnte sie entsprechend ausgerichtet werden. Die Probe wurde mit „+“ markiert.

Nachdem alle Proben ausgehärtet waren, wurden sie aus der Form gelöst und überstehende Paraffinreste mithilfe eines Trimmers (Paraffin Trimmer KP28080) entfernt.

Tabelle 9: Anmerkungen zum Gießvorgang

(6) N 100	eingeringelt
FD 10	event. Membran / Zellen separiert
FD 1/1	Zellklumpen vorhanden
N 5/2	Zellrasen oben aufschwimmend
FD 1/2	zusätzliche „Membran“ sichtbar
C2	beide Hälfte inkl. Zellansammlung in eine Form gegossen
C1	ganze Membran mit sichtbarem Zellbelag als einzige in eine tiefe Form gegossen
N 5/2 „+“	musste erwärmt und erneut ausgerichtet werden, da Pinzette beim Erkalten an Membran haftete entsprechend mit „+“ markiert

3.2.4 Schneiden

Das Schneiden der Proben erfolgte in drei Etappen. Dafür wurden jedoch immer dieselben Geräte verwendet:

- Rotationsmikrotom HM 355S (Fa. Thermo SCIENTIFIC)
- Heizplatte OT 40 (Fa. MEDITE)
- Kühlplatte Para Cool O (Fa. RWW Medizintechnik)

Zuallererst wurden die zu schneidenden Blöcke für zumindest eine halbe Stunde auf die Kühlplatte (-8°C) gelegt. Das Wasserbad wurde auf 38°C (Pumprad auf Stufe 4) vorgewärmt und der Cool Cut eingeschaltet.

Für den Schneidevorgang wurden die Mikrotomklingen A35 der Fa. FEATHER sowie die eprexia Superfrost Plus Adhesion Objektträger verwendet.

Nach der korrekten Inbetriebnahme des Rotationsmikrotoms wird zuerst das Schneidfenster des Blockes eingestellt. Unter zur Hilfenahme des Schneidmodus „Dauer“ ein neu angeschnittener Block mit einer Stärke von 15µm bis zur gewünschten Tiefe getrimmt. Das Trimmen wurde beendet sobald eine Membran mit freiem Auge beziehungsweise Schlieren im Schnitt sichtbar waren.

Danach wurde im Menü auf „Cut“ mit einer Stärke von 5µm gewechselt und vorsichtig die ersten Schnitte angefertigt. Dabei wurde darauf geachtet, die Klinge vor Beginn des Schneidens zu wechseln und benetzt zu halten - wenn nötig durch Verwendung eines mit Tween 20 benetzten Feinhaarpinsels.

Das Schneiden wurde entsprechend des Wasserflusses (Pumprad Stufe 4), der Temperatur des Wasserbades (schwankt zw. 36°C bis 40°C), des Wechsels der Klingen sowie der Schneidegeschwindigkeit adaptiert, um ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen.

Zufriedenstellende Schnitte wurden ins Becken gezogen, dort entfalteteten sie sich und wurden möglichst frei von Luftblasen auf einen Objektträger gezogen.

Das überschüssige Wasser wurde mit einem Einmaltuch abgenommen, die Objektträger an die Heizplatte gelehnt und nach einigen Minuten weiteres Wasser mit einem Filterpapier abgenommen. Daraufhin wurden die Objektträger in einen auf der Heizplatte bei 40°C befindlichen Ständer sortiert und danach ebendort aufgelegt. Dort verblieben sie für einige Stunden.

Es wurden jeweils 10 Schnitte eines Blockes angefertigt und nach Reihenfolge nummeriert.

Beim Block (6) N 100 war mit freiem Auge ein Ablösen des Paraffins von der Membran zu erkennen. Daher wurden zuerst fünf vertikalorientierte, danach fünf horizontalorientierte Schnitte angefertigt. Die querorientierten Schnitte wurde mit „q“ markiert und zeigten mit freiem Auge zwei Schichten.

Zur genaueren Beurteilung der Schnitttiefe wurden die Schnitte teilweise vor Ort mikroskopiert und das Schneiden gegebenenfalls adaptiert.

Tabelle 10: Schneidevorgänge

Schneideetappe	Block	Stückzahl	Anmerkung
1	N 5/1	13	P 01-03 ... Probeschnitte S 01-10 ... verwertbare „schöne“ Schnitte
2	N 50	10	längs- und querangeschnitten offensichtlich verklumpt
	(6) N 100	10	
	C2	10	
3	FD 10	10	sichtbarer „Zellhaufen“
	(7) FD 5	10	keine Zellen (tief genug geschnitten)
	FD 1/1	10	
	C1	10	
	FD 1/2 „II“*	10	sichtbarer Zellrasen
	FD 10 „II“*	10	Membran wirkt eingeringelt

* Die Blöcke wurden nachträglich mit „II“ beschriftet.

3.2.5 Anbacken

Das Anbacken aller H.E. gefärbten Schnitte erfolgte nach Erreichen einer Temperatur der Heizplatte OT 40 (MEDITE) von 60°C für eine halbe Stunde.

Die mittels IHC gefärbten Schnitte wurde vor dem Färbevorgang für 20min in den Brutschrank (Memmet) bei einer Temperatur von 60°C gelegt.

3.2.6 H.E. Färbung

Das H.E. Färben erfolgte in zwei Etappen:

Tabelle 11: Färbevorgänge

Färbeetappe	Block	Stückzahl
1	N 5/1	1 (Nr. 10/10)
	N 50	1 (Nr. 10/10)
	(6) N 100	1 (Nr. 10/10)
	C2	1 (Nr. 10/10)

Tabelle 11: Färbevorgänge

2	C1	1 (Nr. 10/10)
	FD 1/1	1 (Nr. 10/10)
	FD 1/2 II	1 (Nr. 10/10)
	FD 10	1 (Nr. 10/10)
	FD 10 II	1 (Nr. 10/10)
	(7) FD 5	1 (Nr. 10/10)

* Die Blöcke wurden nachträglich mit „II“ beschriftet.

Dabei wurde jeweils entsprechend den nachfolgenden Tabellen gearbeitet:

Tabelle 12: Entparaffinieren & Entwässern

Chemikalie	Zeitangabe	Anmerkung
HistoLab Clear 1a	5min	
HistoLab Clear 1b	5min	
HistoLab Clear 2a	5min	
HistoLab Clear 2b	5min	
HistoLab Clear / 100% Ethanol 1:1	1min	Schwenken und Abrinnen lassen
100% Ethanol	1min	Schwenken und Abrinnen lassen
96% Ethanol	1min	Schwenken und Abrinnen lassen
70% Ethanol	1min	Schwenken und Abrinnen lassen
50% Ethanol	1min	Schwenken und Abrinnen lassen
A. dest.		dreimal waschen und wechseln

Tabelle 13: H.E. Färbevorgang

Chemikalie	Zeitangabe	Anmerkung
Saures Hämalaun nach Mayer (selbst hergestellt lt. Romeos)	10min	
A. dest.		dreimal waschen und wechseln (sollte klar sein)
Ammoniumwasser 2,5ml Ammoniak / 1l A. dest.	30 Sekunden bzw. bis Kerne bläulich	
A. dest.		dreimal waschen und wechseln
Eosin gelblich 1%	30 Sekunden	
96% Ethanol 1	differenzieren	
96% Ethanol 2	differenzieren	
100% Ethanol	kurz	

Tabelle 13: H.E. Färbevorgang

HistoLab Clear / 100% Ethanol	kurz
1:1	
HistoLab Clear 2b	mind. 10min

Die HistoLab Clear Behälter wurden nach 50 Schnitten gewechselt: 2a und 2b kamen an die Stelle 1a und 1b, der Inhalt der ursprünglichen 1a und 1b Behälter wurde gegen neue HistoLab Clear Flüssigkeit getauscht.

Nach 100 Schnitten wurden die gesamte Ethanol-Reihe gewechselt.

Bei Verfärbungen beziehungsweise Schichtenbildung wurden die Chemikalien bereits früher getauscht.

Für das Eindeckeln wurde die Objektträgerunterseite getrocknet, die Oberseite wurde vorsichtig mittels Filterpapierstreifen abgezogen. Anschließend wurde ein Tropfen Tissue TEK auf die einzudeckende Region des Objektträgers getropft und möglichst blasenfrei eingedeckt.

Für das Aushärten verblieben die Objektträger unter dem Abzug.

3.2.7 Immunhistochemie (IHC)

Um zu bestimmen, ob und welche Blöcke für eine weitere immunhistochemische Färbung geeignet waren, wurden die H.E. gefärbten Objektträger mikroskopiert.

Auch entschied sich dabei, welche Schnitte gescannt und so digitalisiert werden sollten, wie in der nachfolgenden Tabelle dargelegt:

Tabelle 14: IHC Planung

Block	Vorgehen
N 5/1	IHC + Scan
N 50	IHC + Scan
(6) N 100	IHC + Scan
C2	Scan
C1	IHC + Scan
FD 1/1	Scan
FD 1/2 II	IHC + Scan
FD 10	Scan
FD 10 II	IHC + Scan
(7) FD 5	nicht verwertbar, da weder Membran noch Zellen mikroskopierbar

3.2.7.1 Anti-MUC5B monoklonale Antikörper

Für die Immunhistochemie Anti-MUC5B wurde ein Antikörper der Fa. abcam (#ab77995) in der Verdünnung 1:200 genutzt. Als Positivkontrolle diente ein humanes Trachea Schnittpräparat („Trachea N27 5“). Es wurden sechs Proben - jeweils 09/10 Schnitte - gefärbt.

Die zuvor bei 60°C für 20min angebackenen Paraffinschnitte wurden zuerst entparaffiniert (Details siehe Tabelle: Entparaffinieren und Entwässern).

Danach erfolgte ein Antigen Retrieval. Dafür wurde eine Citratpuffer-Lösung pH 6,0 in einer Küvette für drei Minuten bei 900 Watt erhitzt (Mikrowelle der Fa. Miele). In diese wurden die Proben gestellt und für 40min bei 150 Watt gekocht. Die Küvette wurde mit Aqua dest. aufgefüllt und konnte anschließend 20min lang auskühlen.

Um die Schnitte vor dem Austrocknen zu schützen, wurde eine Färbekammer (Fa. Carl Roth) mit Aqua dest. befüllt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die weiteren Schritte sowie die dafür benötigten Inkubationszeiten ersichtlich:

Tabelle 15: IHC Protokoll Anti-MUC5B

Vorgang	Inkubationszeit in feuchter Kammer
Waschen in TBS/T Lösung	
Trocknen der Objektträger mit Einwegpapiertüchern	
Pap-Pen aufschütteln und damit den zu untersuchenden Bereich eingrenzen	
Objektträger in TBS/T Lösung spülen und in feuchte Kammer legen	
Hydrogen Peroxid Block bedeckend auftropfen, tlw. mit Pipettenspitze verteilt (wenn notwendig)	12
Abkippen des Hydrogen Peroxid Blocks	
4x Waschen in TBS/T Lösung	
Ultravision Protein Block bedeckend auftropfen	7min
Abkippen und Objektträger nun nicht mehr waschen	
Antikörper verdünnt in AB-Diluent (1:200) bedeckend pipettieren*	über Nacht (4°C)

Tabelle 15: IHC Protokoll Anti-MUC5B

4x Waschen in TBS/T Lösung	
Primary Antibody Enhancer bedeckend auftropfen (Da es sich um einen Maus Primärantikörper handelt)	10min
4x Waschen in TBS/T Lösung	
HRP Polymer bedeckend auftropfen	15min
4x Waschen in TBS/T Lösung	
AEC Substrat bedeckend pipettieren	10min
4x Waschen in Aqua dest.	
Gegensätzen mit Hämalaun dieser Schritt erfolgte gemeinsam mit MUC5AC, um ein vergleichbares Färbeergebnis zu erzielen	10min
4x Waschen in Aqua dest.	
Bläuen mit NH ₃ -Wasser (2,5ml Ammoniak/ 1l A. dest.)	kurz
4x Waschen in Aqua dest.	
Eindeckeln mit Kaiser's Glycerin gelatine Eindeckeln der positiv Kontrolle Trachea N27 5 schwierig	

* Nachdem Auftauen des Antikörpers wurde dieser gevortext, abgespinn und mit 4µl des Antikörpers mit 796µl des AB-Diluent vermischt. Es erfolgte erneutes Vortexen sowie Spinnen. In Summe erhielt man nun 800µl des 1:200 verdünnten Antikörpers. Dies ergab je Probe etwa 100µl sowie ca. 200µl für die größere Positivkontrolle.

Nach dem Eindeckeln der Objektträger verblieben diese für einige Stunden unter dem Abzug, um auszuhärten.

3.2.7.2. Anti-MUC5AC monoklonale Antikörper

Für die Immunhistochemie Anti-MUC5AB wurde ein Antikörper der Fa. Thermo SCIENTIFIC (#MA5-12178) in der Verdünnung 1:100 genutzt.

Als Positivkontrolle diente ein humanes Trachea Schnittpräparat („Trachea N27 6“) derselben Schnittreihe wie auch schon für Anti-MUC5B verwendet wurde.

Es wurden sechs Proben - jeweils 08/10 Schnitten - gefärbt.

Die zuvor bei 60°C für 20min (Memmet Brutschrank) angebackenen Paraffinschnitte wurden zuerst entparaffiniert (Details siehe Tabelle: Entparaffinieren und Entwässern).

Um die Schnitte vor dem Austrocknen zu schützen, wurde eine weitere Färbekammer (Fa. Carl Roth) mit Aqua dest. befüllt.

In der nachfolgenden Tabelle sind alle weiteren Schnitte sowie die dafür benötigten Inkubationszeiten ersichtlich:

Tabelle 16: IHC Protokoll Anti-MUC5AC

Vorgang	Inkubationszeit in feuchter Kammer
Waschen in TBS/T Lösung	
Trocknen der Objektträger mit Einwegpapiertüchern	
Pap-Pen aufschütteln und damit den zu untersuchenden Bereich eingrenzen	
Objektträger in TBS/T Lösung spülen und in feuchte Kammer legen	
Hydrogen Peroxid Block bedeckend auftropfen, tlw. mit Pipettenspitze verteilt (wenn notwendig)	12
Abkippen des Hydrogen Peroxid Blocks	
4x Waschen in TBS/T Lösung	
Ultravision Protein Block bedeckend auftropfen	7min
Abkippen und Objektträger nun nicht mehr waschen	
Antikörper verdünnt in AB-Diluent (1:100) bedeckend pipettieren*	45min
4x Waschen in TBS/T Lösung	
Primary Antibody Enhancer bedeckend auftropfen (Da es sich um einen Maus Primärantikörper handelt)	10min
4x Waschen in TBS/T Lösung	
HRP Polymer bedeckend auftropfen	15min
4x Waschen in TBS/T Lösung	
AEC Substrat bedeckend pipettieren	10min
4x Waschen in Aqua dest.	
Gegensätzen mit Hämalaun dieser Schritt erfolgte gemeinsam mit MUC5AC, um ein vergleichbares Färbeergebnis zu erzielen	10min
4x Waschen in Aqua dest.	
Bläuen mit NH ₃ -Wasser (2,5ml Ammonika/ 11 A. dest.)	kurz
4x Waschen in Aqua dest.	
Eindeckeln mit Kaiser's Glyceringelatine Eindeckeln der positiv Kontrolle Trachea N27 6 schwierig	

Tabelle 16: IHC Protokoll Anti-MUC5AC

* 792µl des AB-Diluent wurden vorgelegt. Dieser Menge wurden 8µl des gevortexten sowie abgespinnnten Antikörper hinzugefügt. Das Gemisch wurde erneut gevortext und abgespinnnt. In Summe erhielt man nun ebenfalls 800µl des 1:100 verdünnten Antikörpers. Dies ergab je Probe etwa 100µl sowie ca. 200µl für die größere Positivkontrolle.

Nach dem Eindeckeln der Objektträger verblieben diese für einige Stunden unter dem Abzug um auszuhärten.

3.2.8 Bildakquisition

Die Objektträger wurden im Modus „Brightfield (BF)“ gescannt. Zunächst erfolgte ein Overview des gesamten Objektträgers in vierfacher Vergrößerung. Die gefärbten Membranen wurden daraufhin markiert (Scan area) und in zwanzigfacher Vergrößerung im Rahmen eines Detailscans aufgenommen.

3.3 Molekularbiologische Aufarbeitung

3.3.1 RNA-Gewinnung

Nach dem Verwerfen der kontaminierten Proben wurde zuerst mit der RNA-Lyse der ganzen Membranen, dann der halben Membranen begonnen.

Tabelle 17: RNA-Lyse Proben

Probenr.	Dekokt	Volumen (µl)	Konzentration (mg/ml)	Membran
1	Kontrolle (C)			ganz
2	„Nature“	5	0,08	ganz
3	„Nature“	50	0,76	ganz
4	„frozen- & freeze-Dried“	1	0,05	ganz
5	„frozen- & freeze-Dried“	10	0,5	ganz
6	„Nature“	100	1,45	halbiert
7	„frozen- & freeze-Dried“	5	0,25	halbiert

3.3.1.1 RNA-Lyse der ganzen Membranen

Nach dem Spülen der Membranen mit PBS 7,4, wurde auf jede der zu untersuchenden Proben 1-5 jeweils 100µl des RNA Lysis buffer T pipettiert und für 6:20min belassen. Das entstandene Lysat wurde danach vorsichtig abgenommen und in zuvor beschriftete Eppendorf Tubes 1,5ml gefüllt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, sodass man in Summe etwa 200µl des Lysats erhielt.

3.3.1.2 RNA-Lyse der halben Membranen

Für die Probe 6 „Natur“ 100µl bzw. 1,45mg/ml sowie die Probe 7 „frozen- & freeze-dried“ 5µl bzw. 0,25mg/ml wurde die Membranen nach Spülen mit PBS 7,4 mittels eines Einmalskalpells halbiert und in Eppendorf Tubes 1,5ml transferiert.

Eine Hälfte der Membran wurde in 1 ml 10% Formol fixiert, die andere Hälfte wurde mit zweimal jeweils 100µl - in Summe also ebenfalls 200µl - des RNA Lysis buffers T überschüttet.

Alle Proben (1-7) wurden anschließend bei -80°C (Eppendorf CryoCube F570hw) tiefgefroren. Dabei ist anzumerken, dass die Membranhälften der Proben 6 und 7 im Lysat verblieben sind.

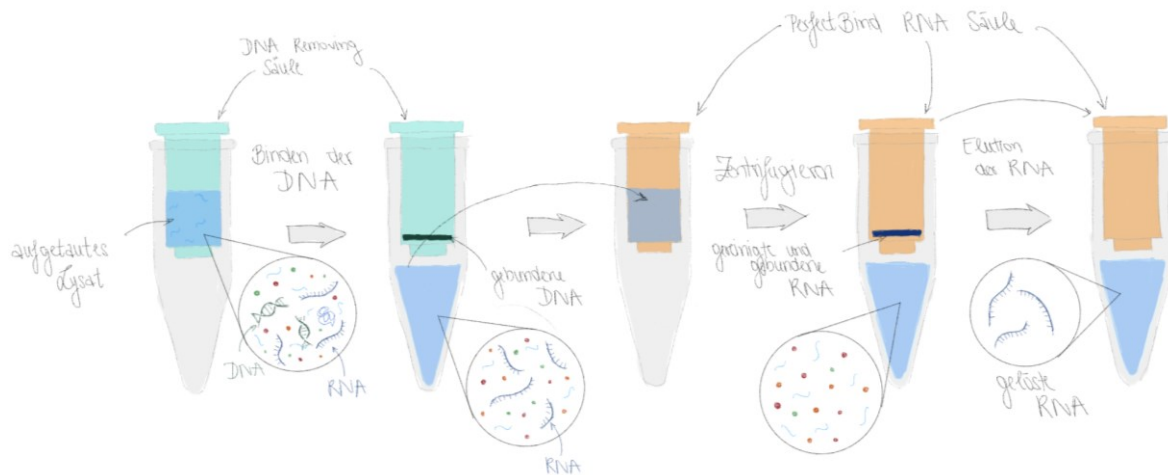
3.3.1.3 RNA-Isolation

Am darauffolgenden Tag wurden die Proben (1-7) schonend auf Eis aufgetaut.

Währenddessen wurde der RNA Wash Buffer II durch die Zugabe von 80ml 99,9% Ethanol komplementiert und 70% Ethanol durch das Mischen von 7ml 99,9% Ethanol mit 3ml des RNA freien Wassers hergestellt.

Die im Folgenden beschriebenen Schritte geschahen bei Raumtemperatur. Durch das Tragen von Einweghandschuhen und möglichst wenig Sprechen, wurde versucht die Kontamination mit Fremd-RNA möglichst gering zu halten.

Abbildung 6: Schema RNA-Isolation - aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde manche Arbeitsschritte vereinfacht dargestellt (Details siehe Fließtext)



Begonnen wurde mit dem Ineinanderstecken der DNA Removing Säulen in die Sammel-Tubes. Daraufhin wurde das Lysat ohne Gewebereste auf die DNA Removing Säulen pipettiert. Bei den den Proben 6 „Natur“ 100µl bzw. 1,45mg/ml und 7 „frozen- & freeze-dried“ 5µl bzw. 0,25mg/ml geschah dieser Schritt nach zuvorigem Suspendieren des Lysats - die verbliebenen Membranhälften wurden anschließend verworfen. Danach erfolgte das Zentrifugieren (Thermo SCIENTIFIC PICO 17) bei 12.000g für 1min.

Im nächsten Schritt konnten die DNA Removing Säulen verworfen werden und der Durchfluss in den Collection Tubes wurde mit 200µl 70% Ethanol versetzt. Unter Verwendung der PerfectBind RNA Säulen wurde das Gemisch für eine 1min bei 10.000g zentrifugiert. Anschließend wurden die Sammel-Tubes durch neue ersetzt.

500µl des RNA wash buffer I wurden auf die PerfectBind RNA Säulen pipettiert, für 15sec bei 10.000g zentrifugiert und die Sammel-Tubes wurden erneut gewechselt.

Anschließend wurden 600µl des komplementierten RNA Wash Buffer II auf die PerfectBind RNA Säulen pipettiert und für weitere 15sec bei 10.000g zentrifugiert. Nach Wechsel der Sammel-Tubes wurden die PerfectBind RNA Säulen für 2min bei 10.000g trocken zentrifugiert.

Im letzten Schritt wurden die PerfectBind RNA Säulen in 1,5ml Eppendorf Tubes umgesteckt. Eine Elution mit 30µl RNase freiem Wasser erfolgte. Nach einer exakt

fünfminütigen Inkubation wurde die Elution bei 10.000g für 1min zentrifugiert und die PerfectBind RNA Säulen verworfen. Anzumerken ist hierbei, dass vom Kurzprotokoll des Kits bewusst abgewichen wurde, um die Ausbeute an RNA zu erhöhen.

Die gewonnenen RNA Proben wurden umgehend auf Eis gelagert.

3.3.2 Messen von RNA

Noch am Tag der Isolation wurden die Proben (1-7) vermessen. Dafür wurde das Gerät NanoDrop One verwendet. Die Proben wurden durchgehend auf Eis gelagert.

Nach Auswahl des Programms „RNA“, wurde der Probenbereich gereinigt (Gesichtstücher #115-0600). Es wurden ebendort 1,5µl des RNase freies Wasser pipettiert und der Selbsttest durchgeführt.

Anschließend erfolgte ein erneutes Reinigen des Probenbereichs, nach dem „Snippen“ der ersten Probe wurden von dieser 1,5µl auf das Gerät pipettiert. Die Probe wurde vom Gerät automatisch vermessen. Dieser Vorgang wurde für alle weiteren Proben wiederholt.

3.3.3 cDNA-Synthese

Die Komponenten des Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit sowie die RNA-Proben wurden auf Eis aufgetaut und dort gelagert. Vor Arbeitsbeginn sowie bei allen Zwischenschritten wurden mit Hilfe des Combi-Spins kurz durchmischt und zentrifugiert.

Um standardisiert mit 1µg RNA arbeiten zu können, wurde jeweils eine 1µg enthaltende Menge an Probenmaterial mit der entsprechenden Menge an Sigma Wasser auf 10µl verdünnt.

Anschließend wurden 8µl des Oligo- sowie 8µl des Random Hexamer Primers zusammengeführt. 2µl der Primer Lösung wurden jeder verdünnten 10µl RNA-Probe beigelegt. Für das Annealing der Primer liefen die Proben (Gesamtvolumen: 12µl) im Thermocycler (CF96 Real-Time System C1000) bei 65°C für 5min (Programm „RTpeg1“).

Nach kurzem Zentrifugieren wurden pro Probe 8µl des Mastermix - bestehend aus 4µl 5X Reaction Buffer, 1µl RiboLock RNase Inhibitor (20U/µl), 2µl 10mM dNTP Mix sowie 1µl RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl) - hinzugefügt. Für die Synthese der cDNA liefen die Proben mit einem Gesamtvolumen von 20µl wiederholt im Thermocycler (CF96 Real-Time System C1000) bei 65°C für 01:10h (Programm „RTpeg12“).

Die cDNA-Proben wurden mit 980µl Wasser verdünnt, um eine cDNA-Konzentration von 1µg/ml zu erhalten. Die weitere Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.3.4 qPCR

Alle benötigten Reagenzien sowie die cDNA-Proben wurden auf Eis aufgetaut und dort gelagert. Vor Arbeitsbeginn sowie bei allen Zwischenschritten wurden die Proben mit Hilfe des Combi-Spins kurz durchmischt und zentrifugiert.

Proben, Positivkontrollen sowie eine „non-template control“ wurden wie folgt gemischt:

Tabelle 18: qPCR MUC5AC

	Primer	Primer Menge	Template Menge	MasterMix Menge	Gesamt-volumen	Proben Anzahl
MUC5AC	MUC5AC R & F	2µl	10µl cDNA Verdünnung	8µl	20µl	7
Positiv-kontrolle	beta-Actin R beta-Actin F	1µl 1µl	10µl cDNA Verdünnung	8µl	20µl	7
MOCK	beta-Actin R beta-Actin F	1µl 1µl	10µl Wasser	8µl	20µl	1

Tabelle 19: qPCR MUC5B

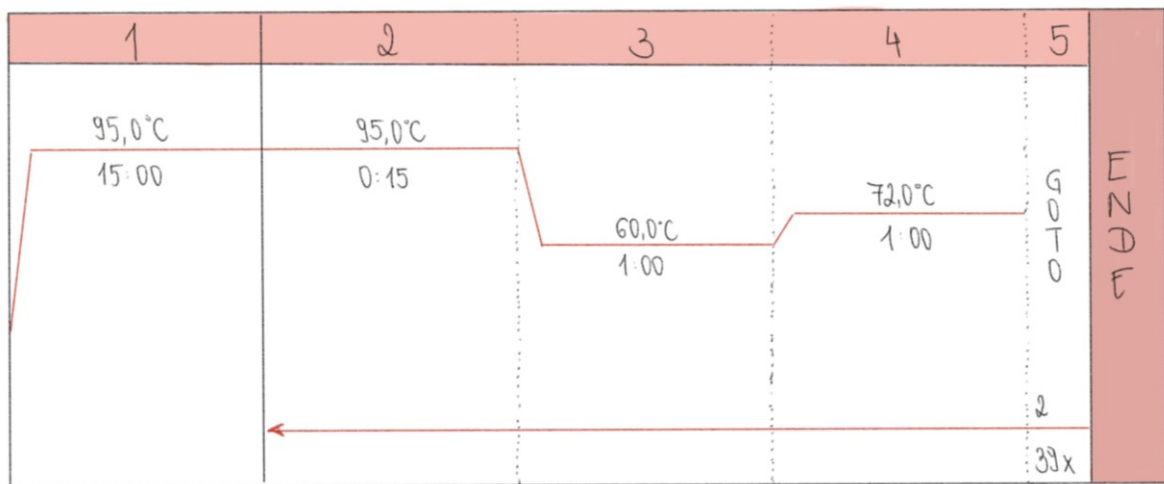
	Primer	Primer Menge	Template Menge	MasterMix Menge	Gesamt-volumen	Proben Anzahl
MUC5B	MUC5B	2µl	10µl cDNA Verdünnung	8µl	20µl	7
Positiv-kontrolle	beta-Actin R beta-Actin F	1µl 1µl	10µl cDNA Verdünnung	8µl	20µl	7
MOCK	beta-Actin R beta-Actin F	1µl 1µl	10µl Wasser	8µl	20µl	1

Anschließend wurde für beide Primer eine PCR mit in der Tabelle unten angeführten Einstellungen durchgeführt:

Tabelle 20: qPCR Einstellungen

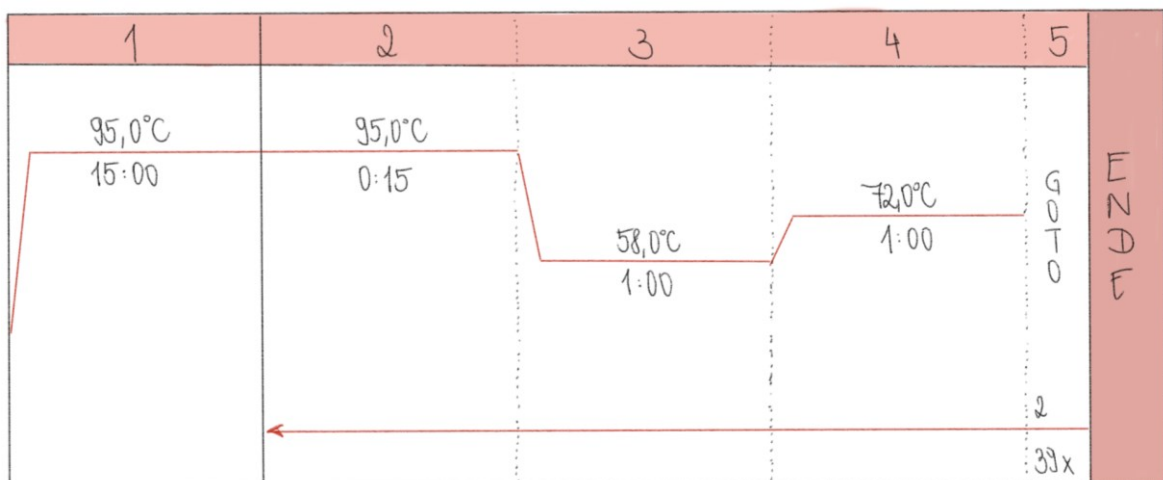
	Protocol	Scan Mode	Sample Volume (µl)	Lid Temperature	Turn on hotlid
MUC5AC	MUC2 und MUC5AC	SYBR / FAM only	20	105	ja
MUC5B	MUC5B	SYBR / FAM only	20	105	ja

Abbildung 7a: Schema Protokoll MUC2 und MUC5AC



Die Schritte 2-5 wurden in 40 Zyklen wiederholt. Das Annealing erfolgte bei 60,0°C.

Abbildung 7b: Schema Protokoll MUC5B



Die Schritte 2-5 wurden in 40 Zyklen wiederholt. Das Annealing erfolgte bei 58,0°C.

4 Ergebnisse

4.1. Kontamination der Zellkultur

Wie bereits im Teil Methoden - Zellkultur beschrieben, kam es im Rahmen der dreitägigen Inkubation mit den Dekokten zur sichtbaren Kontamination von 9 der 24 Wells. Neben Farbumschlägen des Mediums von Rosa in diverse Rosé- und Gelbtöne, waren auch punktförmige Formationen sowie weißliche Schlieren erkennbar. Das Medium war getrübt. In Folge dessen mussten alle der „frozen- & freeze-dried“ 50µl bzw. 2,38mg/ml Proben verworfen werden.

In fünf der 24 Proben war mit freiem Auge ein Ablösen des Zellrasens von der Membran zu erkennen. Dies machte sie für weitere histologische Aufbereitung unbrauchbar. Daher wurden sie für eine RNA-Lyse verwendet.

4.2 Unterschiedliche Färbeergebnisse

In den folgenden Abbildungen sind die Scans der angefertigten und gefärbten Schnitte ersichtlich.

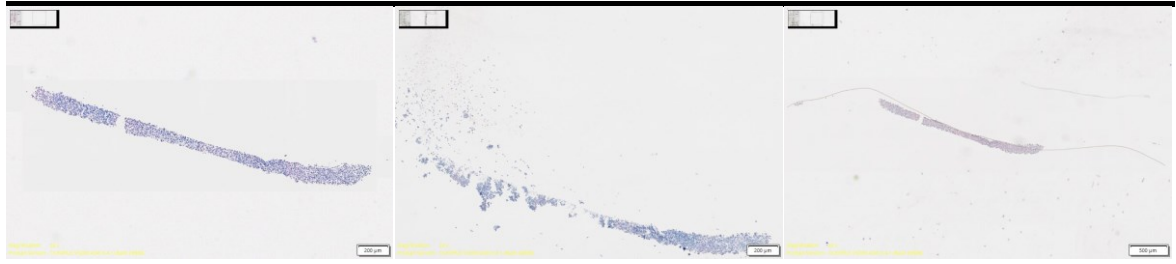
Auffällig ist neben dem Ablösen der Zellen von der Membran auch die hohe Anzahl und Schichtdicke des Zellrasens. Teilweise kann ein Verklumpen der Zellen beobachtet werden.

In der Anti-MUC5AC-Färbung konnte nur in der Positivkontrolle (Präparat Trachea N27 6) ein positives Resultat (Rotfärbung) erzielt werden. Sowohl Kontrolle als auch Proben zeigten dieses Färbeverhalten nicht.

In der Anti-MUC5B-Färbung ist in allen Schnitten ein deutliches positives Resultat (Rot-Violett-Ton) erkennbar. Nur die Probe Natur 5µl (0,08mg/ml) zeigt dabei punktuell roten Farbniederschlag. In der Kontrolle sowie allen anderen Proben zeigt sich ein eher diffuses Anfärbeverhalten.

4.2.1 Kontrolle

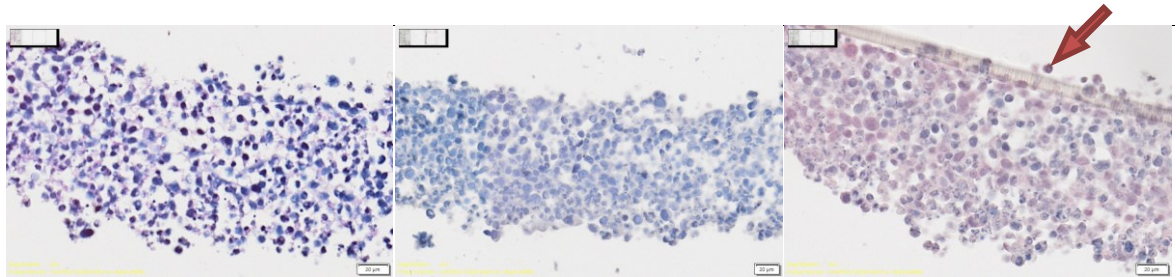
Scans: Kontrolle Block „C1“ - ganze Membran wurde eingebettet



Übersicht Kontrolle 1
H.E. Färbung 4x

Übersicht Kontrolle 1
Anti-MUC5AC IHC 4x

Übersicht Kontrolle 1
Anti-MUC5B IHC 4x



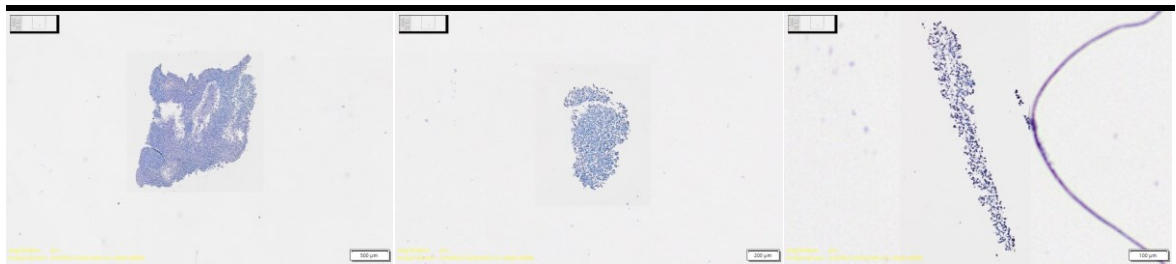
Detail Kontrolle 1
H.E. Färbung 20x

Detail Kontrolle 1
Anti-MUC5AC IHC 20x

Detail Kontrolle 1
Anti-MUC5B IHC 20x

In der Detailansicht der Anti-MUC5B IHC ist rechts oben mit einem Pfeil markiert die poröse Membran gut zu erkennen.

Scans: Kontrolle Block „C2“ - beide Membranhälften in eine Kasette



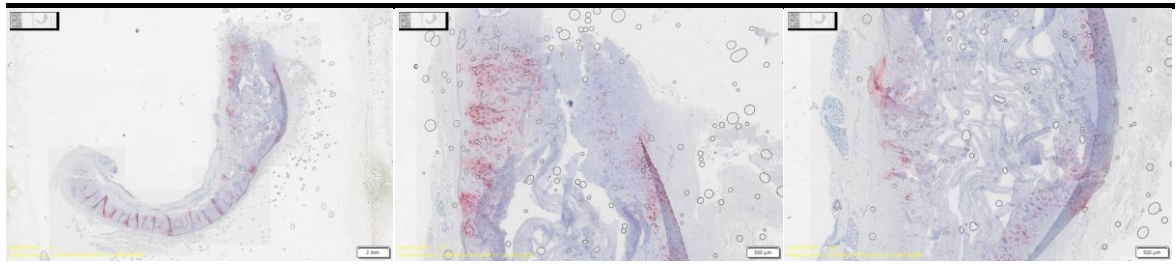
Übersicht C1
H.E. Färbung 4x

Übersicht C1
H.E. Färbung 4x

Übersicht C1
H.E. Färbung 4x

Es findet sich in der H.E. Färbung keine Zellschicht, lediglich größere Zellklumpen.

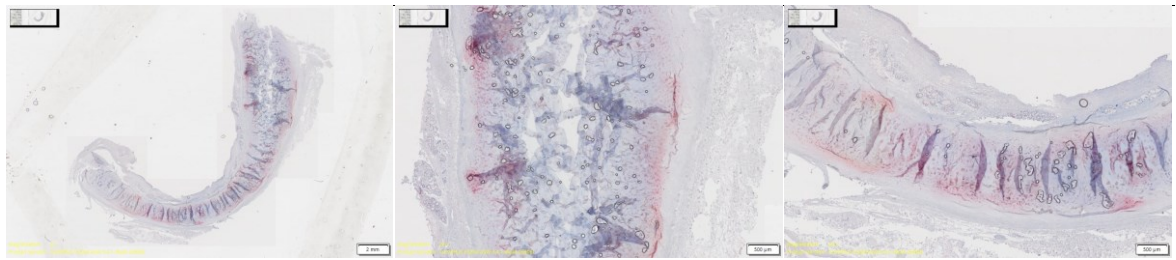
Scans: Positivkontrollen MUC5AC und MUC5B



Übersicht Trachea N27 6
Anti-MUC5AC IHC 4x

Detail Trachea N27 6
Anti-MUC5AC IHC 20x

Detail Trachea N27 6
Anti-MUC5AC IHC 20x



Übersicht Trachea N27 5
Anti-MUC5B IHC 4x

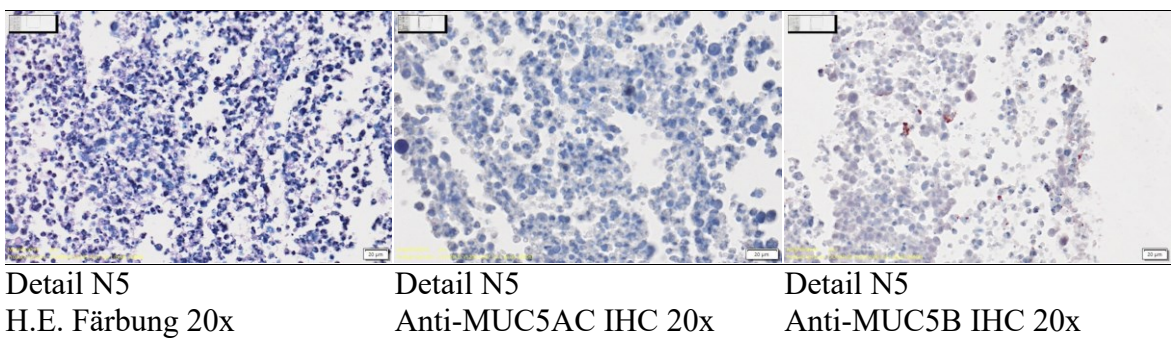
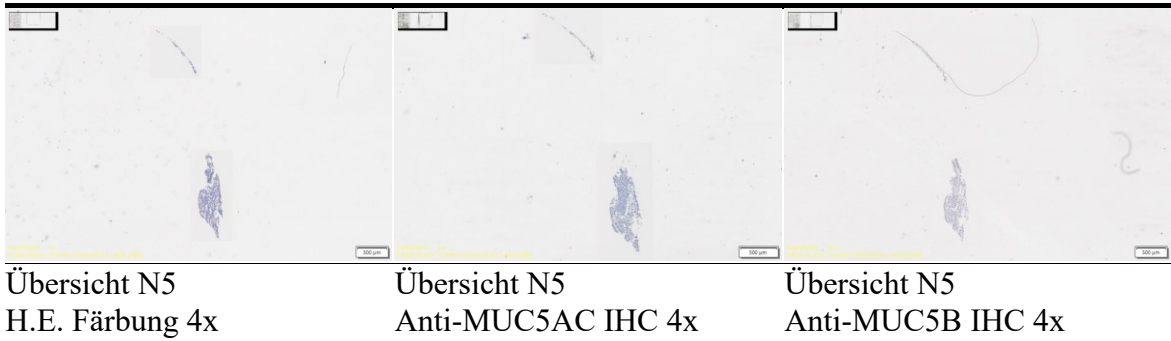
Detail Trachea N27 5
Anti-MUC5B IHC 20x

Detail Trachea N27 5
Anti-MUC5B IHC 20x

Die Positivkontrollen für sowohl Anti-MUC5B sowie Anti-MUC5AC zeigen beide lokalisiertes Anfärbeverhalten.

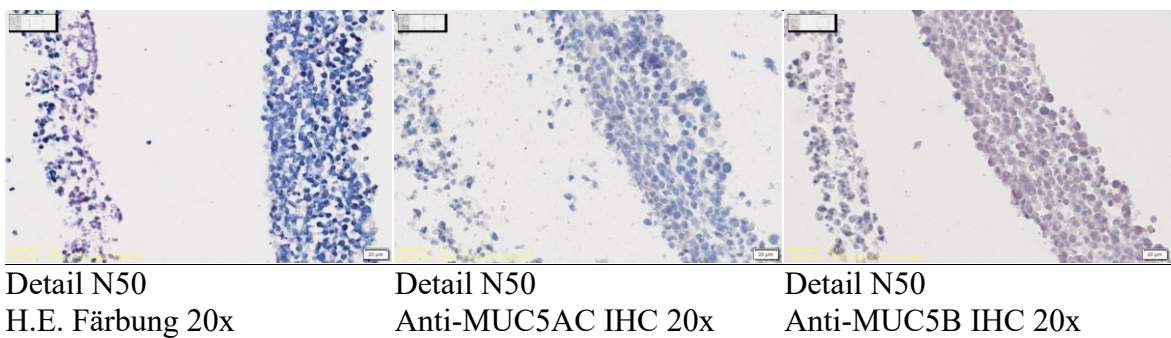
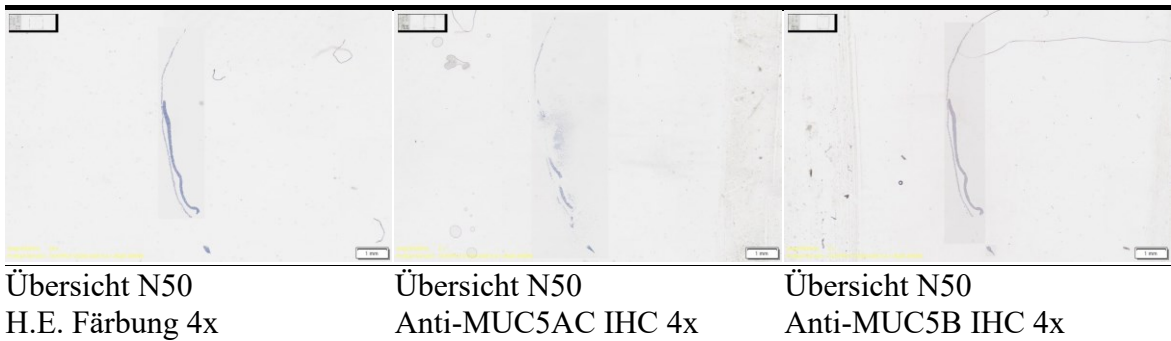
4.2.2 Nature Dekokt

Scans: Nature 5µl bzw. 0,08mg/ml Block N5



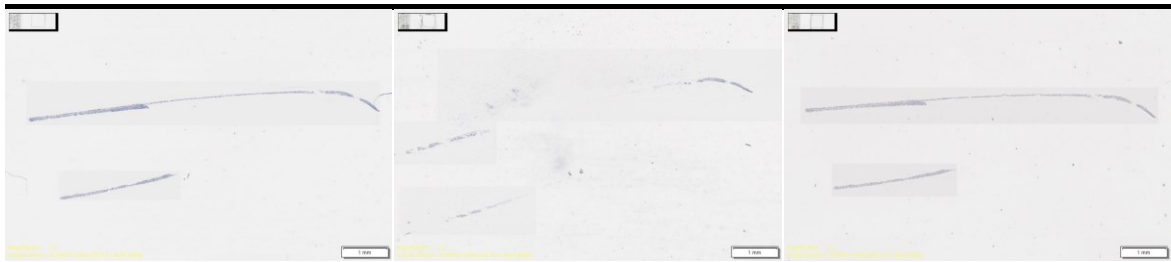
In der Detailansicht Anti-MUC5B ein punktförmiges Anfärbeverhalten zu beobachten ist.

Scans: Nature 50µl bzw. 0,76mg/ml Block N50



In der Detailansicht wird erkennbar, dass die durchwachsenen Membranreste links und der Zellrasen rechts sich voneinander gelöst haben.

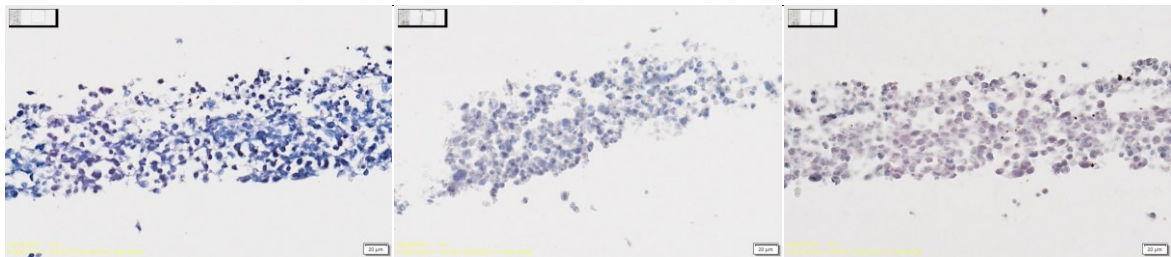
Scans: Nature 100µl bzw. 1,45mg/ml Block N100



Übersicht N100
H.E. Färbung 4x

Übersicht N100
Anti-MUC5AC IHC 4x

Übersicht N100
Anti-MUC5B IHC 4x



Detail N100
H.E. Färbung 20x

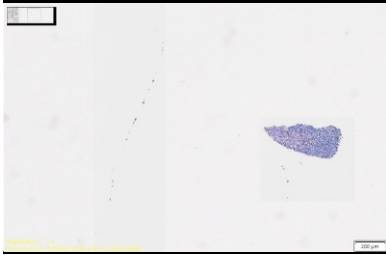
Detail N100
Anti-MUC5AC IHC 20x

Detail N100
Anti-MUC5B IHC 20x

Wie schon mit freiem Auge im Schneideprozess ersichtlich, lassen sich auch mikroskopisch zwei Zellrasen erkennen. Der in den Übersichten dargestellte untere dürfte sich von der oberhalb liegenden Membran gelöst haben.

4.2.3 Frozen- & freeze-Dried Dekokt

Scan: frozen- & freeze-dried 1µl bzw. 0,05mg/ml Block „FD1“



Übersicht FD1
H.E. Färbung 4x

Es findet sich lediglich eine Zellgruppierung. Weder Membran, noch Zellrasen waren sichtbar

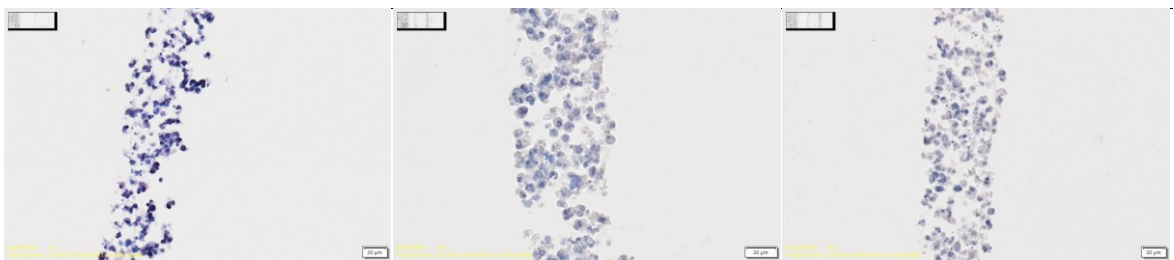
Scan: Frozen- & freeze-dried 1µl bzw. 0,05mg/ml Block „FD1 II“



Übersicht FD1 II
H.E. Färbung 4x

Übersicht FD1 II
Anti-MUC5AC IHC 4x

Übersicht FD1 II
Anti-MUC5B IHC 4x



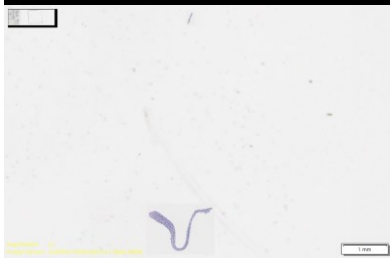
Detail FD1 II
H.E. Färbung 20x

Detail FD1 II
Anti-MUC5AC IHC 20x

Detail FD1 II
Anti-MUC5B IHC 20x

Im Vergleich zu den anderen Proben findet sich ein eher lockerer Zellverbund.

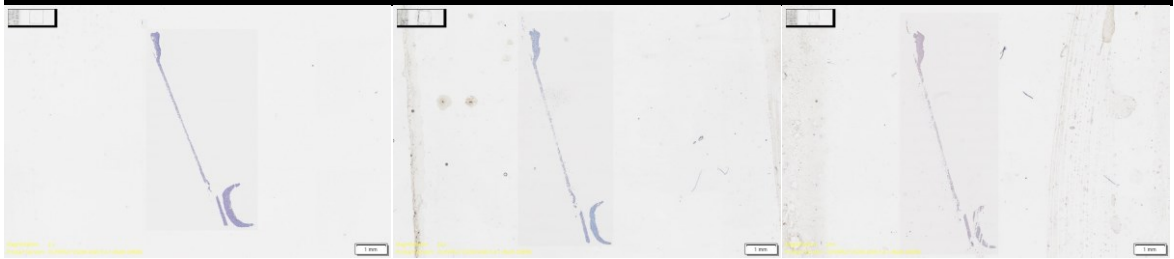
Scan: Frozen- & freeze-dried 10µl bzw. 0,5mg/ml Block „FD10“



Übersicht FD10
H.E. Färbung 4x

U-förmig verformte Zellschicht - möglicherweise dem Gießvorgang geschuldet.

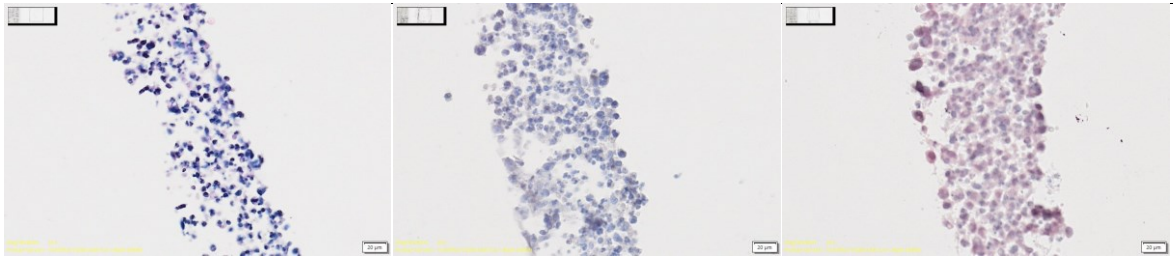
Scan: Frozen- & freeze-dried 10µl bzw. 0,5mg/ml Block „FD10 II“



Übersicht FD1 II
H.E. Färbung 4x

Übersicht FD1 II
Anti-MUC5AC IHC 4x

Übersicht FD1 II
Anti-MUC5B IHC 4x



Detail FD1 II
H.E. Färbung 20x

Detail FD1 II
Anti-MUC5AC IHC 20x

Detail FD1 II
Anti-MUC5B IHC 20x

Ein klares Ablösen der Zellschichte von der Membran ist in den Übersichtsaufnahmen erkennbar.

4.3 Zufriedenstellende RNA-Messergebnisse

In der unten angeführten Tabelle sind die mittels NanoDrop One erzielten RNA-Messergebnisse abzulesen. Die in den beiden rechten Spalten angeführten Verhältnisse stellen ein Maß für die Reinheit der Proben dar.

Laut Herstellerinformation (Thermo Scientific 2016 : 50ff.) sollte die A260/A280 Ratio für RNA bei 2,0 liegen, der Zielwert für die A260/A230 Ratio liegt zwischen 2,0-2,2. Beide sind Maße für die Reinheit der RNA-Probe. Diese war nur in frozen- & freeze-dried 5µl (0,25mg/ml) verhältnismäßig niedrig.

Tabelle 21: RNA Messergebnisse

Beschreibung	Membran	Probennr.	Nukleinsäure (ng/ul)	A260/A280	A260/A230
Kontrolle	ganz	Sample 1	609,502	1,884	1,864
Natur 5µl (0,08mg/ml)	ganz	Sample 2	739,188	1,906	1,764
Natur 50µl (0,76mg/ml)	ganz	Sample 3	544,036	1,9	1,338
Natur 100µl (1,45mg/ml)	Hälfte	Sample 6	460,088	1,916	1,884
frozen/feeze-dried 1µl (0,05mg/ml)	ganz	Sample 4	503,367	1,91	1,753
frozen-/freeze-dried 5µl (0,25mg/ml)	Hälfte	Sample 7	348,052	1,922	1,046
frozen/feeze-dried 10µl (0,5mg/ml)	ganz	Sample 5	639,319	1,89	1,783

4.4 Inkongruente PCR-Ergebnisse

Tabelle 22: qPCR ACTB60 und MUC 5AC

3 Tage	ACTB60	MUC 5AC	dCP	ddCP	-ddCP	Ratio
Kontrolle	15,85	36,75	20,90			
Natur 5µl (0,08mg/ml)	15,33	14,60	-0,73	-21,63	21,63	3245479,02
Natur 50µl (0,76mg/ml)	17,60	39,19	21,59	0,69	-0,69	0,62
Natur 100µl (1,45mg/ml)	17,74	35,09	17,35	-3,55	3,55	11,71
frozen/feeze- dried 1µl (0,05mg/ml)	7,67	32,67	25,00	4,10	-4,10	0,06
frozen- /freeze- dried 5µl (0,25mg/ml)	16,56	0,00	-16,56	-37,46	37,46	189053027942,10
frozen/feeze- dried 10µl (0,5mg/ml)	17,08	34,82	17,74	-3,16	3,16	8,94
Mock	12,59					

dCP = MUC 5AC - ACTB60

ddCP = dCP - dCP_{Kontrolle}

Ratio = 2^{-ddCP}

Tabelle 23: qPCR ACTB60 und MUC 5B

3 Tage	ACTB60	MUC 5B	dCP	ddCP		Ratio
Kontrolle	15,71	23,30	7,59			
Natur 5µl (0,08mg/ml)	16,40	13,19	-3,2	-10,8	10,8	1782,8875536
Natur 50µl (0,76mg/ml)	15,15	6,66	-8,49	-16,08	16,08	69272,7343062
Natur 100µl (1,45mg/ml)	6,21	20,32	14,11	6,52	-6,52	0,0108964
frozen/feeze- dried 1µl (0,05mg/ml)	15,25	24,14	8,89	1,30	-1,30	0,4061262
frozen-/freeze- dried 5µl (0,25mg/ml)	15,03	23,09	8,06	0,47	-0,47	0,7219646
frozen/freeze- dried 10µl (0,5mg/ml)	16,45	26,87	10,42	2,83	-2,83	0,1406323
Mock	37,48					

dCP = MUC 5AC - ACTB60

ddCP = dCP - dCP_{Kontrolle}

Ratio = 2^{-ddCP}

5 Diskussion

5.1 Versuchsaufbau

Wie im ursprünglichen Versuch geplant sollte mit einer primären Zelllinie (NHBE) gearbeitet werden. Diese zeigte nach Mass et al. (vgl. 2016) ein vollständig differenziertes Epithel, in dem unterschiedlichste für das respiratorische System typische Zellen zu finden waren.

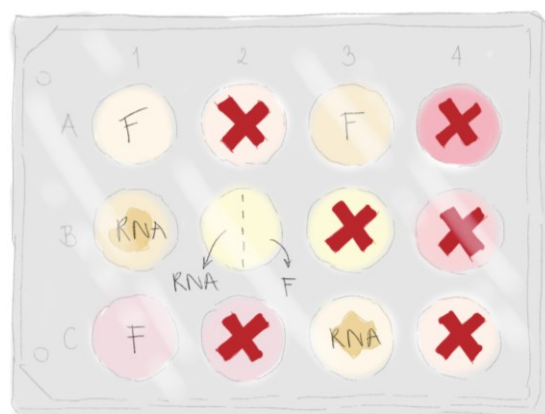
Nachdem die Isolation aus humanen Spenderpräparaten im Vorfeld allerdings zweifach gescheitert war, musste auf die BEAS-2B Zelllinie zurückgegriffen werden. Diese wies in den histologischen Schnitten jedoch keine höheren Differenzierungsmerkmale auf. Eine ähnlich polygonale Morphologie wurden bereits von Atsuta et al. (vgl. 1997) beobachtet. Auch bei dieser Zellkultur trat nach dreitägiger Inkubation mit den Hanshiyi-Dekokten eine Kontamination auf. Als Ursache für die Kontamination können sowohl Zutrag von außen im Rahmen der Kultur als auch durch das Hinzufügen der Dekokte selbst diskutiert werden.

**Abbildung 4a: Schema „Nature“
Dekokt nach drei Tagen Inkubation**



F ... Formol fixiert
RNA ... für RNA Lyse verwendet
x ... kontaminiert
- - - ... halbiert

**Abbildung 4b: Schema „frozen- &
freeze-dried“ Dekokt nach drei Tagen
Inkubation**



F ... Formol fixiert
RNA ... für RNA Lyse verwendet
x ... kontaminiert
- - - ... halbiert (separat aufgearbeitet)

In den allermeisten Schnitten ist ein Ablösen des Zellrasens von der Membran ersichtlich - dies war bereits makroskopisch durch frei schwimmendes Zellmaterial in der PBS 1x Lösung zu beobachten. Ursachen dafür könnte die hohe Anzahl an verwendeten Zellen als auch der Schneidevorgang selbst sein sowie mögliche für das freie Auge nicht ersichtliche Kontamination, die zum Ablösen der Zellen geführt haben könnten.

Das in der Kontrolle Block C2 beobachtete Verklumpen der Zellen lässt sich auf das gemeinsame Einlegen beider Membranhälften in einer Kassette zurückführen.

5.2 Beurteilung der veränderten Muzinproduktion

Der ursprüngliche Plan die immunhistochemisch gefärbten Schnitte mittels computergestützter Analyse hinsichtlich ihrer Muzinproduktion objektiv analysieren zu können, konnte aufgrund der zu geringen Rotfärbung nicht durchgeführt werden.

Allerdings zeigten die Positivkontrollen für sowohl Anti-MUC5AC als auch Anti-MUC5B spezifisches Anfärbemuster - dies spricht für eine erfolgreiche Immunhistochemie.

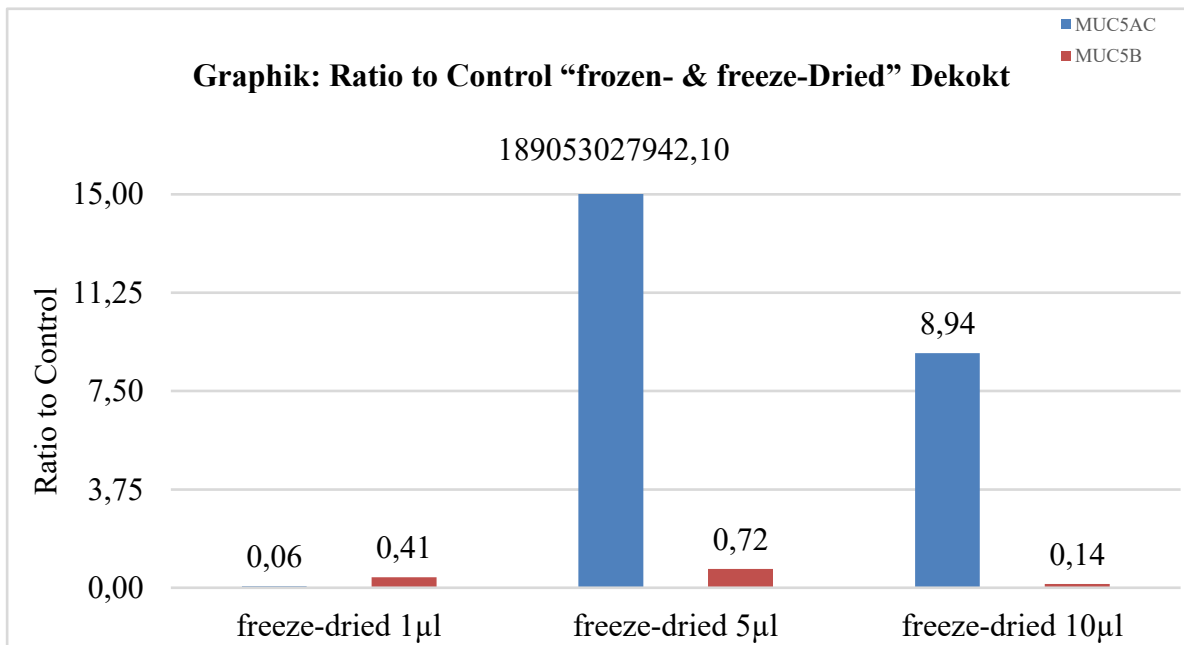
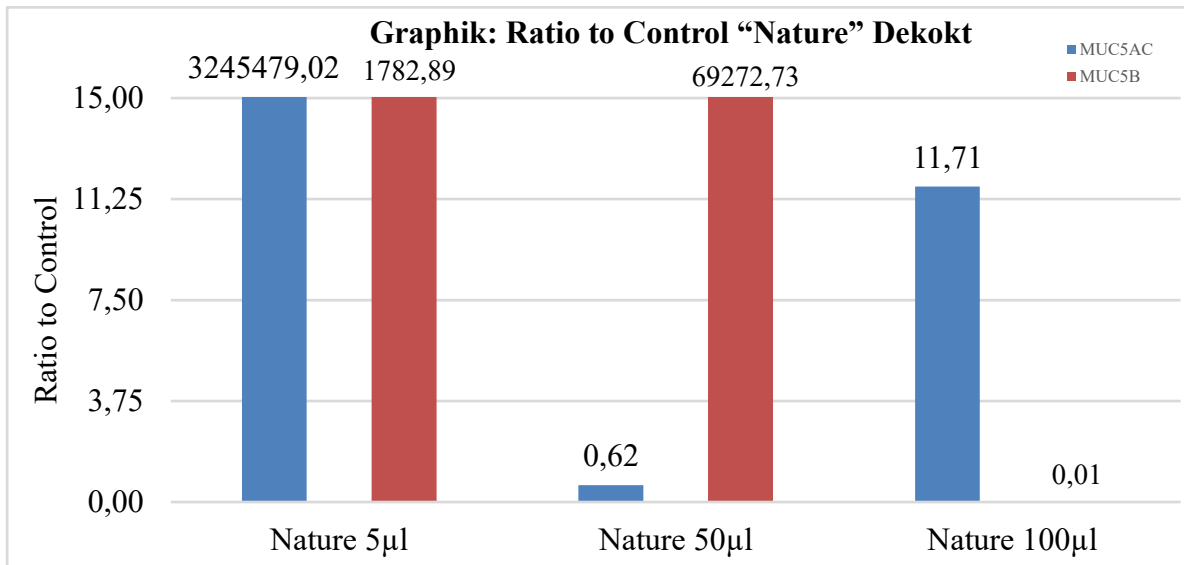
Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in allen anderen mit Anti-MUC5B gefärbten Proben finden sich ein starker Rot- bis Violett-Ton. Jedoch zeigt nur die Probe Nature 5µl bzw. 0,08mg/ml eine punktuelle MUC5B Expression vergleichbar mit einer höher differenzierten Subgruppe an Zellen.

Möglich wäre, dass höhere Konzentrationen des Nature Dekokts sowie alle getesteten Konzentrationen des frozen- & freeze-dried Dekokts zytotoxische Effekt aufweisen.

Sowohl die Kontrollgruppe als auch die Proben zeigen kaum bis gar keine Anfärbbarkeit in der Anti-MUC5AC Immunhistochemie. Dies spricht dafür, dass das Protein MUC5AC von der BEAS-2B Zelllinie gegebenenfalls nicht exprimiert wird. Selbiges stellten Steward et al. (vgl. 2012) fest, die in ihrer Immunhistochemie ebenso keine Anfärbbarkeit für MUC5AC feststellen konnten und auch in einer durchgeführten qPCR keinerlei Nachweis für die Expression von MUC5AC in BEAS-2B Zelllinien finden konnten.

In dieser Hinsicht liefert die selbst durchgeführte qPCR inkongruente Ergebnisse: Da die Ratio bezogen auf die Kontrollgruppe für den Nature Dekokt in den Konzentrationen 0,08mg/ml sowie 1,45mg/ml sowie den frozen- & freeze-dried Dekokt in den Konzentrationen 0,25mg/ml sowie 0,5mg/ml deutlich erhöht ist und für die vermehrte

Expression sprechen würde, alle anderen Proben weisen jedoch eine verringerte Ratio auf. Allenfalls ist die qPCR zu wiederholen.



5.3 Einschränkungen

Vorab ist anzumerken, dass die Wahl einer Zellkultur bewusst getroffen wurde, um die eben klinisch in vivo beobachteten Effekte in vitro darstellen zu können und so besser zu erforschen. Durch die verwendete BEAS-2B Zelllinie sind allerdings eine veränderte MUC5AC Expression beziehungsweise ein verändertes Muzin-Verhältnis nur begrenzt evaluierbar.

Zu beachten ist die Limitation der Zelllinie. Da es zu keiner Differenzierung kam, fehlte das pseudostratifizierte respiratorische Epithel und entsprechend auch komplexe Interaktionsmöglichkeiten. Dem hinzuzufügen ist, dass Immunzellen sowie Drüsen in der Zellkultur nicht nachgebildet werden können - im Menschen spielen sie jedoch eine entscheidende Rolle für den Krankheitsverlauf. Denn nicht nur Becherzellen sondern auch innerviert seromuköse Drüsen (vgl. Lüllmann-Rauch 2019 : 409) sind an der Muzinproduktion beteiligt.

Die bewusst gewählten hohen Konzentrationen an Hanshiyi-Dekokten sind klinisch nicht zu erzielen, sollten in der Zellkultur jedoch bewusst etwaige Effekte sichtbar machen. Zumal die Dekokte klinisch per os zugeführt werden und deren Konzentrationen im Blut stark von der Absorption des Verdauungssystem abhängen. Auch individuelle Varianz kann im Versuch nicht abgebildet werden.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Versuchsreihe sollte lediglich als Beginn der Grundlagenforschung am Hanshiyi-Dekokt angesehen werden. In den nächsten Versuchen sollte auf primäre NHBE-Zelllinien zurückgegriffen werden, um die klinisch beobachtete veränderten Muzin-Verhältnisse (vgl. Yin et al. 2021) besser abbilden zu können.

Auch die verwendeten Konzentrationen sollten in weiteren Versuchen mit um zumindest eine Zehnerpotenz verringert durchgeführt werden.

Die PCR ist allenfalls zu wiederholen, da die inkongruenten Ergebnisse wenig Rückschluss auf ein eventuell verändertes Expressionsmuster der Muzine MUC5AC sowie MUC5B zuließen.

Ganz generell gilt es die klinisch beobachteten Effekte bestmöglich in vitro abzubilden und die komplexen Effekte der Dekokte dadurch besser zu verstehen.

Quellenverzeichnis

Alle nicht anderweitig gekennzeichneten Abbildungen, Tabellen, Graphiken sowie Scans wurden von mir selbst erstellt.

An, X.; Xu, X.; Xiao, M.; Min, X.; Lyu, Y.; Tian, Y.; Ke, J.; Lang, S.; Zhang, Q.; Fan, A.; Liu, B.; Zhang, Y.; Hu, Y.; Zhou, Y.; Shao, J.; Li, X.; Lian, F. und Tong, X. (2021): Efficacy of Jinhua Qinggan granules combined with western medicine in the treatment of confirmed and suspected COVID-19: A randomized controlled trial. In: *Frontiers in Medicine*, 8. doi: 10.3389/fmed.2021.728055.

Atsuta, J.; Sterbinsky, S. A.; Plitt, J.; Schwiebert, L. M.; Bochner, B. S. und Schleimer, R. P. (1997): Phenotyping and Cytokine Regulation of the BEAS-2B Human Bronchial Epithelial Cell: Demonstration of Inducible Expression of the Adhesion Molecules VCAM-1 and ICAM-1. In: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 17(5), S. 571-582. doi: 10.1165/ajrcmb.17.5.2685.

ATCC (2023): BBM. CRL-9482TM. In: <https://www.atcc.org/atcc/productsheetpdf/generatehtmlpdf/crl-9482>. (Stand: 26.09.2023).

Bartlett, N.W.; Walton, R. P.; Edwards, M. R.; Aniscenko, J.; Caramori, G.; Zhu, J.; Glanville, N.; Choy, K.; Jourdan, P.; Burnet, J.; Tuthill, T. J.; Pedrick, M. S.; Hurle, M.; Plumpton, C.; Sharp, N. A.; Bussell, J.; Swallow, D. M.; Schwarze, J.; Guy, B.; Almond, J. W.; Jeffery, P. K.; Lloyd, C. M.; Papi, A.; Killington, R. A.; Rowlands, D. J.; Blair, E. D.; Clarke, N. J. und Johnston, S. L. (2008): Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation. In: *Nature Medicine, Nature Portfolio*, 14(2), S. 199–204. doi:10.1038/nm1713.

Bérubé, K.; Prytherch, Z.; Job, C. und Hughes, T. (2010): Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. In: *Toxicology*, 278(3), S. 311-318. doi:10.1016/j.tox.2010.04.004.

Ehrhardt, C.; Forbes, B. und Kim, K. J. (2008): In Vitro Models of the Tracheo-Bronchial Epithelium. In: Ehrhardt, C. und Kim, K. J. (Hg.) *Drug Absorption Studies*.

Biotechnology: Pharmaceutical Aspects. Vol. VII. Boston: Springer. doi:10.1007/978-0-387-74901-3_10.

Evans, C. M.; Raclawska, D. S.; Ttofali, F.; Liptzin, D. R.; Fletcher, A. A.; Harper, D. N.; McGing, M. A.; McElwee, M. M.; Williams, O. W.; Sanchez, E.; Roy, M. G.; Kindrachuk, K. N.; Wynn, T. A.; Eltzschig, H. K.; Blackburn, M. R.; Tuvim, M. J.; Janssen, W. J.; Schwartz, D. A. und Dickey, B. F. (2015); The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. *Nature*, 6, S. 1-11. doi: 10.1038/ncomms7281.

Hays, J.N. (2005): *Epidemics and pandemics: Their Impacts on Human History*. USA: Bloomsbury Publishing.

Lüllmann-Rauch, R. (2019): *Taschenlehrbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme.

Mass, E.; Ballesteros, I.; Farlik, M.; Halbritter, F.; Günther, P.; Crozet, L.; Jacome-Galarza, C. E.; Händler, K.; Klughammer, J.; Kobayashi, Y.; Gomez-Perdiguero, E.; Schultze, J. L.; Beyer, M.; Bock, C. und Geissmann, F. (2016): Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. In: *Science*, American Association for the Advancement of Science, 353. doi:10.1126/science.aaf4238.

National Health Commission of People's Republic of China & National Administration of Traditional Chinese Medicine (2023): *Diagnosis and treatment protocol for COVID-19 patients (Tentative 10th Version)*. In: *Health Care Science*, 2(1), S. 10-24. doi:10.1002/hcs2.36.

Pezzulo, A. A.; Starner, T. D.; Scheetz, T. E.; Traver, G.; Tilley, A. E.; Harvey, B.; Crystal, P. G.; McCray, P. B. und Zabner, J. (2011): The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. In: *American Journal of Physiology-lung Cellular and Molecular Physiology*, American Physical Society, 300(1), S. 25–31. doi:10.1152/ajplung.00256.2010.

Qiu, Q; Huang, Y.; Liu, X.; Haung, F.; Li, X.; Cui, L.; Luo, H. und Luo, L. (2020): *Potential therapeutic effect of traditional Chinese medicine on coronavirus disease 2019: A*

review. In: *Frontiers in Pharmacology*, *Frontiers Media*, 11, S.1-16.
doi:10.3389/fphar.2020.570893.

Roy, M. G.; Livraghi-Butrico, A.; Fletcher, A. A.; McElwee, M. M.; Evans, S. E.; Boerner, R. M.; Alexander, S. N.; Bellinghausen, L. K.; Song, A. S.; Petrova, Y. M.; Tuvim, M. J.; Adachi, R.; Romo, I.; Bordt, A. S.; Bowden, M. G.; Sisson, J. H.; Woodruff, P. G.; Thornton, D. J.; Rousseau, K.; De la Garza, M. M.; Moghaddam, D. J.; Karmouty-Quintana, H.; Blackburn, M. R.; Drouin, S. M.; Davis, C. W.; Terrell, K. A.; Grubb, B. R.; O'Neal, W. K.; Flores, S. C.; Cota-Gomez, A.; Lozupone, C. A.; Donnelly, J. M.; Watson, A. M.; Hennessy, C. E.; Keith, R. C.; Yang, I. V.; Barthel, L.; Henson, P. M.; Janssen, W. J.; Schwartz, D. A.; Boucher, R. C.; Dickey, B. F. und Evans, C. M. (2014): Muc5b is required for airway defence. In: *Nature*, 505, S. 412–416.
<https://doi.org/10.1038/nature12807>.

Stemcell Technologies (2021): PneumaCult™-ALI Medium. In:
https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/10000003440-PIS_02.pdf (Stand: 26.09.2023).

Stewart, C. E.; Torr, E.; Mohd Jamili, N. H.; Bosquillon, C. und Sayers, I. (2012): Evaluation of differentiated human bronchial epithelial cell culture systems for asthma research. In: *Journal of Allergy*, Hindawi Publishing Corporation, S. 1–11.
doi:10.1155/2012/943982.

Sun, Q. G.; An, X. D.; Xie, P.; Jiang, B.; Tian, J. X.; Yang, Q.; Li, X. Y.; Luo, M.; Liu, P.; Zhao, S. H.; Duan, L. Y.; Lang, S. P.; Fan, A.; Luo, P. C.; Lian, F. M.; Huang, X. D. und Tong, X. L. (2021): Traditional Chinese Medicine Decoctions Significantly Reduce the Mortality in Severe and Critically Ill Patients with COVID-19: A Retrospective Cohort Study. In: *The American Journal of Chinese Medicine*, 49(5), S. 1063-1092.
doi:10.1142/S0192415X21500518.

Thermo Scientific (2016): NanoDrop One. User Guide. Madison: Thermo Fisher Scientific Inc. In: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-Help-UG-en.pdf>. (Stand: 26.09.2023).

Tian, J.; Yan, S.; Wang, H.; Zhang, Y.; Zheng, Y.; Wu, H.; Li, X.; Gao, Z.; Ai, Y.; Gou, X.; Zhang, L.; He, L.; Lian, F.; Liu, B. und Tong, X. (2020): Hanshiyi Formula, a medicine for SARS-CoV2 infection in China, reduced the proportion of mild and moderate COVID-19 patients turning to severe status: A cohort study. In: *Pharmacological Research*, Elsevier BV, 161, S.105-127. doi:10.1016/j.phrs.2020.105127.

Tiefenbacher, S.; Zhou, Y.; Wang, W.; Li, M.; Yao, C.; Tong, X. und Bauer, R. (2022): Development of HPTLC and UPLC methods for quality control of hanshiyi Formula. In: *Planta Medica*, Thieme Medical Publishers, 88(15), S. 1. doi:10.1055/s-0042-1759060.

Whitsett, J. A. (2018): Airway epithelial differentiation and mucociliary clearance. In: *Annals of the American Thoracic Society*, 15(3), S.143–148. doi:10.1513/annalsats.201802-128aw.

Xiong, X.; Wang, P.; Su, K.; Cho, W. C. und Xing, Y. (2020): Chinese Herbal Medicine for Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta-analysis. In: *Pharmacological Research*, Elsevier BV, 160, S. 1-17. doi:10.1016/j.phrs.2020.105056.

Yao, C.; Wei, W.; Zhang, J.; Bi, Q.; Li, J.; Khan, I.; Bauer, R. und Guo, D. (2022): Traditional Chinese medicines against COVID-19: A global overview. In: *World journal of traditional Chinese medicine*, 8(3), S.279-313. doi:10.4103/2311-8571.353502.

Yin, W.; Cao, W.; Zhou, G.; Wang, L.; Sun, J.; Zhu, A.; Wang, Z.; Zhou, Y.; Liu, X.; Li, Y.; Zhong, N.; Zhao, J.; Liu, L. und Ran, P. (2021): Analysis of pathological changes in the epithelium in COVID-19 patient airways. In: *ERJ Open Research*, European Respiratory Society, 7(2), S. 1-4. doi:10.1183/23120541.00690-2020.

Zhang, X.; Lv, L.; Zhong, Y.; Xie, L.; Xu, Q.; ZZou, X.; Ding, Y.; Tian, J.; Fan, J.; Fan, H.; Yang, Y. und Ye, X. (2021): Efficacy and safety of Xiyanping injection in the treatment of COVID-19: A multicenter, prospective, open-label and randomized controlled trial. *Pythother Research*, 35(8), S. 4401-4410. doi: 10.1002/ptr.7141.

Anhang

Herstellung von saurem Hämalan nach Mayer lt. Romeis

Auszug aus dem Organisationshandbuch des Lehrstuhls für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der medizinischen Universität Graz - Gottfried Schatz Forschungszentrum.

erstellt von: Peter Schönbacher am 18.02.2010

überarbeitet von: Monika Sundl am 10.05.2023

Stand: 26.06.2023

Seite 1/1

1. Tag

1g Hämatoxylin wird im Waagenraum (J/05/25) vorsichtig eingewogen und in ca. 950 ml A. dest. gelöst (Waagen und Umfeld sorgfältig zu reinigen).

0,2g NaJ_3 (Natriumjodat) und 50g $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Kaliumaluminiumsulfat, kurz Kalialan) wird zugegeben. Die Salze sind durch mehrmaliges Schütteln in Lösung zu bringen und sollten über Nacht weiter gerührt werden, wobei die Lösung eine blauviolette Farbe annimmt.

2. Tag

50g $\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$ (Chloralhydrat giftig) und 1g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (krist. Citronensäure) werden am 2. Tag zugegeben, die Farbe der Lösung schlägt nun in rotviolett um. Die Lösung sollte erneut gut für mindestens eine Stunde gerührt werden. Das Chloralhydrat muss im Giftwaagenraum (J/05/27) eingewogen werden. Die Farblösung wird in dunklem Glas aufbewahrt, sie ist lange Zeit haltbar.

Chemikalien

Natriumjodat, Kaliumaluminiumsulfat, Citronensäure und Hämatoxylin sind im Waagenraum (J/05/25) im Chemikalienschrank zu finden.

Chloralhydrat befindet sich im Chemikalienschrank des Giftwaagenraumes (J/05/27), nach Einwiegen dieses Stoffes ist die genaue Menge des verbrauchten Giftes in die vorliegende Karteikarte einzutragen.