

Aus dem
Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Untersuchungen zum Pathomechanismus der
Organophosphat-induzierten Nierenschädigung in vitro**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Christian Thomas Höffner

aus
Dingolfing

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Franz Worek
Zweites Gutachten: Prof. Dr. Alexander Dietrich
Drittes Gutachten: Prof. Dr. Holger Schmid

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2025

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Höffner, Christian

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Untersuchungen zum Pathomechanismus der Organophosphat-induzierten Nierenschädigung in vitro

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 05.08.2025

Christian Höffner

Inhaltsverzeichnis

Affidavit.....	3
Inhaltsverzeichnis	4
Publikationsliste	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	7
1.1 Toxizität von Organophosphaten	7
1.2 Precision-cut Tissue Slices	13
1.3 Bisherige Verwendung von Precision-cut Kidney Slices und Einordnung der Arbeit in den aktuellen Stand der Forschung.....	15
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 Paper I	17
2.1 Beitrag zu Paper I	17
2.2 Optimization of long-term incubation of precision-cut kidney slices	18
3 Paper II	19
3.1 Beitrag zu Paper II	19
3.2 Effects of organophosphates on precision-cut kidney slices.....	20
4 Zusammenfassung	21
5 Abstract (English):	24
Literaturverzeichnis	26
Danksagung	37

Publikationsliste

Im Rahmen der kumulativen Dissertation erfolgten zwei Publikationen. Da diese maßgeblich aufeinander aufbauen, werden diese im Folgenden nicht chronologisch, sondern thematisch sortiert. Aus urheberrechtlichen Gründen können die bereits in *Toxicology Mechanisms and Methods* veröffentlichten Teile nicht erneut im Rahmen dieser Dissertation veröffentlicht werden. Gemäß der Verwendungsbestimmungen von Taylor & Francis wurden die Veröffentlichungen der Prüfungskommission zur Verfügung gestellt.

Paper I:

Hoeffner, Christian; Worek, Franz; Horn, Gabriele; Amend, Niko (2024). Optimization of long-term incubation of precision-cut kidney slices. In: *Toxicology Mechanisms and Methods*, 35(1), 11–18. <https://doi.org/10.1080/15376516.2024.2382797>

Paper II:

Hoeffner, Christian; Worek, Franz; Amend, Niko (2024). Effects of organophosphates on precision-cut kidney slices. In: *Toxicology Mechanisms and Methods*, 34(8), 855–866. <https://doi.org/10.1080/15376516.2024.2356184>

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
BChE	Butyrylcholinesterase
BCA	Bicinchoninsäure
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
LDH	Lactatdehydrogenase
PCKS	Precision-cut Kidney Slice
PCTS	Precision-cut Tissue Slice

1 Einleitung

1.1 Toxizität von Organophosphaten

Organophosphate gehören als irreversible Hemmer der AChE zu den Substanzen mit höchster Toxizität für Säugetiere (Marrs 1993). Alle Vertreter der heterogenen Gruppe der Organophosphate haben die Gemeinsamkeit eines zentralen Phosphor-Atoms. Chemisch handelt es sich dabei um organische Phosphorsäureester (Alkylphosphate), wobei durch kovalente Bindung verschiedenster Liganden (Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff, Kohlenstoff-Ketten etc.) eine große Vielfalt von unterschiedlichen Toxinen entsteht. Chemisch basiert die Hemmung der AChE auf einem nukleophilen Angriff eines reaktiven Serin-Rests des Enzyms und einer resultierenden kovalenten Bindung an das zentrale Phosphor-Atom des Organophosphats. Anschließend spalten sich, je nach Substanz, unterschiedliche chemische Gruppen ab und der dabei entstehende Organophosphat-Enzym-Komplex kann so nicht mehr ausgeschüttetes ACh im synaptischen Spalt abbauen. Ein Überangebot des Neurotransmitters führt dann zu einer Dauer- bzw. Überstimulation nikotinerger und muskarinerger Rezeptoren (Chambers und Oppenheimer 2004; Delfino et al. 2009).

Die Geschichte der Organophosphate reicht zurück bis in das 19. Jahrhundert. Wem oder wo die erste Synthese gelang, ist dabei unklar. Häufig wird diese dem französischen Chemiker Philippe de Clermont (1854) zugeschrieben, wobei andere Quellen seinen Landsmann Jean Pierre Boudet (1801), den abermals französischen Chemiker Jean Louis Lassaigne (1820) oder den Schweden Franz Anton Voegeli (1848) als Entdecker von Phosphorsäureestern diskutieren (Holmstedt 1959; Holmstedt 1963; Chambers 1992; Petroianu 2009). Inwiefern dabei chemische Eigenschaften oder genauer die toxischen Eigenschaften der Stoffgruppe bekannt waren, ist zumindest anzuzweifeln (Petroianu 2010). Die Entwicklung von Organophosphaten als Pestizide wird zumeist Gerhard Schrader zugeschrieben, der nach Alternativen zu den in den 1930er Jahren gebräuchlichen Salzen der Arsensäure oder Pyrethrinen, einem Isolat bestimmter Pflanzenarten gesucht haben soll. Der deutsche Chemiker habe dabei tausende, häufig sehr instabile Organophosphate synthetisiert (Holmstedt 1963; Costa et al. 1987). Erst mit der erstmaligen Synthese von Parathion (E 605) im Jahr 1944 gelang es ein wirkungsvolles und ausreichend stabiles Organophosphat herzustellen, welches nach dem zweiten Weltkrieg

Anwendung in der Agrarwirtschaft fand (Costa 2018). Bei Parathion handelt es sich, so wie bei vielen als Pestizid genutzten Organophosphaten, um einen Ester der Thiophosphorsäure. Diese zeichnen sich durch eine Thiophosphatbindung ($P=S$) aus, welche erst nach metabolischer Aktivierung ihre volle Enzym-inhibitorische Wirkung entwickelt. Beim dabei über mehrere Zwischenstufen entstehenden Oxon Paraoxon (E 600) handelt es sich dann um einen potenteren Inhibitor der AChE, der über eine Phosphorylbindung ($P=O$) verfügt (Jokanović 2001; Delfino et al. 2009). Basierend auf dieser Entdeckung potenterer Inhibitoren erfolgte in den 1940er Jahren zudem die Entwicklung verschiedener chemischer Kampfstoffe (Sarin, Soman, Tabun etc.) (Holmstedt 1963; Delfino et al. 2009). Obwohl erste Hinweise auf eine cholinerge Wirkung von Organophosphaten bereits in den 1920er und 1930er Jahren nachgewiesen wurden, konnte eine Hemmung der AChE als Ursache der Toxizität erst 1949 festgestellt werden (DuBois und Doull 1949; Costa 2018). Ihren Höhepunkt erreichten Organophosphate nach dem Verbot alternativer Organochlorpestiziden in den 1970er Jahren. Wenngleich die Prävalenz von Organophosphat-Verbindungen seitdem deutlich zurückgegangen ist, finden sie auch heute aufgrund geringer Anschaffungskosten global ihre Verwendung in der Landwirtschaft (Costa 2018). Seit 2001 gilt in der Europäischen Union die Kommissionsentscheidung zur Aufhebung der Zulassung Parathion-haltiger Pflanzenschutzmittel.

Trotz dieser Entwicklungen sind Organophosphat-Vergiftungen auch heute noch für etwa 100 000 Todesfälle pro Jahr verantwortlich. Weiter werden weltweit etwa 20 % aller Suizide mit Organophosphat-haltigen Pestiziden verübt (Mew et al. 2017). Auch in der Kriminalistik spielen sie eine Rolle. So wurde beispielsweise der erste nachweisbare Mord mit Parathion 1952 von der deutschen Serienmörderin Christa Lehmann an ihrem Ehemann Karl Franz Lehmann verübt. Während Vergiftungen mit dem Pflanzenschutzmittel zuvor auf Fahrlässigkeit zurückzuführen waren, erreichte Parathion daraufhin als „Wormser Gift“ Bekanntheit. Gerade in den 1950er Jahren kam es zu mehreren Morden und Selbsttötungen (Klee 1977; Landin 2020).

Der Großteil der Organophosphat-Vergiftungen ereignet sich aus Versehen, z.B. im Rahmen der Produktion, der Verwendung in der Landwirtschaft oder bei Anwohnern in der Nähe von landwirtschaftlichen Flächen (Georgiadis et al. 2018). Basierend auf ihrem wirtschaftlich großen Anteil des primären Sektors, kommt es gerade in Entwicklungsländern, insbesondere in Südasien und Südamerika, zu einer Vielzahl

von Intoxikationsfällen. Erschwerend kommt hinzu, dass gerade in diesen Ländern ausreichende Maßnahmen zum Arbeitsschutz und die medizinische Versorgung nicht flächendeckend gegeben sind (Jeyaratnam 1990; Marrs 1993; Pearson et al. 2017).

Die klinische Präsentation von Intoxikationen mit Organophosphaten lässt sich generell in drei chronologische Phasen einteilen.

Phase 1, die cholinerge Krise oder das akute cholinerge Syndrom, folgt dosis- und substanzabhängig unmittelbar auf die Ingestion oder anderweitige Aufnahme. Pathogenetisch fußt das akute cholinerge Syndrom auf der Akkumulation von ACh im synaptischen Spalt (Hobbiger 1951; Koelle 1992; Marrs 1993; Chambers und Oppenheimer 2004). Resultierende Symptome können anhand der betroffenen Rezeptorfamilien in nikotinerg, muskarinisch und zentralnervös unterteilt werden. Durch Überaktivierung von nikotinergen ACh-Rezeptoren, welche vorwiegend an der motorischen Endplatte (n1) im Rahmen der neuromuskulären Übertragung vorkommen, kommt es zu Muskelschwäche, Faszikulationen, Muskelkrämpfen, aber auch zu Lähmungserscheinungen. Durch Affektion von neuronalen nikotinergen Rezeptoren (n2), welche sich vor allem im vegetativen Nervensystem finden lassen kommt es zudem zu Tachykardie und arterieller Hypertension (Marrs 1993; Lee 2003). Muskarinische ACh-Rezeptoren unterteilen sich in insgesamt 5 Subtypen, welche in Unterschiedlichen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert werden. Sie sind für einen großen Teil des parasympathischen Anteils des autonomen Nervensystems verantwortlich. Die Funktion verschiedener Drüsen werden durch die Subtypen m1 und m3 beeinflusst (Jain 2016). Im Falle einer Intoxikation sind daher Rhinorrhoe, verstärktes Schwitzen, Hyperlacrimation und -salivation mögliche Folgen (Marrs 1993; Moser 1995). Die Subtypen m2 und m3 eint ihr diffuses Vorkommen in glatter Muskulatur (Shapiro et al. 1989; Fetscher et al. 2002). Zu den m2- und m3-vermittelten Symptomen zählen Miosis, Akkommodationsstörungen, Bronchospasmen, Lungenödem, abdominale Krämpfe mit Erbrechen, Diarrhoe und unbeabsichtigter Urinabgang, aber auch Bradykardie (Marrs 1993; Weissmann-Brenner et al. 2002). Nicht zuletzt durch das Vorkommen der Subtypen m1, m4 und m5 in verschiedenen Bereichen des Gehirns zeigen viele intoxikierte Patienten zentralnervöse Symptome (Jain 2016). Diese reichen von Kopfschmerzen, einem zentralen Tremor oder Konzentrationsstörungen, über Angstzustände oder Unruhe, bis zu symptomatischen Anfällen, zentraler Atemdepression und quantitativen und qualitativen

Bewusstseinsstörungen. In schweren Fällen tritt der Tod in der Regel bereits im Rahmen des akuten cholinergem Syndroms auf. Ursache ist dabei häufig eine Kombination aus zentraler Atemdepression und peripherer Zwerchfelllähmung (Marrs 1993; Eddleston 2019).

Hinweise auf Phase 2, das intermediäre Syndrom, wurden das erste Mal 1973 bei Patienten und Patientinnen, die das Organophosphat Malathion zumeist in suizidaler Absicht eingenommen hatten gefunden. Nach initialer Besserung kam es dabei ein bis zwei Tage nach dem akuten cholinergen Syndrom wiederholt zu Todesfällen (Nalin 1973). Auch wenn die genauen Definitionen des intermediären Syndroms in verschiedenen Studien nicht immer deckungsgleich waren, handelt es sich generell um einen oft inkompletten Symptomkomplex aus proximaler Extremitätenschwäche, Schwäche der Atem- und Atemhilfsmuskulatur und verschiedenen Funktionseinschränkungen von motorischen Hirnnervenanteilen. Weiter wurden ein vermindertes Reflexniveau und eine besondere Häufung von Schwäche der Nackenmuskulatur bei Betroffenen beschrieben (Karalliedde et al. 2006; Yang und Deng 2007). Die Symptome, welche klinisch vor allem durch Atemnot und resultierender Zyanose auffallen, setzen in der Regel 24 – 96 Stunden nach der Exposition ein (Senanayake und Karalliedde 1987; Marrs 1993; Karalliedde et al. 2006). Auch wenn es nicht möglich ist das Auftreten eines intermediären Syndroms bestimmten Vertretern der Organophosphate zuzuordnen, scheint es dennoch Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens zu geben. Häufungen fanden sich hierbei für Fenthion, Monocrotophos und Dimethoat, wessen Restbestände noch bis 2020 in Deutschland als Schneckenkorn eingesetzt werden durften (Senanayake und Karalliedde 1987). Eine weitere Besonderheit der zweiten Phase stellt die Regeneration der betroffenen Muskelgruppen dar. Bei überlebenden Patienten bessern sich demnach in der Regel zunächst die von Hirnnerven innervierten Muskelgruppen. Anschließend kommt es zu einer Besserung der an der Respiration beteiligten Muskelgruppen, was häufig ein Weaning mit Extubation ermöglicht. Die proximalen Extremitätenparesen folgen der Atemmuskulatur. Erst spät kommt es zu einer Funktionsverbesserung der häufig schwer betroffenen Nackenflexoren (Senanayake und Karalliedde 1987). Epidemiologische Angaben zum intermediären Syndrom sind nicht zuletzt aufgrund der uneinheitlichen Definition schwer zu treffen. Je nach Studie, welche häufig nur über überschaubare Patientenzahlen verfügen, schwankt die Inzidenz eines intermediären Syndroms bei Exponierten, welche ein

akutes cholinerges Syndrom erlitten haben zwischen knapp 10 % und über 80 %. Auch Angaben zur Mortalität schwanken zwischen 0 % und 50 % deutlich (Senanayake und Karalliedde 1987; He et al. 1998; Avasthi und Singh 2000; Khan et al. 2001; Lee und Tai 2001; Dandapani et al. 2003; John et al. 2003; Güven et al. 2004). In intensivmedizinischer Betreuung und wo nötig unter Beatmung halten die Symptome des intermediären Syndroms für bis zu 18 Tage an (Senanayake und Karalliedde 1987; Yang und Deng 2007).

Phase 3 der Intoxikation stellen eine Reihe von Organophosphat-induzierten Spätfolgen dar. Bereits 1967, also rund 10 Jahre nach der Entdeckung des Wirkmechanismus von Organophosphaten, wurden degenerative Veränderungen der neuromuskulären Verbindung, sowie feinstruktureller Bestandteile der Muskelfaser mit einer zurückliegenden Exposition mit einem AChE-Inhibitor in Verbindung gebracht (Preusser 1967). Auch kardiotoxische Effekte von Organophosphaten wurden in der Vergangenheit diskutiert (Singer et al. 1987). Die wohl am besten untersuchte Manifestation der dritten Phase findet sich in der Organophosphat-induzierten verzögerten Neuropathie (Senanayake und Karalliedde 1987; Marrs 1993). Obwohl die Anzahl der jährlichen Veröffentlichungen zum Thema besonders in den 1980er und 1990er Jahren gestiegen ist, finden sich die ersten größeren Fallzahlen bereits 1930. Zu Zeiten der amerikanischen Prohibition entwickelten schätzungsweise 50 000 US-Amerikaner etwa 10 – 14 Tage nach dem Genuss eines ingwerhaltigen Extrakts beinbetonte Paresen. Bereits vor 1920 war „Jake“ als Importprodukt aus Mittel- und Lateinamerika ein beliebtes alkoholhaltiges Getränk im Süden und Mittleren Westen der USA. Nach Einführung der Prohibition 1920 traten jedoch Richtlinien in Kraft, welche die Einfuhr von „Jake“ als Getränk verhindern sollten. Um diese Gesetze zu umgehen, bediente man sich nun einer kleinen List. Die Hersteller erhöhten die Konzentration von „Jake“, um so nicht mehr als Getränk, sondern als Oleoresin (öliges Extrakt, welches durch Lösungsmittlextraktion aus Samen, Wurzeln, Blättern oder Früchten gewonnen wird) zu gelten. Nachdem es von den Prohibitionsbehörden nun als „nicht trinkbar“ eingestuft wurde, erfolgte der Import in die USA, wo es wiederum als Mittel gegen Blähungen, Schmerzen oder Schnupfen, aber auch als Zusatz mit bis zu 80 % Ethanol-Gehalt in verschiedenen Getränken Verwendung fand. In einem Versuch die Herstellungskosten von „Jake“ zu verringern, ersetzten verschiedene Hersteller Teile des Ethanols durch Lindol, welches damals in Lacken enthalten war und mit teils hohen Dosen des Organophosphats Trikresylphosphat verunreinigt war

(Aring 1942; Morgan und Penovich 1978). Während sich anscheinend einige der Patienten erholen konnten, litten auch noch Jahre nach der Exposition ein Großteil der Betroffenen am „Jake Leg“, dem „Jake Walk“ oder der „Jamaican Ginger Paralysis“ (Morgan und Penovich 1978). Insgesamt handelt es sich bei der Neuropathie durch Organophosphate um eine verzögerte sensomotorische, häufig beinbetonte Polyneuropathie. Diese wird durch einen axonalen Schaden mit sekundärer Demyelinisierung hervorgerufen und zeigt keinen Zusammenhang mit der enzymhemmenden Wirkung von Organophosphaten, welche gerade in Phase 1 der Vergiftung eine Rolle spielt (Marrs 1993; Lotti und Moretto 2005). Auch in spinalen Motoneuronzellen und im Bereich der motorischen Endplatte kann es zu Funktionsbeeinträchtigungen kommen (Aring 1942; Senanayake und Karalliedde 1987).

Neben den besprochenen verzögerten Effekten von Organophosphaten im menschlichen Körper, wurden bereits eine Reihe anderer Phänomene beschrieben, welche nicht mit der Hemmung der AChE als Mechanismus der Toxizität begründet werden können. Diese reichen von verschiedenen psychiatrischen Beschwerden, über anhaltende Krampfgeschehen, karzinogene Eigenschaften, Retinopathien oder Veränderungen in verschiedenen Hormonschleifen, bis hin zu Beeinträchtigungen im Immunsystem (Lerro et al. 2015; Pham et al. 2016; Chuang et al. 2019; Yang et al. 2019; Bernal-González et al. 2023).

Auch nephrotoxische Effekte von Organophosphaten wurden bereits in den 1980er und 1990er Jahren beschrieben (Wedin 1992). Seitdem erschienen diverse Fallberichte und Studien zum Thema. Dabei zeigte sich unter anderem, dass Organophosphat-intoxikierte Patienten an einem knapp 6-fach erhöhtem Risiko einer akuten Nierenschädigung leiden (Lee et al. 2015). Auch wenn eine Organophosphat-assoziierte Nierenschädigung insgesamt als relativ seltene und unter Behandlung möglicherweise reversible Komplikation angesehen wird, birgt sie dennoch eine erhöhte Morbidität und Mortalität für Betroffene und wirkt sich auch auf das spätere Outcome aus (Abend et al. 1994; Cavari et al. 2013). Darüber hinaus existieren auch Assoziationen zwischen Organophosphat-Exposition und chronischen Nierenschäden. So zeigte sich beispielsweise, dass zwischen 1999 und 2000 mindestens 74 % aller US-amerikanischer Kinder zwischen 6 und 11 Jahren nachweisbar erhöhte Level von Organophosphaten oder deren Metaboliten im Urin

aufwiesen (Barr et al. 2004). Diese, meist durch die Nahrung aufgenommenen Rückstände, konnten weiter mit subklinischen Verschlechterungen bei Kindern mit bestehender chronischer Nierenschädigung in Verbindung gebracht werden und werden von anderen Autoren sogar als Risikofaktoren für die Entwicklung einer chronischen Nierenfunktionsstörung gehandelt (Pearce und Caplin 2019; Jacobson et al. 2021). Trotz einiger Versuche ist der Pathomechanismus der Nierenschädigung bis heute weitgehend ungeklärt. Zu den möglichen Erklärungsansätzen zählen oxidativer Stress durch reaktive Sauerstoffspezies, direkte Zytotoxizität, durch regionale Hypovolämie und Myoglobinurie vermittelter parenchymaler Schaden, Bindung an Serum Albumin mit Interaktion des entstehenden Komplexes mit dem Nierengewebe, Interaktionen mit der Glykokalix des Nierenendothels oder verschiedene immunologische Mechanismen (Cavari et al. 2013; Zafar et al. 2017; Georgiadis et al. 2018; Kaya et al. 2018; Sobolev et al. 2022). Bedauerlicherweise haben viele verschiedene Ansätze gemeint, dass sie oft mehr neue Fragen aufwerfen, als Antworten gefunden werden können (Sobolev et al. 2022). Durch ihre physiologische Funktion und durch die kontinuierliche Versorgung mit 15 – 20 % des Herzzeitvolumens sind die Nieren generell anfällig für verschiedene Exo- und Endotoxine (Wedin 1992). Es liegt daher auch im Bereich des Möglichen, dass andere Inhaltsstoffe von handelsüblichen Pestiziden oder die in der Behandlung eingesetzten Antidote wie Atropin oder Oxime eine Rolle bei der nephrotoxischen Wirkung spielen. In der Regel werden Oxime intravenös oder intramuskulär appliziert. Dabei werden etwa 80 % der Dosis unmetabolisiert nach einer Halbwertszeit von wenigen Stunden wieder über den Urin ausgeschieden (Sidell et al. 1972; Bentur et al. 1993; Clement et al. 1995; Worek et al. 2020; Handl et al. 2021). Belastbare Untersuchungen zur in vivo Nephrotoxizität von Oximen gibt es derzeit noch keine.

1.2 Precision-cut Tissue Slices

Bei PCTS handelt es sich um ein Organmodell, bei dem entnommene Organe oder Biopsien mittels eines Slice-Verfahrens in dünne Scheiben geschnitten werden, um anschließend über unterschiedliche Zeiträume inkubiert zu werden. Sie finden regelhaft Anwendung in verschiedenen Feldern der medizinischen und insbesondere der pharmakologischen und toxikologischen Forschung (Othman et al. 2020; Dimou et al. 2022; Tigges et al. 2022). Gründe dafür sind zunächst, dass sie im Sinne des 3 R-

Prinzips bei der Reduktion von benötigten Versuchstieren helfen, aber auch die heterogene Zellzusammensetzung mit allen Zell-Zell Interaktionen und gewebsarchitektonischen Eigenschaften behalten und im Gegensatz zu Kulturen nicht aus Praktikabilitätsgründen auf eine überschaubare Anzahl an Zelllinien beschränkt sind (Russel und Burch 1959; Parrish et al. 1995; Liberati et al. 2010).

Die Geschichte der PCTS begann in Berlin. Der spätere Nobelpreisträger Otto Heinrich Warburg untersuchte 1924 den Stoffwechsel von Tumorgewebe der Ratte. Im Versuch den Tumor zu entfernen, jedoch weiter metabolisch intakt zu halten, entschloss er sich Scheiben mit einer Fläche von etwa $0,5 \text{ cm}^2$ und einer Dicke von etwa $0,3 \text{ mm}$ mit einer Rasierklinge vom Tumor abzuschneiden. Die spießte er in kleinen, mit Ringerlösung gefüllten Behältern auf und inkubierte sie bei $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ unter ständiger Bewegung in einem Wasserbad (Warburg und Minami 1923). Erst 10 Jahre später griff der abermals deutsche Hans Adolfs Krebs das Konzept des „Gewebschnittverfahren von O. Warburg“ im Rahmen seiner Habilitationsschrift auf, in der er sich mit dem Stoffwechsel von Aminosäuren in verschiedenen Geweben der Ratte beschäftigte. Methodisch änderte sich hierbei kaum etwas (Krebs 1933). Und auch in den Folgejahren fanden PCTS aufgrund von schlechter Viabilität, der aufwendigen Herstellung und eingeschränkter Reproduzierbarkeit nur wenig Anklang. Ab den 1960er Jahren fanden PCTS aus den Gehirnen von Meerschweinchen oder Ratten jedoch Anwendung im Bereich der Neurophysiologie. Dabei konnten verschiedene Autoren die Schnitte erstmals über mehrere Stunden für ihre Versuche verwenden (Yamamoto und McIlwain 1966; Richards und Sercombe 1968; Pickles und Simmonds 1976). Ihren wissenschaftlichen Durchbruch feierten PCTS jedoch erst mit der Einführung des Schlittenmikrotoms (Krumdieck Tissue Slicer). Durch dieses Gerät, welches in seiner grundlegenden Funktionsweise nun seit 1980 im Einsatz ist, war es möglich reproduzierbar Schnitte mit gleicher Dicke in deutlich geringerer Zeit herzustellen (Krumdieck et al. 1980). In den Folgejahren wurden PCTS von einer Vielzahl von Geweben (unter anderem Hirn, Lunge, Herz, verschiedene Teil des Verdauungstrakts und Milz) unterschiedlichster Spezies und später auch aus menschlichen Proben gewonnen (Freeman und O'Neil 1984; Pai und Ravindranath 1991; Vickers et al. 1993; Hoffmann et al. 1995; Parrish et al. 1995; De Kanter et al. 2002; Parrish et al. 2002).

1.3 Bisherige Verwendung von Precision-Cut Kidney Slices

Auch PCTS aus Nierengewebe wurden erstmals in den 1980er Jahren, nach der Einführung des Schlitten- und später des Vibrationsmikrotoms für toxikologische und physiologische Studien verwendet (Rose 1986; Urban und van de Kar 1986). PCKS stellen aufgrund der hohen Densität des Nierengewebes und der daraus resultierenden schwierigen Inkubationsbedingungen bis heute eine große Herausforderung dar. Gerade um Langzeit-Effekte von Xenobiotika zu untersuchen sind stabile Viabilitätslevel und eine möglichst lange Beobachtungszeit von entscheidender Bedeutung. Wenngleich PCKS aufgrund der guten Übertragbarkeit der in vitro Ergebnisse auf die physiologische in vivo Situation von vielen Autoren für unterschiedlichste Studien genutzt werden, unterscheiden sich die Ansätze zur Inkubation jedoch deutlich (Liu et al. 2017).

2013 zeigte eine französische Forschungsgruppe, dass Ratten-PCKS, welche unter einer Atmosphäre mit 40 % Sauerstoff in einer Mischung aus mit Glucose versetztem Williams Medium E und Gentamicin, für 24 – 48 Stunden metabolisch aktiv bleiben (Baverel et al. 2013). Ein Erhöhen des Sauerstoffanteils auf 80 % ermöglichte zwei Jahre später diese Inkubationszeit auf 72 Stunden zu verlängern (Poosti et al. 2015). Bei Untersuchungen zu fibrotischen Veränderungen der Niere erreichte eine dänische Forschungsgruppe 2016 unter Verwendung von Williams Medium E, Penicillin/Streptomycin und einem Antimykotikum etwa 60 % Viabilität nach 5 Tagen. Dabei wurde der Sauerstoffanteil während der Inkubation weiter auf 95 % erhöht (Genovese et al. 2016). Ein etwas anderer Ansatz mit demselben Medium verfolgte 2020 eine Forschungsgruppe aus den Niederlanden. Diese konnte bei PCKS von Mäusen und von menschlichen Nephrektomie-Patienten, unter dem Einsatz von Ciprofloxacin zur antibiotischen Abdeckung und einem Sauerstoffanteil von 80 %, eine stabil hohe metabolische Aktivität für 48 Stunden beobachten (Bigaeva et al. 2020). Vergleicht man diese Inkubation nun mit PCTS aus anderen Geweben, wie beispielsweise der Lunge, welche für mehrere Wochen konserviert werden können und deren Inkubation mit deutlich geringerem Sauerstoff-Aufwand gelingt, so zeigt sich ein enormes Verbesserungspotential bei der Inkubation von PCKS (Tigges et al. 2021).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war einen Beitrag zur Aufklärung des Pathomechanismus der Organophosphat-assoziierten Nierenschädigung zu leisten, um in möglichen Folgestudien mögliche therapeutische Ansätze entwickeln zu können.

In einem ersten Schritt sollten PCKS aus Rattennieren als Modell etabliert und optimiert werden, sodass die Wirkung verschiedener Xenobiotika oder Noxen über mehrere Tage beobachtet werden können. Um möglichst detaillierte und multimodale Beobachtungen zu ermöglichen, war die Etablierung verschiedener Messmethodiken und -parameter ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

In einem zweiten Schritt sollten dann in unterschiedlichen Messreihen die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von ausgewählten Organophosphaten auf das Nierengewebe untersucht werden.

2 Paper I

Die erste Veröffentlichung der Arbeit „Optimization of long-term incubation of precision-cut kidney slices“ beschäftigt sich zentral mit dem Vergleich verschiedener Inkubationsbedingungen für PCKS über mehrere Tage. Zur Viabilitätsmessung über Zeit wurden das resazurin-basierte alamarBlue Cell Viability Testset, Gesamtproteinbestimmung mittels BCA, sowie Bestimmung von intra- und extrazellulärem LDH mittels Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} etabliert. Zusätzlich zu der quantitativen Viabilitätsmessung wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen von PCKS, welche mit einem life/dead staining eingefärbt wurden angefertigt.

2.1 Beitrag zu Paper I

Hoeffner, Christian; Worek, Franz; Horn, Gabriele; Amend, Niko (2024). Optimization of long-term incubation of precision-cut kidney slices. In: *Toxicology Mechanisms and Methods*, 35(1), 11–18. <https://doi.org/10.1080/15376516.2024.2382797>

Christian Höffner:

- Literaturrecherche
- Studiendesign und Methodenauswahl
- Präparation und Inkubation von PCKS
- Durchführen aller veröffentlichter Experimente und Messreihen
- Analyse der Daten mit Visualisierung und statistischer Auswertung mittels GraphPad Prism und Microsoft Excel
- Verfassen des ursprünglichen Entwurfs, sowie weiterer Entwürfe des Papers
- Bearbeitung des Reviews

Prof. Dr. med. Franz Worek:

- Unterstützen der Literaturrecherche
- Unterstützen des Studiendesigns
- Korrektur der verschiedenen Entwürfe der Veröffentlichung
- Supervision und wissenschaftliche Betreuung

Dr. med. Dr. med. dent. Gabriele Horn:

- Unterstützen des Studiendesigns
- Korrektur der verschiedenen Entwürfe der Veröffentlichung

Dr. med. Niko Amend:

- Korrektur der verschiedenen Entwürfe der Veröffentlichung
- Administration des Projekts

2.2 Optimization of long-term incubation of precision-cut kidney slices

Hoeffner, Christian; Worek, Franz; Horn, Gabriele; Amend, Niko (2024). Optimization of long-term incubation of precision-cut kidney slices. In: *Toxicology Mechanisms and Methods*, 35(1), 11–18. <https://doi.org/10.1080/15376516.2024.2382797>

3 Paper II

Paper II „Effects of organophosphates on precision-cut kidney slices“ fußt auf der in Paper I etablierten Methodik. PCKS wurden in verschiedenen Konzentrationen Malaoxon, Paraoxon, Malathion und Parathion für bis zu 10 Tage inkubiert. Dabei wurden täglich qualitativ und quantitativ metabolische Aktivität, Gesamtproteingehalt und Membranpermeabilität bestimmt. Darüber hinaus beschäftigt sich Paper II mit der enzymatischen Aktivität der AChE und BChE im Nierengewebe und der entsprechenden Hemmung durch Organophosphate. Mittels mathematischer Umformung und eines adaptierten Ellmann Assays wurde zusätzlich die Organophosphat-Konzentration im Überstand im Verlauf der Inkubation bestimmt.

3.1 Beitrag zu Paper II

Christian Höffner:

- Literaturrecherche
- Studiendesign und Methodenauswahl im Bereich der photometrischen Cholinesterase-Aktivitäts-Messungen, Viabilitätsmessungen, Messungen der Zytotoxizität und Konfokalmikroskopie
- Präparation und Inkubation von PCKS
- Durchführen aller veröffentlichter Experimente und Messreihen
- Analyse der Daten mit Visualisierung und statistischer Auswertung mittels GraphPad Prism und Microsoft Excel
- Verfassen des ursprünglichen Entwurfs, sowie weiterer Entwürfe des Papers
- Bearbeitung des Reviews

Prof. Dr. med. Franz Worek:

- Unterstützen der Literaturrecherche
- Unterstützung des Studiendesign insbesondere im Bereich der photometrischen Cholinesterase-Aktivitäts-Messungen
- Korrektur der verschiedenen Entwürfe der Veröffentlichung
- Supervision und wissenschaftliche Betreuung

Dr. med. Niko Amend:

- Korrektur der verschiedenen Entwürfe der Veröffentlichung
- Administration des Projekts

3.2 Effects of organophosphates on precision-cut kidney slices

Hoeffner, Christian; Worek, Franz; Amend, Niko (2024). Effects of organophosphates on precision-cut kidney slices. In: *Toxicology Mechanisms and Methods*, 34(8), 855–866. <https://doi.org/10.1080/15376516.2024.2356184>

4 Zusammenfassung

Im Rahmen unserer ersten Publikation zeigten wir, dass PCKS ein potentes Modell darstellen, welches dabei helfen kann die Brücke zwischen in vivo und in vitro Forschung zu schlagen und dazu für Kurz- und Langzeitstudien geeignet ist. Nach einem Vergleich von verschiedenen Inkubationsbedingungen, welche von unterschiedlichen Autoren in der Vergangenheit verwendet wurden und anderen Kombinationen, erwies sich DMEM/F12 und Gentamicin als am besten für Ratten-PCKS geeignet (Baverel et al. 2013; Poosti et al. 2015; Bigaeva et al. 2020; Herbert et al. 2020). Unter Verwendung des alamarBlue Cell Viability Assays beobachteten wir so stabile Viabilitätslevel über die gesamte Inkubationszeit von 4 Tagen. PCKS wurden auf einem Inkubationsschüttler [95 RPM] in einem Cytoperm 2 CO₂ Inkubator (Thermo Scientific) [37 °C, 80 % O₂, 5 % CO₂, 90 % Luftfeuchtigkeit] inkubiert und ausschließlich unter einer Laminar-Flow Werkbank verwendet, um Kontaminationen vorzubeugen. Auf diese Art und Weise konnten wir die Inkubationsdauer der PCKS ohne signifikanten Viabilitätsverlust auf 10 Tage ausdehnen. PCKS zeigten dabei reproduzierbar eine temporär erniedrigte metabolische Aktivität nach 72 Stunden, sowie einen signifikanten Abfall des Gesamtproteins im Laufe der Inkubation. Ähnliche Effekte wurden bereits in Studien beschrieben und könnten auf Umbau- und Anpassungsprozesse in der Herstellung der PCKS zurückzuführen sein (Poosti et al. 2015; Stribos et al. 2016; Bigaeva et al. 2020). Um unabhängig von veränderten Proteinkonzentrationen quantitativ die Viabilität von PCKS beurteilen zu können, entschieden wir uns für das alamarBlue Cell Viability Assay, welches regelmäßig bei anderen PCKS Anwendung findet (Granhall et al. 2002; Axelsson et al. 2003; Carranza-Torres et al. 2015; Ning et al. 2015; Hansen et al. 2016; Tigges et al. 2021). Weiter etablierten wir ein Calcein acetoxymethyl/Ethidium Homodimer-1 basiertes life/dead Staining zur qualitativen Bestimmung der Viabilität. Dabei wurden Z-Stapel-Aufnahmen von repräsentativen PCKS mittels eines Leica DMI-8 konfokal Mikroskops unter einer 10-fachen Vergrößerung erstellt. Es zeigte sich hierbei kaum eine Auswirkungen der 72-Stunden langen Inkubation auf die mikroskopische Architektur des Nierengewebes. Des Weiteren betrachteten wir die Bestimmung von intra- und extrazellulärer LDH als Parameter für Schaden an Zellmembranen und Zytotoxizität. Wenngleich die Betrachtungsdauer des Assays durch die Halbwertszeit von LDH

eingeschränkt ist, zeigte sich kein Effekt von 24-stündiger Inkubation auf die Membrankontinuität (Zur 2005).

Nachdem wir Inkubationsbedingungen optimiert und verschiedene Untersuchungsmethoden etabliert hatten, beschäftigte sich die zweite Veröffentlichung mit möglichen nephrotoxischen Effekten von verschiedenen Organophosphaten (Malaoxon, Malathion, Paraoxon, Parathion). Obwohl die primäre Toxizität von Organosphosphaten von der Enzyminhibition der AChE ausgeht, zeigten sich in unserer Studie erst Effekte bei Konzentrationen, welche jene nötig für eine signifikante AChE Inhibition im Gewebe deutlich übersteigen. Wie bereits in früheren Veröffentlichungen anderer Autoren, fanden auch wir lediglich eine vergleichsweise niedrige AChE-Aktivität im Nierengewebe der Ratten (Muñoz-Delgado et al. 2010; Rienda et al. 2021). Unter Verwendung der zuvor etablierten alamarBlue Cell Viability und BAC-Assays beobachteten wir eine dosisabhängige Reduktion von Viabilität und Gesamtprotein im Zuge der 10-tägigen Inkubation nach Exposition mit Organophosphaten. Herauszuheben ist hierbei, dass sich besonders beim Vergleich von Parathion und seinem entsprechenden Phosphorsäureester Paraoxon mit Malathion und Malaoxon Unterschiede der Viabilitätseinbußen zeigten. Betrachtet man nun die höhere inhibitorische Potenz der Oxone, weist dies abermals auf einen anderen zellschädigenden Mechanismus als die reine AChE-Hemmung hin. Auch histologische Veränderungen und qualitativer Viabilitätsverlust fielen nach Exposition mit Paraoxon oder Parathion im life/dead Staining größer aus als nach Exposition mit Malathion oder Malaoxon. Unabhängig von der Substanz fanden sich in Organophosphat-exponierten PCKS mikroskopische honigwabenartige Formationen und spindelförmige Zellreste. Ähnliche Parathion-induzierte Veränderungen wurden zudem bereits in menschlichen Nieren beschrieben (Adebahr 1960). Trotz dieser mikroskopischen Effekte zeigte sich keine Organophosphat-induzierte Membrandisruption mit Austritt von intrazellulärem LDH oder Anzeichen einer Nekrose. Unter Zuhilfenahme von menschlichen Erythrozyten-Geistern und einem AChE Inhibition Assay basierend auf einem adaptierten Ellman Assay konnten wir den Oxon-Gehalt in verschiedenen Proben im Laufe der Inkubation beurteilen (Ellman et al. 1961; Worek et al. 2012). Dabei zeigte sich generell eine deutliche Reduktion der Paraoxon- beziehungsweise Malaoxon-Konzentration bereits nach kurzer Inkubationszeit. Darüber hinaus zeigten sich weiter reduzierte enzym-inhibitorische Eigenschaften der Verdünnung, sobald diese zusammen mit PCKS inkubiert wurde.

Dies könnte hinweisend auf mögliche Interaktionen zwischen Organophosphaten und dem Nierengewebe sein.

5 Abstract (English)

In our first publication we showed that PCKS provide a powerful model to close the gap between in vivo and in vitro research fit for both short- and long-term observation. Comparing incubation methods favored by different authors in past publications and possible other combinations, a mixture of DMEM/F12 and gentamicin proved to be most suitable for rat-PCKS (Baverel et al. 2013; Poosti et al. 2015; Bigaeva et al. 2020; Herbert et al. 2020). Using the alamarBlue Cell Viability Assay, we observed stable levels of viability over a 4-day incubation period. PCKS were incubated on a shaker [95 RPM] in a Cytoperm 2 CO₂ Incubator (Thermo Scientific) [37 °C, 80 % O₂, 5 % CO₂, 90 % humidity] and only handled under a laminar air flow workbench to prevent contamination. We were able to prolong incubation of PCKS to a total of 10 days without significant loss of viability. However, we repeatedly found a temporary low in metabolic activity after 72 hours, as well as a significant decrease in total protein content during incubation. Both effects might be caused by remodeling and adaptation processes to the slicing procedure and incubation as other authors found similar phenomena in past studies (Poosti et al. 2015; Stribos et al. 2016; Bigaeva et al. 2020). To be able to evaluate viability independently of the decrease in total protein, we chose the alamarBlue Cell Viability Assay, which is well established in other PCTS (Granhall et al. 2002; Axelsson et al. 2003; Carranza-Torres et al. 2015; Ning et al. 2015; Hansen et al. 2016; Tigges et al. 2021). In our study we established a calcein acetoxymethyl/ethidium homodimer-1 based live/dead staining as a qualitative way of assessing viability. Z-Stacks of representative PCKS were generated using a Leica DMI-8 confocal microscope with a ×10 objective. Incubation caused little to no changes in the microscopic architecture of the kidney tissue over the course of 72 hours. Further, we explored analysis of both intra- and extracellular activity of LDH as a parameter for cell membrane damage and cytotoxicity. Although limited by the enzyme's half-life, incubation for 24 hours did not lead to significant LDH leakage (Zur 2005).

After optimization of incubation and establishing different methods, our second publication focused on possible nephrotoxic effects of different organophosphorus

compounds (malaoxon, malathion, paraoxon, parathion). Although the primary mechanism of toxicity of these compounds is based on the inhibition of AChE, effects were only observed in concentrations exceeding those that were needed to achieve significant AChE inhibition in rat kidney tissue. In line with past studies, AChE activity in rat kidney tissue appeared to be relatively low when compared to other tissues (Muñoz-Delgado et al. 2010; Rienda et al. 2021). Utilizing the previously established alamarBlue Cell Viability Assay and BCA-Assay, we observed a dose-dependent loss of viability and a reduction of protein content over the course of 10 days. Remarkably, differences found in this study were mainly between parathion and its related phosphate ester paraoxon versus malathion and malaoxon. Taking the higher AChE inhibiting potency of oxons into account, this further suggests a mechanism for cell damage independent of AChE inhibition. Histological observation using the life/dead staining showed PCKS exposed to paraoxon or parathion suffered a greater loss of viability than those treated with malathion and malaoxon. Regardless of the compound, organophosphate-exposure led to the formation of a microscopical honeycomb like structure and spindle like cell remnants. Similar parathion-induced microscopical changes were described in human kidneys in the past (Adebahr 1960). However, exposed PCKS did not show signs of LDH leakage and in turn necrosis. Using human erythrocyte ghosts and an AChE inhibition assay based on an adapted Ellman assay we monitored paraoxon and malaoxon content over time (Ellman et al. 1961; Worek et al. 2012). In general, we observed a remarkable decline in oxon concentration. Additionally, we found further reduced enzyme-inhibiting properties in the presence of PCKS. This suggests interactions between OP compound and kidney tissue.

Literaturverzeichnis

Abend Y, Goland S, Evron E, Sthoeger ZM, Geltner D, 1994. Acute Renal Failure complicating Organophosphate Intoxication. *Ren Fail* 16: 415–417. doi: 10.3109/08860229409044881. PMID: 8059024

Adebahr G, 1960. Kidney Changes in E 605 Poisoning in Man. *Arch für Toxikol* 18: 107–119. doi: 10.1007/BF00605641.

Aring, CD, 1942. The Systemic Nervous Affinity of Triorthocresyl Phosphate (Jamaica Ginger Palsy). *Brain* 65: 34–47. doi: 10.1093/brain/65.1.34.

Avasthi G, Singh G. 2000. Serial Neuro-electrophysiological Studies in Acute Organophosphate Poisoning - Correlation with Clinical Findings, Serum Cholinesterase Levels and Atropine Dosages. *JAPI* 48: 794–799. PMID: 11273471

Axelsson H, Granhall C, Floby E, Jaksch Y, Svedling M, Sohlenius-Sternbeck, A-K, 2003. Rates of Metabolism of Chlorzoxazone, Dextromethorphan, 7-Ethoxycoumarin, Imipramine, Quinidine, Testosterone and Verapamil by Fresh and Cryopreserved Rat Liver Slices, and some Comparisons with Microsomes. *Toxicol in Vitro* 17: 481–488. doi: 10.1016/s0887-2333(03)00049-3. PMID: 12849732.

Barr DB, Bravo R, Weerasekera G, Caltabiano LM, Whitehead RD, Olsson AO, Caudill SP, Schober SE, Pirkle JL, Sampson EJ, Jackson RJ, Needham LL, 2004. Concentrations of Dialkyl Phosphate Metabolites of Organophosphorus Pesticides in the U.S. Population. *Environ Health Perspect* 112: 186–200. doi: 10.1289/ehp.6503. PMID: 14754573.

Baverel G, Knouzy B, Gauthier C, El Eage M, Ferrier B, Martin G, Duplanya, A, 2013. Use of Precision-cut Renal Cortical Slices in Nephrotoxicity studies. *Xenobiotica* 43: 54–62. doi: 10.3109/00498254.2012.725142. PMID: 23030706

Bentur Y, Nutenko I, Tsipiniuk A, Raikhlin-Eisenkraft B, Taitelman U, 1993. Pharmacokinetics of Obidoxime in Organophosphate Poisoning Associated with Renal Failure. *J Toxicol Clin Toxicol* 31: 315–322. doi: 10.3109/15563659309000398. PMID: 8492344.

Bernal-González KG, Covantes-Rosales CE, Camacho-Pérez MR, Mercado-Salgado U, Barajas-Carrillo VW, Girón-Pérez DA, Montoya-Hidalgo AC, Díaz-Resendiz KJG,

Barcelos-García RG, Toledo-Ibarra GA, Girón-Pérez MI, 2023. Organophosphate-Pesticide-Mediated Immune Response Modulation in Invertebrates and Vertebrates. *Int J Mol Sci* 24: 5360. doi: 10.3390/ijms24065360.

Bigaeva E, Puerta Cavanzo N, Stribos EGD, de Jong AJ, Biel C, Mutsaers HAM, Jensen MS, Nørregaard R, Leliveld AM, de Jong IJ, Hillebrands J-L, van Goor H, Boersema M, Bank RA, Olinga P, 2020. Predictive Value of Precision-cut kidney Slices as an ex Vivo Screening Platform for Therapeutics in Human Renal Fibrosis. *Pharm* 12: 459. doi: 10.3390/pharmaceutics12050459. PMID: 32443499.

Carranza-Torres IE, Guzmán-Delgado NE, Coronado-Martínez C, Bañuelos-García JI, Viveros-Valdez E, Morán-Martínez J, Carranza-Rosales P, 2015. Organotypic Culture of Breast Tumor explants as a Multicellular System for the Screening of Natural Compounds with Antineoplastic Potential. *Biomed Res Int* 2015: 618021. doi: 10.1155/2015/618021. PMID: 26075250.

Cavari Y, Landau D, Sofer S, Leibson T, Lazar I, 2013. Organophosphate Poisoning-induced Acute Renal Failure. *Pediatr Emerg Care* 29: 646– 647. doi: 10.1097/PEC.0b013e31828e9e45. PMID: 23640144.

Chambers HW, 1992. Organophosphorus Compounds: an Overview. *Organophosphates Chemistry, Fate and Effects*: 3–17. doi: 10.1016/C2009-0-03193-6.

Chambers J, Oppenheimer SF, 2004. Organophosphates, Serine Esterase Inhibition, and Modeling of Organophosphate Toxicity. *ToxSci* 77: 185–187. doi: 10.1093/toxsci/kfh060.

Chuang C-S, Yang K-W, Yen C-M, Lin C-L, Kao C-H, 2019. Risk of Seizures in Patients with Organophosphate Poisoning: A Nationwide Population-Based Study. *Int J Environ Res Public Health* 16: 3147. doi: 10.3390/ijerph16173147. PMID: 31470499.

Clement JG, Bailey DG, Madill HD, Tran LT, Spence JD, 1995. The Acetylcholinesterase Oxime Reactivator HI-6 in Man: Pharmacokinetics and Tolerability in Combination with Atropine. *Biopharm Drug Dispos* 16: 415–425. doi: 10.1002/bdd.2510160506. PMID: 8527690.

Costa LG, 2018. Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. *ToxSci* 162: 24–35. doi: 10.1093/toxsci/kfx266. PMID: 29228398.

Costa LG, Galli CL, Murphy SD, 1987 Toxicology of Pesticides: A Brief History. NATO ASI Series. 13. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-70898-5_1.

Dandapani M, Zachariah A, Kavitha MR, Jeyaseelan L, Oommen A, 2003. Oxidative Damage in Intermediate Syndrome of Acute Organophosphorous Poisoning. Indian J Med Res 117: 253–259. PMID: 14748471

De Kanter R, De Jager MH, Draaisma AL, Jurva JU, Olinga P, Meijer DKF, Groothuis GMM, 2002. Drug-metabolizing Activity of Human and Rat Liver, Lung, Kidney and Intestine Slices. Xenobiotica 32: 349–362. doi: 10.1080/00498250110112006. PMID: 12065058.

Delfino RT, Ribeiro TS, Figueroa-Villar JD, 2009. Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review. J Braz Chem Soc 20: 407–428 doi: 10.1590/S0103-50532009000300003.

Dimou P, Trivedi S, Liousia M, D'Souza RR, Klampatsa A, 2022. Precision-Cut Tumor Slices (PCTS) as an Ex Vivo Model in Immunotherapy Research. Antibodies 11: 26. doi: 10.3390/antib11020026. PMID: 35466279.

DuBois KP, Doull J, 1949 Studies on the Toxicity and Mechanism of Action of p-Nitrophenyl Diethyl Thionophosphate. J Pharmacol Exp 95: 79–91. PMID: 18111480

Eddleston M, 2019. Novel Clinical Toxicology and Pharmacology of Organophosphorus Insecticide Self-Poisoning. Annu Rev Pharmacol Toxicol 59: 341–360. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021842. PMID: 30230960.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM, 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. Biochem Pharmacol 7: 88–95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9. PMID: 13726518.

Fetscher C, Fleischman M, Schmidt M, Krege S, Michel MC, 2002. M(3) Muscarinic Receptors Mediate Contraction of Human Urinary Bladder. B J Pharmacol 136: 641–643. doi: 10.1038/sj.bjp.0704781. PMID: 12086973.

Freeman BA, O'Neil JJ, 1984. Tissue Slices in the Study of Lung Metabolism and Toxicology. Environ Health Perspect 56: 51–60. doi: 10.1289/ehp.845651. PMID: 6383802.

Genovese F, Kàrpàti ZS, Nielsen SH, Karsdal MA, 2016. Precision-cut kidney Slices as a Tool to understand the Dynamics of Extracellular Matrix Remodeling in Renal Fibrosis. *Biomark Insights* 11: 77–84. doi: 10.4137/BMI. S38439. PMID: 27257368

Georgiadis G, Mavridis C, Belantis C, Zisis IE, Skamagkas I, Fragkiadoulaki I, Heretis I, Tzortzis V, Psathakis K, Tsatsakis A, Mamoulakis C, 2018. Nephrotoxicity Issues of Organophosphates. *Toxicology* 406-407: 129–136. doi: 10.1016/j.tox.2018.07.019. PMID: 30063941.

Granhall C, Floby E, Nordmark A, Orzechowski A, Thörne A, Tybring G, Sohlenius-Sternbeck A-K, 2002. Characterization of Testosterone Metabolism and 7-Hydroxycoumarin Conjugation by Rat and Human Liver Slices After Storage in Liquid Nitrogen for 1h up to 6 Months. *Xenobiotica* 32: 985–996. doi: 10.1080/0049825021000012646. PMID: 12487728.

Güven M, Sungur M, Eser B, Sari I, Altuntaş F, 2004. The Effects of Fresh Frozen Plasma on Cholinesterase Levels and Outcomes in Patients with Organophosphate Poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* 42: 617–623. doi: 10.1081/clt-200026967. PMID: 15462154.

Handl J, Malinak D, Capek J, Andrys R, Rousarova E, Hauschke M, Bruckove L, Cesla P, Rousar T, Musilek K, 2021. Effects of Charged Oxime Reactivators on the HK-2 Cell Line in Renal Toxicity Screening. *Chem Res Toxicol* 34: 699–703. doi: 10.1021/acs.chemrestox.0c00489. PMID: 33566584.

Hansen NUB, Karsdal MA, Brockbank S, Cruwys S, Rønnow S, Leeming DJ, 2016. Tissue Turnover of Collagen Type I, III and Elastin is elevated in the PCLS Model of IPF and can be restored back to Vehicle Levels using a Phosphodiesterase Inhibitor. *Respir Res* 17:76. doi: 10.1186/s12931-016-0394-8. PMID: 27411390.

He F, Xu H, Qin F, Xu L, Huang J, He X, 1998. Intermediate Myasthenia Syndrome following Acute Organophosphates Poisoning - an Analysis of 21 Cases. *HET* 17: 40–45. doi: 10.1177/096032719801700107. PMID: 9491337.

Herbert J, Laskin DL, Gow AJ, Laskin JD, 2020. Chemical Warfare Agent Research in Precision-Cut Tissue Slices - a Useful Alternative Approach. *Ann N Y Acad Sci* 1480: 44–53. doi: 10.1111/nyas.14459. PMID: 32808309.

Hobbing F, 1951. Inhibition of Cholinesterases by Irreversible Inhibitors in Vitro and in Vivo. *Br J Pharmacol Chemother* 6: 21–30. doi: 10.1111/j.1476-5381.1951.tb00616.x. PMID: 14904884.

Hoffmann P, Skibinski G, James K, 1995. Organ Culture of Human Lymphoid Tissue. I. Characteristics of the system. *J Immunol Methods* 179: 37–49. doi: 10.1016/0022-1759(94)00268-2. PMID: 7868923.

Holmstedt B, 1959. Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacol Rev* 11: 567–688. PMID: 14402820

Holmstedt B, 1963. Cholinesterases and Anticholinesterase Agents. *Handb. Exp. Pharmacol* 15: 428. ISBN : 978-3-642-99877-5

Jacobson MH, Wu Y, Liu M, Kannan K, Li AJ, Robinson M, Warady BA, Furth S, Trachtsman Howard, Trasande Leonardo, 2021. Organophosphate Pesticides and Progression of Chronic Kidney Disease among Children: A Prospective Cohort Study. *Environ Int* 155: 106597. doi: 10.1016/j.envint.2021.106597. PMID: 33951537.

Jain RB, 2016. Levels of Dialkylphosphate Metabolites in Urine among General U.S. Population. *Environ Toxicol Pharmacol* 43: 74–82. doi: 10.1016/j.etap.2016.02.016. PMID: 26970058.

Jeyaratnam J, 1990. Acute Pesticide Poisoning: a Major Global Health Problem. *World Health Stat Q* 43: 139–144. PMID: 2238694

John M, Oommen A, Zachariah A, 2003. Muscle Injury in Organophosphorous Poisoning and its Role in the Development of Intermediate Syndrome. *Neurotoxicology* 24: 43–53. doi: 10.1016/s0161-813x(02)00111-0. PMID: 12564381.

Jokanović M, 2001. Biotransformation of Organophosphorus Compounds. *Toxicology* 166: 139–160. doi: 10.1016/s0300-483x(01)00463-2. PMID: 11543910.

Karalliedde L, Baker D, Marrs TC, 2006. Organophosphate-induced Intermediate Syndrome: Aetiology and Relationships with Myopathy. *Toxicol Rev* 25: 1–14. doi: 10.2165/00139709-200625010-00001. PMID: 16856766.

Kaya Y, Bas O, Hanci H, Cankaya S, Nalbant I, Odaci E, Uydu HA, Aslan A, 2018. Acute Renal Involvement in Organophosphate Poisoning: Histological and Immunochemical Investigations. *Ren Fail* 40: 410–415. doi: 10.1080/0886022X.2018.1489289. PMID: 30012025.

Khan S, Hemalatha R, Jeyaseelan L, Oommen A, Zachariah A, 2001. Neuroparalysis and Oxime Efficacy in Organophosphate Poisoning: a Study of Butyrylcholinesterase. HET 20: 169–174. doi: 10.1191/096032701678766796. PMID: 11393267.

Klee E, 1977. Christa Lehmann - Das Geständnis der Giftmörderin. Krüger, Frankfurt am Main. ISBN: 3810510025

Koelle GB, 1992. Erythrocyte and Tissue AChE Inhibition. JAT 12: 305. doi: 10.1002/jat.2550120417. PMID: 1430784.

Krebs HA, 1933. Untersuchungen über den Stoffwechsel der Aminosäuren im Tierkörper. Habilitation. Universität Freiburg im Breisgau.

Krumdieck CL, Dos Santos JE, Ho KJ, 1980. A New Instrument for the Rapid Preparation of Tissue Slices. Anal Biochem 104: 118–123. doi: 10.1016/0003-2697(80)90284-5. PMID: 6770714.

Landin W, 2020. Wormser Gift. Die Geschichte der Christa Lehmann. Worms Verlag, Worms. ISBN 978-3-947884-28-5.

Lee EC, 2003. Clinical Manifestations of Sarin Nerve Gas Exposure. JAMA 290: 659–662. doi: 10.1001/jama.290.5.659. PMID: 12902371.

Lee F-Y, Chen W-K, Lin C-L, Lai C-Y, Wu Y-S, Lin I-C, Kao C-H, 2015. Organophosphate Poisoning and Subsequent Acute Kidney Injury Risk: a Nationwide Population-based Cohort Study. Medicine 94: e2107. doi: 10.1097/MD.0000000000002107. PMID: 26632728.

Lee P, Tai DY, 2001. Clinical Features of Patients with Acute Organophosphate Poisoning requiring Intensive Care. Intensive Care Med 27: 694–699. doi: 10.1007/s001340100895. PMID: 11398695.

Lerro CC, Koutros S, Andreotti G, Friesen MC, Alavanja MC, Blair A, Hoppin JA, Sandler DP, Lubin JH, Ma X, Zhang Y, Beane Freeman LE, 2015. Organophosphate Insecticide Use and Cancer Incidence among Spouses of Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. Occup Environ Med 72: 736–744. doi: 10.1136/oemed-2014-102798. PMID: 26150671.

- Liberati TA, Randle MR, Toth LA, 2010. In Vitro Lung Slices: a Powerful Approach for Assessment of Lung Pathophysiology. *Expert Rev Mol Diagn* 10: 501–508. doi: 10.1586/erm.10.21. PMID: 20465504.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. 2017. NF- κ B Signaling in Inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2: 17023. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23. PMID: 29158945.
- Lotti M, Moretto A, 2005. Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Toxicol Rev* 24: 37–49. doi: 10.2165/00139709-200524010-00003. PMID: 16042503.
- Marrs TC, 1993. Organophosphate Poisoning. *Pharmacol Therapeut* 58: 51–66. doi: 10.1016/0163-7258(93)90066-m. PMID: 8415873.
- Mew EJ, Padmanathan P, Konradsen F, Eddleston M, Chang S-S, Phillips MR, Gunnell D, 2017. The Global Burden of Fatal Self-poisoning with Pesticides 2006-15: Systematic Review. *J Affect Disord* 219: 93–104. doi: 10.1016/j.jad.2017.05.002. PMID: 28535450.
- Morgan JP, Penovich, 1978. Jamaica Ginger Paralysis. Forty-seven-year Follow-up. *Arch Neurol* 35: 530–532. doi: 10.1001/archneur.1978.00500320050011. PMID: 666613.
- Moser V, 1995. Comparisons of the Acute Effects of Cholinesterase Inhibitors using a Neurobehavioral Screening Battery in Rats. *Neurotoxicol Teratol* 17: 617–625. doi: 10.1016/0892-0362(95)02002-0. PMID: 8747743.
- Muñoz-Delgado E, Montenegro MF, Campoy FJ, Moral-Naranjo MT, Cabezas-Herrera J, Kovacs G, Vidal CJ, 2010. Expression of Cholinesterases in Human Kidney and its Variation in Renal Cell Carcinoma Types. *FEBS J* 277: 4519–4529. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07861.x. PMID: 20883446.
- Nalin DR, 1973. Epidemic of Suicide by Malathion Poisoning in Guyana. Report of 264 Cases. *Trop Geogr Med* 25: 8–14. PMID: 4694003
- Ning L-J, Zhang Y-J, Zhang Y, Qing Q, Jiang Y-L, Yang J-L, Luo J-C, Qin T-W, 2015. The Utilization of Decellularized Tendon Slices to Provide an Inductive Microenvironment for the Proliferation and Tenogenic Differentiation of Stem Cells. *Biomater* 52: 539–550. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.061. PMID: 25818459.

Othman A, Ehnert S, Dropmann A, Ruoß M, Nüssler AK, Hammad S, 2020. Precision-cut Liver Slices as an Alternative Method for Long-term Hepatotoxicity Studies. *Arch Toxicol* 94: 2889–2891. doi: 10.1007/s00204-020-02861-9. PMID: 32683516.

Pai KS, Ravindranath V, 1991. Protection and Potentiation of MPTP-induced Toxicity by Cytochrome P-450 Inhibitors and Inducer: in Vitro Studies with Brain Slices. *Brain Res* 555: 239–244. doi: 10.1016/0006-8993(91)90347-x. PMID: 1933335.

Parrish AR, Gandolfi AJ, Brendel K, 1995. Precision-cut Tissue Slices: Applications in Pharmacology and Toxicology. *Life Sci* 57: 1887–1901. doi: 10.1016/0024-3205(95)02176-J. PMID: 7475939.

Parrish AR, Sallam K, Nyman DW, Orozco J, Cress AE, Dalkin BL, Nagle RB, Gandolfi AJ, 2002. Culturing Precision-cut Human Prostate Slices as an in Vitro Model of Prostate Pathobiology. *Cell Biol Toxicol* 18: 205–219. doi: 10.1023/a:1015567805460. PMID: 12083426.

Pearce N, Caplin B, 2019. Let's take the Heat out of the CKD Debate: More Evidence is needed. *Occup Environ Med* 76: 357–359. doi: 10.1136/oemed-2018-105427. PMID: 30928904.

Pearson M, Metcalfe C, Jayamanne S, Gunnell D, Weerasinghe M, Pieris R, Priyadarshana C, Knipe DW, Hawton K, Dawson AH, Bandara P, DeSilva D, Gawarammana I, Eddleston M, Konradsen F, 2017. Effectiveness of Household Lockable Pesticide Storage to reduce Pesticide Self-poisoning in Rural Asia: a Community-based, Cluster-randomised Controlled Trial. *Lancet* 390: 1863–1872. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31961-X. PMID: 28807536.

Petroianu GA, 2009. The Synthesis of Phosphor Ethers: who was Franz Anton Voegeli? *Die Pharmazie* 64: 269–275. doi: 10.1691/ph.2009.8244

Petroianu GA, 2010. History of Organophosphate Synthesis: the very Early Days. *Die Pharmazie* 65: 306–311. doi: 10.1691/ph.2010.9141

Pham H, Lingao MD, Ganesh A, Capasso JE, Keep R, Sadagopan KA, Levin AV, 2016. Organophosphate Retinopathy. *Oman J Ophthalmol* 9: 49–51. doi: 10.4103/0974-620X.176101. PMID: 27013829.

Pickles HG, Simmonds MA, 1976. Possible Presynaptic Inhibition in Rat Olfactory Cortex. *J Physiol* 260: 475–486. doi: 10.1113/jphysiol.1976.sp011526.

Poosti F, Pham BT, Oosterhuis D, Poelstra K, van Goor H, Olinga P, Hillebrands J-H, 2015. Precision-cut Kidney Slices (PCKS) to study Development of Renal Fibrosis and Efficacy of Drug Targeting ex Vivo. *Dis Model Mech* 8: 1227–1236. doi: 10.1242/dmm.020172. PMID: 26112172.

Preusser H-J, 1967. Die Ultrastruktur der motorischen Endplatte im Zwerchfell der Ratte und Vernderungen nach Inhibierung der Acetylcholinesterase. *Z. Zellforsch.* 80: 436–457. doi: 10.1007/BF00339332.

Richards CD, Sercombe R, 1968. Electrical Activity observed in Guinea-pig Olfactory Cortex maintained in Vitro. *J Physiol* 197: 667–683. doi: 10.1113/jphysiol.1968.sp008581.

Rienda B, Elexpe A, Tolentino-Cortez T, Gulak M, Bruzos-Cidón C, Torrecilla M, Astigarraga E, Barreda-Gómez G, 2021. Analysis of Acetylcholinesterase Activity in Cell Membrane Microarrays of Brain Areas as a Screening Tool to identify Tissue Specific Inhibitors. *Analytica* 2: 25– 36. doi: 10.3390/analytica2010003.

Rose RC, 1986. Ascorbic Acid Transport in Mammalian Kidney. *Am J Physiol* 250: 627-32. doi: 10.1152/ajprenal.1986.250.4.F627.

Russel W, Burch R, 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen. London, UK. ISBN: 0-900767-78-2

Senanayake N, Karalliedde L, 1987. Neurotoxic Effects of Organophosphorus Insecticides. An Intermediate Syndrome. *N Engl J Med* 316: 761–763. doi: 10.1056/NEJM198703263161301. PMID: 3029588.

Shapiro RA, Tietje KM, Subers EM, Scherer NM, Habecker BA, Nathanson NM, 1989. Regulation of Muscarinic Acetylcholine Receptor Function in Cardiac Cells and in Cells Expressing Cloned Receptor Genes. *Trends Pharmacol Sci Suppl*: 43–6. PMID: 2694522

Sidell FR, Groff WA, Kaminskis A, 1972. Toxogonin and Pralidoxime: Kinetic Comparison after Intravenous Administration to Man. *H Pharm Sci* 61: 1765–1769. doi: 10.1002/jps.2600611115. PMID: 4569114.

Singer AW, Jaax NK, Graham JS, McLeod CG, 1987. Cardiomyopathy in Soman and Sarin Intoxicated Rats. *Toxicol Lett* 36: 243–249. doi: 10.1016/0378-4274(87)90192-5.

Sobolev VE, Sokolova MO, Jenkins RO, Goncharov NV, 2022. Molecular Mechanisms of Acute Organophosphate Nephrotoxicity. *Int J Mol Sci* 23: 8855. doi: 10.3390/ijms23168855. PMID: 36012118.

Stribos EGD, Luangmonkong T, Leliveld AM, de Jong IJ, van Son WJ, Hillebrands J-L, Seelen MA, van Goor H, Olinga P, Mutsaers HAM, 2016. Precision-cut Human Kidney Slices as a Model to elucidate the Process of Renal Fibrosis. *Transl Res* 170: 8–16.e1. doi: 10.1016/j.trsl.2015.11.007. PMID: 26687735.

Tigges J, Eggerbauer F, Worek F, Thiermann H, Rauen U, Wille T, 2021. Optimization of Long-term Cold Storage of Rat Precision-cut Lung Slices with a Tissue Preservation Solution. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 321: L1023–L1035. doi: 10.1152/ajplung.00076.2021. PMID: 34643087.

Tigges J, Worek F, Thiermann H, Wille T, 2022. Organophosphorus Pesticides exhibit Compound Specific Effects in Rat Precision-cut Lung Slices (PCLS): Mechanisms Involved in Airway Response, Cytotoxicity, Inflammatory Activation and Antioxidative Defense. *Arch Toxicol* 96: 321–334. doi: 10.1007/s00204-021-03186-x. PMID: 34778934.

Urban JH, van de Kar LD, 1986. An Improved Method for the Measurement of Renin Release from Coronal, Vibratome-cut Kidney Slices. *J Pharmacol Methods* 15: 245–253. doi: 10.1016/0160-5402(86)90054-9.

Vickers AE, Connors S, Zollinger M, Biggi WA, Larrauri A, Vogelaar JP, Brendel K, 1993. The Biotransformation of the Ergot Derivative CQA 206-291 in Human, Dog, and Rat Liver Slice Cultures and Prediction of in Vivo Plasma Clearance. *Drug Metab Dispos* 21: 454–459. PMID: 8100501

Warburg O, Minami S, 1923. Versuche an Überlebendem Carcinom-gewebe. *Klin Wochenschr* 2: 776–777. doi: 10.1007/BF01712130.

Wedin GP, Ballantyne B., Marrs TC, 1992. Nephrotoxicity of Anticholinesterases. *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbomates*: 195–202. Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford. UK. ISBN: 0750602716.

Weissmann-Brenner A, Friedman LM, David A, Vidan A, Hourvitz A, 2002. Organophosphate Poisoning: a Multihospital Survey. *Isr Med Assoc J* 4: 573–576. PMID: 12120477

Worek F, Eyer P, Thiermann H, 2012. Determination of Acetylcholinesterase Activity by the Ellman Assay: a Versatile Tool for in Vitro Research on Medical Countermeasures against Organophosphate Poisoning. *Drug Test Anal* 4: 282–291. doi: 10.1002/dta.337. PMID: 21998030.

Worek F, Thiermann H, Wille T. 2020. Organophosphorus Compounds and Oximes: a Critical Review. *Arch Toxicol* 94: 2275–2292. doi: 10.1007/s00204-020-02797-0. PMID: 32506210.

Yamamoto C, McIlwain H, 1966. Electrical Activities in Thin Sections from the Mammalian Brain maintained in Chemically-defined Media in Vitro. *J Neurochem* 13: 1333–1343. doi: 10.1111/j.1471-4159.1966.tb04296.x. PMID: 5962016.

Yang C-C, Deng J-F, 2007 Intermediate Syndrome Following Organophosphate Insecticide Poisoning. *J Chin Med Assoc* 70: 467–472. doi: 10.1016/S1726-4901(08)70043-1. PMID: 18063499.

Yang F-W, Li Yi-X, Ren F-Z, Luo J, Pang G-F, 2019. Assessment of the Endocrine-disrupting Effects of Organophosphorus Pesticide Triazophos and its Metabolites on Endocrine Hormones Biosynthesis, Transport and Receptor binding in Silico. *Food Chem Toxicol* 133: 110759. doi: 10.1016/j.fct.2019.110759. PMID: 31421215.

Zafar R, Munawar K, Nasrullah A, Haq S, Ghazanfar H, Sheikh AB, Khan AY, 2017. Acute Renal Failure due to Organophosphate Poisoning: a Case Report. *Cureus* 9: e1523. doi: 10.7759/cureus.1523. PMID: 28959515.

Zur B. 2005. Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse. Dissertation. Düsseldorf: Heinrich-HeineUniversity Düsseldorf

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meiner Betreuungskommission Herrn Prof. Dr. med. Franz Worek, Herrn Prof. Dr. med. Thomas Gudermann und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Alexander Dietrich bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Worek für die Möglichkeit mich mit einem solch spannenden Thema beschäftigt haben zu dürfen, für seinen wertvollen wissenschaftlichen Rat und für sein Engagement bei der Erstellung und Veröffentlichung dieser Arbeit.

Diese Dissertation wäre nicht ohne die Hilfe der Mitarbeitenden des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr möglich gewesen. Insbesondere möchte ich mich bei Andreas Wosar für seine Unterstützung bedanken. Ich bedanke mich außerdem bei Jonas Tigges für die Einführung in die PCTS.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.