

# **Untersuchungen zur Induktion fremdstoffmetabolisierender und peroxisomaler Enzyme in Rattenhepatozyten Primärkultur im Zuge der Arzneimittel-Entwicklung**

Vom Fachbereich der Universität Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen  
Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte

**Dissertation**

(D 386)

vorgelegt von

Diplom Lebensmittelchemiker Kai-Uwe Klein

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23. April 2002

Kaiserslautern 2002

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23. April 2002

Promotionskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. G. Himbert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. D. Schrenk
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Eisenbrand

Die vorliegende Arbeit entstand von November 1998 bis November 2001 im Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern in Zusammenarbeit mit der Firma Knoll AG, Ludwigshafen.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk bedanken, der mir die Durchführung der Promotion in der Firma Knoll AG ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Blaich und Herrn Dr. S.O. Müller für die Vergabe des interessanten Themas und ihre wohlwollende Betreuung und Unterstützung.

## **Für meine Frau und meinen Sohn**

...dein Geist braucht Energie und Erregung und Bewegung,  
denn Erfahrung ist Ernährung und Wissen ist Vermehrung...

„Mach dich frei“, Die Fantastischen Vier

---

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Methoden der Hepatozytenkultivierung.....	1
1.2	Fremdstoffmetabolismus.....	4
1.2.1	Cytochrom P450 (Phase I).....	4
1.2.2	UDP-Glucuronosyltransferase (Phase II).....	5
1.3	Peroxisomen.....	7
1.3.1	Peroxisomenproliferation.....	8
1.3.2	Peroxisomen Proliferatoren und Hepatokanzerogenese.....	10
2	Aufgabenstellung.....	12
3	Material und Methoden.....	13
3.1	Knoll-Substanzen.....	13
3.2	Chemikalien.....	20
3.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	23
3.4	Präparation von Rattenhepatozyten.....	26
3.4.1	Lösungen für die Leberperfusion.....	26
3.4.2	Versuchstiere.....	27
3.4.3	Isolierung von Rattenhepatozyten.....	27
3.4.4	Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität.....	29
3.5	Zellkultur.....	30
3.5.1	Collagenbeschichtung der Kulturgefäße.....	30
3.5.2	Kulturbedingungen.....	31
3.5.2.1	Rattenschwanz-Collagen.....	31
3.5.3	Aufarbeitung der Zellen.....	31
3.6	Methoden zur Bestimmung der Cytotoxizität.....	32
3.6.1	Anfärbung mit Kristallviolett.....	32
3.6.1.1	Lösungen und Reagenzien.....	32
3.6.1.2	Versuchsprinzip.....	33
3.6.1.3	Versuchsdurchführung.....	33
3.6.2	Aufnahme von Neutral Rot.....	34
3.6.2.1	Lösungen und Reagenzien.....	34
3.6.2.2	Versuchsprinzip.....	34
3.6.2.3	Versuchsdurchführung.....	34
3.6.3	LDH-Aktivitätsbestimmung.....	35
3.6.3.1	Lösungen und Reagenzien.....	35
3.6.3.2	Versuchsprinzip.....	35
3.6.3.3	Versuchsdurchführung.....	36
3.6.4	Metabolischer Umsatz des Tetrazolium-Salzes WST-1.....	37
3.6.4.1	Lösungen und Reagenzien.....	37
3.6.4.2	Versuchsprinzip.....	37
3.6.4.3	Versuchsdurchführung.....	37
3.6.5	Metabolischer Umsatz des Tetrazolium-Salzes MTT.....	38
3.6.5.1	Lösungen und Reagenzien.....	38
3.6.5.2	Versuchsprinzip.....	38
3.6.5.3	Versuchsdurchführung.....	38
3.6.6	Ermittlung der IC <sub>50</sub> -Konzentrationen.....	39
3.7	Bestimmung der Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen.....	39
3.7.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	39
3.7.1.1	Lösungen und Reagenzien.....	39

---

---

3.7.1.2	Versuchsprinzip.....	40
3.7.1.3	Versuchsdurchführung .....	40
3.7.2	Bestimmung der AROD-Aktivitäten .....	41
3.7.2.1	Lösungen und Reagenzien.....	41
3.7.2.2	Versuchsprinzip.....	41
3.7.2.3	Versuchsdurchführung .....	42
3.7.3	Messung des Testosteron-Metabolismus .....	43
3.7.3.1	Lösungen und Reagenzien.....	43
3.7.3.2	Versuchsprinzip.....	43
3.7.3.3	Versuchsdurchführung .....	44
3.7.3.4	Berechnung der CYP-Aktivität (Umsatz) .....	45
3.7.4	Bestimmung der Laurinsäurehydroxylierung (LAH) .....	46
3.7.4.1	Lösungen und Reagenzien.....	46
3.7.4.2	Versuchsprinzip.....	46
3.7.4.3	Versuchsdurchführung .....	47
3.7.5	Bestimmung der GST-Aktivität mit dem Substrat CDNB .....	48
3.7.5.1	Lösungen und Reagenzien.....	48
3.7.5.2	Versuchsprinzip.....	48
3.7.5.3	Versuchsdurchführung .....	49
3.7.6	Messung der 4-Methyl-Umbelliferon-Konjugation (MUF).....	50
3.7.6.1	Lösungen und Reagenzien.....	50
3.7.6.2	Versuchsprinzip.....	50
3.7.6.3	Versuchsdurchführung .....	51
3.7.7	Messung der 4-Hydroxy-Biphenyl-Konjugation (HOBI).....	52
3.7.7.1	Lösungen und Reagenzien.....	52
3.7.7.2	Versuchsprinzip.....	52
3.7.7.3	Versuchsdurchführung .....	53
3.7.8	Messung der PNP-Konjugation .....	55
3.7.8.1	Lösungen und Reagenzien.....	55
3.7.8.2	Versuchsprinzip.....	55
3.7.8.3	Versuchsdurchführung .....	55
3.8	Bestimmung der Induktion von peroxisomalen Enzymen .....	57
3.8.1	Bestimmung der Acyl-CoA Oxidase-Aktivität (ACOX) .....	57
3.8.1.1	Lösungen und Reagenzien.....	57
3.8.1.2	Versuchsprinzip.....	57
3.8.1.3	Versuchsdurchführung .....	58
3.8.2	Bestimmung der L-Carnitin-Acetyl-Transferase (CAT) .....	59
3.8.2.1	Lösungen und Reagenzien.....	59
3.8.2.2	Versuchsprinzip.....	59
3.8.2.3	Versuchsdurchführung .....	60
3.8.3	Bestimmung der Katalase-Aktivität.....	61
3.8.3.1	Lösungen und Reagenzien.....	61
3.8.3.2	Versuchsprinzip.....	61
3.8.3.3	Versuchsdurchführung .....	61
4	Ergebnisse.....	63
4.1	Bestimmung der Cytotoxizität .....	63
4.1.1	Vorversuche zu den Cytoxizitäts-Assays.....	63
4.1.2	Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Konzentrationen der Knoll-Substanzen.....	69
4.2	Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme in primären Rattenhepatozyten .....	74
4.2.1	Induktion von Cytochrom P450-Isoenzymen .....	74

---

---

4.2.1.1	Bestimmung der AROD-Aktivitäten .....	75
4.2.1.1.1	Zeitliche Veränderungen der AROD-Aktivitäten .....	75
4.2.1.1.2	Überprüfung der Spezifität von EROD, BROD und MROD .....	78
4.2.1.1.3	Bestimmung der EROD-Aktivität .....	81
4.2.1.1.4	Bestimmung der BROD-Aktivität .....	83
4.2.1.2	Untersuchung des Metabolismus von Testosteron.....	86
4.2.1.3	Bestimmung der LAH-Aktivität.....	88
4.2.2	Induktion von Phase II-Enzymen .....	89
4.2.2.1	Bestimmung der GST-Aktivität .....	89
4.2.2.2	Messung der UGT-Aktivität mit MUF als Substrat .....	91
4.2.2.3	Messung der UGT-Aktivität mit HOBI als Substrat .....	92
4.2.2.4	Untersuchung der PNP-Konjugation .....	93
4.3	Induktion peroxisomaler Enzyme in primären Rattenhepatozyten.....	94
4.3.1	Messung der ACOX-Aktivität .....	95
4.3.2	Messung der CAT-Aktivität.....	96
4.3.3	Messung der Katalase-Aktivität .....	97
5	Diskussion .....	98
5.1	Bestimmung der Cytotoxizität in Rattenhepatozyten .....	98
5.2	Beurteilung der <i>in vivo</i> -Ergebnisse .....	101
5.3	Vergleich der <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> -Daten .....	102
5.4	Rezeptorvermittelte Induktion von Cytochrom P450-Isoenzymen und peroxisomalen Enzymen .....	105
5.5	Induktion von Phase II-Enzymen .....	113
6	Zusammenfassung .....	114
7	Literaturverzeichnis.....	115
8	Anhang .....	124
8.1	Ergebnisse aus den Vorversuchen.....	124
8.2	IC <sub>50</sub> -Konzentrationen von Digitonin, SDS und TX-100 .....	125
8.3	Zeitlicher Verlauf der EROD-Aktivität.....	126
8.4	Zeitlicher Verlauf der BROD-Aktivität.....	126
8.5	Zeitlicher Verlauf der PROD-Aktivität.....	126
8.6	AROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten.....	127
8.7	Testosteron-Metabolismus in Rattenhepatozyten.....	131
8.8	LAH-Aktivität in Rattenhepatozyten .....	134
8.9	GST-Aktivität in Rattenhepatozyten.....	135
8.10	MUF-Konjugation in Rattenhepatozyten .....	136
8.11	HOBI-Konjugation in Rattenhepatozyten .....	137
8.12	PNP-Konjugation in Rattenhepatozyten .....	138
8.13	ACOX-Aktivität in Rattenhepatozyten.....	140
8.14	CAT-Aktivität in Rattenhepatozyten.....	141
8.15	Katalase-Aktivität in Rattenhepatozyten .....	142

---

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rattenhepatozyten nach 1 h bzw. 96 h in Kultur .....	3
Abbildung 2: Stoffwechselwege in Peroxisomen [24].....	7
Abbildung 3: Strukturformeln einiger Peroxisomen Proliferatoren.....	9
Abbildung 4: PPAR-vermittelte Transkription von Targetgenen .....	10
Abbildung 5: Strukturformel von Kristallviolett (CV) .....	33
Abbildung 6: Strukturformel von Neutral Rot (NR) .....	34
Abbildung 7: Reduktion von WST-1 .....	37
Abbildung 8: Reduktion von MTT .....	38
Abbildung 9: Strukturformel von Coomassie Brilliant Blue G 250 .....	40
Abbildung 10: Umsetzung von Resorufinethern durch CYP-Isoenzyme .....	41
Abbildung 11: Testosteron-Metabolismus durch CYP-Isoenzyme (Ratte) .....	43
Abbildung 12: Metabolismus von Laurinsäure durch Cytochrom P450-Isoenzyme ..	46
Abbildung 13: Konjugation von CDNB mit Glutathion .....	48
Abbildung 14: Glucuronidierung von MUF .....	50
Abbildung 15: Glucuronidierung von HOBI .....	52
Abbildung 16: Konjugation von PNP .....	55
Abbildung 17: Bestimmung der ACOX-Aktivität mit DCF .....	57
Abbildung 18: Bestimmung der CAT-Aktivität mit DTNB.....	59
Abbildung 19: Bestimmung der Katalase-Aktivität mit Titanoxysulfat.....	61
Abbildung 20: IC <sub>50</sub> -Bestimmung von Digitonin mit WST in Rattenhepatozyten.....	64
Abbildung 21: IC <sub>50</sub> -Bestimmung von Digitonin mit LDH (im Überstand/zellulär) .....	64
Abbildung 22: IC <sub>50</sub> -Bestimmung von Digitonin mit CV und NR .....	65
Abbildung 23: IC <sub>50</sub> -Bestimmung von Digitonin mit Bradford in Rattenhepatozyten...	65
Abbildung 24: IC <sub>50</sub> -Bestimmung von Triton X-100 mit WST in Rattenhepatozyten...	66
Abbildung 25: IC <sub>50</sub> -Bestimmung von SDS mit WST in Rattenhepatozyten .....	66
Abbildung 26: IC <sub>50</sub> -Bestimmung von Digitonin mit WST in Rattenhepatozyten.....	67
Abbildung 27: IC <sub>50</sub> -Bestimmung von Triton X-100 mit LDH in Rattenhepatozyten....	67
Abbildung 28: IC <sub>50</sub> -Bestimmung von SDS mit LDH in Rattenhepatozyten .....	68
Abbildung 29: IC <sub>50</sub> -Bestimmung von Digitonin mit LDH in Rattenhepatozyten .....	68
Abbildung 30: Beispiel einer für Knoll-Substanzen erstellten IC <sub>50</sub> -Kurve .....	70
Abbildung 31: IC <sub>50</sub> -Konzentrationen [µM] der Knoll-Substanzen (LDH) .....	71
Abbildung 32: IC <sub>50</sub> -Konzentrationen [µM] der Knoll-Substanzen (WST-1) .....	72
Abbildung 33: Korrelation der IC <sub>50</sub> -Werte (WST/LDH) .....	73
Abbildung 34: Zeitlicher Verlauf der EROD-Aktivität [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ].....	76
Abbildung 35: Zeitlicher Verlauf der BROD-Aktivität [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ].....	77
Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf der PROD-Aktivität [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ].....	78
Abbildung 37: EROD-Aktivitäten nach 48-stündiger Behandlung mit Modellinduktoren (n = 16) .....	79
Abbildung 38: BROD-Aktivitäten nach 48-stündiger Behandlung mit Modellinduktoren (n = 16) .....	79
Abbildung 39: MROD-Aktivitäten nach 48-stündiger Behandlung mit Modellinduktoren (n = 5) .....	80
Abbildung 40: EROD-Aktivitäten nach Behandlung mit 47110 oder 135252 (n = 3) ..	81
Abbildung 41: EROD-Aktivitäten nach Behandlung mit 409499 oder 418585 (n = 3) ..	82
Abbildung 42: BROD-Aktivitäten nach Behandlung mit 47110 oder 53876 (n = 3) ...	83
Abbildung 43: BROD-Aktivitäten nach Behandlung mit 111995 oder 135252 (n = 3) ..	83
Abbildung 44: BROD-Aktivitäten nach Behandlung mit 409499 oder 418585 (n = 3) ..	84

---



---

Abbildung 45: MROD-Aktivitäten nach 48 h Behandlung mit Knoll-Substanzen (n = 3-4).....	85
Abbildung 46: Beeinflussung des Testosteron-Metabolismus durch Modellinduktoren .....	86
Abbildung 47: Beeinflussung des Testosteron-Metabolismus durch Knoll-Substanzen (n = 4-5).....	87
Abbildung 48: LAH-Aktivität (11 / 12-OH) in Rattenhepatozyten [nmol·h <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] (n = 3) .....	88
Abbildung 49: GST-Aktivitäten nach 48-stündiger Behandlung mit Modellinduktoren (n = 7) .....	89
Abbildung 50: GST-Aktivitäten nach 48 h Behandlung mit 409499, 418585 oder 448698 (n = 4) .....	90
Abbildung 51: GST-Aktivitäten nach 48 h Behandlung mit 420627, 433220 oder 466506 (n = 4) .....	90
Abbildung 52: MUF-Aktivität [nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] in Rattenhepatozyten (n = 3).....	91
Abbildung 53: HOBI-Aktivität [nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] in Rattenhepatozyten (n = 3).....	92
Abbildung 54: PNP-Konjugation in Rattenhepatozyten (n = 3-9) .....	93
Abbildung 55: PNP-Konjugation nach Behandlung mit Knoll-Substanzen (n = 3-4) ..	93
Abbildung 56: ACOX-Aktivitäten in Rattenhepatozyten [nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] (n = 3).....	95
Abbildung 57: CAT-Aktivitäten in Rattenhepatozyten [nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] (n = 4).....	96
Abbildung 58: Katalase-Aktivitäten in Rattenhepatozyten [nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] (n = 2) ..	97
Abbildung 59: Induction von CYP 1A1 .....	105
Abbildung 60: Strukturformeln von CYP 1A-Induktoren .....	106
Abbildung 61: Strukturformeln von CYP 2B-Induktoren .....	107
Abbildung 62: Strukturformeln von CYP 3A-Induktoren .....	109

---

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CYPs, Markerreaktionen und Modellinduktoren .....	5
Tabelle 2: Änderung der Enzym-Aktivitäten relativ zur unbehandelten Kontrolle ( <i>in vivo</i> ) .....	13
Tabelle 3: Einfluss der Knoll-Substanzen auf Enzym-Aktivitäten ( <i>in vivo</i> ) .....	14
Tabelle 4: Eigenschaften der Knoll-Substanzen .....	15
Tabelle 5: Collagenbeschichtung der Kulturgefäße .....	30
Tabelle 6: Kulturbedingungen für die Rattenhepatozyten Primärkultur .....	31
Tabelle 7: Vergleich der IC <sub>50</sub> -Werte [µM] von WST, LDH (n = 3) und MTT (n = 2) ...	69
Tabelle 8: IC <sub>50</sub> -Konzentrationen [µM] der Knoll-Substanzen durch LDH bestimmt (n = 3-4*) .....	71
Tabelle 9: IC <sub>50</sub> -Konzentrationen [µM] der Knoll-Substanzen durch WST-1 bestimmt (n = 3-4*) .....	72
Tabelle 10: CYP-Modellinduktoren (bei Ratten).....	74
Tabelle 11: IC <sub>50</sub> -Konzentrationen von Modellinduktoren in Rattenhepatozyten (n = 1) .....	75
Tabelle 12: IC <sub>50</sub> -Konzentrationen von Modellinduktoren (n = 3) .....	94
Tabelle 13: Einfluss der Knoll-Substanzen CYP 2B-spezifische Reaktionen.....	103
Tabelle 14: Einfluss der Knoll-Substanzen auf die Cyp 2B-spezifische 16β- bzw. auf die CYP 3A spezifische 15β-Hydroxylierungen von Testosteron .....	110
Tabelle 15: Induktion peroxisomaler und CYP 4A-Enzymaktivitäten .....	112
Tabelle 16: IC <sub>50</sub> -Kurven von Digitonin in Rattenhepatozyten (n = 1).....	124
Tabelle 17: IC <sub>50</sub> -Kurven von Digitonin, SDS, Triton X-100 mit WST bestimmt (n = 4-5) .....	125
Tabelle 18: IC <sub>50</sub> -Kurven von Digitonin, SDS, Triton X-100 mit LDH bestimmt (n = 4-5) .....	125
Tabelle 19: Zeitlicher Verlauf der EROD-Aktivität [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] .....	126
Tabelle 20: Zeitlicher Verlauf der BROD-Aktivität [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] .....	126
Tabelle 21: Zeitlicher Verlauf der PROD-Aktivität [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] .....	126
Tabelle 22: AROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten nach Behandlung mit Modellinduktoren (n = 16 / 16 / 5) [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ].....	127
Tabelle 23: EROD- und BROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten nach Behandlung mit Knoll-Substanzen für 48 h (n = 3-4) [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ].....	127
Tabelle 24: MROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten nach Behandlung mit Knoll-Substanzen für 48 h (n = 3) [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] .....	130
Tabelle 25: Testosteron-Hydroxylase-Aktivitäten (Modellinduktoren) [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] .....	131
Tabelle 26: Testosteron-Hydroxylase-Aktivitäten (Knoll-Substanzen) [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] .....	132
Tabelle 27: LAH-Aktivität [nmol·h <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] in Rattenhepatozyten (n = 3).....	134
Tabelle 28: GST-Aktivitäten [nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] in Rattenhepatozyten (n = 7).....	135
Tabelle 29: GST-Aktivitäten [nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] nach Behandlung mit Knoll-Substanzen (n = 3-4) .....	135
Tabelle 30: MUF-Aktivität [nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] in Rattenhepatozyten (n = 3) .....	136
Tabelle 31: HOBI-Aktivität [nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] in Rattenhepatozyten (n = 3) .....	137
Tabelle 32: PNP-Konjugation in Rattenhepatozyten [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ].....	138
Tabelle 33: Konjugation von PNP nach Behandlung mit Knoll-Substanzen [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ] (n = 3) .....	138

---

---

Tabelle 34: ACOX-Aktivitäten [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] in Rattenhepatozyten (n = 3).....	140
Tabelle 35: CAT-Aktivitäten [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] in Rattenhepatozyten (n = 4).....	141
Tabelle 36: Katalase-Aktivitäten [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] in Rattenhepatozyten (n = 2) ....	142

---

---

## Abkürzungsverzeichnis

3-MC	3-Methylcholanthren
ACOX	Acyl-CoA Oxidase
Ah	Aryl hydrocarbon
ARNT	Ah-receptor nuclear translocator
ARO	Aroclor 1254
AROD	Alkoxy-Resorufin-O-Dealkylase
BNF	$\beta$ -Naphthoflavon
BROD	Benzyloxy-Resorufin-O-Debenzylase
BSA	Rinderserumalbumin
CAR	Constitutive androstane oder active receptor
CAT	Carnitin-Acetyl-Transferase
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
CLO	Clofibrat
CIPRO	Ciprofibrat
CoA	CoenzymA
cpm	counts per minute
CPT	Carnitin-Palmitoyl-Transferase
CV	Kristallviolett
CYP	Cytochrom P450
DCF	2,7-Dichlorfluorescein diacetat
DDT	p,p'-Dichlordiphenyltrichlorethan
DEHP	Di-(2-ethylhexyl)phthalat
DEX	Dexamethason
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5-5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
EGTA	Ethylenglykol-bis-(aminoethyl)-tetraessigsäure
EROD	Ethoxy-Resorufin-O-Deethylase
EtOH	Ethanol
FKS	Fötale Kälberserum

---

---

Gluc	Glucuronid
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HAc	Essigsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HOBI	4-Hydroxybiphenyl
HPLC	High pressure liquid chromatography
HRP	Meerretich-Peroxidase
i.p.	Intraperitoneal
LA	Laurinsäure
LAH	Laurinsäurehydroxylierung
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LSC	Liquid scintillation counting (Flüssigszintillationsmessung)
M	Molar ( $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )
MeOH	Methanol
MROD	Methoxy-Resorufin-O-Demethylase
MUF	4-Methylumbelliferon
MW	arithmetischer Mittelwert
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NR	Neutralrot
OD	Optische Dichte-Einheit (Absorption)
OHLA	Hydroxy-Laurinsäure
OHT	Hydroxy-Testosteron
PAH	Polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PAPS	3'-Phospho-adenosin-5'-phosphosulfat
PB	Phenobarbital
PBS	Phosphate buffered saline
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCN	Pregnenolon-16 $\alpha$ -carbonitril
PNP	p-Nitrophenol
PNP-G	PNP-Glucuronid
PNP-S	PNP-Sulfat
p.o.	per os

---

---

PP	Peroxisomen Proliferator
PPAR	Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptor
PROD	Pentoxy-Resorufin-O-Depentylase
PXR	Pregnane X receptor
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SULT	Sulfotransferase
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-Tetrachordibenzo-1,4-dioxin
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	TritonX-100
U	Unit (Enzymsaktivitätseinheit)
UDP	Uridindiphosphat
UDPGA	UDP-Glucuronsäure
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
Upm	Umdrehungen pro Minute

---

# 1 Einleitung

Ein Aufgabenschwerpunkt der Arzneimitteltoxikologie in der pharmazeutischen Industrie ist die Untersuchung potentieller Wirkstoffe in der präklinischen Entwicklungsphase auf ihr Gefährdungspotential (Nebenwirkungen) für die Gesundheit des Menschen. Die meisten dieser behördlich vorgeschriebenen und validierten Tests finden am Ganztier, d.h. *in vivo*, statt. Im Rahmen der Bemühungen die Tierzahlen zu reduzieren und damit eine Kostensenkung und Beschleunigung der pharmazeutischen Entwicklung zu erreichen, wird verstärkt nach geeigneten *in vitro*-Methoden als Alternative zum Tierversuch gesucht.

## 1.1 Methoden der Hepatozytenkultivierung

Als Hauptorgan des Fremdstoffmetabolismus ist die Leber von besonderem Interesse für die Arzneimitteltoxikologie und daher werden Leberparenchymzellen (Hepatozyten) als *in vitro*-Modell zur Untersuchung von Stoffwechselfvorgängen häufig verwendet.

Das größte Problem bei der Kultivierung von Leberzellen ist die zunehmende Dedifferenzierung der Hepatozyten mit fortschreitender Kultivierungsdauer. Diese morphologische Veränderung des Phänotyps entsteht durch Veränderungen im Cytoskelett der Zellen und ist unter dem Mikroskop als „Abflachen“ der normalerweise kuboiden Hepatozyten (siehe Abbildung 1) zu beobachten. Mit der Dedifferenzierung einhergehend ist der Verlust bzw. die sowohl quantitative als auch qualitative Veränderung der Enzymausstattung und damit der metabolischen Kapazität der Zellen. So sinkt der CYP-Gehalt in Rattenhepatozyten nach 24 h in der Primärkultur auf 28% des ursprünglichen Wertes ab [1], wobei die verschiedenen Isoenzyme verschieden stark abgebaut oder inaktiviert werden. So wird die CYP 1A-Aktivität (z.B. EROD) als relativ stabil beschrieben, während im Gegensatz dazu die CYP 2B-abhängige PROD-Aktivität in der einfachen Zellkultur stark abfällt und kaum induzierbar ist [2].

Um die Funktionalität der Hepatozyten auf einem der *in vivo*-Situation möglichst nahen Niveau zu halten und der Dedifferenzierung entgegen zu wirken, werden verschiedene Kulturansätze verwendet.

---

### 1. Variation der extrazellulären Matrix:

Die Hepatozyten werden häufig in Collagen-beschichteten Kulturgefäßen kultiviert. Dies ermöglicht ein Anwachsen der Zellen an den Kulturträger, aber scheint nicht auszureichen alle leberspezifischen Funktionen der Hepatozyten zu erhalten.

Durch Anreicherung des Collagens mit Crude liver membrane fractions konnten einige CYP-Isoenzyme (1A, 2B, 2C6, 2C11, 3A und 4A) in der Rattenhepatozyten Primärkultur bis zu neun Tage fast auf dem Level der frisch isolierten Hepatozyten gehalten werden, während der Einsatz von Laminin oder Fibronectin keine Verbesserung gegenüber Collagen brachte [3]. Der Einsatz von Matrigel, einem Extrakt aus der extrazellulären Matrix eines Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkoms aus der Maus, bewirkte einen besseren Erhalt der Sekretion von Albumin (ein Marker für die Hepatozyten-Vitalität) und Transferrin und der Induzierbarkeit und den Gehalt von einigen CYP-Enzymen als Collagen [4].

### 2. Variation des Kulturmediums:

Auch die Wahl des Kulturmediums und der Zusätze spielt eine große Rolle bei der Erhaltung der leberspezifischen Funktionen. Häufig verwendete Medien sind William's E, DMEM und Chee's Medium (erhält Testosteron-Hydroxylase-Aktivitäten in Rattenhepatozyten Primärkultur besser als William's E [5]). Die Mediumzusätze sind sehr vielfältig und haben sehr unterschiedliche Wirkungen z.B. Natrium Pyruvat (stimuliert DNA-Synthese),  $\delta$ -Amino-Lävulinsäure (erhöht die Häm-Synthese und soll dadurch den CYP-Gehalt stabilisieren [6]), natürliche Hormone wie Insulin und Glucagon [1] oder künstliche wie DEX (niedrige Dosen an DEX ( $10^{-8}$  bis  $10^{-7}$  M) erhöhen die Induktion der CYP 2B1/2 mRNA-Expression durch PB [7]) oder zusätzliche Aminosäuren wie L-Prolin (erhält die Collagen-Synthese [8]).

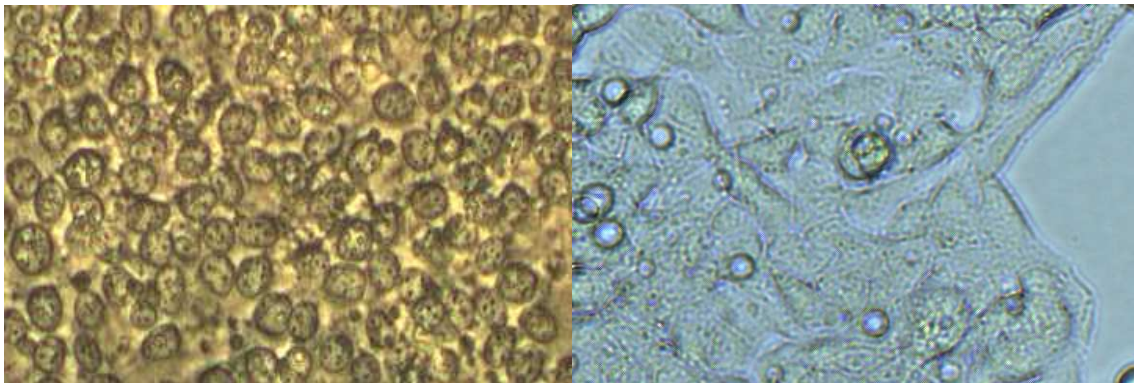
### 3. Zellkulturmodelle:

Das einfachste und am häufigsten verwendete Modell ist die Kultivierung der Hepatozyten in mit einem dünnen Collagenfilm ( $5-10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) beschichteten Kulturgefäß. Eine Erweiterung dieser Methode ist die Überschichtung der angewachsenen Zellen mit einer zweiten Collagenschicht (Sandwich). Dies soll die

---



räumliche Anordnung der Hepatozyten *in vivo* besser simulieren und die Dedifferenzierung verlangsamen. Dunn et al. konnten durch die Sandwich-Methode die Albumin-Sekretion in Hepatozyten noch nach 42 Tagen in Kultur nachweisen [9], während in der normalen Primärkultur die Albumin-Sekretion schon nach einer Woche nicht mehr detektierbar war und auch Kern et al. zeigten, dass durch die Sandwich-Kultur der Gehalt einiger Phase I- und Phase II-Enzyme deutlich stabilisiert werden konnte [10].



**Abbildung 1: Rattenhepatozyten nach 1 h bzw. 96 h in Kultur**

Ein ähnlicher Ansatz der auch das Ziel hat die geometrische Anordnung und die Zellkontakte in der Leber besser zu simulieren ist die Co-Kultur, in der Primärhepatozyten zusammen mit permanenten Zellen kultiviert werden. Rattenhepatozyten in Co-Kultur mit MS Epithelial Zellen, die aus Affen Nierenzellen (*Ceropithecus aethiops*) stammen, zeigten nach 10 Tagen in Kultur noch EROD, BROD und PROD-Aktivitäten. Im Gegensatz dazu war in reiner Primärkultur nach 7 Tagen keine der drei Aktivitäten mehr detektierbar [11].

Ein von der Aufarbeitung völlig anderes Zellkulturmodell für Hepatozyten ist die Verwendung von Leberschnitten. Hier werden aus der Leber zuerst zylinderförmige Stücke (Cores) mit einem Durchmesser von 2-10 mm herausgestanzt und diese dann in ca. 200 µm dünne Scheibchen (Slices) geschnitten. Die Vorteile dieser Kultur liegen im Erhalt der dreidimensionalen Gewebearchitektur und dem Vorhandensein aller Zelltypen (z.B. Kupffer-Zellen) der Leber [12]. Aber das System hat die Nachteile, dass der Gasaustausch und die Nährstoffversorgung durch das Medium im Innern der Slices eingeschränkt ist. Dieses Phänomen zeigt sich auch bei Substraten für enzymatische Reaktionen. So konnten in Ratten-Leberschnitten nach Inkubation mit Testosteron, 7-Ethoxycumarin oder CDNB die gleichen Metabolite

---

gefunden werden wie in der Rattenhepatozyten Primärkultur, aber bei vergleichbarer Zellzahl waren die Umsätze in den Slices viel geringer [13].

## 1.2 Fremdstoffmetabolismus

Lipophile Fremdstoffe (Xenobiotica), die über die Nahrung oder die Umwelt in den Organismus gelangen, werden enzymatisch metabolisiert (Biotransformation), um ihre Polarität zu erhöhen und damit die Ausscheidung über den Harn oder die Galle zu erleichtern.

Für die meisten Fremdstoffe läuft der Metabolismus in zwei Schritten ab. In der Phase I-Reaktion (Funktionalisierung) wird durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse eine funktionelle Gruppe in die Substanz eingeführt oder freigesetzt. In Phase II (Konjugation) erfolgt die enzymatische Konjugation dieser funktionellen Gruppe mit einer polaren Verbindung (z.B. Glutathion, Glucuronsäure oder Sulfat) [14].

### 1.2.1 Cytochrom P450 (Phase I)

Diese Enzymfamilie, die aus Hämproteinen mit Eisen als Zentralatom besteht, katalysiert viele der Phase I-Reaktionen in der Leber. Die meisten Cytochrom P450-Enzyme sind in der Membran des glatten Endoplasmatischen Reticulums (mikrosomale CYP) lokalisiert, einige in der inneren Mitochondrienmembran.

Es wurden bisher über 700 einzelne Enzyme aus den verschiedensten Spezies (z.B. Bakterien, Pilze, Pflanzen, Fische) isoliert [15]. Säugetiere besitzen mindestens 17 Cytochrom P450 Genfamilien, die aus 50 bis 60 individuellen Cytochrom P450 Genen bestehen [16].

1987 wurde von Nebert et al. ([17]) ein einheitliches Nomenklatorsystem eingeführt, das ständig aktualisiert wird. Die Einteilung in Familien und Subfamilien beruht auf dem Homologiegrad in der Aminosäuresequenz und ist unabhängig von der Herkunft (Spezies). Enzyme gehören zur gleichen Familie (1. Zahl), wenn die Sequenzhomologie >40% ist. Cytochrom P450-Enzyme, die eine Homologie >59% aufweisen, gehören derselben Subfamilie (Großbuchstabe) an. Die individuellen Enzyme werden mit einer 2. Zahl gekennzeichnet, wobei als Ausnahme

---

hochkonservierte Enzyme gleich bezeichnet werden, z.B. Ratten CYP 1A2 und Human CYP 1A2 haben „nur“ zu 75% identische Aminosäuresequenzen [18].

Die am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzyme gehören den Familien 1 bis 4 an. In der folgenden Tabelle sind einige Cytochrom P450-Familien, spezifische Reaktionen- oder Substrate und Modellinduktoren (für Ratten) angegeben.

**Tabelle 1: CYPs, Markerreaktionen und Modellinduktoren**

<b>CYP</b>	<b>Substrat/Reaktion</b>	<b>Induktor</b>
1A	EROD, MROD, (BROD), Benzo[a]pyren-Hydroxylase	TCDD, 3-MC, BNF, ARO, PAHs, Isosafrol
2B	PROD, (BROD), 16 $\beta$ -OHT	PB, Dieldrin, DDT
3A	6 $\beta$ -OHT, Erythromycin-N- Demethylase	Steroide, DEX, PCN
4A	LAH	Fibrate (CLO, CIPRO), DHEA, DEHP

Die Induktion dieser Cytochrom P450-Familien, d.h. die Erhöhung der Enzymaktivität läuft über rezeptorvermittelte gesteigerte Transkription der entsprechenden Gene ab. Diese Rezeptoren sind für die jeweiligen Familien spezifisch. Unter 1.3.1 wird das Prinzip der rezeptorvermittelten Induktion von Cytochrom P450-Enzymen anhand der PPAR $\alpha$ -vermittelten Induktion von CYP 4A näher erläutert.

### 1.2.2 UDP-Glucuronosyltransferase (Phase II)

Die Konjugation mit Glucuronsäure stellt die wichtigste Phase II-Reaktion da, weil sie mit vielen funktionellen Gruppen (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH) stattfinden kann und die UGT-Enzyme in fast allen Geweben (Leber, Niere, Darm enthalten die höchsten Konzentrationen) vorhanden sind. Das Cosubstrat UDP- $\alpha$ -Glucuronsäure (UDPGA) hat im Gegensatz zum Cosubstrat der Sulfatierung PAPS (aus schwefelhaltigen Aminosäuren) kaum einen limitierenden Einfluss auf die Konjugationsaktivität, da es in ausreichenden Menge aus Glucose-1-Phosphat synthetisiert werden kann [14].

Die Nomenklatur der UGT, die sich früher nach Modellsubstraten z.B. Bilirubin-UGT, Steroid-UGT richtete, ist mittlerweile an die Namensgebung bei den Cytochrom P450-Enzymen angepasst. Die UGT werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz in zwei Familien (1A und 2A, 2B) eingeteilt. Innerhalb einer Familie besteht mehr als 50% Homologie und weniger als 50% zur anderen Familie [19].

Die UGT 1-Familie enthält neun humane (UGT 1A1, 1A3-1A10) und sieben Ratten (UGT 1A1-1A3, 1A5-1A8) Isoenzyme [20]. Humane UGT 1-Enzyme werden durch fünf Exons eines einzigen Genes codiert, wobei vier (Exons 2-5) bei allen gleich sind und die carboxyterminale Sequenz codiert, die wahrscheinlich für die Bindung des Cosubstrats UDPGA verantwortlich ist, während das fünfte (Exon 1) durch alternatives Splicing den aminoternale Sequenz codiert, die die Funktion der Substratbindung hat. Die Struktur des UGT 1-Gens von Mäusen, Ratten und Hasen soll dem humanen Gen ähnlich sein [21]. Substrate sind Bilirubin, planare und nichtplanare Phenole und Amine.

Im Gegensatz zur UGT 1-Familie werden die Mitglieder der UGT 2-Familie durch voneinander unabhängige Gene codiert. Es wurden sechs humane (UGT 2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15 und 2B17) und sieben Ratten (UGT 2A1, 2B1-2B3, 2B6, 2B8 und 2B12) Isoenzyme identifiziert. Substrate sind z.B Steroide, Gallensäuren und Opiate (Morphin).

Die UGT sind auf der luminalen Seite des endoplasmatischen Reticulums lokalisiert und besitzen eine im Vergleich zu den Cytochrom P450-Enzymen breite und für die einzelnen Isoenzyme überlappende Substratspezifität. Aus diesem Grund ist es besser den Umsatz von früher als Modellsubstrate verwendeten Substanzen weniger für einzelne Enzyme, sondern besser als Marker für eine bestimmte Gruppe oder Familie anzusehen. Als Beispiele für diese überlappende Substratspezifität seien hier PNP und MUF erwähnt, die in der menschlichen Leber durch UGT 1A1, 1A3, 1A6 und 1A9 bzw. durch UGT 1A1, 1A3 und 1A9 umgesetzt werden [21].

---

### 1.3 Peroxisomen

Peroxisomen wurden in den 50er Jahren bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Nierenepithelzellen der Maus entdeckt und aufgrund ihrer Morphologie und ihrer damals noch unbekanntem Funktion als Microbodies bezeichnet. Der Name Peroxisom wurde von De Duve etabliert und folgendermaßen definiert: Membranbegrenzte Ansammlung von Wasserstoffperoxid-produzierenden Oxidasen und Katalase [22].

Peroxisomen sind ubiquitär vorkommende Zellorganellen, deren Morphologie, Häufigkeit und enzymatische Ausstattung stark variiert und sowohl spezies- als auch zellspezifisch ist [23]. In Rattenhepatozyten sind Peroxisomen oval bis länglich mit einem Durchmesser von 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  und enthalten z.T. kristalline Einschlüsse (Cores) aus Urat-Oxidase (dieses Enzym fehlt dem Menschen). Die Peroxisomen enthalten bis zu 50 Enzyme, die z.B. im Fettsäure-Abbau (Alternative zur mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation), D-Aminosäure-Abbau und Cholesterin- und Gallensäure-Stoffwechsel eine Rolle spielen (siehe Abbildung 2).

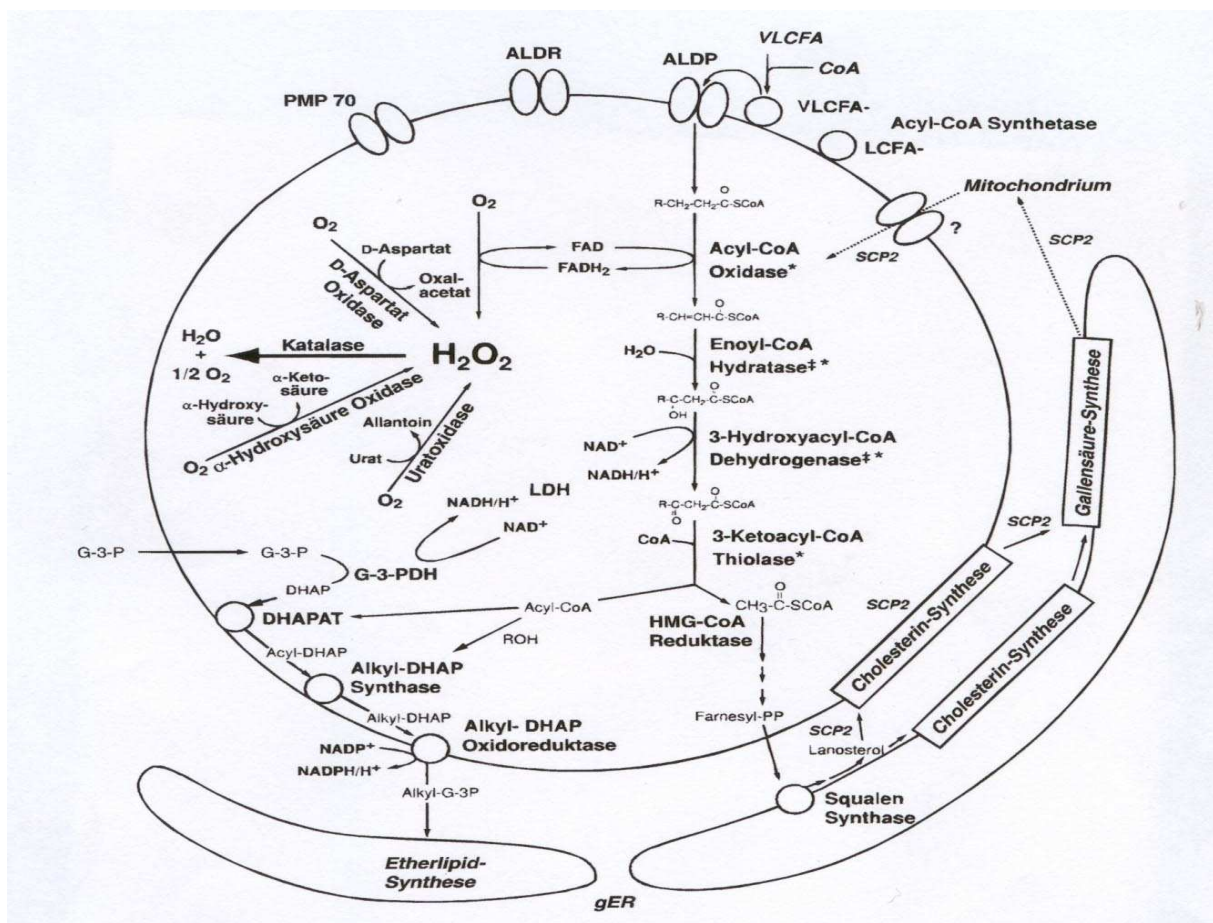


Abbildung 2: Stoffwechselwege in Peroxisomen [24]

**Legende zur Abbildung 2:**

**Substrate:** DHAP (Dihydroxyacetonphosphat), Farnesyl-PP (Farnesylpyrophosphat), G-3-P (Glycerin-3-Phosphat), LCFA (langkettige Fettsäure), ROH (langkettiger Alkohol), VLCFA (sehr langkettige Fettsäure).

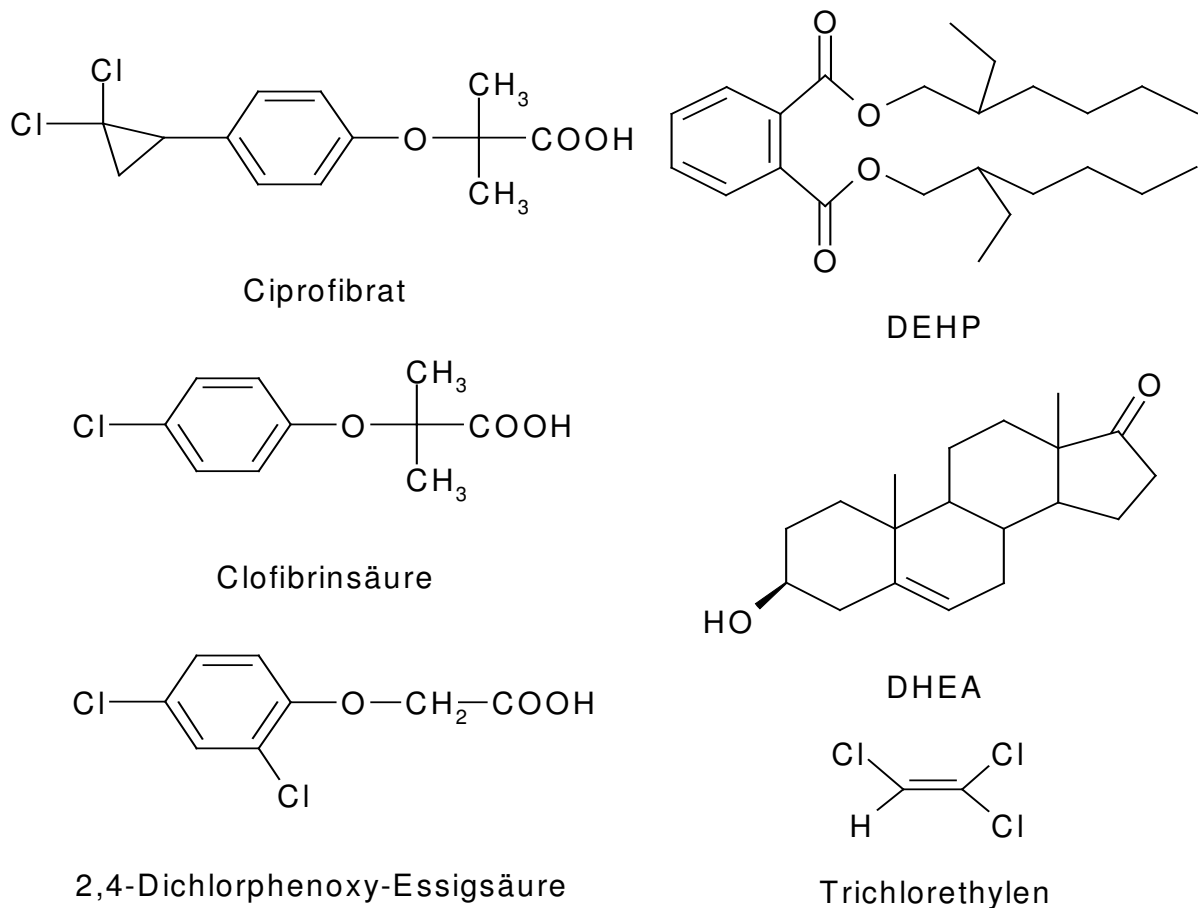
**Enzyme:** DHAPAT (Dihydroxyacetonphosphat-Acyltransferase), G-3-PDH (Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase), SCP2 (Sterol Carrier Protein 2), HMG-CoA Reduktase (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reduktase), LDH (Lactat Dehydrogenase).

**ABC-Transporter:** ALDP (Adrenoleukodystrophie Protein), ALDR (ALDP verwandtes Protein), PMP 70 (peroxisomales Membranprotein von 70 kDa)

### 1.3.1 Peroxisomenproliferation

Die Peroxisomenproliferation in der Ratte ist eine durch den Rezeptor PPAR $\alpha$ -vermittelte Reaktion auf die Behandlung mit Peroxisomen Proliferatoren (PP), die zu Hepatomegalie durch Hypertrophy und Hyperplasie der Hepatozyten führt und bei chronischer Exposition die Inzidenz von Lebertumoren erhöht. So wurden in einem Futtersuch mit Clofibrat an Ratten über 28 Monate in 90% der behandelten Ratten Lebertumore festgestellt [25]. Charakteristisch für die Peroxisomen-proliferation ist die Zunahme der Peroxisomenanzahl und -größe und die ausgeprägte Induktion von peroxisomalen, aber auch von mitochondrialen und mikrosomalen (z.B. CYP 4A) Enzymen in den Hepatozyten. Der Effekt von Peroxisomen Proliferatoren ist speziesspezifisch, Ratten und Mäuse reagieren ihnen gegenüber sehr sensitiv, während im Gegensatz dazu Meerschweinchen, Affen und Menschen nur eine schwache Reaktion zeigen [26].

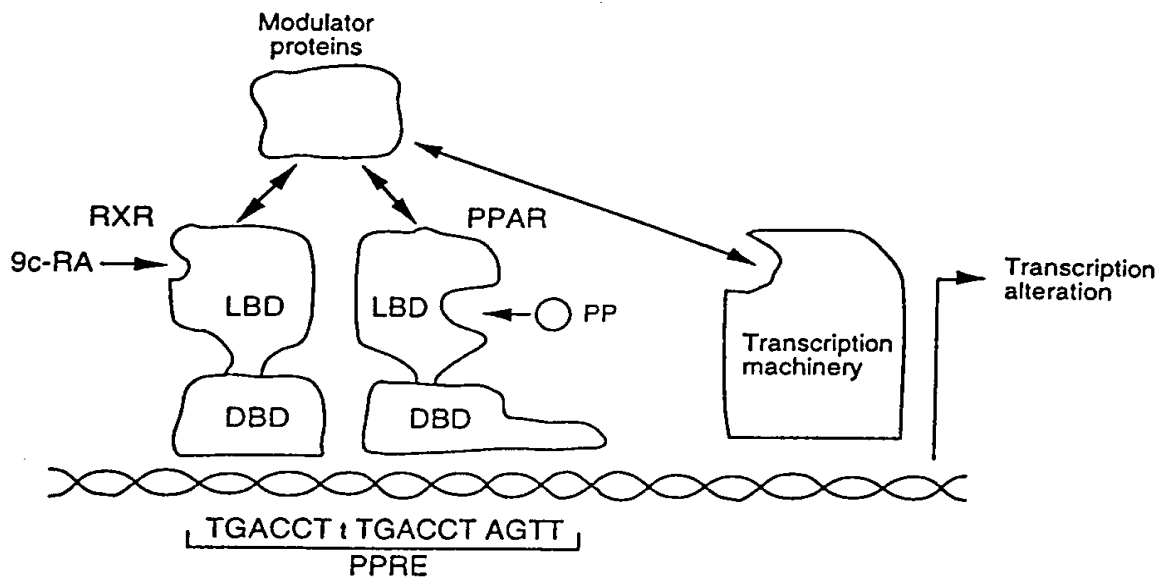
Zu den künstlichen Peroxisomen Proliferatoren zählen Substanzen aus verschiedenen Substanzklassen, z.B. Hypolipidämika wie die Fibrate, Kunststoffweichmacher wie DEHP, organische Lösungsmittel wie Trichlorethylen oder Herbizide wie 2,4-Dichlorphenoxy-Essigsäure (2,4-D). Natürliche Peroxisomen Proliferatoren sind langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolensäure oder Arachidonsäure und deren Derivate (Leukotriene) und das Steroidhormon DHEA. Auch körperliche Zustände wie Fasten oder fettreiche Ernährung können Peroxisomenproliferation auslösen [27].



**Abbildung 3: Strukturformeln einiger Peroxisomen Proliferatoren**

Die Induktion von Cytochrom P450 4A-Isoenzymen wird wie oben erwähnt über den PPAR $\alpha$ -Rezeptor vermittelt. Es gibt außer dem PPAR $\alpha$  noch zwei andere PPAR-Rezeptoren  $\beta$  (auch  $\delta$  genannt) und  $\gamma$  auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird.

PPAR-Rezeptoren sind cytosolische Rezeptoren, die zu der nuklearen Hormon Rezeptor Super-Familie gehören (z.B. Steroid, Thyroid, Retinoid). Der molekulare Mechanismus der Funktionsweise von PPARs ist dem der Steroidhormonrezeptoren ähnlich. Peroxisomen Proliferatoren binden im Cytoplasma an die PPAR-Rezeptoren. Der aktivierte PPAR-Rezeptor wird in den Zellkern transloziert und bildet mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) ein Heterodimer. Coaktivatoren z.B. der Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) oder das PPAR-bindende Protein (PBP) bzw. Repressoren binden an das Heterodimer und dieses lagert sich an PPAR Response Elemente (PPRE) an, die in der Promotorregion von Targetgenen liegen und die Transkription dieser Gene wird (z.B. CYP 4A oder peroxisomale Enzyme: Acyl-CoA Oxidase, Katalase) aktiviert [28].



**Figure** Modulation of gene transcription by a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). Ligand binding of the peroxisome proliferator (PP) leads to PPAR activation and heterodimerization with the retinoid X receptor (RXR), the receptor for 9-*cis*-retinoic acid (9c-RA). The PPAR-RXR heterodimer, through their DNA-binding domains (DBD), binds to the consensus sequence 5'-TGACCT T TGACCT AGTT-3' (or variant), with PPAR occupying the 3' position. Interactions between the PPAR-RXR heterodimer, modulator proteins, and the transcription machinery affect transcription initiation and mRNA abundance. LBD, ligand-binding domain; PPRE, peroxisome proliferator response element

**Abbildung 4: PPAR-vermittelte Transkription von Targetgenen**

### 1.3.2 Peroxisomen Proliferatoren und Hepatokanzerogenese

Peroxisomen Proliferatoren sind nicht-genotoxische Kanzerogene, die bei Langzeitbehandlung die Inzidenz von Hepatokarzinomen in Ratten und Mäusen erhöhen [25]. Zum Mechanismus der Tumorentstehung und -entwicklung gibt es einige Beobachtungen und Theorien.

Peroxisomen Proliferatoren verursachen in Ratten eine durch PPAR $\alpha$ -vermittelte erhöhte Transkription des Wasserstoffperoxid-produzierenden Enzyms Acyl-CoA Oxidase. Im Gegensatz dazu wird die Katalase, die das Wasserstoffperoxid entgiftet, kaum induziert [29]. Das überschüssige Wasserstoffperoxid könnte die Peroxisomen verlassen und in der Zelle zu Lipidperoxidation oder erhöhtem oxidativem Stress führen, indem z.B. aus dem Wasserstoffperoxid in einer Fenton-Reaktion mit Fe<sup>2+</sup>-Ionen das hochreaktive, mutagene Hydroxylradikal gebildet wird [14]. Hier liegt der



vielleicht entscheidende Unterschied zum Menschen, der insensitiv gegenüber Peroxisomen Proliferatoren ist, denn die humane ACOX-Gen Promotorsequenz unterscheidet sich in 3 Basen innerhalb des PPAR Response Elemente (PPRE) von der Ratte. Das führt dazu, dass PP zwar an den humanen PPAR $\alpha$  binden können, aber der aktivierte Rezeptor kann sich nicht an PPRE binden. Dadurch wird letztlich die ACOX-Aktivität nicht erhöht und damit auch nicht ein Überschuss an Wasserstoffperoxid gebildet [30]. Aufgrund der mangelnden Reaktion, d.h. Peroxisomen Proliferation, von Menschen auf die Behandlung mit PP z.B. Fibraten, scheint dadurch auch kein erhöhtes Risiko für den Menschen an Lebertumoren zu erkranken zu bestehen. Diese Hypothese wird in zahlreichen *in vitro*-Studien belegt, in denen humane Zell-Linien z.B. HepG2 oder humane Hepatozyten Primärkulturen auf die Behandlung mit zahlreichen PP kaum ansprechen (weder Peroxisomenproliferation noch Beeinflussung der Apoptose oder der DNA-Syntheserate) [31].

Zusätzlich zu der initiierenden Wirkung der PP durch den Überschuss an Wasserstoffperoxid in Nagern (Ratte, Maus) zeigen PP auch promovierende Eigenschaften, indem sie die Ausschüttung von Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) aus Kupffer-Zellen erhöhen. Diese erhöhten Mengen werden von den Hepatozyten aufgenommen und bewirken sowohl die Proliferation der Hepatozyten als auch die Inhibition, sowohl der spontanen als auch der induzierten Apoptose [32], [26].

---

## 2 Aufgabenstellung

Bei der Charakterisierung von Wirkstoffen in der pharmazeutischen Industrie spielen Tierversuche z.B. an Ratten oder Hunden immer noch eine tragende Rolle. Im Zuge der Reduzierung der Tierzahlen findet die Verwendung von Zellsystemen ein wachsendes Interesse. Besonders die Verwendung von isolierten Hepatocyten (z.B. aus Ratte, Hund oder Mensch) als Bestandteil von Metabolismus- oder Toxikologie-Studien ist ein attraktives *in vitro*-Modell, das z.B. auch vom European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) als geeignetes Zellsystem beschrieben wird [33].

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Hilfe der Rattenhepatozyten Primärkultur zu 16 Experimentalsubstanzen der Firma Knoll AG (jetzt Abbott GmbH) zusätzliche *in vitro*-Daten gewonnen werden.

Zunächst wurden vier in der Literatur häufig beschriebene Cytotoxizitäts-Assays auf ihre Sensitivität und Funktionalität in diesem Zellsystem überprüft. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden zwei Testsysteme ausgewählt und für die Bestimmung der Toxizität der 16 Knoll-Substanzen ( $IC_{50}$ -Konzentration) verwendet.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Modulation, insbesondere die Induktion, fremdstoffmetabolisierender Enzyme (Cytochrom P450 und Phase 2-Enzyme) durch diese Substanzen untersucht werden. Dazu wurden zunächst die verwendeten Assays mit aus der Literatur bekannten Modell-Induktoren [34], [35] auf ihre Sensitivität und Spezifität geprüft. Danach sollten verschiedene Konzentrationen der 16 Knoll-Substanzen eingesetzt werden und ihr Einfluss auf die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme bestimmt werden. Als oberste Grenze sollten die im ersten Teil der Arbeit gefundenen  $IC_{50}$ -Werte benutzt werden.

Abschließend sollte die Frage geklärt werden, ob vier Knoll-Substanzen (201640, 409499, 418585, 420627), die aufgrund ihrer *in vivo* gemessenen Erhöhung der Laurinsäurehydroxylierung auffällig waren, peroxisomenproliferierende Aktivität besitzen. Dazu wurde der Einfluss dieser vier Substanzen auf drei peroxisomale Enzyme (ACOX, CAT, Katalase) mit der Wirkung bekannter Peroxisomen Proliferatoren [36] verglichen.

---

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Knoll-Substanzen

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen, die im weiteren Verlauf nur noch mit ihrem Substanz-Code bezeichnet werden, handelt es sich um Entwicklungskandidaten aus verschiedenen Therapiegebieten und präklinischen bzw. klinischen Entwicklungsstufen. Diese Knoll-Substanzen wurden in der toxikologischen Abteilung der Knoll AG schon auf ihren Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus *in vivo* (Mikrosomen) untersucht. Die Ergebnisse aus diesen 4-Wochen-Toxizitätsstudien an Wistar Ratten werden in folgender Tabelle wiedergegeben. Zum besseren Vergleich werden bei den jeweiligen Assays die Erhöhungen relativ zur Kontrolle (Vehikel) aus einer in der Knoll AG durchgeführten Studie mit Modellinduktoren (siehe Tabelle 2) angegeben.

**Tabelle 2: Änderung der Enzym-Aktivitäten relativ zur unbehandelten Kontrolle (*in vivo*)**

<b>Assay</b>	<b>BNF</b>	<b>PB</b>	<b>DEX</b>	<b>CLO</b>
EROD	<b>46</b>	3,5	3,7	1,7
PROD	3,5	<b>55</b>	6,8	5,1
BROD	<b>15</b>	<b>53</b>	7,5	5,3
6β-OHT	0,7	2,2	<b>2,8</b>	2,0
11-OHLA	0,8	1,1	1,4	<b>3,9</b>
12-OHLA	0,7	0,7	1,2	<b>6,0</b>
GST (CDNB)	2,1	<b>2,2</b>	1,3	0,6
MUF	<b>5,5</b>	2,5	1,2	0,7
HOB1	2,1	<b>4,1</b>	2,1	1,4

Behandlungsschema für den Versuch mit den Modellinduktoren:

60 mg BNF/kg Körpergewicht/Tag (i.p.) für 14 Tage

80 mg PB/kg Körpergewicht/Tag (p.o.) für 14 Tage

80 mg DEX/kg Körpergewicht/Tag (i.p.) für 6 Tage

400 mg CLO/kg Körpergewicht/Tag (i.p.) für 14 Tage

Pro Gruppe wurden 5 männliche Wistar Ratten eingesetzt.

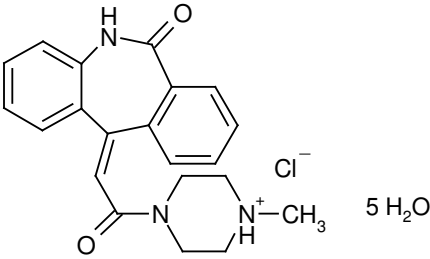
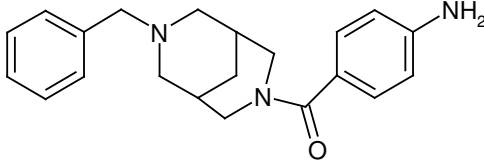
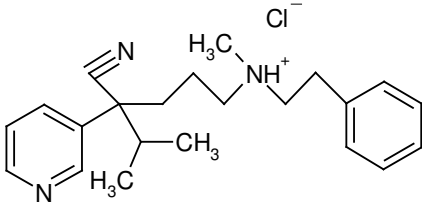
Tabelle 3: Einfluss der Knoll-Substanzen auf Enzym-Aktivitäten (*in vivo*)

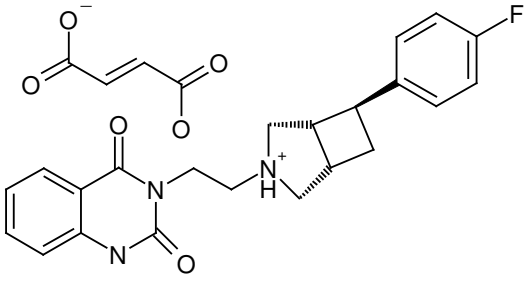
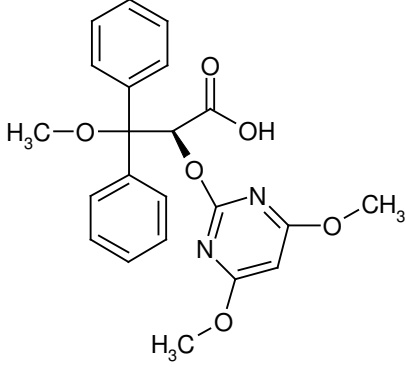
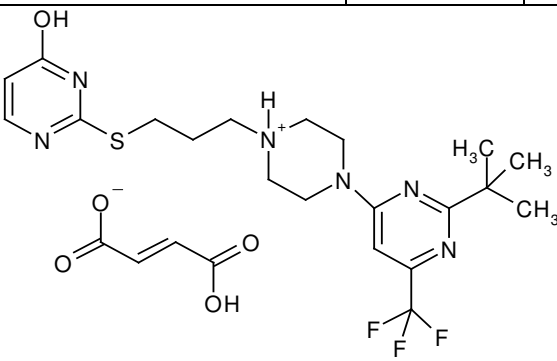
	<b>EROD</b>	<b>PROD</b>	<b>BROD</b>	<b>6<math>\beta</math>- OHT</b>	<b>11- OHLA</b>	<b>12- OHLA</b>	<b>GST</b>	<b>MUF</b>	<b>HOB1</b>
<b>Induktor</b>	<b>BNF 46</b>	<b>PB 55</b>	<b>BNF 15 PB 53</b>	<b>DEX 2,8</b>	<b>CLO 3,9</b>	<b>CLO 6,0</b>	<b>PB 2,2</b>	<b>BNF 5,5</b>	<b>PB 4,1</b>
<b>45966</b>	1,0	<b>39</b>	<b>57</b>	nd	nd	nd	2,2	nd	nd
<b>47110</b>	<b>5,2</b>	<b>18</b>	<b>35</b>	nd	nd	nd	<b>2,8</b>	nd	nd
<b>53876</b>	<b>5,6</b>	<b>101</b>	<b>119</b>	nd	nd	nd	1,0	nd	nd
<b>111995</b>	2,4	<b>21</b>	<b>33</b>	nd	nd	nd	2,0	nd	nd
<b>135252</b>	<b>7,1</b>	<b>173</b>	<b>111</b>	1,4	2,1	1,4	<b>2,7</b>	<b>3,1</b>	<b>7,3</b>
<b>201640</b>	1,7	8,3	3,5	1,5	<b>3,5</b>	<b>4,6</b>	1,5	1,3	2,0
<b>208075</b>	1,0	1,2	0,8	1,1	1,1	1,0	1,1	1,1	1,3
<b>208791</b>	0,8	1,7	1,0	0,5	1,5	1,7	1,2	0,9	0,8
<b>223651</b>	1,0	1,0	0,9	1,1	1,1	1,2	0,9	0,8	1,0
<b>409499</b>	2,7	<b>51</b>	<b>55</b>	nd	<b>2,9</b>	<b>3,7</b>	<b>2,6</b>	<b>4,7</b>	<b>4,4</b>
<b>411693</b>	1,0	1,1	0,9	0,9	1,1	1,2	1,2	1,2	1,0
<b>418585</b>	1,8	<b>74</b>	<b>51</b>	nd	<b>4,8</b>	<b>11</b>	1,6	2,6	2,3
<b>420627</b>	2,7	1,4	1,1	0,7	<b>2,5</b>	<b>2,8</b>	1,9	2,2	2,0
<b>433220</b>	2,0	3,7	2,3	nd	1,4	1,2	<b>2,2</b>	<b>4,1</b>	<b>3,1</b>
<b>448698</b>	2,6	<b>28</b>	<b>30</b>	nd	<b>2,5</b>	<b>2,6</b>	<b>2,5</b>	<b>3,3</b>	<b>4,0</b>
<b>466506</b>	2,7	1,5	1,5	nd	1,5	1,3	1,7	2,7	2,6

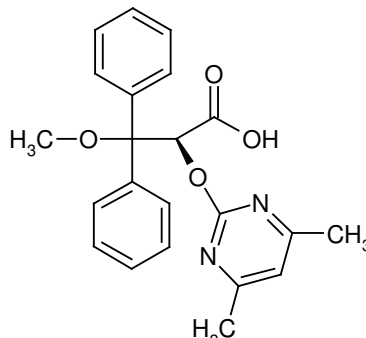
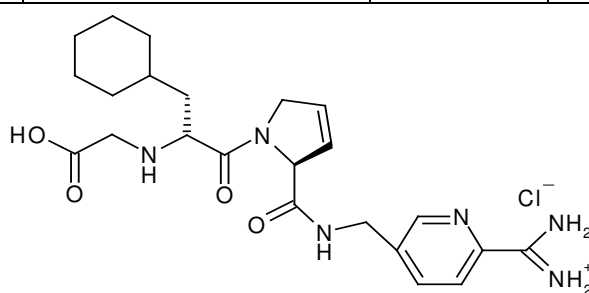
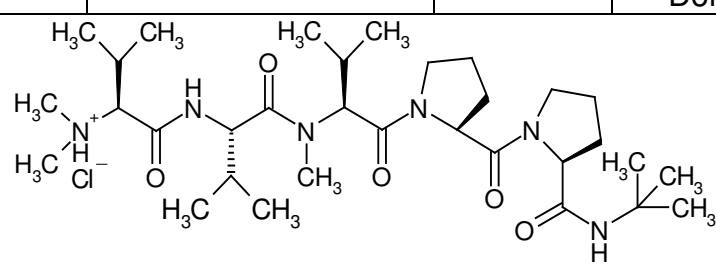
Die Werte sind Induktionsfaktoren relativ zur jeweiligen Kontrolle; nd = not determined

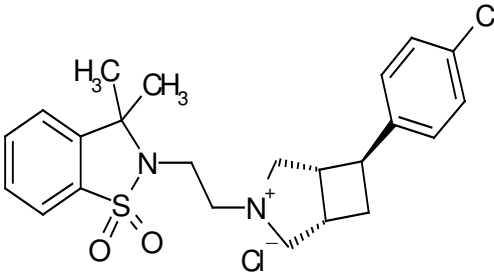
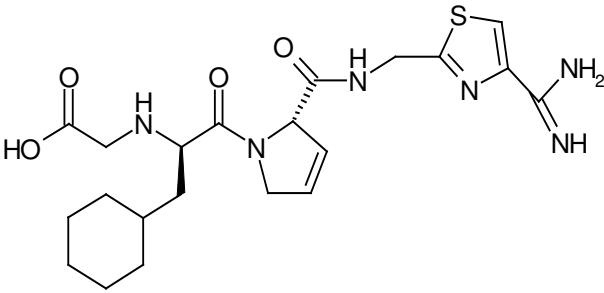
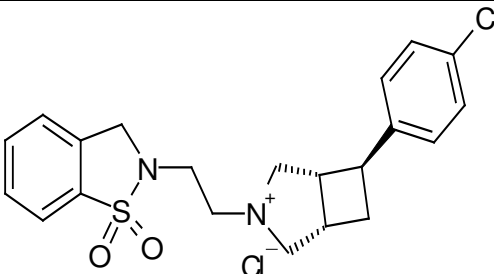
In der folgenden Übersicht werden einige Daten zu den Knollsubstanzen und ihren Eigenschaften wiedergegeben.

Tabelle 4: Eigenschaften der Knoll-Substanzen

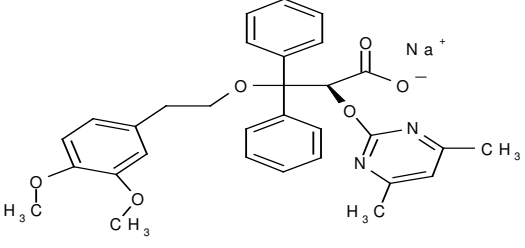
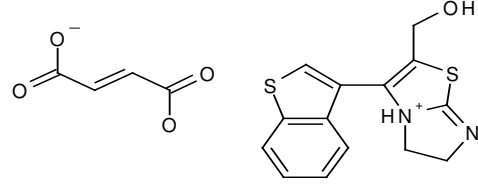
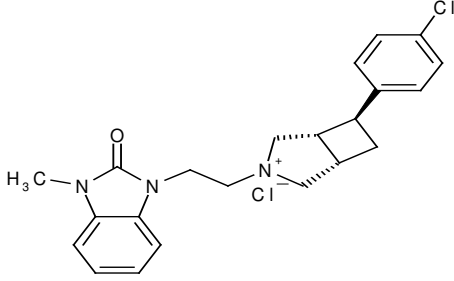
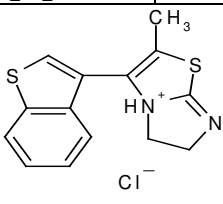
Substanz Code	Chemische Formel	Molmasse [g/mol]	Anwendung Bemerkungen
<b>Strukturformel</b>			
<b>INN (Freiname); chemischer Name</b>			
<b>LU 45966</b>	$C_{21}H_{22}N_3O_2 \cdot Cl \cdot 5 H_2O$	474,0	Anti-Cholinergikum; Dibenzazepin-derivat
			
Darenzepin; Z-1[(5,6-Dihydro-6-oxo-11H-dibenz [b,e]-azepin-11-yliden)-acetyl]-4-methyl- piperazin-hydrochlorid-pentahydrat			
<b>LU 47110</b>	$C_{21}H_{25}N_3O$	335,5	Klasse III- Antiarrhythmikum
			
Ambasilid; 4-Amino-[N-(7-benzyl-3,7-diaza-bicyclo[3.3.1]non-3-yl)]-Benzamid			
<b>LU 53876</b>	$C_{22}H_{30}N_3 \cdot Cl$	372,0	???
			
-; (4-Cyano-5-methyl-4-pyridin-3-yl-hexyl)-methyl-phenethyl-ammonium Hydrochlorid			

<b>BSF 111995</b>	$C_{22}H_{23}FN_3O_2 \cdot C_4H_3O_4$	495,5	Dopamin D <sub>4</sub> - und 5-HT <sub>2A</sub> Rezeptor-Antagonist
			
<p>Belaperidon;          (+)-(1S, 5R, 6S)-Exo-3-(2-(6-(4-fluorphenyl)-3-aza-bicyclo(3.2.0)heptan-3-yl)-ethyl)-1H,3H-chinazolin-2,4-dion Fumarat</p>			
<b>LU 135252</b>	$C_{22}H_{22}N_2O_6$	410,4	ET <sub>A</sub> -Rezeptor-Antagonist; Bluthochdruck
			
<p>Darusentan;          (+)-(S)-2-(4,6-Dimethoxy-pyrimidin-2-yloxy)-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionsäure</p>			
<b>BSF 201640</b>	$C_{20}H_{28}F_3N_6OS \cdot C_4H_3O_4$	572,6	Dopamin D <sub>3</sub> -Rezeptor-Antagonist
			
<p>-;          2-(3-(4-(2 tert-Butyl-6-trifluoromethyl-pyrimidin-4-yl)-piperazin-1-yl)-propylsulfanyl)-3H-pyrimidin-4-on Fumarat</p>			

<b>BSF 208075</b>	$C_{22}H_{22}N_2O_4$	378,4	ET <sub>A</sub> -Rezeptor-Antagonist; Bluthochdruck
			
<p>Ambristentan; (+)-(S)-2-(4,6-Dimethyl-pyrimidin-2-yloxy)-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionsäure</p>			
<b>BSF 208791</b>	$C_{23}H_{33}N_6O_4 \cdot Cl$	493,0	Oraler Thrombininhibitor; (Tripeptid-Analogen)
			
<p>;- (2-(2-[6-(Amino-iminomethyl)-pyridin-3-ylmethylcarbamoyl]-2S-2,5-dihydropyrrol-1-yl)-1R-1-cyclohexylmethyl-2-oxo-ethylamino)-Essigsäure-Hydrochlorid</p>			
<b>BSF 223651</b>	$C_{32}H_{59}N_6O_5 \cdot Cl$	643,3	Cytostaticum; Analogon von Dolastatin 15
			
<p>;- N-Dimethyl-Val-Val-Methyl-Val-Pro-Pro-tert.-Butylamidhydrochlorid</p>			

<b>BSF 409499</b>	$C_{23}H_{28}ClN_2O_2S \cdot Cl$	467,5	Dopamin D <sub>4</sub> - Rezeptor- Antagonist
			
-; 6-(4-Chlorphenyl)-3-[2-(3,3-dimethyl-1,1-dioxo-1,3-dihydro- benzo[d]isothiazol-2-yl)-ethyl]-3-azonia-bicyclo[3.2.0]heptan Hydrochlorid			
<b>BSF 411693</b>	$C_{21}H_{30}N_6O_4S$	462,6	Oraler Thrombininhibitor
			
-; (2-{2-[(4-Carbamimidoyl-thiazol-2-yl)methyl]-carbamoyl}-2,5-dihydro-pyrrol- 1-yl)-1-cyclohexylmethyl-2-oxo-ethylamino)-Essigsäure			
<b>BSF 418585</b>	$C_{21}H_{24}ClN_2O_2S \cdot Cl$	439,4	Dopamin D <sub>4</sub> - Rezeptor- Antagonist
			
-; 6-(4-Chlor-phenyl)-3-[2-(1,1-dioxo-1,3-dihydro-benzo[d]isothiazol-2-yl)- ethyl]-3-azonia-bicyclo[3.2.0]heptan Hydrochlorid			



<b>BSF 420627</b>	$C_{31}H_{31}N_2O_6 \cdot Na$	550,6	ET <sub>A/B</sub> -Rezeptor-Antagonist
			
-; (+)-(S)-Natrium; 3-(2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-ethoxy)-2-(4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl-oxo)-3,3-diphenyl-propionat			
<b>BSF 433220</b>	$C_{14}H_{13}N_2OS_2 \cdot C_4H_3O_4$	407,7	Anti-Obesitas
			
-; 2-Hydroxymethyl-3-(5-methyl-4-propenyl-thiophen-3-yl)-5,6-dihydroimidazo[2,1-b]thiazol-4-ium-Fumarat			
<b>BSF 448698</b>	$C_{22}H_{25}ClN_3O \cdot Cl$	418,4	Dopamin D <sub>4</sub> -Rezeptor-Antagonist
			
-; 6-(4-Chlor-phenyl)-3-[2-(3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-benzoimidazol-1-yl)-ethyl]-3-azonia-bicyclo[3.2.0]heptan Hydrochlorid			
<b>BSF 466506</b>	$C_{14}H_{13}N_2S_2 \cdot Cl$	308,9	Anti-Obesitas
			
-; 3-(Benzo [b]thiophen-3-yl)-2-methyl-5,6-dihydroimidazo[2,1-b]thiazol Hydrochlorid			

## 3.2 Chemikalien

Acetyl-Coenzym A (Trilithiumsalz)	Merck
Androstendion	Sigma
Benzoxo-Resorufin	Sigma
BSA	Roth
L-Carnitin	Sigma
1-Chlor-2,4-dinitro-benzol	Fluka
Chloroform	Merck
Ciprofibrat	Sigma
Collagen (Rattenschwanz)	Roche
Collagenase (Typ IV)	Roche
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva
Dexamethason	Fluka
DHEA	Sigma
Diethylether	J.T.Baker
Digitonin	Sigma
N, N-Dimethylformamid	Merck
5-5´-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)	Sigma
DMSO	Merck
DMEM	Gibco BRL
EGTA	Fluka
Essigsäure	J.T.Baker
Ethanol (absolut)	Merck
Ethoxy-Resorufin	Sigma
FKS (europäischer Ursprung)	Greiner
Folin Ciocalteus Phenolreagenz	Merck
$\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase	Roche
D-Glukose (wasserfrei)	Merck
Glutathion	Sigma
Glycin	Biomol
Glycyl-Glycin	Sigma
HEPES	Merck
Hydrocortison	Sigma

---

---

4-Hydroxy-biphenyl	Sigma
Hydroxy-Testosteron-Standards (2 $\alpha$ ; 2 $\beta$ ; 6 $\alpha$ ; 6 $\beta$ ; 7 $\alpha$ ; 16 $\alpha$ ; 16 $\beta$ )	Steraloids Inc.
15 $\beta$ -Hydroxy-Testosteron	Sigma
Imidazol	Serva
Insulin	Sigma
ITS Liquid Media Supplement (100x)	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kristall Violett	Sigma
[1- <sup>14</sup> C]-Laurinsäure (1,85 MBq/ml)	Amersham
Laurinsäure	Sigma
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Meerrettich-Peroxidase (Typ IV)	Sigma
Methanol	Merck
Methoxy-Resorufin	Sigma
3-Methylcholanthren	Fluka
4-Methylumbelliferon	Serva
MTT-Fertigkit	Roche
NADH <sub>2</sub>	Serva
NADPH <sub>2</sub>	Serva
$\beta$ -Naphthoflavon	Sigma
Narcoren® (Pentobarbital-Natrium)	Rhone Merieux
Natriumacetat (wasserfrei)	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Neutral Rot	Sigma
[U- <sup>14</sup> C]-p-Nitrophenol (3,7 MBq/2,1 mg)	Sigma
p-Nitrophenol	Sigma
PBS Tabletten	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Roche
Pentoxy-Resorufin	Sigma
Phosphorsäure (85%)	Merck

---

---

PNP-Glucuronid	Merck
PNP-Sulfat (Kaliumsalz)	Merck
Pyruvat (Natriumsalz)	ICN
Resorufin	Sigma
Salzsäure (rauchend 37%)	Merck
SDS	Merck
Szintillationscocktail Ultima Gold XR	Packard
[4- <sup>14</sup> C]-Testosteron (1,48 MBq/ml)	NEN
Testosteron	Sigma
Tetrahydrofuran	J.T.Baker
Titanoxysulfat Schwefelsäure-Lösung	Fluka
Triethylamin	J.T.Baker
TRIS	Merck
Triton X-100	Serva
Trypan Blau (0,4%) in 0,9 % NaCl-Lösung	Sigma
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck
WST-1-Fertigkit	Roche

---

### 3.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### Abdampfapparatur

TCS-Trockentemperiersystem Barkey

#### Autoklav

Webeco 1000 Webeco

#### Brutschrank

Heraeus 6220; 6060 Heraeus

#### Festphasenextraktion

Sep-Pak Cartridge (C<sub>18</sub>) Waters

#### Fluoreszenz-Spektrometer

Fluorstar BMG Lab Tech.

#### Gefäße

Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 ml Eppendorf

PP-Röhrchen 15; 50 ml Greiner

Glasgefäße Schott

#### HPLC

##### Anlage

L-6200 Gradienten-Pumpe Merck

L-4200 UV/VIS-Detektor Merck

L-7305 Säulenofen Merck

Ramona Radioaktivitätsdetektor Raytest

##### Zubehör

Silicon PTFE-Septen (geschlitzt) Merck

HPLC-vials (Glas) Abimed

##### Vorsäulen

LiChrospher® 100 RP-18 5 µm 4 x 25 mm Merck

Sentry Guard column Symmetry® C<sub>8</sub> 5 µm 3,9 x 20 mm Waters

Sentry Guard column Symmetry® C<sub>18</sub> 5 µm 3,9 x 20 mm Waters

##### Säulen

Symmetry® C<sub>8</sub> 5 µm, 4,6 x 250 mm Waters

Symmetry® C<sub>18</sub> 5 µm, 4,6 x 250 mm Waters

µBondapak C18 10 µm, 3,9 x 300mm Waters

**Mikroskop**

IMT-2

Olympus

**pH-Meter**

WTW pH 526

WTW Lab.technik

**Photometer**

Thermomax

Molecular Devices

**Pipetten**

Sterile Einmal-Pipetten 2; 5; 10; 25; 50 ml

Greiner

**Pipettierroboter**

Biomek 2000

MWG

**Pumpen**

Vakuumpumpe Neuberger Miniport

Brand

Peristaltische Pumpe Istamec MCMS3

Fisher Scientific

**Perfusionsvorrichtung**

OP-Besteck

Aesculap

Braunüle MT

Braun Melsungen

ES Mull-Kompressen 10x10 cm sterilisiert

Hartmann

Glänzhäkelgarn Nr. 30

Mez AG

Nylon-Siebgewebe (Thomoplast) 100 µm; 250 µm

Reichelt Ch.techik

Leukosilk-Gewebeband

Beiersdorf

Silikon-Schläuche

Reichelt Ch.techik

Luftblasenfalle

Glasbläserei

**Kanülen**

Terumo Neolus Nr. 1 gelb (0,9x40 mm)

Fisher Scientific

Terumo Neolus Nr. 16 blau (0,6x25 mm)

Fisher Scientific

**Einmalspritzen**

Soft-Ject HSW 1 ml

Fisher Scientific

Omnifix 10 ml

Braun Melsungen

**Schüttler**

Easia shaker

Medgenix Diagn.

**Sterile Werkbank**

Hera safe

Heraeus

**Sterilfilter**

VacuCap® 90 (0,2 µm) (Art. 4622)

GelmanSciences

Bottletop 150 ml (0,22 µm)

Nalgene

**Sterilspritzenfilter**

Millex®-GS (0,22 µm) (Art. SLGS 025 BS) Millipore

Millex®-GV (0,22 µm) low-binding (Art. SLGV R25 LS) Millipore

**Szintillationszählgerät**

Tricarb 2200 CA Packard

**Ultraschallbad**

Sonorex Super RK 102 P Bandelin

**Ultraschallgerät**

Branson Sonifier 250 Heinemann

**Vortex**

Heidolph RGL100 Heidolph

**Waagen**

Type 1413 Sartorius

MCBA 100 Sartorius

**Wärmeschrank**

Function line 7000 Heraeus

**Wasserbad**

SW-20C Julabo

**Zählkammer**

Fuchs-Rosenthal-Kammer Brand

**Zellkultur**

Weiß 96well-Platten (TC), klarer Boden Costar

Schwarze 96well-Platten Dynex

96well klar (TC) Greiner

6well Makroplatte (TC) Greiner

100 mm Petrischale(TC) Greiner

Zellschaber 25 cm, steril Greiner

Pipettierhilfe Pipettus akku Hirschmann Labor

**Zentrifuge**

Megafuge 1R Heraeus

6K15 (N<sub>2</sub> begasbar) Sigma

Eppendorf 5415 Eppendorf

---

## 3.4 Präparation von Rattenhepatozyten

### 3.4.1 Lösungen für die Leberperfusion

#### Perfusionspuffer

NaCl	6,30 g
KCl	0,32 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,27 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,81 g
HEPES	3,58 g
D-Glucose (wasserfrei)	1,50 g

auf 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auffüllen

#### Präperfusionslösung (PP1)

EGTA	38 mg
------	-------

zu 1 l Perfusionspuffer; 1 N NaOH auf pH 7,2; sterilfiltrieren (dadurch steigt pH auf 7,4)

#### Collagenaselösung (PP2)

CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,58 g
--	--------

zu 1 l Perfusionspuffer; 1 N NaOH auf pH 7,2; sterilfiltrieren

#### Waschlösung (WP)

CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,58 g
BSA	20,0 g

zu 1 l Perfusionspuffer; 1 N NaOH auf pH 7,2; sterilfiltrieren

---



**Narcoren-Lösung**

Natrium-Pentobarbital 16% (w/v) 1:3 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> verdünnt (53,3 mg/ml)

**Trypanblau-Lösung**

500 µl Trypanblau-Lösung + 500 µl WP

**3.4.2 Versuchstiere**

Für die Leberperfusion wurden männliche Wistar Ratten (Janvier) mit einem Körpergewicht von 220-300 g verwendet. Die Tiere wurden unter Einhaltung des gültigen Tierschutzgesetzes in Makrolon-Käfigen in Tierlaborräumen der Firma Abbott GmbH gehalten und hatten *ad libitum* Zugang zu Futter (Trockenfutter Altromin) und Trinkwasser.

**3.4.3 Isolierung von Rattenhepatozyten**

Die verwendete Methode zur Gewinnung der Hepatozyten basiert auf der durch Seglen etablierten zweistufigen *in situ* Leberperfusion [37, 38].

Vor Beginn der Präparation wurden die sterilfiltrierten Lösungen (PP1, PP2) in einem Wasserbad auf 42°C vortemperiert und das OP-Besteck, die Glasgefäße und sonstige Hilfsmittel, falls sie nicht autoklaviert waren, mit 70% EtOH desinfiziert. Nach dem Aufbau der gesamten Apparatur wurde die Ratte durch eine i.p.-Injektion Narcoren (Dosierung: (0,1 ml/100 g Körpergewicht) + 0,1 ml) narkotisiert. Nach 5-10 min wurde mit der Präparation begonnen.

Zunächst wurde die Bauchseite mit 70% EtOH eingesprüht, dann wurde die Bauchhöhle bis zum Sternum aufgeschnitten, ohne dabei das Zwerchfell zu verletzen, und die Leber mit ihren Zugängen durch Beiseiteschieben des Verdauungstraktes freigelegt. Danach wurde eine lose Ligatur um die Pfortader (*Vena portae*) gelegt und die Ader kurz unterhalb davon mit einer Braunüle (Metallkanüle mit abnehmbarer Kunststoffummhüllung; an das Schlauchsystem mit den Perfusionslösungen verbunden; Fluss ca. 1 ml/min) angestochen. Die Braunüle wurde mit der Ligatur fixiert und die Metallkanüle wurde aus der Pfortader entfernt.

---

Gleich darauf wurde die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) geöffnet, um den Abfluss des Blutes und des Perfusates zu ermöglichen.

1. Schritt: Die Leber wurde zunächst 2 min bei einem Fluss von ca. 50 ml/min mit Präperfusionspuffer PP1 bis zur vollständigen Entblutung durchspült (Verfärbung der Leber von dunkelrot nach hellbraun). Dann wurde der Fluss auf ca. 40 ml/min gesenkt und die Leber weitere 2-3 min perfundiert, um die Komplexbildung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch EGTA und damit die Auflösung der Desmosomen zu vervollständigen.

2. Schritt: Währenddessen wurde eine Collagenase-Lösung (0,5 mg/ml Collagenase D in 250-300 ml PP2; sterilfiltriert) angesetzt und im Anschluss für die Perfusion (Fluss ca. 45 ml/min, Dauer 5-7 min) benutzt. Die zugesetzte Collagenase bewirkte eine Auflösung der extrazellulären Matrix und die Freisetzung der Hepatozyten aus dem Leberparenchym. Dies zeigte sich durch die Ausbildung einer netzartigen Oberflächenstruktur auf der Leber.

Danach wurde die Perfusion beendet und die Leber vorsichtig, ohne die Leberkapsel zu verletzen, in ein Becherglas mit 40 ml WP-Puffer überführt. Die weiteren Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Leberkapsel wurde mit einer Pinzette geöffnet und die so gewonnene Zellsuspension wurde auf eine sterile Kompresse gegeben und mit 160 ml WP-Lösung nachgespült. Das Filtrat wurde für 30 min auf Eis gestellt und mehrmals geschüttelt. Danach wurde die Suspension auf 4 x 50 ml sterile PP-Röhrchen verteilt und zur Abtrennung der toten Zellen bei 50g, 4°C für 2 min zentrifugiert. Der Überstand mit den toten Zellen wurde abgesaugt und die Pellets in je 25 ml Waschpuffer (4°C) resuspendiert.

Die Filtrations- und Zentrifugationsschritte wurden noch zweimal wiederholt, wobei anstelle der Kompresse dann ein 250 µm- und dann ein 100 µm-Siebgewebe verwendet wurde. Abschließend wurden die Zellpellets mit Waschpuffer zu insgesamt 50 ml Hepatozytensuspension ergänzt.

---

### 3.4.4 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität

Die Gesamtzellzahl und die Vitalität der Hepatozytensuspension wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (Tiefe 0,2 mm; die kleinsten Quadrate haben eine Fläche von 0,0625 mm<sup>2</sup> ③ Volumen 0,0125 µl ③ Kammerfaktor 80) bestimmt. Dazu wurden 50 µl der Suspension (vorher vorsichtig aufgeschüttelt) mit 1 ml der Trypanblau-Lösung vermischt (Verdünnung 1:21) und 1-2 min bei RT stehen gelassen. Danach wurden ca. 20 µl auf die Zählkammer aufgegeben und unter dem Mikroskop (100 x-Vergrößerung) betrachtet. Es wurden jeweils 3 Felder mit 16 Kleinstquadraten ausgezählt.

Mit Hilfe folgender Formel wurde dann die Gesamtzellzahl/ml berechnet:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{Z \cdot 21 \cdot 1000 \cdot 80}{16}$$

Z	=	MW der ausgezählten Zellen/Feld
21	=	Verdünnungsfaktor
1000	=	Umrechnung von µl auf ml
80	=	Kammerfaktor
16	=	ausgezählte Kleinstquadrate/Feld

Zur Bestimmung der Vitalität wurde das Verhältnis der toten Zellen (blau gefärbt durch Aufnahme von Trypanblau) zur Gesamtzellzahl berechnet und dann von 100% subtrahiert. Die erhaltene Differenz ergibt den Prozentsatz an lebenden Hepatozyten in der Suspension.

Die Anzahl der lebenden Zellen lag bei durchschnittlich 10 - 15 x 10<sup>6</sup>/ml und die Vitalität betrug 87 ± 5%.

## 3.5 Zellkultur

Für die Zellkultur wurden nur sterile (vom Hersteller oder vor Gebrauch sterilfiltrierte) Lösungen verwendet. Alle Arbeiten fanden, falls nötig, unter sterilen Bedingungen in der sterilen Arbeitsbank statt.

### 3.5.1 Collagenbeschichtung der Kulturgefäße

Rattenschwanzcollagen-Lyophilisat wurde mit 0,2% Essigsäure versetzt und bis zur vollständigen Auflösung (ca. 10 min) bei RT stehen gelassen. Diese Collagenlösung (1 mg/ml) wurde dann zum einen 1:10 (Endkonzentration 100 µg/ml), zum anderen 1:50 verdünnt (Endkonzentration 20 µg/ml).

Folgende Volumina wurden verwendet, um eine Collagenschicht von 6,25 µg/cm<sup>2</sup> zu erhalten:

**Tabelle 5: Collagenbeschichtung der Kulturgefäße**

<b>96well Platten</b>	→	<b>110 µl (20 µg/ml)</b>
<b>6well Platten</b>	→	<b>600 µl (100 µg/ml)</b>
<b>100mm Petrischalen</b>	→	<b>5 ml (100 µg/ml)</b>

Die Kulturgefäße wurden nach Aufgabe der Collagenlösung ohne Deckel unter UV-Licht in der Sterilwerkbank über Nacht oder 1-2 Tage lang getrocknet.

### 3.5.2 Kulturbedingungen

Die Hepatozyten wurden unter folgenden Bedingungen in Kultur gehalten:

**Tabelle 6: Kulturbedingungen für die Rattenhepatozyten Primärkultur**

Kulturmedium	<b>DMEM</b> , supplementiert mit: 0,1 µM Dexamethason 100 U/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin 10% FKS (hitzeinaktiviert: 30 min – 56 °C)
Collagen	3.5.2.1 Rattenschwanz-Collagen 6,25 µg/cm <sup>2</sup> ; mit UV-Licht sterilisiert
Zellaussaat (pro well)	<u>96well</u> : <b>5 x 10<sup>4</sup> Zellen/100 µl Medium</b> <u>6well</u> : <b>1 x 10<sup>6</sup> Zellen/2 ml Medium</b> <u>100 mm</u> : <b>8 x 10<sup>6</sup> Zellen/16 ml Medium</b> (ab dem 1. Mediumwechsel 10 ml)
Brutschrank	37 °C; 95% Luft/ 5% CO <sub>2</sub>

Vier Stunden nach der Zellaussaat wurde der 1. Mediumwechsel durchgeführt und mit der Inkubation der Hepatozyten mit den Knoll-Substanzen begonnen. Die weiteren Mediumwechsel erfolgten dann täglich.

### 3.5.3 Aufarbeitung der Zellen

Bei einigen Versuchen (MUF, HOBI, LAH, ACOX, CAT, Katalase) wurden anstelle der intakten Hepatozyten Zellhomogenate verwendet.

Nach der Inkubation (72 h) wurde das Medium aus den 100 mm-Petrischalen abgesaugt und der Zellrasen mit 8 ml eiskaltem PBS gespült. Die Zellen wurden dann abgeschabt und in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt.

Danach wurde die Suspension zentrifugiert (1500g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde folgendermaßen resuspendiert:

In **1 ml Tris pH 7,4** für MUF, HOBI, LAH

In **250-350 µl 0,1% (v/v) TX** in PBS für ACOX, CAT, Katalase

Anschließend wurden die Hepatozytensuspensionen mit dem Ultraschallgerät (2 x 10 s, Output 45) weiter homogenisiert.

### **3.6 Methoden zur Bestimmung der Cytotoxizität**

Die Hepatozyten wurden in klaren 96well-Platten für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Knoll-Substanzen im Bereich von 0,1 µM bis maximal 3 mM (falls löslich) behandelt. Für jede Konzentrationsstufe wurden 4-8 Wells mit Zellen verwendet. Die Substanzen, außer 411693 und 466506, wurden als DMSO-Lösung direkt ins Kulturmedium gegeben (1:200 Verdünnung; DMSO-Konzentration 0,5%). Aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit in DMSO wurde 466506 direkt in DMEM (ohne Zusätze) und 411693 in DMEM, das mit 1 M HCl auf pH 5 eingestellt wurde, gelöst. Für diese beiden Knoll-Substanzen wurden bei den Versuchen zusätzlich zu der normalerweise verwendeten DMSO-Kontrolle (0,5%) eine DMEM- und eine DMEM-HCl (pH 5)-Kontrolle eingesetzt.

#### **3.6.1 Anfärbung mit Kristallviolett**

##### **3.6.1.1 Lösungen und Reagenzien**

Farbstoff: 0,1% (w/v) Kristallviolett (CV) in DMEM (ohne Zusätze); filtrieren

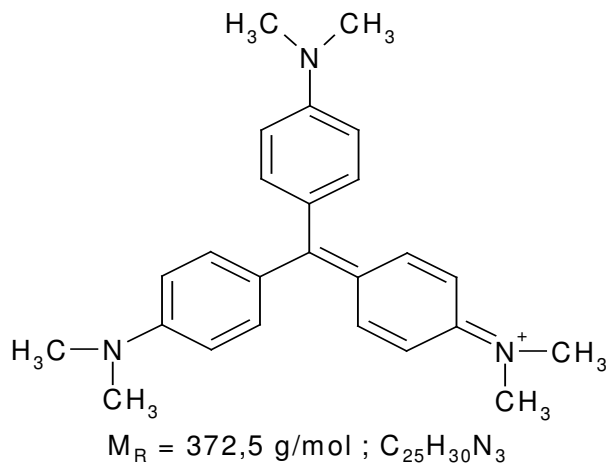
Spüllösung: PBS; 1 PBS-Tablette in 200 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

Fixierungsmittel: 70% (v/v) EtOH

Solubilisierungsmittel: 1% (v/v) HAc in 50% (v/v) EtOH

---

### 3.6.1.2 Versuchsprinzip



**Abbildung 5: Strukturformel von Kristallviolett (CV)**

Nach der Behandlung der Zellen mit cytotoxischen Substanzen können tote und geschädigte Zellen durch Spülschritte aus dem Kulturgefäß entfernt werden. Die übriggebliebenen Zellen werden fixiert und durch Zugabe des basischen Farbstoffes Kristallviolett, der in den Zellmembranen und -kernen gebunden wird, violett gefärbt. Nach Entfernung des überschüssigen CV und der Trocknung des gebundenen Farbstoffes kann dieser resolubilisiert und photometrisch gemessen werden.

### 3.6.1.3 Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde anstelle der ursprünglich von Gillies et al. [39] entwickelten Methode eine Modifikation von Ishiyama et al. [40] verwendet. Nach Inkubation (72 h) der Hepatozyten mit Testsubstanzen wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen in der 96well-Platte durch Zugabe von 200 µl 70% EtOH fixiert. Nach 5 min wurde die Lösung abgesaugt und die Platte wurde bei RT 10-20 min getrocknet. Die Farbstofflösung wurde zugegeben und nach 20 min wurde der Überschuss abgesaugt und mit 100 µl PBS nachgespült. Die 96well-Platte wurde anschließend 30 min im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Das getrocknete CV wurde durch Zugabe von 100 µl 1% (v/v) HAc in 50% (v/v) EtOH resolubilisiert. Abschließend wurde die Platte 5 min auf den Plattenschüttler (Stufe 7) gestellt und danach im Photometer bei 550 nm gegen 650 nm vermessen.

## 3.6.2 Aufnahme von Neutral Rot

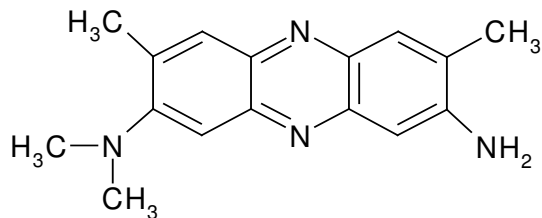
### 3.6.2.1 Lösungen und Reagenzien

Farbstoff: 0,4% (w/v) Neutral Rot (NR) in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> (6 Monate bei 4 °C im Dunkeln lagerbar [41]); direkt vor Gebrauch 1:80 mit DMEM (ohne Zusätze) verdünnen und sterilfiltrieren

Spüllösung: PBS; 1 PBS-Tablette in 200 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

Solubilisierungsmittel: 1% (v/v) HAc in 50% (v/v) EtOH

### 3.6.2.2 Versuchsprinzip



$$M_R = 266,4 \text{ g/mol} ; C_{16}H_{18}N_4$$

#### Abbildung 6: Strukturformel von Neutral Rot (NR)

Der schwach basische Farbstoff Neutral Rot wird durch Endocytose in die Zellen aufgenommen und gelangt in die Lysosomen. Durch das dort vorherrschende leicht saure Milieu (pH 5) wird der Farbstoff durch Protonierung positiv geladen und dadurch finden elektrostatische Wechselwirkungen mit in den Lysosomen vorhandenen anionischen Verbindungen [42] statt, die den Wiederaustritt des NR verhindern und so für eine Akkumulation in den Lysosomen bewirken. Nach Denaturierung der Zellen kann der freigesetzte Farbstoff photometrisch gemessen werden.

### 3.6.2.3 Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung der NR-Aufnahme in die Lysosomen lebender Hepatozyten wurde eine Modifikation [41] der von Borenfreund und Puerner [43] entwickelten Methode eingesetzt.



Nach Inkubation (72 h) der Hepatozyten mit Testsubstanzen wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen in der 96well-Platte mit 100 µl PBS gespült. 200 µl der NR-Lösung wurden zugegeben und die Platte für 3 h im Brutschrank (37°C) inkubiert. Danach wurde das überschüssige NR abgesaugt und mit 100 µl PBS nachgespült. Die 96well-Platte wurde anschließend 30 min im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Das in den Zellen gebundene NR wurde durch Zugabe von 200 µl 1% (v/v) HAc in 50% (v/v) EtOH resolubilisiert. Abschließend wurde die Platte 5 min auf den Plattenschüttler gestellt und danach im Photometer bei 550 nm gegen 650 nm vermessen.

### 3.6.3 LDH-Aktivitätsbestimmung

#### 3.6.3.1 Lösungen und Reagenzien

- Lösung 1: 81,3 mM Tris; 203,3 mM NaCl; pH 7,2  
(4,92 g Tris; 5,95 g NaCl mit HCl<sub>konz</sub> bei 30°C auf pH 7,2 einstellen; mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 500 ml)
- Lösung 2: 244 µM NADH in Lösung 1  
(43 mg NADH in 250 ml Lösung 1; 6 Monate bei -20°C lagerbar)
- Lösung 3: 9,76 mM Pyruvat in Lösung 1  
(107 mg in 100 ml Lösung 1; 2 Monate bei -20°C lagerbar)

#### 3.6.3.2 Versuchsprinzip



Der Ausstrom des cytosolischen Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus intakten Zellen ins Zellkulturmedium ist normalerweise nur gering. Durch Schädigung der Zellen und dem damit einhergehenden Verlust der Membranintegrität steigt der LDH-Ausstrom dem Grad der Schädigung jedoch entsprechend an.

Somit lässt sich zum einen über den erhöhten LDH-Ausstrom in den Zellkulturüberstand und zum anderen durch den verringerten intrazellulären LDH-Gehalt eine Aussage über die Vitalität der Zellen machen.

---

Die Menge an LDH lässt sich nach der Methode von Bergmeyer [44] durch die photometrische Messung der zeitlichen Abnahme der Extinktion von  $\text{NADH}_2$  bestimmen.

### 3.6.3.3 Versuchsdurchführung

Nach der Behandlung der Zellen wurde das Medium (=Überstand) aus der 96well-Platte abpipettiert und bis zur Analyse bei RT gelagert. Dann wurden 100  $\mu\text{l}$  0,1% (v/v) TritonX-100 in PBS (=intracellulärer LDH-Gehalt) zur Zelllysierung in jedes well gegeben. In eine neue 96well-Platte wurden 200  $\mu\text{l}$  der Lösung 2 (**NADH**) vorgelegt und dazu wurden dann 5  $\mu\text{l}$  der Probelösung (Überstand oder TX-Lösung) zugegeben und gut gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40  $\mu\text{l}$  der Lösung 3 (**Pyruvat**) gestartet und die zeitliche Abnahme der Extinktion wurde für 5 min alle 30 s bei 340 nm bei RT gemessen.

Berechnung der LDH-Aktivität:

$$A = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot v}$$

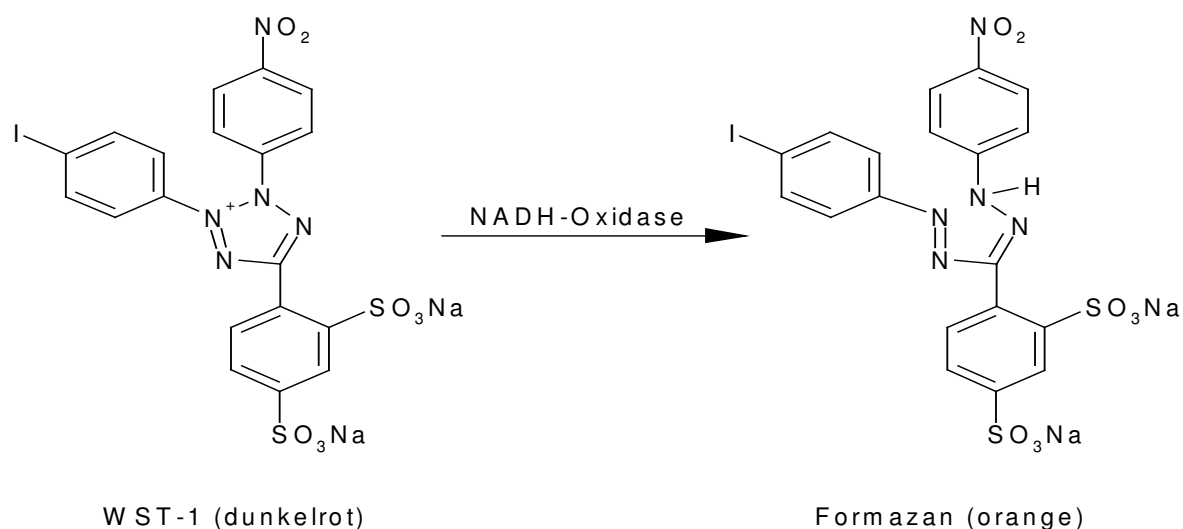
A	=	Aktivität [ $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]
V	=	Gesamtvolumen (245 $\mu\text{l}$ )
v	=	Probenvolumen (5 $\mu\text{l}$ )
d	=	Schichtdicke (0,74 cm)
$\epsilon$	=	6,3 $\text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$
c	=	Konzentration [ $\text{mol} \cdot \text{ml}$ ]
t	=	Zeit [min]

### 3.6.4 Metabolischer Umsatz des Tetrazolium-Salzes WST-1

#### 3.6.4.1 Lösungen und Reagenzien

Farbstoff: WST-1-Lösung

#### 3.6.4.2 Versuchsprinzip



**Abbildung 7: Reduktion von WST-1**

Der Farbstoff WST-1 (Derivat von MTT) wird von vitalen Zellen durch auf der Außenseite der Zellmembran sitzende NADH-Oxidasen zu einem wasserlöslichen Formazan reduziert [45]. Die Menge an gebildetem Formazan ist somit ein Maß für die Vitalität.

#### 3.6.4.3 Versuchsdurchführung

Nach Behandlung der Hepatozyten in einer 96well-Platte wurde das Medium gewechselt und zu dem frischen Medium wurden pro well 10  $\mu\text{l}$  der WST-1-Lösung zugegeben. Danach wurden die Zellen für 3 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde anschließend 1 min auf dem Shaker geschüttelt und dann die Absorption des gebildeten Formazans bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 650 nm gemessen.

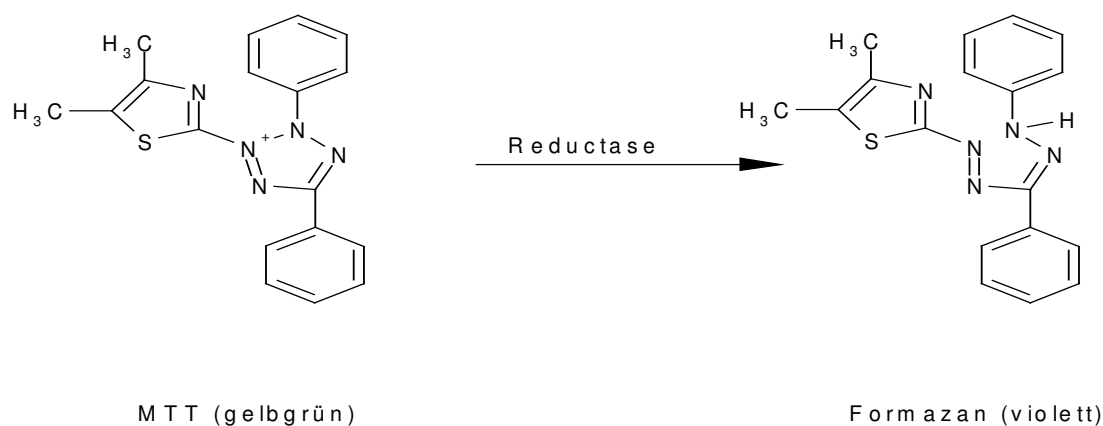
### 3.6.5 Metabolischer Umsatz des Tetrazolium-Salzes MTT

#### 3.6.5.1 Lösungen und Reagenzien

Farbstoff: 5 mg/ml MTT

Solubilisierungsreagenz: 10% (w/v) SDS in 0,01 M HCl

#### 3.6.5.2 Versuchsprinzip



**Abbildung 8: Reduktion von MTT**

Der Farbstoff MTT wird in vitalen Zellen durch NADH bzw. NADPH-abhängige Enzyme des endoplasmatischen Reticulums zu einem wasserunlöslichen Formazan reduziert [46]. Das gebildete Formazan kann nach einem Solubilisierungsschritt photometrisch vermessen werden und ist ein Maß für die Vitalität.

#### 3.6.5.3 Versuchsdurchführung

Nach Behandlung der Hepatozyten in einer 96well-Platte wurde das Medium gewechselt und zu dem frischen Medium wurden pro well 10 µl der MTT-Lösung zugegeben. Danach wurden die Zellen für 3 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Solubilisierungsreagenz zugegeben und die Platte über Nacht weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte 1 min auf dem Shaker geschüttelt und dann die Absorption des gebildeten Formazans bei 550 nm gegen die Referenzwellenlänge 650 nm gemessen.

### 3.6.6 Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Konzentrationen

Die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Konzentrationen für die Testsubstanzen fand mit Hilfe des Computerprogrammes GraphPad Prism der Firma GraphPad Incorporated statt. Dazu wurde der Logarithmus der eingesetzten Konzentrationen gegen die dazugehörigen gemessenen Absorptionen (CV, NR, WST, MTT) bzw. der errechneten Aktivität (LDH) (arithmetischer Mittelwert aus 4 bis 8 Einzelwerten pro Konzentrationsstufe) graphisch aufgetragen und der IC<sub>50</sub>-Wert durch nicht-lineare Regression (sigmoidale Kurve) ermittelt.

## 3.7 Bestimmung der Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen

### 3.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

#### 3.7.1.1 Lösungen und Reagenzien

##### Bradford-Reagenz:

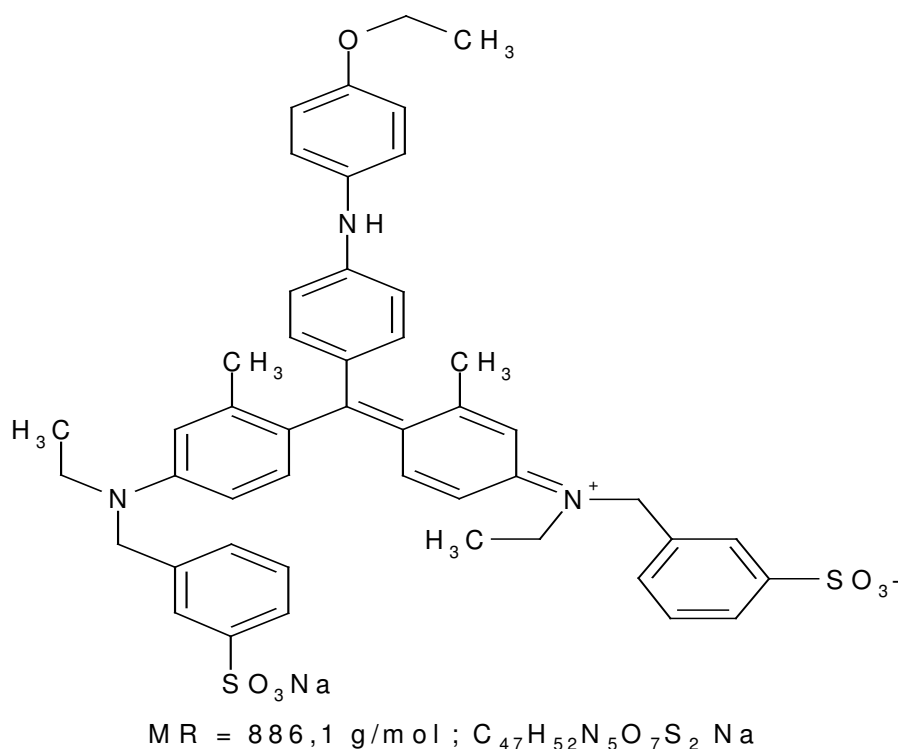
100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 in 50 ml Ethanol absolut lösen und 100 ml 85% Phosphorsäure zugeben; gut schütteln und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 1 l auffüllen.

##### BSA-Standards:

500; 400; 300; 200; 100 µg BSA in 0,1% (v/v) TritonX-100/PBS-Lösung

---

### 3.7.1.2 Versuchsprinzip



**Abbildung 9: Strukturformel von Coomassie Brilliant Blue G 250**

Der Triarylmethan-Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 bindet sich hauptsächlich über Arginin-Seitenketten (geringer auch über Lys, His und aromatische Aminosäuren, [47]) an Proteine. Die Komplexbildung kann durch Zusatz geringer Mengen des Detergenz TritonX-100 verstärkt werden und dadurch die Sensitivität des Assays erhöht werden [48]. Die Bindung an Proteine bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 470 nm nach 595 nm. Über diese Absorptionzunahme und dem Vergleich mit einer Eichgerade lässt sich der Proteingehalt bestimmen [49].

### 3.7.1.3 Versuchsdurchführung

#### Probenaufarbeitung:

Zellhomogenate (siehe 3.5.3) aus 100 mm-Schalen wurden 1:10 mit 0,1% (v/v) TritonX-100 in PBS verdünnt.

Bei Proben in 96well-Platten (direkt nach AROD-Messungen) oder in 6well-Platten wurde die Reaktionslösung (AROD) oder das Medium abgesaugt und dann 100 µl bzw. 2 ml 0,1% (v/v) TritonX-100 in PBS auf die Hepatozyten gegeben.

10 µl der TritonX-Lösung wurden in eine 96well-Platte vorgelegt und dann wurden durch den Pipettierroboter Biomek 2000 200 µl des Bradford-Reagenz zugegeben, durch mehrmaliges Aufziehen gut durchmischt und 10 min bei RT stehen gelassen. Die Absorption des Farbstoff-Proteinkomplexes wurde bei 650 nm gemessen und mit einer Eichkurve aus BSA-Standards verglichen.

### 3.7.2 Bestimmung der AROD-Aktivitäten

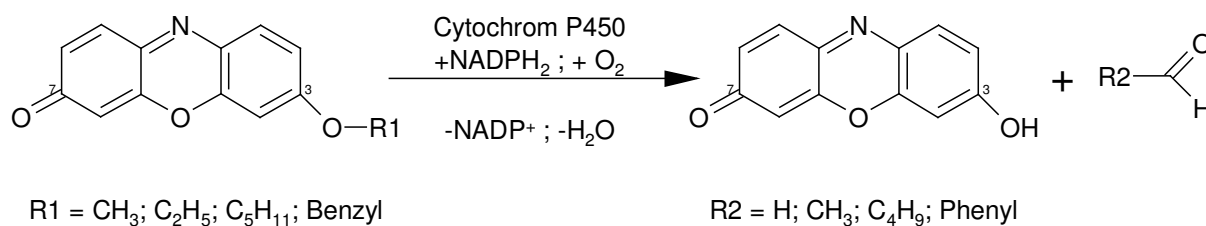
#### 3.7.2.1 Lösungen und Reagenzien

<u>Substrate:</u>	Methoxy-Resorufin	1 mM in DMSO (Endkonz. 5 µM)
	Ethoxy-Resorufin	1 mM in DMSO
	Benzyloxy-Res.	2 mM in DMSO (Endkonz. 10 µM)
	Pentoxy-Resorufin	2 mM in DMSO
Phase 2-Inhibitor:	Salicylamid	0,3 M in Aceton
Die Lösungen werden vor Gebrauch 1:100 mit PBS verdünnt		

#### Resorufin-Standards:

Aus einer 1 mM Resorufinlösung (DMSO) werden verschiedene Konzentration hergestellt und 1:100 mit PBS verdünnt → Endkonzentration 5-1500 pmol/ml

#### 3.7.2.2 Versuchsprinzip



**Abbildung 10: Umsetzung von Resorufinethern durch CYP-Isoenzyme**

Die Resorufinether werden durch verschiedene Cytochrom P450-Familien [50], [51] oxidiert und damit gespalten. Die Fluoreszenzintensität des freigesetzten Resorufin dient als Maß für die CYP-Aktivität. Der Zusatz von Salicylamid verhindert, dass das Resorufin zu einem nicht-fluoreszierenden Sulfat konjugiert [52], [53] wird und dadurch ein geringerer Umsatz gemessen wird.

### 3.7.2.3 Versuchsdurchführung

Es wurde die Modifikation der ursprünglich für Mikrosomen entwickelten Methode von Burke und Mayer [54] nach Lubinski et al. [2] verwendet und auf das 96well-Format angepasst:

Nach Behandlung der Hepatozyten mit den Testsubstanzen wurde das Medium abgesaugt und 50 µl der 300 mM Salicylamid-Lösung zugegeben und die Platte 10 min im Wärmeschrank bei 37°C vorinkubiert. Danach wurden 50 µl der Substrat-Lösung zu den Hepatozyten pipettiert und sofort die Fluoreszenz (t=0 min) bei 544 nm Anregung/ 585 Emission gemessen. Anschließend wurde die Platte für 30 min im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert und danach wieder Fluoreszenz (t=30 min) gemessen. Aus der Differenz der beiden Messwerten (30 min-0 min) ergab sich der Umsatz, der mit Hilfe einer Eichkurve, ermittelt wurde und durch die anschließend erfolgte Proteinbestimmung zur Enzymaktivität umgerechnet wurde.

Berechnung der CYP-Aktivität:

$$A = \frac{FI}{f \cdot t \cdot m}$$

A	=	Aktivität [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ]
FI	=	gemessene Fluoreszenz [1]
f	=	Steigung der Eichgerade [1]
t	=	Zeit [min]
m	=	eingesetzte Menge Protein [mg]



### 3.7.3 Messung des Testosteron-Metabolismus

#### 3.7.3.1 Lösungen und Reagenzien

Substrat: Testosteron 26,33 mM in MeOH

→ Im Ansatz 15 µl=395 nmol

[4-<sup>14</sup>C]-Testosteron 1 mM in MeOH

→ Im Ansatz 5 µl=5 nmol= 25 kBq

Substrat-Mix 5 µl aktiv + 15 µl inaktives Testosteron

Standards: 2,5 mg/ml in MeOH; je 10 µl der einzelnen Standards zusammenpipettieren (90 µl) und mit MeOH auf 500 µl auffüllen

Probeneluent: Fließmittel zum Zeitpunkt t=0 min (73% A : 27% B)

#### 3.7.3.2 Versuchsprinzip

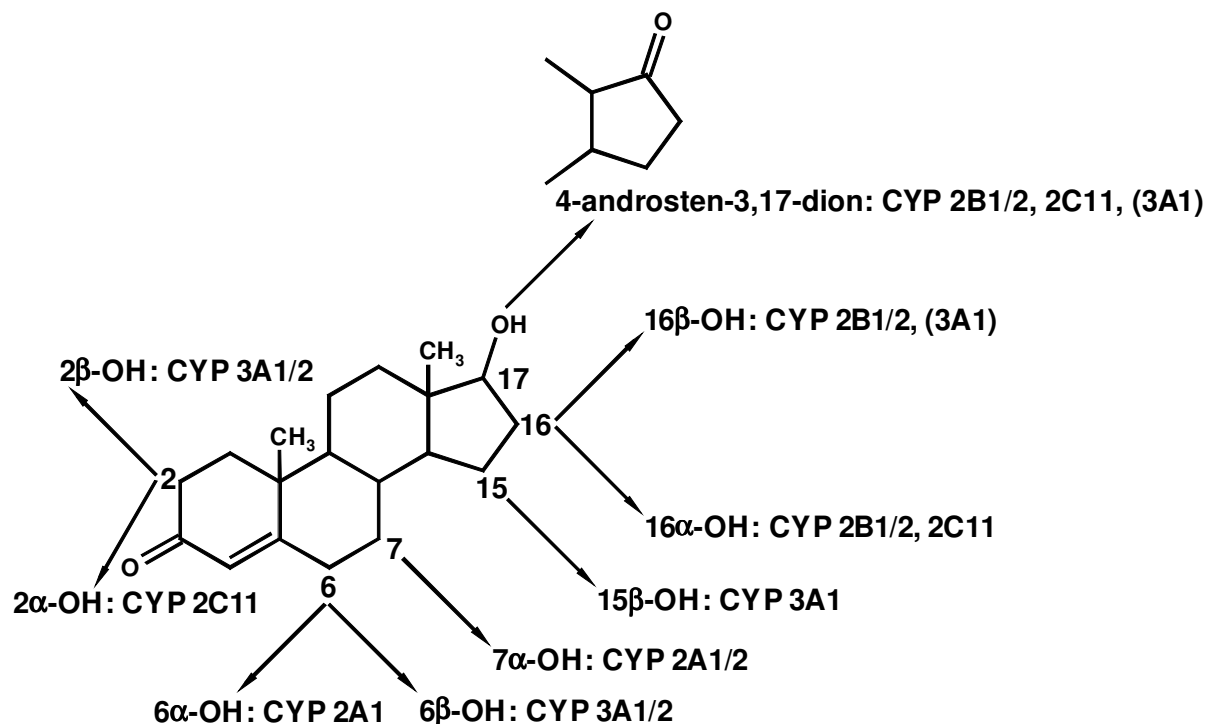


Abbildung 11: Testosteron-Metabolismus durch CYP-Isoenzyme (Ratte)

Testosteron wird durch verschiedene Cytochrom P450-Isoenzyme stereo- und regioselektiv metabolisiert. Dadurch lassen sich mehrere Enzyme gleichzeitig untersuchen.

Im Test wird radioaktives Testosteron durch die Hepatozyten metabolisiert, über HPLC (Methode nach Sonderfan [55]) werden die Metaboliten aufgetrennt und durch den Radioaktivitätsdetektor quantifiziert.

### 3.7.3.3 Versuchsdurchführung

HPLC: Vorsäule Sentry Guard column Symmetry® C<sub>18</sub> 5 µm 3,9 x 20 mm  
Säule Symmetrie®C18 5µm 4.6 X 250 mm

Fließmittel: A = 7% (v/v) THF in H<sub>2</sub>O (HPLC grade)  
B = 7,5% (v/v) THF in MeOH (HPLC grade)  
C = MeOH (HPLC grade)

Fließmittel-Gradient:

Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]
0	73	27	0
8	73	27	0
50	20	80	0
55	0	0	100
58	73	27	0
60	73	27	0

Fluss: 1 ml/min bei RT

Detektion: UV (254 nm)  
Radioaktivität

Inkubationsansatz:

Zu den Hepatozyten (6well-Platte) wurde pro well 20 µl Substrat-Mix (1% MeOH im Ansatz) gegeben und die Platte für 4 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch

---

Zugabe von 2 ml MeOH wurde die Reaktion abgestoppt, die Zellen wurden abgeschabt und die Suspension (4 ml) mit einer 10 ml-Spritze aufgezogen und das Restvolumen mit Wasser (6 ml) ergänzt. Der Spritzeninhalt wurde auf eine vorher konditionierte (5 ml MeOH, 5 ml Wasser) SPE-Kartusche (RP18) gegeben und mit 10 ml Wasser nachgespült. Die auf der Säule verbliebene Probe wurde mit 5 ml MeOH eluiert und unter Stickstoffstrom bei 50°C abgedampft. Der Rückstand wurde in 300 µl Probeneluent und 50 µl Standardlösung aufgenommen.

In der HPLC wurden 275 µl (Einfachbestimmung) analysiert.

#### Wiederfindung:

Die Radioaktivität wurde mit dem Szintillationszählgerät in den Proben (Dreifach-Messung: 10 µl Probe + 6 ml Szintillationscocktail) und im Substrat-Mix (=100%; Dreifachbestimmung: 20 µl Mix + 6 ml Szintillationscocktail) gemessen und das Verhältnis berechnet.

Die Wiederfindung lag bei 89 bis 100%.

#### **3.7.3.4 Berechnung der CYP-Aktivität (Umsatz)**

Die Auswertung der HPLC-Chromatogramme erfolgte durch das Computerprogramm MDLC (Multi Detector Liquid Chromatography). Die berechneten Flächenprozent (zur Gesamtfläche) der einzelnen Metabolite wurden in folgender Formel eingesetzt und der Umsatz damit berechnet. Diese Methode wurde bei allen HPLC-Versuchen (**Testosteron, LAH, PNP-Konjugation**) benutzt.

$$A = \frac{PF \cdot n_{Sub}}{100 \cdot t \cdot m}$$

A	=	Aktivität/Umsatz [pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ]
PF	=	Peakflächenprozent [1]
n <sub>Sub</sub>	=	Stoffmenge des Substrates [pmol]
t	=	Zeit [min]
m	=	eingesetzte Proteinmenge [mg]

### 3.7.4 Bestimmung der Laurinsäurehydroxylierung (LAH)

#### 3.7.4.1 Lösungen und Reagenzien

Substrat: Laurinsäure 12,67 mM in MeOH  
 → Im Ansatz 15 µl=190 nmol  
 [1-<sup>14</sup>C]-Laurinsäure 2 mM in MeOH  
 → Im Ansatz 5 µl=10 nmol= 20 kBq

0,5 M Tris/HCl pH 7,4

(15,14 g Tris mit 37% HCl pH 7,4; mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 250 ml)

Substrat-Puffer-Mix (frisch ansetzen; Ansatz für eine Probe: 5 µl aktive LA + 15 µl inaktive LA mit Tris auf 1050 µl auffüllen)

1% NaHCO<sub>3</sub>

(0,1 g NaHCO<sub>3</sub> in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>)

40 mM NADPH

(362 mg NADPH in 10 ml 0,1% NaHCO<sub>3</sub>)

3 M HCl

(29,7 ml 37% HCl mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 100 ml)

Probeneluent: 45 H<sub>2</sub>O : 55 MeOH : 5 HAc

#### 3.7.4.2 Versuchsprinzip

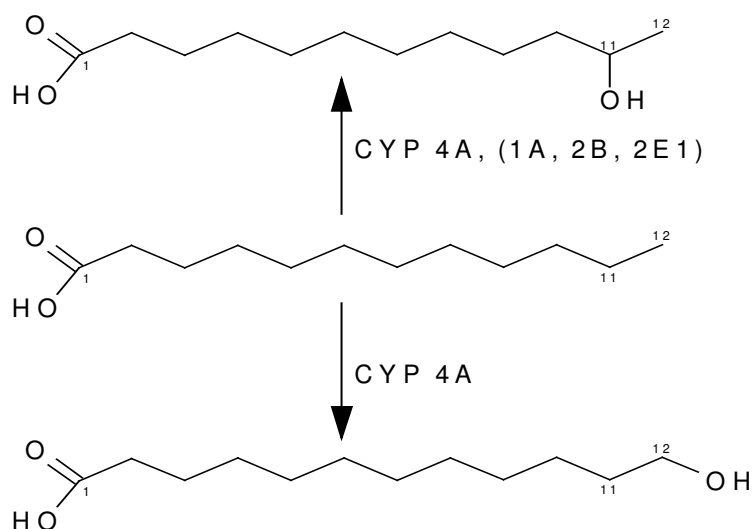


Abbildung 12: Metabolismus von Laurinsäure durch Cytochrom P450-Isoenzyme

Laurinsäure wird durch Cytochrom P450-Isoenzyme (hauptsächlich CYP 4A) zu 11- und 12-Hydroxy-Laurinsäure metabolisiert.

Im Test wird radioaktive Laurinsäure durch die Hepatozyten umgesetzt, über HPLC (modifizierte Methode nach [56]) werden die Metaboliten aufgetrennt und durch den Radioaktivitätsdetektor quantifiziert.

### 3.7.4.3 Versuchsdurchführung

HPLC: Vorsäule LiChrospher® 100 RP-18 5 µm 4 x 25 mm  
Säule µBondapak C18 10 µm, 3,9 x 300mm

Fließmittel: A = 0,1% (v/v) HAc in H<sub>2</sub>O (HPLC grade)  
B = MeOH (HPLC grade)

Fließmittel-Gradient:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	55	45
45	0	100
50	0	100
55	55	45
60	55	45

Fluss: 1 ml/min bei RT

Detektion: UV (208 nm)  
Radioaktivität

Inkubationsansatz (für 1 Probe):

In ein 15 ml Reagenzglas wurden 1050 µl Substrat-Puffer-Mix vorgelegt und dazu 900 µl des Tris-Zellhomogenates (siehe 3.5.3) gegeben und 5 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad (120 Upm/min) vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl NADPH-Lösung gestartet und nach 30 min durch 300 µl 3 M HCl abgestoppt. Die Metabolite (11- und 12-Hydroxy-Laurinsäure) und LA wurden durch

---

10 ml Diethylether (20 min schütteln) und anschließender Zentrifugation (unter N<sub>2</sub>-Begasung; 1000g, 10 min, 4°C) aus der wässrigen Phase extrahiert und danach wurde die Etherphase abgetrennt und unter Stickstoffstrom bei 50°C abgedampft. Der Rückstand wurde in 250 µl MeOH + 250 µl Probeneluent aufgenommen. In der HPLC wurden 2 x 200 µl (Doppelbestimmung) analysiert.

#### Wiederfindung:

Die Radioaktivität wurde mit dem Szintillationszählgerät in den Proben (Dreifachmessung: 10 µl Probe + 6 ml Szintillationscocktail) und im Substrat-Puffer-Mix (=100%; Dreifachbestimmung: 100 µl Mix + 6 ml Szintillationscocktail) gemessen und das Verhältnis berechnet.

Die Wiederfindung lag bei 86 bis 92%.

#### Berechnung der LAH-Aktivität:

Zur Berechnung siehe 3.7.3.4.

### 3.7.5 Bestimmung der GST-Aktivität mit dem Substrat CDNB

#### 3.7.5.1 Lösungen und Reagenzien

Substrat: 25 mM CDNB in EtOH

(51 mg in 10 ml EtOH; 5 min Ultraschallbad)

0,1% (v/v) TX in 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer pH 6,5 (= TX/KP-Puffer pH 6,5)

(500 µl TX + 6,81 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit 1 M KOH auf pH 6,5; H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 500 ml)

10 mM GSH (reduziert)

(31 mg in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>; frisch ansetzen)

#### 3.7.5.2 Versuchsprinzip

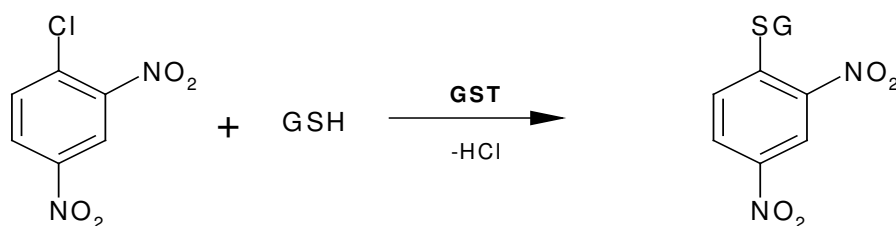


Abbildung 13: Konjugation von CDNB mit Glutathion

Die Glutathiontransferasen (GST) umfassen verschiedene Isoenzymfamilien mit den 4 Hauptklassen alpha, mu, pi und theta. Sie katalysieren die Konjugation von Elektrophilen mit Glutathion.

Die Methode beruht auf der kinetischen Messung der Adduktbildung durch Konjugation von CDNB (1-Chlor-2,4-dinitrobenzol) mit GSH bei 340 nm. [57].

### 3.7.5.3 Versuchsdurchführung

Die für Mikrosomen entwickelte Methode nach Habig [57] wurde auf Hepatozyten übertragen und auf das 96well-Format angepasst.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Hepatozyten durch Zugabe von 258 µl TX/KP-Puffer pH 6,5 lysiert und die GST-Enzyme freigesetzt. Nachdem 30 µl GSH zupipettiert wurden und die gesamte Lösung durch mehrmaliges Aufziehen durch den Pipettierroboter Biomek 2000 gut durchmischt war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 12 µl CDNB gestartet und die Extinktionszunahme bei 340 nm alle 20 s für 4 min in der 96well-Platte gemessen.

#### Berechnung der GST-Aktivität:

Aus den ermittelten Extinktionszunahmen pro Minute (Mittelwert aus 4-8 wells) abzüglich des Leerwertes lässt sich die GST-Aktivität folgendermaßen berechnen:

$$A = \frac{\Delta E}{\Delta t \cdot d \cdot \varepsilon} \cdot \frac{1}{m}$$

A	=	Aktivität [nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ]
ΔE	=	Extinktionsänderung [1]
Δt	=	Zeit [min]
ε	=	Extinktionskoeffizient (9,6 cm <sup>2</sup> /µmol)
d	=	Schichtdicke des Wells (0,88cm)
m	=	eingesetzte Menge Protein [mg]

### 3.7.6 Messung der 4-Methyl-Umbelliferon-Konjugation (MUF)

#### 3.7.6.1 Lösungen und Reagenzien

1 M Tris-HCl-Puffer

(30.37 g Tris mit HCl<sub>konz</sub> auf pH 7,4; mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 250 ml)

50 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung

(0,51 g in 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>):

0,5% (w/v) Brij-Lösung (Angaben für 100 ml):

(0.5 g Brij 58 (Polyoxyethylen-(20)-cetylether) in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>)

Substrat: 30 mM MUF in DMSO

(53 mg in 10 ml DMSO; 5 min Ultraschallbad)

30 mM UDPGA-Lösung

(194 mg in 10 ml DMSO; 5 min Ultraschallbad)

0,5 M HClO<sub>4</sub>-Lösung

(71 ml aus der Stammlösung (7,07 M) mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 1000 ml auffüllen)

1,6 M Glycin-NaOH-Lösung pH 10,3

(30 g mit NaOH-Plätzchen auf pH 10,3; mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 250 ml)

10 mM MUF-Glucuronid-Lösung

(41 mg in 10 ml DMSO lösen; 5 min Ultraschallbad)

#### 3.7.6.2 Versuchsprinzip

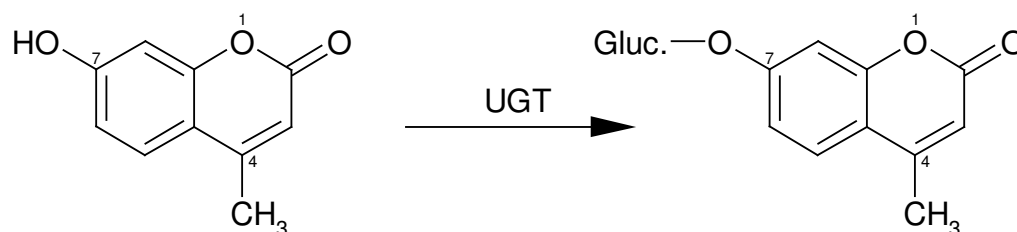


Abbildung 14: Glucuronidierung von MUF

Die Konjugation mit Glucuronsäure katalysiert durch UGTs ist quantitativ gesehen die wichtigste Phase 2-Reaktion [58]. Die verschiedenen UGT-Enzymfamilien lassen sich durch ihre Induzierbarkeit durch Modellinduktoren (z.B. 3-MC, PB; [59])



unterscheiden. Die hier beschriebene Methode beruht auf der fluorimetrischen Messung des durch die Konjugation von MUF mit Glucuronsäure gebildeten MUF-Glucuronids [60].

### 3.7.6.3 Versuchsdurchführung

Es wurde folgender Mix (Menge für 1 Probe) angesetzt:

50 µl	Tris-HCl-Puffer, pH 7,4
50 µl	MgCl <sub>2</sub> -Lösung
50 µl	MUF, 30 mM
50 µl	Brij 58
200 µl	H <sub>2</sub> O dest.
50 µl	Zellhomogenat (siehe 3.5.3)

Der Mix wurde 5 min bei 37 °C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorinkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl UDPGA gestartet. Nach 0, 10 und 20 min wurde die Reaktion bei 37 °C durch 500 µl Perchlorsäure abgestoppt und die Probe abzentrifugiert (5 min, 16000g, RT). 750 µl des Überstandes wurden mit 2 ml Chloroform extrahiert (10 min schütteln) und nach Zentrifugation (10 min, 3200g, 4 °C) wurden 600 µl aus der wässrigen Phase entnommen und bei –20 °C eingefroren. Zur Messung der Fluoreszenz wurden davon 130 µl in eine schwarze 96well-Platte vorgelegt und 130 µl Glycin-NaOH zugegeben, gut durchmischt und nach 4 min die Messung (Anregung 315 nm, Emission 365 nm, Gain 48) gestartet (je Probe und Zeitpunkt Doppelbestimmungen).

Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden mit Hilfe der Eichkurve zu MUF-Aktivitäten umgerechnet:

$$UGT = \frac{\Delta F}{m_{\text{eich}} \cdot v \cdot c}$$

UGT	=	UGT-Aktivität [nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ]
ΔF	=	Fluoreszenzänderung der Probe/min
m <sub>eich</sub>	=	Geradensteigung der Eichkurve [1]
v	=	eingesetztes Probenvolumen [ml]
c	=	Proteingehalt der Probe [mg/ml]

### 3.7.7 Messung der 4-Hydroxy-Biphenyl-Konjugation (HOBI)

#### 3.7.7.1 Lösungen und Reagenzien

1 M Tris-HCl-Puffer

(30.37 g Tris mit HCl<sub>konz</sub> auf pH 7,4; mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 250 ml)

50 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung

(0,51 g in 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>)

0,5% (w/v) Brij-Lösung (Angaben für 100 ml):

(0.5 g Brij 58 (Polyoxyethylen-(20)-cetylether) in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>)

Substrat: 5 mM HOBI in DMSO

(17 mg in 20 ml DMSO; 5 min Ultraschallbad)

30 mM UDPGA-Lösung

(194 mg in 10 ml DMSO; 5 min Ultraschallbad)

0,5 M HClO<sub>4</sub>-Lösung

(71 ml aus der Stammlösung (7.07 M) mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 1000 ml auffüllen)

1,6 M Glycin-NaOH-Lösung pH 10,3

(30 g mit NaOH-Plätzchen auf pH 10.3; mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 250 ml)

Für die photometrische Bestimmung:

25 mM HOBI-Lösung

(85 mg in 20 ml DMSO; 5 min Ultraschallbad):

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung

(26,5 g in 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>)

Folin Ciocalteus Phenolreagenz

#### 3.7.7.2 Versuchsprinzip

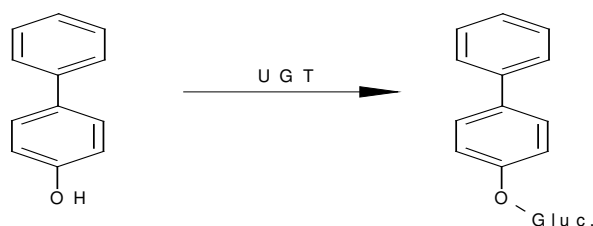


Abbildung 15: Glucuronidierung von HOBI

Zwei Hauptgruppen der UGT-Isoenzyme lassen sich durch ihre Induzierbarkeit durch 3-MC bzw. PB charakterisieren. Die durch 3-MC induzierbare Isoform setzt v.a. planare Substrate (4-Nitrophenol, 1-Naphthol, 4-Methylumbelliferon, 2-Aminophenol) um, während die durch PB induzierbare Form v.a. nichtplanare Moleküle (Morphin, 4-Hydroxybiphenyl) metabolisiert

Die hier beschriebene Methode beruht auf der fluorimetrischen Messung des durch die Konjugation von HOBI mit Glucuronsäure gebildeten HOBI-Glucuronids [59].

### 3.7.7.3 Versuchsdurchführung

Es wurde folgender Mix (Menge für 1 Probe) angesetzt:

50 µl	Tris-HCl-Puffer, pH 7,4
50 µl	MgCl <sub>2</sub> -Lösung
50 µl	HOBI, 5 mM
50 µl	Brij 58
200 µl	H <sub>2</sub> O dest.
50 µl	Zellhomogenat (siehe 3.5.3)

Der Mix wurde 5 min bei 37°C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorinkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl UDPGA gestartet. Nach 0, 20 und 40 min wurde die Reaktion bei 37°C durch 500 µl Perchlorsäure abgestoppt und die Probe abzentrifugiert (5 min, 16000g, RT). 750 µl des Überstandes wurden mit 2 ml Chloroform extrahiert (10 min schütteln) und nach Zentrifugation (10 min, 3200g, 4°C) wurden 600 µl aus der wässrigen Phase entnommen und bei -20°C eingefroren. Zur Messung der Fluoreszenz wurden davon 130 µl in eine schwarze 96well-Platte vorgelegt und 130 µl Glycin-NaOH zugegeben, gut durchmischt und nach 4 min die Messung (Anregung 278 nm, Emission 327 nm, Gain 58) gestartet (je Probe und Zeitpunkt Doppelbestimmungen).

Photometrische Bestimmung des HOBI-Umsatzes:

**Die photometrische Bestimmung diente zur Erstellung der Eichkurve, da das HOBI-Glucuronid nicht käuflich erwerbbar ist.**

Testansatz für eine Messung

100 µl	Tris-HCl-Puffer, pH 7.4
100 µl	MgCl <sub>2</sub> -Lösung
20 µl	4-Hydroxybiphenyl (HOBI), 25 mM
100 µl	Brij 58
480 µl	H <sub>2</sub> O dest.
100 µl	Zellhomogenat (siehe 3.5.3)

Der Mix wurde 5 min bei 37°C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorinkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl UDPGA gestartet. Nach 0, 10, 20, 30 und 40 min wurde die Reaktion bei 37°C durch 500 µl Perchlorsäure abgestoppt und die Probe abzentrifugiert (5 min, 16000g, RT). 200 µl des klaren Überstandes wurden mit 500 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 100 µl NaOH vermischt, dann wurden 100 µl Folin-Reagenz zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte bei 720 nm.

$$UGT = \frac{\Delta F}{m_{\text{eich}} \cdot v \cdot c}$$

UGT	=	UGT-Aktivität [nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ]
ΔF	=	Fluoreszenzänderung der Probe/min
m <sub>eich</sub>	=	Geradensteigung der Eichkurve [1]
v	=	eingesetztes Probenvolumen [ml]
c	=	Proteingehalt der Probe [mg/ml]

### 3.7.8 Messung der PNP-Konjugation

#### 3.7.8.1 Lösungen und Reagenzien

Substrat: [U-<sup>14</sup>C]-PNP 12,5 µM in DMSO

→ Im Ansatz 20 µl=25 nmol= 6500 Bq

Standards: PNP-G; PNP-S; 2,5 mg/ml in H<sub>2</sub>O

Probeneluent: Fließmittel zum Zeitpunkt t=0 min (95% A : 5% B)

#### 3.7.8.2 Versuchsprinzip

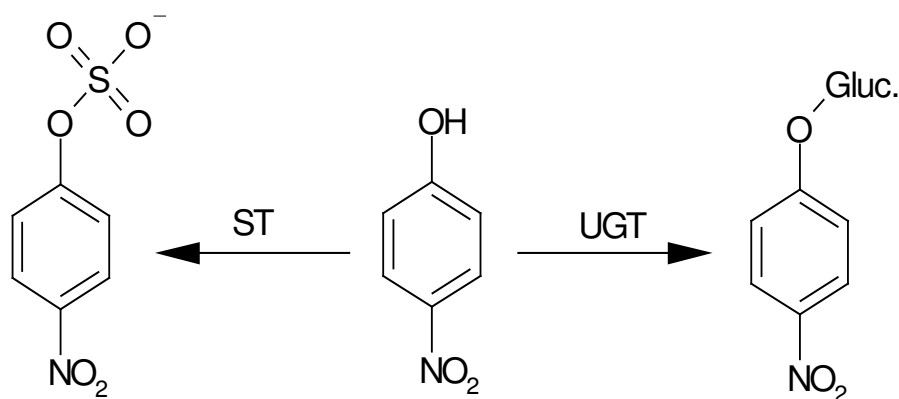


Abbildung 16: Konjugation von PNP

PNP wird ohne Funktionalisierung (Phase 1) direkt mit Sulfat oder Glucuronsäure konjugiert (Phase 2).

Die hier beschriebene Modifikation der Methode nach Gram et al. [61] beruht auf der Auftrennung von PNP und seinen Metaboliten (PNP-G, PNP-S) über Reverse Phase-HPLC und anschließender Quantifizierung mit dem Radioaktivitäts-detektor.

#### 3.7.8.3 Versuchsdurchführung

HPLC: Vorsäule Sentry Guard column Symmetry® C<sub>8</sub> 5 µm 3,9 x 20 mm

Säule Symmetry® C<sub>8</sub> 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fließmittel: A = 2% (v/v) HAc, 0,01% (v/v) TEA in H<sub>2</sub>O (HPLC grade)

B = Acetonitril (HPLC grade)

Fließmittel-Gradient:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	95	5
20	10	90
30	5	95
32	0	100
35	0	100
37	95	5
40	95	5

Fluss: 1 ml/min bei 40°C

Detektion: UV (294 nm)  
Radioaktivität

Inkubationsansatz (für 1 Probe):

Das Medium wurde nach der Behandlung mit den Testsubstanzen erneuert und in jedes well (6well-Platte) 20 µl PNP zugegeben. Nach 30 min Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml MeOH abgestoppt. Die Zellen wurden abgeschabt und mit der Lösung in ein 15 ml Reagenzglas überführt und abzentrifugiert (2000g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde verworfen und der Überstand unter Stickstoffstrom bei 50°C abgedampft. Der Rückstand wurde in 400 µl Probeneluent aufgenommen und falls sich ein Niederschlag bildete wurde noch einmal abzentrifugiert und der Überstand für die HPLC verwendet.

In der HPLC wurden 2 x 150 µl (Doppelbestimmung) analysiert.

Wiederfindung:

Die Radioaktivität wurde mit dem Szintillationszählgerät in den Proben (Dreifach-Messung: 10 µl Probe + 6 ml Szintillationscocktail) und in der Substrat-Lösung (=100%; Dreifachbestimmung: 20 µl Mix + 6 ml Szintillationscocktail) gemessen und das Verhältnis berechnet.

---

Die Wiederfindung lag bei 79 bis 89%.

Berechnung des PNP-Umsatzes:

Zur Berechnung siehe 3.7.3.4.

## 3.8 Bestimmung der Induktion von peroxisomalen Enzymen

### 3.8.1 Bestimmung der Acyl-CoA Oxidase-Aktivität (ACOX)

#### 3.8.1.1 Lösungen und Reagenzien

0,11 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,4

(14,97 g mit 1 M KOH auf pH 7,4; mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  auf 1000 ml)

0,4 M Aminotriazol pH 7,4

(336 mg mit 1 M KOH auf pH 7,4; mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  auf 10 ml; frisch ansetzen)

0,2% (v/v) TritonX-100

(100  $\mu\text{l}$  in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ )

2,5 mM Leuco-DCF

(6 mg in 5 ml 0,01 M NaOH, DMF (9:1); frisch ansetzen, lichtgeschützt)

8 mg/ml HRP (Typ IV-A)(frisch ansetzen)

Substrat: 3 mM Palmitoyl-CoA

(3 mg/ml; frisch ansetzen)

#### 3.8.1.2 Versuchsprinzip

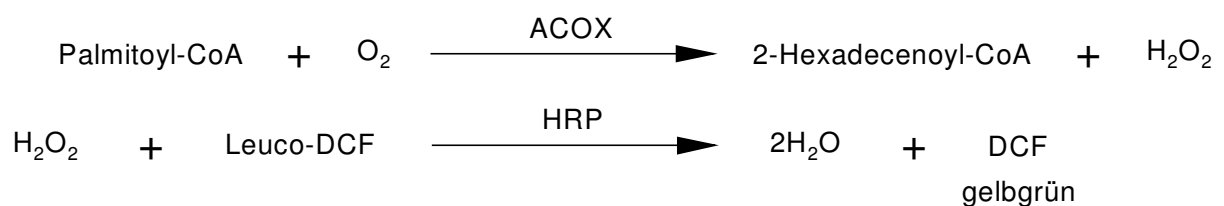


Abbildung 17: Bestimmung der ACOX-Aktivität mit DCF

Die Acyl-CoA Oxidase katalysiert den ersten Schritt im peroxisomalen Fettsäureabbau (perox.  $\beta$ -Oxidation) und setzt dabei Wasserstoffperoxid, das in der Methode nach Small [62] mit HRP als Katalysator die Oxidation von Leuco-DCF zu DCF bewirkt. Die Extinktionszunahme wird bei 490 nm gemessen.

### 3.8.1.3 Versuchsdurchführung

Es wurde folgender Mix angesetzt:

0,40 M	Aminotriazol	5 ml
0,11 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 ml
0,2%	Triton x-100	5 ml
8 mg/ml	HRP	500 $\mu$ l
2,5 mM	Leuco-DCF	1 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	33,5 ml

Davon wurden in jedes well 280  $\mu$ l vorgelegt und mit 10  $\mu$ l Zellhomogenat (siehe 3.5.3) (pro Probe Dreifachbestimmung + Negativkontrolle ohne Palmitoyl-CoA) vermischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu$ l Palmitoyl-CoA gestartet und die Extinktionszunahme bei 490 nm wurde alle 20 s für 5 min gemessen.

#### Berechnung der Enzymaktivität:

Unter Berücksichtigung Extinktionsfaktor ( $\epsilon$ ) für DCF:  $\epsilon = 9,1 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^2$  errechnet sich die Enzymaktivität (A) [ $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ] folgendermaßen:

$$A = \frac{\Delta E}{t \cdot d \cdot \epsilon} \cdot \frac{V}{v} \cdot \frac{F}{c}$$

$\Delta E$	=	Extinktionsänderung
t	=	Zeit [min]
$\epsilon$	=	Extinktionskoeffizient
d	=	Schichtdicke des wells (0,88 cm)
F	=	Verdünnung der Probe
c	=	Proteingehalt der Probe [mg/ml]
V	=	Gesamttestvolumen [ml]
v	=	Probenvolumen [ml]



### 3.8.2 Bestimmung der L-Carnitin-Acetyl-Transferase (CAT)

#### 3.8.2.1 Lösungen und Reagenzien

1,25 M Tris/HCl pH 8,0

(75,7 g mit 1 M HCl auf pH 8,0; mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 500 ml)

125 mM Tris/HCl pH 8,0

50 mM EDTA in Tris

(0,5 M EDTA-Lösung 1:10 mit 125 mM Tris verdünnen)

10 mM DTNB

(99 mg in 25 ml EtOH; frisch ansetzen)

4 mM Acetyl-CoA

(65 mg in 20 ml 125 mM Tris; frisch ansetzen)

0,2% (v/v) Triton X-100 in Tris

(100 µl mit 125 mM Tris auf 50 ml auffüllen)

Substrat: 50 mM L-Carnitin

(99 mg in 125 mM Tris; frisch ansetzen)

#### 3.8.2.2 Versuchsprinzip

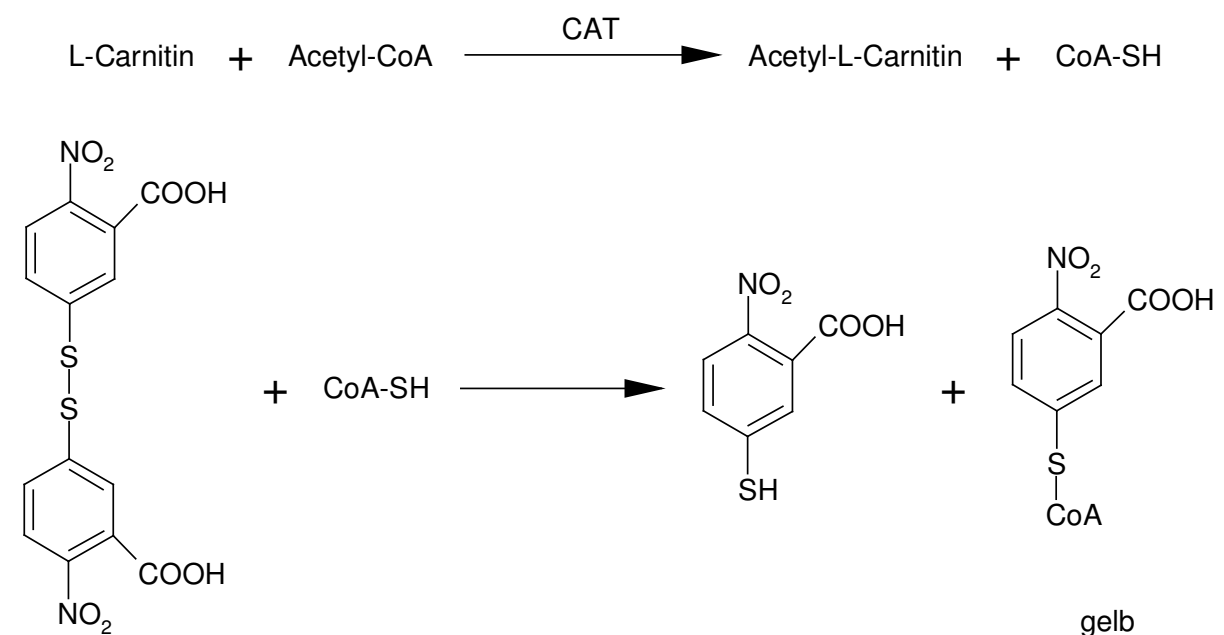


Abbildung 18: Bestimmung der CAT-Aktivität mit DTNB

Die Carnitin-Acetyl-Transferase katalysiert die Übertragung der Acetyl-Gruppe von Coenzym A auf L-Carnitin. Die Methode beruht auf der kinetischen Messung der Extinktionszunahme bei 405 nm durch das gelbfarbige Reaktionsprodukt [63].

### 3.8.2.3 Versuchsdurchführung

Es wurde folgender Mix (Menge für 2 96well-Platten) angesetzt:

6 ml	1,25 M Tris/HCl pH 8,0
3 ml	50 mM EDTA
3 ml	10 mM DTNB
3 ml	4 mM Acetyl-CoA
3 ml	0,2% (v/v) Triton X-100
33 ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

Davon wurden in jedes well 170 µl vorgelegt und mit 20 µl Zellhomogenat (siehe 3.5.3) (pro Probe Dreifachbestimmung + Negativkontrolle ohne Carnitin) vermischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl L-Carnitin gestartet und die Extinktionszunahme bei 405 nm wurde alle 20 s für 10 min gemessen.

#### Berechnung der Enzymaktivität:

Unter Berücksichtigung des Extinktionsfaktors ( $\epsilon$ ) für Coenzym A:  $\epsilon = 12,03 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$  errechnet sich die Enzymaktivität (A) [ $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ] folgendermaßen:

$$A = \frac{\Delta E}{t \cdot d \cdot \epsilon} \cdot \frac{V}{v} \cdot \frac{F}{c}$$

$\Delta E$	=	Extinktionsänderung [1]
t	=	Zeit [min]
$\epsilon$	=	Extinktionskoeffizient
d	=	Schichtdicke des wells (0,63cm)
F	=	Verdünnung der Probe
c	=	Proteingehalt der Probe [mg/ml]
V	=	Gesamttestvolumen [ml]
v	=	Probenvolumen [ml]

### 3.8.3 Bestimmung der Katalase-Aktivität

#### 3.8.3.1 Lösungen und Reagenzien

Titanoxysulfat Schwefelsäure-Lösung

0,2% (w/v) BSA

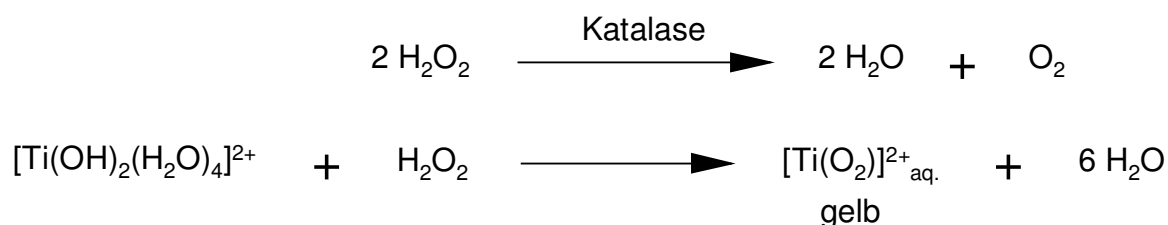
20 mM Imidazol-HCl-Puffer pH 7,2

(136 mg mit 1 M HCl auf pH 7,2; mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 100 ml)

3 mM Wasserstoffperoxid

(34 µl Wasserstoffperoxid 30% (Perhydrol<sup>®</sup>) auf 5 ml 20 mM Imidazol pH 7,2)

#### 3.8.3.2 Versuchsprinzip



**Abbildung 19: Bestimmung der Katalase-Aktivität mit Titanoxysulfat**

Das peroxisomale Enzym Katalase sorgt für die Entgiftung des bei vielen Reaktionen in den Peroxisomen (z.B. β-Oxidation, D-Aminosäure-Oxidase) entstehenden Wasserstoffperoxid durch dessen Aufspaltung in Wasser und Sauerstoff.

Das Prinzip der Methode nach Baudhuin [64], [65] beruht auf der Bildung einer farbigen Komplexverbindung aus Titanoxysulfat mit nicht umgesetztem Wasserstoffperoxid nach definierter Reaktionszeit und gleichzeitiger Säuredenaturierung der Katalase.

#### 3.8.3.3 Versuchsdurchführung

190 µl eines Reaktionsmix aus Imidazol, BSA und Wasserstoffperoxid (1:1:1) wurde auf Eis gelagert (in 96well-Platte) und mit 10 µl Zellhomogenat (siehe 3.5.3) (1:20 oder 1:30 mit 0,1% TX verdünnt; Doppelbestimmung) vermischt. Nach 1,5 und 3 min wurden 100 µl entnommen und in eine Platte mit 100 µl Titanoxysulfat-Schwefelsäure-Lösung pro well überführt. Die Extinktion wurde bei 405 nm gemessen.

Berechnung der Enzymaktivität:

Beim Leerwert (Referenz) wurde anstelle des Homogenates 0,1% TX eingesetzt.

$$A = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{E_0}{E_t} \cdot \frac{F}{c}$$

A	=	Aktivität [nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]
t	=	Reaktionszeit (1,5 ; 3 min)
E <sub>0</sub>	=	Extinktion des Leerwertes
E <sub>t</sub>	=	Extinktion der Probe
F	=	Verdünnung (20 x; 30 x)
c	=	Proteingehalt [mg/ml]

## 4 Ergebnisse

Die Doktorarbeit besteht aus drei Teilen, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden. In den Abbildungen des Ergebnisteiles werden, falls in der Beschriftung nicht anders beschrieben, die Mittelwerte (MW) aus den Experimenten als Punkte oder Balken und die Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken dargestellt.

Auf die Reaktionsprinzipien (siehe Kapitel 3.6 bis 3.8) der verschiedenen Versuche wird in diesem Kapitel nicht näher eingegangen.

### 4.1 Bestimmung der Cytotoxizität

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die allgemeine cytotoxische Wirkung der verwendeten Knoll-Substanzen untersucht. Dazu wurden zuerst vier Cytotoxizitäts-Tests (CV, LDH, NR, WST) mit Hilfe von drei als toxisch bekannten Substanzen (Digitonin, SDS, TritonX-100) auf ihre Sensitivität und Funktionalität untersucht. Die zwei geeignetsten Assays wurden dann zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Konzentrationen der Knoll-Substanzen verwendet.

#### 4.1.1 Vorversuche zu den Cytotoxizitäts-Assays

Stellvertretend für die Vorversuche wird hier eine Versuchsreihe zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Konzentration (Konzentration, die eine 50-prozentige Inhibierung der zellulären Reaktion, z.B. die Reduktion von WST-1, bewirkt) von Digitonin in der Rattenhepatozyten Primärkultur dargestellt.

Die Rattenhepatozyten wurden nach 24 h in Kultur für 90 min mit verschiedenen Konzentration an Digitonin (4-8 wells pro Konzentrationsstufe) behandelt und danach mit Hilfe der vier Assays der  $IC_{50}$ -Wert bestimmt. Zusätzlich wurde auch der Proteingehalt gemessen.

Bei allen Assays fielen die Messwerte mit steigender Digitonin-Konzentration ab und damit ließen sich  $IC_{50}$ -Werte bestimmen. Auch die Proteinbestimmung spiegelte durch abfallende Proteingehalte den toxischen Effekt von Digitonin wieder. Bei den WST- und der LDH-Bestimmungen (zellulär) konnte eine große Differenz zwischen den lebenden Rattenhepatozyten (DMSO-Kontrolle = 100% vital; 2,736 OD bzw. 288 mU/ml) und den toten Zellen (höchste Digitonin-Konzentrationsstufe = 0%; 0,056 OD

---

bzw. 11 mU/ml) bei geringer Streuung der einzelnen Messwerte pro Konzentration beobachtet werden (siehe Anhang 8.1). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei CV und NR eine hohe Streuung und ein geringeres Lebend/Tot-Signalverhältnis (1,163 OD zu 0,674 OD bzw. 0,122 OD zu 0,030). Aufgrund dieser Ergebnisse und des im Vergleich zu WST und LDH größeren Arbeitsaufwandes und der geringeren Stabilität der verwendeten Reagenzien wurden zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der Knoll-Substanzen der WST- und der LDH-Assay verwendet.

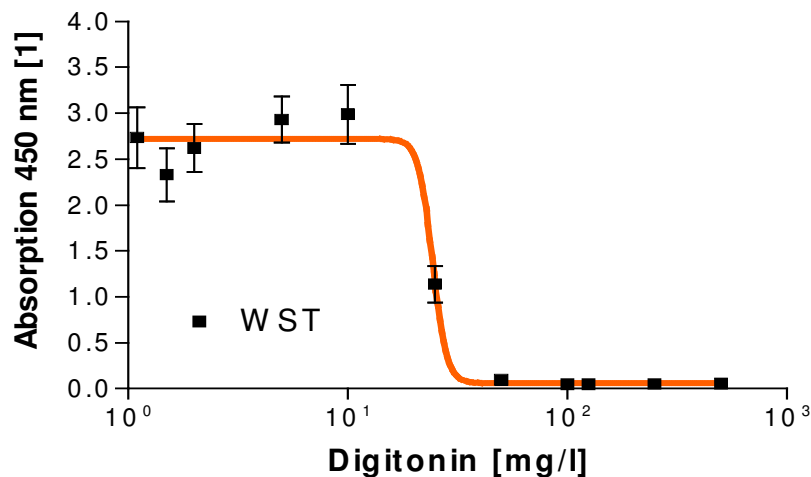


Abbildung 20:  $IC_{50}$ -Bestimmung von Digitonin mit WST in Rattenhepatozyten

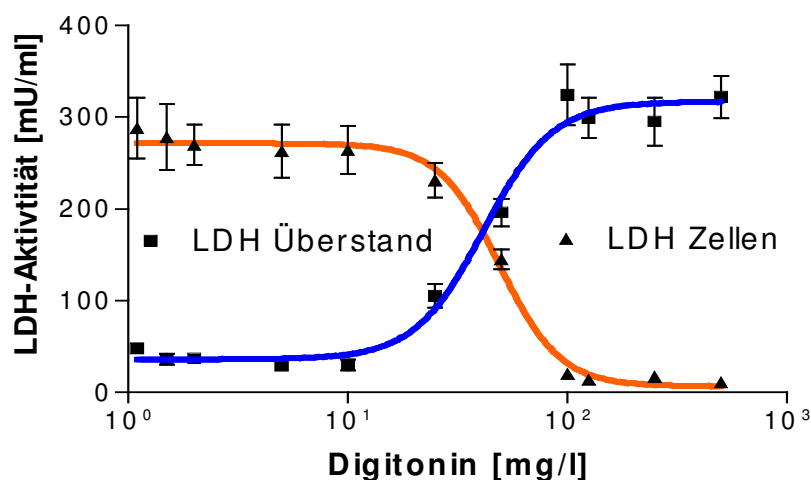


Abbildung 21:  $IC_{50}$ -Bestimmung von Digitonin mit LDH (im Überstand/zellulär)

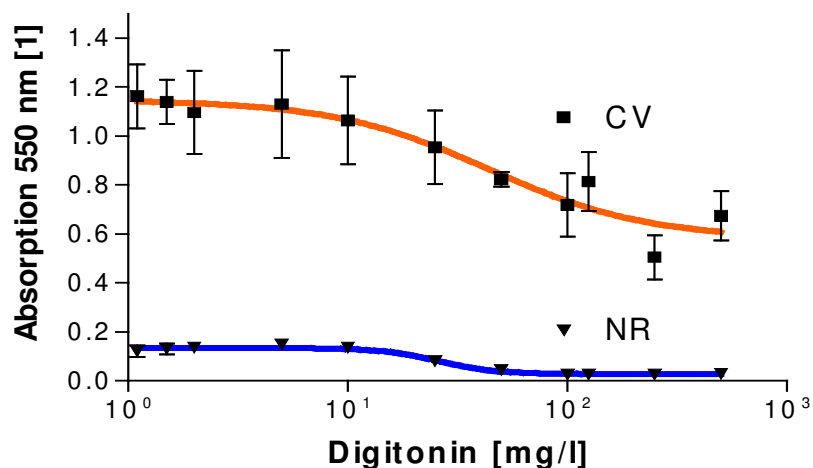


Abbildung 22: IC<sub>50</sub>-Bestimmung von Digitonin mit CV und NR

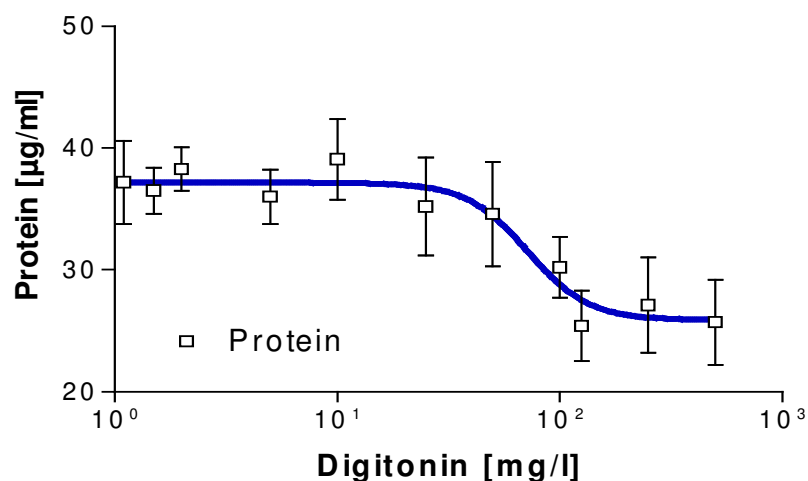


Abbildung 23: IC<sub>50</sub>-Bestimmung von Digitonin mit Bradford in Rattenhepatozyten

Zur weiteren Prüfung der beiden Messmethoden wurde noch die Wirkung der beiden Detergenzien SDS und Triton X-100 auf Rattenhepatozyten untersucht. In den folgenden Abbildungen sind die IC<sub>50</sub>-Kurven (Mittelwerte aus 4-5 Experimenten) für die drei Substanzen, die mit WST und über LDH (zellulär) bestimmt wurden, dargestellt. Die errechneten IC<sub>50</sub>-Konzentrationen waren mit beiden Methoden sehr ähnlich. Für Digitonin wurden 16 mg/l mit WST und 21 mg/l mit LDH ermittelt, für Triton X-100 0,005% (v/v) bzw. 0,003% (v/v) und für SDS wurden 111 mg/l und 126 mg/l als IC<sub>50</sub>-Konzentrationen bestimmt.

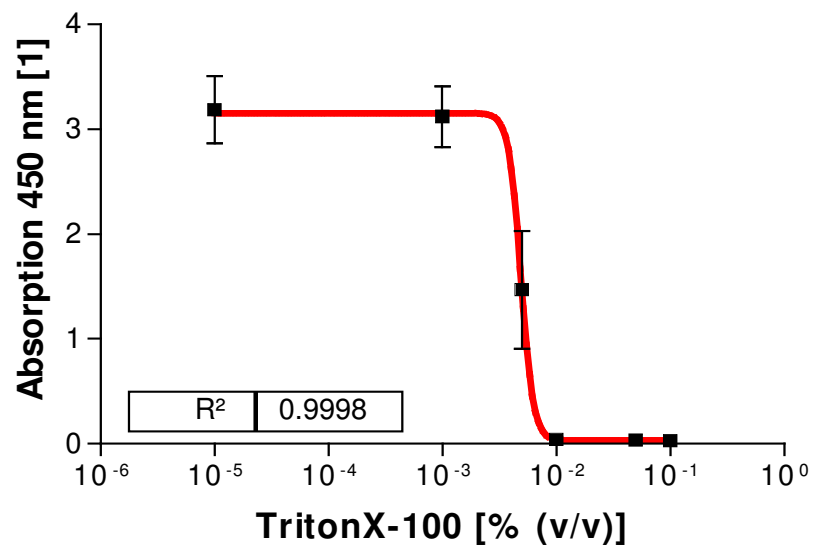


Abbildung 24: IC<sub>50</sub>-Bestimmung von Triton X-100 mit WST in Rattenhepatozyten  
(n = 5)

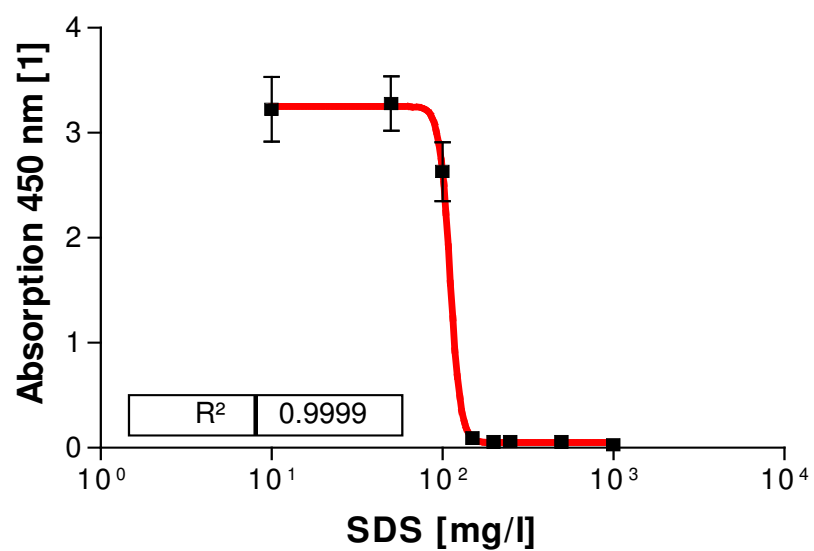


Abbildung 25: IC<sub>50</sub>-Bestimmung von SDS mit WST in Rattenhepatozyten  
(n = 4)



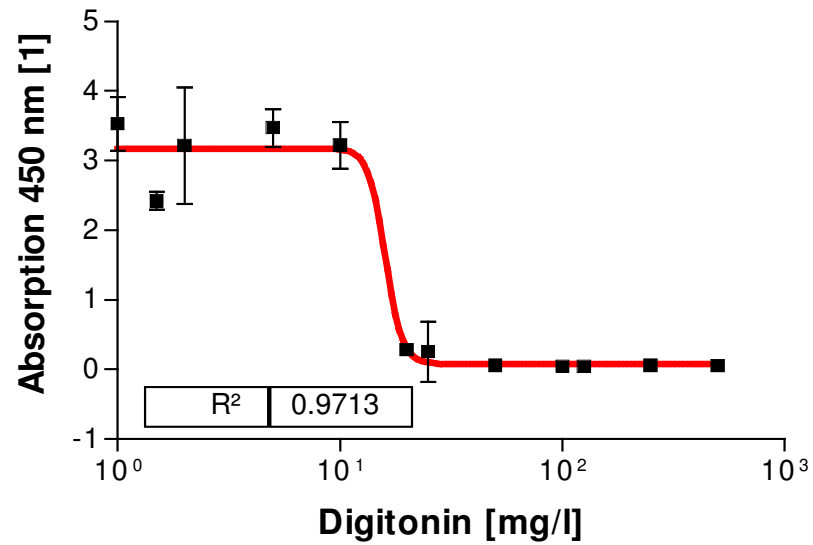


Abbildung 26: IC<sub>50</sub>-Bestimmung von Digitonin mit WST in Rattenhepatozyten  
(n = 4)

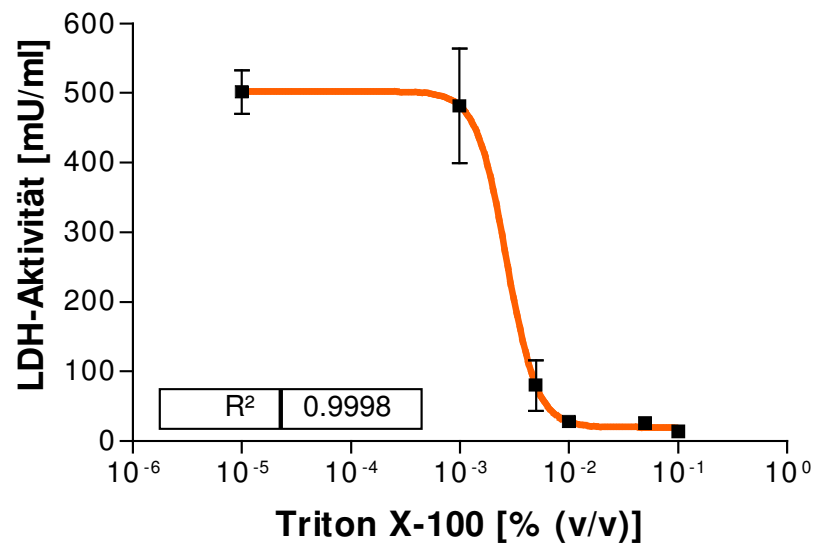


Abbildung 27: IC<sub>50</sub>-Bestimmung von Triton X-100 mit LDH in Rattenhepatozyten  
(n = 5)

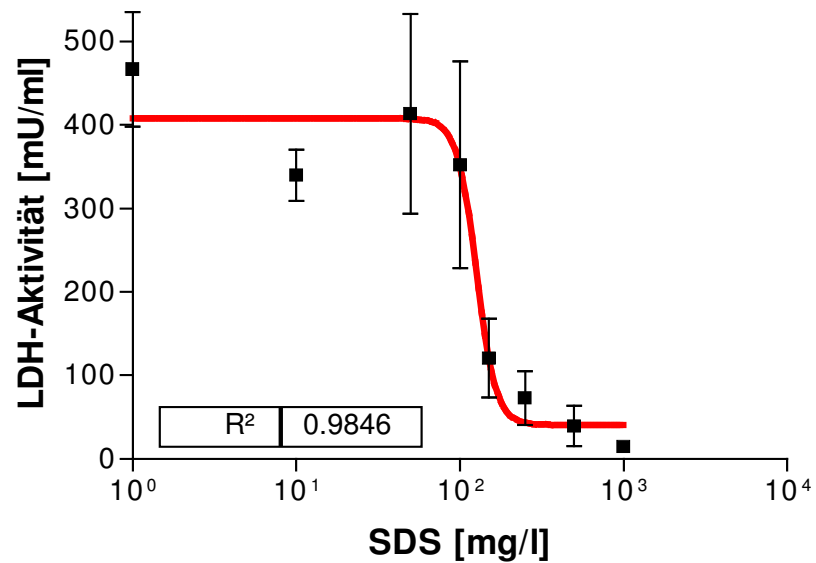


Abbildung 28: IC<sub>50</sub>-Bestimmung von SDS mit LDH in Rattenhepatozyten  
(n = 5)

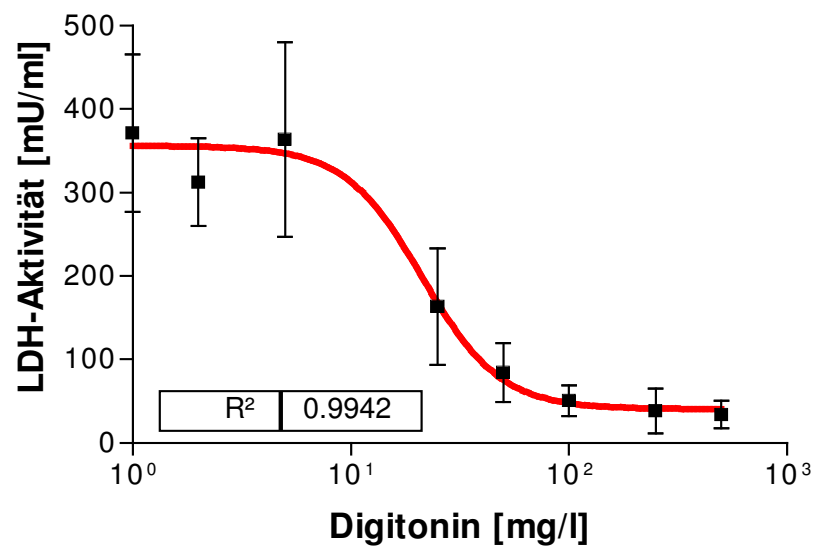


Abbildung 29: IC<sub>50</sub>-Bestimmung von Digitonin mit LDH in Rattenhepatozyten  
(n = 4)

Beim Vergleich der beiden Messmethoden zeigte sich, dass beide Methoden ähnliche IC<sub>50</sub>-Werte liefern.

Während der Untersuchung der Knoll-Substanzen mit WST und LDH wurde der MTT-Test als Alternative ausprobiert.

Die mit MTT bestimmten  $IC_{50}$ -Werte lagen zwischen denen von WST und LDH. Die Standardabweichung (SD) der gemessenen Werte war bei MTT teilweise am geringsten.

Die Ergebnisse zeigten, dass der MTT-Assay eine gute Alternative zu WST oder LDH darstellt, aber da die  $IC_{50}$ -Konzentrationen von einigen Knoll-Substanzen schon mit diesen beiden Methoden bestimmt worden waren, wurden diese Assays auch weiterhin verwendet.

**Tabelle 7: Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte [ $\mu$ M] von WST, LDH (n = 3) und MTT (n = 2)**

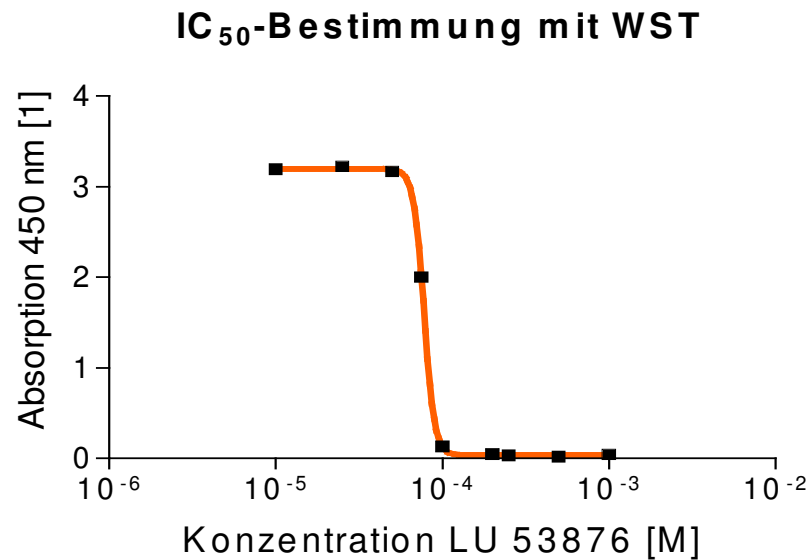
<b>Substanz</b>	<b>WST</b>	<b>SD</b>	<b>MTT</b>	<b>SD</b>	<b>LDH</b>	<b>SD</b>
LU 45966	<b>359</b>	96	<b>559</b>	5	<b>601</b>	79
BSF 208791	<b>900</b>	205	<b>990</b>	8	<b>1268</b>	157
BSF 420627	<b>162</b>	15	<b>244</b>	36	<b>279</b>	13

#### **4.1.2 Bestimmung der $IC_{50}$ -Konzentrationen der Knoll-Substanzen**

Aufgrund der Ergebnisse aus den Vorversuchen wurden für die Untersuchung der Knoll-Substanzen der WST- und der LDH-Assay ausgewählt. Bei der LDH-Bestimmung wurde nur noch der intrazelluläre LDH-Gehalt gemessen, da zum einen durch den täglichen Mediumwechsel die Messung des LDH-Ausstroms aus den Hepatozyten in den Überstand (Medium) zu ineffizient wurde und zum anderen deutlich wurde, dass Mediumbestandteile (z.B. FKS) oder die Testsubstanzen selbst (wurde bei hohen SDS-Konzentrationen beobachtet) die LDH-Messung beeinflussen können.

Die Hepatozyten wurden für 72 h (entsprechend der maximalen Inkubationszeit in den Induktionsversuchen) mit den Knoll-Substanzen in verschiedenen Konzentrationen (üblicherweise 0,001 bis 1 mM/Ansatz) inkubiert und die Auswirkungen auf den WST-Umsatz und den zellulären LDH-Gehalt gemessen. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm GraphPad Prism gegen den Logarithmus der

eingesetzten Konzentrationen aufgetragen und durch nicht-lineare Regression wurde eine sigmoidale Kurve erstellt und die  $IC_{50}$ -Konzentration (entspricht dem Wendepunkt der Kurve) berechnet. Nachfolgend wird exemplarisch eine solche  $IC_{50}$ -Kurve dargestellt.



**Abbildung 30: Beispiel einer für Knoll-Substanzen erstellten  $IC_{50}$ -Kurve**

Aus den berechneten  $IC_{50}$ -Konzentrationen der 16 Knoll-Substanzen aus je 3 bis 4 voneinander unabhängigen Experimenten wurde ein Mittelwert und die Standardabweichung (SD) gebildet. Die Ergebnisse aus den LDH- und den WST-Messungen sind im Folgenden als Tabellen und zur besseren Veranschaulichung noch einmal als Balkendiagramme dargestellt.

Tabelle 8: IC<sub>50</sub>-Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] der Knoll-Substanzen durch LDH bestimmt (n = 3-4<sup>\*</sup>)

Knoll-Substanz	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	SD [ $\mu\text{M}$ ]
LU 45966 *	601	79
LU 47110	450	8
LU 53876	122	29
BSF 111995	122	57
LU 135252	1173	211
BSF 201640 *	102	10
BSF 208075	1853	112
BSF 208791	1268	157
BSF 223651 *	391	118
BSF 409499	29	13
BSF 411693	1041	272
BSF 418585	38	20
BSF 420627	279	13
BSF 433220	8	5
BSF 448698	72	15
BSF 466506	87	20

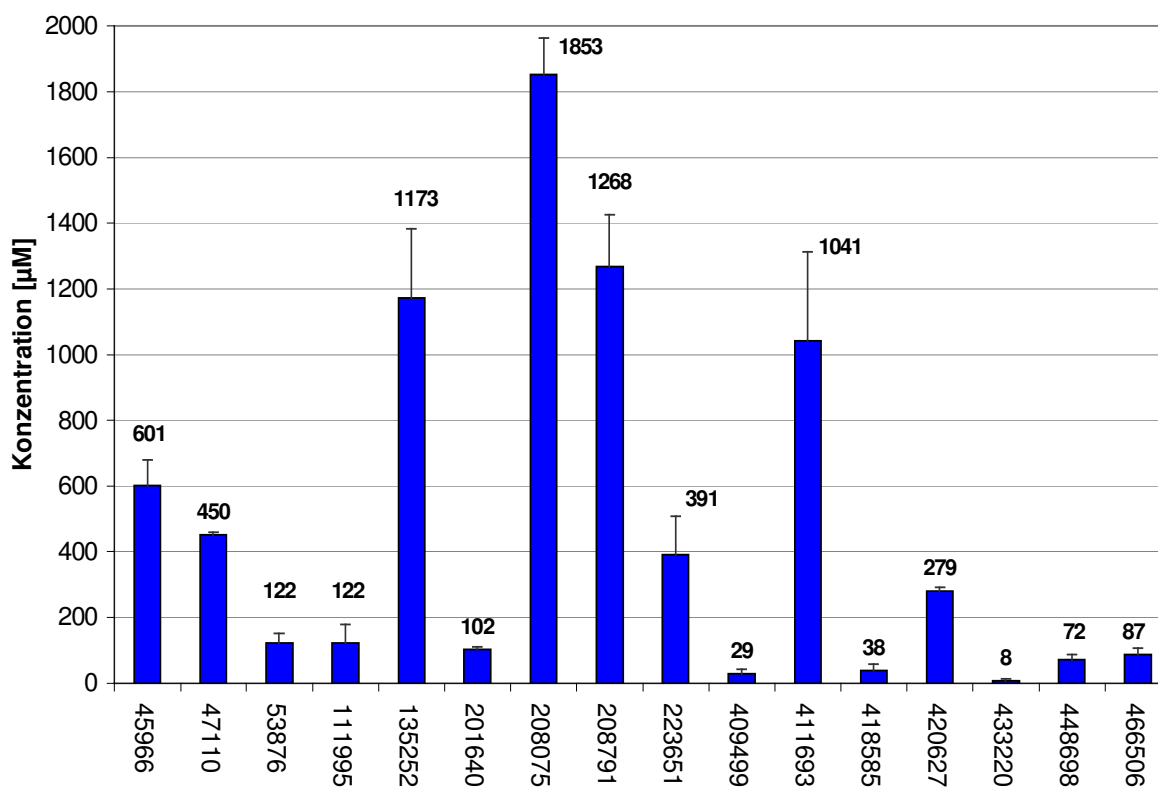
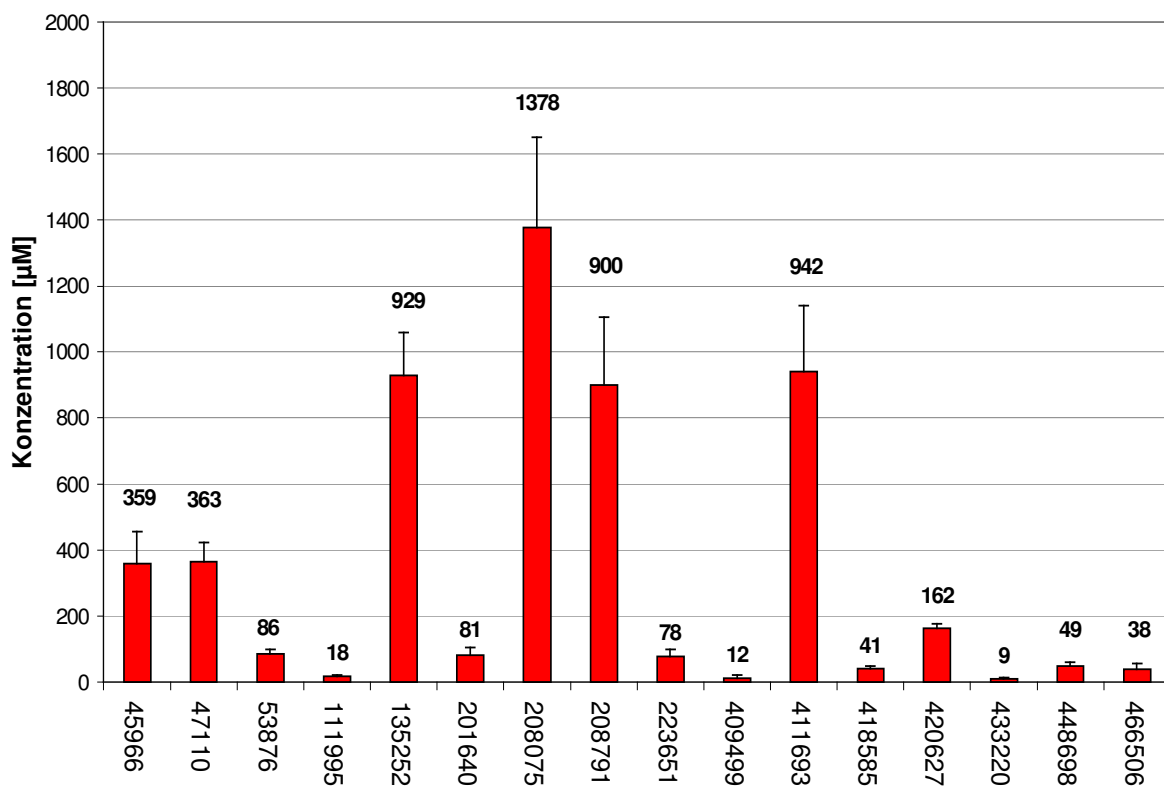
Abbildung 31: IC<sub>50</sub>-Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] der Knoll-Substanzen (LDH)

Tabelle 9: IC<sub>50</sub>-Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] der Knoll-Substanzen durch WST-1 bestimmt (n = 3-4<sup>\*</sup>)

Knoll-Substanz	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	SD [ $\mu\text{M}$ ]
LU 45966 <sup>*</sup>	359	96
LU 47110	363	59
LU 53876	86	13
BSF 111995	18	3
LU 135252	929	130
BSF 201640 <sup>*</sup>	81	22
BSF 208075	1378	274
BSF 208791	900	205
BSF 223651 <sup>*</sup>	78	22
BSF 409499	12	9
BSF 411693	942	199
BSF 418585	41	9
BSF 420627	162	15
BSF 433220	9	5
BSF 448698	49	11
BSF 466506	38	18

Abbildung 32: IC<sub>50</sub>-Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] der Knoll-Substanzen (WST-1)

Zum Vergleich der beiden Methoden wurden die jeweils gefundenen  $IC_{50}$ -Werte gegeneinander graphisch aufgetragen. Dabei ergab sich ein Korrelationsfaktor von 0,965, was die gute Übereinstimmung der durch die beiden Messmethoden erhaltenen Daten zeigt.

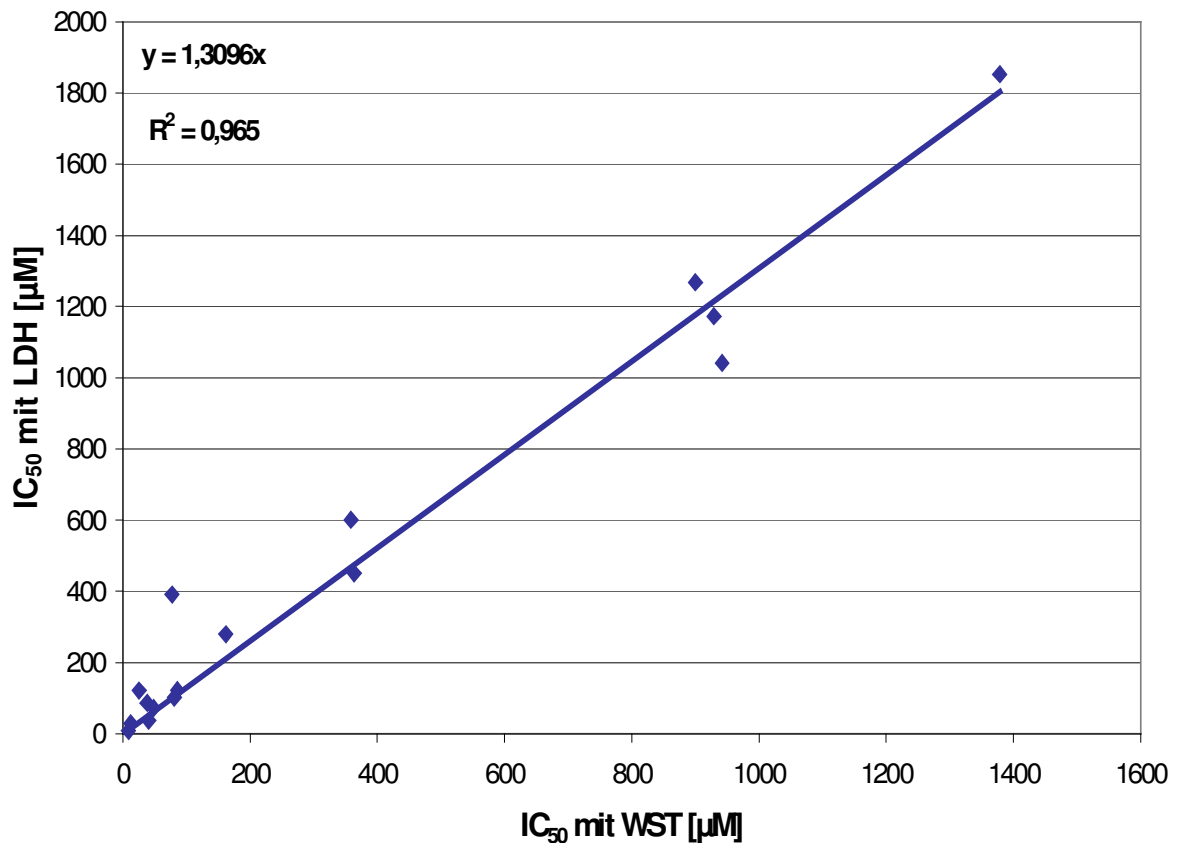


Abbildung 33: Korrelation der  $IC_{50}$ -Werte (WST/LDH)

Da sich mit der WST-Messung die niedrigeren  $IC_{50}$ -Werte ergaben (d.h. die Methode ist etwas empfindlicher als LDH) und in den späteren Induktionsversuchen cytotoxische Einflüsse durch die Knoll-Substanzen auf die Rattenhepatozyten möglichst gering gehalten werden sollten, wurden die mit WST gefundenen Werte als maximal einsetzbare Konzentrationen verwendet.

## 4.2 Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme in primären Rattenhepatozyten

In den Induktionsversuchen wurden immer mehrere Konzentrationsstufen der Knoll-Substanzen eingesetzt, wobei üblicherweise der mit WST bestimmte IC<sub>50</sub>-Wert, die Hälfte davon und 10 µM als Konzentrationen verwendet wurden.

Die meisten der in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse sind nur eine Auswahl aus den gesamten Daten. Die vollständigen Daten befinden sich im Anhang.

### 4.2.1 Induktion von Cytochrom P450-Isoenzymen

Bevor die Knoll-Substanzen untersucht wurden, wurden die verwendeten Assays mit Hilfe aus der Literatur bekannter Modellinduktoren auf ihre Spezifität und Sensitivität überprüft. Dabei wurden folgende Modellsubstanzen und Konzentrationen verwendet [34], [2] :

**Tabelle 10: CYP-Modellinduktoren (bei Ratten)**

<b>Induktor</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Induziert</b>
3-Methylcholanthren	2,5 µM	CYP 1A
Beta-naphthoflavon	25 bzw. 10 µM	CYP 1A
Aroclor	10 µg/ml	CYP 1A/2B
Phenobarbital	0,5 bzw. 3 mM	CYP 2B
Dexamethason	10 µM	CYP 3A
PCN	10 µM	CYP 3A
Clofibrat	100 bzw. 500 µM	CYP 4A
Ciprofibrat	250 µM	CYP 4A
DEHP	1000 µM	CYP 4A
DHEA	100 µM	CYP 4A

Die Induktoren wurden wie später auch die Knoll-Substanzen als konzentrierte DMSO-Lösungen (außer PB; 411693, 466506 direkt in DMEM gelöst) angesetzt und im Zellmedium 1:200 verdünnt. Die DMSO-Konzentration wurde dabei konstant bei 0,5% gehalten, da diese Konzentration noch keinen Einfluss auf die Vitalität der Hepatozyten hatte.



Da die in der Literatur eingesetzten Konzentrationen zum Teil voneinander abwichen, wurde für einige Induktoren die  $IC_{50}$ -Werte einmalig mit WST bestimmt, um cytotoxische Effekte bei den letztlich verwendeten Konzentrationen auszuschließen.

**Tabelle 11:  $IC_{50}$ -Konzentrationen von Modellinduktoren in Rattenhepatozyten (n = 1)**

<b>Induktor</b>	<b><math>IC_{50}</math> [<math>\mu</math>M]</b>
3-MC	> 5
BNF	78
PB	3159
DEX	> 500
CLO	> 1000

Bei 3-MC, DEX, und CLO konnte bis zur im Test höchsten eingesetzten Konzentration (5; 500 bzw. 1000  $\mu$ M) keine Erniedrigung des WST-Umsatzes gemessen werden.

#### **4.2.1.1 Bestimmung der AROD-Aktivitäten**

Die in den Induktionsversuchen (außer einige Vorversuche) ermittelten Ergebnisse wurden mit dem Computerprogramm Analyse-it für Excel (Version 1.62) mit einseitigem ANOVA-Test mit Dunnett-Test (Konfidenzintervall 99% bzw.  $p \leq 0,01$ ) statistisch überprüft. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden mit \* gekennzeichnet.

Die in manchen Tabellen angegebenen relativen Induktionsfaktoren beziehen sich auf den entsprechenden Mittelwert der DMSO-Probe, außer bei den Substanzen, die nicht in DMSO, sondern direkt in DMEM-Medium, gelöst wurden (PB, 411693, 466506). Hier wurde der Mittelwert der Kontrolle (nur DMEM) als Referenzwert verwendet.

##### **4.2.1.1.1 Zeitliche Veränderungen der AROD-Aktivitäten**

Zu Beginn der Induktionsversuche wurde der zeitliche Verlauf der verschiedenen AROD-Aktivitäten (MROD nicht dargestellt, aber entsprechend zu EROD) untersucht, um die minimal benötigte Inkubationszeit für eine maximale Induktion zu ermitteln.

Hierbei erwies sich eine 48-stündige Inkubation mit den Modellsubstanzen als ausreichend für eine größtmögliche Induktion.

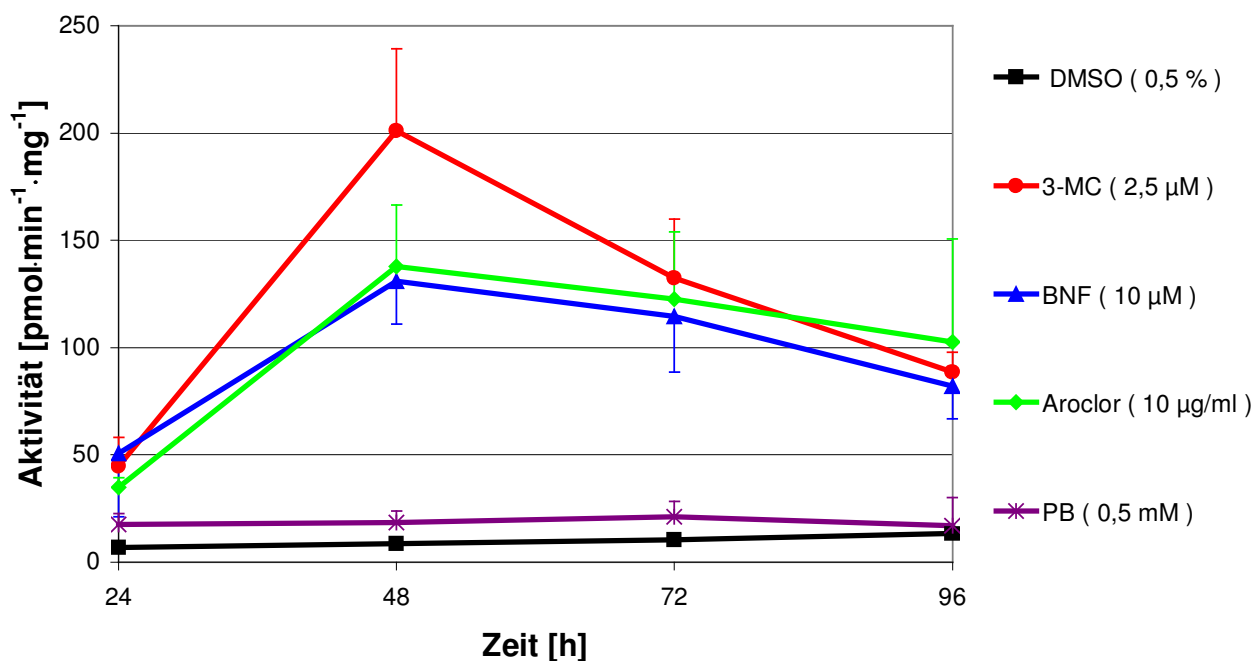


Abbildung 34: Zeitlicher Verlauf der EROD-Aktivität [ $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]

Bei der Messung der CYP 1A-vermittelten EROD-Aktivität zeigte sich ein leichter, stetiger Anstieg der Aktivität der DMSO-Kontrolle mit andauernder Inkubationszeit von  $6,7 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  bei 24 h auf  $13,3 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  bei 96 h.

Die CYP 1A-Modellinduktoren 3-MC, BNF und ARO zeigten schon nach 24 h Inkubation eine 5- bis 7-fache Erhöhung und erreichten eine maximale Induktion bei 48 h (23-; 15- bzw. 16-fach). Danach fielen die Aktivitäten stetig ab, blieben aber deutlich über der DMSO-Kontrolle. Der CYP 2B-Induktor PB bewirkte über den gesamten Zeitraum eine ungefähre Verdopplung der EROD-Aktivität gegenüber der Kontrolle. (Gesamte Daten im Anhang 8.3)

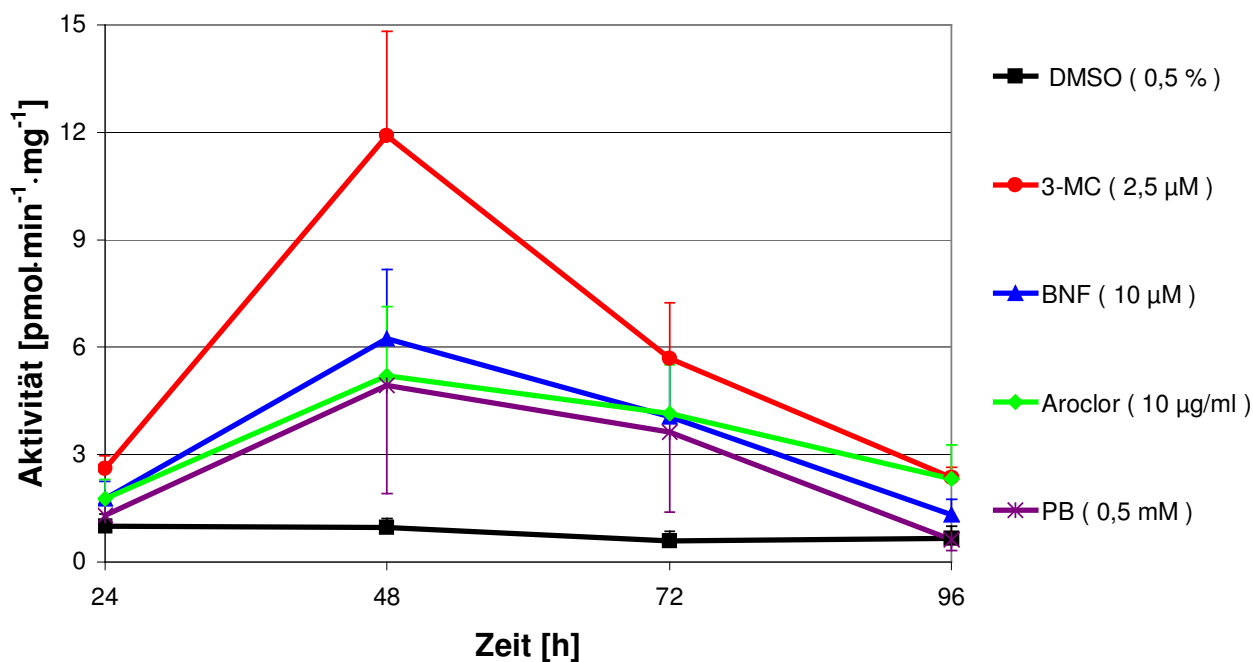


Abbildung 35: Zeitlicher Verlauf der BROD-Aktivität [ $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]

Bei der Messung der sowohl durch CYP 1A- als auch 2B vermittelten BROD-Aktivität zeigte sich, dass sowohl die Grundaktivität als auch die Erhöhung nach Induktion hier geringer waren als beim EROD-Assay.

Die DMSO-Kontrolle blieb in den ersten zwei Tagen konstant ( $1,0 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) und fiel dann leicht ab auf  $0,6$  (72 h) bzw.  $0,7 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  (96 h).

Auch hier zeigten sich die stärksten Erhöhungen nach 48 h Inkubation und 3-MC als potentester Induktor (12-fache Erhöhung). Im Gegensatz zum EROD-Assay zeigte PB hier eine vergleichbar starke Induktion wie BNF und ARO bei 48 h (5-fache im Vergleich zu 6- bzw. 5-fache Erhöhung), die bei 96 h aber vollständig verschwunden war. (Gesamte Daten im Anhang 8.4)

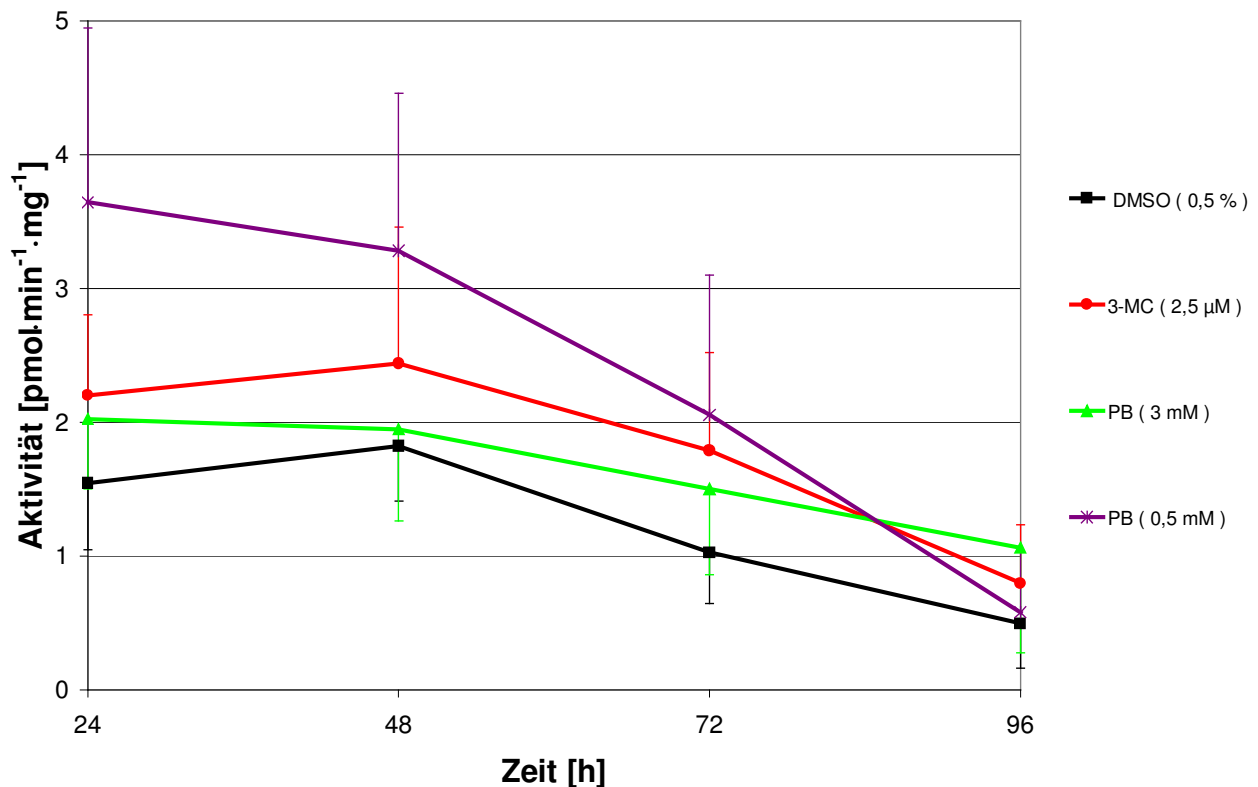


Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf der PROD-Aktivität [ $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]

Bei der Bestimmung der durch CYP 2B-katalysierten PROD-Aktivität zeigte sich im Gegensatz zu den anderen AROD-Aktivitäten ein recht schneller Abfall der gesamten Aktivitäten, so dass selbst durch den Zusatz der Induktoren keine signifikante Erhöhung des Umsatzes gemessen werden konnte

Aus diesem Grund wurde der PROD-Assay nicht zur Untersuchung der Knoll-Substanzen verwendet. (Gesamte Daten im Anhang 8.5)

#### 4.2.1.1.2 Überprüfung der Spezifität von EROD, BROD und MROD

Zur Überprüfung der Spezifität wurden in den Assays alle Induktoren verwendet und auftretende Induktionen mit Literaturangaben verglichen.

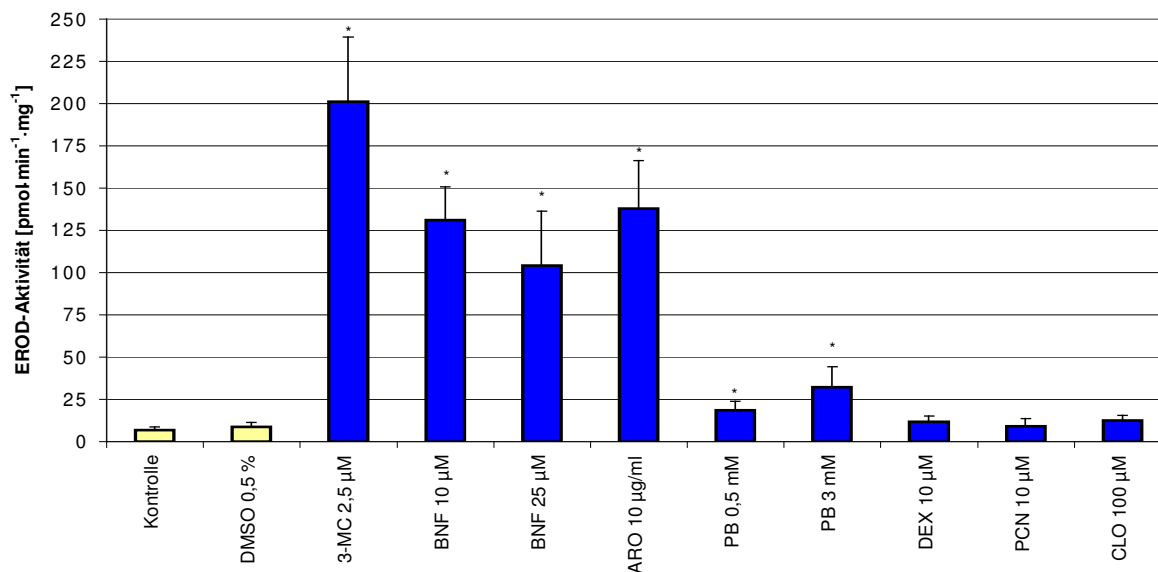


Abbildung 37: EROD-Aktivitäten nach 48-stündiger Behandlung mit Modellinduktoren (n = 16)

Die CYP 1A-Modellinduktoren 3-MC, BNF und ARO zeigten eine starke Erhöhung der EROD-Aktivitäten (23-; 15-; 12- bzw. 16-fach), während der 2B-Induktor PB eine schwache (drei- bzw. fünffache) und die anderen Substanzen keine Induktion bewirkten. Die Aktivität in nur mit DMSO behandelten Rattenhepatozyten betrug nach 48 h 8,7 pmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> (Gesamte Daten im Anhang 8.6).

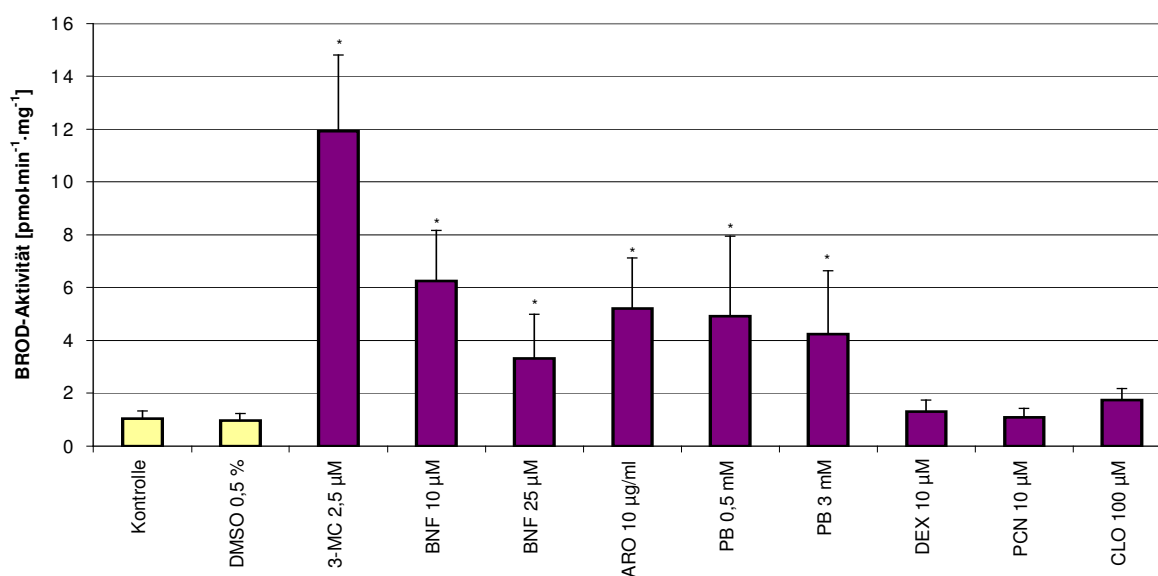


Abbildung 38: BROD-Aktivitäten nach 48-stündiger Behandlung mit Modellinduktoren (n = 16)

Im BROD-Assay bewirkte 3-MC eine starke (12-fache) und BNF, ARO und PB eine mittlere (6-; 3-; 5-; 5- und 4-fache) Induktion der Aktivität in Rattenhepatozyten. Die anderen Substanzen verursachten keine signifikanten Aktivitätsänderungen. Die BROD-Aktivität in DMSO-behandelten Rattenhepatozyten betrug nach 48 h  $1,0 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Gesamte Daten im Anhang 8.6).

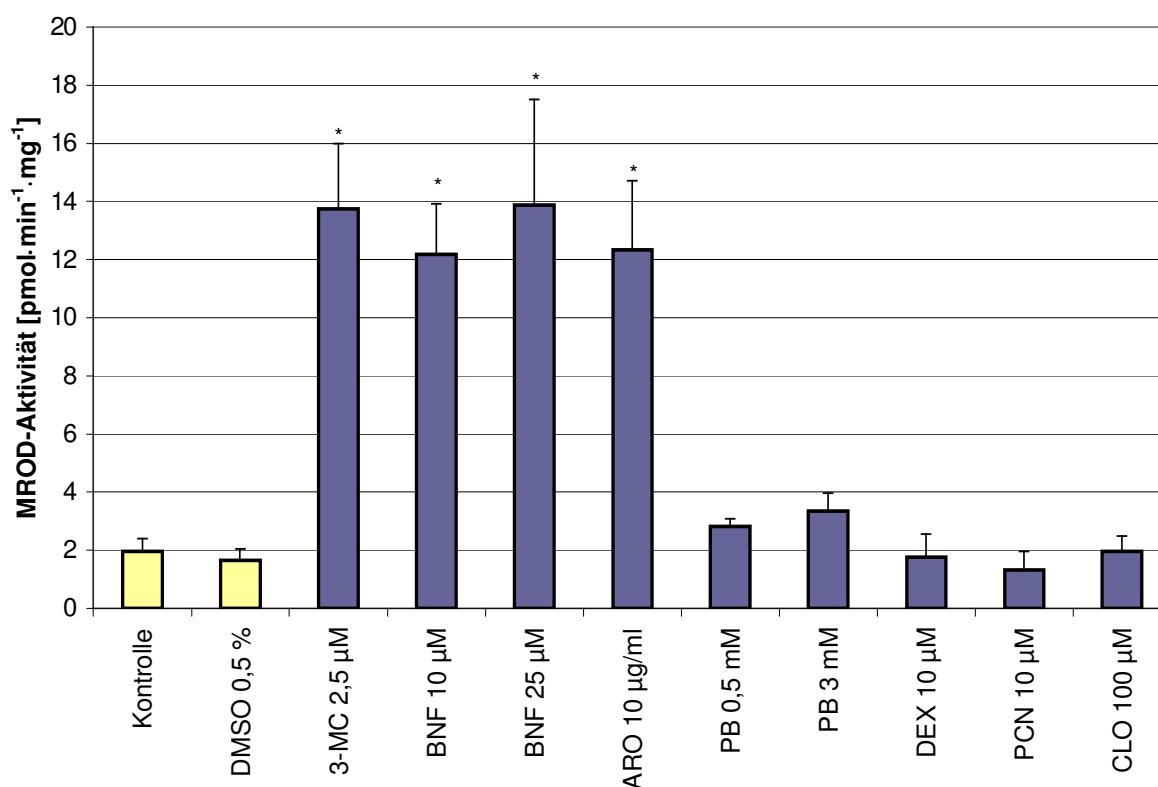


Abbildung 39: MROD-Aktivitäten nach 48-stündiger Behandlung mit Modellinduktoren (n = 5)

Im MROD-Assay zeigte sich ein ähnliches Induktionsprofil wie bei EROD, aber sowohl die absoluten Umsätze als auch die relativen Induktionsfaktoren waren hier geringer und PB bewirkte keine signifikante Erhöhung der MROD-Aktivität. Die Aktivität in der DMSO-Kontrolle betrug nach 48 h  $1,6 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Die CYP 1A-Induktoren 3-MC, BNF (10 und 25  $\mu\text{M}$ ) und ARO erhöhten den Umsatz um das sieben- bis achtfache gegenüber der Kontrolle (Gesamte Daten im Anhang 8.6).

#### 4.2.1.1.3 Bestimmung der EROD-Aktivität

Aufgrund der Ergebnisse aus den Vorversuchen wurden die Rattenhepatozyten für 48 h mit den Knoll-Substanzen inkubiert und anschließend EROD und BROD bestimmt. MROD wurde nur bei Knoll-Substanzen gemessen, bei denen eine EROD-Induktion festgestellt wurde.

Als Positivkontrollen wurden 3-MC, BNF (10  $\mu\text{M}$ ) und PB (0,5 mM) in jeder 96well-Platte mitgeführt.

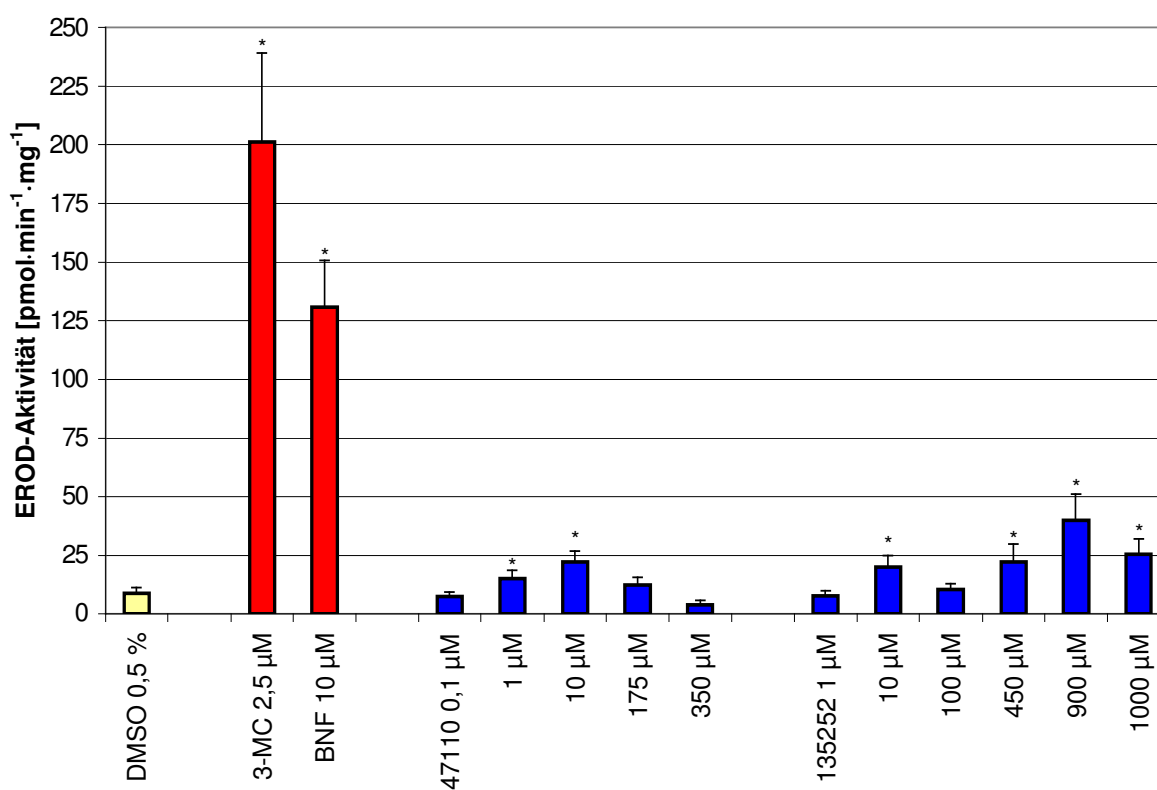


Abbildung 40: EROD-Aktivitäten nach Behandlung mit 47110 oder 135252 (n = 3)

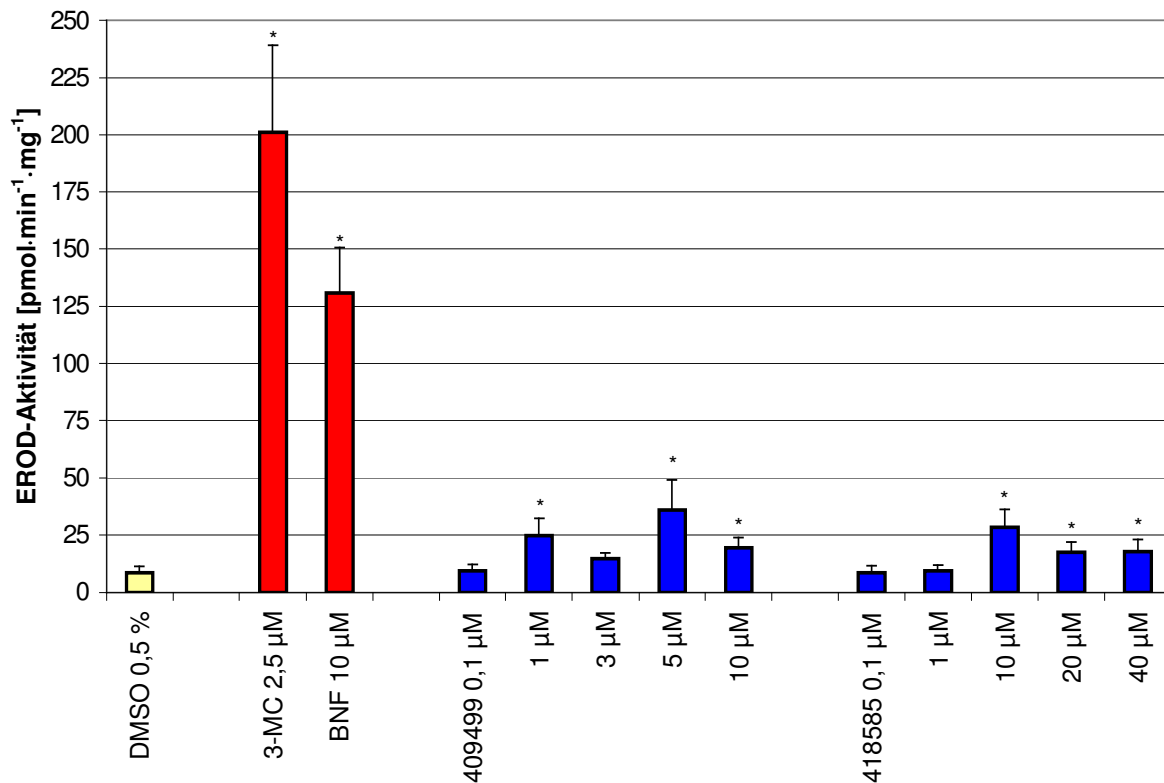


Abbildung 41: EROD-Aktivitäten nach Behandlung mit 409499 oder 418585 (n = 3)

Bei der Behandlung der Rattenhepatozyten mit den 16 Knoll-Substanzen für 48 h ergab sich, dass die meisten (zumindest im eingesetzten Konzentrationsbereich) keine Induktion der CYP 1A-vermittelten EROD-Aktivität bewirkten. Die Substanzen 47110, 135252, 409499 und 418585 hatten eine leicht induzierende Wirkung (2,6-; 4,6-; 4,1- und 3,3-fache), die im Bereich der Induktion durch PB lag und damit weit schwächer als durch die CYP 1A-Modellinduktoren war. Die Grundaktivität in der DMSO-Kontrolle betrug  $8,7 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ .



## 4.2.1.1.4 Bestimmung der BROD-Aktivität

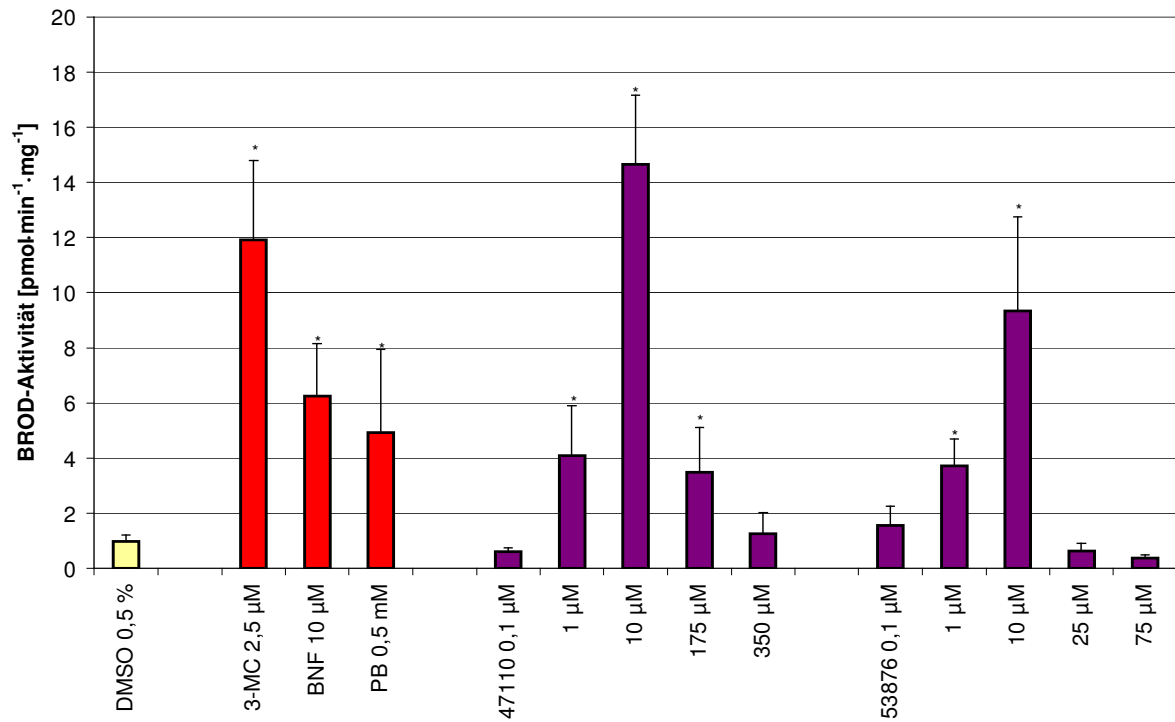


Abbildung 42: BROD-Aktivitäten nach Behandlung mit 47110 oder 53876 (n = 3)

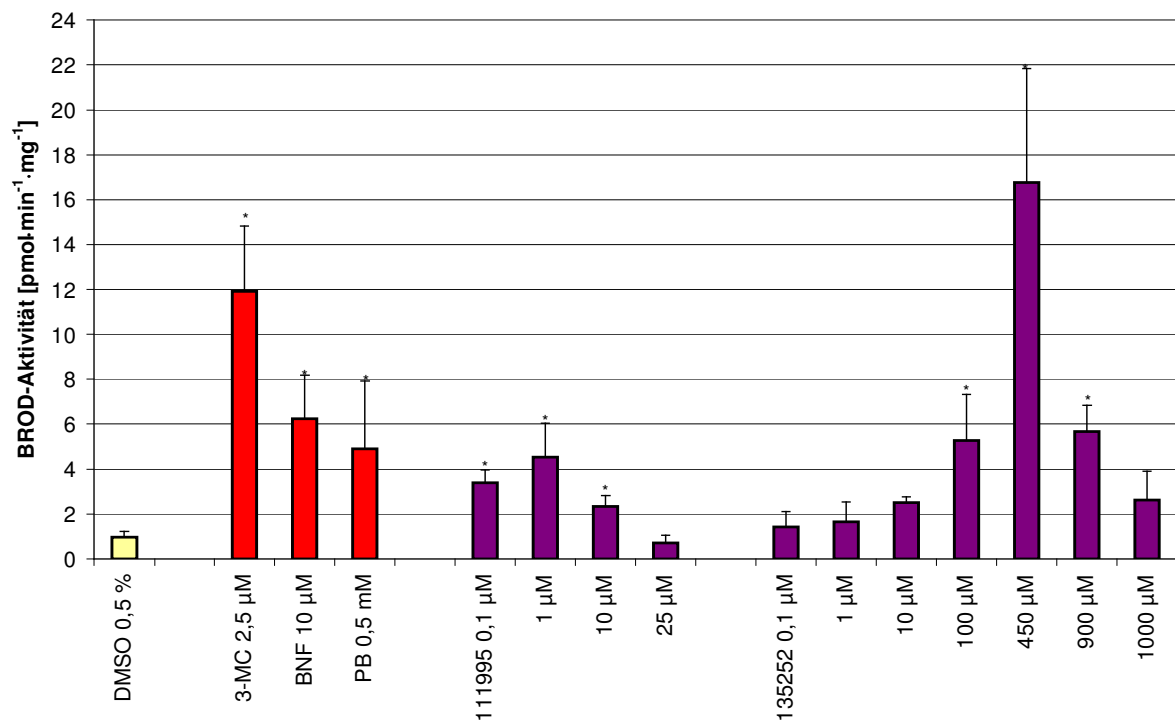


Abbildung 43: BROD-Aktivitäten nach Behandlung mit 111995 oder 135252 (n = 3)

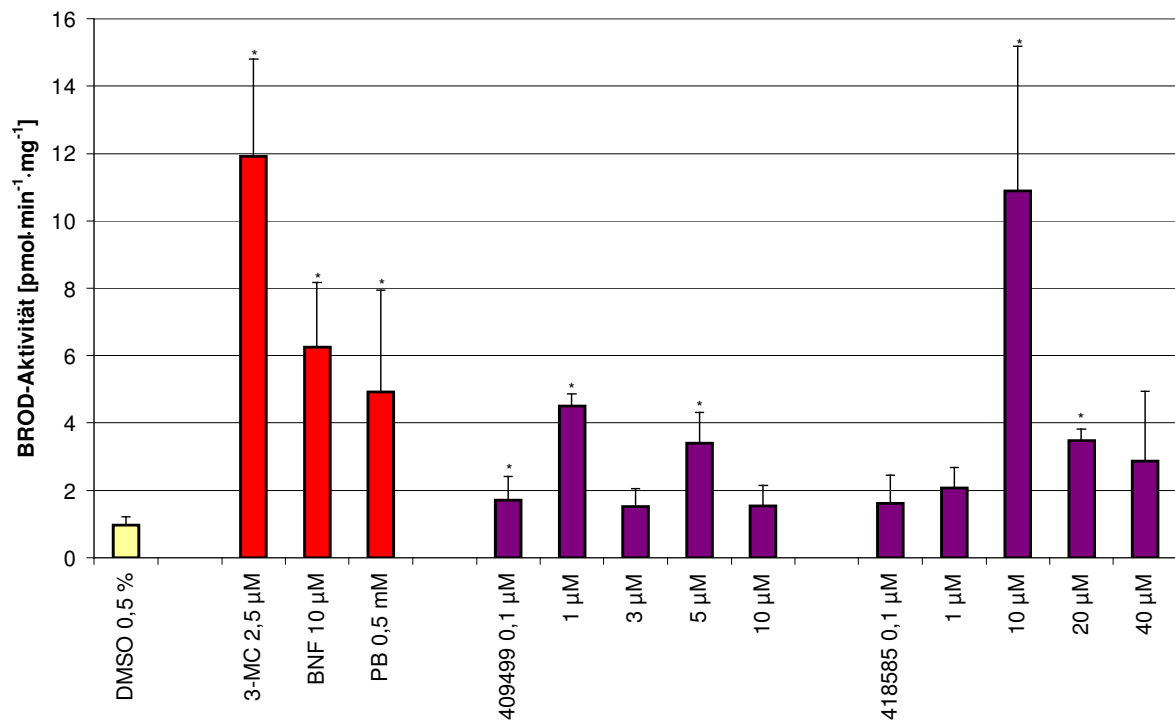


Abbildung 44: BROD-Aktivitäten nach Behandlung mit 409499 oder 418585 (n = 3)

Im Gegensatz zum EROD-Assay erwiesen sich bei BROD einige Knoll-Substanzen als starke Induktoren. 47110 (15-fach), 135252 (17-fach), 53876 (10-fach) und 418585 (11-fach) erzielten eine größere bzw. vergleichbare relative Erhöhung der BROD-Aktivität als 3-MC (12-fach). 111995 und 409499 (beide 4,6-fach) bewirkten eine Induktion im gleichen Bereich wie BNF, ARO oder PB. Die Aktivität in der DMSO-Kontrolle betrug  $1,0 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

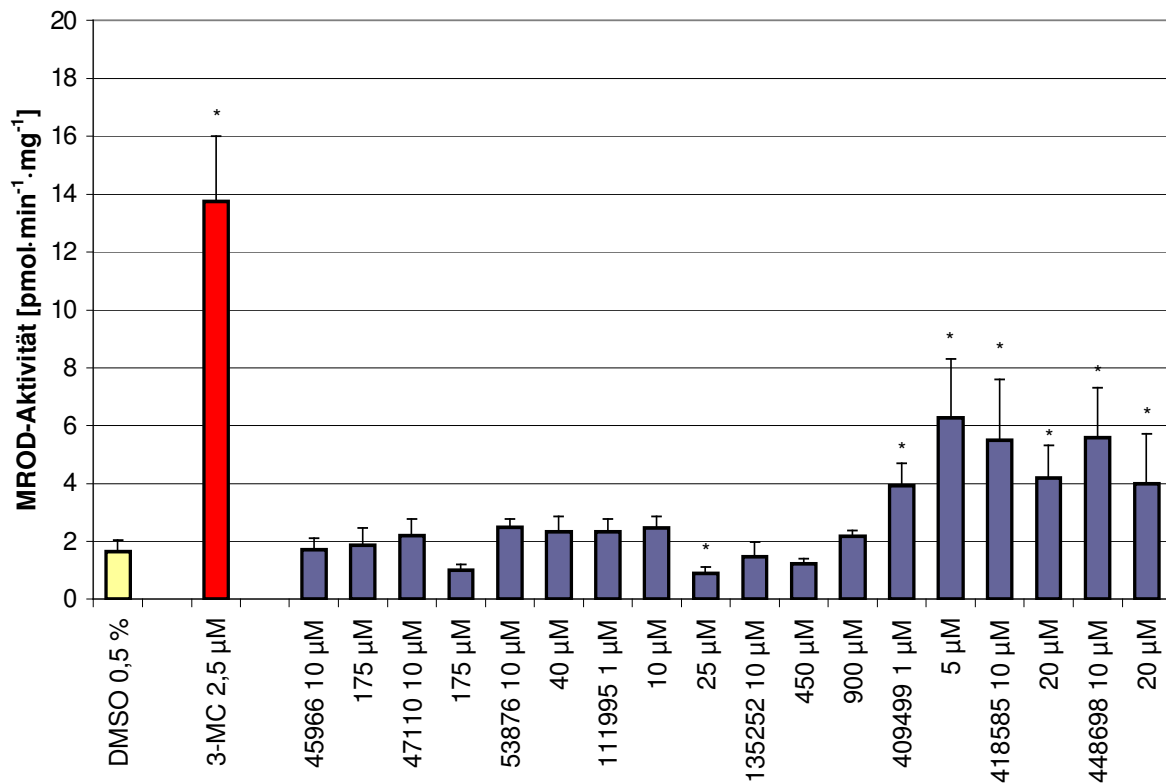


Abbildung 45: MROD-Aktivitäten nach 48 h Behandlung mit Knoll-Substanzen (n = 3-4)

Fünf der acht untersuchten Knoll-Substanzen zeigten (im verwendeten Konzentrationsbereich) keinen signifikanten Einfluss auf die MROD-Aktivitäten. Die drei Knoll-Substanzen 409499, 418585 und 448698 bewirkten im Vergleich zur Erhöhung durch 3-MC (8,3-fach) eine mittelstarke Induktion (3,8-; 3,3- und 3,4-fach). Die Grundaktivität der DMSO-Kontrolle lag bei  $1,6 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

#### 4.2.1.2 Untersuchung des Metabolismus von Testosteron

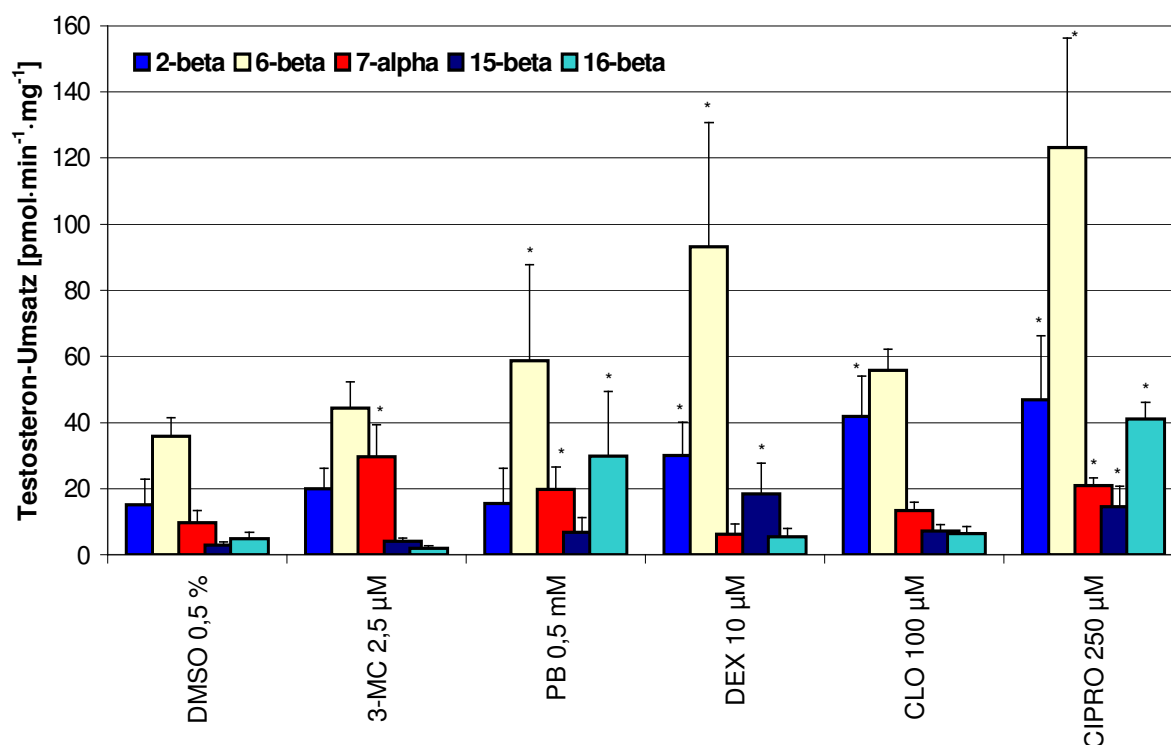


Abbildung 46: Beeinflussung des Testosteron-Metabolismus durch Modellinduktoren

Bei der Behandlung der Rattenhepatozyten mit den Modellinduktoren ergaben sich charakteristische Metabolitenmuster. Der CYP 1A-Induktor 3-MC bewirkte eine signifikante dreifache Erhöhung der Bildung von 7 $\alpha$ -OHT. Die Inkubation mit PB (CYP 2B) führte zu einem Anstieg der 6 $\beta$ - (1,5-fach), 7 $\alpha$ - (2,4-fach) und besonders stark der 16 $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität (10,9-fach). Der CYP 3A-Induktor DEX verursachte eine Zunahme an gebildetem 2 $\beta$ - (2,0x) 6 $\beta$  (2,6x) und 15 $\beta$  (6,3x)-OHT. Die beiden CYP 4A-Induktoren CLO und CIPRO bewirkten eine Erhöhung bei allen im Diagramm dargestellten Hydroxylase-Aktivitäten, wobei die Effekte bei CIPRO wesentlich stärker ausgeprägt waren. CLO und CIPRO führten besonders zu einem Anstieg der 2 $\beta$ -OHT- (2,8x bzw. 3,1x), 6 $\beta$ - (1,6x bzw. 3,4x) und 15 $\beta$  (2,5x bzw. 5,0x)-OHT-Bildung. Zusätzlich bewirkte CIPRO eine 8,3-fache Erhöhung der 16 $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität gegenüber der DMSO-Kontrolle. Die nicht im Diagramm gezeigten Induktoren BNF und PCN verhielten sich qualitativ entsprechend ihrer „CYP-Familienzugehörigkeit“ wie 3-MC bzw. DEX (Gesamte Daten im Anhang 8.7).

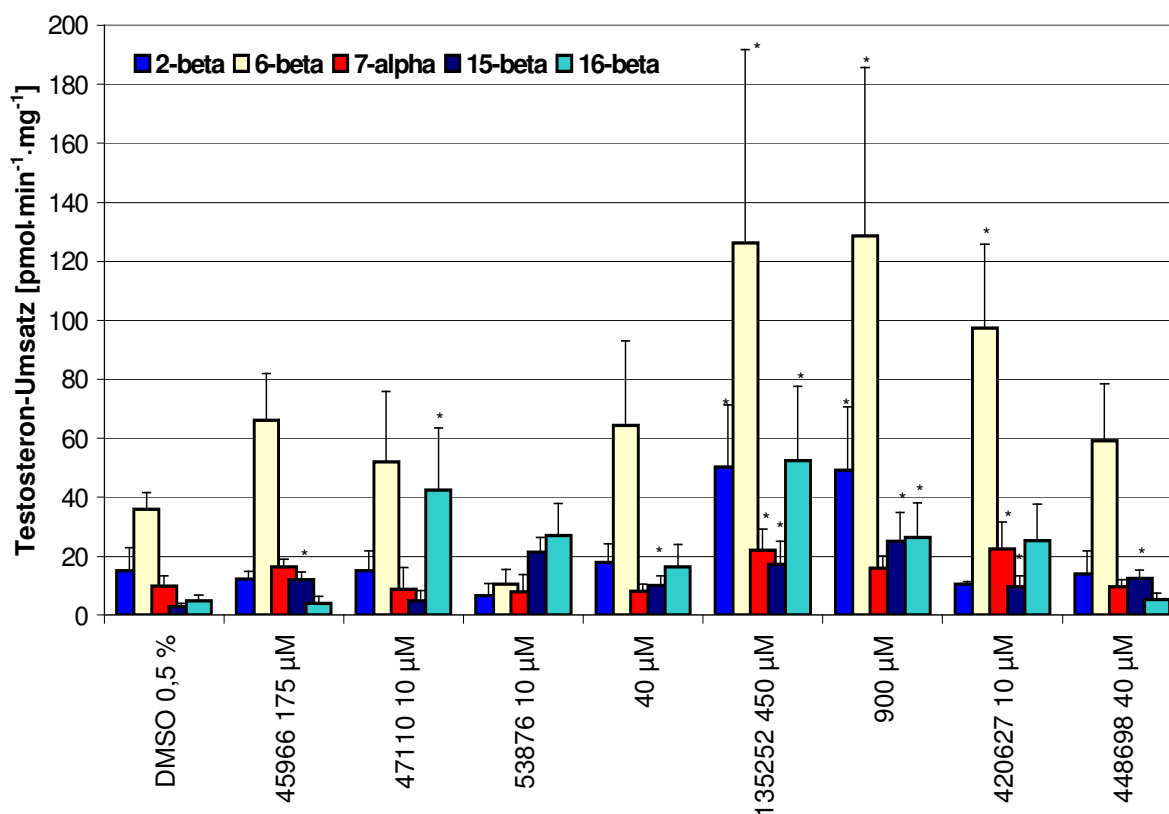


Abbildung 47: Beeinflussung des Testosteron-Metabolismus durch Knoll-Substanzen (n = 4-5)

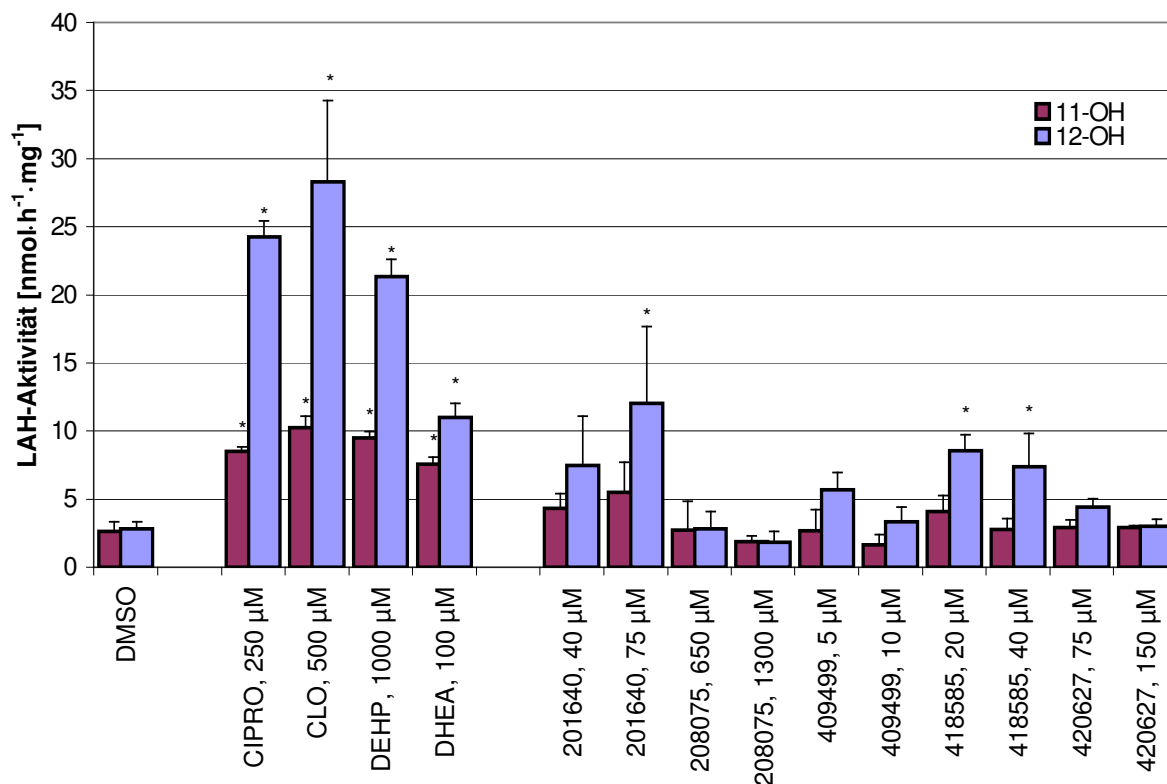
Die Behandlungen der Rattenhepatozyten mit den 16 Knoll-Substanzen erzeugten verschiedene Effekte auf den Testosteron-Metabolismus. Die Erhöhung der 15 $\beta$ - oder der 16 $\beta$ -Hydroxylase-Aktivitäten waren hierbei die am häufigsten beobachteten Induktionen. Im obigen Diagramm sind einige auffallende Beispiele aufgeführt.

Die Behandlung mit 450 oder 900  $\mu\text{M}$  135252 führte zu einer starken Induktion sowohl der CYP 2B-vermittelten 16 $\beta$ -Aktivität (10,5x bzw. 5,3x) als auch der CYP 3A zugeschriebenen 2 $\beta$ - (je 3,3x), 6 $\beta$ - (3,5x bzw. 3,6x) und 15 $\beta$ -Aktivitäten (5,9x bzw. 8,6x). Die Steigerung der Aktivitäten lag im oder sogar leicht über dem Bereich der durch die Modellinduktoren PB (CYP 2B; 10,9-fach) und DEX (CYP 3A; 2,0-, 2,6- und 6,3-fach) erzielten Induktionen.

Die Aktivitäten in den mit DMSO behandelten Rattenhepatozyten betragen nach 72 h 15; 36; 9,8; 2,9 und 5,0  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  für die fünf oben angegebenen Hydroxylasen (2 $\beta$ ; 6 $\beta$ ; 7 $\alpha$ ; 15 $\beta$  und 16 $\beta$ ).

Die gesamten Daten sind im Anhang wiedergegeben (Gesamte Daten im Anhang 8.7).

### 4.2.1.3 Bestimmung der LAH-Aktivität



**Abbildung 48: LAH-Aktivität (11 / 12-OH) in Rattenhepatozyten [nmol·h<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>] (n = 3)**

Die Grundaktivität der DMSO-Kontrolle betrug 2,6 bzw. 2,8 nmol·h<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> für die 11-OH- bzw. 12-OH-Aktivität. Die Modellinduktoren bewirkten vor allem eine Steigerung (acht- bis zehnfach) des Umsatzes zur 12-Hydroxy-Laurinsäure, während die 11-OH-Aktivität nur drei- bis vierfach erhöht wurde. Von den untersuchten Knoll-Substanzen bewirkten nur 201640 und 418585 eine signifikante Zunahme der 12-OH-Aktivität (4,3- bzw. 3,0-fach), die damit im Bereich der Induktion durch DHEA (3,9-fach) lag (Gesamte Daten im Anhang 8.8).

## 4.2.2 Induktion von Phase II-Enzymen

### 4.2.2.1 Bestimmung der GST-Aktivität

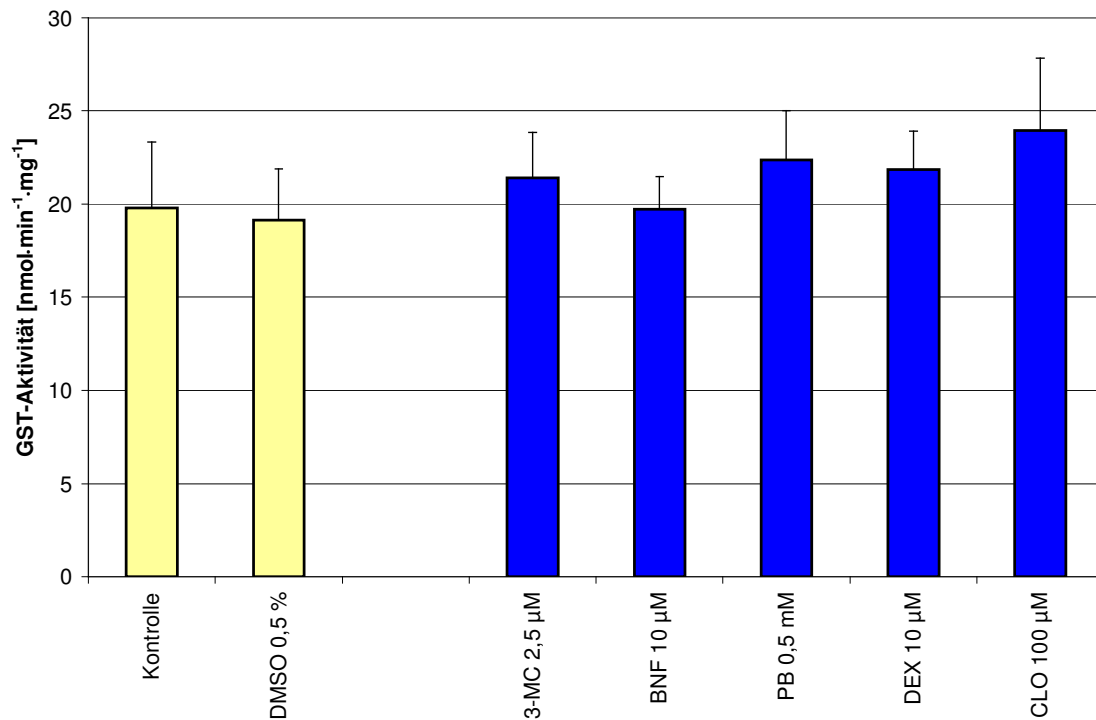


Abbildung 49: GST-Aktivitäten nach 48-stündiger Behandlung mit Modellinduktoren (n = 7)

Die GST-Aktivität in der DMSO-Kontrolle betrug  $19,2 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  und wurde durch die verwendeten Modellinduktoren (mit Ausnahme von BNF) leicht ( $< 1,25x$ ), aber nicht signifikant erhöht.

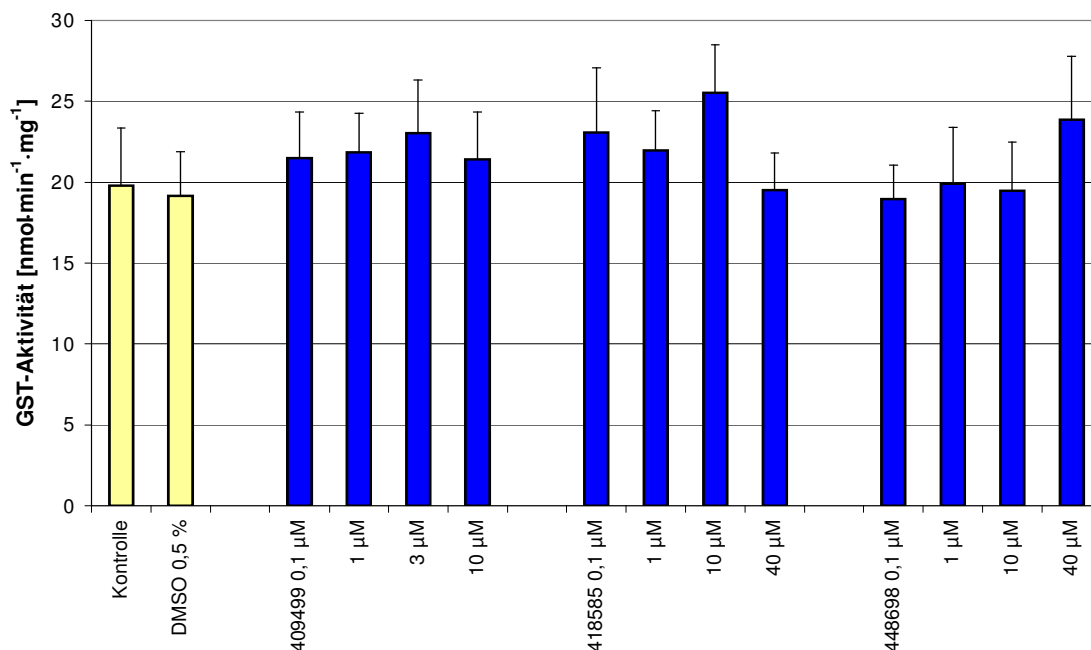


Abbildung 50: GST-Aktivitäten nach 48 h Behandlung mit 409499, 418585 oder 448698 (n = 4)

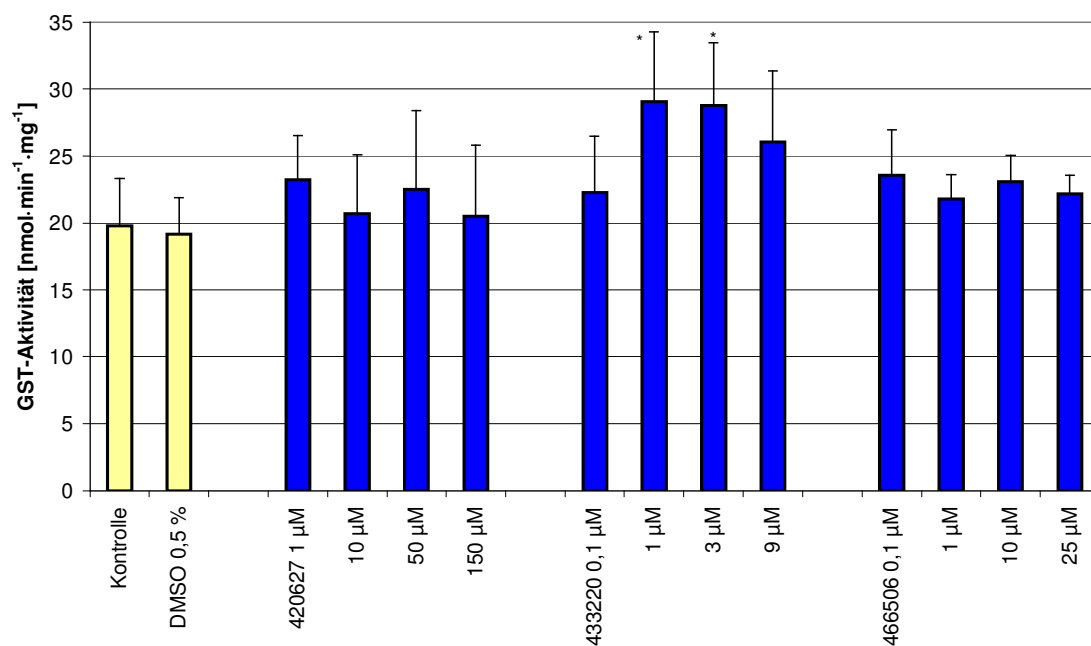


Abbildung 51: GST-Aktivitäten nach 48 h Behandlung mit 420627, 433220 oder 466506 (n = 4)

Im Gegensatz zu den Modellinduktoren bewirkte 433220 (1 und 3 μM) eine signifikante 1,5-fache Zunahme der GST-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (siehe 8.9). Die anderen in diesem Versuch eingesetzten Knoll-Substanzen zeigten wie die Modellinduktoren eine geringe insignifikante Erhöhung der CDNB-Konjugation durch GST.



## 4.2.2.2 Messung der UGT-Aktivität mit MUF als Substrat

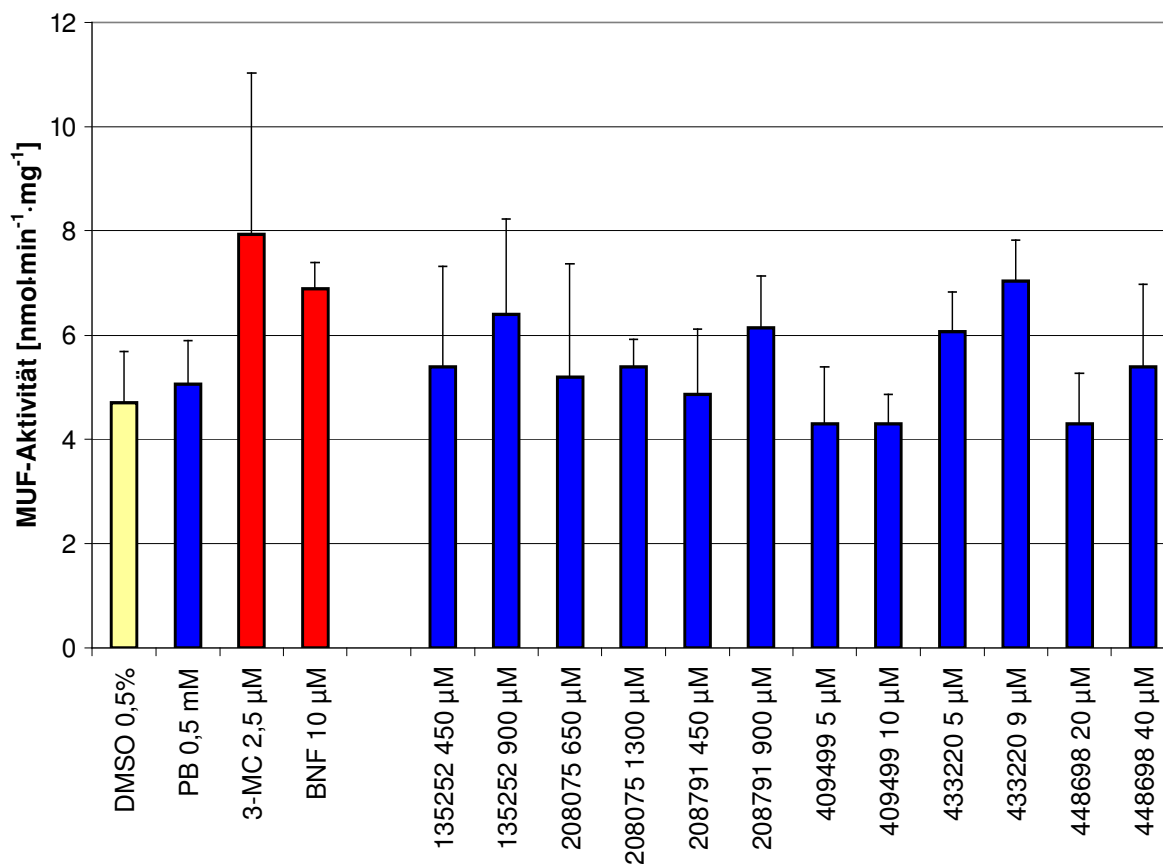


Abbildung 52: MUF-Aktivität [nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>] in Rattenhepatozyten (n = 3)

Bei der MUF-Konjugation durch hauptsächlich UGT 1A in Rattenhepatozyten wurde für die DMSO-Kontrolle eine Aktivität von 4,7 nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> gemessen. Sowohl die eingesetzten CYP 1A-Induktoren 3-MC und BNF als auch die Knoll-Substanzen 135252, 208791 und 433220 führten zu Zunahmen in der UGT-Aktivität, die aber aufgrund der hohen Streuungen zwischen den einzelnen Experimenten nicht signifikant waren (Gesamte Daten im Anhang 8.10).

#### 4.2.2.3 Messung der UGT-Aktivität mit HOBI als Substrat

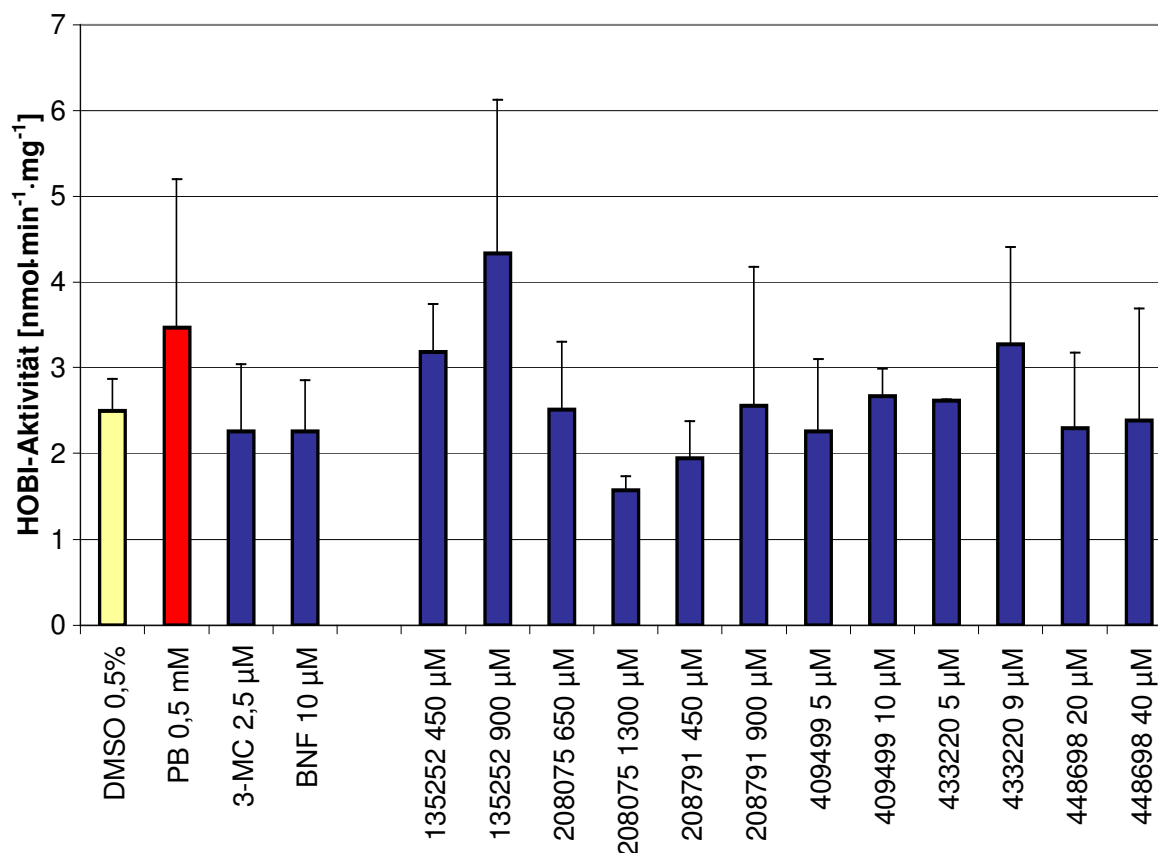


Abbildung 53: HOBI-Aktivität [nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>] in Rattenhepatozyten (n = 3)

Bei der HOBI-Konjugation durch UGT 2B (aber auch 1A) in Rattenhepatozyten wurde für die DMSO-Kontrolle eine Aktivität von 2,5 nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> gemessen. Ähnlich wie bei der MUF-Konjugation bewirkten weder der verwendete CYP 2B-Induktor PB noch die Knoll-Substanzen eine signifikante Steigerung der UGT-Aktivität, obwohl bei PB und 135252 eine leichte Erhöhung (1,4- bzw. 1,7-fach) messbar war (Gesamte Daten im Anhang 8.11).

## 4.2.2.4 Untersuchung der PNP-Konjugation

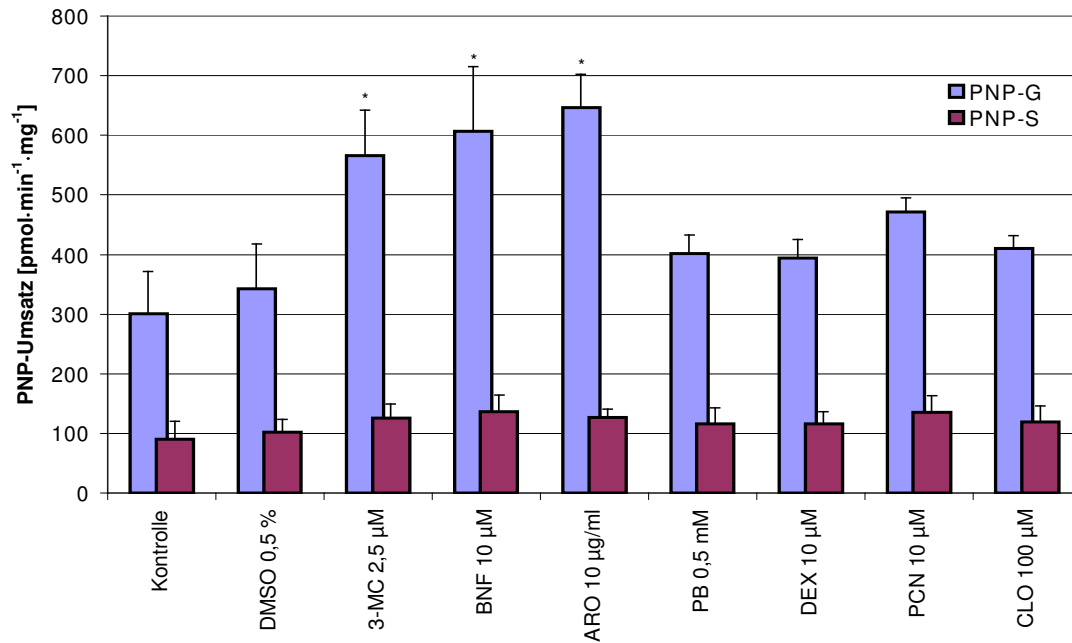


Abbildung 54: PNP-Konjugation in Rattenhepatozyten (n = 3-9)

Die Glucuronidierung von PNP ließ sich mit CYP 1A-Induktoren signifikant steigern, während die Sulfatierung durch die Modellsubstanzen wenig beeinflusst wurde.

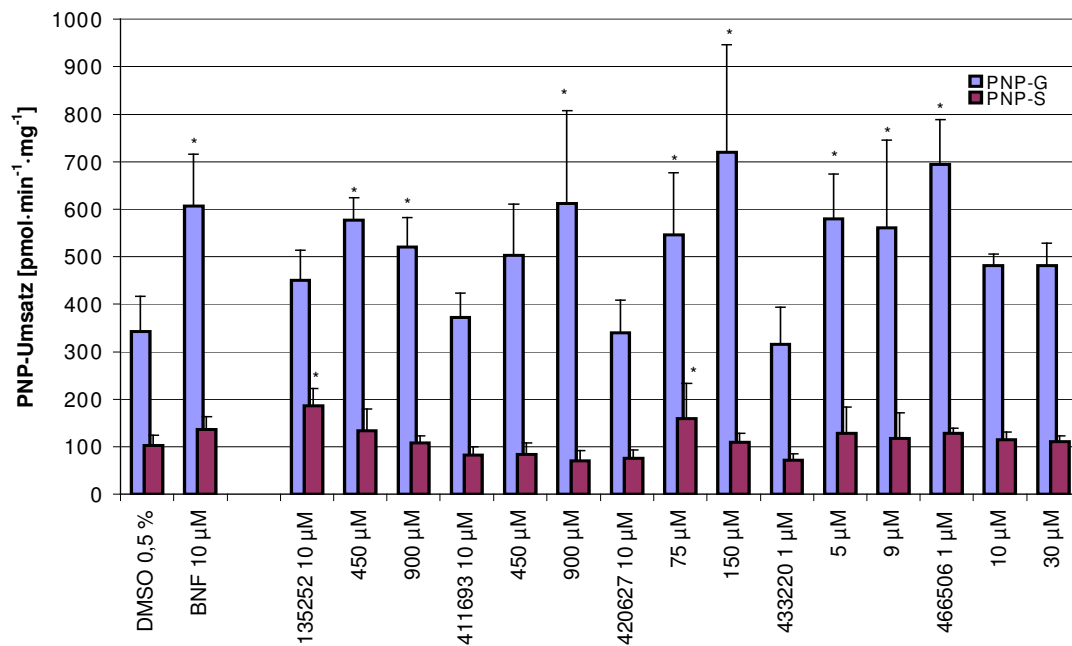


Abbildung 55: PNP-Konjugation nach Behandlung mit Knoll-Substanzen (n = 3-4)

Die Konjugation von PNP sowohl mit Sulfat (hauptsächlich durch SULT 1A1 und 1A2) als auch mit Glucuronsäure (durch UGT 1A, vor allem UGT 1A6) wurde nur von einigen der 16 Knoll-Substanzen signifikant beeinflusst. 411693, 420627, 433220 und 466506 bewirkten einen mit den CYP 1A-Modellinduktoren vergleichbaren Anstieg der Glucuronidierungs-Aktivität (ca. 1,5- bis zweifach). Zusätzlich erhöhten 135252 und 420627 auch die PNP-Konjugation mit Sulfat, was durch die Modellsubstanzen nicht erreicht wurde.

Die Grundaktivität in Rattenhepatozyten nach 72 h betrug 343 pmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> für die Glucuronidierung und 103 pmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> für die Sulfatierung.

Die gesamten Daten sind im Anhang wiedergegeben (Gesamte Daten im Anhang 8.12).

### 4.3 Induktion peroxisomaler Enzyme in primären Rattenhepatozyten

Vor der Untersuchung der peroxisomalen Enzymen wurden für die Modellinduktoren die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen mit Hilfe des WST-Assays bestimmt. Dabei zeigte sich, dass Clofibrat und DEHP im eingesetzten Konzentrationsbereich (3 mM bzw. 2 mM) keine toxische Wirkung hatten. Im Gegensatz dazu wurde für DHEA ein vergleichsweise niedriger IC<sub>50</sub> von 172 µM gemessen, während Ciprofibrat mit 891 µM auch eher als untoxisch zu bewerten war. Die in den Induktionsversuchen angewendeten Konzentrationen wurden zur besseren Vergleichbarkeit an Literaturangaben angepasst und lagen (bis auf DHEA) weit unter den IC<sub>50</sub>-Werten.

**Tabelle 12: IC<sub>50</sub>-Konzentrationen von Modellinduktoren (n = 3)**

<b>Induktor</b>	<b>IC<sub>50</sub> [µM]</b>	<b>SD</b>
CLO	> 3000	-
CIPRO	891	122
DEHP	> 2000	-
DHEA	172	23

### 4.3.1 Messung der ACOX-Aktivität

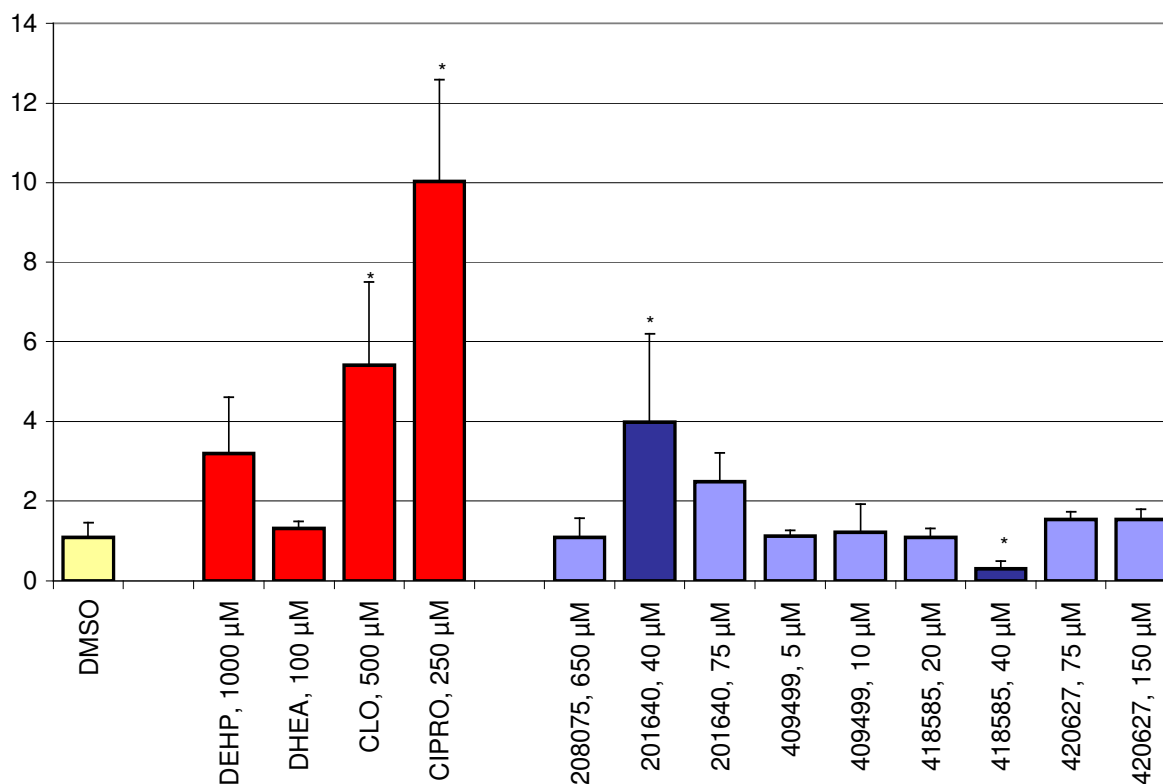


Abbildung 56: ACOX-Aktivitäten in Rattenhepatozyten [nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>] (n = 3)

Die als Peroxisomen Proliferatoren bekannten Modellsubstanzen DEHP, CLO und CIPRO erhöhten die ACOX-Aktivität nach 72-stündiger Behandlung um 2,8- (nicht signifikant); 5,0- bzw. das 9,2-fache gegenüber der uninduzierten DMSO-Kontrolle (1,2 nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit DHEA oder den Knoll-Substanzen 208075, 409499 und 420627 zu keiner Induktion. 201640 bewirkte bei beiden eingesetzten Konzentrationen einen Anstieg der Aktivität um das 3,6- bzw. das 2,3-fache. Die Inkubation mit 40 µM von 418585 bewirkte eine signifikante Verringerung der ACOX-Reaktion auf 30% der Kontrolle (Gesamte Daten im Anhang 8.13).

### 4.3.2 Messung der CAT-Aktivität

Bei der Bestimmung der CAT-Aktivität in Homogenaten von Rattenhepatozyten zeigte sich, dass alle vier eingesetzten Modellsubstanzen und auch 418585, 40  $\mu\text{M}$  und beide Konzentration von 201640 eine Steigerung der Aktivität bewirkten. Die relativen Erhöhungen gegenüber der Kontrolle betragen bei DEHP 2,4x, CLO 4,8x und CIPRO 7,0x. Dagegen fielen die Induktionen durch 201640 mit 1,8- bzw. 2,2-fach und 418585, 20  $\mu\text{M}$  mit 2,0-fach schwächer aus. Die Behandlung mit den Knoll-Substanzen 208075, 409499 und 420627 führte zu keiner signifikanten Veränderung der CAT-Aktivität gegenüber der DMSO-Kontrolle ( $1,6 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).

Die Modellinduktoren verhielten sich im ACOX- und im CAT-Assay im Bezug auf die relativen Erhöhungen gleich. CIPRO war in beiden Assays der stärkste Induktor, gefolgt von CLO, DEHP und DHEA als schwächstem Induktor (Gesamte Daten im Anhang 8.14).

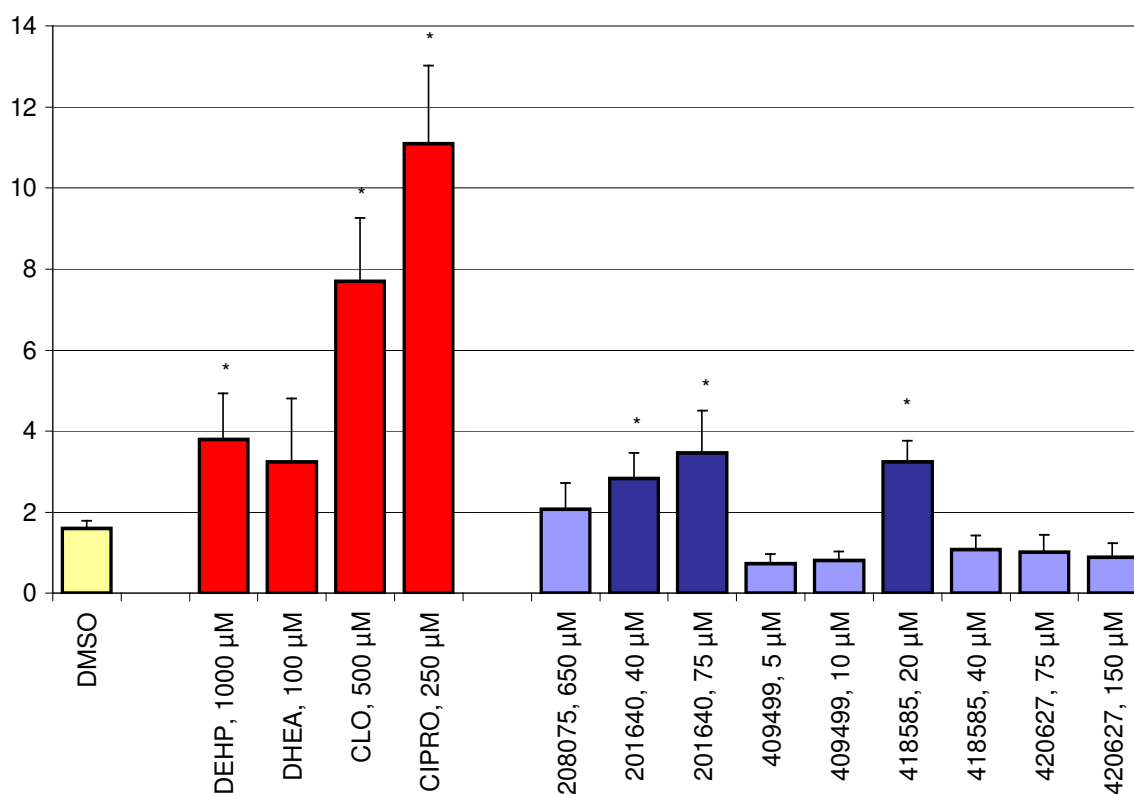


Abbildung 57: CAT-Aktivitäten in Rattenhepatozyten [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] (n = 4)

### 4.3.3 Messung der Katalase-Aktivität

Die uninduzierte Katalase-Aktivität in Rattenhepatozyten betrug  $398 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Die Modellsubstanzen bewirkten bis auf CIPRO keine Erhöhung der Grundaktivität. CIPRO steigerte die Aktivität um das 2,3-fache auf  $912 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Die Knoll-Substanzen 208075, 409499 und 420627 zeigten keine Veränderung der Katalase-Aktivität. Im Gegensatz dazu bewirkten 201640,  $75 \mu\text{M}$  und 418585,  $40 \mu\text{M}$  signifikanten Anstiege auf  $625 (1,6\text{x})$  bzw.  $700 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} (1,8\text{x})$  gegenüber der Aktivität in der DMSO-Kontrolle.

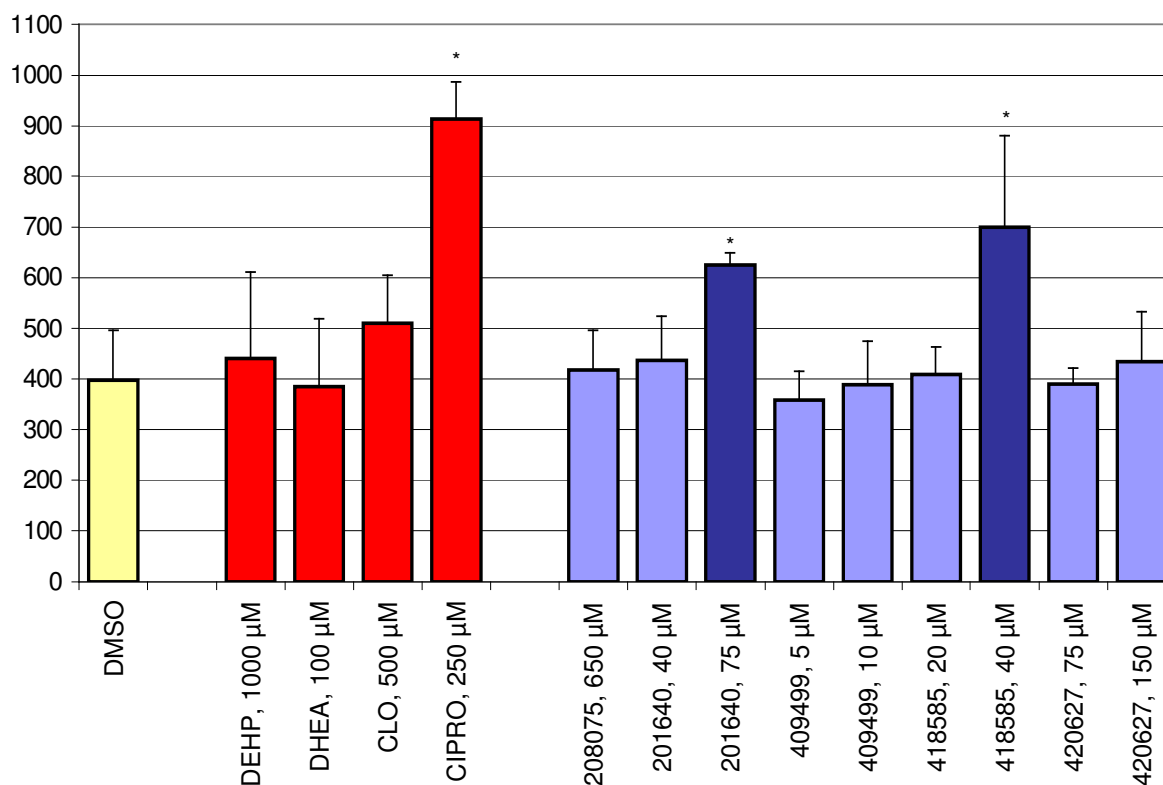


Abbildung 58: Katalase-Aktivitäten in Rattenhepatozyten [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] ( $n = 2$ )

## 5 Diskussion

Bevor die Ergebnisse aus der Zellkultur diskutiert werden, sollen mögliche Gründe für Unterschiede der *in vivo*- und *in vitro*-Daten zu den Enzymaktivitäten angegeben werden:

- Dosierung (*in vivo* kann theoretisch höher dosiert werden, weil eventuell auftretende cytotoxische Effekte durch Zellproliferation kompensiert werden können. Im Gegensatz dazu sind Hepatozyten in der „einfachen“ Primärkultur nicht mehr teilungsfähig)
- Behandlungsdauer (*in vivo* vier Wochen; *in vitro* zwei bis drei Tage)
- hormonelle Einflüsse (z.B. die Menge an CYP 2C11, das Hauptenzym (über 50% des gesamten CYP) in der Leber männlicher Ratten, wird durch Testosteron geregelt [66]; *in vitro* durch chemisch definierte Medien ausschließbar)
- extrahepatische Stoffwechselwege (z.B. DEHP wird *in vivo* durch Lipasen im Dünndarm zum aktiveren Monoester hydrolysiert [67])
- Dedifferenzierung der Hepatozyten *in vitro* und die damit verbundene qualitative und quantitative Veränderung der Enzymausstattung der Zellen

Vor allem der letzte Punkt dürfte für Unterschiede zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Daten verantwortlich sein.

### 5.1 Bestimmung der Cytotoxizität in Rattenhepatozyten

In den Vorversuchen wurden als Testsubstanzen die beiden Lösungsvermittler SDS (anionisches Detergenz) und TritonX-100 (nicht-ionisch), sowie das Saponin Digitonin verwendet. Die Auswahl fiel auf diese Substanzen, weil ein „einfacher“ toxischer Effekt in den Experimenten gemessen werden sollte. Alle drei Verbindungen verursachen eine Schädigung der Zellmembran. SDS und TritonX-100 solubilisieren Lipide und Proteine der Zellmembran, während Digitonin durch die Bildung von schwerlöslichen Addukten mit Cholesterin in der Zellmembran die Zellschädigung verursacht.

---



Die Cytotoxizitäts-Assays CV und NR, die in der Literatur als sensitive Tests bei der Verwendung von Zell-Linien beschrieben werden, wurden aber aufgrund der hohen Schwankungen der gemessenen Absorptionswerte und dem schlechteren Lebend/Tot-Signalverhältnis im Vergleich zu WST und LDH für die Hauptversuche nicht verwendet. Gillies et al. berichteten von einer 25-prozentigen Variabilität zwischen den Kontrollen verschiedener 24well-Platten innerhalb eines Experimentes bei Einsatz des CV-Assays [39]. Für den NR-Assay wurden Unterschiede zwischen den Kontrollen zweier Experimente von fast 94% gemessen (0,975 OD zu 1,887 OD) [41].

Eine Möglichkeit das Lebend/Tot-Signalverhältnis zu verbessern wäre der Einsatz größerer Zellzahlen (anstelle von  $5 \times 10^4$  in 96well z.B.  $1 \times 10^6$  in 6well), da die absorbierte Menge beider Farbstoffe mit der Zahl der lebenden Zellen korreliert. Der Nachteil hierbei ist natürlich der hieraus resultierende höhere Material- und Zeitaufwand. Um die Schwankungen innerhalb verschiedener Experimente zu minimieren, könnte man die Ergebnisse relativ zu jeweils mitgeführten Kontrollen angeben.

Die errechneten  $IC_{50}$ -Konzentrationen für die drei Testsubstanzen waren mit WST und LDH sehr ähnlich. Für Digitonin wurden 16 mg/l mit WST und 21 mg/l mit LDH ermittelt, für Triton X-100 0,005% (v/v) bzw. 0,003% (v/v) und für SDS wurden 111 mg/l und 126 mg/l als  $IC_{50}$ -Konzentrationen bestimmt. Der für SDS berechnete Wert liegt im Bereich des von Borenfreund und Puerner in 3T3 Mausfibroblasten ermittelte Wert von 80-90 mg/l [43].

Bei der Bestimmung der  $IC_{50}$ -Konzentrationen der Knoll-Substanzen zeigte sich ein etwas anderes Bild, denn bei allen Substanzen (bis auf 418585 mit  $41 \mu\text{M}$  zu  $38 \mu\text{M}$  und 433220 mit  $9 \mu\text{M}$  zu  $8 \mu\text{M}$ ) waren die mit WST bestimmten Werte niedriger (durchschnittlich 33%) als die LDH-Werte. Diese Tatsache lässt sich durch die unterschiedlichen Prinzipien der beiden Messmethoden erklären.

Bei der Messung des intrazellulären LDH-Gehaltes wird eine Schädigung erst dann messbar, wenn die Zellmembranintegrität gestört ist, d.h. dass die Zellmembran „löchrig“ geworden ist. Im Gegensatz dazu wird beim WST-Assay die Aktivität einer auf der extracellulären Seite der Zellmembran sitzenden NADH-Oxidase des Plasma Membran Oxidoreductase-Systems (PMOR) gemessen. Dieses System spielt möglicherweise eine Rolle bei der Regulierung des Redox Potential der Zelle

---

durch Übertragung von Elektronen von cytosolischen NADH auf extracelluläre Elektronenakzeptoren [45].

Aus oben genannten Beobachtungen ergeben sich drei Gründe für die größere Sensitivität von WST gegenüber Zellschäden im Vergleich zur LDH-Methode.

1. Der Ausstrom von cytosolischer LDH (100-150 kDa) setzt eine starke Schädigung der Zellmembran voraus. Eventuell vorher vorhandene Toxizität z.B. die Inhibition von Enzymen wird nicht erfasst.
2. Da die WST reduzierende NADH-Oxidase auf der äußeren Seite der Zelle lokalisiert ist, könnten Substanzen direkt auf dieses Enzym toxische Effekte ausüben ohne in die Zellen gelangen zu müssen. Dies würde zu einer Überschätzung des toxischen Potentials führen, falls die NADH-Oxidase nicht essentiell für das Überleben der Zelle wäre.
3. Da die Reduktion von WST durch die NADH-Oxidase von NADH (oder auch NADPH) abhängt [46], würde ein durch toxische Substanzen verursachter Mangel an diesen beiden Cofaktoren in der Zelle, auch die Reduktion von WST beeinflussen und detektierbar sein.

Bei Substanzen, die wie die Testsubstanzen (SDS, TX, Digitonin) direkt die Zellmembran schädigen, wird der Unterschied zwischen beiden Methoden (wie auch beobachtet) gering sein, da hier keine anderen toxische Effekte (z.B. Enzym-inhibition) zum Tragen kommen.

Aufgrund der oben genannten Gründe und dem geringeren methodischen Aufwand scheint der WST-Assay ein etwas besseres System zur Detektion von Cytotoxizität im Bezug auf die Sensitivität und den Arbeitsaufwand als die LDH-Bestimmung zu sein.

---

## 5.2 Beurteilung der *in vivo*-Ergebnisse

Mit Hilfe der Ergebnisse aus den *in vivo*-Untersuchungen (siehe Tabelle 3) lassen sich die Knoll-Substanzen aufgrund ihrer Induktionsprofile in drei z.T. überlappende Gruppen einteilen:

Die erste Gruppe zeigte eine mittlere bis sehr starke Erhöhung der BROD-, PROD-, HOBI- und GST-Aktivitäten (geringer EROD und MUF). Aufgrund der Ähnlichkeit zu dem Induktionsmuster durch PB (starke Induktion von PROD, BROD, HOBI, schwache Induktion von EROD und MUF) werden diese Substanzen im Folgenden als Induktoren des PB-Typs (CYP 2B) bezeichnet. Zu dieser Gruppe gehören: 45966, 47110, 53876, 111995, 135252, 409499, 418585 und 448698.

In die zweite Gruppe werden die Substanzen eingeordnet, die keine oder nur geringe Induktionen (außer bei CYP 4A) bewirkten. Diese „Nicht-Induktoren“ sind: 201640, 208075, 208791, 223651, 411693, 420627, 433220 und 466506.

Die dritte Gruppe, die sich mit den anderen beiden überlappt, enthält die Substanzen, die aufgrund ihrer Erhöhung der LAH-Aktivitäten als potentielle Peroxisomen Proliferatoren (CLO-Typ) bezeichnet werden. Hierzu zählen die PB-Typ Induktoren 409499, 418585, 448698 und die „Nicht-Induktoren“ 201640 und 420627.

Herausragend aus den gesamten Gruppen ist die Knoll-Substanz LU 135252, die in den CYP 2B-spezifischen Assays (PROD, BROD, HOBI) eine deutlich stärkere Aktivitätssteigerung als die Referenzsubstanz PB zeigte. Unter Berücksichtigung der Unterschiede in der Dosierung und der Behandlungsdauer (14 Tage PB – 28 Tage LU 135252) scheint LU 135252 *in vivo* ein sehr potenter CYP 2B-Induktor zu sein. Auch die Substanzen 409499, 418585 und 448698 (gleiches Strukturelement: 6-(4-Chlor-phenyl)-3-aza-bicyclo[3.2.0]heptan; siehe Tabelle 4) sind auffällig aufgrund ihrer Fähigkeit, sowohl die Aktivitäten in den CYP 2B- als auch in dem CYP 4A-spezifischen Assay zu erhöhen.

---

### 5.3 Vergleich der *in vivo* und *in vitro*-Daten

Aufgrund der oben (5. Diskussion) beschriebenen Unterschiede in der Behandlung (z.B. Dosierung, Behandlungsdauer) werden die *in vivo*- und *in vitro*-Daten rein qualitativ miteinander verglichen. Da sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nicht alle Substanzen in allen Assays untersucht wurden, beschränkt sich der Vergleich auf EROD, BROD, PROD und für einige Substanzen zusätzlich auf LAH.

Aufgrund der Fülle der Daten werden nur einige Ergebnisse diskutiert, deren Besonderheit versucht wird zu interpretieren.

Anstelle der *in vivo* gemessenen CYP 2B-spezifischen PROD-Aktivität, wird *in vitro* die 16 $\beta$ -Hydroxylierung von Testosteron als Marker für die 2B-Induktion benutzt. Der Grund hierfür liegt in dem starken Abfall der PROD-Aktivität *in vitro* in folge des Abbaus oder der Inaktivierung von CYP 2B, der auch nicht durch die Behandlung mit CYP 2B-Induktoren wie PB zu kompensieren ist [2]. Die aufgrund der *in vivo*-Ergebnisse vorgenommene Einteilung der Knoll-Substanzen in CYP 2B-Induktoren und „Nicht-Induktoren“ lässt sich mit geringen Abweichungen auch auf die *in vitro*-Daten übertragen. 201640, 208791, 223651, 411693 und 466506 zeigten im verwendeten Konzentrationsbereich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* keine induzierte Wirkung. 433220 zeigte *in vitro* eine leichte Erhöhung der GST- und der MUF-Aktivität (je 1,5-fach), die auch *in vivo* mit 2,2- und 4,1-fach beobachtet wurde. 420627 in der Konzentration von 10  $\mu$ M erhöhte die 16 $\beta$ -Hydroxylierung von Testosteron um das 5,1-fache, was im Vergleich zur 10,9-fachen Erhöhung durch PB einer mittelstarken Induktion entspricht, aber die BROD-Aktivität zeigte nur eine geringe, nicht signifikante 1,6-fache Erhöhung. Hieraus kann im Einklang mit den *in vivo*-Daten (keine PROD-Induktion) geschlossen werden, dass 420627 kein CYP 2B-Induktor ist. Das gleiche gilt für 208075, das eine 5,3-fache Erhöhung der BROD-Aktivität bewirkte, aber im Testosteron-Assay die 16 $\beta$ -Hydroxylierung nicht veränderte. Somit ist die Gruppe der „Nicht-Induktoren“ *in vivo* und *in vitro* identisch. Bei der Gruppe der potentiellen Peroxisomen Proliferatoren waren die relativen Aktivitätserhöhungen der *in vivo*-Studien: 418585 > CLO > 201640 > 409499 > 420627 > 208075 = Kontrolle (siehe Tabelle 3). Im Gegensatz dazu waren die relativen Erhöhungen in den *in vitro*-Versuchen: CLO > 201640 > 418585 > 409499 > 420627 > 208075=DMSO-Kontrolle (siehe Tabelle 27).

Diese Reihenfolgen der Induktionshöhen berücksichtigen aber nicht die verschiedenen eingesetzten Konzentrationen der Substanzen. Bei den *in vivo*-Versuchen lagen die Dosierungen zwischen 200 bis 400 mg/Tag/kg Körpergewicht, wobei die Behandlungsdauer mit CLO nur 14 Tage anstatt vier Wochen betrug. Bei längerer Behandlung könnte die Induktion durch CLO durchaus größer sein, was die oben genannte Reihenfolge verschieben könnte.

*In vitro* sind die Konzentrationsunterschiede größer. 208075, das *in vivo* keine Erhöhung der LAH-Aktivität zeigte und deshalb als Negativkontrolle verwendet wurde, wurde mit den höchsten Konzentrationen (650  $\mu\text{M}$ ; 1300  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt und zeigte keine LAH-Induktion. Dies bestätigt die Annahme, dass 208075 kein Peroxisomen Proliferator ist. CLO wurde in Anlehnung an die Literatur [68] 500  $\mu\text{M}$  verwendet. Diese Konzentration ist damit ca. drei- (420627, 150  $\mu\text{M}$ ) bis hundertmal (409499, 5  $\mu\text{M}$ ) höher als die der getesteten Knoll-Substanzen. Aus diesem Grund kann die Aussage getroffen werden, dass 201640 (75  $\mu\text{M}$ ; 4,3-fache LAH-Induktion) und 418585 (20  $\mu\text{M}$ ; 3,0-fache) bei Verwendung von equimolaren Mengen eventuell, wie in den *in vivo*-Versuchen gezeigt, potentere LAH-Induktoren und damit auch Peroxisomen Proliferatoren als CLO (500  $\mu\text{M}$ , 10,1-fache) sind. Die *in vivo* schwächer wirkenden Substanzen 409499 (3,7x Erhöhung der 12-OHLA) und 420627 (2,8x) zeigten *in vitro* noch etwas schwächer ausgeprägte relative Erhöhungen (2,0x und 1,6x). Damit sind die beiden Substanzen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die schwächsten Induktoren (ohne Berücksichtigung der unterschiedlichen Konzentrationen).

**Tabelle 13: Einfluss der Knoll-Substanzen CYP 2B-spezifische Reaktionen**

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>BROD</b>	<b>16<math>\beta</math>-OHT</b>
3-MC	2,5	12,2	0,4
PB	500	4,7	10,9
45966	10	4,0	1,4
47110	10	<b>15,0</b>	<b>8,5</b>
	175	3,6	0,7
53876	10	<b>9,6</b>	<b>5,7</b>
111995	1	4,6	2,5
135252	450	<b>17,2</b>	<b>10,5</b>
	900	5,8	5,3
409499	1	4,6	0,8
	5	3,5	1,6
418585	10	11,2	1,8
	20	3,6	0,8
448698	10	8,1	3,5

**Induktionsfaktoren relativ zur DMSO-Kontrollaktivität**

Die als PB-Typ Induktoren bezeichnete Gruppe zeigte auch *in vitro* die Erhöhung der BROD-Aktivität und der 16 $\beta$ -Hydroxylierung von Testosteron. Vergleicht man die Höhe der relativen Induktionsfaktoren im BROD-Assay mit PB (4,7x) und nicht mit 3-MC (12,2x), dann kann man alle acht Knoll-Substanzen (45966, 47110, 53876, 111995, 135252, 409499, 418585 und 448698) als starke bis sehr starke PB-Typ Induktoren (4,0 bis 17,2-fache Erhöhung) bezeichnen. Bei der Betrachtung der 16 $\beta$ -Hydroxylierung zeichnet sich ein etwas anderes Bild. Die relativen Erhöhungen reichten von 1,4- bis 10,5-fach (vgl. Tabelle 13) und sind im Vergleich mit PB (10,9-fach) als schwach bis stark anzusehen. Die stärksten Induktoren in beiden Assays waren 135252 und 47110. Damit ist die *in vivo* herausragende Rolle als CYP 2B-Induktor von 135252 auch *in vitro* bestätigt. Dies wird auch durch die Ergebnisse des EROD-Assays (CYP 1A1-spezifisch [50]) bestätigt. *In vivo* zeigten die Knoll-Substanzen, bis auf 135252 mit einer als schwach einzustufenden relativen Erhöhung von 7,1-fach (im Vergleich zu 46-fach durch BNF), kein Induktionsvermögen. Im Einklang hiermit zeigte 135252 auch *in vitro* den höchsten Induktionsfaktor mit 4,6-fach und ist damit im Vergleich zu BNF (15x) oder 3-MC (23x) als schwacher Induktor zu bewerten. In die gleiche Kategorie sind die strukturell miteinander verwandten Dopamin D<sub>4</sub>-Rezeptor-Antagonisten 409499 (4,1x) und 418585 (3,3x) einzuordnen, die *in vivo* als sehr schwach induzierend (2,7x und 1,8x) einzustufen sind. Parallel zu der schwachen EROD-Induktion ist auch die Erhöhung der CYP 1A2-spezifischen [51] MROD-Aktivität (zu der keine *in vivo*-Daten vorliegen) durch 409499 um das 3,8-fache, durch 418585 3,3-fache und durch 448698 3,4-fache im Vergleich zum Modellinduktor BNF (8,4x) als gering bis mittel einzuschätzen.

Abschließend kann die Aussage getroffen werden, dass die Ergebnisse der *in vivo*- und der *in vitro*-Experimente unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Konzentrationen (siehe oben LAH-Induktion) qualitativ identisch sind.

---

## 5.4 Rezeptorvermittelte Induktion von Cytochrom P450-Isoenzymen und peroxisomalen Enzymen

Die Induktion der fremdstoffmetabolisierenden CYP-Familien 1A, 2B, 3A und 4A ist, wie in der Einleitung kurz beschrieben, ein durch verschiedene Rezeptoren vermittelter Prozess. Im folgenden Abschnitt sollen einige strukturelle Voraussetzungen für Induktoren der verschiedenen Familien diskutiert werden, ohne dabei auf die einzelnen Mechanismen, die im Detail noch nicht aufgeklärt sind, näher einzugehen. Grundsätzlich ergibt sich die Voraussetzung für einen potentiellen Induktor, dass er strukturell so beschaffen sein muss, dass er mit dem Rezeptor interagieren kann, um diesen zu aktivieren (direkte Regulierung oder ligandenabhängiger Mechanismus [69]).

Für die CYP 1A (auch 1B)-Induktion ist dieser Rezeptor der sogenannte Ah-Rezeptor (aryl hydrocarbon). Der im Cytosol vorliegende inaktive, proteingebundene Ah-Rezeptor, wird durch Bindung des Liganden (=Induktor) aktiviert und der Ligand-Ah-Rezeptor-Komplex transloziert in den Zellkern. Dort dimerisiert der Komplex mit dem Protein ARNT (Ah-receptor nuclear translocator) und dieses Dimer bindet nun spezifisch an responsive Elemente XREs (xenobiotic responsive elements). Dieser Enhancer-Komplex steigert im Endeffekt dann die Transkription der jeweiligen Gene (AhR gene battery z.B. CYP 1A1) [70].

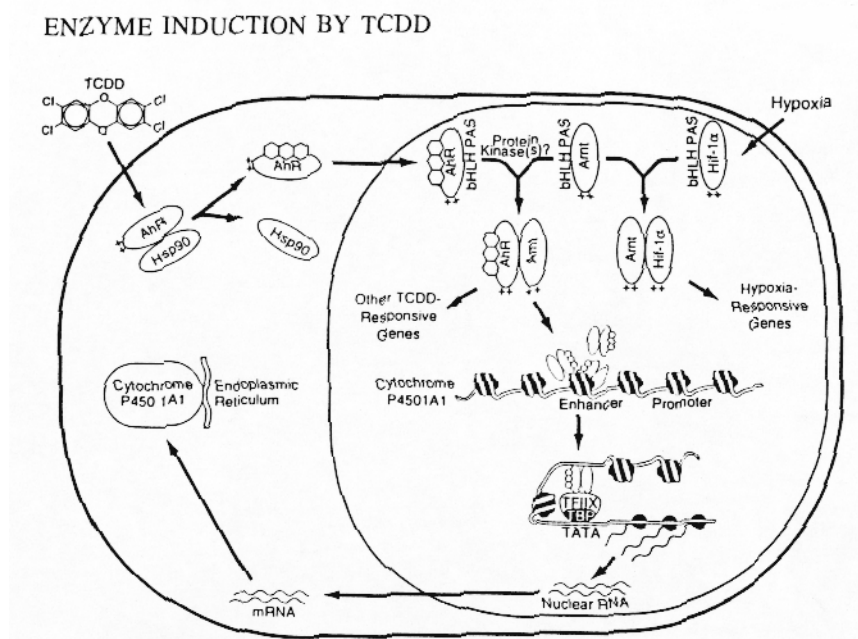
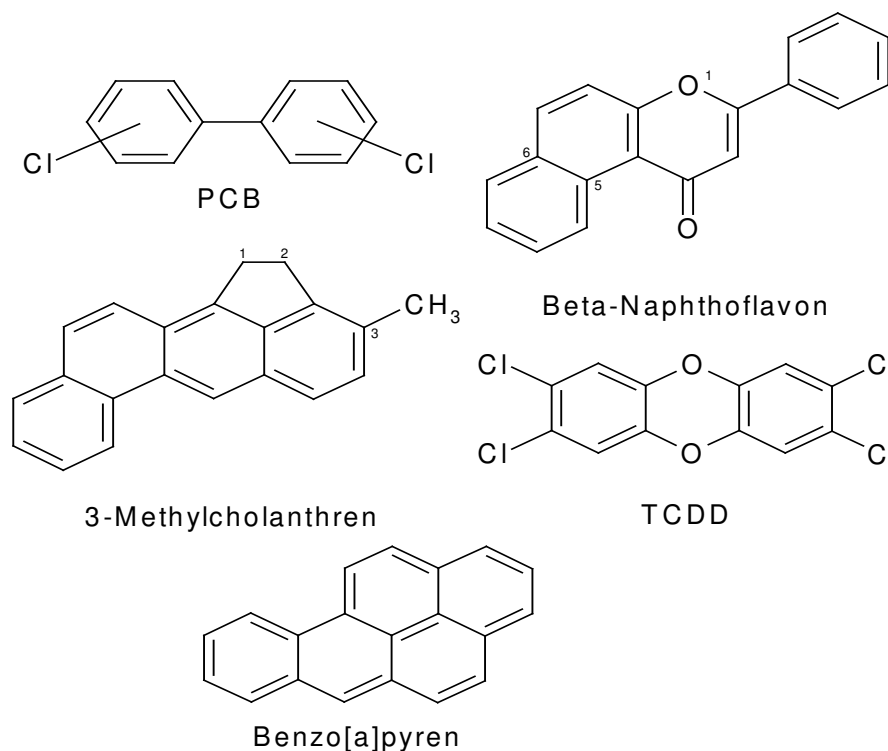


Abbildung 59: Induktion von CYP 1A1

Die Voraussetzungen für eine gute Interaktion mit dem Ah-Rezeptor lassen sich aus der Untersuchung gemeinsamer Strukturelemente von bekannten, besonders guten CYP 1A-Induktoren wie 2,3,7,8-TCDD, 3-MC, non-ortho substituierten PCBs ableiten.



**Abbildung 60: Strukturformeln von CYP 1A-Induktoren**

Aufgrund dieser Quantitative Structure-Activity Relationship-Studien (QSAR) über CYP 1A-Induktoren ergaben sich folgende strukturelle Anforderungen an potentielle Induktoren:

Die Liganden sollten möglichst planar, polyzyklisch und hydrophob sein [71].

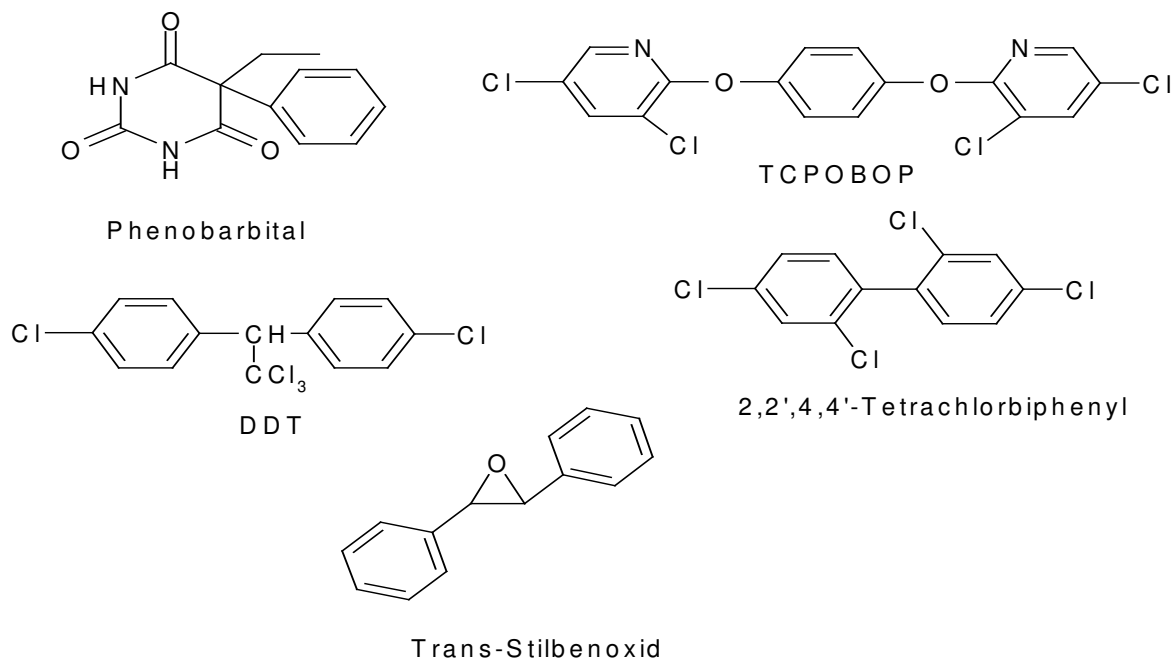
Bei Betrachtung verschiedener PCBs zeigte sich, dass ortho-Substitution mit voluminösen Chloratomen die Coplanarität der beiden Phenylringe einschränkt und sich negativ auf die CYP 1A-Induktion auswirkt, während eine rechteckige Form von 14 Å auf 7 Å (wie TCDD) sich positiv auswirkt.

Durch Überlagerung der räumlichen Struktur von acht Induktoren (z.B. TCDD, 3-MC, BNF, Benzo[a]pyren) konnten diese geometrischen Anforderungen weiter präzisiert werden. Ein idealer AhR-Ligand ist planar, hydrophob, enthält aromatische Systeme für  $\pi$ - $\pi$  Elektronen-Interaktionen mit dem AhR und entspricht diesen Abmessungen (16 Å x 10,6 Å x 4;2 Å) [72].



Vergleicht man diese Anforderungen mit den Strukturformeln der Knoll-Substanzen (siehe Tabelle 4) erkennt man, dass alle ein aromatisches System (außer 223651) enthalten, aber die meisten Substanzen weder polyzyklisch, noch hydrophob (meistens mehrere polare oder ionisierbare Gruppen) und auch nicht planar sind. Daraus ergibt sich, dass die Knoll-Substanzen keine guten Ah-Rezeptor Liganden und damit auch keine CYP 1A-Induktoren sind, was durch die Ergebnisse aus den *in vivo* und *in vitro*-Versuchen auch bestätigt wird.

Die Induktion von Cytochrom P450 2B-Isoenzymen wird durch den CAR-Rezeptor (constitutive active oder androstane receptor) vermittelt. Dieser Rezeptor ist wie der Name schon sagt konstitutiv aktiv, wird aber durch Interaktion mit zwei Steroiden Androstanol ( $5\alpha$ -Androstan- $3\alpha$ -ol) und Androstenol ( $5\alpha$ -Androst-16-en- $3\alpha$ -ol) inaktiviert. Durch PB-Typ Induktoren wird die Bindung dieser Androstane an den CAR-Rezeptor unterbunden und der Rezeptor wird dadurch wieder aktiv [16]. Dabei ist noch nicht geklärt, ob die Induktoren direkt an CAR binden oder durch einen indirekten Mechanismus (z.B. Phosphorylierung des Rezeptors, Aktivierung von Coaktivatoren) die Induktion von CYP 2B bewirken [69].



**Abbildung 61: Strukturformeln von CYP 2B-Induktoren**

Die Strukturen von PB-Typ Induktoren sind wesentlich uneinheitlicher als die der CYP 1A-Induktoren. Aus diesem Grund sind die strukturellen Voraussetzungen nicht gut charakterisiert.

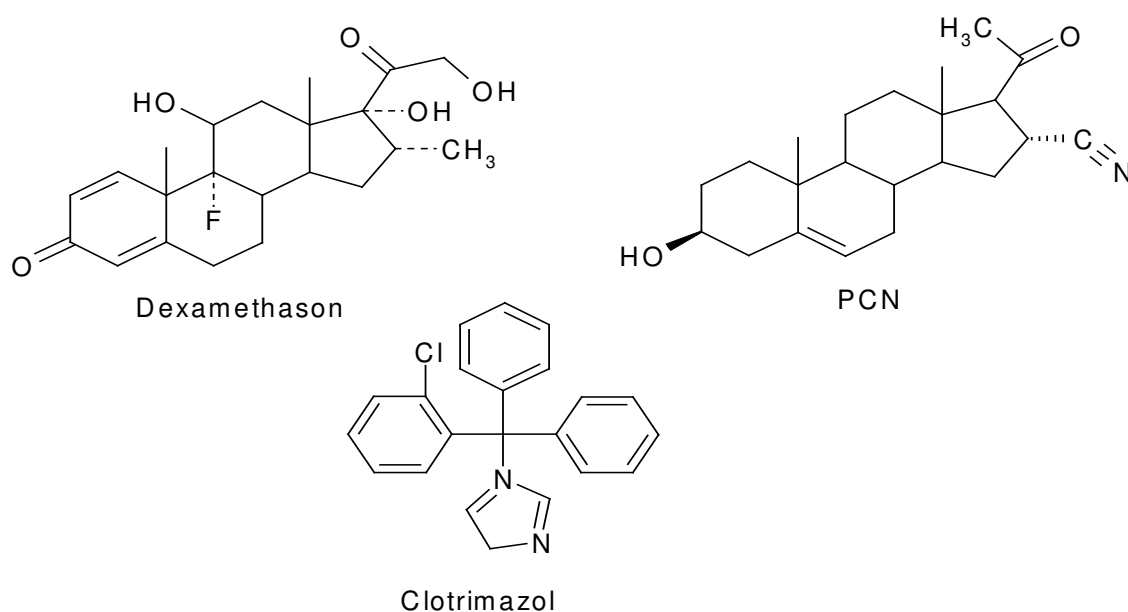
Ein Kriterium für CYP 2B-Induktoren ist die, im Gegensatz zu CYP 1A-Induktoren, nicht planare, sterisch anspruchsvolle räumliche Form, aber keine Steroide [69]. Ein weiteres Merkmal ist das Vorhandensein von polaren Gruppen (z.B. Keto) oder Heteroatomen (z.B. Cl).

Wendet man diese, nicht sehr spezifischen, Strukturkriterien auf die Knoll-Substanzen an, dann wird deutlich, dass hier Voraussagen sehr schwer zu machen sind. Die Substanzen, die *in vitro* die höchsten BROD- und 16 $\beta$ -OHT-Aktivitäten zeigten sind 135252, 47110 und 53876. Vergleicht man ihre Struktur kann man keine gemeinsamen Strukturelemente erkennen. Bei 135252 ist die 3,3-Diphenylgruppierung (Ähnlichkeit zu DDT) mit dem benachbarten Pyrimidinring auffällig. Diese Gruppierung ist räumlich anspruchsvoll und würde damit ein Kriterium erfüllen. Besonders auffallend sind die unterschiedlichen Induktionsmuster von 135252 und 208075, das sich nur durch zwei Methylgruppen anstelle von Methoxygruppen von ersterem unterscheidet. 135252 ist ein schwacher CYP 1A (EROD), ein sehr starker CYP 2B (BROD, 16 $\beta$ -OHT) und ein starker CYP 3A-Induktor (15 $\beta$ -OHT, 6 $\beta$ -OHT und 2 $\beta$ -OHT). Im Gegensatz dazu zeigte 208075 im betrachteten Konzentrationsbereich, außer bei BROD (1300  $\mu$ M, 5,3-fache Erhöhung) keinen induzierenden Einfluss. Vielleicht aber weist die BROD-Induktion bei Verwendung der höchsten Konzentrationsstufe (IC<sub>50</sub> aus WST) daraufhin, dass 208075 bei hohen Konzentration auch ein PB-Typ Induktor wie 135252 ist. Dies könnte durch die Messung der Erhöhung der 16 $\beta$ -Hydroxylierung im Testosteron-Assay überprüft werden, da in den bisher durchgeführten Testosteron-Versuchen maximal 650  $\mu$ M eingesetzt wurden. Die Gruppe der Dopamin D<sub>4</sub>-Rezeptor-Antagonisten (11995, 409499, 41858 und 448698) gehört komplett zu den PB-Typ Induktoren. Man kann also davon ausgehen, dass die Aktivierung des CAR-Rezeptors und damit die CYP 2B-Induktion z.T. durch ein gemeinsames Strukturmerkmal bedingt wird. Dieser gemeinsame Molekülbestandteil ist die 6-(4-Chlor (bzw. Fluor)phenyl)-3-aza-bicyclo (3.2.0)heptan-Gruppierung, die Ähnlichkeit mit DDT hat. Insgesamt sind die vier Verbindungen ähnlich aufgebaut und weisen durch die drei zyklischen Gruppen eventuell eine Ähnlichkeit in der räumlichen Anordnung zum potentesten CYP 2B-Induktor, dem TCPOBOP [69] auf.

Die Induktion von CYP 3A wird über den sogenannten PXR-Rezeptor (Pregnane X Receptor) vermittelt. Dieser Rezeptor hat die Besonderheit, dass er sowohl mit PB-

---

Typ Induktoren [73] als auch mit den „typischen“ 3A-Induktoren wie DEX und PCN aktiviert werden kann. Die über den PXR-Rezeptor vermittelte CYP 3A-Induktion verläuft ähnlich der PPAR $\alpha$ -vermittelten CYP 4A-Induktion (siehe 1.3.1), d.h. als Dimerisierungspartner dient auch der RXR-Rezeptor (Retinoid X Receptor) [73]. Es gibt einen merklichen Unterschied in der LBD (Ligand Binding Domain) des humanen PXR und dem der Ratte (nur 75 % Homologie in der Aminosäuresequenz). Darauf beruht wahrscheinlich die unterschiedliche Induzierbarkeit von humanem CYP 3A4 durch Rifampicin aber nicht durch PCN, während es sich bei der Ratte umgekehrt verhält [16]. CYP 3A4 spielt eine sehr wichtige Rolle in der Biotransformation von Medikamenten, da es erstens mit ca. 30% des gesamten Cytochrom P450 in der Leber das häufigste Isoenzym ist [71] und zweitens im Stoffwechsel von ungefähr 60% aller verwendeten Arzneimittel eine Rolle spielt [74].



**Abbildung 62: Strukturformeln von CYP 3A-Induktoren**

Die strukturellen Merkmale der CYP 3A-Induktoren sind entweder ein Steroid-Grundkörper (PCN, DEX, Pregnenolon) oder mehrere Phenylreste (Clotrimazol, Rifampicin) [74].

Die Überprüfung der Knoll-Substanzen auf diese Strukturmerkmale zeigt, dass keine der Substanzen eine steroidähnliche Struktur hat, aber einige Substanzen wie 135252, 47110 und 45966 mehrere Ringsysteme enthalten und damit eventuell Liganden für den PXR-Rezeptor sind. Als Kriterien für eine CYP 3A-Induktion wurden *in vitro* die Erhöhungen der 15 $\beta$ -, 6 $\beta$ - (CYP 3A1 ist für 85% der 6 $\beta$ -Hydroxylase-

Aktivität verantwortlich [75]) und 2 $\beta$ -Hydroxylierung von Testeron untersucht. Hierbei zeigten alle als PB-Typ Induktoren bezeichneten Knoll-Substanzen eine Erhöhung der 15 $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität, aber nur 135252 bewirkte außerdem signifikante Steigerungen in der 6 $\beta$ - (3,6x) und 2 $\beta$ -Hydroxylierung (3,3x). Eine interessante Beobachtung wurde beim Vergleich der 16 $\beta$ - Hydroxylase-, die CYP 2B-spezifisch ist, und der CYP 3A spezifischen 15 $\beta$ - Hydroxylase-Aktivität gemacht. Bei niedrigen Konzentrationen der Knoll-Substanzen z.B. bei 135252, 53876, 418585, und 448698, überwog die 16 $\beta$ -Hydroxylierung, während bei den höchsten Konzentration die 15 $\beta$ -Hydroxylierung stärker war. Dies lässt sich vielleicht so erklären, dass bei niedrigen Konzentration die Substanzen hauptsächlich mit dem CAR-Rezeptor interagieren und so die Induktion von CYP 2B bewirken, während bei hohen Konzentrationen die Knoll-Substanzen mehr mit dem PXR-Rezeptor interagieren und dadurch die Transkription von CYP 3A gesteigert wird.

**Tabelle 14: Einfluss der Knoll-Substanzen auf die Cyp 2B-spezifische 16 $\beta$ - bzw. auf die CYP 3A spezifische 15 $\beta$ -Hydroxylierungen von Testosteron**

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [<math>\mu</math>M]</b>	<b>15<math>\beta</math>-OHT</b>	<b>16<math>\beta</math>-OHT</b>
DEX	10	6,3	1,1
PB	500	1,7	10,9
45966	175	4,1	0,8
47110	10	1,7	8,5
	175	1,8	0,7
53876	10	2,6	5,7
	40	3,3	3,1
111995	1	1,8	2,5
	10	2,9	1,3
135252	450	5,9	10,5
	900	8,6	5,3
409499	5	2,3	1,6
	10	3,3	0,6
418585	10	1,9	1,8
	20	3,3	0,8
448698	10	1,9	3,5
	40	4,3	1,1

**Induktionsfaktoren relativ zur DMSO-Kontrollaktivität**

Die Ergebnisse aus dem Testosteron-Assay weisen daraufhin, dass es sich bei den als PB-Typ Induktoren bezeichneten Knoll-Substanzen tatsächlich um typische CYP 2B-Induktoren handelt und weniger um CYP 3A-Induktoren. LU 135252 ragt hier aufgrund seines hohen Induktionsvermögens wie bei den anderen Assays hervor.

In der Einleitung ist die durch PPAR $\alpha$  vermittelte Induktion von CYP 4A und peroxisomalen Enzymen im Rahmen der Peroxisomenproliferation näher beschrieben. Die strukturellen Voraussetzungen für eine starke Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung sind eine saure Gruppe und ein relativ planares, amphiphiles Grundgerüst. Die Peroxisomen Proliferatoren (siehe Abbildung 3) DEHP, DHEA und Trichlorethylen müssen erst metabolisch aktiviert werden. DEHP wird z.B. im Dünndarm durch Lipasen hydrolysiert und der entstandene Monoester ist der eigentliche Peroxisomen Proliferator [76]. Das Steroidhormon DHEA wird durch Sulfat-Konjugation in der Position 3 in die aktive Form überführt [77]. Trichlorethylen wird durch Epoxidierung, anschließender Umlagerung zum Trichlorformaldehyd und Oxidation zur Trichloressigsäure aktiviert, wobei Trichloressigsäure ein schwacher Peroxisomen Proliferator ist.

Die auf Peroxisomenproliferation untersuchten Knoll-Substanzen (201640, 409499, 418585 und 420627; 208075 als Negativkontrolle) haben einen amphiphilen Charakter (polare und apolare Gruppen). 420627 enthält eine Carboxylgruppe und 201640 hat durch die am Pyrimidinring sitzende Hydroxylgruppe, deren Proton leicht abgespalten werden kann, auch eine saure Gruppe. Die beiden Dopamin D<sub>4</sub>-Rezeptor-Antagonisten 409499 und 418585 enthalten keine saure Gruppe, aber durch Oxidation in der  $\alpha$ -Position zum Stickstoff des Isothiazolidinringes und damit der Abspaltung der Ethylgruppe, würde eine –NH-Gruppe gebildet und durch die benachbarte Sulfonyl-Gruppe würde die Abgabe des Protons erleichtert und daraus würde eine saure Gruppe entstehen.

Daraus ergibt sich, dass alle vier Knoll-Substanzen aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften als Liganden für PPAR $\alpha$ -Rezeptor in Frage kämen und damit Peroxisomen Proliferatoren wären.

---

Tabelle 15: Induktion peroxisomaler und CYP 4A-Enzymaktivitäten

Substanz	Konz. [µM]	LAH 11-OH	LAH 12-OH	ACOX	CAT	Katalase
DMSO	0,5%	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
CIPRO	250	3,2	8,6	9,2	7,0	2,3
CLO	500	3,9	10,1	5,0	4,8	1,3
DEHP	1000	3,6	7,6	2,9	2,4	1,1
DHEA	100	2,9	3,9	1,2	2,0	1,0
201640	40	1,6	2,6	3,6	1,8	1,1
	75	2,1	4,3	2,3	2,2	1,6
208075	650	1,0	1,0	1,0	1,3	1,0
	1300	0,7	0,7	-	-	-
409499	5	1,0	2,0	1,0	0,5	0,9
	10	0,6	1,2	1,1	0,5	1,0
418585	20	1,5	3,0	1,0	2,0	1,0
	40	1,1	2,6	0,3	0,7	1,8
420627	75	1,1	1,6	1,4	0,6	1,0
	150	1,1	1,1	1,4	0,6	1,1

Angegeben sind die Induktionsfaktoren relativ zur DMSO-Kontrolle

Diese Überlegungen werden durch die *in vitro* (ACOX, CAT, Katalase und LAH) und *in vivo*-Ergebnisse (nur LAH) zumindest für 201640 und 418585 gut bestätigt, denn in allen vier Assays bewirkten die beiden Substanzen eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivitäten.

## 5.5 Induktion von Phase II-Enzymen

Die Beeinflussung der Phase II-Enzyme durch Knoll-Substanzen soll hier nur kurz diskutiert werden. Aus den *in vivo*-Daten ist ersichtlich (siehe Tabelle 2; [59]), dass die Induktion von UGTs (über die Konjugation von MUF und HOBI gemessen) und besonders die von GSTs (mit CDNB als Substrat) sehr niedrig ist. Die Induktion *in vitro* ist im allgemeinen niedriger (z.B. aufgrund der niedrigeren Zellzahl) und deshalb sind die gefundenen Induktionsfaktoren mit Modellinduktoren im Bereich < 2,0-fach (für GST mit CDNB, für UGT mit MUF, HOBI und PNP und für SULT mit PNP als Substrat) nicht überraschend. Passend zum Induktionsprofil von 135252, erhöht dieses die HOBI-Aktivität (durch UGT 2B [21]) um das 1,7-fache und damit stärker als der Modellinduktor PB (1,4-fach). Dies bestätigt wieder das starke PB-Typ Induktionsvermögen dieser Substanz.

Beim Vergleich mit Literaturwerten zeigt sich eine gute Übereinstimmung: Kern et al. [10] fanden nach 72 h Inkubation von Rattenhepatozyten aus Wistar Ratten eine Kontroll-Aktivität von  $263,7 \pm 54,9$  pmol/(min  $\times$   $2 \times 10^6$  Zellen) für die Glucuronidierung und  $105,1 \pm 40,0$  pmol/(min  $\times$   $2 \times 10^6$  Zellen) für die Sulfatkonjugation im Vergleich zu den eigenen Werten mit  $366,7 \pm 86,7$  pmol/(min  $\times$   $2 \times 10^6$  Zellen) bzw.  $113,3 \pm 46,7$  pmol/(min  $\times$   $2 \times 10^6$  Zellen).

---

## 6 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Cytotoxizität von drei Testsubstanzen (Digitonin, SDS und TritonX-100) mit Hilfe von vier verschiedenen Assays (NR, CV, LDH und WST) in der Rattenhepatozyten Primärkultur untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass WST und LDH aufgrund ihrer geringen Streuung und hohen Sensitivität die am besten geeigneten Methoden sind, um Cytotoxizität zu messen. Anschließend wurden mit diesen Assays die  $IC_{50}$ -Konzentrationen von 16 Entwicklungssubstanzen der Firma Knoll AG bestimmt, um die ermittelten Konzentration in den folgenden Induktionsversuchen zu verwenden.

Anschließend wurde der Einfluss der 16 Knoll-Substanzen auf Cytochrom P450-Isoenzyme in der Rattenhepatozyten Primärkultur untersucht. Dabei zeigte sich, dass von den 16 Substanzen lediglich drei eine schwache CYP 1A-Induktion, die über EROD und MROD bestimmt wurde, bewirkten. Im Gegensatz dazu bewirkten acht der Knoll-Substanzen eine starke Induktion, im Vergleich zum Modellinduktor PB, der durch CYP1A und 2B katalysierten BROD-Aktivität. Dieses PB-ähnliche Induktionsmuster zeigte sich auch im Testosteron-Assay. Als herausragender Induktor, vom PB-Typ zeigte sich dabei die Substanz LU 135252. Die Konjugationsreaktionen (Phase II) mit den verschiedenen Substraten CDNB für GST und MUF, HOBI und PNP für verschiedene UGTs wurden durch die Knoll-Substanzen wenig beeinflusst.

Im abschließenden Teil wurde der Einfluss von vier Knoll-Substanzen auf drei peroxisomale Enzyme (ACOX, CAT und Katalase) und auf Cytochrom P450 4A untersucht. Die beiden Substanzen 201640 und 418585 erhöhten die Aktivitäten aller vier Enzyme (wenn auch schwächer als die Modellinduktoren CLO und CIPRO) und könnten sich damit als Peroxisomen Proliferatoren erweisen.

Der Vergleich von *in vivo*-Daten aus Toxizitätsstudien mit den *in vitro*-Daten zeigte eine sehr gute Übereinstimmung bei der qualitativen Einteilung der Substanzen in Nicht-Induktoren und Induktoren, des PB- bzw. des Clofibrat-Typs.

---



## 7 Literaturverzeichnis

1. Dickens M and Peterson RE, Effects of Hormone-Supplemented Medium on Cytochrome P-450 Content and Mono-Oxygenase Activities of Rat Hepatocytes in Primary Culture. *Biochem Pharmacol* **29**: 1231-1238, 1980.
  2. Lubinski J, Flint OP and Durham SK, In Vivo and In Vitro Studies of Rat Liver Cytochrome P450 Induction: 2. In Vitro Induction by Phenobarbital and 3-Methylcholanthrene Measured in an Automated 24-Well Plate Assay for Cytochrome P450-dependent Activity (PROD and EROD). *In Vitro Toxicology* **7**(1): 13-23, 1994.
  3. Saad B, Scholl FA, Thomas H, Schawalter H, Streit V, Waechter F and Maier P, Crude liver membrane fractions and extracellular matrix components as substrata regulate differentially the preservation and inducibility of cytochrome P-450 isoenzymes in cultured rat hepatocytes. *Eur J Biochem* **213**(2): 805-14., 1993.
  4. Schuetz EG, Li D, Omiecinski CJ and Kleinman HK, Regulation of Gene Expression in Adult Rat Hepatocyte Cultured on a Basement Membrane Mix. *Journal of Cellular Physiology* **134**(309-323), 1988.
  5. Skett P and Roberts P, Effect of Culture Medium on the Maintenance of Steroid Metabolism in Cultured Adult Rat Hepatocytes. *In Vitro Toxicology* **7**(3): 261-267, 1994.
  6. Price PJ, Samrock RL, Lobo-Alfonso JO and Green CE, Retention of Xenobiotic-Inducible Cytochrome P450 Gene Expression in Hepatocytes. *In Vitro Toxicology* **10**(3): 365-371, 1997.
  7. Kocarek TA, Schuetz EG and Guzelian PS, Biphasic regulation of Cytochrome P450 2B1/2 mRNA expression by Dexamethasone in primary cultures of adult Rat Hepatocytes maintained on Matrigel. *Biochem Pharmacol* **48**(9): 1815-1822, 1994.
  8. Lee J, Morgan JR, Tompkins RG and Yarmush ML, Proline-mediated enhancement of hepatocyte function in a collagen gel sandwich culture configuration. *Faseb J* **7**(6): 586-91., 1993.
-

9. Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG and Tompkins RG, Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *Faseb J* **3**(2): 174-7., 1989.
  10. Kern A, Bader A, Pichlmayr R and Sewing KF, Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem Pharmacol* **54**(7): 761-72., 1997.
  11. Donato MT, Castell JV and Gomez-Lechon MJ, Cytochrome P450 activities in pure and co-cultured rat hepatocytes. Effects of model inducers. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **30A**(12): 825-32., 1994.
  12. Vickers AEM, Liver Slices: An In Vitro Tool to Predict Drug Biotransformation and to Support Risk Assessment. *In Vitro Toxicology* **10**(1): 71-80, 1997.
  13. Ekins S, Murray GI, Burke MD, Williams JA, Marchant NC and Hawksworth GM, Quantitative differences in phase I and II metabolism between rat precision-cut liver slices and isolated hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **23**(11): 1274-9., 1995.
  14. Eisenbrand G and Metzler M, *Toxikologie für Chemiker*. Thieme Verlag, Stuttgart, 1994.
  15. Omiecinski CJ, Rimmel RP and Hosagrahara VP, Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology. *Toxicol Sci* **48**(2): 151-6., 1999.
  16. Waxman DJ, P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys* **369**(1): 11-23., 1999.
  17. Nebert DW, Adesnik M, Coon MF, Estabrook RW, Gonzales FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF and Kemper B, The P450 gene superfamily: Recommended nomenclature. *DNA* **5**: 1-11, 1987.
  18. Guengerich FP, Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact* **106**: 161-182, 1997.
  19. Radomska-Pandya A, Czernik PJ, Little JM, Battaglia E and Mackenzie PI, Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* **31**(4): 817-99., 1999.
  20. Ritter JK, Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* **129**(1-2): 171-93., 2000.
-

21. King CD, Rios GR, Green MD and Tephly TR, UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* **1**(2): 143-61., 2000.
  22. De Duve C and Baudhuin P, Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* **46**: 257-323, 1966.
  23. Hruban Z and Rechcigl M, Microbodies and related particles. Morphology, biochemistry and physiology. *Int Rev Cytol Suppl.* **1**: 1-296, 1969.
  24. Baumgart E, Lipidstoffwechsel in Peroxisomen und dessen experimentelle Beeinflussung. In: *Medizinische Fakultät.* Ruprechts-Karls-Universität, Heidelberg, 1998.
  25. Reddy JK and Qureshi SA, Tumorigenicity of the hypolipemic peroxisome proliferator ethyl-p-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) in rats. *Br J Cancer* **40**: 476-482, 1979.
  26. James NH, Gill JH, Brindle R, Woodyatt NJ, Macdonald N, Rolfe M, Hasmall SC, Tugwood JD, Holden PR and Roberts RA, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha-regulated growth responses and their importance to hepatocarcinogenesis. *Toxicol Lett* **102-103**: 91-6., 1998.
  27. Hawkins JM, Jones WE, Bonner FW and Gibson GG, The effect of peroxisome proliferators on microsomal, peroxisomal, and mitochondrial enzyme activities in the liver and kidney. *Drug Metab Rev* **18**: 441-515, 1987.
  28. Qi C, Zhu Y and Reddy JK, Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. *Cell Biochem Biophys* **32**(Spring): 187-204., 2000.
  29. Lazarow PB and De Duve C, A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**(6): 2043-6, 1976.
  30. Hasmall SC, James NH, Macdonald N, Soames AR and Roberts RA, Species differences in response to diethylhexylphthalate: suppression of apoptosis, induction of DNA synthesis and peroxisome proliferator activated receptor alpha-mediated gene expression. *Arch Toxicol* **74**(2): 85-91., 2000.
  31. Goll V, Alexandre E, Viollon-Abadie C, Nicod L, Jaeck D and Richert L, Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis, and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* **160**(1): 21-32., 1999.
-

32. Hasmall S, James N, Hedley K, Olsen K and Roberts R, Mouse hepatocyte response to peroxisome proliferators: dependency on hepatic nonparenchymal cells and peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha). *Arch Toxicol* **75**(6): 357-61., 2001.
  33. Blaauboer BJ, Castell JV, Boobis AR, Coecke S, Groothuis GMM, Guillouzo A, J. HT, Gabrielle M, Lorenzon G, Miltenburger HG, Skett P, Villa P, Wiebel FJ and Rogiers V, The Practical Applicability of Hepatocyte Cultures in Routine Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 1. *ATLA* **22**: 231-241, 1994.
  34. Wortelboer HM, de Kruif CA, van Iersel AA, Falke HE, Noordhoek J and Blaauboer BJ, Comparison of cytochrome P450 isoenzyme profiles in rat liver and hepatocyte cultures. The effects of model inducers on apoproteins and biotransformation activities. *Biochem Pharmacol* **42**(2): 381-90., 1991.
  35. Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR and Mayer RT, Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem. Pharmacology* **48**(5): 923-936, 1994.
  36. Gray TJ, Lake BG, Beaman JA, Foster JR and Gangolli SD, Peroxisome proliferation in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **67**(1): 15-25., 1983.
  37. Seglen PO, Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp Cell Res* **82**(2): 391-8., 1973.
  38. Seglen PO, Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* **13**: 29-83., 1976.
  39. Gillies RJ, Didier N and Denton M, Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* **159**(1): 109-13., 1986.
  40. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y and Ueno K, A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* **19**(11): 1518-20., 1996.
  41. Fautz R, Husein B and Hechenberger C, Application of the neutral red assay (NR assay) to monolayer cultures of primary hepatocytes: rapid colorimetric viability determination for the unscheduled DNA synthesis test (UDS). *Mutat Res* **253**(2): 173-9., 1991.
-

42. Allison AC and Young MR, Vital staining in fluorescence microscopy of lysosomes. In: *Vital staining in fluorescence microscopy of lysosomes*, Vol. 2 (Eds. Dingle JT and Fell HB), pp. 600-626, New York, 1969.
  43. Borenfreund E and Puerner JA, Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* **24**(2-3): 119-24., 1985.
  44. Bergmeyer H-U, Lactate Dehydrogenase. In: *Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases*, Vol. 3 (Ed. Bergmeyer H-U), pp. 118-126. Bergmeyer, H.-U., Weinheim, 1983.
  45. Berridge MV and Tan AS, Trans-plasma membrane electron transport: a cellular assay for NADH- and NADPH-oxidase based on extracellular, superoxide-mediated reduction of the sulfonated tetrazolium salt WST-1. *Protoplasma* **205**: 74-82, 1998.
  46. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD and Wang R, The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that use Tetrazolium Salts. *Biochemica* **4**: 14-19, 1996.
  47. Compton SJ and Jones CG, Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**(2): 369-74., 1985.
  48. Friedenauer S and Berlet HH, Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Anal Biochem* **178**(2): 263-8., 1989.
  49. Bradford N, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-253, 1976.
  50. Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T and Mayer RT, Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem Pharmacol* **34**(18): 3337-45., 1985.
  51. Nerurkar PV, Park SS, Thomas PE, Nims RW and Lubet RA, Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse. *Biochem Pharmacol* **46**(5): 933-43., 1993.
  52. Burke MD and Orrenius S, The effect of albumin on the metabolism of ethoxyresorufin through O-deethylation and sulphate-conjugation using isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **27**(11): 1533-8., 1978.
-

53. Bennet PN, Blackwell E and Davies DS, Competition for sulphate during detoxification in the gut wall. *Nature* **258**: 247-248, 1975.
  54. Burke MD and Mayer RT, Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* **2**(6): 583-8., 1974.
  55. Sonderfan AJ, Arlotto MP, Dutton DR, McMillen SK and Parkinson A, Regulation of testosterone hydroxylation by rat liver microsomal cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys* **255**(1): 27-41., 1987.
  56. Gibson GG, Orton TC and Tamburini PP, Cytochrome P-450 induction by clofibrate. Purification and properties of a hepatic cytochrome P-450 relatively specific for the 12- and 11-hydroxylation of dodecanoic acid (lauric acid). *Biochem J* **203**(1): 161-8., 1982.
  57. Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB, Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**(22): 7130-9., 1974.
  58. Bock KW, von Clausbruch UC, Kaufmann R, Lilienblum W, Oesch F, Pfeil H and Platt KL, Functional heterogeneity of UDP-glucuronyltransferase in rat tissues. *Biochem Pharmacol* **29**(4): 495-500., 1980.
  59. Bock KW, Burchell B, Dutton GJ, Hanninen O, Mulder GJ, Owens IS, Siest G and Tephly TR, UDP-glucuronosyltransferase activities. Guidelines for consistent interim terminology and assay conditions. *Biochem Pharmacol* **32**(6): 953-5., 1983.
  60. Lilienblum W, Walli AK and Bock KW, Differential induction of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities by various inducing agents. *Biochem Pharmacol* **31**(6): 907-13., 1982.
  61. Gram TE, Hansen AR and Fouts JR, The submicrosomal distribution of hepatic uridine diphosphate glucuronyltransferases in the rabbit. *Biochem J* **106**: 587-591, 1968.
  62. Small GM, Burdett K and Connock MJ, A sensitive spectrophotometric assay for peroxisomal acyl-CoA oxidase. *Biochem J* **227**(1): 205-10., 1985.
  63. Bieber LL and Markwell MA, Peroxisomal and microsomal carnitine acetyltransferases. *Methods Enzymol* **71**(Pt C): 351-8., 1981.
  64. Baudhuin P, Beaufay H, Rahman-Li Y, Sellinger OZ, Wattiaux R, Jacques P and De Duve C, Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of
-

- monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochem J* **92**(1): 179-84., 1964.
65. Hübl P and Breitschneider R, Die Titanylulfatmethode zur Bestimmung der Katalase in Blut, Serum und Harn. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **335**: 146-155, 1964.
66. Waxman DJ, Hormonal Regulation of Liver Cytochrome P450 Enzymes. In: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Ed. Ortiz de Montellano PR), pp. 391-416. Plenum Press, New York, 1995.
67. Maier M, Hepatische Peroxisomenproliferation durch Hypolipidämika. In: *Medizinische Fakultät*, pp. 159. Ruprechts-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg, 1995.
68. Lake BG, Gray TJ, Stubberfield CR, Beamand JA and Gangolli SD, Induction of lauric acid hydroxylation and maintenance of cytochrome P-450 content by clofibrate in primary cultures of rat hepatocytes. *Life Sci* **33**(3): 249-54., 1983.
69. Sueyoshi T and Negishi M, Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 123-43., 2001.
70. Whitlock JP, Jr., Chichester CH, Bedgood RM, Okino ST, Ko HSP, Ma Q, Dong LQ and Li H, Induction of drug-metabolizing enzymes by dioxin. *Drug Metab Rev* **29**(4): 1107-1127, 1997.
71. Pelkonen O, Mäenpää J and Taavitsainen P, Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* **28**(12): 1203-1253, 1998.
72. Lewis DF, Quantitative structure-activity relationships in substrates, inducers, and inhibitors of Cytochrome P4501 (CYP1). *Drug Metabolism Reviews* **29**(3): 589-650, 1997.
73. Honkakoski P and Negishi M, Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* **347**(Pt 2): 321-37., 2000.
74. Kliewer SA, Lehmann JM, Milburn MV and Willson TM, The PPARs and PXR: nuclear xenobiotic receptors that define novel hormone signaling pathways. *Recent Prog Horm Res* **54**: 345-67; discussion 367-8., 1999.
75. Jansen EH and de Fluiter P, Detection of the enzymatic activity of cytochrome P-450 enzymes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **580**(1-2): 325-46., 1992.
-

- 
76. Lake BG, Beamand JA, Foster JR, Gangolli SD and Gray TJ, Peroxisomal Effects of Phthalate esters in Primary Cultures of Rat Hepatocytes. *Toxicology* **28**: 167-179, 1983.
  77. Sakuma M, Yamada J and Suga T, Induction of peroxisomal beta-oxidation by structural analogues of dehydroepiandrosterone in cultured rat hepatocytes: structure-activity relationships. *Biochimica et Biophysica Acta* **1169**(1): 66-72, 1993.
-



**Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:**

Posterbeitrag:

**Klein K.-U., Blaich G., Schrenk D.**

Determination of Cytochrome P 450 Isoenzymes in Primary Cultures of Rat Hepatocytes by Measuring Alkoxyresorufin-O-dealkylation Activity

Workshop 2000 des Jungchemikerforums der GDCh, 20-22. September 2000, Hamburg

Posterbeitrag:

**Klein K.-U., Blaich G., Schrenk D.**

Specific classification of Model P450 Inducers in primary Rat Hepatocyte cultures using Alkoxyresorufin O-Dealkylation (AROD) and Testosterone metabolism

42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 13-15. März 2001, Mainz

Abstract: Archives of Pharmacology, 363, R135 (2001)

---

## 8 Anhang

Angabe der vollständigen Daten für die Knoll-Substanzen in tabellarischer Form.

### 8.1 Ergebnisse aus den Vorversuchen

Die Daten zu den IC<sub>50</sub>-Kurven von Digitonin mit fünf Assays bestimmt. Jeweils die erste Spalte enthält den MW und die zweite Spalte die SD.

Tabelle 16: IC<sub>50</sub>-Kurven von Digitonin in Rattenhepatozyten (n = 1)

Digitonin [mg/l]	CV		LDH Überstand		LDH Zellen		WST		NR		Protein	
	Abs. 550 nm		[mU/ml]		[mU/ml]		Abs. 450 nm		Abs. 550 nm		[µg/ml]	
500	<b>0,674</b>	0,100	<b>322</b>	23	<b>11</b>	2	<b>0,056</b>	0,003	<b>0,030</b>	0,001	<b>26</b>	4
250	<b>0,506</b>	0,090	<b>295</b>	26	<b>17</b>	3	<b>0,051</b>	0,002	<b>0,027</b>	0,002	<b>27</b>	4
125	<b>0,815</b>	0,120	<b>299</b>	22	<b>14</b>	2	<b>0,049</b>	0,003	<b>0,027</b>	0,001	<b>25</b>	3
100	<b>0,719</b>	0,130	<b>324</b>	33	<b>20</b>	2	<b>0,047</b>	0,002	<b>0,026</b>	0,001	<b>30</b>	3
50	<b>0,823</b>	0,030	<b>196</b>	15	<b>145</b>	11	<b>0,098</b>	0,004	<b>0,044</b>	0,003	<b>35</b>	4
25	<b>0,955</b>	0,150	<b>105</b>	13	<b>231</b>	19	<b>1,137</b>	0,200	<b>0,082</b>	0,003	<b>35</b>	4
10	<b>1,064</b>	0,180	<b>30</b>	6	<b>264</b>	26	<b>2,987</b>	0,320	<b>0,135</b>	0,020	<b>39</b>	3
5	<b>1,131</b>	0,220	<b>29</b>	3	<b>263</b>	29	<b>2,931</b>	0,250	<b>0,149</b>	0,021	<b>36</b>	2
2	<b>1,097</b>	0,170	<b>37</b>	5	<b>270</b>	22	<b>2,623</b>	0,260	<b>0,135</b>	0,018	<b>38</b>	2
1,5	<b>1,139</b>	0,090	<b>36</b>	6	<b>278</b>	36	<b>2,333</b>	0,290	<b>0,131</b>	0,023	<b>37</b>	2
1	<b>1,163</b>	0,130	<b>48</b>	6	<b>288</b>	33	<b>2,736</b>	0,330	<b>0,122</b>	0,024	<b>37</b>	3

## 8.2 IC<sub>50</sub>-Konzentrationen von Digitonin, SDS und TX-100

Nach Inkubation der Rattenhepatozyten mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen wurden die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen sowohl mit WST als auch über LDH bestimmt.

Tabelle 17: IC<sub>50</sub>-Kurven von Digitonin, SDS, Triton X-100 mit WST bestimmt (n = 4-5)

Digitonin			SDS			Triton X-100		
[mg/l]	MW	SD	[mg/l]	MW	SD	[% (v/v)]	MW	SD
500	<b>0,053</b>	0,010	1000	<b>0,029</b>	0,006	<b>0,1</b>	0,030	0,005
250	<b>0,058</b>	0,010	500	<b>0,054</b>	0,024	<b>0,05</b>	0,035	0,003
125	<b>0,049</b>	0,005	250	<b>0,060</b>	0,002	<b>0,01</b>	0,043	0,008
100	<b>0,045</b>	0,002	200	<b>0,054</b>	0,003	<b>0,005</b>	1,467	0,563
50	<b>0,057</b>	0,020	150	<b>0,092</b>	0,040	<b>0,001</b>	3,123	0,290
25	<b>0,254</b>	0,433	100	<b>2,632</b>	0,281	<b>0,0001</b>	3,185	0,320
20	<b>0,284</b>	0,023	50	<b>3,279</b>	0,259			
10	<b>3,222</b>	0,332	10	<b>3,225</b>	0,306			
5	<b>3,470</b>	0,274	1	<b>3,266</b>	0,348			
2	<b>3,218</b>	0,841						
1,5	<b>2,425</b>	0,129						
1	<b>3,526</b>	0,387						

Tabelle 18: IC<sub>50</sub>-Kurven von Digitonin, SDS, Triton X-100 mit LDH bestimmt (n = 4-5)

Digitonin			SDS			Triton X-100		
[mg/l]	MW	SD	[mg/l]	MW	SD	[% (v/v)]	MW	SD
500	<b>34</b>	16	1000	<b>15</b>	7	0,100	<b>14</b>	6
250	<b>39</b>	27	500	<b>40</b>	24	0,050	<b>26</b>	5
100	<b>51</b>	18	250	<b>73</b>	32	0,010	<b>28</b>	3
50	<b>84</b>	35	150	<b>121</b>	47	0,005	<b>80</b>	36
25	<b>164</b>	69	100	<b>352</b>	124	0,001	<b>482</b>	82
5	<b>364</b>	117	50	<b>414</b>	120	0,0001	<b>502</b>	31
2	<b>313</b>	52	10	<b>340</b>	31			
1	<b>371</b>	94	1	<b>467</b>	69			

### 8.3 Zeitlicher Verlauf der EROD-Aktivität

Änderung der EROD-Aktivität nach Behandlung mit Modellinduktoren für 24 bis 96 h.

Tabelle 19: Zeitlicher Verlauf der EROD-Aktivität [ $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]

EROD	DMSO		3-MC		BNF		Aroclor		PB	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Zeit [h] (n)										
24 (4)	<b>6,7</b>	2,0	<b>44,8</b>	13,2	<b>50,7</b>	29,3	<b>34,8</b>	4,5	<b>17,7</b>	4,9
48 (16)	<b>8,7</b>	2,5	<b>201,1</b>	38,1	<b>130,9</b>	19,9	<b>137,8</b>	28,5	<b>18,4</b>	5,4
72 (14)	<b>10,4</b>	3,0	<b>132,3</b>	27,5	<b>114,7</b>	25,9	<b>122,8</b>	31,1	<b>21,1</b>	7,3
96 (3)	<b>13,3</b>	2,0	<b>88,6</b>	9,4	<b>82,1</b>	15,2	<b>102,7</b>	48,0	<b>16,8</b>	13,2

### 8.4 Zeitlicher Verlauf der BROD-Aktivität

Änderung der BROD-Aktivität nach Behandlung mit Modellinduktoren für 24 bis 96 h.

Tabelle 20: Zeitlicher Verlauf der BROD-Aktivität [ $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]

BROD	DMSO		3-MC		BNF		Aroclor		PB	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Zeit [h] (n)										
24 (5)	<b>1,0</b>	0,3	<b>2,6</b>	0,4	<b>1,8</b>	0,5	<b>1,8</b>	0,5	<b>1,3</b>	0,4
48 (16)	<b>1,0</b>	0,2	<b>11,9</b>	2,9	<b>6,2</b>	1,9	<b>5,2</b>	1,9	<b>4,9</b>	3,0
72 (14)	<b>0,6</b>	0,3	<b>5,7</b>	1,6	<b>4,1</b>	1,7	<b>4,1</b>	1,4	<b>3,6</b>	2,2
96 (3)	<b>0,7</b>	0,3	<b>2,3</b>	0,3	<b>1,3</b>	0,4	<b>2,3</b>	0,9	<b>0,6</b>	0,3

### 8.5 Zeitlicher Verlauf der PROD-Aktivität

Änderung der PROD-Aktivität nach Behandlung mit Modellinduktoren für 24 bis 96 h.

Tabelle 21: Zeitlicher Verlauf der PROD-Aktivität [ $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]

PROD	DMSO		3-MC		PB (3 mM)		PB (0,5 mM)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Zeit [h] (n)								
24 (5)	<b>1,5</b>	0,5	<b>2,2</b>	0,6	<b>2,0</b>	0,5	<b>3,6</b>	1,3
48 (8)	<b>1,8</b>	0,4	<b>2,4</b>	1,0	<b>1,9</b>	0,7	<b>3,3</b>	1,2
72 (8)	<b>1,0</b>	0,4	<b>1,8</b>	0,7	<b>1,5</b>	0,6	<b>2,1</b>	1,0
96 (3)	<b>0,5</b>	0,3	<b>0,8</b>	0,4	<b>1,1</b>	0,8	<b>0,6</b>	0,4

## 8.6 AROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten

AROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten nach 48-stündiger Inkubation mit den Modellinduktoren.

**Tabelle 22: AROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten nach Behandlung mit Modellinduktoren (n = 16 / 16 / 5) [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]**

Substanz	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	EROD	SD	BROD	SD	MROD	SD
Kontrolle	0	7,0	1,5	1,0	0,3	2,0	0,4
DMSO	0,5%	8,7	2,5	1,0	0,2	1,6	0,4
3-MC	2,5	201,1 *	38,1	11,9 *	2,9	13,7 *	2,3
BNF	10	130,9 *	19,9	6,2 *	1,9	12,2 *	1,7
BNF	25	104,2 *	32,3	3,3 *	1,7	13,9 *	3,6
ARO	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	137,8 *	28,5	5,2 *	1,9	12,3 *	2,4
PB	500	18,4 *	5,4	4,9 *	3,0	2,8	0,3
PB	3000	32,2 *	12,1	4,2 *	2,4	3,4	0,6
DEX	10	11,8	3,2	1,3	0,4	1,8	0,8
PCN	10	9,0	4,4	1,1	0,3	1,3	0,6
CLO	100	12,6	3,0	1,7	0,4	2,0	0,5

\* signifikant  $p \leq 0,01$

AROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten nach 48-stündiger Inkubation mit Knoll-Substanzen.

**Tabelle 23: EROD- und BROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten nach Behandlung mit Knoll-Substanzen für 48 h (n = 3-4) [ $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]**

Substanz	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	EROD	SD	BROD	SD
45966	0,1	12,6	3,3	1,4	0,9
	1	9,7	3,3	1,7	0,8
	10	3,8 *	0,8	3,9 *	1,6
	175	0,7 *	0,4	0,7	0,4
	350	1,0 *	0,1	0,4	0,2
47110	0,1	7,2	2,1	0,6	0,1
	1	14,9 *	3,6	4,1 *	1,8
	10	22,2 *	4,7	14,7 *	2,5
	175	12,3	3,2	3,5	1,6
	350	3,9 *	1,8	1,2	0,8
53876	0,1	11,2	0,7	1,6	0,7

Substanz	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	EROD	SD	BROD	SD
111995	1	8,5	1,0	3,7	1,0
	10	23,5 *	9,4	9,3 *	3,4
	25	11,5	2,4	0,6	0,3
	75	2,0 *	0,9	0,4	0,1
	0,1	17,2	3,5	3,4	0,6
135252	1	11,8	2,6	4,5 *	1,5
	10	4,4 *	0,6	2,3	0,5
	25	2,4 *	0,2	0,7	0,3
	0,1	nd	nd	1,4	0,7
	1	7,5	2,2	1,6	0,9
409499	10	19,8 *	5,0	2,5	0,3
	100	10,4	2,3	5,3 *	2,1
	450	22,1 *	7,6	16,8 *	5,1
	900	39,9 *	11,2	5,7 *	1,1
	1000	25,2 *	6,9	2,6	1,3
	0,1	9,3	2,9	1,7	0,7
	1	24,9 *	7,5	4,5 *	0,3
	3	14,9	2,5	1,5	0,5
	5	35,9 *	13,2	3,4 *	0,9
	10	19,5 *	4,4	1,5	0,6
418585	0,1	8,7	3,0	1,6	0,8
	1	9,4	2,5	2,1	0,6
448698	10	28,5 *	7,8	10,9 *	4,3
	20	17,5 *	4,4	3,5	0,3
	40	17,8 *	5,3	2,9	2,1
	0,1	7,3	3,0	1,9	1,0
	1	9,2	2,9	1,7	0,9
	10	13,2	2,9	7,9 *	2,5
201640	20	19,7	6,1	2,6	0,9
	40	5,7	1,4	0,9	0,5
	0,1	14,7	4,7	1,9	0,3
	1	17,4	6,8	2,1	0,7
208075	10	15,2 *	1,8	2,1	0,6
	50	7,8	3,1	1,6	0,4
	75	2,8 *	1,6	0,5	0,1
	0,1	9,3	1,2	1,6	1,1
	1	8,0	2,2	1,6	0,4
	10	13,4	2,1	1,4	0,3
	100	10,2	1,0	2,5	1,5
	500	10,4	2,1	1,9	0,8
	1300	15,9	5,2	5,2 *	2,4

Substanz	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	EROD	SD	BROD	SD
208791	1	8,4	2,9	1,1	0,2
	10	6,3	1,4	1,1	0,6
	100	9,5	1,1	nd	nd
	300	nd	nd	1,3	0,5
	450	8,5	3,1	nd	nd
	900	8,8	4,1	1,6	0,7
223651	1	19,6	7,4	nd	nd
	10	13,6	5,7	0,8	0,3
	25	10,3	3,9	1,0	0,5
	75	5,0	1,8	0,6	0,2
411693	0	12,1	2,5	1,1	0,1
	15	10,8	1,3	1,1	0,2
	150	13,1	1,5	1,3	0,4
	450	10,8	0,8	1,2	0,7
	900	10,2	0,5	1,0	0,1
420627	1	9,5	3,1	1,5	0,9
	10	8,5	5,3	1,5	1,1
	50	8,0	3,1	1,4	0,8
	150	10,6	5,4	1,0	0,6
433220	0,1	10,7	2,7	1,3	0,5
	1	11,7	3,2	1,4	0,7
	3	13,5	4,6	1,4	0,7
	9	26,0 *	14,8	1,8	0,7
466506	0,1	5,8	0,8	0,9	0,1
	1	6,0	1,3	1,0	0,2
	10	6,9	0,3	0,6	0,2
	25	5,2	0,4	0,3	0,1

\* signifikant  $p \leq 0,01$ ; nd = nicht bestimmt

**Tabelle 24: MROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten nach Behandlung mit Knoll-Substanzen für 48 h (n = 3) [pmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>]**

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [µM]</b>	<b>MROD</b>	<b>SD</b>
45966	10	1,7	0,4
	175	1,9	0,6
47110	10	2,2	0,6
	175	1,0	0,2
53876	10	2,5	0,3
	40	2,3	0,5
111995	1	2,3	0,4
	10	2,5	0,4
	25	0,9 *	0,2
135252	10	1,5	0,5
	450	1,2	0,2
	900	2,2	0,2
409499	1	3,9 *	0,8
	5	6,3 *	2,0
418585	10	5,5 *	2,1
	20	4,2 *	1,1
448698	10	5,6 *	1,7
	20	4,0	1,7

\* signifikant  $p \leq 0,01$



## 8.7 Testosteron-Metabolismus in Rattenhepatozyten

Beeinflussung des Metabolismus von Testosteron in Rattenhepatozyten nach Behandlung mit Modellinduktoren oder Knoll-Substanzen für 72 h.

Tabelle 25: Testosteron-Hydroxylase-Aktivitäten (Modellinduktoren) [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]

Substanz	n	Kon	6 $\alpha$	15 $\beta$	7 $\alpha$	6 $\beta$	16 $\alpha$	16 $\beta$	2 $\alpha$	2 $\beta$	And	DHT
<b>Kontrolle</b>	8	<b>550</b>	<b>18</b>	<b>3,9</b>	<b>8,4</b>	<b>39</b>	<b>64</b>	<b>2,7</b>	<b>41</b>	<b>20</b>	<b>243</b>	<b>245</b>
SD		49	4	2,0	2,3	4	17	1,3	8	6	78	68
<b>DMSO</b>	11	<b>503</b>	<b>17</b>	<b>2,9</b>	<b>9,8</b>	<b>36</b>	<b>58</b>	<b>5,0</b>	<b>37</b>	<b>15</b>	<b>186</b>	<b>198</b>
SD		87	5	1,0	3,6	6	22	1,9	16	8	59	57
<b>3-MC</b>	7	<b>660</b>	<b>17</b>	<b>4,1</b>	<u><b>29,7</b></u>	<b>44</b>	<b>47</b>	<b>2,0</b>	<b>33</b>	<b>20</b>	<b>238</b>	<b>202</b>
SD		98	3	1,1	9,7	8	13	0,7	8	6	50	55
<b>10 <math>\mu\text{M}</math> BNF</b>	6	<b>644</b>	<b>16</b>	<b>3,5</b>	<u><b>24,9</b></u>	<b>41</b>	<u><b>20</b></u>	<b>1,7</b>	<u><b>10</b></u>	<b>7</b>	<b>231</b>	<b>185</b>
SD		109	4	1,4	12,0	8	8	0,7	6	2	57	55
<b>ARO</b>	7	<b>561</b>	<b>17</b>	<b>4,5</b>	<b>7,2</b>	<b>45</b>	<u><b>18</b></u>	<b>1,8</b>	<u><b>8</b></u>	<b>7</b>	<b>294</b>	<b>212</b>
SD		47	4	1,3	2,4	7	6	0,7	3	3	95	66
<b>0,5 mM PB</b>	10	<b>535</b>	<b>17</b>	<b>6,8</b>	<u><b>19,8</b></u>	<u><b>59</b></u>	<b>41</b>	<u><b>29,9</b></u>	<u><b>11</b></u>	<b>16</b>	<b>187</b>	<b>202</b>
SD		87	3	4,6	6,8	29	17	19,6	7	11	55	64
<b>DEX</b>	10	<b>670</b>	<b>17</b>	<u><b>18,5</b></u>	<b>6,2</b>	<u><b>93</b></u>	<b>68</b>	<b>5,6</b>	<b>41</b>	<u><b>30</b></u>	<b>178</b>	<b>154</b>
SD		101	4	9,3	3,2	38	23	2,4	14	10	56	46
<b>PCN</b>	7	<b>713</b>	<b>19</b>	<u><b>10,3</b></u>	<b>7,5</b>	<u><b>66</b></u>	<b>64</b>	<b>2,6</b>	<b>38</b>	<b>23</b>	<b>240</b>	<b>159</b>
SD		85	3	3,0	2,2	10	21	1,2	12	10	63	44
<b>CLO</b>	7	<b>515</b>	<b>17</b>	<b>7,3</b>	<b>13,5</b>	<b>56</b>	<b>101</b>	<b>6,5</b>	<b>73</b>	<u><b>42</b></u>	<b>245</b>	<b>187</b>
SD		98	4	1,9	2,5	6	36	2,0	17	12	46	61
<b>CIPRO</b>	2	<b>609</b>	<b>12</b>	<u><b>14,7</b></u>	<u><b>21,0</b></u>	<u><b>123</b></u>	<b>66</b>	<u><b>41,1</b></u>	<b>29</b>	<u><b>47</b></u>	<b>129</b>	<b>264</b>
SD		70	1	6,1	2,3	33	8	5,0	15	19	20	10

signifikant  $p \leq 0,01$

Tabelle 26: Testosteron-Hydroxylase-Aktivitäten (Knoll-Substanzen) [pmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>]

Subst.	Konz	Kon	6 $\alpha$	15 $\beta$	7 $\alpha$	6 $\beta$	16 $\alpha$	16 $\beta$	2 $\alpha$	2 $\beta$	And	DHT
45966	10	<b>585</b>	18	<b>4,2</b>	<b>9,6</b>	<b>33</b>	<b>15</b>	<b>6,9</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>152</b>	<b>157</b>
	SD	65	7	1,5	3,9	8	4	3,3	1	3	23	23
SD	175	<b>624</b>	<b>22</b>	<b>12,0</b>	<b>16,4</b>	<b>66</b>	<b>12</b>	<b>4,1</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>90</b>	<b>274</b>
	SD	102	4	2,7	2,6	16	3	2,3	3	3	11	53
SD	350	<b>516</b>	<b>19</b>	<b>9,1</b>	<b>13,4</b>	<b>64</b>	<b>12</b>	<b>4,1</b>	<b>3</b>	<b>14</b>	<b>97</b>	<b>262</b>
	SD	142	7	2,2	5,1	17	3	1,1	1	2	13	29
47110	10	<b>609</b>	<b>23</b>	<b>4,9</b>	<b>8,7</b>	<b>52</b>	<b>67</b>	<b>42,4</b>	33	<b>15</b>	<b>171</b>	<b>155</b>
	SD	35	7	3,6	7,5	24	45	21,1	13	7	37	42
SD	175	<b>279</b>	<b>20</b>	<b>5,3</b>	<b>8,6</b>	<b>34</b>	<b>9</b>	<b>3,4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>158</b>	<b>184</b>
	SD	23	4	1,9	1,9	5	4	2,3	1	0	41	47
SD	350	<b>253</b>	<b>20</b>	<b>4,0</b>	<b>7,0</b>	<b>37</b>	<b>10</b>	<b>3,8</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>239</b>	<b>168</b>
	SD	29	6	1,6	3,4	8	1	1,8	1	1	135	47
53876	10	503	<b>21</b>	<b>7,9</b>	<b>10,6</b>	<b>66</b>	<b>27</b>	<b>28,3</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>133</b>	<b>174</b>
	SD	121	5	5,9	4,8	26	11	20,6	4	11	34	58
SD	40	<b>613</b>	<b>18</b>	<b>10,1</b>	<b>8,2</b>	<b>64</b>	<b>25</b>	<b>16,4</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>110</b>	<b>215</b>
	SD	36	4	3,3	2,4	29	11	7,5	1	6	10	13
SD	75	<b>174</b>	<b>15</b>	<b>2,0</b>	<b>3,9</b>	<b>26</b>	<b>9</b>	<b>2,3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>157</b>	<b>172</b>
	SD	70	6	1,0	1,8	10	2	1,3	2	1	58	44
111995	1	<b>659</b>	<b>27</b>	<b>5,3</b>	<b>7,8</b>	<b>57</b>	<b>18</b>	<b>12,4</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>149</b>	<b>110</b>
	SD	92	18	3,2	4,3	11	6	4,4	2	3	45	30
SD	10	<b>517</b>	<b>20</b>	<b>8,4</b>	<b>9,9</b>	<b>57</b>	<b>15</b>	<b>6,6</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>114</b>	<b>256</b>
	SD	107	9	3,3	1,2	4	4	2,0	1	3	17	28
SD	25	<b>414</b>	<b>18</b>	<b>6,5</b>	<b>7,5</b>	<b>43</b>	<b>12</b>	<b>3,0</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>155</b>	<b>159</b>
	SD	46	8	3,1	1,8	19	3	1,0	1	2	21	31
135252	10	<b>550</b>	<b>22</b>	<b>2,7</b>	<b>8,5</b>	<b>37</b>	<b>19</b>	<b>6,7</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>179</b>	<b>146</b>
	SD	39	9	1,1	6,0	11	7	2,5	6	7	21	25
SD	450	<b>417</b>	<b>21</b>	<b>17,3</b>	22,1	<b>126</b>	<b>71</b>	<b>52,4</b>	<b>20</b>	<b>50</b>	<b>144</b>	<b>199</b>
	SD	49	4	7,7	7,1	66	45	25,2	10	21	6	55
SD	900	<b>281</b>	<b>19</b>	<b>25,1</b>	<b>15,9</b>	<b>129</b>	<b>56</b>	<b>26,2</b>	<b>21</b>	<b>49</b>	<b>187</b>	<b>193</b>
	SD	54	4	9,8	4,2	57	27	11,8	9	21	37	67
409499	1	<b>505</b>	<b>20</b>	<b>2,6</b>	<b>11,4</b>	<b>32</b>	<b>18</b>	<b>4,0</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>157</b>	<b>172</b>
	SD	47	7	0,2	2,5	5	4	1,2	2	1	15	20
SD	5	<b>432</b>	<b>18</b>	<b>6,8</b>	<b>13,6</b>	<b>48</b>	<b>30</b>	<b>7,8</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>190</b>	<b>226</b>
	SD	53	5	3,3	4,0	26	13	3,5	3	1	46	64
SD	10	<b>657</b>	<b>20</b>	<b>9,5</b>	<b>13,9</b>	<b>50</b>	<b>20</b>	<b>3,2</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>190</b>	<b>222</b>
	SD	38	7	3,7	6,2	12	9	1,6	2	2	38	56
418585	10	<b>536</b>	<b>19</b>	<b>5,6</b>	<b>8,9</b>	<b>46</b>	<b>34</b>	<b>9,1</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>158</b>	<b>149</b>
	SD	158	5	2,0	2,6	20	5	3,1	2	2	24	31
SD	20	<b>516</b>	<b>12</b>	<b>9,6</b>	<b>9,5</b>	<b>49</b>	<b>26</b>	<b>3,9</b>	<b>18</b>	<b>17</b>	<b>104</b>	<b>274</b>
	SD	54	3	1,2	1,9	19	7	1,5	1	2	13	10

Subst.	Konz	Kon	6 $\alpha$	15 $\beta$	7 $\alpha$	6 $\beta$	16 $\alpha$	16 $\beta$	2 $\alpha$	2 $\beta$	And	DHT
448698	40	<u>306</u>	19	7,0	7,0	40	52	3,3	34	16	247	249
		15	2	2,5	2,1	13	12	1,5	12	3	42	41
	10	535	20	5,6	11,9	48	25	<u>17,5</u>	<u>3</u>	7	162	146
		27	7	1,5	1,8	8	1	1,2	0	1	31	62
	20	516	14	<u>7,5</u>	10,5	48	<u>15</u>	7,1	<u>3</u>	10	110	199
		134	3	0,7	3,8	16	6	2,6	1	1	12	37
201640	40	579	18	<u>12,4</u>	9,6	59	<u>18</u>	5,2	<u>6</u>	14	192	180
		108	4	2,9	2,3	19	7	2,3	3	8	74	58
208075	10	452	24	4,9	10,5	52	25	5,3	11	6	157	283
		56	4	2,1	3,4	9	11	1,8	2	1	34	74
208075	40	499	21	<u>7,1</u>	10,4	56	25	7,7	<u>8</u>	7	154	224
		105	3	2,0	2,4	9	9	3,5	6	2	32	59
	10	531	24	4,0	10,3	38	32	4,2	17	9	167	269
208791		43	2	1,5	3,2	3	16	1,7	4	2	37	65
	650	348	20	3,1	9,0	35	22	5,1	13	7	154	319
208791		55	1	1,2	2,3	7	9	1,7	5	1	16	79
	10	453	22	3,1	9,6	43	28	7,4	13	8	149	260
223651		80	3	0,9	3,4	12	9	1,8	1	1	32	36
	450	472	22	3,5	10,9	46	28	11,6	13	9	144	248
		104	1	1,9	3,8	13	6	2,1	1	3	17	53
223651	10	428	23	2,8	10,6	39	27	5,0	14	6	147	266
		67	1	0,3	3,2	5	12	2,4	2	0	23	75
411693	40	568	23	3,9	10,1	44	31	9,1	16	10	150	220
		118	1	1,4	3,9	15	5	3,1	4	2	25	43
	10	433	22	4,1	9,0	39	26	5,0	16	8	176	303
420627		42	1	1,9	0,7	5	11	2,2	6	2	53	70
	450	540	22	2,9	10,8	43	27	7,2	12	10	145	278
420627		36	0	1,1	1,5	9	11	2,7	0	1	34	69
	10	520	26	<u>9,7</u>	<u>22,5</u>	<u>97</u>	88	<u>25,4</u>	15	10	353	219
		165	2	3,6	9,1	29	24	12,2	7	1	75	25
433220	75	488	23	3,2	13,4	43	25	10,8	11	9	146	211
		199	2	0,6	2,5	11	9	2,7	5	2	40	45
	1	527	24	3,5	10,4	48	32	7,9	15	9	154	262
466506		56	3	1,3	2,2	5	14	3,7	3	2	26	53
	5	508	24	4,3	10,6	48	26	5,0	14	9	162	289
		20	2	1,6	4,4	11	8	1,5	4	2	14	76
466506	1	499	24	3,4	9,3	36	41	3,6	25	12	165	293
		45	2	1,5	1,9	5	18	1,7	10	4	36	66
	10	342	21	3,0	4,9	36	<u>13</u>	2,4	<u>9</u>	5	143	363
	72	3	1,5	2,3	6	4	0,8	2	1	13	16	

signifikant  $p \leq 0,01$

## 8.8 LAH-Aktivität in Rattenhepatozyten

Umsatz von Laurinsäure zu 11-Hydroxy- (11-OH) bzw. 12-Hydroxy-Laurinsäure (12-OH) in Homogenaten von Rattenhepatozyten nach 72-stündiger Behandlung mit Modellinduktoren oder ausgewählten Knoll-Substanzen.

Tabelle 27: LAH-Aktivität [ $\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] in Rattenhepatozyten (n = 3)

Substanz	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	11-OH	SD	rel. DMSO	12-OH	SD	rel. DMSO
DMSO	0,5%	<b>2,6</b>	0,7	1,0	<b>2,8</b>	0,5	1,0
CIPRO	250	<b>8,5 *</b>	0,3	3,2	<b>24,2 *</b>	1,2	8,6
CLO	500	<b>10,2 *</b>	0,8	3,9	<b>28,3 *</b>	6,0	10,1
DEHP	1000	<b>9,5 *</b>	0,5	3,6	<b>21,4 *</b>	1,3	7,6
DHEA	100	<b>7,6 *</b>	0,5	2,9	<b>11,0 *</b>	1,0	3,9
201640	40	<b>4,3</b>	1,1	1,6	<b>7,4</b>	3,6	2,6
	75	<b>5,5</b>	2,2	2,1	<b>12,0 *</b>	5,7	4,3
208075	650	<b>2,7</b>	2,1	1,0	<b>2,8</b>	1,3	1,0
	1300	<b>1,8</b>	0,5	0,7	<b>1,8</b>	0,8	0,7
409499	5	<b>2,7</b>	1,6	1,0	<b>5,7</b>	1,3	2,0
	10	<b>1,6</b>	0,7	0,6	<b>3,4</b>	1,1	1,2
418585	20	<b>4,1</b>	1,2	1,5	<b>8,6 *</b>	1,2	3,0
	40	<b>2,8</b>	0,8	1,1	<b>7,4 *</b>	2,5	2,6
420627	75	<b>2,9</b>	0,6	1,1	<b>4,4</b>	0,6	1,6
	150	<b>2,9</b>	0,1	1,1	<b>3,0</b>	0,5	1,1

\* signifikant  $p \leq 0,01$

## 8.9 GST-Aktivität in Rattenhepatozyten

GST-Aktivität in mit TritonX-100 lysierten Rattenhepatozyten (96well) nach 48-stündiger Inkubation mit Modellinduktoren und ausgewählten Knoll-Substanzen mit CDNB als Konjugationssubstrat.

Tabelle 28: GST-Aktivitäten [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] in Rattenhepatozyten (n = 7)

Substanz	Kontrolle	DMSO 0,5%	3-MC 2,5 $\mu\text{M}$	BNF 10 $\mu\text{M}$	PB 0,5 mM	DEX 10 $\mu\text{M}$	CLO 100 $\mu\text{M}$
<b>GST-Aktivität</b>	<b>19,8</b>	<b>19,2</b>	<b>21,4</b>	<b>19,7</b>	<b>22,4</b>	<b>21,9</b>	<b>24,0</b>
<b>SD</b>	3,6	2,7	2,4	1,7	2,6	2,1	3,9

Tabelle 29: GST-Aktivitäten [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] nach Behandlung mit Knoll-Substanzen (n = 3-4)

Substanz	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Aktivität	SD	
409499	<b>0,1</b>	21,5	2,9	
	<b>1</b>	21,9	2,4	
	<b>3</b>	23,0	3,3	
	<b>10</b>	21,4	2,9	
	<b>418585</b>	<b>0,1</b>	23,1	4,0
418585	<b>1</b>	22,0	2,4	
	<b>10</b>	25,5	3,0	
	<b>40</b>	19,5	2,3	
	<b>448698</b>	<b>0,1</b>	19,0	2,1
	448698	<b>1</b>	19,9	3,5
<b>10</b>		19,5	3,0	
<b>40</b>		23,8	3,9	
<b>420627</b>		<b>1</b>	23,2	3,3
420627		<b>10</b>	20,7	4,4
	<b>50</b>	22,5	5,9	
	<b>150</b>	20,5	5,3	
	<b>433220</b>	<b>0,1</b>	22,3	4,2
	433220	<b>1 *</b>	29,1	5,2
<b>3 *</b>		28,8	4,7	
<b>9</b>		26,0	5,3	
<b>466506</b>		<b>0,1</b>	23,6	3,4
466506		<b>1</b>	21,8	1,8
	<b>10 *</b>	23,1	2,0	
	<b>25</b>	22,2	1,4	

\* signifikant  $p \leq 0,01$

## 8.10 MUF-Konjugation in Rattenhepatozyten

Glucuronidierung (Phase 2-Reaktion) von 4-Methyl-Umbelliferon in Homogenaten von Rattenhepatozyten nach 72-stündiger Behandlung mit Modellinduktoren oder ausgewählten Knoll-Substanzen.

**Tabelle 30: MUF-Aktivität [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] in Rattenhepatozyten (n = 3)**

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>Aktivität</b>	<b>SD</b>	<b>rel. DMSO</b>
DMSO	0,5%	<b>4,7</b>	1,0	1,0
PB	500	<b>5,1</b>	0,8	1,1
3-MC	2,5	<b>7,9</b>	3,1	1,7
BNF	10	<b>6,9</b>	0,5	1,5
135252	450	<b>5,4</b>	1,9	1,1
	900	<b>6,4</b>	1,8	1,4
208075	650	<b>5,2</b>	2,2	1,1
	1300	<b>5,4</b>	0,5	1,1
208791	450	<b>4,9</b>	1,3	1,0
	900	<b>6,1</b>	1,0	1,3
409499	5	<b>4,3</b>	1,1	0,9
	10	<b>4,3</b>	0,6	0,9
433220	5	<b>6,1</b>	0,8	1,3
	9	<b>7,0</b>	0,8	1,5
448698	20	<b>4,3</b>	1,0	0,9
	40	<b>5,4</b>	1,6	1,1

## 8.11 HOBI-Konjugation in Rattenhepatozyten

Glucuronidierung (Phase 2-Reaktion) von 4-Hydroxy-Biphenyl in Homogenaten von Rattenhepatozyten nach 72-stündiger Behandlung mit Modellinduktoren oder ausgewählten Knoll-Substanzen.

Tabelle 31: HOBI-Aktivität [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] in Rattenhepatozyten (n = 3)

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>Aktivität</b>	<b>SD</b>	<b>rel. DMSO</b>
DMSO	0,5%	<b>2,5</b>	0,4	1,0
PB	500	<b>3,5</b>	1,7	1,4
3-MC	2,5	<b>2,3</b>	0,8	0,9
BNF	10	<b>2,3</b>	0,6	0,9
135252	450	<b>3,2</b>	0,6	1,3
	900	<b>4,3</b>	1,8	1,7
208075	650	<b>2,5</b>	0,8	1,0
	1300	<b>1,6</b>	0,2	0,6
208791	450	<b>1,9</b>	0,4	0,8
	900	<b>2,6</b>	1,6	1,0
409499	5	<b>2,3</b>	0,8	0,9
	10	<b>2,7</b>	0,3	1,1
433220	5	<b>2,6</b>	0,0	1,0
	9	<b>3,3</b>	1,1	1,3
448698	20	<b>2,3</b>	0,9	0,9
	40	<b>2,4</b>	1,3	1,0

## 8.12 PNP-Konjugation in Rattenhepatozyten

Enzymatische PNP-Konjugation mit Sulfat oder Glucuronsäure in intakten Rattenhepatozyten nach Behandlung mit Modellinduktoren oder Knoll-Substanzen für 72 h.

Tabelle 32: PNP-Konjugation in Rattenhepatozyten [ $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]

<b>Substanz</b>	<b>PNP-G</b>	<b>SD</b>	<b>PNP-S</b>	<b>SD</b>	<b>n</b>
Kontrolle	<b>301</b>	70	<b>91</b>	29	7
DMSO 0,5%	<b>343</b>	75	<b>103</b>	22	9
3-MC 2,5 $\mu\text{M}$	<b>566 *</b>	76	<b>126</b>	24	8
BNF 10 $\mu\text{M}$	<b>607 *</b>	108	<b>136</b>	28	8
ARO 10 $\mu\text{g/ml}$	<b>647 *</b>	55	<b>127</b>	14	4
PB 0,5 mM	<b>402</b>	31	<b>116</b>	27	5
DEX 10 $\mu\text{M}$	<b>395</b>	31	<b>117</b>	20	5
PCN 10 $\mu\text{M}$	<b>471</b>	23	<b>136</b>	27	3
CLO 100 $\mu\text{M}$	<b>411</b>	21	<b>120</b>	27	3

signifikant  $p \leq 0,01$

Tabelle 33: Konjugation von PNP nach Behandlung mit Knoll-Substanzen [ $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] (n = 3)

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>PNP-G</b>	<b>SD</b>	<b>PNP-S</b>	<b>SD</b>
45966	10 $\mu\text{M}$	<b>343</b>	15	<b>115</b>	36
	175 $\mu\text{M}$	<b>337</b>	50	<b>133</b>	53
	350 $\mu\text{M}$	<b>233</b>	19	<b>161 *</b>	12
47110	10 $\mu\text{M}$	<b>359</b>	70	<b>107</b>	28
	175 $\mu\text{M}$	<b>303</b>	13	<b>109</b>	40
	350 $\mu\text{M}$	<b>273</b>	45	<b>122</b>	15
53876	10 $\mu\text{M}$	<b>470</b>	7	<b>172 *</b>	26
	40 $\mu\text{M}$	<b>520 *</b>	13	<b>152</b>	84
	75 $\mu\text{M}$	<b>233</b>	80	<b>65</b>	24
111995	1 $\mu\text{M}$	<b>395</b>	9	<b>175 *</b>	23
	10 $\mu\text{M}$	<b>459</b>	33	<b>138</b>	64
	25 $\mu\text{M}$	<b>266</b>	84	<b>74</b>	16
135252	10 $\mu\text{M}$	<b>450</b>	63	<b>186 *</b>	37
	450 $\mu\text{M}$	<b>578 *</b>	46	<b>134</b>	46
	900 $\mu\text{M}$	<b>520 *</b>	62	<b>108</b>	15
409499	1 $\mu\text{M}$	<b>304</b>	85	<b>129</b>	55



<b>Substanz</b>	<b>Konz. [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>PNP-G</b>	<b>SD</b>	<b>PNP-S</b>	<b>SD</b>
418585	5 $\mu\text{M}$	<b>481</b>	90	<b>142</b>	52
	10 $\mu\text{M}$	<b>530 *</b>	5	<b>128</b>	67
	10 $\mu\text{M}$	<b>409</b>	62	<b>149</b>	27
	20 $\mu\text{M}$	<b>491</b>	67	<b>143</b>	45
	40 $\mu\text{M}$	<b>246</b>	25	<b>101</b>	9
448698	10 $\mu\text{M}$	<b>330</b>	26	<b>108</b>	26
	20 $\mu\text{M}$	<b>538 *</b>	52	<b>157</b>	50
	40 $\mu\text{M}$	<b>27 *</b>	6	<b>18 *</b>	7
201640	10 $\mu\text{M}$	<b>364</b>	84	<b>86</b>	9
	40 $\mu\text{M}$	<b>461</b>	65	<b>123</b>	38
	75 $\mu\text{M}$	<b>636 *</b>	151	<b>160</b>	54
208075	10 $\mu\text{M}$	<b>375</b>	23	<b>115</b>	9
	650 $\mu\text{M}$	<b>375</b>	32	<b>125</b>	34
	1300 $\mu\text{M}$	<b>518 *</b>	61	<b>123</b>	33
208791	10 $\mu\text{M}$	<b>335</b>	15	<b>87</b>	16
	450 $\mu\text{M}$	<b>464</b>	67	<b>92</b>	38
	900 $\mu\text{M}$	<b>533</b>	163	<b>104</b>	34
223651	10 $\mu\text{M}$	<b>410</b>	11	<b>97</b>	21
	40 $\mu\text{M}$	<b>482</b>	90	<b>101</b>	48
	75 $\mu\text{M}$	<b>534 *</b>	124	<b>134</b>	58
411693	10 $\mu\text{M}$	<b>373</b>	51	<b>83</b>	18
	450 $\mu\text{M}$	<b>503</b>	108	<b>84</b>	25
	900 $\mu\text{M}$	<b>612 *</b>	195	<b>71</b>	21
420627	10 $\mu\text{M}$	<b>340</b>	68	<b>77</b>	17
	75 $\mu\text{M}$	<b>546 *</b>	131	<b>160 *</b>	73
	150 $\mu\text{M}$	<b>720 *</b>	225	<b>110</b>	18
433220	1 $\mu\text{M}$	<b>315</b>	78	<b>72</b>	15
	5 $\mu\text{M}$	<b>580 *</b>	94	<b>129</b>	55
	9 $\mu\text{M}$	<b>560 *</b>	186	<b>118</b>	54
466506	1 $\mu\text{M}$	<b>694 *</b>	94	<b>128</b>	11
	10 $\mu\text{M}$	<b>482</b>	24	<b>115</b>	16
	30 $\mu\text{M}$	<b>481</b>	47	<b>111</b>	12

\* signifikant  $p \leq 0,01$

### 8.13 ACOX-Aktivität in Rattenhepatozyten

ACOX-Aktivität in Homogenaten von Rattenhepatozyten nach 72-stündiger Inkubation mit Modellinduktoren oder ausgewählten Knoll-Substanzen.

Tabelle 34: ACOX-Aktivitäten [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] in Rattenhepatozyten (n = 3)

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>Aktivität</b>	<b>SD</b>	<b>rel. DMSO</b>
DMSO	0,5%	<b>1,2</b>	0,4	1,0
DEHP	1000	<b>3,4</b>	1,5	2,9
DHEA	100	<b>1,4</b>	0,2	1,2
CLO	500	<b>5,8</b>	2,2	5,0
CIPRO	250	<b>10,7</b>	2,7	9,2
201640	40	<b>4,2</b>	2,4	3,6
	75	<b>2,7</b>	0,8	2,3
409499	5	<b>1,2</b>	0,1	1,0
	10	<b>1,3</b>	0,8	1,1
418585	20	<b>1,2</b>	0,3	1,0
	40	<b>0,3</b>	0,2	0,3
420627	75	<b>1,6</b>	0,2	1,4
	150	<b>1,6</b>	0,3	1,4
208075	650	<b>1,2</b>	0,5	1,0

\* signifikant  $p \leq 0,01$

## 8.14 CAT-Aktivität in Rattenhepatozyten

CAT-Aktivität in Homogenaten von Rattenhepatozyten nach 72-stündiger Inkubation mit Modellinduktoren oder ausgewählten Knoll-Substanzen.

Tabelle 35: CAT-Aktivitäten [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] in Rattenhepatozyten (n = 4)

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>Aktivität</b>	<b>SD</b>	<b>rel. DMSO</b>
DMSO	0,5%	<b>1,6</b>	0,2	1,0
DEHP	1000	<b>3,8 *</b>	1,1	2,4
DHEA	100	<b>3,2</b>	1,6	2,0
CLO	500	<b>7,7 *</b>	1,0	4,8
CIPRO	250	<b>11,1 *</b>	0,7	7,0
201640	40	<b>2,8 *</b>	0,6	1,8
	75	<b>3,5 *</b>	1,1	2,2
409499	5	<b>0,7</b>	0,2	0,5
	10	<b>0,8</b>	0,2	0,5
418585	20	<b>3,2 *</b>	0,5	2,0
	40	<b>1,1</b>	0,3	0,7
420627	75	<b>1,0</b>	0,4	0,6
	150	<b>0,9</b>	0,3	0,6
208075	650	<b>2,1</b>	0,6	1,3

\* signifikant  $p \leq 0,01$

## 8.15 Katalase-Aktivität in Rattenhepatozyten

Katalase-Aktivität in Homogenaten von Rattenhepatozyten nach 72-stündiger Inkubation mit Modellinduktoren oder ausgewählten Knoll-Substanzen.

Tabelle 36: Katalase-Aktivitäten [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ] in Rattenhepatozyten (n = 2)

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>Aktivität</b>	<b>SD</b>	<b>rel. DMSO</b>
DMSO	0,5%	<b>398</b>	97,7	1,0
DEHP	1000	<b>441</b>	170,5	1,1
DHEA	100	<b>386</b>	134,0	1,0
CLO	500	<b>510</b>	94,5	1,3
CIPRO	250	<b>912 *</b>	73,8	2,3
201640	40	<b>437</b>	86,9	1,1
	75	<b>625 *</b>	23,9	1,6
409499	5	<b>358</b>	56,8	0,9
	10	<b>389</b>	85,5	1,0
418585	20	<b>409</b>	53,9	1,0
	40	<b>700 *</b>	181,3	1,8
420627	75	<b>390</b>	32,0	1,0
	150	<b>435</b>	98,5	1,1
208075	650	<b>417</b>	79,2	1,0

\* signifikant  $p \leq 0,01$

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Im besonderen bei:

Meinen Arbeitskollegen Frau Dr. Lioudmila Tonkonog, Frau Silke Tengler, Herrn Jürgen Beigel, Herrn Manuel Ammerschläger und insbesondere Frau Margret Kling für die anregenden Diskussionen und die sehr gute Zusammenarbeit im Labor.

Meinen Chefs Herrn Dr. Günter Blaich und Herrn Dr. Stefan Otto Müller für die gute Betreuung und Unterstützung.

Meinen Eltern, die mich unterstützten und mir das Studium ermöglichten.

Meiner Frau Sandra für ihre geduldige Unterstützung, insbesondere während der Endphase dieser Arbeit.

Meinem Sohn Alexander für die Ablenkung während dem Zusammenschreiben.

## Lebenslauf

**Name:** Kai-Uwe Klein

**Geboren am:** 14. Juli 1973

**Geburtsort:** Kaiserslautern

**Nationalität:** deutsch

**Familienstand:** verheiratet, 1 Kind (Alexander, 17.12.2001)

**Schulbildung:** 1979-1983 Paul-Münch-Grundschule

1983-1992 Burggymnasium

Juni 1992 allgemeine Hochschulreife

**Studium:** 1992 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität  
Kaiserslautern

März 1995 staatliche Vorprüfung

März 1997 1. Staatsprüfung

Juni 1997 Anfertigung der Diplomarbeit im Arbeitskreis von  
Prof. Dr. G. Eisenbrand unter Leitung von Prof. Dr.  
W. Tang

November 1998 Beginn der Doktorarbeit in der Abteilung  
Toxikologie der Knoll AG, Ludwigshafen unter  
Leitung von Dr. G. Blaich und Betreuung von Prof.  
Dr. Dr. D. Schrenk