
**Untersuchungen zur metabolischen Aktivierung
ausgewählter Proteratogene in zellulären
Leber-*in vitro*-Systemen der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Chemie der Technischen Universität Dortmund
von Dipl.-Lebensmittelchemikerin
Anne Bergner

Dortmund, 2013

Tag der Disputation: 22. Juli 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Jan G. Hengstler, Technische Universität Dortmund

2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas K. Nüssler, Eberhard-Karls Universität Tübingen

Gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	V
1 Einleitung	1
1.1 Alternativmethoden zum Tierversuch	1
1.2 Alternativmethoden zur Prüfung auf Embryotoxizität	3
1.2.1 Embryonaler Stammzelltest.....	4
1.2.2 Whole Embryo Culture	6
1.3 Biotransformation	9
1.3.1 Biotransformationssysteme <i>in vitro</i>	14
1.3.1.1 Leberschnitte	14
1.3.1.2 Primäre Hepatozyten.....	16
1.3.1.3 Permanente Zelllinien.....	17
1.3.1.4 Subzelluläre Fraktionen.....	17
1.4 Testsubstanzen	18
1.4.1 Cyclophosphamid	18
1.4.2 Albendazol.....	21
1.4.3 Valpromid.....	24
1.4.4 2-Acetylamino-fluoren.....	26
2 Aufgabenstellung	28
3 Material	30
3.1 Referenzsubstanzen	30
3.2 Chemikalien	31
3.3 Pufferlösungen	33
3.4 Geräte	35
3.5 Verbrauchsmaterial	36
3.6 Zellsysteme	36
3.6.1 Hepatozyten und Leberschnitte der Ratte	36
3.6.2 3T3-Fibroblasten	38
4 Methoden	39
4.1 Präparation zellulärer <i>in vitro</i>-Metabolismussysteme	39
4.1.1 Primäre Rattenhepatozyten.....	39
4.1.1.1 Kultivierung.....	40
4.1.2 Leberschnitte der Ratte	41
4.1.2.1 Kultivierung.....	41
4.1.2.2 Isolierung der mikrosomalen Fraktion	41
4.1.2.3 Proteinbestimmung.....	42
4.2 Charakterisierung zellulärer <i>in vitro</i>-Metabolismussysteme	42

4.2.1	Zytotoxizitätstest in primären Rattenhepatozyten	42
4.2.1.1	Zytotoxizität der Testsubstanzen in Rattenhepatozyten	43
4.2.1.2	Einfluss veränderter Kulturbedingungen auf die Vitalität der Rattenhepatozyten.....	44
4.2.2	Bestimmung der enzymatischen Aktivität.....	44
4.2.2.1	Alkoxyresorufin-O-Dealkylase-Aktivitäten	44
4.2.2.1.1	Primäre Rattenhepatozyten.....	44
4.2.2.1.2	Leberschnitte der Ratte	47
4.2.2.2	Testosteron-Metabolismus	48
4.2.2.2.1	Primäre Rattenhepatozyten.....	50
4.2.2.2.2	Leberschnitte der Ratte	51
4.2.3	Untersuchung ausgewählter CYP-Enzyme mittels RT-PCR und Western Blot in primären Rattenhepatozyten	51
4.2.3.1	Zelllysate für die RT-PCR.....	51
4.2.3.2	Zelllysate für den Western Blot	51
4.2.4	Analytische Untersuchungen der Inkubate aus den Biotransformationssystemen	52
4.2.4.1	Quantitative Analyse der Proteratogene und Teratogene.....	52
4.2.4.1.1	Cyclophosphamid	53
4.2.4.1.2	Albendazol und Albendazolsulfoxid.....	54
4.2.4.1.3	Valpromid und Valproinsäure	54
4.2.4.1.4	2- Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-2-Acetylaminofluoren	55
4.2.4.2	Strukturaufklärung entstandener Metaboliten	56
4.2.4.2.1	Cyclophosphamid	58
4.2.4.2.2	Albendazol.....	59
4.2.4.2.3	Valpromid	60
4.2.4.2.4	2-Acetylaminofluoren.....	61
4.3	Charakterisierung der 3T3-Fibroblasten-Kultur	63
4.3.1	Kultivierung.....	63
4.3.2	Untersuchung fremdstoffmetabolisierender Aktivität.....	63
4.3.2.1	Alkoxyresorufin-O-Dealkylase-Aktivitäten	63
4.3.2.2	Untersuchung ausgewählter CYP-Enzyme mittels RT-PCR und Western Blot.....	64
4.3.3	Untersuchung der Proteratogene und Teratogene im 3T3-Zytotoxizitätstest	65
4.4	Prüfung von <i>in vitro</i>-Metabolismusinkubaten im EST und der WEC	66
4.4.1	Methodenentwicklung.....	66
4.4.1.1	3T3-Fibroblasten	66
4.4.1.2	ESZ-D3.....	68
4.4.1.3	WEC	68
4.4.2	Zytotoxizitätstest in 3T3-Fibroblasten.....	69
4.4.2.1	Quantitative Analyse der Proteratogene und Teratogene.....	71
4.4.3	Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest in ESZ-D3	71
4.4.4	WEC	73
5	Ergebnisse	75
5.1	Charakterisierung zellulärer <i>in vitro</i>-Metabolismussysteme der Ratte....	75
5.1.1	Zytotoxizität der Testsubstanzen in Rattenhepatozyten	75
5.1.2	Einfluss veränderter Kulturbedingungen auf die Vitalität der Rattenhepatozyten.....	76
5.1.3	Enzymatische Aktivität.....	77
5.1.3.1	AROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten	77
5.1.3.2	AROD-Aktivitäten in Leberschnitten der Ratte	80
5.1.3.3	Testosteron-Metabolismus in Rattenhepatozyten	82
5.1.3.4	Testosteron-Metabolismus in Leberschnitten der Ratte.....	84
5.1.4	Expression ausgewählter CYP-Enzyme in Rattenhepatozyten	86
5.1.4.1	RT-PCR	86
5.1.4.2	Western Blot	87
5.1.5	Quantitative Analyse der Proteratogene und Teratogene.....	88

5.1.5.1	Cyclophosphamid	88
5.1.5.2	Albendazol und Albendazolsulfoxid.....	90
5.1.5.3	Valpromid und Valproinsäure	92
5.1.5.4	2-Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-2-Acetylaminofluoren	94
5.1.6	Strukturaufklärung entstandener Metabolite	96
5.1.6.1	Cyclophosphamid	97
5.1.6.2	Albendazol.....	103
5.1.6.3	Valpromid.....	114
5.1.6.4	2-Acetylaminofluoren.....	121
5.2	Charakterisierung der 3T3-Fibroblasten-Kultur	132
5.2.1	Fremdstoffmetabolisierende Aktivität	132
5.2.1.1	AROD-Aktivitäten	132
5.2.1.2	Untersuchung ausgewählter CYP-Enzyme mittels RT-PCR und Western Blot.....	132
5.2.2	Untersuchung der Proteratogene und Teratogene im 3T3-Zytotoxizitätstest	133
5.3	Überführung von <i>in vitro</i>-Metabolismusinkubaten in den EST und die WEC	136
5.3.1	Prüfung von <i>in vitro</i> -Metabolismusinkubaten in 3T3-Fibroblasten	136
5.3.1.1	Toleranz gegenüber Hepatozyteninkubaten von Ratte, Schwein und Mensch.....	136
5.3.1.2	Toleranz gegenüber Leberschnittinkubaten	139
5.3.2	Cyclophosphamid	140
5.3.2.1	EST: 3T3-Fibroblasten	140
5.3.2.2	EST: ESZ-D3.....	145
5.3.2.3	WEC	147
5.3.2.4	Übersicht der Ergebnisse aus den CPA-Inkubatüberführungen	149
5.3.3	Albendazol.....	150
5.3.3.1	EST: 3T3-Fibroblasten	150
5.3.3.2	EST: ESZ-D3.....	156
5.3.3.3	WEC	158
5.3.3.4	Übersicht der Ergebnisse aus den ABZ-Inkubatüberführungen.....	159
5.3.4	Valpromid.....	161
5.3.4.1	EST: 3T3-Fibroblasten	161
5.3.4.2	Übersicht der Ergebnisse aus den VPD-Inkubatüberführungen	165
5.3.5	2-Acetylaminofluoren.....	166
5.3.5.1	EST: 3T3-Fibroblasten	166
5.3.5.2	Übersicht der Ergebnisse aus den 2-AAF-Inkubatüberführungen	169
6	Diskussion	170
6.1	Primäre Hepatozyten und Leberschnitte der Ratte als <i>in vitro</i>-Metabolismussysteme für den EST und die WEC.....	170
6.1.1	Vitalität.....	171
6.1.2	Enzymaktivitäten	172
6.1.2.1	Rattenhepatozyten	172
6.1.2.2	Schweine- und Humanhepatozyten	178
6.1.2.3	Leberschnitte der Ratte	179
6.1.3	Metabolismus der Proteratogene und Teratogene	182
6.1.3.1	Cyclophosphamid.....	182
6.1.3.2	Albendazol und Albendazolsulfoxid.....	185
6.1.3.3	Valpromid und Valproinsäure	188
6.1.3.4	2-Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-2-Acetylaminofluoren	190
6.2	Untersuchung der Proteratogene und Teratogene im 3T3-Zytotoxizitätstest	194

6.3	Überführung von <i>in vitro</i>-Metabolismusinkubaten in den EST und die WEC	198
6.3.1	Cyclophosphamid	199
6.3.2	Albendazol	202
6.3.3	Valpromid.....	204
6.3.4	2-Acetylamino-fluoren.....	205
7	Fazit und Ausblick.....	208
8	Abkürzungsverzeichnis	210
9	Abbildungsverzeichnis	212
10	Tabellenverzeichnis	214
11	Literaturverzeichnis	217
12	Anhang.....	238
12.1	Charakterisierung zellulärer Biotransformationssysteme	238
12.1.1	Testosteron-Metabolismus	238
12.1.1.1	Primäre Rattenhepatozyten.....	239
12.1.1.2	Primäre Schweinehepatozyten.....	240
12.1.1.3	Primäre Humanhepatozyten.....	242
12.1.2	Zytotoxizität von 2-AAF in Rattenleberschnitten	244
12.1.3	Strukturaufklärung	246
12.1.3.1	Cyclophosphamid	246
12.1.3.2	Albendazol	265
12.1.3.3	Valpromid.....	288
12.1.3.4	2-Acetylamino-fluoren.....	309
12.2	Untersuchung der Proteratogene und Teratogene im 3T3- Zytotoxizitätstest	329
	
	Wissenschaftliche Publikationen & Kongressbeiträge.....	332
	Eidesstattliche Erklärung	335
	Danksagung.....	336

Zusammenfassung

Die *in vitro*-Embryotoxizitätstests EST und WEC sind aufgrund mangelnder fremdstoffmetabolisierender Aktivität nicht in der Lage, Substanzen, welche nach metabolischer Aktivierung embryotoxisch wirken (sog. Proteratogene), zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Anwendung zellulärer Leber-*in vitro*-Systeme der Ratte zur metabolischen Aktivierung ausgewählter Proteratogene untersucht, um diese in einer Präinkubationsmethode mit dem 3T3-Fibroblasten-Zytotoxizitätstest, welcher Bestandteil des EST ist, zu kombinieren. Die Arbeit stellt ein Teilprojekt des BMBF-geförderten Vorhabens „Entwicklung eines Biotransformationssystems für die metabolische Aktivierung von validierten *in vitro*-Systemen zur Prüfung auf Embryotoxizität“ dar. Die Bearbeitung des Projektes erfolgte mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin und der Charité-Universitätsmedizin in Berlin, wo die Embryotoxizitätspunkte bearbeitet wurden sowie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und der Technischen Universität München, wo Schweine- und Humanhepatozyten eingesetzt und für PCR- und Western Blot-Analysen durchgeführt wurden.

Zu Beginn des Projekts werden die Kulturbedingungen der Rattenhepatozyten für die Überführung der Inkubate in die Zielkulturen optimiert und anhand des Umsatzes ausgewählter Alkoxyresorufinderivate und des Modellsubstrats Testosteron charakterisiert. Die fremdstoffmetabolisierende Aktivität von Rattenhepatozyten, welche unter den gewählten Standardbedingungen im Laufe der Kulturperiode abnimmt, kann durch die Inkubation mit einem Induktionscocktail, bestehend aus 10 µM β-Naphtoflavon, 100 µM Phenobarbital und 0,1 µM Dexamethason, für 24 Stunden im Vergleich zu basalen Kulturbedingungen gesteigert werden. Im Hinblick auf eine Inkubatüberführung in den EST wird eine Postinkubationsperiode von weiteren 24 Stunden unter Standardmediumbedingungen durchgeführt. Die EROD-, PROD- und BROD-Aktivität beträgt in diesem Studienaufbau nach 48 Stunden $96,3 \pm 33,4$, $1,5 \pm 0,8$ und $6,3 \pm 0,8$ pmol/min/10⁶ Zellen. Eine Serum-Puffer-Mischung (WEC-Medium), welche in der Postinkubationsperiode eingesetzt und in die WEC überführt wird, führt nach 48 Stunden zu EROD- PROD- und BROD-Aktivitäten von $35,4 \pm 2,5$, $0,6 \pm 0,3$ und $2,0 \pm 0,4$ pmol/min/10⁶ Zellen. Die Induktion von CYP1A1 und 2B1/2 wird im Vergleich zu den gewählten Standardbedingungen anhand von Western Blot-Analysen nachgewiesen. Das Metabolitenprofil von Testosteron, welches nach Inkubation von 200 µM innerhalb der 24 Stunden-Postinkubationsperiode aufgenommen wird, lässt auf eine hohe Aktivität der UGT schließen, da Testosteron und

seine Oxidationsprodukte, im Wesentlichen 6 β -, 16 α - und 2 α -OHT konjugiert vorliegen. In Schweine- und Humanhepatozyten werden 6 β -OHT und Androstendion als Hauptmetaboliten identifiziert. Der Anteil konjugierter Metaboliten beträgt in diesen Spezies ca. 45 %. In Rattenleberschnitten, welche ebenfalls als zelluläres *in vitro*-Metabolismussystem herangezogen werden, führt eine Induktion von 6 Stunden mit dem zuvor beschriebenen Induktionscocktail und eine Postinduktionsperiode von weiteren 24 Stunden zu einer EROD- und BROD-Aktivität von $20,4 \pm 9,1$ und $1,6 \pm 1,4$ pmol/min/mg Protein. Die PROD-Aktivität liegt unterhalb der Nachweisgrenze der Methode. Das Metabolitenprofil von Testosteron induzierter Leberschnitte ist mit dem der basalen Kultur vergleichbar. Hauptmetaboliten sind 6 β -, 16 α -, 2 α -OHT und deren Konjugate sowie Androstendion.

Im Rahmen der Methodenentwicklung zur Kombination der Biotransformationssysteme mit dem 3T3-Zytotoxizitätstest zeigt sich unter Zumischung frischen Mediums, dass Inkubateile von 50 % (v/v) aus Rattenhepatozyten und Leberschnitten, 25 % (v/v) aus Schweinehepatozyten und 100 % (v/v) aus Humanhepatozyten die Vitalität der 3T3-Zellen nicht beeinflussen. Im D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest können 40 % (v/v) Rattenhepatozyteninkubate eingesetzt werden. Das in Rattenhepatozyten eingesetzte WEC-Medium verursacht bis zu einem Anteil von 92,5 % (v/v) in der WEC keine Entwicklungsstörungen der Embryonen.

Die Anwendung der entwickelten Methode erfolgt mit den vier Modellsubstanzen CPA, ABZ, VPD und 2-AAF sowie deren im Projekt definierten Metaboliten, Acr, ABZSO, VPA und NOH-AAF. Um den Effekt einer metabolischen Aktivierung abschätzen zu können, wird die Umsetzung der Substrate und die Bildung der definierten Metaboliten quantitativ erfasst. Darüber hinaus werden Strukturaufklärungsanalysen mittels Q-TOF LC-MS durchgeführt. CPA (0,1 und 1 mM) wird von induzierten Rattenhepatozyten innerhalb von 24 Stunden zu 50 % umgesetzt. Acr konnte weder quantitativ noch in den massenspektrometrischen Analysen nachgewiesen werden. Der neben Acr zytotoxische CPA-Metabolit Phosphoramid Mustard wird anhand der Strukturaufklärungsanalysen qualitativ nachgewiesen. ABZ (10 und 25 μ M) wird unter den gewählten Bedingungen vollständig umgesetzt. ABZSO kann als Hauptmetabolit (60 bis 70 %) identifiziert werden. Der Umsatz von VPD (1 und 4 mM) beträgt ca. 30 %. VPA wird in den für die Überführung vorgesehenen Inkubaten quantitativ nicht erfasst.

2-AAF (10 und 100 μ M) wird in Rattenhepatozyten und Leberschnitten vollständig umgesetzt. Der aktive Metabolit NOH-AAF wird in den Inkubaten nicht nachgewiesen.

Im 3T3-Zytotoxizitätstest werden die Testsubstanzen einzeln und in Mischungen mit den definierten Metaboliten über sieben Tage inkubiert. Die Mischungen dienen der Abschätzung des Umsatzes und der Bildung des definierten aktiven Metaboliten, welche zum Nachweis einer metabolischen Aktivierung notwendig sind. Die IC_{50} -Werte von CPA und Acr betragen ca. 1,5 mM und 2 μ M. Die Prüfung von 0,1 mM CPA-Inkubaten aus induzierten Rattenhepatozyten führt unter den gewählten Überführungsbedingungen zu einer Abnahme des IC_{50} -Wertes um den Faktor 132 im Vergleich zu reinem CPA. Die Inkubate aus induzierten Schweine- und Humanhepatozyten führen zu einem um den Faktor 532 bzw. 8 niedrigeren IC_{50} -Wert. Die metabolische Aktivierung von CPA kann ebenfalls im D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest und in der WEC mit Inkubaten aus Rattenhepatozyten gezeigt werden. Diese Beobachtung wird auf den Nachweis von Phosphoramid Mustard in den Rattenhepatozyteninkubaten zurückgeführt.

Der IC_{50} -Werte von ABZ und ABZSO betragen ca. 0,6 μ M und 13 μ M. ABZ wird somit *in vitro* metabolisch zu ABZSO deaktiviert. Dieser Effekt kann durch die Präinkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten sowohl in den Zielkulturen des EST als auch der WEC nachgewiesen werden. Darüber hinaus führt die Prüfung der generierten ABZ-Inkubate aus primären Schweine- und Humanhepatozyten zu einer Erniedrigung der Zytotoxizität in 3T3-Zellen. Ein IC_{50} -Wert in 3T3-Zellen kann aus den Hepatozyteninkubaten nicht ermittelt werden, da die vorliegenden ABZSO-Konzentrationen unter den gewählten Überführungsbedingungen keine Zytotoxizität induzieren.

Ein IC_{50} -Wert für VPD kann unter den gewählten Bedingungen nicht ermittelt werden. Der IC_{50} -Wert von VPA beträgt ca. 1,7 mM. Die Überführung der Hepatozyteninkubate führt nicht zum Nachweis einer metabolischen Aktivierung von VPD. Das Ergebnis korreliert mit dem fehlenden quantitativen Nachweis von VPA in den für die Überführung ausgewählten Inkubaten.

Die IC_{50} -Werte von 2-AAF und NOH-AAF betragen ca. 77 μ M und 10 μ M. Eine metabolische Aktivierung von 2-AAF kann im Rahmen der eingesetzten Methode nicht nachgewiesen werden. Das Ergebnis korreliert mit dem fehlenden Nachweis des aktiven Metaboliten NOH-AAF in den Hepatozyten- und Leberschnittinkubaten.

Zusammenfassend kann abgeleitet werden, dass basierend auf der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode die Kombination zellulärer *in vitro*-Biotransformationssysteme der Ratte sowie Schweine- und Humanhepatozyten mit dem 3T3-Zytotoxizitätstest möglich ist. Darüber hinaus können Inkubate aus induzierten Rattenhepatozyten in die WEC und in den D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest des

EST eingesetzt werden. Ein geringer Testsubstanzumsatz, das metabolische Profil und/oder die Instabilität aktiver Metaboliten stellen kritische Parameter dar, welche der Standardisierung der Methode entgegen stehen. Bei Anwendungen im Rahmen von Einzelfall-Prüfungen werden analytische Untersuchungen zum metabolischen Profil und der Stabilität gebildeter Metaboliten empfohlen und für die Bewertung erhaltener Daten als essentiell bewertet.

Summary

The murine embryonic stem cell test (EST) and the whole embryo culture (WEC) represent two ECVAM-validated *in vitro* embryotoxicity tests, which are unable to detect proteratogenic compounds due to their insufficient xenobiotic-metabolising enzyme activities. Within the framework of this thesis, the application of primary rat hepatocytes and liver slices to metabolically activate proteratogenic substances was investigated. The integration of metabolic activity into the 3T3 viability assay as a part of the EST was accomplished by a preincubation step of the test compounds in the *in vitro* biotransformation systems followed by the transfer of the obtained supernatant. This thesis is a part of the BMBF-funded project “Development of a biotransformation system for the metabolic activation of two *in vitro* embryotoxicity test systems”.

In a first step, the culture conditions of primary rat hepatocytes were optimised for the transfer of supernatants into the 3T3 viability assay. The metabolic activity of the cells was evaluated by the turnover of three alkoxyresorufine derivatives (ethyl-, pentyl- and benzyloxyresorufine) and the model substrate testosterone. Enzyme activity was optimised by incubation of an induction cocktail containing 10 μM β -naphthoflavone, 100 μM phenobarbital and 0.1 μM dexamethasone for 24 hours. The medium of the induction period was replaced by fresh medium, incubated for further 24 hours. The post-induction period was used for substance incubation and transfer of the supernatant into the target culture during method development. Under the conditions described, the EROD-, PROD- and BROD-activities were 96.3 ± 33.4 , 1.5 ± 0.8 and 6.3 ± 0.8 pmol/min/ 10^6 cells after 48 hours. Incubation of a serum buffer mixture (92.5 / 7.5, v/v), required for the transfer into the WEC and hereafter referred to as “WEC medium”, during the post-induction period revealed an EROD-, PROD- and BROD-activity of 35.4 ± 2.5 , 0.6 ± 0.3 and 2.0 ± 0.4 pmol/min/ 10^6 cells. The metabolic profile of testosterone (200 μM), which was incubated during the post-induction period, revealed a high conjugation activity as all oxidised metabolites, specifically 6β -, 16α - and 2α -OHT were conjugated with glucuronic acid and/or sulphate.

Precision-cut slices from rat liver, used as an alternative *in vitro* biotransformation system, were incubated with the induction cocktail for 6 hours. After a 24 hour post-induction period the EROD- and BROD-activities were 20.4 ± 9.1 and 1.6 ± 1.4 pmol/min/mg protein. PROD-activity was below limit of quantification (0.9 pmol resorufine). There was no difference between the metabolic profile of testosterone in liver slices treated with or without the

induction cocktail. The main metabolites were 6 β -, 16 α - and 2 α -OHT and their conjugated forms as well as androstenedione.

During method development for integrating the biotransformation system into the 3T3 viability assay, it was shown that 50 % (v/v) of the supernatant from rat hepatocytes and liver slices after a 24 hour culture period did not decrease the viability of the 3T3 cells compared to control, when mixed with fresh medium. 40 % (v/v) of the rat hepatocyte supernatant could be transferred into the differentiation and viability assay in embryonic stem cells (ES-D3). No developmental impairment was observed when 92.5 % (v/v) of WEC medium, incubated in rat hepatocytes for 24 hours was used in the WEC.

Within a proof of concept approach cyclophosphamide (CPA), albendazole (ABZ), valpromide (VPD) and 2-acetylaminofluorene (2-AAF) and their defined metabolites acrolein (Acr), albendazole sulfoxide (ABZSO), valproic acid (VPA) and N-hydroxy-2-acetylaminofluorene (NOH-AAF) were used as model compounds.

Initially, the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of the test substances were evaluated in the 3T3 viability assay. Defined mixtures of the corresponding proteratogenic and teratogenic compound were used to investigate the turnover required for the detection of a metabolic activation within the viability assay. The IC₅₀ values of CPA and Acr were about 1.5 mM and 2 μ M. Under the selected conditions, the transfer of CPA supernatants from primary rat hepatocytes revealed a decrease of the IC₅₀ value of CPA by a factor of 132 compared to CPA. The embryotoxic potential of CPA was also shown in the differentiation and viability assay in ES-D3 cells, as well as in the WEC after incubation in the induced rat hepatocyte culture. These observations were associated with the analytically detected Phosphoramidate mustard.

ABZ was metabolically detoxified *in vitro* as the IC₅₀ value of ABZSO was higher than that of ABZ (13 μ M and 0.6 μ M, respectively). This result was confirmed in all target cultures after the transfer of supernatants from rat hepatocytes. Under the test conditions, no IC₅₀ value could be determined, as the concentration of ABZSO was too low to induce cytotoxicity.

No IC₅₀ value for VPD could be evaluated in the 3T3 viability assay due to limited solubility of the test substance in the culture medium. The IC₅₀ value of VPA was about 1.7 mM.

There was no evidence for a metabolic activation of VPD by rat hepatocytes as the concentration-response curves of VPD and metabolically activated VPD overlapped. This result was in accordance to the absence of VPA in supernatants of rat hepatocytes as analytically determined.

The IC₅₀ values of 2-AAF and NOH-AAF were about 77 µM and 10 µM. No decrease of 3T3 viability compared to control was observed after transfer of 2-AAF supernatants, which is in accordance to the absence of the teratogenic metabolite NOH-AAF in the supernatant of rat hepatocytes and liver slices as analytically determined.

In conclusion, based on the method developed within the present work, cellular *in vitro* biotransformation systems from rat liver were successfully coupled with the EST and the WEC. However, its use as a standard method is limited by low turnover of substrates, profile of formed metabolites as well as instability of the active metabolites in the culture medium. Within the scope of individual applications of the developed method, analytical examinations of metabolic profiles and stability of formed metabolites are strictly recommended and are assessed as essential for the evaluation of the overall result.

1 Einleitung

1.1 Alternativmethoden zum Tierversuch

Die moderne und globalisierte Welt eröffnet Möglichkeiten der Nutzung immer neuer Materialien und Substanzen für den alltäglichen Gebrauch. Dem gegenüber steht der Wunsch nach einem minimalen gesundheitlichen und ökologischen Risiko. Dieses zu bewerten bedarf zahlreicher Untersuchungen, darunter Tierversuche. In den 25 Mitgliedstaaten der EU wurden 2005 12,1 Millionen Tiere für wissenschaftliche Zwecke verwendet. 51 % davon für die Untersuchung von Arzneimitteln und Medizinprodukten und 19 % für toxikologische Prüfungen von Chemikalien und Pflanzenschutzmitteln. Im Rahmen des europäischen Chemikaliengesetzes, welches die Registrierung, Evaluierung und Zulassung von Chemikalien in Abhängigkeit der Herstellungsmenge vorsieht (REACH), wird die Zahl der dafür zusätzlich benötigten Versuchstiere zwischen 9 und 54 Millionen geschätzt (Liebsch *et al.* 2011). Um die hohen Versuchstierzahlen zu reduzieren, beinhaltet dieses Gesetz außerdem die Forderung nach einer Anwendung von verfügbaren validierten Alternativmethoden zum Tierversuch. Dies ist nicht zuletzt auf das „3 R-Prinzip“ von Russel und Burch von 1959 zurückzuführen (Russel und Burch 1959). Es fasst die Durchführung von Alternativmethoden mit den Begriffen „Reduction, Replacement, Refinement“ zusammen. Nach diesen Leitlinien sollten Versuche so effizient wie möglich gestaltet werden, um die Anzahl der Tiere so weit wie möglich zu reduzieren (Reduction). Alternative Methoden mit nicht-empfindsamen Organismen können einen Tierversuch auch völlig ersetzen (Replacement). Sind diese beiden Maßnahmen nicht ausreichend verfügbar, sollte der Versuchsaufbau die Belastung der Tiere auf ein Minimum reduzieren (Refinement).

Die regulatorische Akzeptanz von Alternativmethoden erfordert deren Validierung. Dazu sind sowohl die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Labors und zwischen verschiedenen Laboren als auch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen, meist in Form von biostatistischen Methoden, notwendig. Zur Initiierung und Koordination der Entwicklung von Alternativmethoden wurde im Oktober 1991 das „European Centre for the Validation of Alternative Methods“ (ECVAM) gegründet. Es dient als zentrale

Kommunikationsstelle zwischen Gesetzgeber, Industrie, Wissenschaft, Verbraucherorganisationen und Tierschutzverbänden, mit dem Ziel, die Entwicklung und Validierung alternativer Methoden voranzutreiben und die regulatorische Akzeptanz dieser Methoden, auch international zu erhöhen. Ausgewählte Alternativmethoden, welche, basierend auf Validierungsstudien der ECVAM, in die Testrichtlinien der europäischen „Organisation for Economic Co-Operation and Development“ (OECD) aufgenommen wurden, sind in Tabelle 1.1 dargestellt. In Deutschland bildet die *Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch* (ZEBET), eine entsprechende nationale Einrichtung (Liebsch *et al.* 2011; Lilienblum 2008; Seiler *et al.* 2011).

Tabelle 1.1: Übersicht regulatorisch anerkannter Alternativmethoden

OECD- Testrichtlinie	Alternativmethode
428	Dermale Resorption
439	Skin Irritation: Reconstructed Human <i>Epidermis</i> Test
431	Skin Corrosion: Human Skin Model Test
435	Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion
437	Bovine Corneal Opacity and Permeability Test (BCOP)
438	Isolated Chicken Eye Test (ICE)
429	Local Lymph Node Assay
471	Bacterial Reverse Mutation Test (Ames-Test)
473	Mammalian Chromosome Aberration Test

mod. nach (Lilienblum 2008; Seiler *et al.* 2011)

Alternativmethoden werden auch als Screeningverfahren in der Entwicklung von Arzneimitteln, Kosmetika und Pflanzenschutzmitteln eingesetzt. Sie erlauben zu einem frühen Zeitpunkt Aussagen über unerwünschte Eigenschaften und führen zu einer Reduktion des zeitlichen und finanziellen Aufwands, da sie vergleichsweise schnell durchzuführen und kostengünstiger als ein Tierversuch sind und weniger Testsubstanz benötigen.

Die Entwicklung von Alternativmethoden zur Reproduktionstoxizität stellt eine besondere Herausforderung dar, da es sich bei dieser Art der Toxizität um einen hochkomplexen Zyklus mit einer Vielzahl von Beeinträchtigungs- und Schädigungsmöglichkeiten handelt (vgl. Abbildung 1.1). Die Abbildung dieses Prozesses innerhalb einer *in vitro*-Testmethode ist bisher nicht möglich. Aus diesem Grund werden Alternativmethoden entwickelt, welche

die einzelnen Prozesse abbilden und in einer Testbatterie kombiniert werden können. Einen Teilprozess bildet die Embryogenese, welche die Phase der Organogenese beinhaltet. Dieser Prozess ist besonders sensibel für embryotoxische und teratogene Substanzen, welche für Missbildungen und Embryolethalität verantwortlich sind (Spielmann 2005).

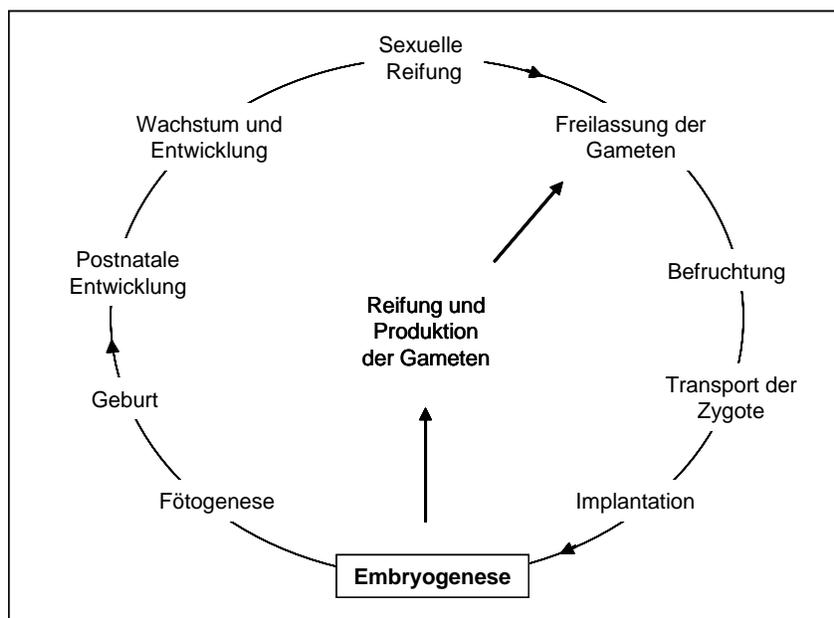


Abbildung 1.1: Reproduktionszyklus der Säugetiere

Dargestellt sind wesentliche Schritte des Reproduktionszyklus in Säugetieren (mod. nach (Spielmann 2005).

1.2 Alternativmethoden zur Prüfung auf Embryotoxizität

Um die Anzahl der Tierversuche für die Untersuchung adverser Effekte von Substanzen auf die Embryogenese zu reduzieren, sind in den letzten 30 Jahren große Anstrengungen in der Entwicklung von Alternativmethoden unternommen worden. Die dabei entwickelten Testsysteme beruhen auf Zelllinien, primären Zellkulturen und Kulturen ganzer Embryonen. Für die Testsysteme auf Basis der Zellkulturen sind keine oder nur sehr wenige Versuchstiere notwendig. Sie erfassen eine geringere Anzahl von Entwicklungsendpunkten im Vergleich zu Embryonenkulturen, welche jedoch auf Versuchstiere angewiesen sind. Voraussetzung für die regulatorische Akzeptanz dieser Alternativmethoden sind ein standardisiertes Testprotokoll, die Reproduzierbarkeit der Methode, die Untersuchung einer großen Auswahl embryotoxischer und nicht-embryotoxischer Substanzen, ein daraus

entwickeltes Prädiktionsmodell zur Differenzierung des embryotoxischen Potenzials sowie für die eingesetzten Validierungssubstanzen eine gute Korrelation mit Ergebnissen der *in vivo*-Prüfungen (Spielmann 2005).

1.2.1 Embryonaler Stammzelltest

Stammzellen besitzen die Eigenschaft der Selbsterneuerung, sodass sie im undifferenzierten Zustand kontinuierlich kultiviert werden können und je nach Zugabe oder Reduktion von spezifischen Wachstumsfaktoren in verschiedene Zelltypen ausdifferenzieren können. Auf der Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen der Linie D3 (ESZ-D3) zu schlagenden Kardiomyozyten beruht der von Spielmann 1997 entwickelte Embryonale Stammzelltest (EST) (Spielmann *et al.* 1997). Er basiert auf der Bewertung von drei toxikologischen Endpunkten: Die Inhibition der Differenzierung der ESZ zu Kardiomyozyten unter Einfluss einer Testsubstanz im Vergleich zur Zytotoxizität derselben Substanz auf die ESZ und auf differenzierte 3T3-Fibroblasten. Sie dienen als Modell einer maternalen Toxizität und sollten i.d.R. weniger sensitiv auf ein Teratogen reagieren als die ESZ.

Die Differenzierung der ESZ beginnt mit der sog. „hanging drop“-Kultur, in der sich Multizellaggregate bilden. Nach drei Tagen werden diese in Suspensionskultur genommen und innerhalb von zwei Tagen entstehen sog. „Embryobodies“ (EBs), welche die drei Keimblätter Ekto-, Meso- und Endoderm aufweisen. Nach der Überführung der EBs in eine 24-well-Platte wird nach Anheftung der Zellen u. a. die spontane Differenzierung in kontrahierende Kardiomyozyten unterstützt. An Tag 10 erfolgt die mikroskopische Auswertung. Die Zytotoxizität in ESZ-D3 und 3T3-Fibroblasten wird ebenfalls an Tag 10 mittels MTT-Test erhoben. Zur Klassifizierung einer Substanz in die Kategorien nicht-embryotoxisch, schwach-embryotoxisch und stark-embryotoxisch werden die mittleren inhibitorischen Konzentrationen (ID_{50-D3} , IC_{50-D3} und IC_{50-3T3}) in ein biostatistisches Prädiktionsmodell (PM) eingesetzt. Es dient der Übertragung von Ergebnissen der *in vitro*-Methoden auf *in vivo*-Endpunkte (Seiler und Spielmann 2011; Seiler *et al.* 2006; Spielmann *et al.* 1997).

Der EST war 2002 Teil einer ECVAM-Validierungsstudie, in der 20 Substanzen, darunter stark-, schwach- und nicht-embryotoxische Stoffe, getestet und anhand des PM klassifiziert wurden. Die Präzision betrug 78 %. Alle stark embryotoxischen Substanzen wurden korrekt identifiziert. Die Prädiktivität von schwachen und nicht-embryotoxischen Substanzen war ausreichend (≥ 65 %). Der EST gilt als reproduzierbar und laut Validierungskriterien als

wissenschaftlich validiert (ESAC 2002). In der chemischen und pharmazeutischen Industrie kann der EST somit zur Bewertung des embryotoxischen Potentials in der Produktentwicklung herangezogen werden (Paquette *et al.* 2008; Whitlow *et al.* 2007). Aufgrund der Auswahl und vergleichsweise geringen Anzahl der Testsubstanzen, der Untersuchung eines einzelnen Endpunktes (schlagende Kardiomyozyten) und der Abwesenheit eines metabolisch aktiven Systems zur Erfassung von Proteratogenen wurde der EST bisher nicht regulatorisch anerkannt und nicht in die OECD-Testrichtlinien aufgenommen (Spielmann *et al.* 2006).

Um die Präzision des EST zu steigern werden eine Reihe von Möglichkeiten evaluiert: Zur Erhöhung der Datenlage des EST wurden im Rahmen des europäischen ReProTect-Projekts 13 weitere Chemikalien getestet, woraus zwei durch das PM des validierten EST richtig klassifiziert worden sind (Marx-Stoelting *et al.* 2009). In einer detaillierten Analyse wurden die Anwendungsbereiche und Einschränkungen des EST evaluiert (Riebeling *et al.* 2012). Eine objektivere Auswertung bei gleichbleibender Sensitivität gegenüber dem klassischen EST ermöglicht die Identifikation molekularer Endpunkte mittels RT-PCR und FACS-Analyse an Tag 7 der Differenzierung. Dabei dient die Expression gewebespezifischer Markerproteine wie α -Actinin und die großen Untereinheiten des Myosins (myosin heavy chain, MHC) als Differenzierungsmarker der ESZ (Buesen *et al.* 2009; Seiler *et al.* 2004; zur Nieden *et al.* 2001). Die Arbeitsgruppe um van Dartel arbeitet auf Basis der Genomics-Technologie an neuen, sensibleren Endpunkten im Vergleich zur morphologischen Auswertung (van Dartel *et al.* 2009; van Dartel and Piersma 2011). Dabei werden für die Proliferation und Differenzierung verantwortliche Gene identifiziert und deren Expressionsänderung unter Substanzeinfluss untersucht. Einen weiteren molekularen Endpunkt bildet die Untersuchung des Metaboloms, also der Einfluss einer Substanz auf endogene Metaboliten, welche als spezifische Biomarker der Entwicklung und Differenzierung in humanen Stammzellen identifiziert wurden. Sie können quantitativ mittels LC/MS-Technik erfasst werden (Cezar *et al.* 2007; West *et al.* 2010). Die Einführung weiterer Differenzierungsendpunkte wird ebenfalls zur Erhöhung der Prädiktivität des EST untersucht. Da der EB somatische Zellen der drei Keimblätter enthält, besteht anhand der Genexpression spezifischer Markergene die Möglichkeit, die Inhibition der Differenzierung zu Knochen-, Knorpel- und Nervengewebe zu untersuchen. Somit können spezifische embryotoxische Effekte an Geweben ekto- meso- und endodermalen Ursprungs identifiziert und differenziert werden (Baek *et al.* 2011; zur Nieden *et al.* 2004; zur Nieden *et al.* 2010). Im Rahmen des ReProTect-Projekts wurde von Uibel *et al.* ein Reporterassay entwickelt,

welcher auf der Beeinflussung eines zellulären Signalweges, welcher für die embryonale Entwicklung von Bedeutung ist, beruht (Uibel *et al.* 2010). Die Einführung weiterer Reporter für entwicklungsspezifische Signalwege könnte die Vorhersagekraft des EST erhöhen (Seiler *et al.* 2011).

Bei den in der ECVAM-Validierungsstudie eingesetzten Substanzen handelt es sich um Stoffe, welche direkt embryotoxisch wirken, da die fremdstoffmetabolisierende Aktivität der im EST eingesetzten Zellsysteme nur gering ausgeprägt ist. Eine erste Methode zur Identifikation des Proteratogens Cyclophosphamid im EST wurde von Bremer entwickelt (Bremer *et al.* 2002). Transformierte V79-Zellen, welche CYP2B1 exprimieren, wurden für die Präinkubation von Cyclophosphamid herangezogen. Die anschließende Überführung der Medienüberstände in den EST führte zur Inhibition der Differenzierung der ESZ. Diese Methode zur Identifikation von Proteratogenen eignet sich praktisch nur für Substanzen, deren an der metabolischen Aktivierung beteiligten Enzyme bekannt sind (Bremer *et al.* 2002). Im Rahmen des europäischen ReProTect-Projekts wurden primäre Hepatozyten der Maus für die metabolische Aktivierung von CPA herangezogen. Die Kombination erfolgte in Form einer Präinkubation und anschließender Überführung der Medienüberstände in die Differenzierungs- und Zytotoxizitätstests des EST. Im Differenzierungstest konnte die metabolische Aktivierung von Cyclophosphamid nachgewiesen werden (Hettwer *et al.* 2010).

1.2.2 Whole Embryo Culture

Die Kultur ganzer Embryonen (Whole Embryo Culture, WEC) von Ratte und Maus wurde in den 1970er Jahren von New entwickelt (New *et al.* 1976; New 1978). Sie basiert auf einer mit der *in vivo*-Situation vergleichbaren Entwicklung von Embryonen, welche zwischen Tag 8 und 13 der Gravidität explantiert und kultiviert werden. Zunächst wurden normale Entwicklungsprozesse während der sensiblen Phase der Organogenese und Mechanismen, welche für abnormale Entwicklungen verantwortlich sind, untersucht. Der durch steigende Entwicklung und Vermarktung von Chemikalien zunehmende Bedarf an toxikologischen Studien führte dazu, dass die WEC zur Prüfung von Fremdstoffen auf Embryotoxizität herangezogen wurde (Sadler *et al.* 1982). 1985 veröffentlichte Klug ein Protokoll zur Standardisierung der WEC und 1995 wurde von Piersma eine Prävalidierungsstudie durchgeführt, welche die Reproduzierbarkeit der WEC gezeigt hat (Klug *et al.* 1985; Piersma *et al.* 1995). Das Protokoll von Klug sieht eine Explantation der Rattenembryonen an Tag 9½ der Gravidität und die Überführung in eine Roller-Kultur vor (Klug *et al.* 1985).

Drei bis vier Embryonen werden unter steigendem Sauerstoffgehalt in 6 ml Serum und 1 ml Phosphatpuffer für 48 Stunden kultiviert. Der Puffer dient zur Lösung der Testsubstanz und zur Erhöhung der Pufferkapazität des Mediums. Der erfolgreiche Einsatz von Rinderserum anstelle von Rattenserum eröffnete die Möglichkeit, größere Mengen Serum unter konstanten Bedingungen zu nutzen. Piersma verwendete in der Prävalidierungsstudie Rattenserum als Kulturmedium (Piersma *et al.* 1995). Die Auswertung beinhaltet die Ausprägung morphologischer, entwicklungs- und wachstumsspezifischer Parameter. Darunter fallen die Anzahl der Somiten, die Scheitel-Steiß-Länge, der Dottersack-Durchmesser und der Proteingehalt. Eine detailliertere Bewertung der Entwicklung erfolgt modifiziert anhand eines von Brown entwickelten „Score“-Systems (Brown and Fabro 1981). Dabei werden u. a. die Haltung des gesamten Embryos, das Neuralrohr, der Kopf, die Ohren, die Augen, das Herz, die Ausbildung der Gliedmaßen, der sog. Schwanz und die Durchblutung bewertet. Aus diesen Parametern abgeleitete Kennzahlen werden addiert und zum sog. „Total Morphological Score“ (TMS) zusammengefasst. Je größer die Wertung, desto weiter ist der Embryo entwickelt. Neben dem TMS bilden die „No-effect-concentration“ (IC_{NOEC}), die 50 %-Effekt Konzentration (50 % der Embryonen weisen Malformationen oder Letalität auf; IC_{50}) und die Maximum-Effekt-Konzentration (kleinste Konzentration bei maximalen Malformationen; IC_{MAX}) weitere Endpunkte (Chapin *et al.* 2008).

Die WEC bildet ein komplexes *in vitro*-System, welches die Bewertung relevanter Endpunkte der Embryotoxizität unabhängig vom maternalen Organismus ermöglicht. Die Exposition erfolgt kontrolliert in der Phase der Organogenese. Die benötigten Substanzmengen sind im Vergleich zu *in vivo*-Studien geringer. Als *in vitro*-Methode ist die WEC vergleichsweise zeitintensiv, bedarf geschultes Personal und ist auf trüchtige Versuchstiere angewiesen. Im Vergleich zur Prüfung nach OECD Testrichtlinie 414 ist der Bedarf an Versuchstieren jedoch reduziert. Aufgrund der Unabhängigkeit des maternalen Organismus werden kinetische Einflüsse nicht berücksichtigt und der Expositionsweg ist artifiziell (Flick und Klug 2006; Klug *et al.* 1985; Piersma 1993; Piersma *et al.* 2004)

Die WEC war neben dem EST 2002 Teil der ECVAM-Validierungsstudie. Die Klassifizierung erfolgt analog dem EST in stark-, schwach- und nicht-embryotoxisch. In der Prävalidierungsphase wurde anhand der Prüfung von acht Substanzen und der Endpunkte IC_{NOEC} TMS (höchste Konzentration, welche keinen Effekt auf den TMS hat) und der IC_{50} ein erstes Prädiktionsmodell (PM1) entwickelt. Dies führte dazu, dass 72 % korrekt klassifiziert wurden. Unter Berücksichtigung der IC_{50} -Werte aus dem 3T3-Zytotoxizitätstest

und der IC_{MAX} wurde ein optimiertes PM₂ entwickelt, welches zu 84 % richtiger Klassifizierung der acht Prävalidierungssubstanzen führte. Nach Prüfung der restlichen 14 Substanzen ergibt sich für die WEC-PM₂ eine Präzision von 80 %. Alle stark embryotoxischen Stoffe wurden korrekt identifiziert. Die Prädiktivität von schwachen embryotoxischen Substanzen war gut (≥ 75 %) und von nicht-embryotoxischen Substanzen ausreichend (≥ 65 %) (Genschow *et al.* 2002; Piersma *et al.* 2004). Die WEC gilt als reproduzierbare Methode und laut Validierungskriterien als wissenschaftlich validiert (ESAC 2002). Aufgrund der Auswahl und vergleichsweise geringen Anzahl der Testsubstanzen, der fehlenden Präzision des PM, welche möglicherweise auf der Zusammenfassung der morphologischen Endpunkte zurückzuführen ist, und der Abwesenheit eines metabolisch aktiven Systems zur Erfassung von Proteratogenen wurde die WEC bisher nicht regulatorisch anerkannt und in die OECD-Testrichtlinien aufgenommen (Spielmann *et al.* 2006). Eine von Pfizer 2011 durchgeführte Studie, welche zusätzlich weitere 48 Substanzen in das ECVAM PM₂ einsetzt, erreicht eine Präzision von 50 %, zusammen mit 13 Substanzen aus der ECVAM-Validierungsstudie, 56 %. Das Vorhaben, die Präzision des PM durch ein „Random Forrest Modell“ zu optimieren, scheitert (Thomson *et al.* 2011). Die Integration eines metabolisch aktiven Biotransformationssystems in Form von Leber-S9- und Mikrosomenfraktionen in die WEC konnte anhand der Proteratogene Cyclophosphamid und 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) gezeigt werden (Fantel *et al.* 1979; Faustman-Watts *et al.* 1983; Kitchin *et al.* 1981). Kokulturen von Embryonen mit primären Hepatozyten unterschiedlicher Spezies in Anwesenheit von Cyclophosphamid führten ebenfalls zu embryotoxischen Effekten (Oglesby *et al.* 1986; Ozolins *et al.* 1995; Piersma *et al.* 1991). Eine weitere Möglichkeit, Proteratogene ohne den Zusatz von Biotransformationssystemen in der WEC zu erfassen, besteht in der Verwendung von Serum aus Tieren, welche zuvor mit dem Proteratogen behandelt wurden. In dieser sog. *ex vivo*-WEC können durch unterschiedliche Probennahmezeitpunkte kinetische Aspekte *in vivo* berücksichtigt werden. Für diese Methode werden jedoch zusätzliche Versuchstiere benötigt (Ellis-Hutchings und Carney 2010; Sadler *et al.* 1982). Die Arbeitsgruppe von Klein beobachtete eine Zunahme von Malformationen in der WEC nach Einsatz von humanem Serum von Frauen, welche mit Antiepileptika wie Valproinsäure behandelt wurden (Chatot *et al.* 1984; Klein *et al.* 1980).

1.3 Biotransformation

Die Leber bildet das zentrale Stoffwechselorgan im Organismus. Durch die Pfortader gelangen resorbierte Nähr- und Fremdstoffe (Xenobiotika) aus dem Magen-Darmtrakt in die Leber. Abhängig von deren Eigenschaften bilden die Moleküle Substrate von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen, welche sich in den Leberparenchymzellen (Hepatozyten) befinden. Diese sog. Biotransformation dient dazu, die Polarität lipophiler Fremdstoffe zu erhöhen um deren Ausscheidung über die Galle und die Niere zu erleichtern. Werden giftige Fremdstoffe auf diesem Weg aus dem Organismus entfernt, wird von einer „metabolischen Detoxifizierung“ gesprochen. Während der Biotransformation können jedoch auch reaktive, meist elektrophile Metaboliten gebildet werden, welche in der Lage sind, an nukleophile Makromoleküle wie Proteine, Lipide und die DNS zu binden und ihre Funktion zu beeinträchtigen. Dieser Prozess wird als „metabolische Aktivierung“ bezeichnet. Eine „Giftung“ liegt vor, wenn der Metabolit toxischer ist als die Ausgangssubstanz, aus der er gebildet wurde (Eisenbrand *et al.* 2005b)

Der Fremdstoffmetabolismus kann in zwei Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase werden durch Oxidation, Reduktion oder Hydroxylierungen funktionelle Gruppen in das Molekül eingeführt, weshalb sie als Funktionalisierungsreaktion bezeichnet wird. In der zweiten Phase, der Konjugationsreaktion, werden an die funktionellen Gruppen polare Moleküle aus dem Intermediärstoffwechsel angehängt (Jancova *et al.* 2010).

Flavin-abhängige Monooxygenasen (FMO), Prostaglandin H-Synthasen (PGHS), Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen (ADH, AIDH), Reduktasen und zahlreiche Hydrolasen sind Phase-I-Enzyme, welche sowohl membrangebunden als auch im Zytosol vorkommen. Die bedeutendsten Enzyme der Phase I sind Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (CYP). Dabei handelt es sich um Häm-Proteine, welche als prosthetische Gruppe ein Protoporphyrin IX mit einem komplexgebundenen Eisen-Ion aufweisen. Im reduzierten Zustand (Fe^{2+}) und der Ausbildung eines Kohlenmonoxid-Komplexes verschiebt sich die Soret-Bande im Absorptionsspektrum nach 450 nm. Diese physikalische Eigenschaft verleiht den Enzymen ihren Namen und wird bei der Bestimmung des CYP-Gehalts genutzt (Omura und Sato 1964a; Omura und Sato 1964b). Die Bezeichnung „Monooxygenase“ geht auf die von CYP-Enzymen katalysierte Reaktion zurück. Die Bindung und Aktivierung von molekularem Sauerstoff am Häm-Eisen führt im nächsten Schritt zur Übertragung eines Sauerstoffatoms auf das Substrat bei gleichzeitiger Reduktion des zweiten Sauerstoffatoms zu Wasser. Die dafür benötigten Elektronen stammen aus NADPH-Reduktionsäquivalenten

und werden von der Cytochrom-Reduktase in Eielektronenschritten auf das CYP übertragen (Abbildung 1.2). Die CYP-Superfamilie besteht aus mehr als 7.000 identifizierten Gensequenzen in Tieren, Pflanzen, Bakterien und Pilzen. Das humane Genom weist 57 CYP-Gene auf (Handschin und Meyer 2003).

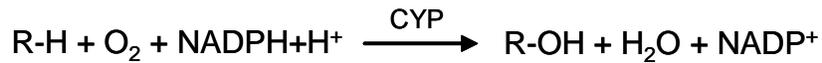


Abbildung 1.2: Schema der CYP- katalysierten Reaktion

Die Einteilung der CYP-Enzyme erfolgt nach einer 1987 entwickelten Nomenklatur und basiert auf der Aminosäuresequenz der Proteine (Nebert *et al.* 1987). Enzyme mit einer Homologie von $\geq 40\%$ werden in einer „Familie“ und einer Sequenzidentität von $\geq 55\%$ in einer „Subfamilie“ zusammengefasst. Innerhalb einer Subfamilie werden „Isoenzyme“ unterschieden, wenn sich die Aminosäuresequenzen um mehr als 3% unterscheiden. Die Familie wird mit einer arabischen Zahl und die Subfamilie mit einem Großbuchstaben dargestellt. Die Isoenzyme erhalten wieder eine arabische Zahl (z.B. CYP3A4, CYP3A5) (Anzenbacher und Anzenbacherova 2001).

CYP-Enzyme befinden sich in praktisch allen Geweben des Organismus. Die Leber weist den größten Gehalt und die größte Vielfalt der Isoenzyme auf. Der Darm, das Gehirn, die Niere, die Lunge, das Herz und die Haut bilden weitere Organe in denen CYPs exprimiert werden. In der Zelle sind sie membrangebunden im endoplasmatischen Retikulum und in den inneren Mitochondrien lokalisiert.

CYP-Enzyme weisen eine breite und überlappende Substratspezifität auf und sind an der Biosynthese endogener Substanzen, darunter Steroide, Gallensäuren, Fettsäuren, Prostaglandine, Thromboxane, biogene Aminen und Retinoide beteiligt. Neben den endogenen Substanzen bilden exogene Fremdstoffe wie Arzneimittel, Lebensmittelinhaltsstoffe und Umweltkontaminanten Substrate der CYPs. Im Organismus der Wirbeltiere sind primär die Isoenzyme der Familien 1, 2 und 3 für die Funktionalisierung von Fremdstoffen verantwortlich, welche ausschließlich im ER lokalisiert sind (Gonzalez und Korzekwa 1995). Sie katalysieren die Hydroxylierung von Aliphaten und Aromaten, die Oxidation von Heteroatomen, die Epoxidierung von Alkenen, Alkinen und Aromaten und die oxidative Desalkylierung, Desaminierung und Desulfurierung (Eisenbrand *et al.* 2005b; Handschin und Meyer 2003; Martignoni *et al.* 2006). Gene, welche für CYPs kodieren,

weisen Sequenzvariationen auf. Sie sind polymorph. Die Kodierung der Allele führt zu Proteinen, deren enzymatische Aktivität eingeschränkt oder gar nicht vorhanden ist. Der am besten untersuchte humane Polymorphismus ist der des CYP2D6. Dieses Isoenzym ist für den Metabolismus vieler Arzneimittel verantwortlich. Bei einem Defekt (poor metabolizer) kommt es zur Akkumulation der Substanz im Körper während die Wirkung bei Patienten, welche eine Vielzahl von CYP2D6-Genkopien aufweisen (ultrarapid metabolizer) durch den „first-pass“-Effekt in der Leber stark vermindert ist (Pelkonen *et al.* 2008).

Die Transkription der CYP-Enzyme wird Rezeptor-vermittelt reguliert. Zu den wichtigsten hepatischen Kernrezeptoren, welche für die Regulation von CYP1A, CYP2B und CYP3A verantwortlich sind, gehören der „Arylhydrocarbon-Rezeptor“ (AhR), der „Constitutive Androstan-Rezeptor“ (CAR) und der „Pregnan-X-Rezeptor“ (PXR). Über die Bindung von Liganden an den Rezeptor kann die Expression der CYPs induziert oder inhibiert werden. Viele Fremdstoffe, welche Substrate von CYPs sind, bilden Liganden oder Agonisten der Kernrezeptoren und induzieren ihren eigenen Metabolismus. Die Induktion ist i. d. R. Dosis-abhängig und reversibel (Handschin und Meyer 2003).

Der AhR liegt im inaktiven Zustand im Zytosol als Multiproteinkomplex mit dem Hitzeschockprotein 90 (HSP90) vor. Die Ligandenbindung führt zur Translokation in den Zellkern, wo AhR einen Transkriptionsfaktorkomplex mit dem „AhR nuclear translocator“ (ARNT) bildet, welcher an die Xenobiotika-responsiven-Elemente in den Promotorregionen von CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 und einigen CYP2-Enzyme bindet und die Genexpression initiiert. Neben polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) sind Benzimidazol- und Tryptophan-Derivate Liganden des AhR (Pascussi *et al.* 2004).

Der CAR gehört zur Superfamilie der Kernrezeptoren und ist konstitutiv aktiv. Fremdstoffe können CAR sowohl direkt über Ligandenbindung als auch indirekt (z.B. durch Dephosphorylierung) aktivieren. Im inaktiven Zustand befindet sich CAR, gekoppelt mit dem „CAR retention protein“ (CCRP) und HSP90, im Zytosol. In Anwesenheit eines Aktivators transloziert CAR in den Nukleus und heterodimerisiert mit dem Retinoid-X-Rezeptor alpha (RXR α). Das CAR/RXR-Heterodimer bindet an „Phenobarbital-responsive enhancer units“ (PBRU) und „Phenobarbital-responsive enhancer modules“ (PBREM) in den Promotorregionen von Isoenzymen der Subfamilien CYP2B, CYP2C und CYP3A und leitet die Genexpression ein. Die Phenobarbital-vermittelte Enzyminduktion ist auf eine indirekte CAR-Aktivierung zurückzuführen (Graham und Lake 2008; Handschin und Meyer 2003; Pascussi *et al.* 2004).

Der PXR gehört ebenfalls zur Superfamilie der Kernrezeptoren und ist im inaktiven Zustand im Zytosol lokalisiert. Nach Ligandenbindung transloziert er in den Zellkern und bildet ein Heterodimer mit dem RXR α . Der Transkriptionsfaktorkomplex bindet an Xenobiotika-responsive Elemente in der DNS, darunter an das „Xenobiotic-responsive enhancer module“ (XREM). PXR ist für die Expression von Enzymen der Subfamilien CYP2A, CYP2B, CYP2C und CYP3A, besonders des humanen CYP3A4, verantwortlich. Die endogenen und exogenen Liganden des PXR sind meist lipophile Moleküle mit einem geringen Molekulargewicht, welche keine weiteren besonderen Strukturmerkmale aufweisen. Die flexible Ligandenbindungsdomäne des PXR ist für die Aktivierung durch eine Vielzahl von Arzneistoffen, Steroiden, Lebensmittelinhaltsstoffen und Umweltkontaminanten verantwortlich. Die Eigenschaft führt dazu, dass PXR, neben dem CAR als „Xenobiotikasensoren“ bezeichnet werden (Handschin und Meyer 2003; Pascussi *et al.* 2004; Pelkonen *et al.* 2008).

Neben AhR, CAR und PXR sind der Peroxisom-Proliferation-aktivierter Rezeptor alpha (PPAR α), der Glucocorticoid-Rezeptor (GR), der Vitamin D3-Rezeptor (VDR), der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) und der „Hepatocyte Nuclear Factor-4“ (HNF-4) an der Regulation der CYP-Enzyme beteiligt. Die Aktivierung durch gleiche Liganden bzw. Aktivatoren, die Bindung an gleiche responsive Elemente in der DNS, die Bildung von Heterodimeren mit den gleichen Rezeptoren und die funktionelle Interaktion führen zu engen Querverbindungen der Kernrezeptoren. Die durch den sog. „crosstalk“ hervorgerufene Enzyminduktion bildet auf der einen Seite einen Schutzmechanismus des Organismus gegen adverse Effekte von Fremdstoffen, kann auf der anderen Seite aber auch zu einer erhöhten metabolischen Aktivierung von Fremdstoffen und daraus folgenden Schäden führen (Pascussi *et al.* 2008; Pascussi *et al.* 2004).

Phase-II-Reaktionen dienen der weiteren Erhöhung der Polarität von Fremdstoffen durch Konjugation mit polaren Gruppen. Die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Enzyme werden im Folgenden kurz dargestellt.

Die Konjugation mit Glucuronsäure wird durch UDP-Glucuronosyl-Transferasen (UGT) in Anwesenheit von aktivierter Glucuronsäure (UDP-Glucuronsäure) katalysiert. Die Glucuronidierung bildet die bedeutendste Konjugationsform im Organismus, da viele funktionelle Gruppen (-OH, NH₂, -SH, -CO₂H) konjugiert werden können. UGTs liegen membrangebunden im ER vor und gehören einer Superfamilie von Enzymen mit

überlappender Substratspezifität an. Die Sulfatierung ist im Gegensatz zur Glucuronidierung aufgrund des limitierten Gehalts von schwefelhaltigen AS und der hohen Substrataffinität bei gleichzeitig geringer Kapazität bei geringen Dosierungen bevorzugt. Das durch Sulfotransferasen (SULT) auf alkoholische oder phenolische Hydroxylgruppen übertragene Sulfat stammt von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS). SULTs bilden eine Superfamilie von Enzymen, welche sowohl im Zytosol als auch membrangebunden am Golgi-Apparat lokalisiert sind. Zytosolische Isoformen sind für die Sulfatierung von Fremdstoffen verantwortlich, welche im Fall von aromatischen Aminen und Hydroxylaminen aufgrund der guten Sulfatabgangsgruppe jedoch zur Bildung reaktiver Intermediate führt.

Elektrophile Fremdstoffe und Metaboliten darunter α , β -ungesättigte Carbonylverbindungen und Epoxide von polyzyklischen aromatische Kohlenwasserstoffen bilden Substrate der Glutathion-S-Transferasen (GST). Sie übertragen unter Ausbildung einer Thioetherbindung das Tripeptid Glutathion (GSH) und tragen wesentlich zum Schutz der Zelle gegen reaktive Sauerstoffspezies bei. In der Zelle liegen sie sowohl zytosolisch als auch membrangebunden vor. Glutathionaddukte werden i. d. R. nach Abspaltung von Glutamat und Glycin und anschließender N-Acetylierung als Mercaptursäuren über die Niere ausgeschieden.

N-Acetyltransferasen (NAT) sind für die Übertragung des Acetylrestes von Acetyl-CoA verantwortlich. Im Menschen sind zwei Isoformen, NAT1 und NAT2, mit unterschiedlicher Substratspezifität bekannt. 4-Aminobenzoessäure bildet ein typisches Substrat der NAT1 während Koffein ein klassisches Substrat der NAT2 ist. NATs liegen sowohl im Zytosol als auch membrangebunden im ER vor. Im Gegensatz zu den bereits genannten Konjugationen trägt die Acetylierung nicht zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit bei, sondern stellt einen Prozess zur Beendigung der biologischen Wirkung dar. Da das Acetat eine gute Abgangsgruppe darstellt, führt die Acetylierung aromatischer Amine zur metabolischen Aktivierung dieser Verbindungen (Eisenbrand *et al.* 2005b; Jancova *et al.* 2010).

Einige Enzyme der Phase II, darunter einige Formen der GST und die NAT2, weisen genetische Polymorphismen auf. Besonders gut ist der NAT2- Polymorphismus beim Menschen untersucht, bei dem zwischen schnellen und langsamen Acetylierern unterschieden wird (Coecke *et al.* 2006; Eisenbrand *et al.* 2005a; Eisenbrand *et al.* 2005b). Die Isoenzyme der UGT und GST werden u. a. über die Liganden- bzw. Agonisten-abhängigen Kernrezeptoren AhR, CAR und PXR reguliert und sind induzierbar. In den

Promotorregionen wurden entsprechende Xenobiotika-responsive Elemente identifiziert (Pascussi *et al.* 2004).

1.3.1 Biotransformationssysteme *in vitro*

In vitro-Biotransformationssysteme, welche hauptsächlich auf der Leber basieren, werden zur Untersuchung des Fremdstoffmetabolismus und der Enzyminduktion bzw. -inhibition herangezogen. Sie erlauben auf schnellem Weg Aussagen über die metabolische Stabilität von Substanzen und eröffnen mit Hilfe analytischer Methoden die Strukturaufklärung gebildeter Metaboliten. Außerdem können sie mit anderen *in vitro*-Methoden, welche keine fremdstoffmetabolisierende Aktivität besitzen, in Form von Präinkubationen und Kokulturen kombiniert werden (Blaauboer 2002; Coecke *et al.* 2006; Pelkonen *et al.* 2008). Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über verschiedene *in vitro*-Metabolismussysteme mit ihren Anwendungsmöglichkeiten und Grenzen. Die für toxikologische Fragestellungen am häufigsten verwendeten *in vitro*-Biotransformationssysteme werden im Folgenden detaillierter dargestellt.

1.3.1.1 Leberschnitte

Manuell hergestellte Leberschnitte wurden bereits in den 1930er Jahren kultiviert, wiesen jedoch eine geringe Vitalität und Reproduzierbarkeit auf. Erst die Entwicklung entsprechender Schneidetechniken ermöglichte die reproduzierbare Gewinnung in einer Stärke von 200 bis 300 µm. In Leberschnitten sind alle Zelltypen des Organs vorhanden und die Gewebematrix bleibt erhalten. Neben Untersuchungen Leber-spezifischer Funktionen werden sie als *in vitro*-Biotransformationssystem in Metabolismusstudien von Wirk- und Fremdstoffen eingesetzt. Leberschnitte haben einen hohen Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen, welcher in den beiden entwickelten Kultursystemen berücksichtigt wird. In der Multiwell-Platten-Kultur sind die Schnitte vollständig von Kulturmedium umgeben. Der Gasaustausch wird durch ständiges Schütteln im Inkubator, welcher mehr als 70 % Sauerstoff enthalten sollte, optimiert. Eine erfolgreiche Kulturperiode von ca. 24 Stunden kann mit dieser Methode erreicht werden. Eine deutlich längere Kulturperiode von bis zu sieben Tagen kann mit dem „dynamic organ culture“-System erzielt werden. Die Schnitte werden auf einer Membran, welche sich auf einem Netz innerhalb eines Kunststoffeinsatzes befindet, gelegt und in einem mit wenig Kulturmedium gefüllten Glasgefäß in einem Rollinkubator kultiviert. Dabei sind sie sowohl der Medium- als auch der Gasphase

exponiert, was zu einer Verlängerung der Vitalität gegenüber der Plattenkultur führt. Die Anwendung als *in vitro*-Biotransformationssystem setzt die Aktivität fremdstoff-metabolisierender Enzyme über die Kulturperiode voraus. Die CYP-Aktivität beträgt je nach Kulturbedingung nach zwei bis drei Tagen 30 bis 50 % der Initialaktivität (Price *et al.* 1998). Eine Enzyminduktion mit klassischen Induktoren wie β -Naphtoflavon, Dexamethason oder Phenobarbital ist möglich (Lake *et al.* 1993). Die Aktivität der Phase-II-Enzyme UGT, SULT, GST und NAT nimmt dagegen kaum ab (Hashemi *et al.* 1999b). Unter Berücksichtigung der CYP-Aktivitätsabnahme stellen Leberschnitte damit ein valides System zur Untersuchung des Metabolismus von Fremdstoffen dar. Die Verwendung von Leber unterschiedlicher Spezies erlaubt darüber hinaus Aussagen über speziesspezifischen Metabolismus von Testsubstanzen (de Graaf *et al.* 2007; Ekins 1996; Lerche-Langrand und Toutain 2000).

Tabelle 1.2: *In vitro*-Metabolismusmodelle

Modell	Vorteile	Nachteile
Mikrosomen	<ul style="list-style-type: none"> • Fremdstoffmetabolisierende Enzyme erhalten • Verschiedene Spezies verfügbar 	<ul style="list-style-type: none"> • Kofaktoren erforderlich • Eingeschränktes Enzymspektrum
S9-Fraktion	<ul style="list-style-type: none"> • Fremdstoffmetabolisierende Enzyme erhalten • Verschiedene Spezies verfügbar 	<ul style="list-style-type: none"> • Kofaktoren erforderlich • In Kokulturen sehr toxisch
Transgene Zellen	<ul style="list-style-type: none"> • Enzymaktivität vorhanden • Enzyme verschiedener Spezies transfizierbar 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine physiologischen Enzym Spiegel • Nur bestimmte Fragestellungen
Aus Hepatozyten abgeleitete Zelllinien	<ul style="list-style-type: none"> • Enzymaktivität vorhanden • Verschiedene Spezies verfügbar 	<ul style="list-style-type: none"> • Unvollständiges metabolisches Profil • Instabiler Genotyp
Primäre Hepatozyten	<ul style="list-style-type: none"> • Zellstruktur erhalten • Vollständiges metabolisches Profil • Endogene Kofaktoren • Verschiedene Spezies verfügbar • Kryokonservierung möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • Eingeschränkte Kulturdauer (wenige Tage) • Enzymaktivität nimmt mit der Zeit ab • Instabiler Phänotyp
Leberschnitte	<ul style="list-style-type: none"> • Gewebestruktur erhalten • Vollständiges metabolisches Profil • Endogene Kofaktoren • Verschiedene Spezies verfügbar • Kryokonservierung möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • Eingeschränkte Kulturdauer (wenige Tage) • Enzymaktivität nimmt mit der Zeit ab
Isoliert-perfundierte Leber	<ul style="list-style-type: none"> • Gewebestruktur erhalten • Vollständiges metabolisches Profil • Endogene Kofaktoren • Gallenkanäle erhalten 	<ul style="list-style-type: none"> • Kurze Lebensdauer (wenige Stunden) • Kein humanes Material verfügbar

mod. nach (Guillouzo 1998)

1.3.1.2 Primäre Hepatozyten

Die Kultur primärer Hepatozyten wird vielfach als *in vitro*-Biotransformationssystem in der pharmazeutischen und toxikologischen Forschung eingesetzt. Dabei werden häufig Hepatozyten der Ratte verwendet. Die von Seglen entwickelte Kollagenase-Perfusion ermöglicht die Gewinnung der Leberparenchymzellen (Seglen 1976). Je nach Fragestellung stehen unterschiedliche Kultivierungsmethoden zur Verfügung. Die Suspensionskultur kann zur Untersuchung der metabolischen Stabilität von Fremdstoffen herangezogen werden. Die metabolische Aktivität der Hepatozyten in Suspension ist auf wenige Stunden begrenzt. Um längere Kulturperioden zu erreichen werden Hepatozyten auf Kulturplatten ausplattiert, welche mit Kollagen, Fibronectin oder Matrigel beschichtet sind. Durch die Beschichtung wird die Ausbildung einer adherenten Zellkultur („Monolayer“) gefördert. Aufgrund der Abnahme leberspezifischer Funktionen, u. a. der CYP-Aktivität werden primärer Hepatozyten in dieser Form der Kultur meist nicht länger als 24 bis 48 Stunden kultiviert (Coecke *et al.* 1999). Der Verlust der Vitalität und metabolischen Aktivität wird häufig auf das zweidimensionale Kultursystem zurückgeführt. Die sog. Kollagen/Matrigel-Sandwich-Kultur und die Verpackung der Hepatozyten in Alginat-Mikrokapseln ermöglichen in einer Art dreidimensionalem Kultursystem die Polarisierung der Hepatozyten ähnlich ihrer *in vivo*-Situation. Dies führt zu erhöhter und länger andauernder Vitalität und enzymatischen Aktivität im Vergleich zur Monolayerkultur (Gebhardt *et al.* 2003). Kulturperioden von bis zu zwei Wochen sind beschrieben (LeCluyse *et al.* 1996). Die Verwendung primärer Hepatozyten wird grundsätzlich durch die Veränderung des Phänotyps (Dedifferenzierung) in Verbindung mit dem Verlust der CYP-Aktivität und weiterer leber-spezifischer Funktionen begrenzt. Unter Berücksichtigung dieses Vorgangs bietet dieses zelluläre *in vitro*-Biotransformationssystem eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten bei der Untersuchung des Metabolismus von Fremdstoffen oder den Auswirkungen von Fremdstoffen auf die Enzymaktivität. Neben Rattenhepatozyten können Leberzellen anderer Spezies, darunter des Menschen zur Untersuchung des speziesspezifischen Fremdstoffmetabolismus herangezogen werden (Coecke *et al.* 1999; Elaut *et al.* 2006; Guillouzo 1998).

1.3.1.3 Permanente Zelllinien

Bei Hepatomzelllinien handelt es sich um transformierte Primärhepatozyten, welche unbegrenzt subkultiviert werden können und somit in großer Zahl zur Verfügung stehen. Sie bilden ebenso wie primäre Hepatozyten einen Zellrasen aus, benötigen dazu jedoch keine zusätzliche Matrixbeschichtung der Kulturplatten. Eine häufig verwendete Zelllinie menschlichen Ursprungs ist HepG2. Aus Nagern stammen u. a. die Zelllinien H4IIE und Hepa-1. Keine dieser Hepatomzelllinien weisen das gesamte Spektrum fremdstoffmetabolisierender Enzyme der ursprünglichen Leberzellen auf (Aninat *et al.* 2006). Einige Kernrezeptoren, welche für Enzyminduktionsstudien von zentraler Bedeutung sind, werden geringer oder gar nicht mehr exprimiert. Abhängig von der Kulturperiode können Veränderungen im Geno- und Phänotyp auftreten, welche durch Validierungsstudien identifiziert werden sollten, bevor die Zelllinie für bestimmte Fragestellungen verwendet wird. Unter der Berücksichtigung der beschränkten Enzymaktivität und Induktionsfähigkeit stellen Hepatomzelllinien eine einfache, kostengünstige *in vitro*-Screeningmethode zur Untersuchung des Metabolismus neuer Wirkstoffe dar, bei der auf die Verwendung von Versuchstieren verzichtet werden kann (Guillouzo 1998; Plant 2004).

Die stabile Transfektion von CYP-kodierender cDNS in nicht-hepatischen Zelllinien wie Fibroblasten aus dem chinesischen Hamster (V79) ermöglicht die Identifikation der am Metabolismus eines Fremdstoffs beteiligten CYP-Isoenzyme (Bull *et al.* 2001; Philip *et al.* 1999). Außerdem können je nach Fragestellung (z.B. Zytotoxizität, Mutagenität) sensible Zellen ausgewählt und die Abhängigkeit der Aktivität einzelner CYP-Isoenzyme auf den Endpunkt untersucht werden. Für die Transfektion stehen Vektoren zur Verfügung, welche CYP-Enzyme unterschiedlicher Spezies, darunter Nager und Mensch, kodieren. Diese genetisch transformierten Zellen eignen sich generell nicht als Screeningmethode zur Untersuchung des Fremdstoffmetabolismus, da meist nur ein CYP-Isoenzym über den Vektor kodiert wird und Phase-II-Enzyme nicht berücksichtigt werden (Bull *et al.* 2001; Glatt *et al.* 1987; Guillouzo 1998; Philip *et al.* 1999).

1.3.1.4 Subzelluläre Fraktionen

Subzelluläre Fraktionen werden häufig aus Lebergewebe hergestellt und können je nach Fragestellung auch aus anderen Organen wie Niere oder Haut gewonnen werden. Aus der Zentrifugation von Gewebehomogenaten bei 9.000 x g resultiert im Überstand die sog. S9-

Fraktion, welche sowohl zytosolische als auch mikrosomale Enzyme enthält. Eine weitere Zentrifugation bei 100.000 x g führt zur Trennung der Mikrosomen vom Zytosol. Die mikrosomale Fraktion enthält ausschließlich die membrangebundenen, für den Fremdstoffmetabolismus bedeutenden CYP- und UGT Enzyme. Durch den Zusatz von Kofaktoren wie NADPH, Glutathion oder UDP-Glucuronsäure können subzelluläre Fraktionen zur Aktivierung oder Detoxifizierung von Fremdstoffen oder zur Untersuchung der metabolischen Stabilität einer Testsubstanz genutzt werden (Wrighton *et al.* 1995). In *in vitro*-Genotoxizitätstests werden Leber-S9-Fraktionen standardmäßig zur metabolischen Aktivierung der Testsubstanzen eingesetzt und sind regulatorisch anerkannt. Sie stammen meist aus mit Enzyminduktoren wie Aroclor 1254, β -Naphthoflavon und Phenobarbital behandelten männlichen Ratten, um eine höhere metabolische Aktivität in der subzellulären Fraktion zu erreichen. Subzelluläre Fraktionen stellen extrazelluläre *in vitro*-Biotransformationssysteme dar, welche für begrenzte Zeit (ca. zwei Stunden) und in Abhängigkeit der gewählten Kofaktoren für Untersuchungen des Fremdstoffmetabolismus herangezogen werden können (Coecke *et al.* 2006; Ekins *et al.* 2000; Guillouzo 1998).

1.4 Testsubstanzen

1.4.1 Cyclophosphamid

Cyclophosphamid (2-[Bis(2-chloroethyl)amino]tetrahydro-2H-1, 3, 2-oxazaphosphorine 2-oxide, CPA) gehört zur Gruppe der Stickstoff-Lost-Verbindungen (Abbildung 1.3) Es handelt sich um ein weißes kristallines Pulver mit der Summenformel $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ und einem Molekulargewicht von 260,0 g/mol. Als Monohydrat ist es wasserlöslich. Die LD_{50} beträgt in der Ratte nach oraler Gabe 94 mg/kg KG. CPA ist mutagen und teratogen (Anderson *et al.* 1995; Hales 1982).

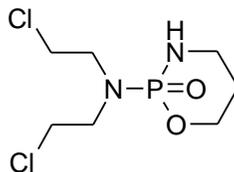


Abbildung 1.3: Strukturformel von Cyclophosphamid

Cyclophosphamid weist chemotherapeutische Eigenschaften auf und wird in der Humanmedizin als alkylierendes Zytostatikum zur Behandlung von Leukämie, Brust-, Lungen- und Prostata Tumoren sowie Lymphomen verwendet. Die immunsuppressive Eigenschaft von CPA wird zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie rheumatoide Arthritis genutzt. In den frühen 1940er Jahren wurde die Antitumorwirkung an Mausmodellen entdeckt und 1959 wurde es von der US amerikanischen „Food and Drug Administration“ (FDA) als zytotoxischer Antikrebswirkstoff zugelassen. Um diese Wirkung zu entfalten muss CPA in der Leber metabolisch aktiviert werden. Es handelt sich um ein sog. „Prodrug“ (Ozolins 2010; Zhang *et al.* 2005).

In der Leber der Ratte wird CPA hauptsächlich durch CYP2B1 aber auch 2C6 und 2C11 zum 4-Hydroxycyclophosphamid hydroxyliert, welches mit dem Tautomer Aldophosphamid im Gleichgewicht liegt. Bei 4-Hydroxycyclophosphamid handelt es sich um die Transportform des aktivierten CPA im Plasma. Dieses zerfällt unter β -Elimination in Acrolein, den proteinalkylierenden Metaboliten und Phosphoramidmustard, den DNS-alkylierenden Metaboliten von CPA. Beide Metaboliten sind stark zytotoxisch und führen zur Apoptose. Phosphoramidmustard zyklisiert unter Chlor-Verlust zu einem Aziridiniumion, welches sich unter neutralen und alkalischen Bedingungen zum Carbeniumion öffnet und über die N7-Position Guanin-Addukte bildet. Unter einer weiteren Chlor-Abspaltung erfolgt über einen zweiten Guaninrest eine Quervernetzung innerhalb der Basen-Stränge. Bei Acrolein handelt es sich um eine reaktive α , β -ungesättigte Carbonylverbindung, welche kovalente Bindungen mit Makromolekülen ausbildet und den Zellstoffwechsel beeinflusst. Die Oxidation von Aldophosphamid durch Aldehyddehydrogenasen (ALDH) liefert das inaktive Carboxyphosphamid. Ein Nebenstoffwechselweg bildet die N-Dechloroethylierung von CPA durch CYP3A unter Bildung des inaktiven Dechloroethyl-CPA und Chloroacetaldehyd (CAA), welcher für die Neuro- und Nierentoxizität von CPA verantwortlich ist. Die elektrophilen Metaboliten (Acrolein, CCA) und Intermediate (Aziridinium-, Carbeniumionen) können über GSH-Konjugation entgiftet werden. Im Unterschied zur Ratte wird CPA in der humanen Leber neben CYP2B6 und 2C9 auch von 3A4 an Position 4 hydroxyliert. CPA hat eine induzierende Wirkung auf CYP2B-, 2C- und 3A-Isoenzyme in der Leber der Ratte und des Menschen. Neben einer Expressionssteigerung über den ligandenabhängigen Kernrezeptor Pregnan-X-Rezeptor (PXR) werden mRNA- und proteinstabilisierende Effekte diskutiert (Chang *et al.* 1993; Clarke und Waxman 1989; Roy *et al.* 1999; Yu *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2005).

Die Zytotoxizität und DNA-alkylierende Eigenschaft der Metaboliten Acrolein und Phosphoramidmustard sind für die embryotoxische Wirkung von CPA verantwortlich. Embryoletalität und Malformationen treten sowohl in Säugetieren wie Maus, Ratte und Affe als auch in Nicht-Säugetieren wie Hühner, Frosch und Zebrafisch auf (Chhibber und Gilani 1986; Ozolins 2010). CPA verursacht in der Ratte schwere Fehlbildungen des Neuralrohrs, welche Enzephalozele und Anecephalie zur Folge haben. Außerdem werden starke Retardierungen der Ossifikation, Gliedmaßendeformationen bis hin zu Embryoletalität beobachtet. Tag 10 bis 16 der Schwangerschaft bilden die für die embryotoxischen Effekte von CPA sensible Periode in der Ratte (Mirkes 1985). Mirkes et al. haben 1981 nach Exposition einzelner CPA-Metaboliten in *in vitro*-Embryokulturen der Ratte zunächst Phosphoramidmustard als embryotoxischen Metaboliten von CPA identifiziert und eine konzentrationsabhängige Zunahme der Anomalien nachgewiesen, welche mit denen der *in vivo*-Untersuchungen übereinstimmen (Mirkes et al. 1981). Untersuchungen mit Dechloroethyl-CPA, welches nach Bioaktivierung Acrolein aber kein Phosphoramidmustard bildet, verursachen dennoch CPA-ähnliche Malformationen. Daraus resultiert die Annahme, dass sowohl Acrolein als auch Phosphoramidmustard für die Teratogenität von CPA verantwortlich sind (Mirkes et al. 1984). Aufgrund der Tatsache, dass CPA nach Biotransformation teratogen wirkt, wurde die Notwendigkeit metabolisch aktiver *in vitro*-Embryotoxizitätstests erkannt. CPA wird seit Jahren als Modellsubstanz für die Methodenentwicklung solcher Systeme eingesetzt (Hales 1981; Oglesby et al. 1986; van Aerts et al. 1993). In den Untersuchungen von Mirkes et al. wurden den Embryokulturen zur CPA-Aktivierung subzelluläre Leberfraktionen (S9) Aroclor 1254-induzierter männlicher Ratten zugesetzt (Mirkes et al. 1981; Mirkes et al. 1984). Kitchin et al. beobachteten in der WEC eine Verkleinerung des Dottersacks und eine Abnahme des Herzschlags und der Somitenanzahl nach Inkubation von 0,35 mM CPA in Anwesenheit von 0,5 mg/ml mikrosomalen Proteins und NADPH (Kitchin et al. 1981). Diese Arbeit bildete die Grundlage für die von Luijten et al. entwickelte Methode der Präinkubation von Proteratogenen in Leber-S9- oder Mikrosomenfraktionen und der Inkubatüberführung in die WEC (Luijten et al. 2008). Die Präinkubation von CPA in der Mikrosomenfraktion führte zu schweren Malformationen und Embryoletalität. In Kokultursystemen mit primären Hepatozyten konnte die Embryotoxizität von CPA in Embryonenkulturen von Ratte und Maus nachgewiesen werden. Dabei wurden sowohl adherente Monolayerkulturen als auch Suspensionskulturen primärer Hepatozyten verwendet. Sensitivitätsunterschiede nach Verwendung unterschiedlicher Hepatozytenspezies weisen dabei auf speziesspezifische

CPA-Aktivierung hin (Oglesby *et al.* 1986; Ozolins *et al.* 1995; Piersma *et al.* 1991). Bremer *et al.* setzen die mit cDNS von CYP2B1 stabil transfizierte Zelllinie V79 als Biotransformationssystem ein und beobachten eine Inhibition der Differenzierung in Kardiomyozyten im EST durch präinkubiertes CPA (Bremer *et al.* 2002). CPA selbst wurde im EST als schwach embryotoxisch klassifiziert (Binder 2008). In der gleichen Arbeit führte eine Kokultur der ESZ mit permanenten Hepatomzelllinien nicht zu einer Inhibition der Differenzierung im Vergleich zu reinem CPA, woraus abgeleitet wird, dass die fremdstoffmetabolisierende Aktivität der eingesetzten Zellen für die metabolische Aktivierung von CPA zu gering ist (Binder 2008). Eine sechsstündige Präinkubation von CPA in primären murinen Hepatozyten mit anschließender Überführung des Medienüberstands in den Differenzierungstest des EST führte zu einer Abnahme des ID₅₀-Wertes um den Faktor 70 (Hettwer *et al.* 2010). In den Zytotoxizitätstests konnte das Ergebnis aufgrund von Kontamination nicht nachgewiesen werden.

1.4.2 Albendazol

Albendazol (Methyl-(5-(propylthio)-1H-benzimidazol-2yl)carbamat; ABZ) gehört zur Substanzklasse der Benzimidazolcarbamate (Abbildung 1.4). Es handelt sich um einen weißen kristallinen Feststoff mit der Summenformel C₁₂H₁₅N₃O₂S und einem Molekulargewicht von 265,3 g/mol. Die LD₅₀ beträgt nach oraler Gabe in der Ratte 2.400 mg/kg KG und in der Maus 1.500 mg/kg KG. Eine teratogene Wirkung in der Ratte und im Schaf wurde nachgewiesen (Cristofol *et al.* 1997; Mantovani *et al.* 1995a; Mantovani *et al.* 1995b; Navarro *et al.* 1999; Piscopo und Smoak 1997).

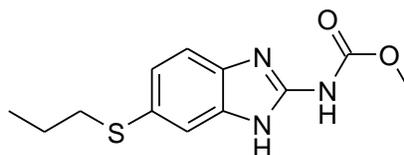


Abbildung 1.4: Strukturformel von Albendazol

Benzimidazole weisen eine besonders potente anthelmintische, antifungizide und antineoplastische Wirkung auf. In der Veterinärmedizin wird Albendazol zur Behandlung gastrointestinaler Parasiten wie Rund- und Bandwürmer, Lebersaugwürmer und Lungenwürmer verwendet. In der Humanmedizin wird es zur Behandlung der durch den

Bandwurm *Taenia solium* ausgelösten Neurocysticercosis verwendet (Whittaker und Faustman 1991).

Die Biotransformation von ABZ in der Leber klassischer Versuchstiere und des Menschen liefert die beiden Hauptmetaboliten Albendazolsulfoxid (ABZSO) und Albendazolsulfon (ABZSO₂). Bei ABZSO handelt es sich um den pharmakologisch und toxikologisch relevanten Metaboliten von ABZ. Da der Schwefel in ABZ ein prochirales Zentrum bildet, erfolgt die Oxidation stereospezifisch. Für die Bildung des (S)-ABZSO sind in der Ratte hauptsächlich die CYP-Isoenzyme 2C6, 2A1 und 3A1 verantwortlich. Die Flavin-abhängigen Monooxygenasen (FMO) dagegen bilden primär (R)-ABZSO. Beide Enantiomere werden in der Ratte zu gleichen Anteilen gebildet. Die weitere Oxidation des Schwefels zum pharmakologisch inaktiven Sulfon wird durch CYP1A1 katalysiert. Die Biotransformation der Enantiomere ist vergleichbar (Capece *et al.* 2003; Capece *et al.* 2009; Delatour *et al.* 1991; Moroni *et al.* 1995; Velik *et al.* 2003). Baliharova *et al.* haben die S-Oxidation von ABZ in Rattenhepatozytenkulturen *in vitro* gezeigt (Baliharova *et al.* 2003b). Asteinza *et al.* weisen nach oraler Gabe eine induktive Wirkung von ABZ auf die enzymatische Aktivität und den Proteingehalt von CYP1A1/2 nach (Asteinza *et al.* 2000). Die Induktion wurde durch *in vitro*-Studien an primären Hepatozytenkulturen bestätigt. Hier zeigt sich jedoch, dass nach 24 Stunden der Metabolit ABZSO die Hauptkomponente im Kulturmedium bildet. Aus diesen Beobachtungen resultiert die Hypothese, dass ABZSO für die Induktion von CYP1A1 durch ABZ verantwortlich ist (Asteinza *et al.* 2000; Baliharova *et al.* 2003b; Rolin *et al.* 1989a).

Die beschriebenen therapeutischen Wirkungen von ABZ beruhen auf der selektiven Inhibition der Tubulinpolymerisation in intestinalen Zellen von Parasiten. Dies hat zur Folge, dass der Spindelapparat während der Mitose nicht ausgebildet und die Zellteilung beeinflusst oder verhindert wird (Capece *et al.* 2003; Lacey und Watson 1985; Teruel *et al.* 2003). Auf diesen Effekt wird auch das embryotoxische Potential von ABZ zurückgeführt. Da ABZ *in vivo* einem „first-pass“-Effekt unterliegt und innerhalb weniger Stunden im Plasma nicht mehr nachgewiesen wird, wird ABZSO für die embryotoxische Wirkung von ABZ verantwortlich gemacht. Zusammenhänge zwischen der Störung der mitotischen Aktivität während der Embryogenese und daraus resultierenden Abnormalität werden vermutet (Cristofol *et al.* 1997; Whittaker und Faustman 1991). Embryotoxische Effekte wie Resorption, verringertes Fetalgewicht und Missbildungen an der Wirbelsäule und den Extremitäten konnten nach oraler Gabe von > 20 mg/kg KG ABZ an trächtige Ratten

festgestellt werden (Mantovani *et al.* 1995a). Cristòfols Untersuchungen mit Netobimin, einer Substanz, die durch intestinale Bakterien zu ABZ und nach Absorption in der Leber zu ABZSO transformiert wird, zeigen ebenfalls eine Erhöhung der Resorptionsrate und Mortalität der Föten mit steigender Dosis (Cristofol *et al.* 1997). Delatour beobachtet Missbildungen an schwangeren Sprague-Dawley-Ratten ab einer oralen Dosis von 6,62 mg/kg KG ABZ und einer Dosis von 9,36 mg/kg KG des Metaboliten ABZSO (Delatour *et al.* 1981; Delatour *et al.* 1984). Untersuchungen der Plasmaspiegel zeigen eine deutliche Abnahme des ABZ-Spiegels innerhalb einer Stunde. Die ABZSO-Konzentration steigt im gleichen Zeitraum stark an und bleibt über 12 Stunden konstant. Durch eine zusätzliche Gabe des kompetitiven CYP-Inhibitors Proadifen (SKF-525A) tritt nahezu keine Embryotoxizität mehr auf. Der Plasmaspiegel von ABZSO ist signifikant reduziert. Das Ergebnis führt zu der Schlussfolgerung, dass dieser Metabolit für das embryotoxische Potential von ABZ verantwortlich ist. Die Plasmauntersuchungen nach Inhibitorgabe zeigen dabei einen verringerten ABZ-Spiegel. Diese Beobachtung wird von Delatour *et al.* auf einen inhibitorischen Effekt von SKF-525A auf die gastrointestinale Absorption von ABZ zurückgeführt (Delatour *et al.* 1984). Whittaker und Faustman haben das embryotoxische Potential von ABZ und ABZSO *in vitro* im Micromass-Test an Neuronal- und Knorpelzellkulturen gezeigt (Whittaker und Faustman 1992; Whittaker und Faustman 1991). ABZ führt dabei zu einer stärkeren Inhibition des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung als ABZSO. Beide Substanzen zeigen hohe Affinität zum $\alpha\beta$ -Heterodimer des Tubulins. Diese Ergebnisse der *in vitro*-Methoden korrelieren nicht mit den Daten der beschriebenen *in vivo*-Studien. Eine Erklärung ist die mögliche Entgiftungsreaktion des Organismus von ABZ. ABZSO weist eine höhere Polarität auf als ABZ und kann somit besser aus dem Organismus ausgeschieden werden (Whittaker und Faustman 1991). Von Cristòfol und Navarro werden außerdem additive Effekte von ABZ und ABZSO hinsichtlich der Ausbildung von Fehlbildungen des Skeletts und vaskulären Anomalitäten diskutiert, da beide den Embryo erreichen und eine Affinität zu Tubulin besitzen (Cristofol *et al.* 1997; Navarro *et al.* 1999).

1.4.3 Valpromid

Valpromid (2,2-Di-n-propylacetamid, VPD) ist das Carbonsäureamid der 2-Propylpentansäure (Abbildung 1.5). Es handelt sich um einen weißen kristallinen Feststoff mit der Summenformel $C_8H_{17}NO$ und einem Molekulargewicht von 143,1 g/mol. Die LD_{50} beträgt nach oraler Gabe in der Ratte 890 mg/kg KG. VPD ist als Humanteratogen klassifiziert (Phiel *et al.* 2001).

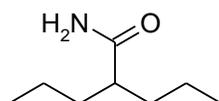


Abbildung 1.5: Strukturformel von Valpromid

Valpromid wird seit ca. 35 Jahren als antipsychotisches und antiepileptisches Arzneimittel eingesetzt. Es handelt sich um ein „Prodrug“, da es beim Menschen nach oraler Applikation einem „first-pass“-Effekt unterliegt und zu Valproinsäure (VPA) metabolisiert wird, bevor es den systemischen Kreislauf erreicht (Bialer *et al.* 1984; Bialer 1991). VPD und VPA besitzen antikonvulsive Eigenschaften, wobei VPD die größere Potenz aufweist. In der Humanmedizin werden VPD- bzw. Natrium-Valproat-Präparate zur Behandlung tonisch-klonischer Krampfanfälle, non-convulsiver Anfälle, Migräne und bipolar affektiver Störungen eingesetzt. Außerdem wird die Anwendung zur Therapie von Krebs und HIV-Infektion klinisch untersucht (Andrews *et al.* 1995; Eikel *et al.* 2006b; Kiang *et al.* 2006; Loescher und Nau 1985).

Die Hydrolyse von VPD zu VPA wird durch nicht näher bestimmte Amidasen katalysiert. VPA wird in der Leber des Menschen vorwiegend durch CYP2C9, weniger durch 2A6 und 2B6 an den Positionen ω und $\omega-1$ hydroxyliert. An Position 4 wird eine Doppelbindung eingeführt. Für die Bildung von 3-Hydroxy-VPA ist CYP2A6 verantwortlich. Die Bildung von 2-en-VPA findet über die β -Oxidation in den Mitochondrien statt. Die Hydroxylierung an Position 4 und 5 und die Entsättigung an Position 4 werden in der Leber der Ratte durch CYP2B1 katalysiert. Position 3 wird nach Induktion mit Pregnenolon-16 α -Carbonitril durch CYP3A1 hydroxyliert. Den Hauptkonjugationsweg bildet die Glucuronsäurekonjugation der Hydroxylgruppen. Diese können außerdem an Position 3 oder 4 durch Alkoholdehydrogenasen zu Keto-VPA oxidiert werden. 2,4-dien-VPA, welches über β -Oxidation

aus 4-en-VPA entsteht, wird mit GSH konjugiert und zur Mercaptursäure verstoffwechselt (Kiang *et al.* 2006; Kiang *et al.* 2011; Lee *et al.* 2009). Die elektrophilen Metaboliten 4-en- und 2,4-dien-VPA stehen unter Verdacht, für die in seltenen Fällen auftretende, aber akute Hepatotoxizität von VPA verantwortlich zu sein. Sie können zu Störungen mitochondrialer Stoffwechselreaktionen wie der oxidativen Phosphorylierung, der Gluconeogenese, der Harnstoffsynthese und der β -Oxidation führen. Außerdem wurde die Abnahme des intrazellulären GSH-Spiegels in der Kultur primärer Rattenhepatozyten nach VPA-Inkubation beobachtet. Als Folge kommt es zur mikrovesikulären Verfettung der Leber. Phenobarbital und andere Enzyminduktoren erhöhen die Bildung von 4-en-VPA und das Risiko der Hepatotoxizität (Fisher *et al.* 1991; Ho *et al.* 2003; Rettie *et al.* 1988; Turnbull *et al.* 1983).

Die Verabreichung von Valproat-Präparaten während der Schwangerschaft führt in vielen Spezies, darunter Ratte, Maus, Kaninchen und Mensch zu Malformationen am Herzen und am Skelett. Neuralrohrdefekte wie Exenzephalie und Spina bifida aperta treten nur bei der Maus und dem Menschen auf. Diese Beobachtung führte dazu, dass die Maus als Modell für Neuralrohrdefekte durch VPA und Analoga für den Menschen verwendet wird (Eikel *et al.* 2006b; Okada *et al.* 2009). Die subkutane Injektion von VPD und VPA in NMRI-Mäuse am achten Tag der Schwangerschaft führte zu 53 % Exenzephalie durch VPA und 6 % durch VPD. Die pharmakokinetischen Studien zeigen entgegen den Untersuchungen beim Menschen einen geringen Umsatz von VPD zu VPA (Radatz *et al.* 1998). Die maximale VPA-Plasmakonzentration (c_{max}) in der NMRI-Maus beträgt 10 % der für den teratogenen Effekt benötigten Plasmakonzentration. Radatz *et al.* leiten daraus ab, dass VPD eine geringere embryoschädigende Potenz besitzt als VPA (Radatz *et al.* 1998).

Der embryoschädigende Mechanismus von VPA ist bis heute nicht vollständig geklärt. Phiel *et al.* entdeckten 2001 an Xenopusembryonen neben einer starken Retardierung des Wachstums eine signifikante Inhibition von Histondeacetylasen (HDACs), welche durch VPD nicht ausgelöst wurde (Phiel *et al.* 2001). Dieses Ergebnis wurde von Eikel *et al.* bestätigt, welche *in vitro* an der murinen F9-Teratokarzinomzelllinie und *in vivo* an einem NMRI-Exenzephalon-Maus-Modell eine Hyperacetylierung von Histonen nach VPA-Behandlung nachweisen konnten (Eikel *et al.* 2006a; Eikel *et al.* 2006b; Nau *et al.* 1981). Außerdem konnte eine HDAC-Inhibition an HeLa-Zellen gezeigt werden, welche durch VPD nicht auftrat. Eine *in utero*-Exposition von VPA führte in Untersuchungen von Menegola zu einer Steigerung der Expression acetylierter Histone in den Somiten von Mausembryonen

(Menegola *et al.* 2010). HDACs sind für die Struktur des Chromatins verantwortlich und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression. Die Enzyminhibition kann zu Störungen der Transkription, Translation und Signaltransduktion in der Zelle führen und die Entwicklung eines Organismus beeinflussen (Phiel *et al.* 2001; Sha und Winn 2010). In den *in vitro*-Embryotoxizitätstests EST, FACS-EST und ReProGlo-EST wurde VPA als schwach embryotoxisch klassifiziert (Genschow *et al.* 2004; Riebeling *et al.* 2011; Uibel *et al.* 2010). VPD wurde von Binder im EST getestet und ebenfalls als schwach embryotoxisch klassifiziert (Binder 2008).

1.4.4 2-Acetylaminofluoren

2-Acetylaminofluoren (*N*-(2-Fluorenyl)acetamid, 2-AAF) ist ein aromatisches Aminderivat (Abbildung 1.6) Es handelt sich um ein beiges kristallines Pulver mit der Summenformel $C_{15}H_{13}NO$ und einem Molekulargewicht von 223,27 g/mol. Die LD_{50} beträgt in der Maus nach oraler Gabe 810 mg/kg KG. 2-AAF ist als Humankarzinogen klassifiziert.

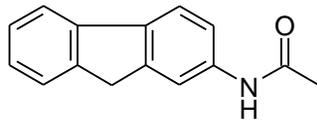


Abbildung 1.6: Strukturformel von 2-Acetylaminofluoren

2-AAF wurde neben 2-Aminofluoren (2-AF) Anfang der 40er Jahren in den USA als Insektizid entwickelt. Trotz geringer akuter Toxizität wurden sie aufgrund der kanzerogenen Eigenschaft jedoch nie vermarktet. Hauptzielorgane sind die Leber und die Harnblase, aber auch in der Haut und in der Brustdrüse von Ratten wurden Tumore nachgewiesen. Heute dient 2-AAF hauptsächlich zur Untersuchung des Einflusses einer metabolischen Aktivierung bei der chemischen Kanzerogenese und als Positivkontrolle für Mutagenitäts- und Kanzerogenitätstest *in vivo* und *in vitro* (Heflich und Neft 1994; Kriek 1992).

Der Metabolismus von 2-AAF wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in subzellulären Fraktionen der Leber der Ratte und des Kaninchens untersucht. 2-AAF wird in der Ratte durch CYP1A1 und 1A2 hydroxyliert. Die N-Hydroxylierung im Menschen wird durch CYP1A2 katalysiert. Metaboliten sind 3-, 5-, 7- und 9-Hydroxy-AAF (OH-AAF), AAF-9-on und N-Hydroxy-AAF (NOH-AAF), Acetoxy-2-acetylaminofluoren (2-AAAF), zweifach

hydroxylierte AAF-Metaboliten und 2-Aminofluoren (2-AF) (Lenk und Rosenbauer- Thilmann 1993; Lotlikar *et al.* 1967). Die metabolische Aktivierung von 2-AAF wurden in Kulturen primärer Ratten- und Humanhepatozyten untersucht (Monteith und Strom 1990; Spilman und Byard 1981). C-Hydroxylierungen werden als detoxifizierend angesehen, da die resultierenden Metaboliten eine geringere mutagene und kanzerogene Potenz besitzen. NOH-AF kann säurekatalysiert über die Bildung eines Nitreniumions direkt DNS-Addukte bilden. Die O-Acetylierung von NOH-AF, die N, O-Transacetylierung von NOH-AAF und die Übertragung von Sulfatresten auf NOH-AAF und NOH-AF führen aufgrund guter Abgangsgruppen ebenfalls zur Bildung von elektrophilen Nitreniumionen, welche Addukte mit der DNS ausbilden können. Acetylierte DNS-Addukte sind *N*-(desoxyguanosin-8-yl)-AAF und 3-(desoxyguanosin-*N*²-yl)-AAF. *N*-(desoxyguanosin-8-yl)-AF bildet ein *N*-deacetyliertes DNS-Addukt.

Die Embryotoxizität von 2-AAF wurde in den 60er Jahren von Izumi an Mäusen festgestellt (Izumi 1962a; Izumi 1962b). Verringerte Fötengewichte, Skelettfehlbildungen und Gaumenspalten wurden beobachtet. Untersuchungen von Faustman-Watts mit 2-AAF in der Kultur von Rattenembryonen in Anwesenheit einer Leber-Mikrosomenfraktion führten zu Störungen des Neuralrohrverschlusses (Faustman-Watts *et al.* 1983). NOH-AAF und 2-AAAF, zwei proximale Mutagene, führen ohne metabolische Aktivierung dagegen zu ventrolateralen Protrusionen und Hypoplasien in der Region des Prosenzephalons. Deacetylierte Metaboliten von 2-AAF, NOH-AF und Nitrosofluoren, führen ohne Biotransformationssystem ebenfalls zu Malformationen, welche sich von denen des metabolisch aktivierten AAFs unterscheiden (Faustman-Watts *et al.* 1984a). Über den Einsatz einzelner Ring-hydroxylierter AAF-Metaboliten konnte 7-OH-AAF als der für die Störung des Neuralrohrverschlusses verantwortliche Metabolit identifiziert werden (Faustman-Watts *et al.* 1985). Die Ergebnisse widerlegen die These, dass es sich bei C-Hydroxylierungen von 2-AAF grundsätzlich um Entgiftungsreaktionen handelt (s. o).

2 Aufgabenstellung

Die *in vitro*-Embryotoxizitätstests EST und WEC gelten hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit und Prädiktivität als validierte Testmethoden zur Prüfung auf Embryotoxizität. Dies ist das Ergebnis der 2002 von der ECVAM durchgeführten Ringversuche (Genschow *et al.* 2002). Neben den begrenzten Entwicklungsphasen und Differenzierungsprozessen, welche im EST und der WEC abgebildet werden, stellt die fehlende metabolische Aktivität der Systeme eine Anwendungsbeschränkung dar, welche die Anwendung der Testsysteme für regulatorische Zwecke ausschließt (Spielmann *et al.* 2006). In einem ECVAM Workshop wurde die Biotransformation von Fremdstoffen als „Flaschenhals“ für den erfolgreichen Einsatz von *in vitro*-Toxizitätstests bezeichnet (Coecke *et al.* 2006). Ziel ist die Entwicklung einer *in vitro*-Methode, welche sowohl den Effekt der Ausgangssubstanz als auch der daraus möglicherweise resultierenden Metaboliten erfasst. In dem Workshop wird die Integration eines metabolisch aktiven Systems in den EST zur Erhöhung der behördlichen Akzeptanz empfohlen (Coecke *et al.* 2006). Die Problematik der fehlenden metabolischen Aktivierung in *in vitro*-Embryotoxizitätstests wurde bereits in den 1980er Jahren in der WEC erkannt. Einige Lösungsansätze wurden seither evaluiert: Leber-S9- und Mikrosomen-Fractionen wurden direkt oder als Präinkubat in die WEC eingesetzt. Die Enzymaktivität fällt jedoch unter Serumbedingungen ab und der Zusatz der S9-Fraktion erwies sich in höheren Konzentrationen als embryotoxisch (Fantel *et al.* 1979; Kitchin *et al.* 1981; Luijten *et al.* 2008). Außerdem können bei der Verwendung subzellulärer Fraktionen nur enzymatische Prozesse berücksichtigt werden, welche über die vorhandenen Enzyme katalysiert und durch den Zusatz des jeweiligen Kofaktors unterstützt werden. Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Kombination eines metabolisch aktiven Systems mit dem EST und der WEC erlauben bis heute keine Entwicklung eines standardisierten Protokolls zur Prüfung von Proteratogenen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob und in welcher Form zelluläre Leber-*in vitro*-Systeme der Ratte für die metabolische Aktivierung von Proteratogenen geeignet sind und ob eine Aktivierung im 3T3-Zytotoxizitätstest, welcher einen Bestandteil des EST bildet, nachgewiesen werden kann. Ziel der Arbeit ist die Entwicklung einer

Präinkubationsmethode, welche die Überführung von Inkubaten aus primären Hepatozyten und Leberschnitten der Ratte in die 3T3-Zielkultur vorsieht. Dies erfordert die Anpassung der Kulturbedingungen der Biotransformationssysteme und 3T3-Fibroblasten, um die fremdstoffmetabolisierende Aktivität zu gewährleisten und die Vitalität und Proliferation der 3T3-Zellen nicht zu beeinträchtigen. Um den Effekt einer metabolischen Aktivität im System abzuschätzen, werden neben den Modellsubstanzen CPA, ABZ, VPD und 2-AAF auch deren Metaboliten Acr, ABZSO, VPA und NOH-AAF im 3T3-Zytotoxizitätstests untersucht. Ein aus den zellulären Biotransformationssystemen möglicherweise auftretender unvollständiger Umsatz der Testsubstanzen wird in der 3T3-Kultur durch definierte Mischungen des Pro- und Teratogens simuliert. Anhand analytischer Untersuchungen der Inkubate aus den Hepatozytenkulturen wird der Umsatz der Testsubstanzen und das Metabolitenprofil ermittelt und der Erfolg des Nachweises einer metabolischen Aktivierung im Vergleich mit den Mischungsversuchen abgeleitet. Zur Überprüfung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Präinkubationsmethode werden die Testsubstanzen in den Hepatozytenkulturen inkubiert und die Überstände in den 3T3-Zytotoxizitätstest überführt. Die Arbeit bildet ein Teilprojekt des BMBF-geförderten Vorhabens „Entwicklung eines Biotransformationssystems für die metabolische Aktivierung von validierten *in vitro*-Systemen zur Prüfung auf Embryotoxizität“ und wird in der Experimentellen Toxikologie und Ökologie der BASF SE in Ludwigshafen angefertigt. Das Projekt findet in Zusammenarbeit mit der Charité-Universitätsmedizin Berlin und dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin statt, welche die Untersuchungen der Testsubstanzen in der WEC bzw. den Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest des EST durchführen und die Toleranz der Systeme gegenüber Hepatozyteninkubaten untersuchen. Dazu werden im Rahmen dieser Arbeit Inkubate aus Rattenhepatozyten zur Verfügung gestellt. Neben zellulären Leber-*in vitro*-Systemen der Ratte werden primäre Schweine- und Humanhepatozyten zur metabolischen Aktivierung der Testsubstanzen herangezogen und die Inkubate in die Zielkulturen der WEC und des EST überführt. Diese werden von der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg (MLU) bzw. der Technischen Universität in München (TUM) präpariert und dienen der Identifikation möglicher speziesspezifischer Metabolitenprofile.

3 Material

3.1 Referenzsubstanzen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Testsubstanzen Cyclophosphamid (CPA), Acrolein (Acr), Albendazol (ABZ), Albendazolsulfoxid (ABZSO), Valpromid (VPD), Valproinsäure (VPA), 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) und N-Hydroxy-2-Acetylaminofluoren (NOH-AAF) untersucht. Cyclophosphamid und Acrolein werden aufgrund der Instabilität als Reinsubstanz von der Projektleitung Charité-Universitätsmedizin Berlin, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Leitung Prof. Ralf Stahlmann, zur Verfügung gestellt und nach Bedarf angesetzt. Valproinsäure wird als Stammlösung in PBS angesetzt. Alle anderen Referenzsubstanzen werden von der Charité Berlin als DMSO-Lösung bereitgestellt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Konzentrationen der Stammlösungen sind in Tabelle 3.1 ersichtlich.

Tabelle 3.1: Stammlösungen der Referenzsubstanzen

Referenzsubstanz	Konzentration		Lösungsmittel	Hersteller/ Quelle
	mg/ml	mM		
CPA	27,9	100,0	PBS	BASF/ Sigma
Acr	5,6	100,0	DMSO	BASF/ Sigma
ABZ	10,0	37,7	DMSO	Charité Berlin/ Sigma
ABZSO	10,0	35,5	DMSO	Charité Berlin/ Dayang Chemicals
VPD	300,0	2094,5	DMSO	Charité Berlin/ Dayang Chemicals
VPA	100,0	601,7	PBS	Charité Berlin/ Sigma
2- AAF	200,0	895,8	DMSO	Charité Berlin/ Sigma
NOH- AAF	100,0	417,9	DMSO	Charité Berlin/ Endotherm

3.2 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien werden aus üblichen Quellen des Handels in einer ihrer Anwendung gemäßen Reinheit bezogen.

15 α , 2 α , 2 β , 6 α , 6 β , 16 α , 16 β -Hydroxytestosteron	Sigma
4-Androsten-3, 17-dion	Fluka
5'-Adenosinmonophosphat	Sigma
Bovine Serum Albumin	Roche
Bradford Reagenz	Sigma
Calciumchlorid dihydrat	Sigma
CASY TON	Innovatis
Kollagenase von Clostridium histolyticum Typ IV	Sigma
Dicumarol (3,3'-Methylene-bis(4-hydroxycoumarin)	Sigma
DMSO	J.T. Baker
Dulbecco's MEM, 4,5 g/l Glukose	Biochrom
"Earl's buffered salt solution"	Biochrom
EDTA	Riedel-de Haën
EGTA	Sigma
Fetales Rinderserum	Biochrom
Gentamicin-Sulfatlösung	Sigma
Glukose-6-Phosphat	Sigma
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Sigma
"Hank's buffered salt solution"	Biochrom
Krebs-Henseleit-Puffer	Sigma
L-Glutamin	Biochrom
Magnesiumchlorid anhydrid	Sigma
Magnesiumchlorid hexahydrat	Sigma
NADPH	Calbiochem
Narcoren: Pentobarbital-Natrium	Merial GmbH
Natriumacetat	Riedel-de Haën
Natriumbicarbonat-Lösung	Sigma
Natriumdodecylsulfat	Sigma
„Newborn calf serum“	Biochrom
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom

Material

“Phosphate buffered saline w und w/o Ca/ Mg”	Biochrom
Protease Inhibitor Tablette (Complete Mini)	Roche
Resorufin Na-Salz	Sigma
Resorufinbenzylether	Sigma
Resorufinethylether	Sigma
Resorufinpentylether	Sigma
Testosteron	Sigma
“Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid” (MTT)	Sigma
Tris: Trizma base	Riedel-de Haën
Trizol-Reagenz	Invitrogen
Williams Medium E	Biochrom
β -Glucuronidase/ Arylsulfatase from <i>Helix pomatia</i>	Roche
Nonidet P40	Roche

3.3 Pufferlösungen

Krebs-Henseleit-Puffer (KHB)

Für die Präparation von Leberschnitten wird folgender Puffer verwendet:

Krebs-Henseleit-Puffer	
Calciumchlorid	0,373 g/l
Natriumbicarbonat-Lösung (7,5 %)	28 ml/l
in 1 l ddH ₂ O lösen und mit HCl pH-Wert auf 7,4 einstellen	

Zur Herstellung der mikrosomalen Fraktion aus Leberschnitten werden folgende Puffer verwendet:

Homogenisationspuffer:

Saccharose	250 mM
EDTA	1 mM
in ddH ₂ O lösen	

Resuspensionspuffer:

Glutathion	0,5 mM
Tris- Puffer	1,5 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2 mM
KH ₂ PO ₄	50 mM
Glycerin (20%)	10%
in ddH ₂ O lösen und mit 2 M NaOH pH-Wert auf 7,5 einstellen	

AROD-Reaktionspuffer

Zur Aufnahme der Kinetik der CYP-Aktivität werden primäre Hepatozyten in folgendem Puffer kultiviert:

Na ₂ HPO ₄	1 mM
NaCl	137 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	0,5 mM
Glukose	10 mM
HEPES	10 mM
in ddH ₂ O lösen und mit HCl pH-Wert auf 7,4 einstellen	

RIPA-Lysepuffer

Zur Gewinnung des Zelllysats aus Rattenhepatozyten für den Western Blot wird folgender Puffer benötigt:

Tris	10 mM
NaCl	100 mM
EDTA	10 mM
Nonidet P40	0,5 % (v/v)
Deoxycholsäure	0,5 % (v/v)
in ddH ₂ O lösen und mit HCl pH-Wert auf 7,5 einstellen	

Vor Gebrauch wird eine Protease-Inhibitor-Tablette in 50 ml RIPA-Puffer gelöst.

3.4 Geräte

Biofreezer UF 756	Dometic
CASY 1 Zellzähler	Schärfe System
HPLC	Agilent 1100 Series & Jasco PU- 1580
HPLC-Fluoreszenzdetektor	Jasco FP- 1520
HPLC-UV-Detektor	Agilent
Inkubator Heraeus instruments	Thermo- Fisher
Kanülen	Braun
Mikroskop CKX31	Olympus
Perfusionspumpe	Ismatec
Photometer sunrise und infinite 200	Tecan
Photometer Wallac	Perkin-Elmer
Q-TOF	Agilent 6540
Speed-vac Apparatur	Thermo-Fisher
Sterilwerkbänke	Hera safe Thermo scientific
Stickstoff-Tank	Messer, Griesheim
Tissue Lyser	Quiagen
Tissue Slicer	Krumdieck
Ultraschallsonde	B. Braun
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckman
Waage AT 200	Mettler
Wasserbad inkl. Thermostat	Julabo
Zentrifuge Multifuge 3 S-R Heraeus	Thermo-Fisher

3.5 Verbrauchsmaterial

Multiwellplatten, klar	Greiner-bio-one
Multiwellplatten und Petrischalen, Kollagen-beschichtet	Greiner-bio-one
Multiwellplatten, schwarz	Nunc
Multiwellplatten, steril	TPP
Zellkulturflaschen, steril	TPP
Chromafil Cellulose-Acetat-Filter (0,2 µm)	Macherey-Nagel

3.6 Zellsysteme

3.6.1 Hepatozyten und Leberschnitte der Ratte

Für die Präparation von Hepatozyten und Leberschnitten werden männliche Wistar Han Ratten mit einem Gewicht von 250 bis 350 g verwendet, welche von Charles River, Sulzfeld, Deutschland, bezogen werden.

Präparationsmedien

Für die Zwei-Schritt-Kollagenase Perfusion werden folgende Puffer und Medien verwendet:
EGTA-Lösung:

Medium	Hank's buffered salt solution, w/o Ca,Mg
Puffer	HEPES-Puffer (10 mM)
Antibiotika	Gentamicin (50 µg/ml)
Weitere	90 mg EGTA in 1 ml 1 M NaOH

Kollagenase-Perfusionslösung:

Medium	Williams Medium E
Antibiotika	Gentamicin (50 µg/ml)
Puffer	HEPES- Puffer (10 mM)
Weitere	Glutamin (2 mM)
	NaOH 1 M (0,04 %, v/v)
	Kollagenase IV (100 U/ml)

Die Hepatozyten werden in Williams Medium E mit unterschiedlichen Zusätzen kultiviert:

Nährmedien

Einsaatmedium: Williams Medium E complete (WMEC)

Medium	Williams Medium E
Antibiotika	Gentamicin (50 µg/ml)
Serum	FBS (10 %, v/v)
Weitere	Glutamin (2 mM)
	Insulin (0,5 µg/l)
	HEPES Puffer (10 mM)

Kulturmedium: Williams Medium E incomplete (WMEI)

Medium	Williams Medium E
Antibiotika	Gentamicin (50 µg/ml)
Weitere	Glutamin (2 mM)
	Insulin (0,5 µg/l)
	HEPES Puffer (10 mM)

Zur Anpassung der Hepatozyten an den EST werden die Zellen in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert, welches analog zum WMEC/I hergestellt und als DMEMC und DMEMI bezeichnet wird. Für die Kombination mit der WEC werden Hepatozyten in einer Serum-Mischung, bestehend aus 90 % (v/v) Rinderserum und 10 % (v/v) Rattenserum, kultiviert, welcher vor Versuchsbeginn 7,5 % (v/v) HBSS zugesetzt werden (im Folgenden als WEC-Medium bezeichnet). Die Präinkubation und die Kultur der Leberschnitte werden in WMEC durchgeführt.

3.6.2 3T3-Fibroblasten

Balb/c 3T3-Fibroblasten vom Klon A31 werden von RCC Cytotest Cell Research, Rossdorf, Deutschland, bezogen.

Nährmedium

Medium	DMEM
Serum	Newborn calf serum (NCS) (10 %, v/v)
Antibiotika	Penicillin/Streptomycin (50 U/ml, 50 µg/ml)
Weitere	Glutamin (4 mM)

Dieses Medium wird sowohl für den Test auf Zytotoxizität der Referenzsubstanzen als auch bei der Zumischung frischen Mediums zu präinkubiertem Hepatozytenmedium verwendet.

Einfriermedium

Medium	DMEM-Nährmedium
Serum	zusätzlich NCS (10 %, v/v)
Weitere	DMSO (10 %, v/v)

4 Methoden

4.1 Präparation zellulärer *in vitro*-Metabolismussysteme

4.1.1 Primäre Rattenhepatozyten

Die Isolierung der Hepatozyten erfolgt nach einem modifizierten Zwei-Schritt-Perfusions-Protokoll nach Seglen (Seglen 1976). Es werden männliche Ratten des Stamms Wistar Han mit einem Gewicht von ca. 250 g verwendet. Die Tiere werden unter Tag-Nacht-Zyklus (12 Stunden/12 Stunden) gehalten und haben freien Zugang zu Wasser und Standardfutter. Die Narkotisierung des Tieres erfolgt über eine intraperitoneale Injektion von 1,8 ml/kg KG Pentobarbital-Natrium-Lösung (160 mg/ml). Das narkotisierte Tier wird auf einem Präparierbrett fixiert und das Bauchfell mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Das Abdomen wird entlang der *Linea Alba* geöffnet und die Leber freigelegt. In die Portalvene (*Vena portae*) wird eine Kanüle eingeführt, welche unterhalb der Kanülenmündung mit einer Dieffenbach-Klemme fixiert wird. Zunächst wird über einen Volumenstrom von 20 ml/min und die Öffnung der *Vena cava* die Leber mit einem EGTA-Puffer blutfrei gespült. Anschließend erfolgt die Perfusion mit kollagenasehaltigem Medium. Dazu wird die *Vena cava* abgeklemmt und es kommt zum Anschwellen der Leber. Die Kollagenase führt zur Auflösung des Gewebeverbands innerhalb der Leber, wodurch die Hepatozyten mobilisiert werden können. Die Leber wird entnommen, in ein eiskaltes steriles Becherglas überführt und mit kaltem WMEI-Kulturmedium gewaschen. Unter einer sterilen Werkbank wird in 15 ml Perfusionsmedium die Leberkapsel mit einem Metallkamm geöffnet und die Hepatozyten ausgekämmt. Nach Zusatz von 20 ml kaltem WMEI-Kulturmedium wird die Zellsuspension durch eine sterile Gaze filtriert und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Durch zweimalige Zentrifugation (5 min, 40 x g, 4 °C) werden die Hepatozyten (Pellet) von den Nicht-Parenchymzellen (Überstand) getrennt. Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet in warmem WMEI resuspendiert und die Vitalität mittels Trypanblau-Exklusionstest bestimmt.

Vitalitätsbestimmung: Prinzip

Mit Hilfe von Trypanblau lässt sich die Vitalität von Zellen in Suspension bestimmen. Dieser Farbstoff diffundiert durch Zellmembranen toter Zellen und färbt diese blau. Dadurch lassen sich unter dem Mikroskop tote von lebenden Zellen unterscheiden, die diesen Farbstoff nicht aufnehmen und gelblich-klar erscheinen.

Durchführung:

Für die Bestimmung der Vitalität werden 50 µl Zellsuspension zu 1200 µl 0,4%iger Trypanblaulösung pipettiert und auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Es werden vier Großquadrate mit jeweils 16 Kleinstquadraten ausgezählt und mit Hilfe folgender Formel die Vitalität bestimmt:

$$\% \text{lebende Zellen} = \frac{\text{lebende Zellen}}{\text{tote} + \text{lebende Zellen}} \times 100$$

Für die Experimente werden Hepatozytenkulturen mit einer Vitalität von > 85 % eingesetzt.

4.1.1.1 Kultivierung

Die Hepatozyten werden in mit Kollagen Typ 1 beschichteten Kulturplatten bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchte über insgesamt ca. 60 Stunden kultiviert. Die Einsaat erfolgt in WMEC, welches nach 12 Stunden durch WMEI (vgl. Kap. 3.6.1) ersetzt wird. Dieser Zeitpunkt wird im Folgenden als Inkubationsbeginn (0 Stunden) definiert. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die einzelnen Zellzahlen und verwendeten Kulturgefäße.

Tabelle 4.1: Kulturbedingungen primärer Hepatozyten der Ratte

Art der Studie	Zellzahl/ml	Platte	Volumen/well
Metabolismusstudien	7,5*10 ⁵	6-well	2 ml Medium
		Petrischale Ø 90 mm	10 ml Medium
Zytotoxizität	2,0*10 ⁵	24-well	1 ml Medium
CYP-Aktivitätsmessung	1,25*10 ⁵	96-well, schwarz	0,2 ml Medium

4.1.2 Leberschnitte der Ratte

Die vorgekühlte Microtomeinheit eines „Krumdieck-Tissue Slicers“ wird zur Desinfektion zunächst mit 70%igem Ethanol, anschließend zweimal mit eiskaltem Krebs-Henseleit-Puffer (KHB) gespült und mit frischem KHB gefüllt. Zur Gewinnung der Leber wird eine männliche Ratte (Wistar Han) mit einem Gewicht von ca. 300 g durch das Inhalationnarkotikum Isofluran (Konzentration: 0,5 bis 3,0 %) betäubt. Die Tötung erfolgt durch Entbluten.

Das Tier wird auf einem Präparierbrett fixiert und das Bauchfell mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Nach Öffnung des Abdomens entlang der *Linea Alba* wird die Leber entnommen, in eiskaltem KHB überführt und dort während der gesamten Präparation gelagert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen auf Eis bzw. in eiskaltem KHB. Aus den Leberlappen werden mit Hilfe einer Zylinderstanze manuell Gewebezyylinder mit einem Durchmesser von 8 mm gestanzt. Diese werden in die dafür vorgesehene Halterung des „Tissue Slicers“ überführt. Nach Einstellung der Schnittdicke auf 200 µm werden automatisch Gewebeschnitte angefertigt, welche in der Glasfalle gesammelt werden. In regelmäßigen Abständen werden die Schnitte über die Öffnung der Schlauchklemme aus der Glasfalle ausgespült und in eine mit KHB gefüllte Petrischale auf Eis überführt. Lediglich Schnitte, welche eine homogene Schnittdicke aufweisen, werden in vorgewärmtes WMEC-Medium überführt und in einem mit Carbogen gefluteten Inkubator bei 37 °C für ca. eine Stunde präinkubiert.

4.1.2.1 Kultivierung

Im Anschluss an die Präinkubation werden zwei Schnitte pro well in eine mit 5 ml WMEC-Medium pro well gefüllte 6-well Platte überführt. Diese Kulturform wird sowohl für CYP-Aktivitätsbestimmungen und die Testsubstanzinkubationen als auch für die Inkubation-Überführung in die 3T3-Zielkultur verwendet. Die Inkubation erfolgt für bis zu 30 Stunden auf einem Schüttler (150 rpm) unter den Bedingungen der Präinkubation.

4.1.2.2 Isolierung der mikrosomalen Fraktion

Die CYP-Aktivitätsbestimmung in Leberschnitten erfolgt aus der mikrosomalen Fraktion des Schnitthomogenats. An den nachfolgend angegebenen Zeitpunkten werden je sechs gleichbehandelte Schnitte auf einem Zellstofftuch abgetupft, in einem Gefäß gesammelt, das Nassgewicht bestimmt und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Nun folgende

Arbeiten werden auf Eis durchgeführt. Das Gewebe wird mit 500 µl Homogenisationspuffer und einer eiskalten Edelstahlkugel versetzt und in einem „Tissue Lyser“ 30 s homogenisiert. Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 9.000 x g, 4 °C werden Zellmembranen, Zellkerne und Mitochondrien pelletiert. Der Überstand, die sog. S9-Fraktion, wird bei 100.000 x g eine Stunde bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in Resuspensionspuffer (1 ml/g Nassgewicht) mittels einer Ultraschallsonde resuspendiert. Die mikrosomale Fraktion wird bei -80 °C asserviert.

4.1.2.3 Proteinbestimmung

Prinzip

Die Proteinbestimmung der mikrosomalen Fraktion wird anhand der Methode nach Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau bildet in Anwesenheit von Phosphorsäure mit basischen und aromatischen Aminosäuren einen Komplex. Dabei kommt es zur Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 595 nm, bei der die Proteinlösungen photometrisch gemessen werden.

Durchführung

In einer 96-well-Platte werden zu 5 µl Proteinlösung 250 µl Bradford-Reagenz pipettiert, 1 min geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Neben den Proben wird eine externe Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von 0,03 bis 1,00 mg/ml „Bovine-Serum-Albumin“ (BSA) photometrisch bei 595 nm gemessen. Die Proteingehaltsbestimmung der Proben erfolgt über die Regressionsgerade der BSA-Standards. Für die CYP-Aktivitätsbestimmung wird eine Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Resuspensionspuffer hergestellt.

4.2 Charakterisierung zellulärer *in vitro*-Metabolismussysteme

4.2.1 Zytotoxizitätstest in primären Rattenhepatozyten

Prinzip

Das Tetrazoliumsalz Methylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid (MTT) dient der colorimetrischen Bestimmung der Vitalität von Zellen. Durch mitochondriale Dehydrogenasen wird in vitalen Zellen der gelbliche, wasserlösliche Farbstoff MTT zu einem violetten unlöslichen Formazan reduziert.

Durchführung

Es werden 0,5 g MTT in 100 ml PBS-Puffer gelöst und steril filtriert. Diese Lösung wird mit Kulturmedium um den Faktor 10 verdünnt und auf die zuvor zweimal mit PBS^{+/+} gewaschenen Zellen pipettiert und zwei Stunden inkubiert. Durch Zugabe einer 10%igen SDS-DMSO-Lösung werden die Zellen lysiert und die Kristalle solubilisiert. Die Probe wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen 690 nm gemessen. Der erhaltene Wert ist direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen (Mosmann 1983).

4.2.1.1 Zytotoxizität der Testsubstanzen in Rattenhepatozyten

Um eine maximale Metabolisierung der Referenzsubstanzen in Hepatozyten zu erreichen, werden ausgewählte Stoffkonzentrationen in die Hepatozytenkultur eingesetzt. Deren zytotoxischer Einfluss wird mittels MTT-Test untersucht. Zu Inkubationsbeginn (0 Stunden) werden die Hepatozyten für 24 und 48 Stunden mit den in Tabelle 4.2 dargestellten Konzentrationen der Referenzsubstanzen inkubiert. Dabei werden je drei wells gleich behandelt. Neben der Lösungsmittelkontrolle von 0,2 % (v/v) DMSO wird eine Positivkontrolle (1 % (v/v) Triton X-100) mitgeführt. Zur Abschätzung der gewählten Konzentrationsbereiche werden bereits publizierte Zytotoxizitätsdaten der Testsubstanzen in Hepatozytenkulturen und die Konzentrationsbereiche der Teratogene im EST und der WEC herangezogen (Baliharova *et al.* 2003b; Fisher *et al.* 1991; Mirkes *et al.* 1984; Riebeling *et al.* 2011; Rolin *et al.* 1989b; Spilman und Byard 1981; Takeuchi *et al.* 1988; Turnbull *et al.* 1983; van Aerts *et al.* 1993; Velik *et al.* 2003).

Tabelle 4.2 Substanzkonzentrationen im Zytotoxizitätstest in Rattenhepatozyten

Substanz	Konzentration [μM]			
	10	100	1000	
CPA	10	100	1000	
Acr	4	20	100	
ABZ	0,1	1	10	25
ABZSO	0,1	1	10	
VPD	10	100	1.000	4.000
VPA	100	1.000	10.000	
2-AAF	1	10	100	
NOH-AAF	1	10	100	

4.2.1.2 Einfluss veränderter Kulturbedingungen auf die Vitalität der Rattenhepatozyten

Zur Anpassung an die Zielkulturen werden primäre Rattenhepatozyten sowohl in DMEM-Medium kultiviert, dem Kulturmedium der 3T3-Fibroblasten und ESZ-D3, als auch in WEC-Medium. Die Vitalität wird nach 24 und 48 Stunden mittels MTT-Test ermittelt und auf die Standardmediumkontrolle (WMEI) normiert. Als Positivkontrollen dient 1 % (v/v) Triton X-100.

4.2.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

4.2.2.1 Alkoxyresorufin-O-Dealkylase-Aktivitäten

Prinzip

Bei den alkoxylierten Derivaten des Resorufins, Resorufinethylether, -pentylether und benzylether handelt es sich um spezifische Substrate unterschiedlicher CYP-Isoenzyme. Die Aktivität der Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD; Ratte: u. a. CYP1A1 und 1A2), der Pentyloxyresorufin-O-Depentylase (PROD; Ratte: u. a. CYP2B1/2) und der Benzyloxyresorufin-O-Benzylase (BROD; Ratte: u. a. CYP1A1, 2B1/2 und 3A1), wird über die Freisetzung von Resorufin aus den Substraten fluorimetrisch gemessen (vgl. Abbildung 4.1). Die Quantifizierung erfolgt über eine Kalibriergerade des Resorufins (Burke und Mayer 1974).

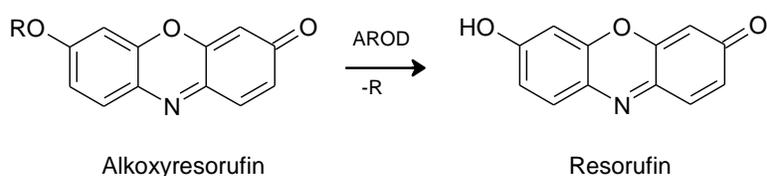


Abbildung 4.1: Enzymatische Spaltung von Alkoxyresorufin-Derivaten
(AROD: Alkoxyresorufin-O-Dealkylase)

4.2.2.1.1 Primäre Rattenhepatozyten

Zur Bestimmung der CYP-Aktivität von Rattenhepatozyten findet die Kultivierung der Zellen grundsätzlich in schwarzen 96-well-Platten mit klarem Boden statt. Die Messung erfolgt als Dreifachbestimmung zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten in Reaktionspuffer (vgl. Kap. 3.3). Neben den in DMSO gelösten Substraten Ethyl-, Pentyl- und Benzyloxyresorufin wird

dem Reaktionsansatz Dicumarol zugesetzt, welches die DT-Diaphorase hemmt und eine Oxidation des gebildeten Resorufins unterbindet. Der Gesamtansatz ist Tabelle 4.3 zu entnehmen.

Tabelle 4.3: AROD-Inkubationslösung für primäre Rattenhepatozyten

Lösung	Stammkonzentration [mM]	Endkonzentration [µM]	Volumen / well [µl]
Dicumarol	1	10	1
Ethyl-, Pentyl- und Benzyloxyresorufin	2,5	10	0,4
Reaktionspuffer			98,6

Nachdem das Medium abgenommen wurde, werden die Zellen zweimal mit temperiertem Reaktionspuffer gewaschen. Anschließend werden 100 µl pro well der ebenfalls vorgewärmten AROD-Inkubationslösung auf die Zellen gegeben. Die Aufnahme der Enzymkinetik erfolgt über 60 Minuten bei 37 °C in einem Fluoreszenzphotometer bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 nm in 5-Minuten Intervallen. Das Zeitintervall mit linearem Kurvenverlauf wird zur Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit herangezogen. Die Quantifizierung des Produkts erfolgt über eine externe Resorufin-Kalibriergerade. Dazu wird eine 1 mM-Stammlösung in DMSO angesetzt, anschließend eine Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 1 bis 1000 nM in Reaktionspuffer hergestellt und fluorimetrisch gemessen. Die Enzymaktivität wird in pmol/min/10⁶ Zellen angegeben. Die Quantifizierungsgrenze (LOQ) wird durch Inkubationen der Substrate ohne Zellen ermittelt, wobei es sich bei \bar{x} um den Mittelwert der abiotisch gebildeten Resorufinkonzentration handelt (Rücker *et al.* 2008). Sie wird in pmol Resorufin angegeben und bei der Berechnung der Resorufinkonzentration der Proben berücksichtigt.

$$\text{LOQ} = (\bar{x} + 3\text{SD}) \times 2$$

CYP-Aktivität unter Standard- und Zielkulturbedingungen

Die basale CYP-Aktivität primärer Rattenhepatozyten wird zu Inkubationsbeginn (0 Stunden) und nach 48 Stunden Kulturperiode gemessen. Dazu werden die Zellen sowohl in WMEI-Standardmedium als auch in den Medien der Zielkulturen des EST und der WEC kultiviert. Dies dient der Untersuchung des Einflusses veränderter Kulturbedingungen auf

die CYP-Aktivität im Hinblick auf die Kombination der Kultursysteme in Form einer Präinkubation. Das DMEM-Medium wird analog zum WME-Medium eingesetzt (vgl. Kap. 3.6.1). Das WEC-Medium wird dagegen erst zu Inkubationsbeginn verwendet, um sicher zu stellen, dass die Hepatozyten angewachsen sind. Die Präinkubation wird mit WMEC durchgeführt. Nach 48 Stunden wird die CYP-Aktivität als Triplikat gemessen.

CYP-Aktivität unter induzierenden Bedingungen

Dem Kulturmedium der Hepatozyten wird ein sog. Induktionscocktail zugesetzt, welcher sich aus 100 μM Phenobarbital, 10 μM β -Naphtoflavon und 0,1 μM Dexamethason zusammensetzt. Die Behandlung mit dem Induktionscocktail erfolgt zunächst über die gesamte Kultivierungsperiode der Hepatozyten, einschließlich der Präinkubationszeit um die größtmögliche Induktion innerhalb von ca. 60 Stunden zu ermitteln. Um eine Testsubstanzinkubation, welche im Hinblick auf eine Überführung ohne Induktoren stattfinden soll, zu berücksichtigen, werden die Hepatozyten 24 Stunden induziert. Es folgt eine Postinkubationsperiode von weiteren 24 Stunden unter Standardbedingungen. Neben WMEI wird das WEC-Medium nach 24 Stunden Induktion in das beschriebene Inkubationsprotokoll eingesetzt. Nach weiteren 24 Stunden wird die CYP-Aktivität gemessen. In Abbildung 4.2 sind die gewählten Zeitschemata graphisch dargestellt. Da das DMEMI- im Vergleich zum WMEI-Hepatozytenmedium bei der Überführung die Vitalität der 3T3-Zellen und ESZ-D3 und die Differenzierungsfähigkeit der ESZ-D3 verringert, wird dies im Induktionsprotokoll nicht berücksichtigt (vgl. Kap. 4.4.1.1 f).

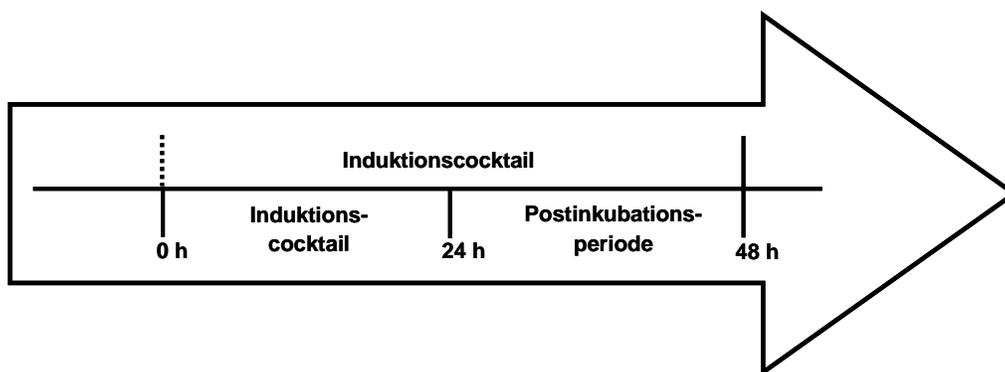


Abbildung 4.2: Induktionsprotokoll primärer Rattenhepatozyten

Oben: Einsatz des Induktionscocktails über die gesamte Kultivierungsperiode. Unten: Einsatz des Induktionscocktails für 24 h, anschließend 24 h Postinkubationsperiode mit WMEI- oder WEC-Medium. Zu den Zeitpunkten 0 h und 48 h wird die AROD-Aktivität bestimmt. Der Induktionscocktail beinhaltet 100 μM PB, 10 μM bNF, 0,1 μM Dex.

4.2.2.1.2 Leberschnitte der Ratte

Um die CYP-Aktivität in Leberschnitten zu bestimmen wird aus je sechs gleichbehandelten Schnitten die mikrosomale Fraktion gewonnen (vgl. Kap. 4.1.2.2) und der Proteingehalt bestimmt. Die Proben werden anschließend auf 1 mg/ml Protein eingestellt. Die Enzymaktivitätsmessung findet in einer schwarzen 96-well-Platte statt mit einem Probevolumen von 100 μ l. Dazu wird ein sog. „Mastermix“ hergestellt, der sich aus in Tabelle 4.4 dargestellten Bestandteilen zusammensetzt:

Tabelle 4.4: „Mastermix“ für die CYP-Aktivitätsbestimmung in der mikrosomalen Fraktion
* zugesetzte Substratlösung richtet sich nach der gewünschten CYP-Aktivitätsmessung

Stammlösungen	Konzentration	Endkonzentration	Volumen pro well [μ l]
MgCl ₂	200 mM	10 mM	5
5'-AMP	200 mM	2 mM	1
G-6-P	500 mM	5 mM	1
G-6-P-DH	0,7 U/ μ l	10 U	1,5
Dicumarol	1 mM	10 μ M	1
Ethoxyresorufin*	200 μ M	2 μ M	1
Pentoxyresorufin*	1 mM	10 μ M	1
Benzyloxyresorufin*	500 μ M	5 μ M	1

Zu 10 μ l der Mikrosomenfraktion werden 74,5 μ l eines 100 mM Tris-HCl-Puffers, pH 7,4 pro well pipettiert. Nach Zugabe von 10,5 μ l Mastermix pro well wird die Platte in das auf 37 °C temperierte Fluoreszenzphotometer gestellt. Die über einen Dispenser durchgeführte Zugabe von 5 μ l pro well einer 2 mM NADPH-Lösung startet die Enzymkinetik, welche über 15 min in 1 Minuten-Intervallen aufgenommen wird. Die Messparameter sind mit denen der Hepatozyten identisch (vgl. Kap. 4.2.2.1.1). Das gebildete Resorufin wird über eine externe Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von 1 bis 1000 nM Resorufin in Tris-HCl-Puffer quantifiziert. Die Enzymaktivität wird in pmol/min/mg Protein angegeben. Die Quantifizierungsgrenze wird durch Inkubationen ohne Protein analog den Hepatozyten ermittelt (vgl. Kap. 4.2.2.1.1). Sie wird in pmol Resorufin angegeben und bei der Berechnung der Resorufinkonzentration der Proben berücksichtigt.

CYP-Aktivität unter basalen und induzierenden Bedingungen

Die basale CYP-Aktivität in Leberschnitten wird zu Inkubationsbeginn (0 Stunden) und nach 6, 12 und 24 Stunden Kultur in WMEC-Medium bestimmt. Um die Induzierbarkeit dieser Enzyme innerhalb der 24 Stunden Kulturperiode zu untersuchen, werden die Leberschnitte mit dem Induktionscocktail behandelt und zu den in Abbildung 4.3 angegebenen Zeitpunkten die CYP-Aktivität bestimmt. Eine Induktionperiode berücksichtigt analog den Hepatozyten eine mögliche Überführung von Leberschnittinkubaten in die Zielkulturen. Aufgrund abnehmender Vitalität der Leberschnitte über eine Kulturperiode von 48 Stunden und eine damit verbundene Verunreinigung des Mediums durch nekrotische Zellen wird die Induktion im Vergleich zur Hepatozytenkultur auf sechs Stunden reduziert. Als Kontrolle wird die Aktivität unter basalen Kulturbedingungen nach 30 Stunden gemessen nachdem nach 6 Stunden ein Mediumwechsel erfolgt.

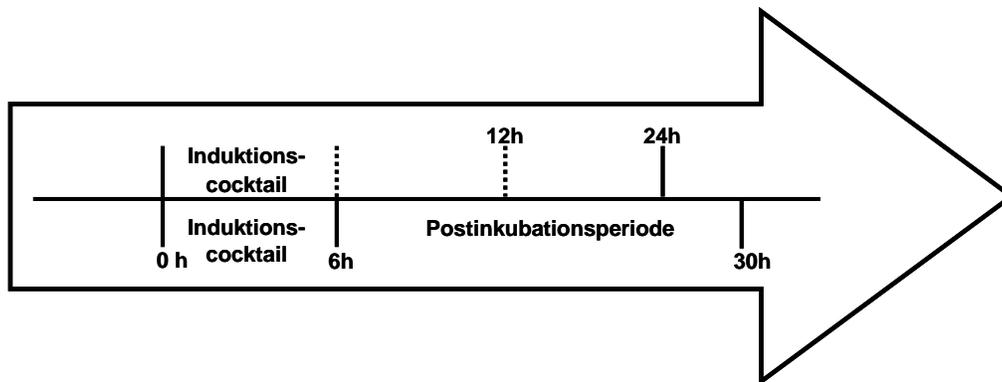


Abbildung 4.3 Enzyminduktion in Rattenleberschnitten

Oben: Einsatz des Induktionscocktails über die gesamte Kultivierungsperiode. Zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h und 24 h wird die AROD-Aktivität bestimmt. Unten: Einsatz des Induktionscocktails für 6 h, anschließend 24 h Postinkubationsperiode mit WMEC-Medium. Zum Zeitpunkt 30 h wird die AROD-Aktivität bestimmt. Der Induktionscocktail beinhaltet 100 μM PB, 10 μM bNF, 0,1 μM Dex.

4.2.2.2 Testosteron-Metabolismus

Prinzip

Das Modellsubstrat Testosteron wird durch unterschiedliche CYP-Isoenzyme stereo- und regioselektiv metabolisiert (vgl. Abbildung 4.4). Über die chromatographische Trennung der Metaboliten lässt sich eine Aussage über die Aktivität dieser Enzyme treffen (Ekins *et al.* 1995). Mit einer β -Glucuronidase/Arylsulfatase-Inkubation können darüber hinaus Informationen über die Aktivität der konjugierenden Enzyme UGT und SULT gewonnen werden (Pfeiffer und Metzler 2004).

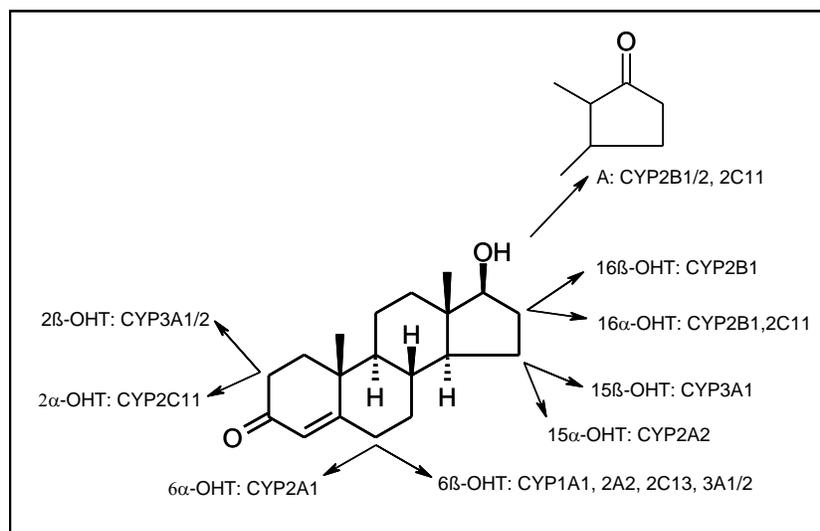


Abbildung 4.4: Stereo- und regioselektiver Metabolismus von Testosteron

Metabolismus des Modellsubstrats Testosteron durch CYP-Enzyme der Ratte. OHT: Hydroxytestosteron, A: Androsten-3,17-dion (Arlotto *et al.* 1991; Hengstler *et al.* 2000a).

Durchführung

Ein 1 ml-Aliquot der aus primären Hepatozyten und Leberschnitten der Ratte gewonnenen Testosteroninkubate wird einer dreifachen Ethylacetat-Extraktion im Volumenverhältnis 2:1 unterworfen. Dabei verbleiben Testosteron- und Hydroxytestosteron-Konjugate aufgrund ihrer Hydrophilie in der wässrigen Mediumphase. Anschließend erfolgt die Einengung der gesammelten organischen Phase in einer „speed-vac“-Apparatur. Der Rückstand wird in einem Volumen eines Methanol-Wasser-Gemischs (75/25, v/v), welches ein Fünftel des Ausgangsvolumens entspricht, resuspendiert. Daraus resultiert neben der Trennung von hydroxylierten und konjugierten Testosteronmetaboliten eine Aufkonzentrierung. Die Trennung und Detektion erfolgt mittels HPLC (vgl. Tabelle 4.5).

In der wässrigen Mediumphase verbleibende konjugierte Metaboliten werden einer β-Glucuronidase/Arylsulfatase-Inkubation unterworfen. Dazu werden 0,5 ml der Probe mittels 0,5 ml eines 1 M-Natriumacetatpuffers (pH 5) auf einen pH-Wert von ca. 5,5 eingestellt und mit 10 µl/ml eines handelsüblichen Gemischs aus β-Glucuronidase und Arylsulfatase aus *Helix pomatia* versetzt und ca. 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die dabei freigesetzten Metaboliten (Testosteron und Hydroxymetabolite) werden mittels Ethylacetat extrahiert, anschließend eingengt, resuspendiert und chromatographisch analysiert.

Tabelle 4.5: Chromatographische Bedingungen der Testosteron-Analytik

Säule	Purospher RP-18 (5 µm) 250 x 4 mm
Eluent	[A]: H ₂ O / MeOH / HCOOH (750 / 250 / 1, v/v/v) [B]: MeOH / H ₂ O / ACN / HCOOH (635 / 350 / 15 / 1, v/v/v/v)
Fluss	0,7 ml/min
Gradient	0 min 25 % [B] 10 min 25 % [B] 35 min 100 % [B] 50 min 100 % [B] 60 min 25 % [B] 70 min 25 % [B]
Detektor	UV; 240 nm

Zur Zuordnung der Peaks und Quantifizierung der Peakflächen aus den Inkubaten werden Eichgeraden im Konzentrationsbereich von 10 bis 250 µM aus Testosteron und folgenden verfügbaren Testosteronmetaboliten hergestellt: 2α-, 2β-, 6α-, 6β-, 16α-, 16β- und 15α-OHT sowie Androsten-3,17-dion. Die berechneten Konzentrationen der Metaboliten werden auf die Summe aller detektierten Analyten normiert. Die Berechnung der Wiederfindung nach 24 Stunden und des Umsatzes erfolgt anhand folgender Formeln:

$$\text{Umsatz [\%]} = \frac{A - B}{A} \times 100 \qquad \text{Wiederfindung [\%]}_{(24h)} = \frac{\sum C_B + C_M}{C_A} \times 100$$

A: Testosteron-Peakfläche „Inkubation ohne Zellen“

B: Testosteron-Peakfläche „Inkubation mit Zellen“

C_A: Konzentration Testosteron „Inkubation ohne Zellen“

C_B: Konzentration Testosteron „Inkubation mit Zellen“

C_M: Summenkonzentration analysierter Metaboliten „Inkubation mit Zellen“

4.2.2.2.1 Primäre Rattenhepatozyten

In der Kultur primärer Rattenhepatozyten werden 200 µM Testosteron mit und ohne Zellen über 24 Stunden in WMEI-Medium inkubiert und der Überstand bis zur Aufarbeitung bei -20 °C asserviert. Der Einfluss des Induktionscocktails auf den Metabolismus des Modells substrats wird untersucht, indem die Hepatozyten für 24 Stunden mit dem

Induktionscocktail und für weitere 24 Stunden mit 200 μM Testosteron in WMEI-Medium inkubiert werden.

Das Inkubationsprotokoll wurde den Projektpartnern an der TUM und der MLU zur Verfügung gestellt, welche Testosteron in primären Human- und Schweinehepatozyten unter basalen und induzierten Bedingungen inkubiert und die Überstände zur Analyse zur BASF SE gesendet haben.

4.2.2.2 Leberschnitte der Ratte

Die Testosteroninkubation in der Kultur von Leberschnitten erfolgt in einer 6-well-Platte mit je zwei Schnitten pro well in einem Medienvolumen von 5 ml. Es werden 200 μM Testosteron für 24 Stunden sowohl mit als auch ohne Schnitte inkubiert. Außerdem werden die Schnitte für 6 Stunden mit dem Induktionscocktail und anschließend für weitere 24 Stunden mit 200 μM Testosteron inkubiert. Die Überstände werden bis zur Aufarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ asserviert.

4.2.3 Untersuchung ausgewählter CYP-Enzyme mittels RT-PCR und Western Blot in primären Rattenhepatozyten

4.2.3.1 Zelllysate für die RT-PCR

Neben der Aktivität wird die Expression der CYP-Isoenzyme 1A1 und 2B1/2 in Rattenhepatozyten untersucht. Innerhalb des Verbundprojekts werden die mRNA-Analysen mittels RT-PCR an der MLU durchgeführt. Die dafür benötigten Zelllysate werden von BASF SE zur Verfügung gestellt und zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 Stunden unter basalen Kulturbedingungen und 24 und 48 Stunden nach Behandlung mit dem Induktionscocktail gewonnen. Dazu werden die Hepatozyten einer 6-well-Platte zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Zugabe von 100 μl Trizol-Reagenz pro well erfolgt. Die Zellen werden mit einem Zellschaber von der Platte abgekratzt, in einem Eppendorfgefäß vereinigt und bis zum Versand bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.2.3.2 Zelllysate für den Western Blot

Die Untersuchung der Proteinexpression von CYP1A1 und 2B1/2 in primären Rattenhepatozyten wird an der TUM mittels Western Blot durchgeführt. Die Zelllysate werden zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 Stunden unter basalen Kulturbedingungen, 24 und 48 Stunden unter induzierenden Bedingungen und 48 Stunden nach 24 Stunden Induktion

und 24 Stunden Postinkubationsperiode gewonnen. Dazu werden die Hepatozyten einer 6-well-Platte zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend werden pro well 200 µl des RIPA-Puffers (vgl. Kap. 3.3) zugegeben und 5 min bei 4 °C geschüttelt. Die Zelllysate werden durch auf- und abpipettieren homogenisiert und anschließend in einem Eppendorfgefäß vereinigt. Das Homogenat wird bei 4 °C, 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein Eppendorfgefäß überführt, welches bei -20 °C asserviert und auf Trockeneis nach München geschickt wird.

4.2.4 Analytische Untersuchungen der Inkubate aus den Biotransformationssystemen

4.2.4.1 Quantitative Analyse der Proteratogene und Teratogene

Zur Überprüfung der Stabilität der eingesetzten Substanzen im Kulturmedium und zur Bestimmung des metabolischen Umsatzes werden Überstände aus der Kultur primärer Rattenhepatozyten und Leberschnitte nach den in Tabelle 4.6 genannten Inkubationsperioden gesammelt und bei -20 °C asserviert.

Tabelle 4.6: Zeitpunkte der Probennahme zur Konzentrationsbestimmung
RH: Rattenhepatozyten, LS: Leberschnitte

Beschreibung der Probe	Inkubationsperiode
nicht inkubiert	0 Stunden
ohne RH	48 Stunden
mit RH	48 Stunden
RH, induziert	24 Stunden
ohne LS	24 Stunden
mit LS	24 Stunden

Im Rahmen des Verbundprojekts werden die Proben zentral in zwei beauftragten Laboren und bei BASF SE analysiert. Die Berechnung der Wiederfindung zu Inkubationsbeginn (0 Stunden) des Umsatzes erfolgt nach folgenden Formeln:

$$\text{Umsatz [\%]} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

$$\text{Wiederfindung [\%]}_{(\text{Oh})} = \frac{B}{A} \times 100$$

A: Konzentration Testsubstanz „Inkubation ohne Zellen“

B: Konzentration Testsubstanz „Inkubation mit Zellen“

4.2.4.1.1 Cyclophosphamid

Die Analyse von Cyclophosphamid wurde bei „Across Barriers“ in Saarbrücken in Auftrag gegeben. Die Extraktion des Analyten aus dem Kulturmedium erfolgt mit eiskaltem Acetonitril im Verhältnis 1:1 (v/v) über 20 min. Die Probe wird zentrifugiert und der Überstand in ein HPLC-Gefäß überführt und analysiert. Die Linearität ist im Konzentrationsbereich von 50 bis 350 µM CPA gegeben. Die chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 4.7 ersichtlich. Die innerhalb des Verbundprojekts beauftragte Analyse des Metaboliten Acrolein erbrachte trotz mehrfacher Wiederholungen und geeigneter Referenzlösungen im biologisch relevanten Konzentrationsbereich keine validen Ergebnisse.

Tabelle 4.7: Chromatographische Bedingungen der CPA-Analyse

Die Untersuchungen werden von Across Barriers in Saarbrücken durchgeführt.

System	Agilent 1100 LC MSD
Säule	Agilent Zorbax Extend-C18, (3,5 µm), 150 x 4,6 mm
Eluent	10 mM Ammoniumacetat in H ₂ O; pH 8,5; Methanol; 30/70 (v/v)
Fluss	1,0 ml/min, isochratisch
Injektionsvolumen	20 µl
Ionenquelle und Polarität	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI, +)
Ionenmodus	SIM, m/z 523

4.2.4.1.2 Albendazol und Albendazolsulfoxid

Die Analysenmethode von ABZ und ABZSO wurde im Zentrallabor Deutscher Apotheker (ZLA) in Eschborn entwickelt und validiert. Nach der Zugabe des internen Standards Phenacetin werden die Proben im Verhältnis 1:2 (v/v) mit 1,25 % (v/v) ammoniakalischem Ethylacetat versetzt und die Analyten extrahiert. Die organische Phase wird unter N₂ eingedampft, in Eluent resuspendiert und analysiert. Die Linearität ist im Bereich 0,01 bis 10 µM ABZ und ABZSO gegeben. Die chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 4.8 dargestellt.

Tabelle 4.8: Chromatographische Bedingungen der ABZ/ABZSO-Analyse

Die Untersuchungen werden vom Zentrallabor Deutscher Apotheker in Eschborn durchgeführt.

System	Agilent 6410 Triple Quadrupol LC/MS
Säule	Spherisorb CN (3 µm) 12,5 x 3 mm
Ofentemperatur	35 °C
Eluent	Methanol/H ₂ O/Essigsäure: 40/60/1 (v/v/v)
Fluss	0,4 ml/min, isochratisch
Injektionsvolumen	5 µl
Ionenquelle und Polarität	Elektrospray-Ionisation (ESI, +)
Ionenmodus	SIM, <i>m/z</i> 266 und 282

4.2.4.1.3 Valpromid und Valproinsäure

Die Analysenmethode von VPD und VPA wurde ebenfalls im ZLA entwickelt und validiert. Zur Analyse von Valpromid wird der Probe Valeramid als interner Standard zugesetzt. 2-Ethylhexansäure dient als interner Standard für die Analyse von Valproinsäure. Beide Proben werden je zweimal im Volumenverhältnis 1:2 (v/v) mit Ethylacetat 20 min extrahiert, anschließend zentrifugiert und die Überstände unter N₂ eingeengt. Der Rückstand wird in Acetonitril resuspendiert und in ein HPLC-Gefäß überführt. Nach Zugabe der Derivatisierungsreagenzien Pyridin und N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (MSTFA) werden die Proben für 60 min bei 60 °C inkubiert und im Anschluss sofort analysiert. Die Linearität ist im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 mM gegeben. Die chromatographischen Parameter sind in Tabelle 4.9 dargestellt.

Tabelle 4.9: Chromatographische Bedingungen der VPD/VPA-Analyse

Die Untersuchungen werden vom Zentrallabor Deutscher Apotheker in Eschborn durchgeführt.

System	Agilent Technologies 6890 Series
Säule	Agilent GC-Column HP-5 MS Länge: 30 m; ID: 0,25 mm
Trägergas	Helium
Fluss	1 ml/min
Gradient	70 °C, 2 min (initial) 8 °C/min auf 170 °C 50 °C/min auf 250 °C 250 °C, 0,9 min Equilibrierung auf 70 °C, 0,5 min
Injektionsvolumen	1 µl
Ionenquelle und Polarität	Elektronenstoß-Ionisation (EI, +)
Ionenmodus	SIM, <i>m/z</i> 200 und 201

4.2.4.1.4 2-Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-2-Acetylaminofluoren

Die Analysenmethode für 2-AAF und NOH-AAF wurde von BASF SE entwickelt und validiert. Neben den Proben der Rattenhepatozyten und Leberschnitte werden die Inkubate der Verbundpartner analysiert. Im Fall der Hepatozyteninkubate können 2-AAF und NOH-AAF direkt aus den Medienüberständen analysiert werden. Proben mit einer AAF-Konzentration größer 5 µM werden mit Kulturmedium verdünnt. Inkubate, die einen erhöhten Serumgehalt aufweisen werden einer Proteinfällung mittels Aceton unterzogen. Im Anschluss werden sie in einer „speed vac“-Apparatur eingeengt und in einem ACN/H₂O-Gemisch (1:1, v/v) resuspendiert und mittels LC-FLD analysiert. Die Quantifizierung erfolgt anhand von Kalibriergeraden im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 5 µM für AAF und 5 bis 50 µM für NOH-AAF. Die Quantifizierungsgrenze von 2-AAF liegt bei 0,08 µM und von NOH-AAF bei 2,2 µM. Die chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 4.10 dargestellt.

Tabelle 4.10: Chromatographische Bedingungen der AAF/NOH-AAF-Analyse

Die Untersuchungen werden von BASF SE durchgeführt.

System	Jasco PU-1580, AS-1555
Säule	Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl (5µm) 150 x 3 mm
Eluent	ACN (1 ml/l TFA): H ₂ O (1 ml/l TFA) 50:50 (v/v)
Fluss	0,5 ml/min, isochratisch
Injektionsvolumen	25 µl
Detektor	Jasco FP-1520; λ _{ex} : 280 nm, λ _{em} : 320 nm; Verstärkung 100

4.2.4.2 Strukturaufklärung entstandener Metaboliten

Die Analysen zur Konzentrationsbestimmung erlauben Aussagen über den Umsatz der Testsubstanzen, ihre Stabilität im Kulturmedium und mit Ausnahme von CPA die Bildung des ausgewählten aktiven/inaktiven Metaboliten. Darüber hinaus sind für alle Testsubstanzen weitere aktive und inaktive Metaboliten bekannt. Um die in der Rattenhepatozytenkultur gebildeten Metaboliten von CPA, ABZ, VPD und 2-AAF zu identifizieren, werden im Labor für Strukturaufklärung der BASF SE massenspektrometrische Experimente durchgeführt.

Prinzip:

Nach der chromatographischen Auftrennung gelangt das Inkubat aus der Hepatozytenkultur in das Q-TOF-Massenspektrometer, bestehend aus einem Quadrupolmassenfilter (Q), einer Hexapolkollisionszelle und einem „Time-of-Flight“- (TOF)-Analysator. In der Ionenquelle werden durch Elektrospray-Ionisation (ESI) aus ungeladenen Teilchen sog. Quasi-Molekülonen. Im positiven Modus entstehen u.a. [M+H]⁺-, [M+Na]⁺-, [M+NH₄]⁺- und im negativen Modus [M-H]⁻-, [M+HCOO]⁻-Ionen. Die Ladung ist generell erforderlich, um die Ionen in den verschiedenen Massenanalysatoren durch Wechselwirkung mit elektrischen Feldern nach ihrem Verhältnis Masse/Ladung (m/z) aufzutrennen. Im Massenfilter können sich überlagernde Gleich- und Wechselspannungen so gewählt werden, dass entweder alle Ionen oder nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis passieren können. In der Kollisionszelle entstehen durch Stöße der Quasi-Molekülonen mit Stickstoff-Molekülen Fragmentationen, verursacht durch Energieübertragung bei genügend hoher kinetischer Energie (kollisionsinduzierte Dissoziation, CID). Nach Verlassen der Kollisionszelle erreichen die Ionen den Extraktionsbereich des TOF-Analysators. Durch einen Pulser

werden Ionenpakete in ein Hochspannungsfeld geleitet, wo sie beschleunigt werden und anschließend in einem feldfreien Flugrohr nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt werden. Bei gleicher kinetischer Energie fliegen leichte Ionen schneller und erreichen den Detektor früher. Die Masse ist proportional zur Flugzeit t im Quadrat. Die Flugzeit beträgt für den gesamten Massenbereich ca. 100 μs , anschließend wird durch einen erneuten Extraktionspuls der Messzyklus wiederholt. Der Reflektor im Flugrohr dient der Fokussierung der Ionen im Detektor und erhöht die Auflösung.

Im Full Scan-Modus wird ein komplettes Massenspektrum aller Ionen aufgenommen. Im Quadrupol erfolgt keine Massenselektion und in der Kollisionszelle wird keine Fragmentierung erzeugt. Die Massenauftrennung erfolgt im TOF-Analysator. Im MS/MS-Modus (Produktionen-Scan) werden im Quadrupol die Quasi-Molekülonen von Interesse selektiert, im Hexapol fragmentiert und das Massenspektrum der Fragmentionen im TOF-Analysator gemessen. Die MS/MS-Experimente erlauben über das Fragmentierungsmuster Aussagen über die Struktur des ursprünglichen Molekülonen. Die Q-TOF-Messtechnik liefert ab einem Molekulargewicht von 300 Da eine Massengenauigkeit von 2 ppm, welche die Identifikation anhand der Summenformel ermöglicht (Seminarunterlagen der Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG). Die Auswertung erfolgt mit der Software Mass Hunter Qualitative Analysis B.04.00.

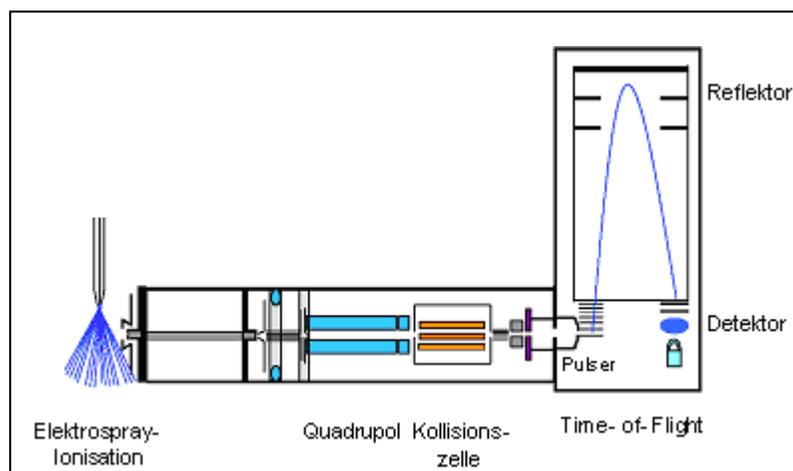


Abbildung 4.5: Aufbau eines Q-TOF-Massenanalysators

Durch die Elektrospray-Ionisation werden aus ungeladenen Teilchen Quasi-Molekülonen, welche in der Kollisionszelle fragmentiert werden können. Die Ionen und Fragment-Ionen werden im Pulser in die Flugröhre beschleunigt und am Ende durch einen Ionendetektor analysiert (mod. Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Agilent Technologies).

4.2.4.2.1 Cyclophosphamid

Die für die Strukturaufklärung entstandener Metaboliten verwendete CPA-Substratkonzentration in den Inkubaten beträgt 100 µM. Zur Analyse herangezogen werden die Überstände der 24 Stunden-Inkubation unter basalen Bedingungen. Als Kontrollen dient das CPA-Inkubat ohne Zellen und eine Leerinkubation. Nach dem Auftauen werden die Proben filtriert bevor sie in die HPLC injiziert werden. Detaillierte LC/MS-Parameter sind in Tabelle 4.11 dargestellt.

In einem ersten Experiment werden alle Analyten im Full Scan-Modus massenspektrometrisch analysiert. In einem zweiten Experiment werden die aus dem ersten Experiment identifizierten Metaboliten anhand ihrer Retentionszeit (RT) und akkuraten Masse im Quadrupol selektiert, in der Kollisionszelle fragmentiert und anschließend das Massenspektrum aufgenommen. Tabelle 4.12 gibt einen Überblick über die MS/MS- Experimente der CPA-*in vitro*-Metabolismusinkubate.

Tabelle 4.11: Q-TOF LC/MS-Parameter für die Analyse von CPA-Inkubaten

HPLC-System	Agilent 1200 / 1290
Säule	Phenomenex Synergi Fusion-RP 80, (4 µm), 250 x 3,0 mm
Eluent	[A]: H ₂ O (1 ml/l HCOOH) [B]: ACN (1 ml/l HCOOH)
Fluss	0,5 ml/min
Gradient	0 min 0 % [B] 25 min 100 % [B] 30 min 100 % [B] 30,1 min 0 % [B] 39 min 0 % [B]
Injektionsvolumen	5 µl
MS System	Agilent 6540 Q-TOF LC/MS
Ionenquelle & Polarität	ESI (+) und (-)
Kollisionsgas	N ₂

Tabelle 4.12: Übersicht der MS/MS-Experimente der im Full Scan detektierten CPA-Analyten
M: Metabolit

Analyt	RT [min]	Akkurate Masse [<i>m/z</i>]
CPA-M1	4,85	380,1122
CPA-M2	5,63	221,0008
CPA-M3	7,56	532,1392
CPA-M4	8,79	293,0219
CPA-M5	9,08	275,0114
CPA-M6	9,32	277,0270
CPA-M7	9,23	259,0164
CPA	11,11	261,0321

4.2.4.2.2 Albendazol

Die ABZ-Konzentration in den Hepatozyteninkubaten beträgt 25 μM . Die Inkubationsperiode, die Proben und deren Aufarbeitung sowie die Durchführung der MS- und MS/MS-Experimente sind Kapitel 4.2.4.2.1 zu entnehmen. Detaillierte LC/MS-Parameter sind in Tabelle 4.13 dargestellt. Einen Überblick über die MS/MS-Experimente der ABZ-*in vitro*-Metabolismusinkubate liefert Tabelle 4.14.

Tabelle 4.13: Q-TOF LC/MS-Parameter für die Analyse von ABZ-Inkubaten

HPLC-System	Agilent 1200 / 1290
Säule	Phenomenex Synergi Fusion-RP 80, (4 μm), 250 x 3,0 mm
Eluent	[A]: H ₂ O (1 ml/l HCOOH) [B]: ACN (1 ml/l HCOOH)
Fluss	0,5 ml/min
Gradient	0 min 0 % [B] 25 min 100 % [B] 30 min 100 % [B] 30,1 min 0 % [B] 39 min 0 % [B]
Injektionsvolumen	10 μl
MS System	Agilent 6540 Q-TOF LC/MS
Ionenquelle & Polarität	ESI (+) und (-)
Kollisionsgas	N ₂

Tabelle 4.14: Übersicht der MS/MS-Experimente der im Full Scan detektierten ABZ-Analyten
M: Metabolit

Analyt	RT [min]	Akkurate Masse [<i>m/z</i>]
ABZ-M1	6,64	224,0852
ABZ-M2	7,45	298,0856
ABZ-M3	8,27	314,0806
ABZ-M4	8,34	458,1223
ABZ-M5	8,47	282,0908
ABZ-M6	8,56	296,0696
ABZ-M7	8,80	280,0748
ABZ-M8	9,16	362,0473
ABZ-M9	9,38	282,0908
ABZ-M10	9,43	224,0488
ABZ-M11	10,53	298,0856
ABZ-M12	11,04 / 11,47 / 11,88	442,1275
ABZ	11,73	266,0955

4.2.4.2.3 Valpromid

Die VPD-Konzentration in den Hepatozyteninkubaten beträgt 4 mM. Die Inkubationsperiode, die Proben und deren Aufarbeitung sowie die Durchführung der MS- und MS/MS-Experimente sind Kapitel 4.2.4.2.1 zu entnehmen. Detaillierte LC/MS-Parameter sind in Tabelle 4.15 dargestellt. Einen Überblick über die MS/MS-Experimente der VPD-*in vitro*-Metabolismusinkubate liefert Tabelle 4.16.

Tabelle 4.15: Q-TOF LC/MS Parameter für die Analyse von VPD-Inkubaten

HPLC- System	Agilent 1200 / 1290
Säule	Phenomenex Synergi Fusion-RP 80, (4 µm), 250 x 3,0 mm
Eluent	[A]: H ₂ O (1 ml/l HCOOH) [B]: ACN (1 ml/l HCOOH)
Fluss	0,5 ml/min
Gradient	0 min 0 % [B] 25 min 100 % [B] 30 min 100 % [B] 30,1 min 0 % [B] 39 min 0 % [B]
Injektionsvolumen	1 µl
MS System	Agilent 6540 Q-TOF LC/MS
Ionenquelle & Polarität	ESI (+) und (-)
Kollisionsgas	N ₂

Tabelle 4.16: Übersicht der MS/MS-Experimente der im Full Scan detektierten VPD-Analyten
M: Metabolit

Analyt	RT [min]	Akkurate Masse [m/z]
VPD-M1	7,39 / 8,27	160,1328
VPD-M2	7,40 / 9,23 / 9,96	143,1067
VPD-M3	8,64 / 8,79 / 9,06 / 9,24	448,1748
VPD-M4	8,66	158,1176
VPD-M5	9,47	320,1700
VPD-M6	9,94 / 10,21 / 10,54	142,1226
VPD	11,41	144,1381
VPD-M7	13,91	145,1223

4.2.4.2.4 2-Acetylaminofluoren

Die 2-AAF-Konzentration in den Inkubaten beträgt 10 µM. Die Inkubationsperiode, die Proben und deren Aufarbeitung sowie die Durchführung der MS- und MS/MS-Experimente sind Kapitel 4.2.4.2.1 zu entnehmen. Detaillierte LC/MS-Parameter sind in Tabelle 4.17 dargestellt.

Einen Überblick über die MS/MS-Experimente der 2-AAF-*in vitro*-Metabolismusinkubate liefert Tabelle 4.18. Eine NOH-AAF-Standardlösung wird unter den gleichen Bedingungen fragmentiert. Das Fragmentierungsmuster wird als Referenz zur Aufklärung von 2-AAF-Metaboliten herangezogen.

Tabelle 4.17: Q-TOF LC/MS-Parameter für die Analyse von 2-AAF-Inkubaten

HPLC- System	Agilent 1200 / 1290
Säule	Phenomenex Phenyl-Hexyl, (5 µm), 150 x 3,0 mm
Eluent	[A]: H ₂ O (1 ml/l HCOOH) [B]: ACN (1 ml/l HCOOH)
Fluss	0,5 ml/min
Gradient	0 min 0 % [B] 25 min 100 % [B] 30 min 100 % [B] 30.1 min 0 % [B] 39 min 0 % [B]
Injektionsvolumen	20 µl
MS System	Agilent 6540 Q-TOF LC/MS
Ionenquelle & Polarität	ESI (+) und (-)
Kollisionsgas	N ₂

Tabelle 4.18: Übersicht der MS/MS-Experimente der im Full Scan detektierten 2-AAF-Analyten
M: Metabolit

Analyt	RT [min]	Akkurate Masse [m/z]
2-AAF-M1	4,45 / 5,89 / 6,74	374,1234
2-AAF-M2	5,82 / 5,93 / 7,26 / 9,67	198,0913
2-AAF-M3	8,38 / 9,40 / 10,97 / 11,26	416,1340
2-AAF-M4	9,63	182,0964
2-AAF-M5	12,88	278,0482
2-AAF-M6	13,07	320,0587
2-AAF	14,48	224,1070

4.3 Charakterisierung der 3T3-Fibroblasten-Kultur

4.3.1 Kultivierung

Bei der Zelllinie 3T3 handelt es sich um adherent wachsende murine balb/c Embryo-fibroblasten vom Klon A31 (vgl. Kap. 3.6.2). Sie werden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen (75 cm²) kultiviert und besitzen eine Verdopplungszeit von 20 bis 24 Stunden. Bei 80 bis 90%iger Konfluenz werden die Zellen passagiert. Dazu wird das Medium entfernt, die Zellen mit warmem PBS⁻ gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %, w/v) versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37 °C haben sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst und können in DMEM-Medium resuspendiert werden. Zur Zellzahlbestimmung werden 100 µl der Zellsuspension in 9,9 ml CASY-TON pipettiert und mit Hilfe des Zellzählers CASY die Zellzahl pro ml bestimmt. 5*10⁵ Zellen werden anschließend in eine neue Kulturflasche überführt. Unter diesen Bedingungen ergibt sich ein Passagenintervall von drei bis vier Tagen.

Zur Kryokonservierung werden 2*10⁶ Zellen in 1 ml des Einfriermediums für 24 Stunden in einem Isopropanol-Einfriergefäß bei -80 °C eingefroren, bevor sie im Stickstofftank bei -196 °C gelagert werden. Zum Auftauen werden 20 ml warmes Kulturmedium in zwei Kulturflaschen vorgelegt. Anschließend wird das die Zellsuspension enthaltene Kryoröhrchen im Wasserbad zügig aufgetaut und unmittelbar je 1 ml in die vorbereiteten Flaschen überführt. Nach 2 Stunden wird das Medium entfernt, durch frisches Kulturmedium ersetzt und die Kultur fortgesetzt.

4.3.2 Untersuchung fremdstoffmetabolisierender Aktivität

4.3.2.1 Alkoxyresorufin-O-Dealkylase-Aktivitäten

Die Bestimmung der CYP-Aktivität der 3T3-Fibroblasten erfolgt in Anlehnung an das Zytotoxizitätsprotokoll, um die Ergebnisse mit den vorherrschenden Kulturbedingungen während der Substanztestungen vergleichen zu können (vgl. Kap. 4.3.3). An Tag 0 werden 500 Zellen in 50 µl Medium pro well in eine schwarze 96-well-Platte pipettiert. Nach zwei Stunden erfolgt die Zugabe weiterer 150 µl Medium. Der Mediumwechsel wird analog des Zytotoxizitätsprotokolls an Tag 3 und 5 vorgenommen.

Die CYP-Aktivität wird an Tag 3, 7 und 10 als Sechsfachbestimmung in serumreduziertem DMEM-Medium gemessen. Die Zusammensetzung des Inkubationsmediums ist in Tabelle 4.19 ersichtlich.

Tabelle 4.19: AROD-Inkubationsmedium für 3T3-Zellen

Lösung	Stammkonzentration [mM]	Endkonzentration [µM]	Volumen [µl]
Dicumarol	1	10	1
Ethyl-, Pentyl- und Benzyloxyresorufin	2,5	10	0,4
DMEM-1 % NCS-Medium			98,6

Nachdem das Medium abgenommen wurde, werden die Zellen zweimal mit vortemperiertem PBS^{+/+} gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von 100 µl des Inkubationsmediums. Die Enzymkinetik wird analog Kapitel 4.2.2.1.1 über zwei Stunden gemessen. Das gebildete Resorufin wird über eine Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von 1 bis 1000 nM in DMEM-1 %-NCS-Medium quantifiziert. Die Enzymaktivität wird in pmol/min/10⁶ Zellen angegeben. Die Quantifizierungsgrenze wird durch Inkubationen ohne Zellen analog Kapitel 4.2.2.1.1 ermittelt. Sie wird in pmol Resorufin angegeben und bei der Berechnung der Resorufinkonzentration der Proben berücksichtigt.

4.3.2.2 Untersuchung ausgewählter CYP-Enzyme mittels RT-PCR und Western Blot

Neben der Aktivität werden die Expression und Translation der CYP-Isoenzyme 1A und 2B in 3T3-Fibroblasten untersucht. Innerhalb des Verbundprojekts werden die mRNA-Analysen an der MLU und die Proteinanalysen an der TUM durchgeführt. Das dafür benötigte Probenmaterial wird von BASF SE zur Verfügung gestellt. Die für die Bestimmung notwendigen Zelllysate werden aus einer ca. 90 % konfluenten Zellkulturflasche der Passagen 92, 94 und 96 gewonnen. Die Zellzahl beträgt ca. 10⁷ Zellen. Das Zelllysate für die RT-PCR wird in 1 ml Trizol-Reagenz pro Zellkulturflasche aufgenommen, nachdem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen worden sind. Zur Isolierung des Proteins für die Western Blot Analysen wird der Zellrasen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen bevor die Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer (vgl. Kap. 3.3) pro Zellkulturflasche erfolgt. Der weitere Aufarbeitungs- und Lagerungsprozess entspricht dem analoger Hepatozytenproben (vgl. Kap. 4.2.3).

4.3.3 Untersuchung der Proteratogene und Teratogene im 3T3-Zytotoxizitätstest

Die im Verbundprojekt untersuchten *in vitro*-Systeme zur Prüfung auf Embryotoxizität beinhalten die Endpunkte der Inhibition der Differenzierung und Entwicklung ($ID_{50 D3}$ und IC_{MAX} / Anzahl dysmorpher Embryonen) und der Zytotoxizität ($IC_{50 D3}$ und $IC_{50 3T3}$). An der Charité Berlin wird die Kultur der Rattenembryonen und am BfR die Differenzierungs- und Zytotoxizitätsexperimente mit den embryonalen Stammzellen der Maus (Linie D3) durchgeführt. Die Daten zur Zytotoxizität in der 3T3-Fibroblastenkultur werden im Rahmen dieser Arbeit erhoben.

Die Durchführung erfolgt modifiziert nach dem ECVAM-validierten Protokoll (Seiler und Spielmann 2011). In einer 96-well Platte werden in einer sechsfach Bestimmung acht Konzentrationen, eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO, $\leq 0,2\%$) und eine Positivkontrolle (5-Fluorouracil, $7,7 \mu\text{M}$) für bis zu zehn Tage inkubiert. Die Dauer und die Zeitpunkte des Mediumwechsels richten sich nach dem Zeitraster des Differenzierungsassays im EST (Seiler *et al.* 2006). Die Inhibition des Zellwachstums wird an Tag 7 und 10 mittels MTT-Test gemessen (vgl. Kap. 4.2.1). Die für den Zytotoxizitätstest eingesetzten Konzentrationen der Referenzsubstanzen sind in Tabelle 4.20 dargestellt. Für alle durchgeführten Versuche werden die Passagen 90 bis 110 der 3T3-Fibroblasten verwendet. Die mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) werden graphisch anhand der Konzentration-Wirkungskurve ermittelt.

Tabelle 4.20: Substanzkonzentrationen im Zytotoxizitätstest in 3T3-Fibroblasten

Substanz	Testkonzentrationen [μM]								
CPA	438,96	658,44	987,65	1481,48	2222,22	3333,33	5000,00	7500,00	
Acr	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	8,00	
ABZ	0,11	0,17	0,25	0,37	0,56	0,84	1,26	1,88	
ABZSO	4,16	6,24	9,36	14,04	21,07	31,60	47,40	71,10	
VPD	27,27	54,55	109,09	218,18	436,36	872,72	1745,45	3490,89	
VPA	352,17	528,26	792,39	1188,58	1782,88	2674,32	4011,47	6017,21	
2-AAF	6,55	9,83	14,75	22,12	33,18	49,77	74,65	111,98	
NOH-AAF	0,82	1,63	3,27	6,53	13,06	26,12	52,25	104,49	

Neben der Erfassung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung der einzelnen Testsubstanzen werden Effekte von Ko-Expositionen von Substrat und Metabolit erhoben. Aufgrund der zu erwartenden Unvollständigkeit der Umsetzung von Proteratogen zu Teratogen durch die Hepatozyten wird die Zytotoxizität und Proliferationshemmung in unterschiedlichen Mengenverhältnissen von Proteratogen und Teratogen bestimmt. Diese „simulierte Biotransformation“ gibt Auskunft darüber, welche Menge Proteratogen zum Teratogen umgewandelt werden muss, um eine metabolische Aktivierung des Proteratogens zu messen. Die Konzentrationsverhältnisse (in %) von Proteratogen zu Teratogen betragen 80:20, 50:50, 20:80, 10:90 und 1:99. Ausgehend von den Daten der Einzeltestungen der Referenzsubstanzen werden Konzentrationsreihen der Substanzpaare hergestellt und im 3T3-Zytotoxizitätstest geprüft. Die Zytotoxizitätsmessung erfolgt an Tag 7 und 10. Zur Ermittlung der IC_{50} -Werte wird die Summe der Konzentrationen der Einzelsubstanzen gegen die auf die Lösungsmittelkontrolle normierte Vitalität aufgetragen.

4.4 Prüfung von *in vitro*-Metabolismusinkubaten im EST und der WEC

4.4.1 Methodenentwicklung

4.4.1.1 3T3-Fibroblasten

Primäre Hepatozyten

Die Kombination primärer Hepatozyten mit den *in vitro*-Embryotoxizitätssystemen EST und WEC in Form einer Präinkubation erfordert die Toleranz der Zielkulturen gegenüber bereits inkubiertem Hepatozytenmedium. Tabelle 4.21 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Kulturmedien der *in vitro*-Metabolismus- und Zielkultursysteme.

Um mögliche Medieneffekte zu erfassen werden Medienüberstände ohne Testsubstanz aus den Hepatozytenkulturen von Ratte, Schwein und Mensch in den 3T3-Fibroblasten getestet. Dabei handelt es sich sowohl um das Standardhepatozytenmedium WMEI als auch um das analog zum Hepatozytenmedium hergestellte Medium der 3T3-Fibroblasten DMEMI, welches für 24 Stunden ausschließlich auf Ratten- und Schweinehepatozyten inkubiert wird. Da die Qualität des Mediums u. a. von der Inkubationszeit abhängig ist, werden WMEI-Medienüberstände nach 6, 24 und 48 Stunden und 24 Stunden nach der Induktionsperiode abgenommen, steril filtriert und bis zur Überführung bei -20 °C asserviert.

Nach dem Auftauen werden dem Hepatozytenmedium 10 % (v/v) NCS und 1 % (v/v) Glutamin zugesetzt. Im Anschluss wird das Medium zu 25 %, 50 % und 75 % (v/v) mit frischem 3T3-DMEM-Medium gemischt. Das Humanhepatozytenmedium wird außerdem zu 100 % (v/v) eingesetzt. Durch den Zusatz von Serum und Glutamin beträgt der finale Gehalt des Hepatozytenmediums jeweils 22,25 %, 44,5 %, 66,75 % und 89,1 % (v/v). Der Zytotoxizitätstest erfolgt modifiziert nach dem Standardprotokoll (Seiler *et al.* 2006). An Tag 0 werden 500 Zellen pro well in 50 µl DMEM-Medium in eine 96-well-Platte pipettiert. Nach zweistündiger Anhaftungszeit wird das Medium entfernt und gegen 200 µl pro well der Medienmischungen aus Hepatozyteninkubaten ausgetauscht. Als Negativkontrolle dient das DMEM-Standardmedium der 3T3-Fibroblasten, als Positivkontrolle 5-FU (7,7 µM). Der Mediumwechsel erfolgt an Tag 3 und 5. Die Vitalität der 3T3-Zellen wird an Tag 7 mittels MTT-Test gemessen (vgl. Kap. 4.2.1). Die Vitalität der mit Hepatozytenmedium behandelten Zellen wird auf die Standardmediumkontrolle normiert.

Tabelle 4.21: Kulturbedingungen der verwendeten *in vitro*-Metabolismus- und Embryotoxizitätssysteme

FCS: Fetales Kälberserum, NEAA: nicht-essentielle Aminosäure, NCS: „Newborn calf serum“, Pen/Strep: Penicilin/ Streptomycin (% in v/v).

Zellsystem	Kulturmedium	Supplementierung
Primäre Hepatozyten und Leberschnitte der Ratte	Williams Medium E	2 mM Glutamin 50 µg/l Insulin 50 µg/ml Gentamicin 10 mM HEPES-Puffer
ESZ-D3	Dulbecco´s MEM	20 % FCS 2 mM Glutamin 1 % Pen/Strep 1 % NEAA 0,1 mM β-Mercaptoethanol
3T3-Fibroblasten	Dulbecco´s MEM	10 % NCS 4 mM Glutamin 1 % Pen/Strep
WEC	83,25 % Rinderserum 9,25 % Rattenserum 7,5 % HBSS	-

Leberschnitte der Ratte

Neben Inkubaten primärer Hepatozyten stehen Inkubate aus der Leberschnittkultur der Ratte als *in vitro*-Metabolismussystem für die Kombination mit den Zielkulturen zur Verfügung (vgl. Kap. 4.1.2). Dazu werden je zwei Leberschnitte in 5 ml WMEC für 6 und 24 Stunden kultiviert. Nach Beendigung der Kulturperiode werden die Schnitte entfernt, das Medium steril filtriert und bis zur Verwendung bei -20 °C asserviert. Die Modifizierung des Mediums zum Einsatz in die 3T3-Kultur sowie der Zytotoxizitätstest verlaufen analog zum Protokoll der Hepatozytenmedien (vgl. Kap. 4.4.1.1). Das aus den Vorprüfungen resultierende Protokoll zur Überführung von *in vitro*-Metabolismusinkubaten in die Zielkulturen ist in Kapitel 4.4.2 beschrieben.

4.4.1.2 ESZ-D3

Neben der Überführung von Hepatozyteninkubaten von Ratte, Schwein und Mensch in den 3T3-Zytotoxizitätstest werden Überstände aus der Rattenhepatozytenkultur gewonnen, welche am BfR in den Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest des ESTs eingesetzt werden. Die Medienüberstände werden analog zu den 3T3-Zellen nach 6, 24 und 48 Stunden und 24 Stunden nach der Induktionsperiode gesammelt, steril filtriert und bei -20 °C asserviert. Dem Hepatozytenmedium werden am BfR die fehlenden Komponenten FCS, Glutamin, NEAA und β -Mercaptoethanol und darüber hinaus 50 % bzw. 60 % (v/v) frisches D3-DMEM-Medium zugesetzt. Daraus resultieren Inkubatanteile von 40,75 % und 32,6 % (v/v). Die aus diesen Verträglichkeitsprüfungen resultierenden Überführungsprotokolle von Testsubstanzinkubaten in die D3-Kultur des EST werden in Kapitel 4.4.3 dargestellt.

4.4.1.3 WEC

Die Entwicklung der Rattenembryonen ist vom Serumgehalt des Kulturmediums abhängig. Aus diesem Grund werden nach 24 und 48 Stunden und 24 Stunden nach der Induktionsperiode ausschließlich Überstände aus WEC-Medium gewonnen und bei -20 °C asserviert. An der Charité Berlin erfolgt die Zugabe von 7,5 % (v/v) HBSS, bevor das Medium in die WEC eingesetzt wird. Daraus resultiert ein Inkubatanteil von 92,5 % (v/v). Das aus diesen Vorprüfungen resultierende Protokoll ist in Kapitel 4.4.4 beschrieben.

4.4.2 Zytotoxizitätstest in 3T3-Fibroblasten

Die Untersuchungen zur Toleranz der 3T3-Fibroblasten gegenüber Medienüberständen aus der Kultur primärer Hepatozyten und Leberschnitte (vgl. Kap. 4.4.1) haben gezeigt, dass eine Überführung von Inkubaten aus der Kultur primärer Rattenhepatozyten und Leberschnitte (RH / LS) bei einem Anteil von 50 % (v/v) keinen Einfluss auf die Vitalität der 3T3-Zellen haben.

Inkubate aus Schweine- und Humanhepatozyten (PH und HH) werden bis zu einem Anteil von 25 % (v/v) bzw. 100 % (v/v) von den 3T3-Zellen toleriert. Den Ratten- und Schweinehepatozytenüberständen werden neben 10 % Serum und 1 % Glutamin 50 % bzw. 75 % (v/v) frisches 3T3-DMEM-Medium zugesetzt. Dem Humanhepatozytenmedium werden die Anteile Serum und Glutamin zugesetzt. Daraus resultieren Inkubatanteile von 44,5 % (v/v, RH / LS), 22,25 % (v/v, PH) und 89,1 % (v/v, HH).

Aus den Ergebnissen der 3T3-Fibroblasten resultiert das in Abbildung 4.6 dargestellte Protokoll zur Gewinnung von Hepatozyten- und Leberschnittinkubaten. Für den 3T3-Zytotoxizitätstest werden sowohl Überstände nach 24 Stunden unter basalen Kulturbedingungen als auch 24 Stunden nach der Induktionsperiode gesammelt. Die Induktion erfolgt für 24 Stunden in der Hepatozyten- und für 6 Stunden in der Leberschnittkultur.

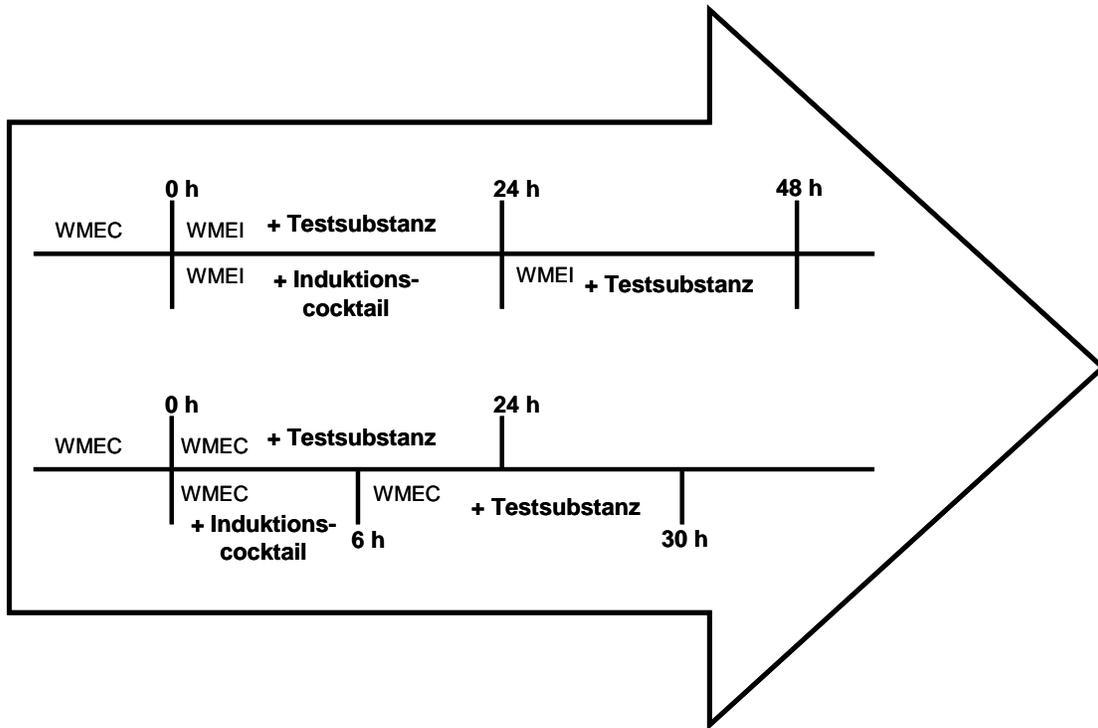


Abbildung 4.6: Inkubationsprotokoll für die Überführung von Inkubaten in den 3T3-Zytotoxizitätstest

Oben: Inkubationsprotokoll für Hepatozyten, unten: Inkubationsprotokoll für Leberschnitte

Mit Hilfe der Untersuchungen zur Toleranz der 3T3-Zellen gegenüber Hepatozytenmedium sind die Voraussetzungen für die Überführung von Testsubstanzinkubaten geschaffen worden. Dazu werden die Proteratogene CPA, VPD und 2-AAF und das Teratogen ABZ in den in Tabelle 4.22 dargestellten Konzentrationen in den Hepatozyten- und Leberschnittkulturen inkubiert (vgl. Abbildung 4.6) und in den beschriebenen Anteilen im 3T3-Zytotoxizitätstest eingesetzt („aktives Inkubat“). Dabei ist eine maximale DMSO-Konzentration von 0,2 % (v/v) tolerierbar. Zur Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung wird das Testsubstanzinkubat siebenmal mit gleichbehandeltem Lösungsmittelüberstand (WMEI + 0,2 % (v/v) DMSO) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Als metabolisch inaktive Kontrolle dienen Testsubstanzinkubate ohne Hepatozyten („inaktives Inkubat“), welche ebenfalls siebenmal mit dem entsprechenden Lösungsmittelüberstand 1:2 verdünnt werden. Als Negativkontrolle wird der Lösungsmittelüberstand der jeweiligen Hepatozyteninkubation verwendet. Die Positivkontrolle 5-FU (7,7 μ M) wird als Reinsubstanz im Zytotoxizitätstest eingesetzt.

Daraus resultiert die Überführung drei verschiedener Hepatozyten- bzw. Leberschnittinkubate in je acht Konzentrationen: 1. „ohne Zellen/LS“, 2. „mit Zellen/LS“ und 3. „mit Zellen/LS, induziert“.

Tabelle 4.22: Konzentrationen der Testsubstanzen in den Hepatozytenkulturen zur Überführung in den 3T3-Zytotoxizitätstest

Hepatozytenkulturen von Ratte (RH), Schwein (PH) und Mensch (HH) und Leberschnitte der Ratte (LS).

	CPA	ABZ	VPD	2-AAF
RH	0,1 mM; 1 mM	10 µM; 25 µM	1 mM; 4 mM	
PH	0,1 mM; 1 mM	10 µM; 25 µM	1 mM; 4 mM	100 µM
HH	1 mM	25 µM		
LS				100 µM

Der Zytotoxizitätstest wird wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, durchgeführt. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) wird graphisch anhand der Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt. Dazu werden die durch die Verdünnungen erreichten Metabolitenäquivalent-Konzentrationen, ausgehend von der eingesetzten Konzentration der Testsubstanz in den Hepatozyten, gegen die auf die Lösungsmittelkontrolle normierte Vitalität aufgetragen.

4.4.2.1 Quantitative Analyse der Proteratogene und Teratogene

Zur Überprüfung der Stabilität der Testsubstanzen während des Überführungsprozesses werden Proben der für die Zytotoxizitätstests angesetzten Medien aus Rattenhepatozyten- und Leberschnittinkubaten von CPA, ABZ, VPD und 2-AAF an Tag 0 und 5 asserviert und im Fall von CPA, ABZ und VPD an die mit den jeweiligen Analysen beauftragten Labors gesendet. 2-AAF wird von BASF SE analysiert. Die Analysenmethoden sind in Kapitel 4.2.4.1 beschrieben.

4.4.3 Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest in ESZ-D3

Die Überführung von Medienüberständen aus der Kultur von Rattenhepatozyten unter Zumischung frischen Mediums ergab, dass eine der Kontrolle vergleichbare Vitalität und Differenzierung erreicht wird, wenn das Medium zu einem Anteil von 40 % (v/v) eingesetzt wird.

Unter Berücksichtigung der Zugabe von 15 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Glutamin, 1 % (v/v) NEAA, 1% (v/v) β -Mercaptoethanol und 0,5 % (v/v) Pen/Strep beläuft sich der Anteil am Ende auf 32,6 % (v/v) Rattenhepatozytenmedium im D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest.

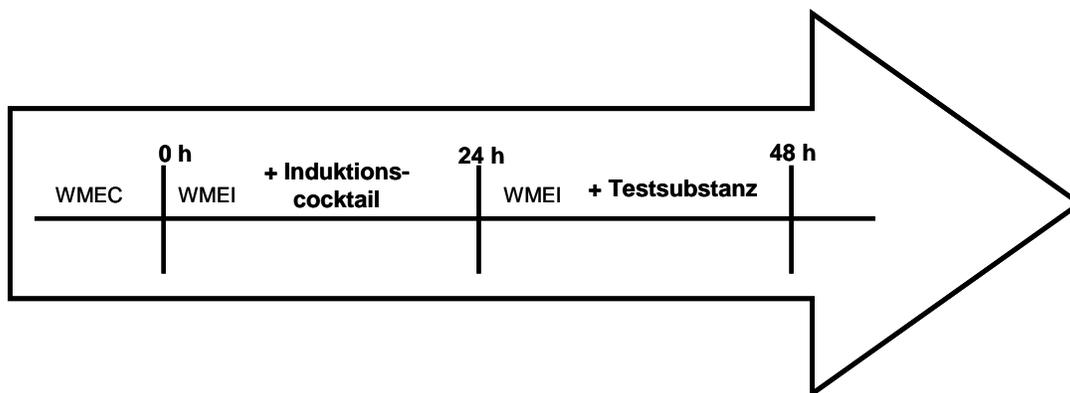


Abbildung 4.7 Inkubationsprotokoll für die Überführung von Rattenhepatozyteninkubaten in den D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest

In den Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest in ESZ-D3 werden ausschließlich Medienüberstände aus induzierten Rattenhepatozyten („aktives Inkubat“) überführt (vgl. Abbildung 4.7), da diese eine erhöhte Verträglichkeit in den ESZ-D3 aufwiesen als Inkubate aus basalen Kulturbedingungen. Als Kontrolle dienen Inkubationen der Testsubstanzen ohne Hepatozyten („inaktives Inkubat“). CPA wird in einer Konzentration von 1 mM inkubiert, ABZ von 25 μ M. Zur Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung werden die Testsubstanzinkubate viermal mit gleichbehandeltem Lösungsmittelüberstand (WMEI + 0,2 % (v/v) DMSO) im Verhältnis 1:3 verdünnt. Als Negativkontrolle wird der Lösungsmittelüberstand der jeweiligen Hepatozyteninkubation verwendet. Daraus resultiert die Überführung von zwei Hepatozyteninkubaten in je 5 Konzentrationen: 1. „ohne Zellen“ und 2. „mit Zellen, induziert“. Zur Ermittlung der mittleren inhibitorischen Differenzierungs- und Proliferationskonzentration (ID_{50} und IC_{50}) wird eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt. Dazu werden die durch Verdünnungen erreichten Metabolitenäquivalent-Konzentrationen, ausgehend von der eingesetzten Konzentration der Testsubstanz in den Hepatozyten, gegen die auf die Lösungsmittelkontrolle normierte Differenzierung oder Vitalität aufgetragen.

4.4.4 WEC

Da sowohl der Vitalitätstest als auch die CYP-Aktivitätstests in WEC-Medium-kultivierten Rattenhepatozyten nach 24 Stunden Induktion keine oder nur geringe Abnahmen im Vergleich zu Kontrollmedium aufwiesen, wurden WEC-Medienüberstände nach diesem Protokoll generiert und an der Charité Berlin in die WEC eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass nach Zusatz von weiteren 7,5 % (v/v) frischem HBSS, 1,57 mg/ml Glukose und 75 µg/ml Methionin die Toleranz gegenüber dem Hepatozyteninkubat gegeben ist.

Daraus resultiert das in Abbildung 4.8 dargestellte Inkubationsprotokoll für Rattenhepatozyten zur Überführung von Medienüberständen in die WEC. Mit der Annahme, dass die Abnahme der CYP-Aktivität und anderer fremdstoffmetabolisierender Enzyme unter Serumkulturbedingungen in den ersten 24 Stunden größer ausfällt als unter Standardkulturbedingungen, wird zur Überführung in die WEC grundsätzlich das Induktionsprotokoll angewendet.

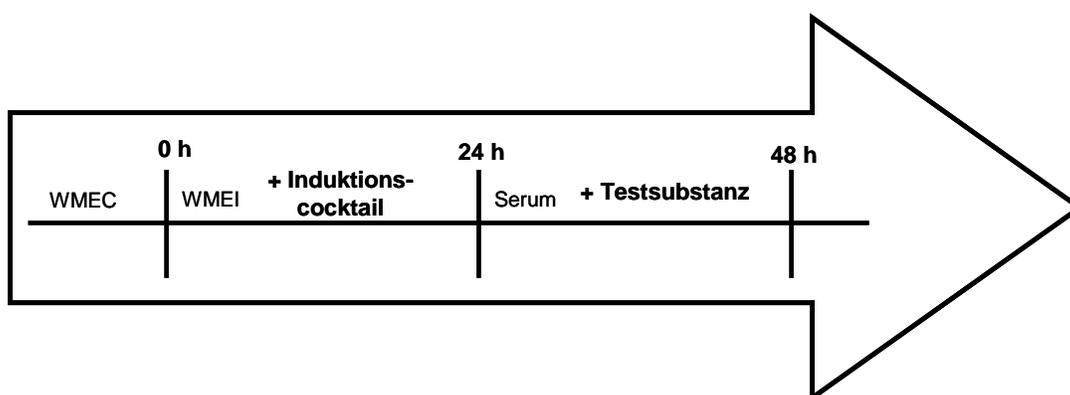


Abbildung 4.8: Inkubationsprotokoll für primäre Hepatozyten für die Überführung von Inkubaten in die WEC

Die maximal tolerierbare DMSO-Konzentration in der WEC beträgt 0,1 % (v/v) woraus eine maximale Konzentration von 10 µM ABZ resultiert. CPA wird in einer Konzentration von 1 mM inkubiert („aktives Inkubat“). Als Kontrolle dienen Inkubationen der Testsubstanzen ohne Rattenhepatozyten, welche ebenfalls in der WEC eingesetzt werden („inaktives Inkubat“).

Um in der WEC einen Konzentrationseffekt zu untersuchen, werden die Testsubstanz-inkubate mit inkubierten Lösungsmittelüberständen aus Inkubationen mit und ohne Zellen 1:2 verdünnt. Als Negativkontrolle in der Zielkultur dient der Lösungsmittelüberstand. Zur Bestimmung des Einflusses des metabolischen Umsatzes der Testsubstanzen auf die Entwicklung der Embryonen wird der prozentuale Anteil dysmorpher Embryonen gegen die Metabolitenäquivalent-Konzentration, ausgehend von der eingesetzten Konzentration der Testsubstanz in den Hepatozyten, aufgetragen. Außerdem werden die Dottersackdurchblutung, die Anzahl der Somiten, die Scheitel-Steiß-Länge, der Proteingehalt und der sog. „Total Morphological Score“ (TMS) bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgt mit der Software SPSS, Version 16.0.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung zellulärer *in vitro*-Metabolismussysteme der Ratte

5.1.1 Zytotoxizität der Testsubstanzen in Rattenhepatozyten

Die Integration primärer Hepatozyten der Ratte in *in vitro*-Embryotoxizitätstests erfordert den Umsatz von potentiellen Proteratogenen zu ihren aktiven Metaboliten. Um im Sinne einer maximalen Empfindlichkeit der Methode einen größtmöglichen prozentualen Umsatz zu erreichen, soll eine optimale Substratkonzentration in die Kultur eingesetzt werden. Dabei sind nur solche Konzentrationen akzeptabel, die keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Vitalität der Hepatozyten haben, da zytotoxische Effekte die Verträglichkeit des Mediums in den Zielkulturen herabsetzen. Die Zytotoxizität der Testsubstanzen in den ausgewählten Konzentrationen (vgl. Kap. 4.2.1.1) wird nach 24 und 48 Stunden mittels MTT-Test untersucht. Die Ergebnisse, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle von drei unabhängigen Experimenten sind in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1: Einfluss der Testsubstanzen auf die Vitalität der Rattenhepatozyten

Dargestellt ist jeweils die Vitalität im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle (0,2 % DMSO) bei der höchsten eingesetzten Konzentration (n = 3).

Substanzen	Konzentration [max.]	Vitalität 24 h [% Kontrolle]	Vitalität 48 h [% Kontrolle]
CPA	1 mM	> 90	60 ± 2,7
Acr	100 µM	> 90	> 90
ABZ	25 µM	70 ± 3,2	55 ± 0,5
ABZSO	10 µM	> 90	> 90
VPD	4 mM	> 90	> 90
VPA	1 mM	> 90	> 90

Die ausgewählten Konzentrationen von Acr, ABZSO, VPD und VPA zeigen nach 24 und 48 Stunden keinen Einfluss auf die Vitalität der Rattenhepatozyten. Die Inkubation von 1 mM CPA führt nach 48 Stunden zu einer Abnahme der Vitalität um ca. 40 % der Kontrolle. Nach 24 Stunden Behandlung mit 25 µM ABZ beträgt die Vitalität ca. 70 % und fällt um weitere 20 % nach 48 Stunden. Für 2-AAF und NOH-AAF ist im getesteten Konzentrationsbereich ein deutlicher Rückgang der Vitalität zu beobachten. Die aus der Konzentrations-Wirkungskurve graphisch ermittelten mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) von 2-AAF und NOH-AAF betragen nach 24 Stunden 52 µM bzw. 0,6 µM und nach 48 Stunden 40 µM bzw. 0,5 µM. Für die Überführungsversuche werden die Konzentrationen 25 µM ABZ und 10 µM 2-AAF über eine 24 Stunden-Kulturperiode als tolerabel bewertet.

5.1.2 Einfluss veränderter Kulturbedingungen auf die Vitalität der Rattenhepatozyten

Die Kombination primärer Rattenhepatozyten mit den Zielkulturen erfordert die Toleranz im Hinblick auf Vitalität und metabolische Aktivität der Hepatozyten gegenüber den jeweiligen Kulturbedingungen. Primäre Rattenhepatozyten werden dazu mit den Kulturmedien der 3T3-Fibroblasten bzw. der ESZ-D3 (DMEM) und der WEC (Serum-Puffermischung) über 48 Stunden inkubiert. Die Bestimmung der Vitalität mittels MTT-Test erfolgt nach 24 und 48 Stunden. Als Kontrolle dient das Standardkulturmedium der Hepatozyten. Die gemittelten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Vitalität primärer Rattenhepatozyten unter Zielkulturbedingungen

Dargestellt ist jeweils die Vitalität im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle (n = 2).

Zielkulturmedium	Vitalität 24 h [% Kontrolle]	Vitalität 48 h [% Kontrolle]
DMEM (EST)	> 90	> 90
Serum-Puffermischung (WEC)	85,3 ± 7,6	64,3 ± 9,1

Das Kulturmedium der ESZ-D3 und 3T3-Zellen hat keinen Einfluss auf die Vitalität der Rattenhepatozyten. Dagegen ist ein Rückgang der Vitalität durch Inkubation mit der Serum-

Puffermischung der WEC um ca. 15 % nach 24 Stunden und um weitere 20 % nach 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

5.1.3 Enzymatische Aktivität

Für die Kombination eines Biotransformationssystems in *in vitro*-Embryotoxizitätstests ist die metabolische Aktivität eingesetzter Leberzellen essentiell. Der enzymatische Umsatz eingesetzter Testsubstanzen sollte ausreichend sein, um in den Zielkulturen die metabolische Aktivierung zu erfassen. Eine zentrale Rolle nehmen dabei die Enzyme der Cytochrom P450-Familie ein, welche für die Funktionalisierung von vielen Fremdstoffen verantwortlich sind. Neben den Isoenzymen der Subfamilien 2A und 2C spielen in der Rattenleber CYP1A1/2, 2B1/2 und 3A1 eine bedeutende Rolle im Fremdstoffmetabolismus. Ihre Aktivität wird über den Umsatz der Substrate Ethoxy-, Pentoxy- und Benzyloxyresorufin erfasst.

5.1.3.1 AROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten

CYP-Aktivität unter Standard- und Zielkulturbedingungen

Die basale CYP-Aktivität wird nach der Präinkubation, definiert als 0 Stunden, und nach 48 Stunden Kulturperiode in WME-Standardmedium gemessen. Um Medieneinflüsse in den Zielkulturen bei der Überführung von Hepatozyteninkubaten zu reduzieren, werden Rattenhepatozyten außerdem für 48 Stunden in DMEM- und WEC-Medium kultiviert und der Einfluss der veränderten Bedingungen auf die CYP-Aktivität gemessen. Die Präinkubation der sich anschließenden WEC-Mediumkultur wird mit WMEC-Standardmedium durchgeführt. Zum Zeitpunkt 0 (Inkubationsbeginn) wird das Medium gegen WEC-Medium ausgetauscht. Das DMEMC-Medium wird bereits zur Präinkubation verwendet und anschließend durch DMEMI ersetzt. Die Nachweisgrenzen werden über Substratinkubationen ohne Zellen ermittelt (vgl. Kap. 4.2.2.1.1). Sie beträgt für die EROD-Messung 0,28 pmol, für die PROD-Messung 0,45 pmol und für die BROD-Messung 0,12 pmol Resorufin. Diese Stoffmenge wird bei der Aktivitätsberechnung der Proben berücksichtigt. In Tabelle 5.3 sind die ausgewählten CYP-Aktivitäten von drei, für WEC-Medium von zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Tabelle 5.3: CYP-Aktivität in Rattenhepatozyten unter Standard- und Zielkulturbedingungen

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD der AROD-Aktivitäten primärer Rattenhepatozyten zu den Zeitpunkten 0 und 48 Stunden unter Standardbedingungen (WMEC/WMEI; n = 3), Zielkulturbedingungen des EST (DMEMC/DMEMI; n = 3) und der WEC (WEC-Medium; n = 2). LOQ: Quantifizierungsgrenze.

Aktivität	0h	48h	0h	48h	48h
	WMEC	WMEI	DMEMC	DMEMI	WEC- Medium
EROD [pmol/min/10 ⁶ Zellen]	2,3 \pm 0,7	<LOQ	1,4 \pm 0,3	<LOQ	<LOQ
PROD [pmol/min/10 ⁶ Zellen]	1,5 \pm 0,5	<LOQ	0,9 \pm 0,3	<LOQ	<LOQ
BROD [pmol/min/10 ⁶ Zellen]	1,9 \pm 0,7	<LOQ	0,7 \pm 0,5	<LOQ	<LOQ

Die EROD-Aktivität beträgt unter Standardmediumbedingungen 2,3 pmol/min/10⁶ Zellen, die PROD-Aktivität 1,5 pmol/min/10⁶ Zellen und die BROD-Aktivität 1,9 pmol/min/10⁶ Zellen. Die Kultur der Rattenhepatozyten in DMEMC-Medium führt zum Zeitpunkt 0 Stunden zu einer leicht aber nicht signifikant erniedrigten AROD-Aktivität im Vergleich zum WMEC-Medium. Nach 48 Stunden fällt die Aktivität der ausgewählten CYP-Enzyme in beiden Medien unter die Quantifizierungsgrenze. Bei der Inkubation mit WEC-Medium ist nach einer 48 Stunden-Kulturperiode ebenfalls keine CYP-Aktivität nachweisbar.

CYP-Aktivität unter induzierenden Bedingungen

Um die Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme während der Kulturperiode zu steigern, wird dem Kulturmedium ein Induktionscocktail zugesetzt (vgl. Kap.4.2.2.1.1). Nach der Präinkubation („0 Stunden“) und einer Kulturperiode von 48 Stunden unter Einfluss des Induktionscocktails wird die AROD-Aktivität im Monolayer der primären Rattenhepatozyten gemessen. Tabelle 5.4 zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 5.4: CYP-Aktivität unter induzierenden Bedingungen

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD zu den Zeitpunkten 0 und 48 Stunden. Der eingesetzte Induktionscocktail beinhaltet 100 μ M PB, 10 μ M β NF und 0,1 μ M Dex.

Aktivität	0h	48h
EROD [pmol/min/10 ⁶ Zellen]	22,6 \pm 13,0*	130,8 \pm 23,4 ***
PROD [pmol/min/10 ⁶ Zellen]	1,3 \pm 0,3	1,6 \pm 0,5
BROD [pmol/min/10 ⁶ Zellen]	3,3 \pm 1,2	10,4 \pm 1,3 ***

(n = 3, *.p<0,05; ***.p<0,001 im Vergleich zur Standardmediumkultur zu den jeweiligen Zeitpunkten, t-Test nach Student)

Bereits nach der Präinkubationszeit lässt sich eine Induktion der Enzymaktivität durch die Behandlung mit dem Induktionscocktail im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachten. Dabei ist die EROD-Aktivität signifikant erhöht. Eine um den Faktor 1,7 erhöhte BROD-Aktivität im Vergleich zur Initialaktivität unter basalen Kulturbedingungen kann nachgewiesen werden. Die PROD-Aktivität wird innerhalb dieses Zeitrahmens nicht beeinflusst. Nach 48 Stunden Inkubation mit dem Induktionscocktail beträgt die EROD-Aktivität $130,8 \pm 23,4$, die PROD-Aktivität $1,6 \pm 0,5$ und die BROD-Aktivität $10,4 \pm 1,3$ pmol/min/ 10^6 Zellen. Dabei ist die EROD-Aktivität um Faktor 56 und die BROD-Aktivität um den Faktor 5,4 im Vergleich zur basalen Initialaktivität erhöht. Die PROD-Aktivität bleibt im Laufe der Kulturperiode konstant.

Neben der Induktion über die gesamte Kulturperiode wird außerdem die CYP-Aktivität nach 48 Stunden gemessen, nachdem nach 24 Stunden das Medium mit Induktionscocktail gegen das Standardkulturmedium WMEI oder das WEC-Medium ausgetauscht wurde. In Tabelle 5.5 sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten aus der Postinkubationsperiode mit WMEI- und WEC-Medium dargestellt.

Da sich das inkubierte DMEM-Hepatozytenmedium bei der Überführung in die Zielkulturen des ESTs im Vergleich zu WME-Medium als weniger verträglich herausstellte (vgl. Kap. 5.3.1.1), wird das DMEM-Medium in den Induktionsexperimenten nicht berücksichtigt.

Tabelle 5.5 CYP-Aktivität nach Induktions- und Postinkubationsperiode

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD nach einer 24 Stunden-Induktions- und einer 24 Stunden-Postinkubationsperiode. Die Postinkubationsperiode wird mit WMEI- und WEC-Medium durchgeführt (n = 3). Der eingesetzte Induktionscocktail beinhaltet 100 μ M PB, 10 μ M β NF und 0,1 μ M Dex.

Aktivität	48 h nach WMEI- Postinkubations- periode	48 h nach WEC- Postinkubations- periode
EROD [pmol/min/ 10^6 Zellen]	$96,3 \pm 33,4$ **	$35,4 \pm 2,5$ ***
PROD [pmol/min/ 10^6 Zellen]	$1,5 \pm 0,8$ *	$0,6 \pm 0,3$
BROD [pmol/min/ 10^6 Zellen]	$6,3 \pm 0,8$ ***	$2,0 \pm 0,4$ **

(*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001 im Vergleich zu Standardmediumbedingungen zum Zeitpunkt 48 h, t-Test nach Student).

Die 24-stündige Inkubation mit dem Induktionscocktail führt nach der 24 Stunden-Postinkubationsperiode mit dem Standardmedium WMEI zu einer erhöhten CYP-Enzymaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 48 Stunden. Die EROD-Aktivität ist um den

Faktor 40 und die BROD-Aktivität um den Faktor 3 im Vergleich zur basalen Aktivität zu Inkubationsbeginn erhöht, jedoch um 25 % respektive 40 % im Vergleich zur Aktivität nach 48 Stunden Induktion erniedrigt. Die PROD-Aktivität ist mit der unter induzierenden Bedingungen vergleichbar.

Im Fall der 24 Stunden-Postinkubationsperiode mit WEC-Medium kann in induzierten Rattenhepatozyten CYP-Aktivität nachgewiesen werden. Die EROD-Aktivität ist dabei um den Faktor 15 im Vergleich zur basalen Initialaktivität erhöht. Die PROD-Aktivität beträgt 50 % der basalen Ausgangsaktivität und die BROD-Aktivität bleibt konstant. Der induktive Effekt nach der Postinkubationsperiode mit WEC-Medium fällt zwischen 60 % (EROD und PROD) und 70 % (BROD) geringer aus als mit WMEI- Medium.

5.1.3.2 AROD-Aktivitäten in Leberschnitten der Ratte

CYP-Aktivität unter Standardbedingungen

Als mögliches fremdstoffmetabolisierendes Zellsystem für die Kombination mit den Zielkulturen stehen neben den primären Rattenhepatozyten Leberschnitte der Ratte zur Verfügung. Die CYP-Aktivität der Leberschnitte wird aus der mikrosomalen Fraktion der Schnitthomogenate nach der Präinkubation und nach einer Kulturperiode von 6, 12 und 24 Stunden gemessen. Die Nachweisgrenzen werden mit Substratinkubationen ohne Protein ermittelt (vgl. Kap. 4.2.2.1.1). Sie beträgt für die EROD-Messung 0,8 pmol, für die PROD-Messung 0,9 pmol und für die BROD-Messung 0,3 pmol Resorufin. Diese Stoffmengen werden bei der Aktivitätsberechnung der Proben berücksichtigt. Tabelle 5.6 zeigt die CYP-Aktivitäten von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 5.6: Basale AROD-Aktivitäten von Leberschnitten

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD nach der Präinkubation (0 Stunden) und nach 6, 12 und 24 Stunden Kultur unter basalen Bedingungen (n = 3). LOQ: Quantifizierungsgrenze.

Aktivität	0 h	6 h	12 h	24 h
EROD [pmol/min/mg Protein]	28,2 \pm 2,7	7,4 \pm 1,7	< LOQ	< LOQ
PROD [pmol/min/mg Protein]	19,1 \pm 5,5	6,9 \pm 1,0	< LOQ	< LOQ
BROD [pmol/min/mg Protein]	39,4 \pm 7,1	8,6 \pm 2,5	2,9 \pm 1,3	2,8 \pm 2,6

Nach der Präinkubation (0 Stunden) beträgt die EROD-, PROD und BROD-Aktivität 28,2, 19,1, und 39,4 pmol/min/mg Protein. Nach 6 Stunden nehmen die Aktivitäten um 65 bis 78 % ab und nach 12 Stunden ist keine EROD- und PROD-Aktivität mehr nachweisbar. Die BROD-Aktivität bleibt über die Kulturperiode detektierbar und beträgt nach 24 Stunden 2,8 pmol/min/mg Protein.

CYP-Aktivität unter induzierenden Bedingungen

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit der CYP-Aktivität innerhalb der 24 Stunden-Kulturperiode werden die Leberschnitte mit dem Induktionscocktail behandelt. Nach 6, 12 und 24 Stunden wird die CYP-Aktivität gemessen. Außerdem wird analog der Hepatozytenkultur eine Induktion in einem Zeitrahmen von 6 Stunden durchgeführt. Nach einer 24 Stunden-Postinkubationsperiode wird zum Zeitpunkt 30 Stunden die CYP-Aktivität gemessen. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sind in Tabelle 5.7 dargestellt.

Tabelle 5.7: AROD-Aktivitäten von Leberschnitten unter induzierenden Bedingungen

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD nach 6, 12 und 24 Stunden Induktion und nach einer 6 Stunden-Induktions- und einer 24 Stunden-Postinkubationsperiode ($n = 3$). Der eingesetzte Induktionscocktail beinhaltet 100 μ M PB, 10 μ M β NF und 0,1 μ M Dex. LOQ: Quantifizierungsgrenze.

Aktivität	6 h	12 h	24 h	30 h
EROD [pmol/min/mg Protein]	9,2 \pm 4,6	2,3 \pm 3,9	180,6 \pm 70,6	20,4 \pm 9,1
PROD [pmol/min/mg Protein]	3,8 \pm 4,6	< LOQ	13,4 \pm 6,1	< LOQ
BROD [pmol/min/mg Protein]	8,2 \pm 4,6	3,8 \pm 2,7	22,3 \pm 18,5	1,6 \pm 1,4

Die EROD, PROD- und BROD-Aktivitäten nach 6 Stunden sind mit den unter basalen Bedingungen gemessenen Werten vergleichbar und liegen bei 7,7, 3,8 und 5,9 pmol/min/mg Protein. Nach 12 Stunden fällt die PROD-Aktivität zunächst unter die Nachweisgrenze und steigt nach 24 Stunden auf einen Wert von 13,4 pmol/min/mg Protein. Die EROD- und BROD-Aktivität nimmt ebenfalls nach 12 Stunden ab, steigt aber nach 24 Stunden auf Werte, die gegenüber den basalen Aktivitäten erhöht sind. Die EROD-Aktivität beträgt nach 6 Stunden Induktion und einer 24 Stunden-Postinkubationsperiode 20,4 pmol/min/mg Protein und die BROD-Aktivität 1,6 pmol/min/mg Protein. Die PROD-Aktivität ist nicht nachweisbar. Die basalen Aktivitäten liegen zum Zeitpunkt 30 Stunden unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).

5.1.3.3 Testosteron-Metabolismus in Rattenhepatozyten

Das metabolische Profil des Modells substrats Testosteron erlaubt neben der photometrischen AROD-Aktivitätsbestimmung eine Aussage über die Aktivität ausgewählter fremdstoffmetabolisierender Enzyme in den eingesetzten *in vitro*-Systemen. Dazu werden 200 μ M Testosteron für 24 Stunden in den Hepatozytenkulturen von Ratte, Schwein und Mensch inkubiert. Um den Einfluss des Induktionscocktails auf den Testosteron-metabolismus zu untersuchen, werden außerdem 200 μ M Testosteron nach 24 Stunden Induktion mit dem Induktionscocktail für 24 Stunden inkubiert.

Neben Metaboliten des Phase-I-Metabolismus werden Glucuronsäure- und Sulfatkonjugate durch Inkubation mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase erfasst. Die Analyse erfolgt mittels HPLC-UV. Die Quantifizierung gebildeter Metaboliten wird über externe Kalibration durchgeführt. Die verwendeten Referenzsubstanzen und deren Retentionszeit sind in Tabelle 5.8 dargestellt.

Tabelle 5.8: Analyten des Testosteronmetabolismus

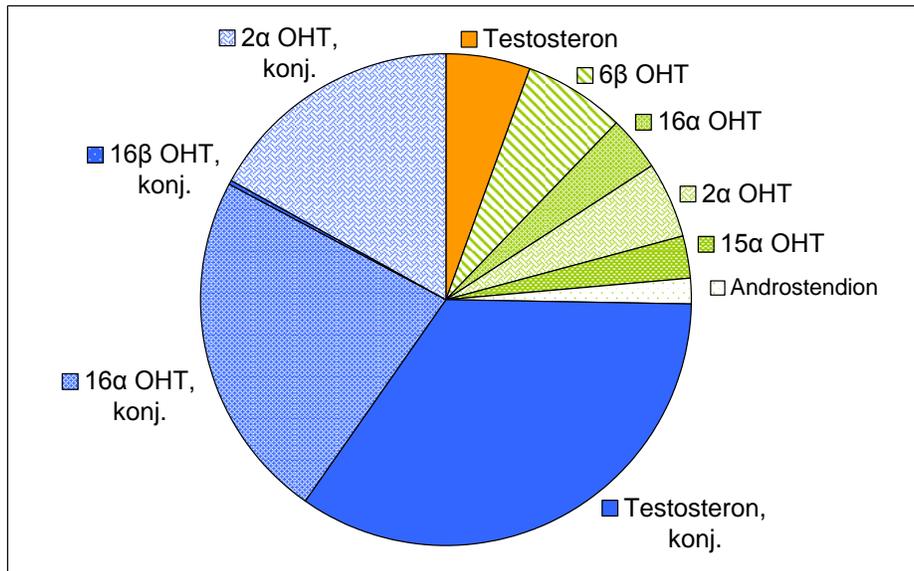
Analyt mit zugehöriger Retentionszeit. OHT: Hydroxytestosteron

Analyt	Retentionszeit [min]
6 α - OHT	16
15 α - OHT	18,2
6 β - OHT	19,6
16 α - OHT	20,6
16 β - OHT	22,7
2 α - OHT	23,4
2 β - OHT	23,6
Androstendion	26,5
Testosteron	29,3

Die Auswertung der Chromatogramme anhand der externen Standards liefert die in Abbildung 5.1 dargestellten Metabolitenprofile von Testosteron in primären Rattenhepatozyten unter basalen und induzierten Bedingungen (Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten). Dabei werden die Konzentrationen einzelner Metaboliten auf die Summe der Konzentration aller detektierten Metaboliten normiert.

Die für den Speziesvergleich aufgenommenen Profile primärer Hepatozyten von Schwein und Mensch, sowie eine tabellarische Aufführung der Einzelwerte befinden sich im Anhang Kapitel 12.1.1.

a)



b)

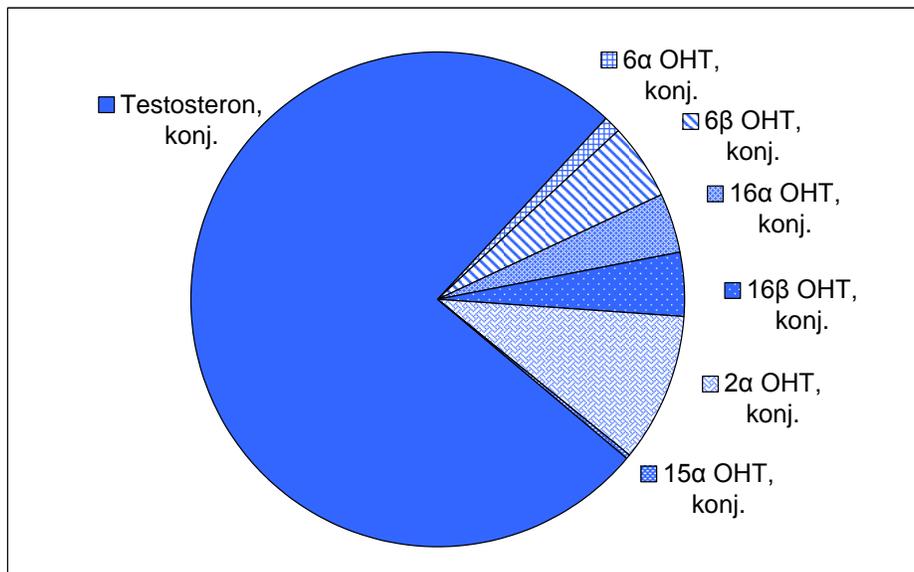


Abbildung 5.1: Metabolisches Profil von Testosteron in Rattenhepatozyten

Dargestellt sind die Anteile der Analyten aus der a) 24 Stunden-Inkubation (basal, n = 3) und b) 24 Stunden-Inkubation (induziert, n = 3). Die Konzentrationen einzelner Metaboliten sind auf die Summe der Konzentration der detektierten Metaboliten normiert. Der Umsatz beträgt a) 98 % und b) 100 %. Dargestellt sind in orange) Anteil des nicht-metabolisierten Testosterons, in grün) Phase-I-Metaboliten und in blau) Phase-II-Metaboliten. OHT: Hydroxytestosteron; konj.: konjugiert.

Der Umsatz von Testosteron in primären Rattenhepatozyten über 24 Stunden unter basalen Kulturbedingungen beträgt 98 %. Die über die Summe der Analyten berechnete und auf die Testosteronkonzentration im Inkubat ohne Zellen normierte Wiederfindung nach 24 Stunden beträgt 37 %. Phase-I-Metaboliten sind 6 β -, 16 α -, 2 α -, 15 α -OHT und Androstendion. Mit Glucuronsäure oder Sulfat konjugiert liegen Testosteron, 16 α -, 2 α - und 16 β -OHT vor. Sie bilden 75 % der detektierten Metaboliten.

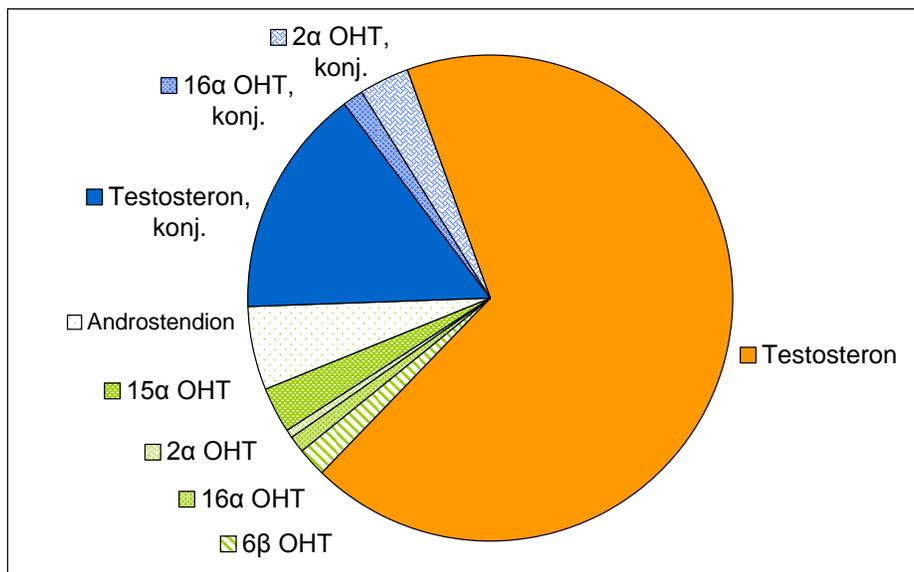
Unter induzierten Bedingungen beträgt der Umsatz von Testosteron 100 %. Die Wiederfindung beträgt 42 %. 6 α -, 6 β -, 16 α -, 16 β -, 2 α -, 15 α -OHT und Testosteron liegen als Konjugat mit Glucuronsäure und/oder Sulfat vor. 75 % der detektierten Metaboliten bilden konjugiertes Testosteron. Phase-I-Metaboliten werden nicht detektiert.

5.1.3.4 Testosteron-Metabolismus in Leberschnitten der Ratte

Die Untersuchung des Testosteronmetabolismus in der Kultur von Leberschnitten der Ratte erfolgt für 24 Stunden mit einer Substratkonzentration von 200 μ M. Der Einfluss einer 6-stündigen Induktion auf die Enzymaktivität in Leberschnitten wird ebenfalls anhand des Modellsubstrats Testosteron untersucht. Aus der chromatographischen Analyse und der Quantifizierung der Metaboliten resultieren die in Abbildung 5.2 dargestellten Metabolitenprofile von Leberschnitten der Ratte (Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten).

Unter basalen Bedingungen beträgt der Umsatz von 200 μ M Testosteron in Leberschnitten der Ratte 91 % und die über die Summe der Analyten berechnete Wiederfindung 14 %. Phase-I-Metaboliten sind 6 β -, 16 α -, 2 α -, 15 α -OHT und Androstendion. 16 α -, 2 α - und Testosteron liegen außerdem als Glucuronsäure- und/oder Sulfat-Konjugate vor. Unter induzierten Bedingungen beträgt der Umsatz 75 %. Die Wiederfindung liegt bei 33 %. 6 β -, 16 α -, 2 α -, 15 α - OHT und Androstendion können als Phase-I-Metaboliten identifiziert werden. 14 % der detektierten Metaboliten bilden Glucuronsäure- und/oder Sulfat-Konjugate von 2 α -, 2 β -, 16 α - OHT und Testosteron.

a)



b)

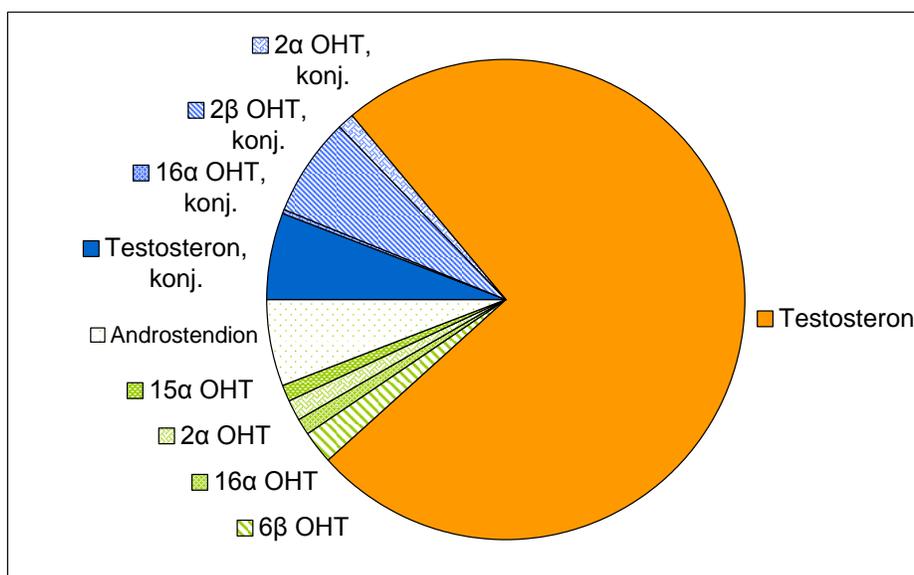


Abbildung 5.2: Metabolisches Profil von Testosteron in Leberschnitten der Ratte

Dargestellt sind die Anteile der Analyten aus der a) 24 Stunden-Inkubation (basal, n = 3) und b) 24 Stunden-Inkubation (induziert, n = 3). Die Konzentrationen einzelner Metaboliten sind auf die Summe der Konzentration der detektierten Metaboliten normiert. Der Umsatz beträgt a) 91 % und b) 75 %. Dargestellt sind in orange) Anteil des nicht-metabolisierten Testosterons, in grün) Phase-I-Metaboliten und in blau) Phase-II-Metaboliten. OHT: Hydroxytestosteron; konj.: konjugiert.

5.1.4 Expression ausgewählter CYP-Enzyme in Rattenhepatozyten

5.1.4.1 RT-PCR

Innerhalb des Verbundprojekts werden die Untersuchungen zur Genexpression von CYP1A1 und 2B1/2 in Rattenhepatozyten an der MLU durchgeführt. Die Zelllysate werden zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 Stunden unter basalen Kulturbedingungen und 24 und 48 Stunden nach Behandlung mit dem Induktionscocktail gewonnen. Als Kontrolle dient das als „housekeeping“-Gen genutzte Cyclophilin. In Abbildung 5.3 sind beispielhaft die RT-PCR-Produkte einer Präparation dargestellt.

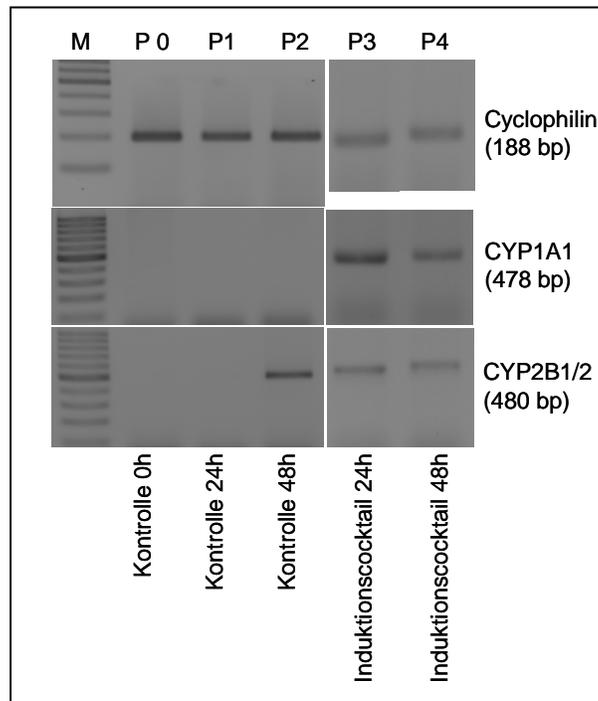


Abbildung 5.3: RT-PCR Produkte von CYP1A1 und CYP2B1/2 aus primären Rattenhepatozyten
Die RT-PCR wird von der MLU in Halle-Wittenberg durchgeführt. Die Zelllysate stammen aus einer Hepatozytenpräparation. P0-P2: Basale Bedingungen, P3-P4: Induzierende Bedingungen, Zeitangabe: Zeitpunkt der Probennahme. Cyclophilin: „housekeeping“-Gen.

Unter basalen Bedingungen ist für CYP1A1 zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 Stunden keine Bande detektierbar. Eine Expression von CYP2B1/2 ist ebenfalls zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden nicht zu beobachten. Nach 48 Stunden ist eine schwache Bande nachweisbar. Die Behandlung mit dem Induktionscocktail führt nach 24 und 48 Stunden zum Nachweis einer Bande für CYP1A1. Die Bandenintensität von CYP2B1/2 ist nach der Behandlung mit

dem Induktionscocktail mit der Bande zum Zeitpunkt 48 Stunden unter basalen Bedingungen vergleichbar.

5.1.4.2 Western Blot

Die Untersuchungen der CYP1A1- und 2B1/2-Proteine aus primären Rattenhepatozyten werden mittels Western Blot an der TUM durchgeführt. Die Zelllysate werden zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 Stunden unter basalen Kulturbedingungen, 24 und 48 Stunden unter induzierenden Bedingungen und 48 Stunden nach 24 Stunden-Induktions- und 24 Stunden-Postinkubationsperiode gewonnen. Als Ladungskontrolle dient die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Zwei repräsentative Blots sind in Abbildung 5.4 dargestellt.

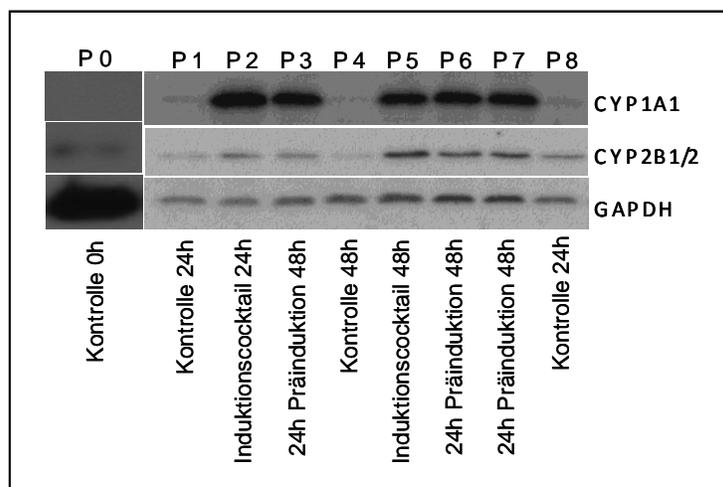


Abbildung 5.4: Western Blot von CYP1A1 und 2B1/2 aus primären Rattenhepatozyten

Der Western Blot wird von der TU in München durchgeführt. Die Zelllysate stammen aus 3 Hepatozytenpräparationen P0, P1-P5 und P6-P8, Zeitangabe: Zeitpunkt der Probennahme. GAPDH: Ladungskontrolle.

Nach der Präinkubationszeit (P0) kann bei erhöhter Proteinbeladung im Vergleich zu P1 bis P8 ein schwaches Signal von CYP2B1/2 detektiert werden. CYP1A1 wird zu Inkubationsbeginn (0 Stunden) nicht nachgewiesen. Unter basalen Kulturbedingungen können nach 24 Stunden (P1 und P8) schwache Proteinbanden von CYP1A1 und 2B1/2 detektiert werden. Die 24-stündige Inkubation mit dem Induktionscocktail führt in den Proteinanalysen zu einer Zunahme der Bandenintensität von CYP1A1 (P2). Ein induktiver Effekt auf CYP2B1/2 ist nach 48 Stunden Inkubation mit dem Induktionscocktail nachweisbar (P5). CYP1A1 weist in induzierten Hepatozyten nach 48 Stunden (P3, P6 und

P7) eine mit der 48 Stunden-Induktion vergleichbare Bandenintensität auf. CYP2B1/2 ist durch die 24-stündige Induktionsperiode schwächer induziert als nach 48 Stunden Behandlung. Die CYP2B1/2-Bande ist jedoch deutlich stärker als unter basalen Bedingungen. Die Daten aus den Western Blots bestätigen die Ergebnisse der RT-PCR und der Enzymaktivitätsuntersuchungen.

5.1.5 Quantitative Analyse der Proteratogene und Teratogene

5.1.5.1 Cyclophosphamid

Die Konzentrationsbestimmungen von Cyclophosphamid in den *in vitro*-Metabolismusinkubaten werden von „Across Barriers GmbH“ in Saarbrücken durchgeführt. Sie erlauben Aussagen über die Stabilität von CPA im Kulturmedium und den Umsatz des Proteratogens im *in vitro*-Metabolissystem. Der Referenzmetabolit Acrolein war im gewünschten Konzentrationsbereich nicht quantifizierbar. Daher erfolgt die Berechnung des Umsatzes über die Konzentrationsabnahme von CPA. Die Ergebnisse der Inkubate aus der Kultur von Rattenhepatozyten und Leberschnitten sind in Tabelle 5.9 aufgeführt.

Die Wiederfindung von CPA in nicht-inkubierten Proben beträgt in Standardhepatozyten- und Leberschnittmedium 90 bis 100 % und in WEC-Medium ca. 60 %. Ein abiotischer Abbau von ca. 10 % in Leberschnittinkubaten und von ca. 30 % in Hepatozyteninkubaten der Konzentration 100 μ M CPA findet während der Kulturperiode von 24 Stunden statt. Diese Abnahme wird in den 1 mM-Inkubaten nicht beobachtet. In WEC-Medium reduziert sich die CPA-Konzentration abiotisch um 20 % im 100 μ M-Inkubat und um 10 % im 1 mM-Inkubat verglichen mit der Konzentration der nicht-inkubierten Proben. Nach einer 48-stündigen Inkubation von 100 μ M CPA mit Hepatozyten werden $37,5 \pm 1,8$ μ M CPA analysiert, welches einem Umsatz von ca. 23 % bezogen auf die Konzentration der Probe ohne Hepatozyten entspricht. Im 1 mM-Inkubat beträgt der Umsatz 10 %. Durch die Induktion wird der Umsatz von 100 μ M auf 40 % und von 1 mM auf 25 % trotz Halbierung der Inkubationszeit formal gesteigert. Die Erhöhung des Umsatzes resultiert jedoch aus der höheren Wiederfindung von CPA nach 24 Stunden. Die analysierten CPA-Konzentrationen in den Proben der 24 Stunden Inkubation unter basalen Kulturbedingungen sind mit denen der induzierten Kultur vergleichbar. In WEC-Medium werden nach 24 Stunden Inkubation in der induzierten Hepatozytenkultur $36,4 \pm 5,2$ μ M CPA detektiert. Diese Konzentration ist mit dem Wert aus der Standardmediumkultur vergleichbar. Der Umsatz beträgt ca. 18 %. Im 1 mM-Inkubat kann kein Umsatz berechnet werden, da die analysierte Konzentration größer

als die Konzentration der Probe ohne Hepatozyten ist. In den Inkubaten der Leberschnitte werden nach 24 Stunden 63,8 μM und 524,5 μM CPA analysiert. Dies entspricht einem Umsatz von 29 % und 52 %.

Tabelle 5.9: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von CPA in Rattenhepatozyten- und -leberschnittinkubaten

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der CPA-Konzentrationsbestimmung in Inkubaten aus primären Rattenhepatozyten und -leberschnitten sowie der Umsatz, normiert auf die CPA-Konzentration im Inkubat „ohne Zellen“ (n = 3). *¹: n = 1.

Inkubationsperiode	Inkubat	Eingesetzte Konzentration [μM]	Analysierte Konzentration [μM]	Wiederfindung [%]	Umsatz [%]
Inkubation in Standard-Hepatozytenmedium					
0 h	nicht inkubiert	100	89,5 \pm 29,5	90	
48 h	ohne RH	100	48,7 \pm 12,3	49	
48 h	mit RH	100	37,5 \pm 1,8		23
24 h	ohne RH	100	73,2 \pm 17,7	73	
24 h	mit RH	100	54,6 \pm 9,2		25
24 h	RH, induziert	100	44,0 \pm 17,9		40
0 h	nicht inkubiert	1000	1012,7 \pm 203,2	101	
48 h	ohne RH	1000	908,8 * ¹	91	
48 h	mit RH	1000	815,8 \pm 224,9		10
24 h	ohne RH	1000	1134,1 \pm 155,0	113	
24 h	mit RH	1000	782,5 \pm 130,6		31
24 h	RH, induziert	1000	853,9 \pm 174,4		25
Inkubation in WEC-Serum					
0 h	nicht inkubiert	100	63,5 * ¹	64	
24 h	ohne RH	100	44,1 \pm 3,9	44	
24 h	RH, induziert	100	36,4 \pm 5,2		18
0 h	nicht inkubiert	1000	651,8 * ¹	65	
24 h	ohne RH	1000	558,4 * ¹	56	
24 h	RH, induziert	1000	562,1 * ¹		0
Inkubation in Rattenleberschnitten					
24 h	ohne LS	100	89,4 * ¹	89	
24 h	mit LS	100	63,8 * ¹		29
24 h	ohne LS	1000	1081,5 * ¹	108	
24 h	mit LS	1000	524,5 * ¹		52

5.1.5.2 Albendazol und Albendazolsulfoxid

Die Konzentrationsbestimmungen von Albendazol und Albendazolsulfoxid werden vom Zentrallabor deutscher Apotheker in Eschborn durchgeführt. Sie erlauben Aussagen über die Stabilität von ABZ im Kulturmedium und den Umsatz zu ABZSO durch die *in vitro*-Metabolismussysteme. Die Ergebnisse der Inkubate aus der Kultur von Rattenhepatozyten und -leberschnitten sind in Tabelle 5.10 aufgeführt.

Die Wiederfindung von 10 μM ABZ in nicht-inkubierten Proben beträgt in Standardhepatozyten- und Leberschnittmedium 60 bis 70 % und in WEC-Medium 93 %. In nicht-inkubierten Proben der Konzentration 25 μM ABZ werden 50 % Substrat wiedergefunden. Nach 24 und 48 Stunden Inkubation von 10 μM ohne Zellen können im Standardhepatozytenmedium noch 29 % bzw. 22 % ABZ nachgewiesen werden. Im 25 μM -Inkubat ohne Zellen beträgt die Wiederfindung nach 24 Stunden 16 %. In Leberschnitt- und WEC-Medium ohne Zellen reduziert sich die ABZ-Konzentration im Vergleich zur nicht-inkubierten Probe nicht. In den Inkubaten ohne Zellen wird kein Anstieg der ABZSO-Konzentration beobachtet. Nach 48 Stunden Hepatozyteninkubation ist kein ABZ mehr nachweisbar. Daraus resultiert ein Umsatz, aufgrund der niedrigen Wiederfindungen auf die theoretische Ausgangskonzentration berechnet, von 100 %. Davon können 82 % als ABZSO identifiziert werden. Nach der 24 Stunden-Inkubation unter basalen und induzierten Bedingungen wird ein Umsatz von 99 % ermittelt. ABZSO wird zu vergleichbaren Anteilen von 69 bis 75 % gebildet. Dies entspricht ABZSO-Konzentrationen von 7 μM (10 μM) und 16 μM (25 μM). In WEC-Medium beträgt der Umsatz 56 %. Davon bilden 75 %, also 4 μM ABZSO. In Leberschnitten beträgt der Umsatz von ABZ 94 %. Dabei entstehen 7 μM ABZSO, welche einen Anteil von 77 % des Umsatzes bilden.

Zusammengefasst resultieren aus der Standardhepatozyten- und Leberschnittkultur ähnliche Umsätze von ABZ. Die Bildung von ABZSO ist ebenfalls vergleichbar. Der Anteil des gebildeten Sulfoxids ist unabhängig von der Substratkonzentration. Durch die Behandlung mit dem Induktionscocktail wird keine weitere Zunahme der ABZSO-Konzentration beobachtet. Die Wiederfindung von ABZ in Standardhepatozyten- und Leberschnittinkubaten ohne Zellen ist gering. Obwohl der Umsatz von ABZ in WEC-Medium um die Hälfte reduziert ist, kann eine im Vergleich hohe Konzentration ABZSO nachgewiesen werden. Möglicherweise ist nicht nur die Biotransformation von ABZ sondern auch die des Sulfoxids in WEC-Medium geringer als in Standardhepatozytenmedium.

Tabelle 5.10: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von ABZ und ABZSO in Rattenhepatozyten und -leberschnittinkubaten

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der ABZ-Konzentrationsbestimmung in Inkubaten aus primären Rattenhepatozyten und -leberschnitten sowie der Umsatz zu ABZSO, normiert auf die theoretische Ausgangskonzentration (n = 3). *¹: n = 1, n.n.: nicht nachweisbar.

Inkubationsperiode	Inkubat	Eingesetzte Konzentration [μ M]	Analysierte Konzentration [μ M]	Wiederfindung [%]	Umsatz [%]	davon zu ABZSO [%]
Inkubation in Standard-Hepatozytenmedium						
0 h	nicht inkubiert	10	7,3 \pm 1,9	73		
48 h	ohne RH	10	2,2 * ¹	22		
48 h	mit RH	10	n.n.		100	82
24 h	ohne RH	10	2,8 \pm 1,1	29		
24 h	mit RH	10	0,1 * ¹		99	75
24 h	RH, ind.	10	0,1 \pm 0,07		99	68
0 h	nicht inkubiert	25	12,3 \pm 5,7	49		
24 h	ohne RH	25	3,9 \pm 3,5	16		
24 h	mit RH	25	0,1 * ¹		99	65
24 h	RH, ind.	25	0,3 \pm 0,2		99	66
Inkubation in WEC-Serum						
0 h	nicht inkubiert	10	9,3 * ¹	93		
24 h	ohne RH	10	8,9 * ¹	89		
24 h	RH, ind.	10	4,4 * ¹		56	75
Inkubation in Rattenleberschnitten						
0 h	nicht inkubiert	10	5,9 * ¹	59		
24 h	ohne LS	10	5,3 * ¹	53		
24 h	mit LS	10	0,3 * ¹		94	77

5.1.5.3 Valpromid und Valproinsäure

Die Konzentrationsbestimmungen von Valpromid und Valproinsäure werden vom Zentrallabor deutscher Apotheker in Eschborn durchgeführt. Sie erlauben Aussagen über die Stabilität von VPD im Kulturmedium und den Umsatz zu VPA durch die *in vitro*-Metabolismussysteme. Die Ergebnisse der Inkubate aus der Kultur von Rattenhepatozyten und -leberschnitten sind in Tabelle 5.11 aufgeführt.

Die Wiederfindung von VPD beträgt in nicht-inkubierten Proben des Standardhepatozyten- und Leberschnittmedium zwischen 75 und 80 % und in WEC-Medium 110 %. Nach 24 und 48 Stunden Inkubation ohne Zellen in Hepatozyten- und WEC-Medium bleibt der Wert konstant bei ca. 80 %. Im Leberschnittmedium sinkt die Wiederfindung auf 60 % nach 24 Stunden.

1 mM VPD wird innerhalb von 48 Stunden zu 32 % umgesetzt. Ein vergleichbarer Umsatz wird nach 24 Stunden Induktion und 24 Stunden Postinkubationsperiode ermittelt. Die Erhöhung der Substratkonzentration auf 4 mM VPD führt zu einem Umsatz von 2,4 % unter basalen Bedingungen und von 11 % unter induzierten Bedingungen. Mit Ausnahme des 48 Stunden-Inkubats von 1 mM VPD kann in keiner Probe VPA nachgewiesen werden. Die in diesem Inkubat detektierte VPA-Konzentration beträgt 13 µM. Nach der Inkubation von 2 mM VPD in WEC-Medium in induzierten Rattenhepatozyten kann kein Umsatz von VPD analysiert werden. Auch in der Kultur der Leberschnitte findet innerhalb von 24 Stunden kein Umsatz von VPD zu VPA statt.

Tabelle 5.11: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von VPD und VPA in Rattenhepatozyten und -leberschnittinkubaten

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der VPD-Konzentrationsbestimmung in Inkubaten aus primären Rattenhepatozyten und -leberschnitten sowie der Umsatz zu VPA, normiert auf die VPD-Konzentration im Inkubat ohne Zellen (n = 2). *¹: n = 1, n.n.: nicht nachweisbar.

Inkubations- periode	Inkubat	Eingesetzte Konzentration [μ M]	Analysierte Konzentration [μ M]	Wieder- findung [%]	Umsatz [%]	davon zu VPA [%]
Inkubation in Standard-Hepatozytenmedium						
0 h	nicht inkubiert	1000	749,8 * ¹	75		
48 h	ohne RH	1000	841,3 * ¹	84		
48 h	mit RH	1000	571,1 * ¹		32,1	1,4
24 h	ohne RH	1000	819,4 * ¹	82		
24 h	RH, ind.	1000	590,9 * ¹		28,0	n.n.
0 h	nicht inkubiert	4000	3252,4 \pm 602,8	81		
24 h	ohne RH	4000	3271,1 \pm 209,1	82		
24 h	mit RH	4000	3191,8 \pm 58,8		2,4	n.n.
24 h	RH, ind.	4000	2905,0 \pm 149,1		11,0	n.n.
Inkubation in WEC-Medium						
0 h	nicht inkubiert	2000	2213,4 * ¹	111		
24 h	ohne RH	2000	2206,7 * ¹	110		
24 h	RH, ind.	2000	2225,9 * ¹		/	n.n.
Inkubation in Rattenleberschnitten						
0 h	nicht inkubiert	1000	749,8 * ¹	75		
24 h	ohne LS	1000	601,0 * ¹	60		
24 h	mit LS	1000	599,0 * ¹		0,3	n.n.

5.1.5.4 2-Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-2-Acetylaminofluoren

Die Konzentrationsbestimmungen von 2-AAF und NOH-AAF erfolgen nach Kap. 4.2.4.1.4. Die Analysen erlauben Aussagen über die Stabilität von 2-AAF im Kulturmedium und den Umsatz zu NOH-AAF durch die *in vitro*-Metabolismussysteme. Die Ergebnisse der Inkubate aus der Kultur von Rattenhepatozyten und -leberschnitten sind in Tabelle 5.12 aufgeführt. 2-AAF wird zunächst in der höchstmöglichen, nicht zytotoxischen Konzentration von 10 µM für 24 Stunden in Rattenhepatozyten inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung liefert in den Kontrollproben eine Wiederfindung von weniger als 60 %. Der Umsatz beträgt 97 bis 100 %. NOH-AAF kann nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der niedrigen Wiederfindung und der Tatsache, dass für eine Überführung von 2-AAF-Inkubaten in die 3T3-Zielkultur eine höhere Konzentration erreicht werden soll, werden Leberschnitte der Ratte als Biotransformationssystem herangezogen. Sie erlauben den Einsatz von 100 µM 2-AAF ohne zytotoxische Effekte (die Ergebnisse der Zytotoxizitätsbestimmung sind im Anhang, Kap. 12.1.2 dargestellt) und das serumhaltige Kulturmedium führt zu einer Wiederfindung von 96 bis 104 %. Innerhalb von 24 Stunden werden 82 bis 89 % 2-AAF durch die Leberschnitte umgesetzt. Ein Unterschied zwischen der basalen und der induzierten Leberschnittkultur besteht nicht. NOH-AAF kann in keinem Inkubat nachgewiesen werden.

Tabelle 5.12: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von 2-AAF und NOH-AAF in Rattenhepatozyten- und -leberschnittinkubaten

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der 2-AAF-Konzentrationsbestimmung in Inkubaten aus primären Rattenhepatozyten und -leberschnitten sowie der Umsatz zu NOH-AAF, normiert auf die 2-AAF-Konzentration im Inkubat ohne Zellen/Schnitte (n = 2). *¹: n = 1, n.n.: nicht nachweisbar.

Inkubations- periode	Inkubat	Eingesetzte Konzentration [μ M]	Analysierte Konzentration [μ M]	Wieder- findung [%]	Umsatz [%]	davon zu NOH-AAF [%]
Inkubation in Standard-Hepatozytenmedium						
0 h	nicht inkubiert	10	5,8 * ¹	58		
24 h	ohne RH	10	5,7 * ¹	57		
24 h	mit RH	10	0,1 * ¹		97	n.n.
24 h	RH, ind.	10	0,0 * ¹		100	n.n.
Inkubation in Rattenleberschnitten						
0 h	nicht inkubiert	10	10,7 * ¹	104		
24 h	ohne LS	10	10,9 * ¹	109		
24 h	mit LS	10	1,9 * ¹		82	n.n.
0 h	nicht inkubiert	100	95,7 \pm 0,3	96		
24 h	ohne LS	100	91,6 \pm 13,1	92		
24 h	mit LS	100	9,7 \pm 4,2		89	n.n.
24 h	LS, ind.	100	16,7 * ¹		82	n.n.

5.1.6 Strukturaufklärung entstandener Metabolite

Zur Identifizierung gebildeter Metaboliten in den *in vitro*-Metabolismusinkubaten der Rattenhepatozyten werden die Proben im Labor für Strukturaufklärung der BASF SE massenspektrometrisch analysiert (vgl. Kap. 4.2.4.2). Dazu werden die Substanzinkubate mit und ohne Zellen sowie die Inkubate „ohne Testsubstanz“ (Leerinkubation) chromatographisch aufgetrennt und anschließend in einem Q-TOF-Massenanalysator detektiert. Die Q-TOF-Messtechnik liefert hochauflösende Massenspektren, die die Strukturaufklärung anhand der Summenformel erlaubt. Für die Auswertung werden i.d.R. die Experimente unter positiven ESI-Bedingungen herangezogen. In den LC/MS-Chromatogrammen über die Summe aller registrierten Ionen (Total Ion Current, TIC) der Proben „mit Zellen“ werden zunächst Signale identifiziert, welche sich in den Chromatogrammen der Proben „ohne Zellen“ und der Leerinkubation nicht befinden, da es sich in diesem Fall um enzymatisch gebildete Metaboliten der Testsubstanz handeln sollte. Das Massenspektrum (Full Scan) zu dieser Retentionszeit (RT) liefert ein signifikantes Signal bei einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis (m/z , i.d.R. $z=1$), welches zur Berechnung möglicher Summenformeln herangezogen wird. Für die Auswertung werden ausschließlich Summenformeln berücksichtigt, die eine Abweichung der akkuraten Masse i.d.R. kleiner als ± 1 mDa aufweisen. Natrium-Addukte einiger Verbindungen können ebenfalls im Full Scan identifiziert und berechnet werden. Zur Berechnung werden neben der akkuraten Masse auch die Isotopenmuster herangezogen, welche besonders für chlorhaltige Verbindungen (vgl. CPA) aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung von 3:1 für ^{35}Cl und ^{37}Cl charakteristisch sind. Der Nachweis, dass es sich bei der detektierten Masse tatsächlich um eine Verbindung handelt, die enzymatisch aus der Testsubstanz hervorgeht, erfolgt über Massenchromatogramme (Extracted Ion Chromatogram, EIC). Das Fragmentierungsmuster in den Massenspektren der Produktionen-Scans wird für die Aufklärung der Konstitution der Verbindung herangezogen.

Für alle untersuchten Substanzen kann auf diese Weise ein Teil der Metaboliten identifiziert werden. Da Überlagerungen aufgrund von Matrixeffekten die Analyse erschweren, und/oder die Konzentration der Metaboliten gering ist, werden die akkuraten Massen von Metaboliten, welche bereits publiziert wurden oder auf möglichen enzymatischen Reaktionen beruhen, über das EIC abgefragt und berechnet. Über den Produktionen-Scan können anhand des Fragmentierungsmusters die Strukturen ermittelt werden.

5.1.6.1 Cyclophosphamid

Die LC-MS-Chromatogramme (+ESI TIC) der CPA-Inkubate mit und ohne Zellen nach 24 Stunden unter basalen Bedingungen sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Tabelle 5.14 zeigt Strukturvorschläge der identifizierten CPA-Metaboliten. Die Full Scan- und Fragmentierungsspektren sowie die Massenchromatogramme von CPA und den identifizierten Metaboliten sind im Anhang, Kapitel 12.1.3.1 dargestellt.

CPA wird im Inkubat „ohne Zellen“ im Massenchromatogramm bei RT 11,11 min detektiert. Der Full Scan weist ein Signal bei m/z 261,0321 auf, welches nach Berechnung die Summenformel von CPA ($C_7H_{16}Cl_2N_2O_2P$) mit einer Abweichung von 0 mDa liefert. Ein Natriumaddukt wird ebenfalls detektiert. Im MS/MS-Spektrum bildet m/z 140,0418 das Hauptfragment (Fragment 3, Tabelle 5.13), welches durch Abspaltung von [1,3,2]-Oxazaphosphinan-2-oxid entsteht. Das um zwei Protonen reichere Fragment 2 bei m/z 142,0180 entsteht aus der Abspaltung von 5,6 Dihydro-[1,3,2]-Oxazaphosphinin-2-oxid, welches auch als korrespondierendes Fragment bei m/z 120,0204 gefunden wird. Eine folgende HCl-Abspaltung liefert das Fragment 4 bei m/z 106,0418. Fragment 1 bei m/z 232,9998 geht über eine Ethylenabspaltung aus dem Ring des Moleküls hervor.

Die Abfrage der Metaboliten erfolgt anhand der Publikationen von van Aerts und Zhang (van Aerts *et al.* 1995; Zhang *et al.* 2005). Die Darstellung der identifizierten Metaboliten erfolgt in der Reihenfolge ihrer Retentionszeit.

CPA-M1 wird anhand der akkuraten Massen des $[M+H]^+$ und des Natriumaddukts $[M+Na]^+$ im positiven Modus sowie des $[M-H]^-$ im negativen Modus und der jeweiligen Massenchromatogramme als Glutathionlypropionsäure identifiziert. Die Abweichung des Moleküls (+ESI) beträgt -1,7 mDa. Das $[M-H]^-$ wird hier als Bestätigung der Säurefunktion genutzt. Ein valides MS/MS-Spektrum liegt aufgrund von Überlagerungseffekten nicht vor.

CPA-M2 zeigt im Full Scan bei RT 5,63 min ein charakteristisches Isotopenmuster einer Verbindung mit zwei Cl-Atomen. Die Abweichung zur akkuraten Masse beträgt 0,5 mDa. Ein Natriumaddukt kann ebenfalls nachgewiesen werden. Im Massenchromatogramm können sowohl das $[M+H]^+$ als auch das $[M+Na]^+$ zu RT 5,63 min ermittelt werden. Die Verbindung wird auf Basis der Full Scan Spektren und der akkuraten Masse Phosphoramid Mustard zugeordnet.

CPA-M3 wird zur RT 7,56 min detektiert. Die Abweichung der akkuraten Masse beträgt -2,2 mDa. Im Full Scan zeigt sich ein charakteristisches Isotopenmuster einer chlorhaltigen Verbindung. Das Fragmentierungsmuster bestätigt die Annahme, dass es sich um Glutathionylcyclophosphamid handelt. Im MS/MS-Spektrum geht das Hauptfragment bei m/z 403,0931 aus einer Spaltung der Glu-Cys-Peptidbindung des Glutathions hervor (Fragment 1, Tabelle 5.13). Die Abspaltung des verbliebenen Cys-Gly-Restes liefert das Fragment m/z 257,0247 (Fragment 2, Tabelle 5.13).

CPA-M4 wird bei RT 8,79 min detektiert und weist im Full Scan ein Signal bei m/z 293,0220 auf. Ein Natriumaddukt kann ebenfalls detektiert und berechnet werden. Die Massenchromatogramme weisen einen signifikanten Peak bei RT 8,79 min auf. Das MS/MS-Spektrum liefert nach Abspaltung von Prop-2-ensäure das Haupt- und Schlüsselfragment zur Strukturaufklärung m/z 221,0007 (Fragment 1, Tabelle 5.13). Eine daraus folgende Abspaltung von Phosphoramidit führt zum Fragment 2 bei m/z 142,0186. Die weitere Abspaltung von 2-Chloroethylamin liefert das Fragment 3 bei m/z 62,9996. Anhand der Fragmentierung wird die Verbindung mit einer Massenabweichung von -0,8 mDa als Carboxyphosphamid identifiziert.

CPA-M5 wird mit einer Massenabweichung von -0,4 mDa bei RT 9,08 min als 4-Ketocyclophosphamid identifiziert. Im Full Scan weisen das Molekülion und das Natriumaddukt ein charakteristisches Isotopenmuster einer Verbindung mit zwei Chloratomen auf. Ein valides MS/MS-Spektrum liegt nicht vor.

CPA-M6 hat eine akkurate Masse von m/z 277,0270 und wird bei RT 9,32 min detektiert. Die Verbindung wird aufgrund des vorliegenden Molekülions, des Natriumaddukts und der Chlor-Isotopenmuster im Full Scan als 4-Hydroxycyclophosphamid bzw. Aldophosphamid identifiziert. Die Abweichung beträgt -0,8 mDa. Aufgrund der im Massenchromatogramm von CPA-M7 (s.u.) nachgewiesenen akkuraten Masse von m/z 259,0153 bei RT 9,23 min, bei der es sich um ein sog. „in-source-Fragment“ der m/z 277,0270 handelt (Wasserabspaltung), wird 4-Hydroxycyclophosphamid als bevorzugt vorliegende Struktur betrachtet.

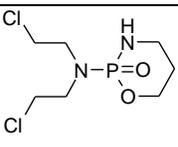
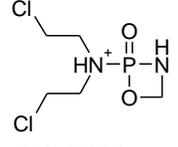
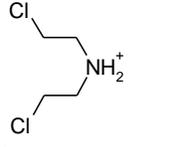
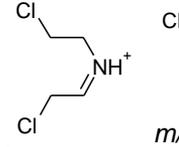
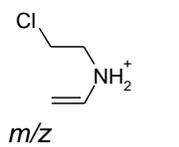
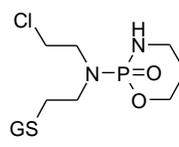
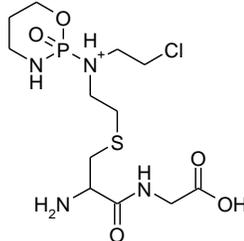
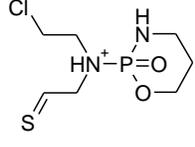
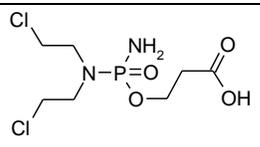
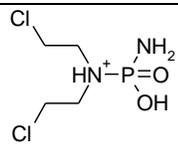
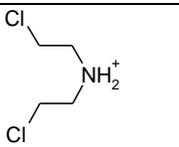
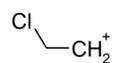
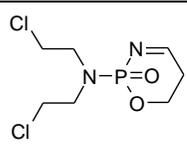
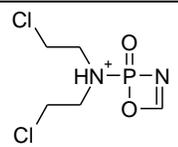
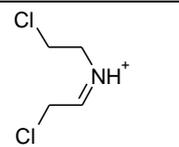
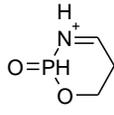
CPA-M7 wird bei RT 11,62 min detektiert und weist im Full Scan ein Signal bei m/z 259,0165 mit einem charakteristischen Chlor-Isotopenmusters auf. Bei dem zweiten Peak im Massenchromatogramm bei RT 9,23 min handelt es sich um das „in-source-Fragment“ von CPA-M6. Das MS/MS-Spektrum weist ein ähnliches Fragmentierungsmuster auf wie CPA. Das Hauptfragment bildet ebenfalls m/z 140,0031 (Fragment 2, Tabelle 5.13) und entsteht aus der Abspaltung von 5,6 Dihydro-[1,3,2]-Oxazaphosphinin-2-oxid, welches

auch als korrespondierendes Fragment bei m/z 120,0196 gefunden wird (Fragment 2, Tabelle 5.13).

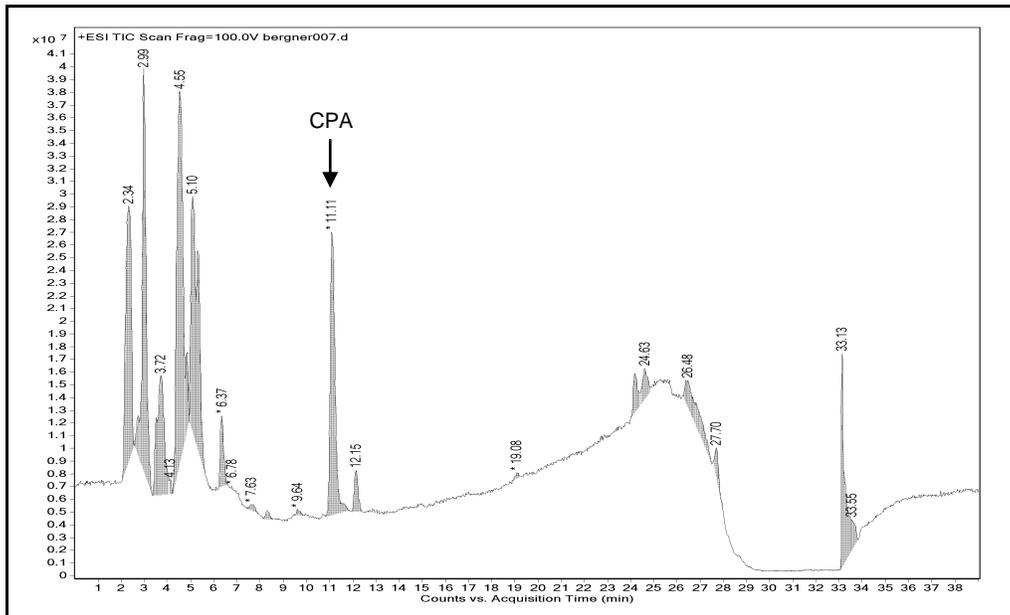
Eine Ethylenabspaltung aus dem Molekölion wird durch das Fragment m/z 230,9859 (Fragment 1, Tabelle 5.13) bestätigt. Anhand der Fragmentierung wird die Verbindung mit einer Massenabweichung von -1,2 mDa als Iminocyclophosphamid identifiziert.

Tabelle 5.13: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von CPA

Dargestellt sind die Schlüsselfragmente zur Strukturaufklärung der CPA-Metaboliten aus den im Anhang Kap. 12.1.3.1 dargestellten MS/MS-Spektren. Metaboliten (M) geordnet nach RT.

	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
 CPA m/z 261,0321 RT 11,11 min	 m/z 232,9998	 m/z 142,0180	 m/z 140,0024	 m/z 106,0418
 CPA-M3 m/z 532,1393 RT 7,56 min	 m/z 403,0931	 m/z 257,0247		
 CPA-M4 m/z 293,0220 RT 8,79 min	 m/z 221,0007	 m/z 142,0186	 m/z 62,9996	
 CPA-M7 m/z 259,0165 RT 11,62 min	 m/z 230,9859	 m/z 140,0031	 m/z 120,0196	

a)



b)

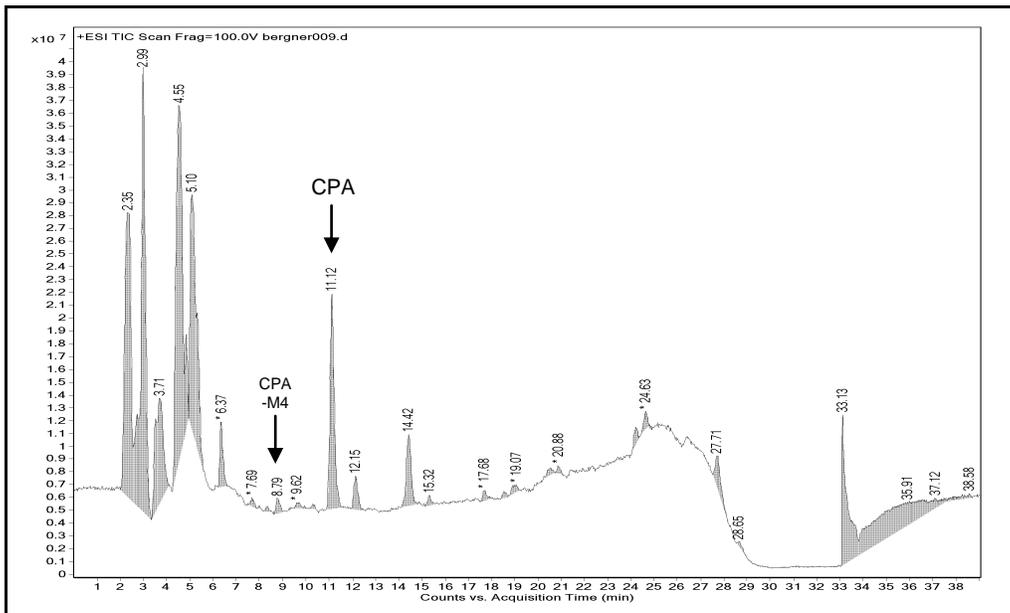
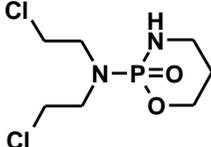
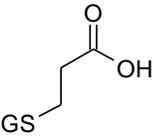
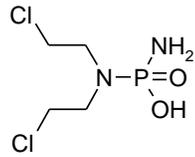
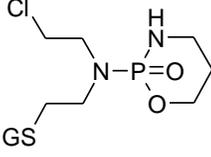
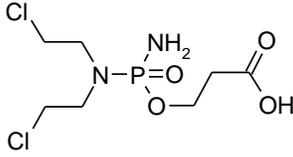
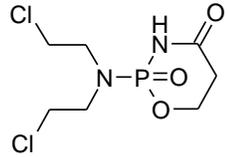
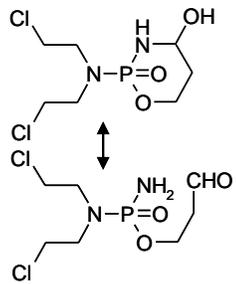
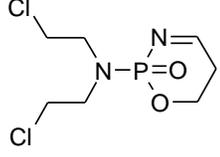


Abbildung 5.5: LC/MS-Chromatogramme der CPA-Inkubate aus primären Rattenhepatozyten
 Dargestellt sind die +ESI-TIC-Chromatogramme der Rattenhepatozyteninkubate a) ohne Zellen und b) mit Zellen über 24h unter basalen Bedingungen. CPA-Konzentration 100 μ M. CPA: RT 11,11 min, CPA-M4: RT 8,79 min. Matrixpeaks in Abb. b werden anhand der Leerinkubation (nicht gezeigt) identifiziert.

Tabelle 5.14: Strukturvorschläge identifizierter CPA-Metaboliten

Dargestellt sind die CPA-Metaboliten (CPA-M1 bis CPA-M7), welche in den Inkubaten aus Rattenhepatozyten identifiziert worden sind.

Substrat	Identifizierte CPA-Metaboliten
 <p>Cyclophosphamid RT 11,11 min [M+H]⁺ = 261,0321 Δ 0 mDa</p>	<p>CPA-M1 C₁₃H₂₁N₃O₈S RT 4,85 min [M+H]⁺ = 380,1122; Δ -1,7 mDa Glutathionylpropionsäure</p> 
	<p>CPA-M2 C₄H₁₁Cl₂N₂O₂P RT 5,63 min [M+H]⁺ = 221,0008; Δ +0,5 mDa Phosphoramid Mustard</p> 
	<p>CPA-M3 C₄H₁₁Cl₂N₂O₂P RT 7,56 min [M+H]⁺ = 532,1393; Δ -2,2 mDa Glutathionylcyclophosphamid</p> 
	<p>CPA-M4 C₇H₁₅Cl₂N₂O₄P RT 8,79 min [M+H]⁺ = 293,0220; Δ -0,8 mDa Carboxyphosphamid</p> 
	<p>CPA-M5 C₇H₁₃Cl₂N₂O₃P RT 9,08 min [M+H]⁺ = 275,0114; Δ -0,4 mDa 4-Ketocyclophosphamid</p> 
	<p>CPA-M6 C₇H₁₅Cl₂N₂O₃P RT 9,32 min [M+H]⁺ = 277,0270; Δ -0,8 mDa 4-Hydroxycyclophosphamid- Aldophosphamid</p> 
	<p>CPA-M7 C₄H₁₃Cl₂N₂O₂P RT 11,62 min [M+H]⁺ = 259,0165; Δ -1,2 mDa Iminocyclophosphamid</p> 

Auf Grundlage der identifizierten Metaboliten wird die Biotransformation von CPA in primären Rattenhepatozyten unter den im Rahmen dieser Arbeit vorliegenden Inkubationsbedingungen wie in Abbildung 5.6 gezeigt, abgeleitet.

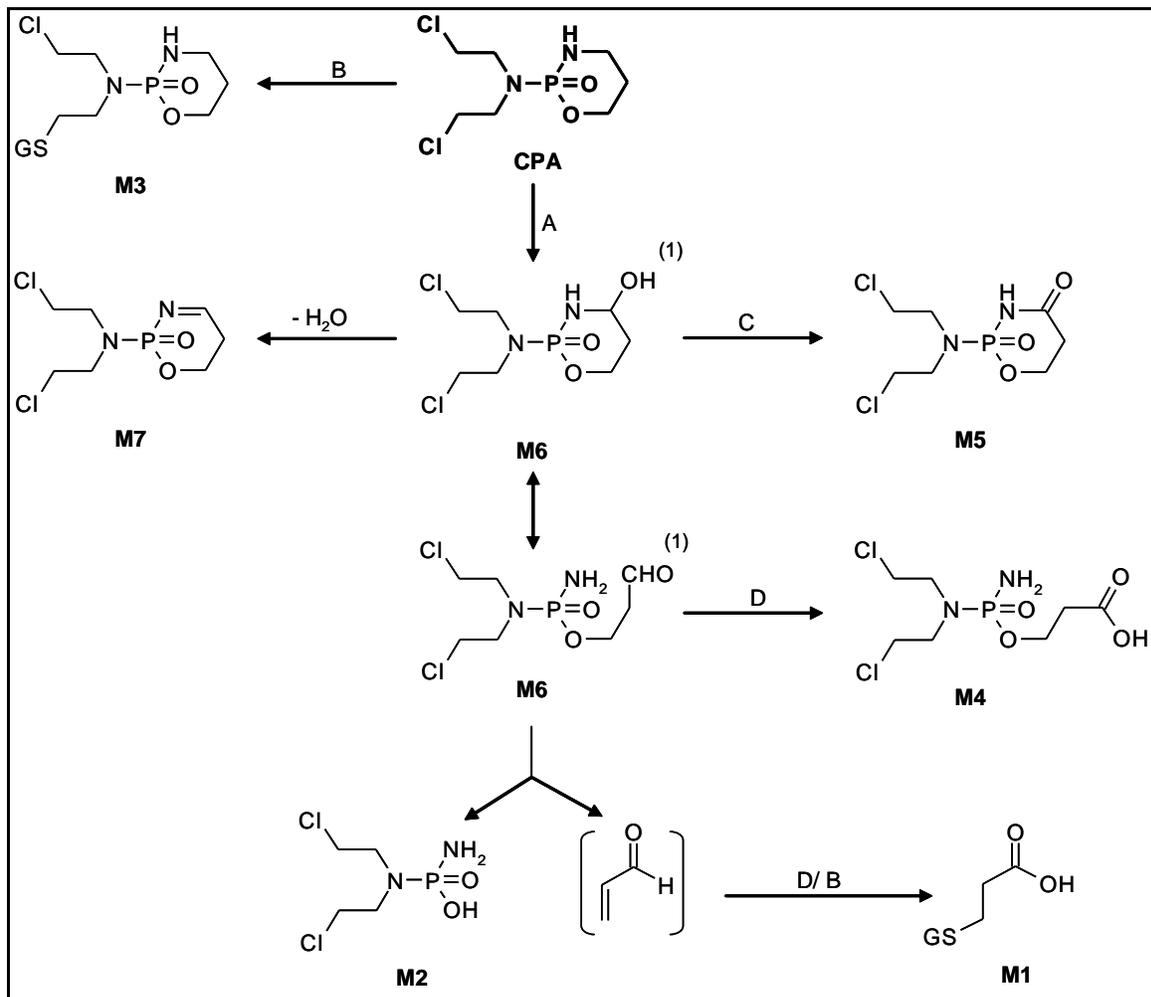


Abbildung 5.6: Biotransformation von Cyclophosphamid in primären Rattenhepatozyten
 Dargestellt sind die Metaboliten, die durch die Strukturaufklärung identifiziert worden sind. []: Vorläufer, die nicht analysiert werden konnten. (1): Eine Aussage über die vorliegende Struktur kann nicht getroffen werden. Beteiligte Enzyme sind: A) CYP, B) GST, C) ADHs, D) AIDHs. Aldophosphamid zerfällt abiotisch zu Phosphoramid Mustard und Acrolein (Zhang *et al.* 2005).

5.1.6.2 Albendazol

Die LC-MS-Chromatogramme (+ESI TIC) der ABZ-Inkubate mit und ohne Zellen nach 24 Stunden unter basalen Bedingungen sind in Abbildung 5.7 dargestellt. Tabelle 5.16 zeigt Strukturvorschläge der identifizierten ABZ-Metaboliten. Die Full Scan Spektren, die Massenchromatogramme sowie die MS/MS-Spektren von ABZ und den identifizierten Metaboliten sind im Anhang, Kapitel 12.1.3.2 dargestellt.

ABZ wird im Full Scan der Inkubation „ohne Zellen“ bei RT 11,73 min mit einer Abweichung der akkuraten Masse von 0 mDa detektiert. Im MS/MS-Spektrum bildet m/z 234,0686 das Hauptfragment, welches durch Abspaltung von Methanol entsteht. Eine weitere Propylenabspaltung führt zum Fragment 2 bei m/z 192,0224. Die Abspaltung des Propylthio-Radikals aus dem Hauptfragment liefert das Fragment bei m/z 159,0415.

Die Metaboliten von ABZ werden anhand der Abfrage der akkuraten Massen von bereits publizierten Metaboliten identifiziert (Dayan 2003; Gyurik *et al.* 1981). Die Darstellung der Metaboliten erfolgt in der Reihenfolge ihrer Retentionszeit.

ABZ-M1 wird bei RT 6,64 min detektiert. Im MS/MS-Spektrum kommt es durch eine Propylenabspaltung, die bei ABZ-M9 ebenfalls beobachtet wird, zur Bildung des Hauptfragments bei m/z 182,0373. Die radikalische Abspaltung des Thioalkylrestes liefert das Fragment 2 bei m/z 133,0626. Anhand der Fragmentierung wird die Verbindung mit einer Massenabweichung von -0,2 mDa als ABZ-2-Aminosulfoxid identifiziert.

ABZ-M2 weist im Massenchromatogramm bei m/z 298,0858 zwei Isomere bei RT 7,45 min und 9,41 min auf, welche als Hydroxy-ABZSO identifiziert werden. Die Massenabweichungen betragen +0,2 bzw. -0,2 mDa. Ein MS/MS-Spektrum liegt für die Verbindung bei RT 7,45 min vor. Eine Cyclopropanol-Abspaltung, wie sie bei ABZ-M5 ebenfalls nachgewiesen wird, liefert das Fragment 1 bei m/z 240,0434 in Tabelle 5.15. Das Hauptfragment bei m/z 238,0277 geht aus einer Wasser- und Ethylenabspaltung aus dem Molekülion hervor. Die darauffolgende Methanolabspaltung führt zum Fragment 3. Ebenso wie bei ABZ-M1 kann eine radikalische Spaltung der Thio-Benzimidazol-Bindung nachgewiesen werden, die das Fragment 4 bei m/z 191,0679 bildet. Anhand der Fragmentierung kann keine genaue Aussage über die Position der Hydroxylgruppe getroffen werden. Eine aufgrund eines stabileren Übergangszustandes bevorzugte Hydroxylierung an Position 2 führt zu Diastereomeren, die den Nachweis von zwei Isomeren (RR, SS und RS, SR) zur Folge haben.

ABZ-M3 wird mit einer Massenabweichung von -0,1 mDa bei RT 8,27 min nachgewiesen. Ein aussagekräftiges MS/MS-Spektrum liegt nicht vor, sodass die Identifikation von Hydroxy-ABZSO₂ auf der akkuraten Masse und dem Schwefel-Isotopenpeak im Full Scan beruht.

ABZ-M4 wird mit einer Massenabweichung von -0,4 mDa bei RT 8,34 min als O-Glucuronid von Hydroxy-ABZ identifiziert. Bei den Peaks bei RT 11,05, 11,47 und 11,88 min handelt es sich um „in source“-Oxidationsprodukte der N-Glucuronide. Die Abspaltung der Glucuronsäure im Produktionen-Scan liefert das Fragment 1 bei m/z 282,0894 (vgl. Tabelle 5.15). Die weitere Fragmentierung ist mit der von ABZ-M5 vergleichbar. Eine Glucuronidierung von möglichen Hydroxylgruppen an Position 2 oder 3 wird angenommen.

ABZ-M5 wird bei RT 8,47 min detektiert. Ein Natriumaddukt kann ebenfalls detektiert und berechnet werden. Im MS/MS-Spektrum entsteht das Hauptfragment bei m/z 250,0641 (Fragment 1, Tabelle 5.15) durch eine Methanolabspaltung aus der Carbamatgruppe. Fragment 2 bei m/z 222,0322 entsteht aus einer Wasser- und Propylenabspaltung aus dem Molekülion. Eine Methanolabspaltung aus Fragment 2 führt zum Fragment 4 bei m/z 190,0041. Fragment 3 bei m/z 192,0219 entsteht aus der Cyclopropanol-Abspaltung aus dem Fragment 1. Anhand der Fragmentierung wird die Verbindung mit einer Massenabweichung von 0 mDa als Hydroxy-ABZ identifiziert. Eine genaue Aussage über die Position der Hydroxylgruppe kann nicht getroffen werden. Da eine Hydroxylierung in α -Position zum Schwefel ein instabiles Thiohalbacetal und eine oxidative Desalkylierung zur Folge hätte, werden Position 2 und 3 als bevorzugt bewertet.

ABZ-M6 weist eine RT von 8,56 min auf. Im MS/MS-Spektrum resultiert aus einer Methanolabspaltung das Hauptfragment 1 bei m/z 264,0434 (vgl. Tabelle 5.15). Die Fragmente 2 und 3 gehen aus einer für Carboxygruppen charakteristischen Wasser- und Kohlenmonoxidabspaltung hervor. Eine weitere Ethylenabspaltung liefert das Fragment 4 bei m/z 190,0066. Anhand der Fragmentierung wird die Verbindung mit einer Massenabweichung von -0,2 mDa als 3-Carboxy-ABZ identifiziert.

ABZ-M7 wird bei RT 8,80 min gefunden. Im MS/MS-Spektrum zeigt sich eine komplexe Fragmentierung. Neben der bereits häufig beobachteten Methanolabspaltung wird eine Propenylradikal-Abspaltung aus dem Fragment 2 bei m/z 239,0347 nachgewiesen, welche Fragment 3 mit m/z 207,0085 liefert. Da sich aus Fragment 2 auch eine 2-Oxopropylradikal-Abspaltung zu Fragment 4 bei m/z 191,0142 nachweisen lässt, kann die Position des Sauerstoffs nicht eindeutig zugeordnet werden. Somit kann die Struktur mit einer

Massenabweichung von -0,2 mDa aufgrund der Stabilität als 2-Oxo-ABZ postuliert werden. Möglich sind auch ein ungesättigtes ABZSO oder ein Aldehyd (nicht publiziert).

ABZ-M8 wird im Massenchromatogramm bei RT 9,16 min detektiert. Die Intensität des MS/MS-Spektrums ist schwächer, sodass Fragmente größerer Massenabweichungen resultieren. Fragment 1 bei m/z 282,0915 bildet das Schlüsselfragment zur Strukturaufklärung, da es aus der Abspaltung von Schwefeltrioxid hervorgeht. Die weiteren Fragmente wurden bereits bei ABZ-M4 beobachtet. Anhand der Fragmentierung wird die Verbindung mit einer Massenabweichung von 0 mDa als Hydroxy-ABZ-O-Sulfat identifiziert. Eine Sulfatierung an mögliche Hydroxylgruppen an Position 2 oder 3 wird postuliert.

ABZ-M9 bildet im TIC-Chromatogramm des Inkubats „mit Zellen“ den größten Metabolitenpeak. Das Massenchromatogramm weist ein Signal bei RT 9,38 min auf. Im MS/MS-Spektrum entstehen die Hauptfragmente 1 und 3 aus einer Propylen- und anschließender Methanolabspaltung. Die radikalische Abspaltung eines Thials aus dem Fragment 1 liefert das Fragment bei m/z 191,0684 und damit den Beweis für eine Oxidation des Schwefels. Fragment 2 bei m/z 222,0327 entsteht aus dem Moleküllion durch Methanolabspaltung aus der Carbamatgruppe und Ethylenabspaltung aus dem Alkylrest. Anhand der Fragmentierung wird die Verbindung mit einer Massenabweichung von +0,2 mDa als ABZSO identifiziert.

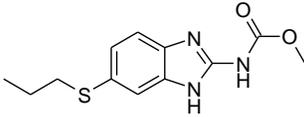
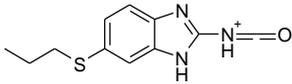
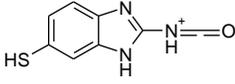
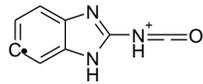
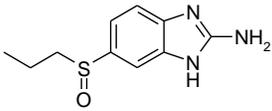
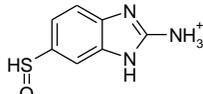
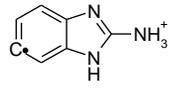
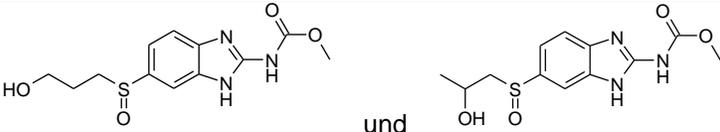
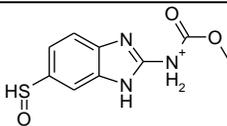
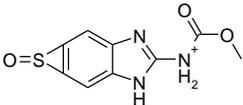
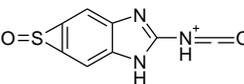
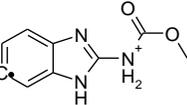
ABZ-M10 kann bei RT 9,43 min aufgrund der akkuraten Masse als 6-Mercapto-ABZ identifiziert werden. Ein aussagekräftiges MS/MS-Spektrum liegt nicht vor. Die Abweichung beträgt 0,2 mDa.

ABZ-M11 wird mit einer Massenabweichung von 0 mDa bei RT 10,53 min nachgewiesen. Neben ABZ-M11 sind im Massenchromatogramm die Peaks der beiden Isomere von ABZ-M2 zu sehen. Im MS/MS-Spektrum wird das Hauptfragment durch die Methanolabspaltung gebildet, auf die eine Propylenabspaltung auf Fragment 2 bei m/z 224,0122 folgt. Fragment 3 bei m/z 159,0431 geht aus einer radikalischen Spaltung der Propylsulfonyl-Benzimidazol-Bindung hervor, wie sie bereits bei ABZ und ABZ-M9 nachgewiesen wurde. Anhand der Fragmentierung wird die Verbindung als ABZSO₂ identifiziert.

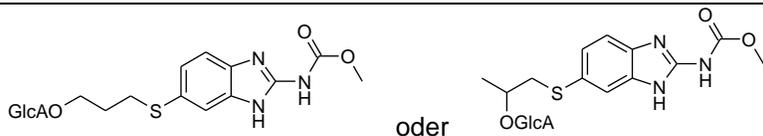
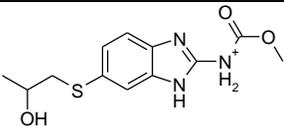
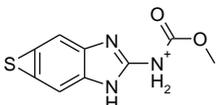
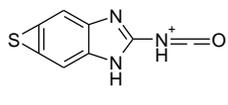
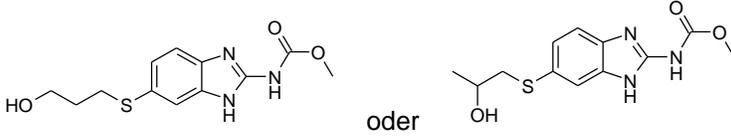
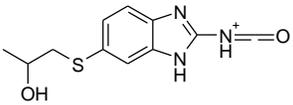
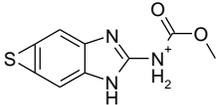
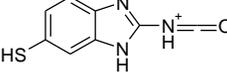
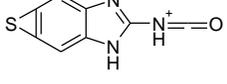
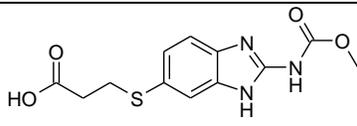
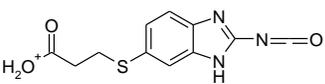
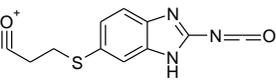
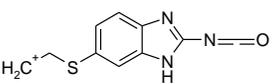
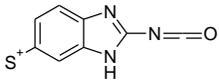
ABZ-M12 besitzt die akkurate Masse eines N-Glucuronsäurekonjugats von ABZ. Im Massenchromatogramm werden drei Isomere bei RT 11,04, 11,47 und 11,88 min nachgewiesen. Fragment 1 (m/z 266,0950, Tabelle 5.15) bestätigt die Annahme, dass es sich um Glucuronsäurekonjugate handelt. Da weitere Fragmentierungen unter den gegebenen Messparametern nur untergeordnet stattfinden, kann keine Zuordnung von Isomeren erfolgen.

Tabelle 5.15: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von ABZ

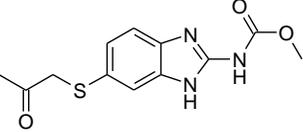
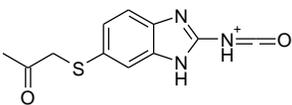
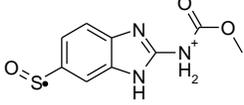
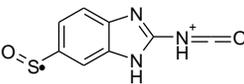
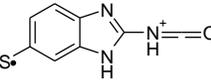
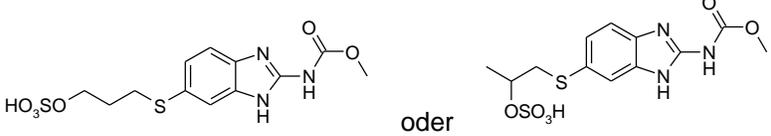
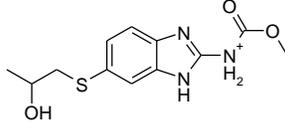
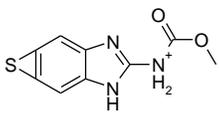
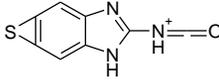
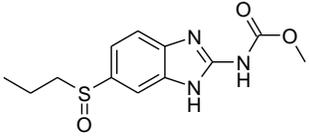
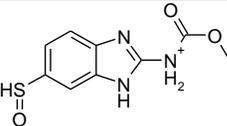
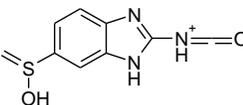
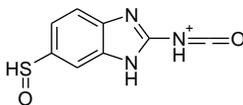
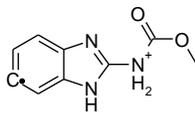
Dargestellt sind die Schlüsselfragmente aus den im Anhang, Kap. 12.1.3.2 dargestellten MS/MS-Spektren. Metaboliten (M) geordnet nach RT.

 <p>ABZ <i>m/z</i> 266,0957; 11,73 min</p>			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	
 <p><i>m/z</i> 234,0686</p>	 <p><i>m/z</i> 192,0224</p>	 <p><i>m/z</i> 159,0415</p>	
 <p>ABZ-M1 <i>m/z</i> 224,0852; RT 6,64 min</p>			
Fragment 1		Fragment 2	
 <p><i>m/z</i> 182,0373</p>		 <p><i>m/z</i> 133,0626</p>	
 <p>ABZ-M2.1 und -M2.2 <i>m/z</i> 298,0856; RT 7,45 und 9,41 min</p>			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
 <p><i>m/z</i> 240,0434</p>	 <p><i>m/z</i> 238,0277</p>	 <p><i>m/z</i> 206,0017</p>	 <p><i>m/z</i> 191,0679</p>

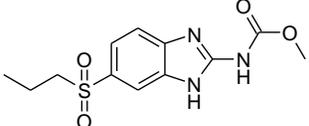
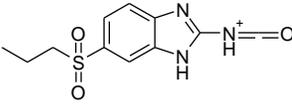
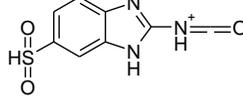
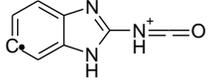
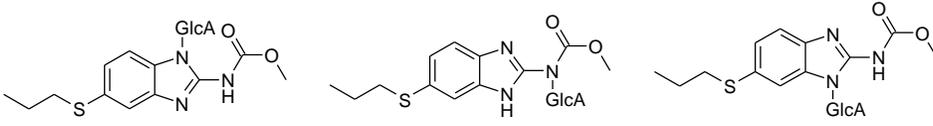
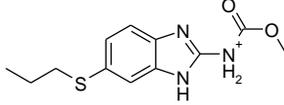
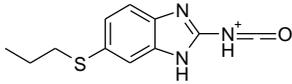
Fortsetzung Tabelle 5.15: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von ABZ

 <p style="text-align: center;">ABZ-M4 m/z 458,1228; RT 8,34 min</p>			
Fragment 1	Fragment 2		Fragment 3
 <p style="text-align: center;">m/z 282,0894 *</p>	 <p style="text-align: center;">m/z 222,0322</p>		 <p style="text-align: center;">m/z 190,0041</p>
 <p style="text-align: center;">ABZ-M5 m/z 282,0907; RT 8,47 min</p>			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
 <p style="text-align: center;">m/z 250,0641 *</p>	 <p style="text-align: center;">m/z 222,0322</p>	 <p style="text-align: center;">m/z 192,0219</p>	 <p style="text-align: center;">m/z 190,0041</p>
 <p style="text-align: center;">ABZ-M6 m/z 296,0700; RT 8,56 min</p>			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
 <p style="text-align: center;">m/z 264,0434</p>	 <p style="text-align: center;">m/z 246,0322</p>	 <p style="text-align: center;">m/z 218,0371</p>	 <p style="text-align: center;">m/z 190,0066</p>

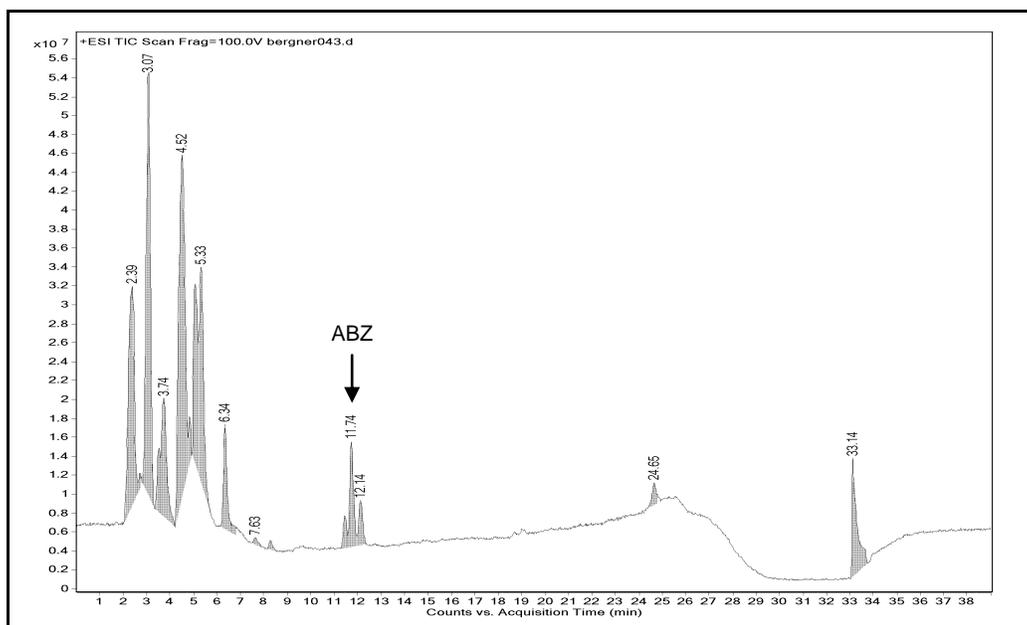
Fortsetzung Tabelle 5.15 Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von ABZ

 <p>oder Isomeres</p> <p>ABZ-M7 m/z 280,0750; RT 8,80 min</p>			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
 <p>m/z 248,0486</p>	 <p>m/z 239,0347</p>	 <p>m/z 207,0085</p>	 <p>m/z 191,0142</p>
 <p>oder</p> <p>ABZ-M8 m/z 362,0475; RT 9,16 min</p>			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	
 <p>m/z 282,0915 *</p>	 <p>m/z 222,0315</p>	 <p>m/z 190,0073</p>	
 <p>ABZ-M9 m/z 282,0907; RT 9,38 min</p>			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
 <p>m/z 240,0438</p>	 <p>m/z 222,0327</p>	 <p>m/z 208,0175</p>	 <p>m/z 191,0684</p>

Fortsetzung Tabelle 5.15 Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von ABZ

 <p>ABZ-M11 m/z 298,0856; RT 10,53 min</p>		
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3
 <p>m/z 266,0593</p>	 <p>m/z 224,0122</p>	 <p>m/z 159,0431</p>
 <p>ABZ-M12.1, -M12.2, M12.3 m/z 442,1279; RT 11,04; 11,47 und 11,88 min</p>		
Fragment 1	Fragment 2	
 <p>m/z 266,0950</p>	 <p>m/z 234,0688</p>	

a)



b)

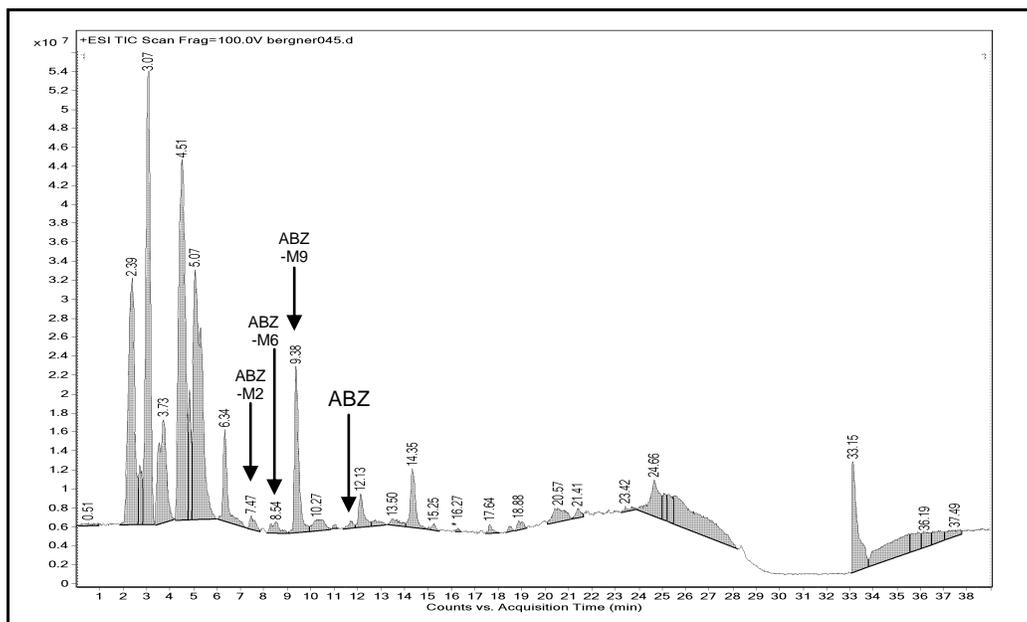
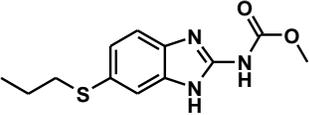
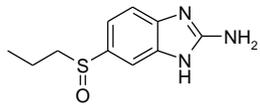
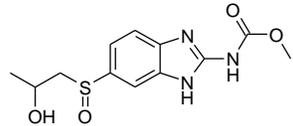
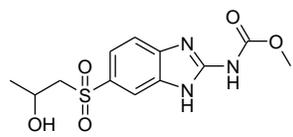
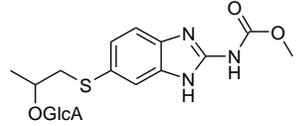
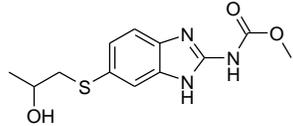
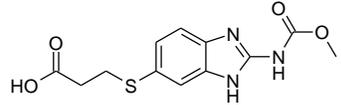
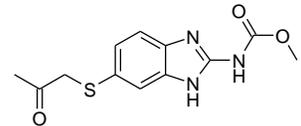
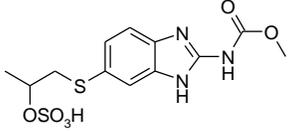
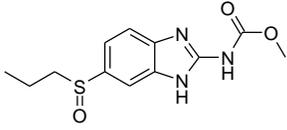
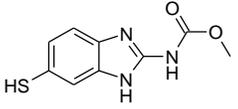
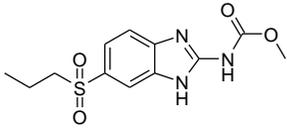
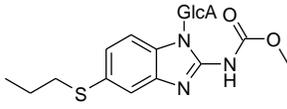


Abbildung 5.7: LC/MS-Chromatogramme der ABZ-Inkubate aus primären Rattenhepatozyten
 Dargestellt sind die +ESI-TIC-Chromatogramme der Rattenhepatozyteninkubate a) ohne Zellen und b) mit Zellen über 24 h unter basalen Bedingungen. ABZ-Konzentration: 25 μ M. ABZ: RT 11,73 min, ABZ-M2: RT 7,45 min, ABZ-M6: RT 8,56 min und ABZ-M9: RT 9,38 min. Matrixpeaks in Abb. b werden anhand der Leerinkubation (nicht gezeigt) identifiziert.

Tabelle 5.16: Strukturvorschläge identifizierter ABZ-Metaboliten

Substrat	Identifizierte ABZ-Metaboliten
 <p>Albendazol RT 11,73min [M+H]⁺ = 266,0957 Δ 0 mDa</p>	<p>ABZ-M1 C₁₀H₁₃N₃OS RT 6,64 min [M+H]⁺ = 224,0852; Δ -0,2 mDa ABZ-2-Aminosulfoxid</p> 
	<p>ABZ-M2.1 und -M2.2 C₁₂H₁₅N₃O₄S RT 7,45 / 9,41 min [M+H]⁺ = 298,0856; Δ +/-0,2mDa 2-/3-Hydroxy-ABZSO</p> 
	<p>ABZ-M3 C₁₂H₁₅N₃O₅S RT 8,27 min [M+H]⁺ = 314,0806; Δ -0,1 mDa 2-Hydroxy-ABZSO₂ oder Isomeres</p> 
	<p>ABZ-M4 C₁₈H₂₃N₃O₉S RT 8,34 min [M+H]⁺ = 458,1228; Δ -0,4mDa 2-Hydroxy-ABZ-O-glucuronid oder Isomeres</p> 
	<p>ABZ-M5 C₁₂H₁₅N₃O₃S RT 8,47 min [M+H]⁺ = 282,0907 ; Δ 0 mDa 2-Hydroxy-ABZ oder Isomeres</p> 
	<p>ABZ-M6 C₁₂H₁₃N₃O₄S RT 8,56 min [M+H]⁺ = 296,0700; Δ -0,2 mDa 3-Carboxy-ABZ</p> 
	<p>ABZ-M7 C₁₂H₁₃N₃O₃S RT 8,80 min [M+H]⁺ = 280,0750; Δ -0,2 mDa 2-Oxo-ABZ oder Isomeres</p> 

Fortsetzung Tabelle 5.16: Strukturvorschläge der identifizierten ABZ-Metaboliten

<p>ABZ-M8 C₁₂H₁₅N₃O₆S₂</p> <p>RT 9,16 min</p> <p>[M+H]⁺ = 362,0475; Δ 0 mDa</p> <p>2-Hydroxy-ABZ-O-sulfat oder Isomeres</p>	
<p>ABZ-M9 C₁₂H₁₅N₃O₃S</p> <p>RT 9,38 min</p> <p>[M+H]⁺ = 282,0907; Δ +0,2 mDa</p> <p>ABZSO</p>	
<p>ABZ-M10 C₉H₉N₃O₂S</p> <p>RT 9,43 min</p> <p>[M+H]⁺ = 224,0488; Δ +0,2 mDa</p> <p>6-Mercapto-ABZ</p>	
<p>ABZ-M11 C₁₂H₁₅N₃O₄S</p> <p>RT 10,53 min</p> <p>[M+H]⁺ = 298,0856; Δ 0 mDa</p> <p>ABZSO₂</p>	
<p>ABZ-M12.1, -M12.2 und -M12.3 C₁₈H₂₃N₃O₈S</p> <p>RT 11,04; 11,47 und 11,88 min</p> <p>[M+H]⁺ = 442,1279; Δ -0,5 mDa</p> <p>ABZ-N-glucuronide</p>	

Auf Grundlage der identifizierten Metaboliten wird die Biotransformation von ABZ in primären Rattenhepatozyten unter den im Rahmen dieser Arbeit vorliegenden Inkubationsbedingungen wie in Abbildung 5.8 gezeigt, abgeleitet.

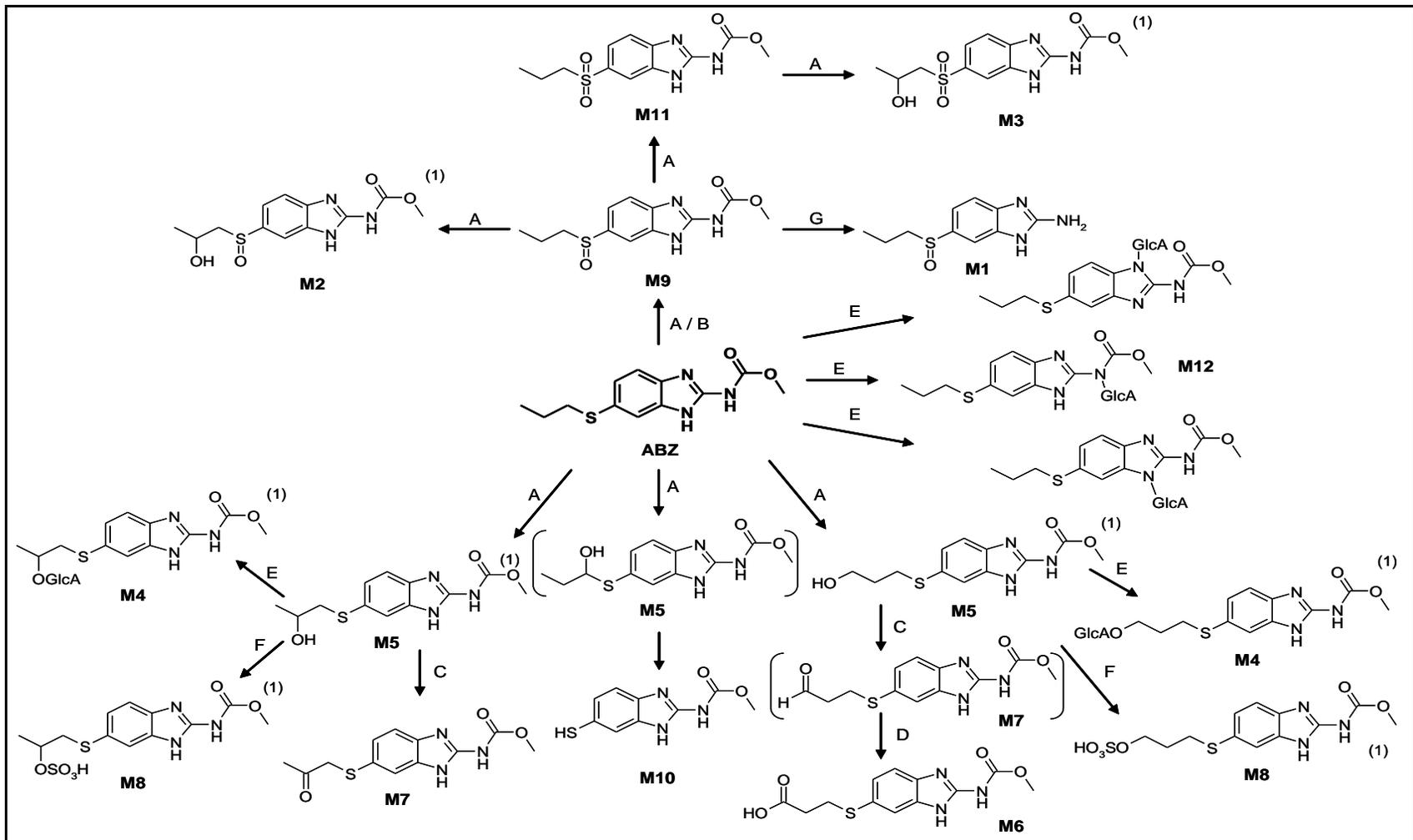


Abbildung 5.8: Metabolismus von ABZ in primären Rattenhepatozyten

Dargestellt sind die Metaboliten M, die durch die Strukturaufklärung identifiziert worden sind. (1): Die Position der Hydroxygruppe und daraus folgende Konjugate kann nicht exakt ermittelt werden. Beteiligte Enzymsysteme sind: A) CYP, B) FMO, C) ADH, D) AIDH, E) UGT, F) SULT und G) Hydrolasen (Gyurik *et al.* 1981).

5.1.6.3 Valpromid

Die LC-MS-Chromatogramme (+ESI TIC) der VPD-Inkubate mit und ohne Zellen nach 24 Stunden unter basalen Bedingungen sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Tabelle 5.18 zeigt Strukturvorschläge der identifizierten VPD-Metaboliten. Die Full Scan Spektren, die Massenchromatogramme sowie die MS/MS-Spektren von VPD und den identifizierten Metaboliten sind im Anhang, Kapitel 12.1.3.3 dargestellt.

VPD wird im Inkubat „ohne Zellen“ im Massenchromatogramm bei RT 11,41 min detektiert. Der Full Scan weist ein Signal bei m/z 144,1380 auf, welches nach Berechnung die Summenformel von VPD ($C_8H_{17}NO$) mit einer Abweichung von -0,3 mDa liefert. Im MS/MS-Spektrum entsteht das Hauptfragment 4 bei m/z 57,0702 (vgl. Tabelle 5.17) aus einer Propylenabspaltung auf die eine Ammoniak- und Kohlenmonoxidabspaltung folgt (Fragment 1 und 2). Eine Ethylenabspaltung und eine darauffolgende Propanabspaltung aus dem Molekülion führen zu Fragment 3 bei m/z 72,0448.

Die Metaboliten werden anhand der Abfrage der akkuraten Massen von bereits publizierten VPD- bzw. VPA-Metaboliten identifiziert (Kiang *et al.* 2011; Omtzigt *et al.* 1992). Die Darstellung erfolgt in der Reihenfolge ihrer Retentionszeit.

VPD-M1 weist im Full Scan ein Signal bei m/z 160,1328 auf. Die Berechnung führt zu einer Summenformel von $C_8H_{17}NO_2$. Im Massenchromatogramm werden bei RT 7,01, 7,39 und 8,27 min Isomerenpeaks identifiziert. In den MS/MS-Spektren zeigen sich sowohl bei RT 7,39 min als auch bei 8,27 min mit VPD vergleichbare Ammoniak- und Kohlenmonoxidabspaltungen sowie zusätzlich eine Wasserabspaltung (vgl. Fragmente 1 bis 3 in Tabelle 5.17). Anhand der Fragmentierung werden die Isomere mit Massenabweichungen zwischen -0,4 und -0,9 mDa Hydroxy-VPD zugeordnet. Eine Aussage über die Position der Hydroxylgruppe kann anhand der vorliegenden Spektren nicht getroffen werden. Aufgrund der Isomerenanzahl handelt es sich möglicherweise um 3-, 4- und 5-Hydroxy-VPD.

VPD-M2 weist im Massenchromatogramm über m/z 143,1072 Signale bei RT 7,40, 9,23 und 9,96 min auf, welche als Isomere der einfach-ungesättigten VPA identifiziert werden. Die Massenabweichungen betragen zwischen -0,1 und 1,1 mDa. Im Massenchromatogramm ist die Peakintensität bei RT 7,40 min gegenüber den anderen beiden Isomeren dominant. Im MS/MS-Spektrum zu dieser RT liefert die Wasser- und Kohlenmonoxidabspaltung auf das Fragment 2 bei m/z 97,1009 und die fehlende Ammoniakabspaltung Hinweise darauf, dass es sich bei der vorliegenden Verbindung um

eine Carbonsäure handelt. Eine Propylenabspaltung aus Fragment 2 führt zu dem bereits bei VPD und VPD-M1 nachgewiesenen Fragment 4 bei m/z 55,0538. Eine Aussage über die Position der Doppelbindung kann nicht getroffen werden.

VPD-M3 wird bei RT 8,64, 8,79, 9,06 und 9,24 min detektiert. In zwei von drei aussagekräftigen MS/MS-Spektren wird eine für Glutathionaddukte charakteristische Glutamin- (Fragment 1, Tabelle 5.17) und darauffolgende Cysteinylglycinabspaltung auf Fragment 3 bei m/z 141,0894, der zweifach-ungesättigten VPA, beobachtet. Eine untergeordnete Abspaltung von N-Formylglycin aus Fragment 1 liefert Fragment 2 bei m/z 216,1035. Durch die bereits bei VPD-M2 nachgewiesenen Abspaltungen von Wasser und Kohlenmonoxid entsteht das Fragment 4 bei m/z 95,0857. Anhand der Fragmentierung werden die Verbindungen mit Massenabweichungen zwischen -0,1 und -2,3 Glutathionaddukten der einfach-ungesättigten VPA zugeordnet.

VPD-M4 wird bei RT 8,66 min mit einer Massenabweichung von -0,6 mDa als Oxo-VPD identifiziert. Aufgrund der schwachen Peakintensität treten im MS/MS-Spektrum erhöhte Massenabweichungen auf. Das Hauptfragment 2 bei m/z 95,0855 entsteht durch die Abspaltung von Wasser und Kohlenmonoxid auf Fragment 1 bei m/z 112,1087 und eine anschließende Ammoniakabspaltung. Eine weitere Propinabspaltung führt zu Fragment 4. Die Fragmentierung erlaubt keine Aussage über die Position der Carbonylgruppe. Position 5 wird aufgrund des fehlenden Nachweises des Oxidationsproduktes als unwahrscheinlich bewertet.

VPD-M5 wird bei RT 9,47 min gefunden. Im MS/MS-Spektrum bildet Fragment 1 bei m/z 144,1374 das Schlüsselfragment zur Strukturaufklärung, da es aus einer Glucuronsäureabspaltung hervorgeht. Das Hauptfragment 2 bei m/z 57,0699, welches bereits bei VPD als Hauptfragment nachgewiesen wurde, entsteht aus den Abspaltungen von Wasser, Ammoniak und Propylen. Anhand der Fragmentierung wird die Verbindung mit einer Massenabweichung von -0,2 mDa als N-Glucuronid von VPD identifiziert. Aufgrund der Signalintensität im Massenchromatogramm handelt sich um den Hauptmetaboliten von VPD.

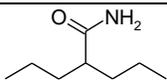
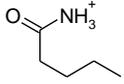
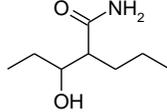
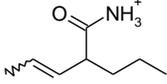
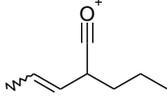
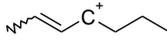
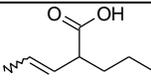
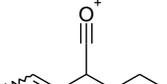
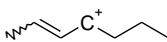
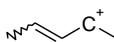
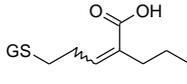
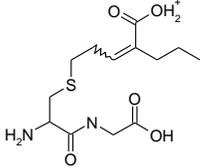
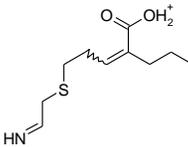
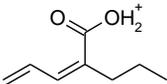
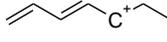
VPD-M6 weist im Massenchromatogramm Signale bei RT 9,94, 10,21 und 10,54 min auf, welche anhand der akkuraten Masse von m/z 142,1226 und der Fragmentierung einfach-ungesättigten Isomeren von VPD zugeordnet werden. Im MS/MS-Spektrum bei RT 10,21 min geht Fragment 1 bei m/z 125,0940 aus der bei VPD-M1 bereits gezeigten Ammoniak-Abspaltung hervor. Eine folgende Kohlenmonoxidabspaltung führt zu Fragment 2 und eine Propin- oder Propylenabspaltung zu den Hauptfragmenten bei m/z 57,0702 und

m/z 55,0538. Im Massenchromatogramm resultiert der Peak bei RT 7,39 min aus einer Wasserabspaltung („in-source-Fragment“) von Hydroxy-VPD.

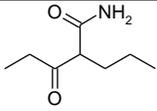
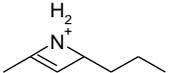
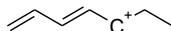
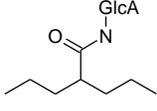
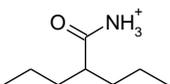
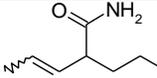
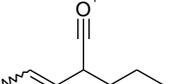
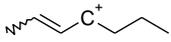
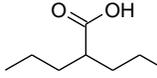
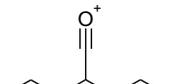
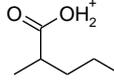
VPD-M7 wird bei RT 13,91 min nachgewiesen. Das MS/MS-Spektrum wird durch Fragmente von VPD überlagert, welche durch das „tailing“ des VPD-Peaks entstehen. Eine Wasserabspaltung aus dem Molekölion auf Fragment 1 bei m/z 127,1104 kann nachgewiesen werden. Mit einer Massenabweichung von 0,3 mDa wird die Verbindung als VPA identifiziert.

Tabelle 5.17: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von VPD

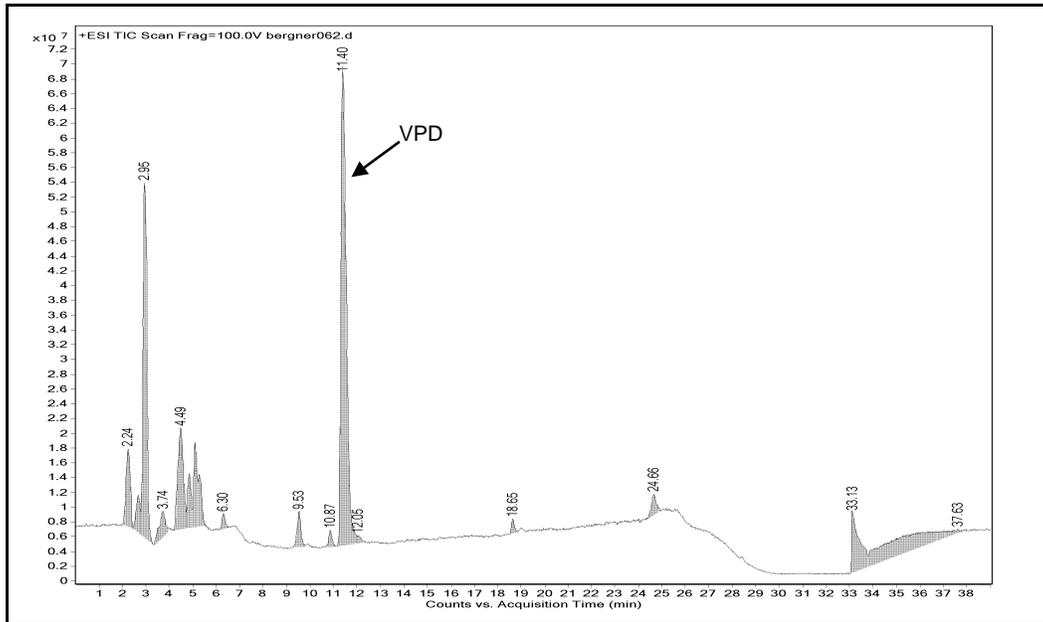
Schlüsselfragmente zur Strukturaufklärung der VPD-Metaboliten aus den im Anhang, Kap. 12.1.3.3 dargestellten MS/MS-Spektren. Metaboliten (M) geordnet nach RT. * Dargestellt ist jeweils nur eine mögliche Position der Doppelbindung bzw. der funktionellen Gruppe.

	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
 VPD m/z 144,1382 RT 11,41 min	 m/z 102,0913	 m/z 85,0651	 m/z 72,0448	 m/z 57,0702
 VPD-M1 * m/z 160,1332 RT 7,01, 7,39, 8,27 min	 m/z 142,1218	 m/z 125,0940	 m/z 97,1009	 m/z 55,0540
 VPD-M2 * m/z 143,1067 RT 7,40 min	 m/z 125,0940	 m/z 97,1009	 m/z 69,0691	 m/z 55,0538
 VPD-M3 * m/z 448,1748 RT 8,64, 8,79, 9,24 min	 m/z 319,1328	 m/z 216,1035	 m/z 141,0894	 m/z 95,0857

Fortsetzung Tabelle 5.17: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von VPD

 <p>VPD-M4 <i>m/z</i> 158,1176 RT 8,66 min</p>	 <p><i>m/z</i> 112,1087</p>	 <p><i>m/z</i> 95,0855</p>	 <p><i>m/z</i> 55,0553</p>	
 <p>VPD-M5 <i>m/z</i> 320,1704 RT 9,47 min</p>	 <p><i>m/z</i> 144,1374</p>	 <p><i>m/z</i> 57,0699</p>		
 <p>VPD-M6 <i>m/z</i> 142,1226 RT 9,94, 10,21, 10,54 min</p>	 <p><i>m/z</i> 125,0940</p>	 <p><i>m/z</i> 97,1009</p>	 <p><i>m/z</i> 57,0702</p>	 <p><i>m/z</i> 55,0538</p>
 <p>VPD-M7 <i>m/z</i> 145,1223 RT 13,91 min</p>	 <p><i>m/z</i> 127,1104</p>	 <p><i>m/z</i> 117,0908</p>		

a)



b)

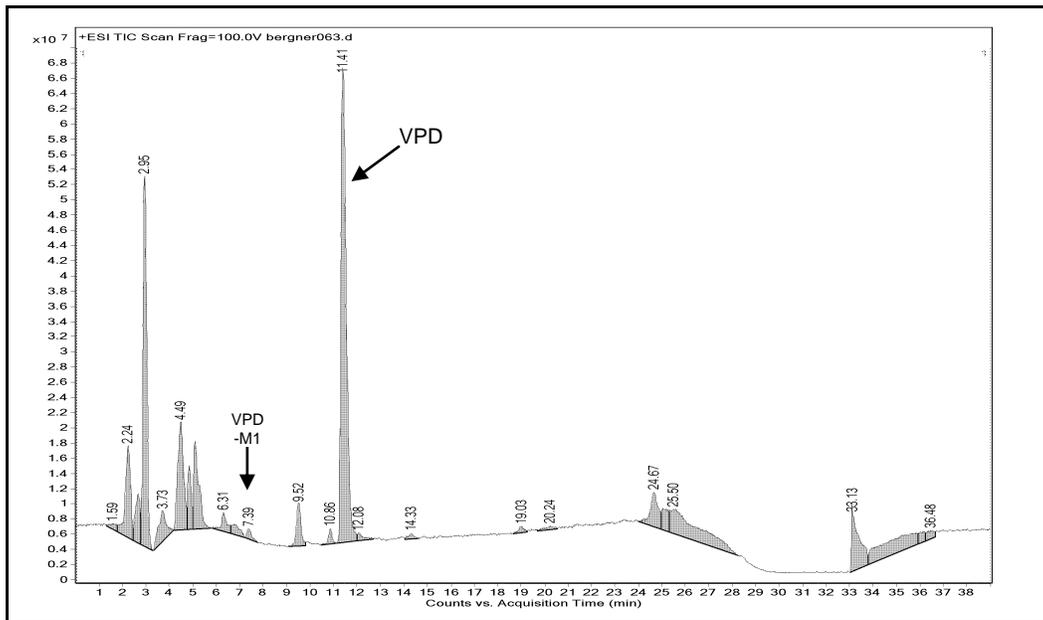
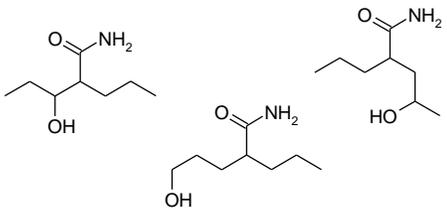
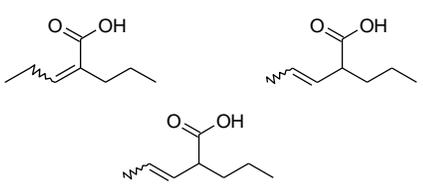
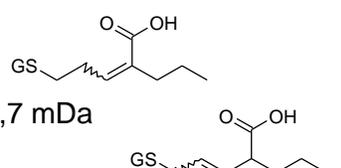
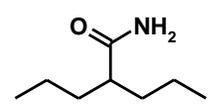
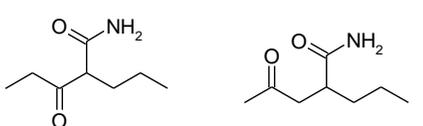
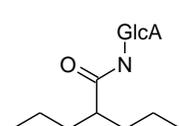
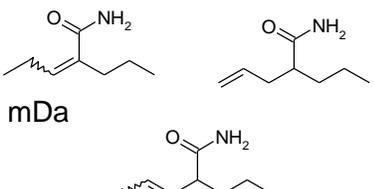
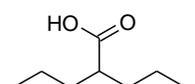


Abbildung 5.9: LC/MS-Chromatogramme der VPD-Inkubate aus primären Rattenhepatozyten
 Dargestellt sind die +ESI-TIC-Chromatogramme der Rattenhepatozyteninkubate a) ohne Zellen und b) mit Zellen über 24h unter basalen Bedingungen. VPD-Konzentration 4 mM. VPD: RT 11,40 min, VPD-M1: RT 7,39 min. Matrixpeaks in Abb. b werden anhand der Leerinkubation (nicht gezeigt) identifiziert.

Tabelle 5.18: Strukturvorschläge identifizierter VPD-Metaboliten

GS: Glutathion

Substrat	Identifizierte VPD-Metaboliten
	<p>VPD-M1.1, -M1.2 und -M1.3 C₈H₁₇NO₂</p> <p>RT 7,01; 7,39 und 8,27 min</p> <p>[M+H]⁺ = 160,1332</p> <p>Δ -0,9/ -0,4/ -0,7 mDa</p> <p>3-/ 4-/ 5-Hydroxy-VPD</p> 
	<p>VPD-M2.1, -M2.2 und -M2.3 C₈H₁₄O₂</p> <p>RT 7,40; 9,23 und 9,96 min</p> <p>[M+H]⁺ = 143,1067;</p> <p>Δ -0,1/ 0,6/ 1,1 mDa</p> <p>2-/ 3-/ 4-en-VPA</p> 
	<p>VPD-M3.1 - M3.4 C₁₈H₂₉N₃O₈S</p> <p>RT 8,64; 8,79; 9,06 und 9,24 min</p> <p>[M+H]⁺ = 448,1748; Δ -2,3/ -0,1/ 0,5/ -0,7 mDa</p> <p>5-GS-2-/ 3-en-VPA</p> 
 Valpromid [M+H] ⁺ = 144,1383 Δ -0,3 mDa RT 11,41 min	<p>VPD-M4 C₈H₁₅NO₂</p> <p>RT 8,66 min</p> <p>[M+H]⁺ = 158,1176 Δ -0,6 mDa</p> <p>3-/ 4-Oxo-VPD</p> 
	<p>VPD-M5 C₁₄H₂₅NO₇</p> <p>RT 9,47 min</p> <p>[M+H]⁺ = 320,1704; Δ -0,2 mDa</p> <p>VPD-N-glucuronid</p> 
	<p>VPD-M6.1, -M6.2, M6.3 C₈H₁₅NO</p> <p>RT 9,94; 10,21 und 10,54 min</p> <p>[M+H]⁺ = 142,1226; Δ -0,3/ -0,1/ -0,4 mDa</p> <p>2-/ 3-/ 4-en-VPD</p> 
	<p>VPD-M7 C₈H₁₆O₂</p> <p>RT 13,91 min</p> <p>[M+H]⁺ = 145,1223; Δ 0,3 mDa</p> <p>VPA</p> 

Auf Grundlage der identifizierten Metaboliten wird die Biotransformation von VPD in primären Rattenhepatozyten unter den im Rahmen dieser Arbeit vorliegenden Inkubationsbedingungen wie in Abbildung 5.10 gezeigt, abgeleitet.

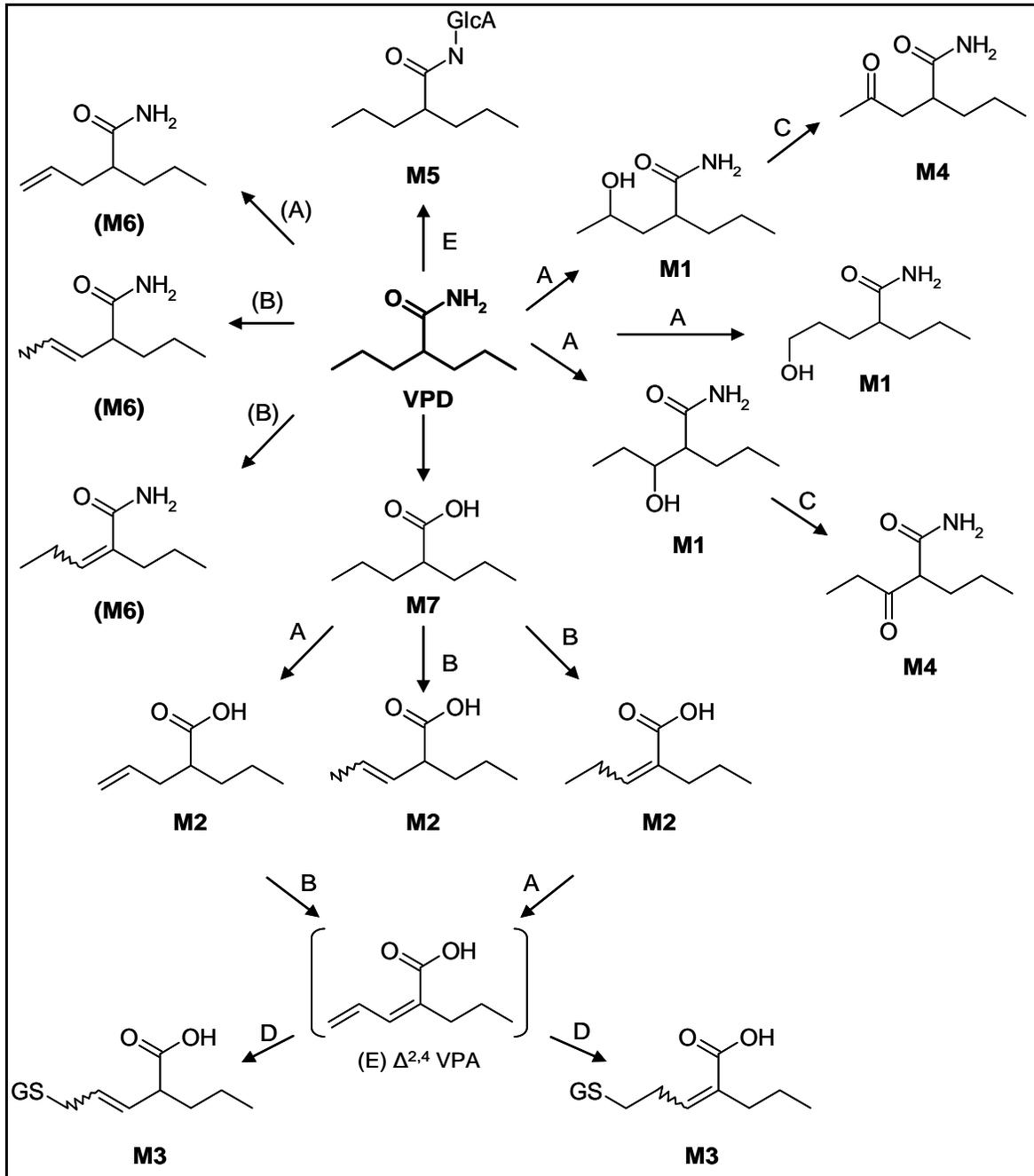


Abbildung 5.10: Metabolismus von VPD in primären Rattenhepatozyten

Dargestellt sind die Metaboliten, die durch die Strukturaufklärung identifiziert worden sind. [] Vorläufer, der nicht identifiziert werden konnte. Beteiligte Enzymsysteme sind: A) CYP, C) ADH, D) GST und E) UGT. B) Teilreaktionen der β -Oxidation. (A/B) und (M6) wurden bisher nicht publiziert und werden analog zu VPA postuliert (Kiang *et al.* 2011).

5.1.6.4 2-Acetylaminofluoren

Die LC-MS-Chromatogramme (+ESI TIC) der 2-AAF-Inkubate mit und ohne Zellen nach 24 Stunden unter basalen Bedingungen sind in Abbildung 5.11 dargestellt. Tabelle 5.20 zeigt Strukturvorschläge der identifizierten 2-AAF-Metaboliten. Die Full Scan Spektren, die Massenchromatogramme sowie die MS/MS-Spektren von 2-AAF und den identifizierten Metaboliten sind im Anhang, Kapitel 12.1.3.4 dargestellt.

2-AAF wird im Full Scan der Inkubation „ohne Zellen“ bei RT 14,48 min mit einer Abweichung der akkuraten Masse von 0,4 mDa detektiert. Im MS/MS-Spektrum entsteht Fragment 1 bei m/z 182,0964 durch eine Keten-Abspaltung aus dem Molekülion. Eine weitere Ammoniakabspaltung führt zu Fragment 2 bei m/z 165,0691 (vgl. Tabelle 5.19). Fragment 4 bei m/z 155,0852 geht aus einer Acetyl-Radikal-Abspaltung auf Fragment 3 (m/z 181,0880) und einer weiteren Cyano-Radikal-Abspaltung hervor.

Neben den Inkubaten aus der Hepatozytenkultur wird eine NOH-AAF-Standardlösung unter den gleichen Bedingungen fragmentiert und zur Aufklärung analysierter Metaboliten herangezogen. Im Produktions-Scan wird eine radikalische Fragmentierung beobachtet, bei der auf eine Acetyl-Radikal-Abspaltung auf Fragment 1 bei m/z 197,0833 eine Hydroxylradikal-Abspaltung auf Fragment 2 bei m/z 180,0802 folgt. Eine anschließende Abspaltung von Cyanwasserstoff liefert Fragment 3 (vgl. Tabelle 5.19).

Die Metaboliten von 2-AAF werden anhand der Abfrage der akkuraten Massen von bereits publizierten Metaboliten identifiziert (Heflich und Neft 1994). Die Darstellung erfolgt in der Reihenfolge ihrer Retentionszeit. Grundlage für die Vorschläge zur Struktur der Metaboliten bildet die aktivierende Eigenschaft der Aminogruppe auf den Aromaten, der weitere Substituenten in ortho- und para-Position dirigiert (+M-Effekt). Weitere Substituenten am Aromaten werden danach in Position 1, 3, 5, 7 und 9 erwartet (Dybing *et al.* 1979; Holme *et al.* 1986).

2-AAF-M1 weist im Massenchromatogramm drei Signale auf. Die Verbindungen werden anhand der akkuraten Masse und der Fragmentierung Glucuronsäure-Konjugaten von Hydroxy-AF zugeordnet. Die Massenabweichungen betragen zwischen -0,7 und 0,2 mDa. Isomer 2-AAF-M1.1 retardiert bei 4,45 min. Aufgrund einer fehlenden Wasserabspaltung werden C5 und C7 als mögliche Positionen der Hydroxylgruppe postuliert, da an diesen Positionen kein Proton für eine Wasserabspaltung zur Verfügung steht ohne die Aromatizität aufzuheben. Die Fragmentierung von 2-AAF-M1.2 weist Ähnlichkeiten mit dem

NOH-AAF-Standard auf, da eine radikalische Fragmentierung nach Abspaltung der Glucuronsäure beobachtet wird (vgl. Fragment 2, Tabelle 5.19). Bei 2-AAF-M1.2 könnte es sich demnach um ein Glucuronid von NOH-AF handeln. Im MS/MS-Spektrum von 2-AAF-M1.3 geht das Fragment 2 bei m/z 180,0802 aus einer Abspaltung von Glucuronsäure zusammen mit der Hydroxylgruppe hervor. Da diese Abspaltung häufig bei benzyllischen Positionen beobachtet wird, wird C9 als mögliche Position des Konjugats postuliert. Die Abspaltung der Glucuronsäure auf Fragment 1 bei m/z 198,0836 wird untergeordnet gefunden.

2-AAF-M2 weist im Massenchromatogramm vier Signale auf. Die Verbindungen werden anhand der akkuraten Masse und der Fragmentierung als Isomere von Hydroxy-2-AF identifiziert. Die Massenabweichungen betragen zwischen 0,3 und 1,8 mDa. Die MS/MS-Spektren der Isomere 2-AAF-M2.1 und -M2.4 weisen eine komplexe Fragmentierung auf. Es werden sowohl nicht-radikalische als auch radikalische Abspaltungen gefunden, wobei das der Abspaltung vorausgegangene Ion nicht eindeutig zugeordnet werden kann. Da Kohlenmonoxid-Abspaltungen bei beiden Verbindungen nachgewiesen werden (vgl. 2-AAF-M2.1 und -M2.4, Fragment 4, Tabelle 5.19), werden Ring-hydroxylierte Isomere vermutet. Bei 2-AAF-M2.4 könnte es sich aufgrund der Hydroxylradikal-Abspaltung aus dem Molekülion, welche bei 2-AAF-M2.1 nicht beobachtet wird, auch um NOH-AF handeln (vgl. Fragment 1 Tabelle 5.19). Das MS/MS-Spektrum von 2-AAF-M2.2 weist eine schwache Intensität auf. Aufgrund der Hydroxyl-Radikalabspaltung auf Fragment 1 könnte auch hier eine N-Hydroxylierung vorliegen. Bei 2-AAF-M2.3 wird eine Ammoniakabspaltung auf Fragment 1, eine Wasserabspaltung auf Fragment 2 und eine Cyanwasserstoff-Abspaltung auf Fragment 4 beobachtet (vgl. Tabelle 5.19). Fragment 3, welches nur in diesem MS/MS-Spektrum nachgewiesen und als Schlüsselfragment angesehen wird, geht aus einer Hydroxymethylradikal-Abspaltung hervor, welche durch eine Hydroxylgruppe an Position 9 bevorzugt auflaufen könnte (vgl. 2-AAF-M4).

2-AAF-M3 zeigt im Massenchromatogramm vier Signale, welche Isomeren von Glucuronsäure-Konjugaten von 2-AAF zugeordnet werden. Die Massenabweichung beträgt zwischen -1,0 und -0,3 mDa. 2-AAF-M3.1 bei RT 8,38 min weist neben einer Glucuronsäure- und Keten-Abspaltung eine Hydroxylradikal-Abspaltung auf, wie sie bei NOH-AAF beobachtet wurde. Aufgrund des Fragments 3 bei m/z 181,0883 könnte es sich bei diesem Isomer um ein O-Glucuronid von NOH-AAF handeln. Bei 2-AAF-M3.2, -M3.3 und -M3.4 werden nach der Glucuronsäure- und Ketenabspaltung eine Ammoniak-, Wasser- (je Fragment 3, Tabelle 5.19) bzw. eine Ammoniak-/Kohlenmonoxid-Abspaltung

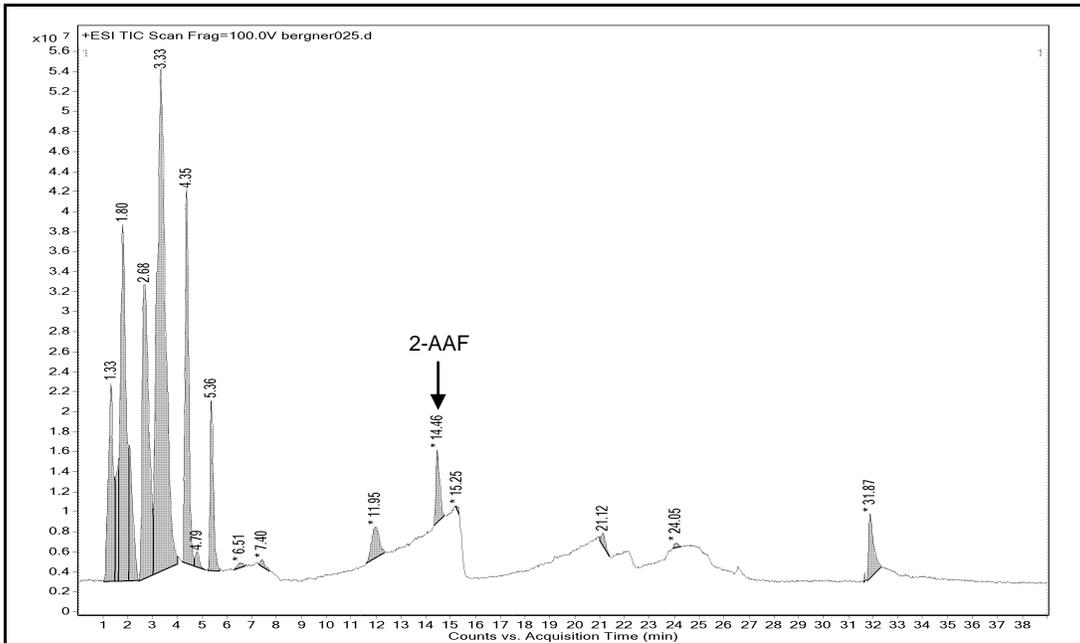
beobachtet, anhand derer eine Spezifizierung der Position des Konjugats nicht möglich ist. In Arbeiten von Dybing et al. werden 5- und 7-Hydroxy-2-AAF bevorzugt glucuronidiert, gefolgt von 3-Hydroxy-2-AAF (Dybing *et al.* 1979).

2-AAF-M4 wird mit einer Massenabweichung von -0,3 mDa bei RT 9,63 min als 2-AF identifiziert. Das Hauptfragment 1 bei m/z 165,0693 geht aus einer Ammoniakabspaltung hervor. Fragment 2 entsteht durch eine Methylradikal-Abspaltung, welche mit der Abspaltung des Hydroxymethyl-Radikals in 2-AAF-M2.4 vergleichbar ist. Eine anschließende Cyanoradikal-Abspaltung liefert Fragment 3 bei m/z 141,0690 (vgl. Tabelle 5.19)

2-AAF-M5 bildet ein Sulfat-Konjugat von Hydroxy-2-AF (2-AAF-M2). Es wird bei RT 12,88 min detektiert und weist eine Massenabweichung von -0,3 mDa auf. Im Produktionen-Scan bildet Fragment 1 bei m/z 198,0905 das Schlüsselfragment zur Strukturaufklärung, da es aus einer Schwefeltrioxid-Abspaltung hervorgeht. Anschließend erfolgt eine Wasser- und Cyanwasserstoff-Abspaltung auf Fragment 2 und 3 (vgl. Tabelle 5.19). Die genaue Position der Sulfatgruppe kann im Rahmen dieser Methode nicht bestimmt werden.

2-AAF-M6 wird bei RT 13,07 min detektiert und mit einer Massenabweichung von 0 mDa als Sulfat-Konjugat von Hydroxy-2-AAF identifiziert. Im MS/MS-Spektrum geht Fragment 1 bei m/z 240,1011 aus der Schwefeltrioxid-Abspaltung hervor. Außerdem wird die für die Acetylgruppe des 2-AAF charakteristische Ketenabspaltung auf Fragment 2 bei m/z 198,0912 nachgewiesen.

a)



b)

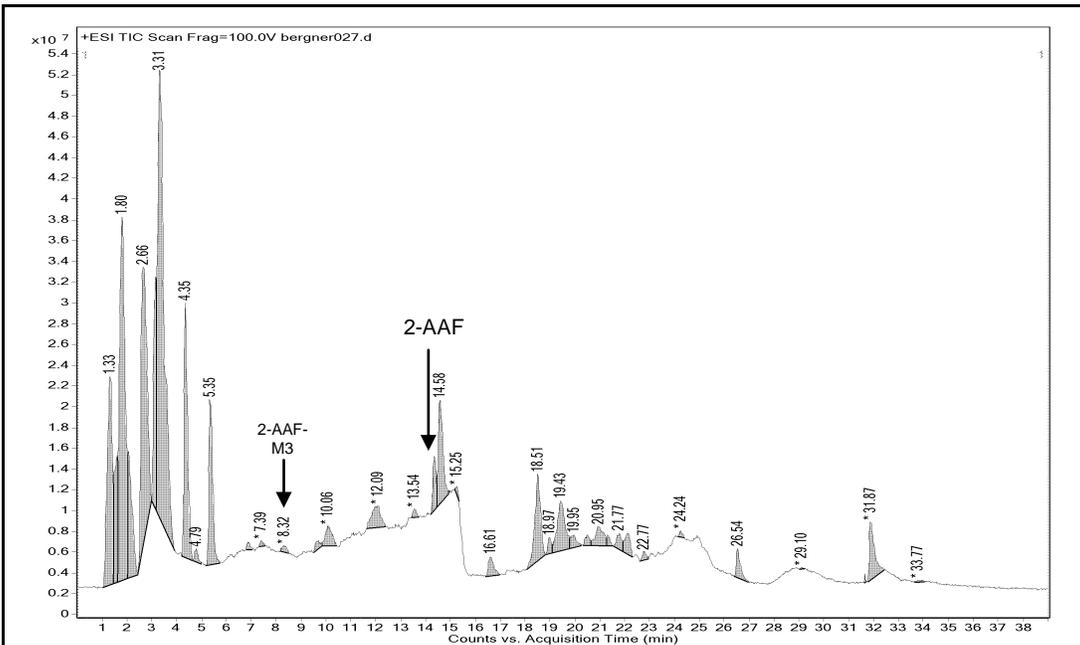
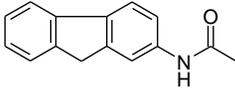
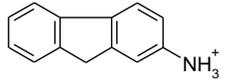
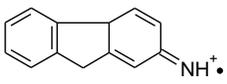
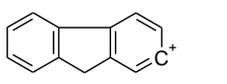
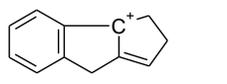


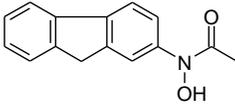
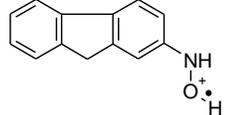
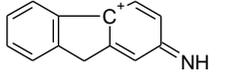
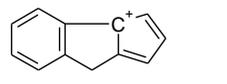
Abbildung 5.11: LC/MS-Chromatogramme der 2-AAF-Inkubate aus primären Rattenhepatozyten

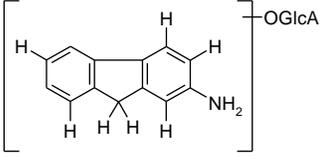
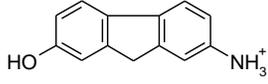
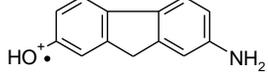
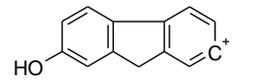
Dargestellt sind die +ESI-TIC-Chromatogramme der Inkubate a) ohne Zellen und b) mit Zellen über 24h unter basalen Bedingungen. 2-AAF-Konzentration 100 μ M. 2-AAF: RT 14,48 min, 2-AAF-M3: RT 8,38 min. Matrixpeaks in Abb. b werden anhand der Leerinkubation (nicht gezeigt) identifiziert.

Tabelle 5.19: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von 2-AAF

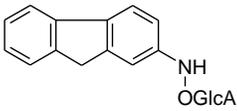
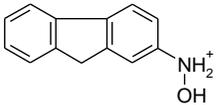
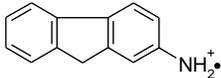
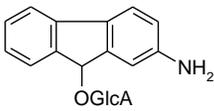
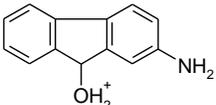
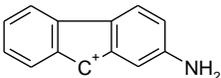
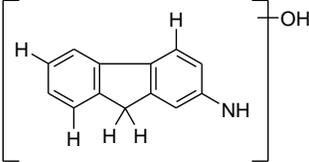
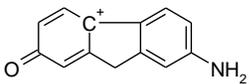
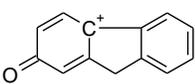
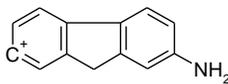
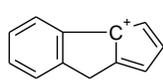
Dargestellt sind die Schlüsselfragmente aus den im Anhang, Kap. 12.1.3.4 dargestellten MS/MS-Spektren. Metaboliten (M) geordnet nach RT. Positionen in generischen Formeln, die keine Protonen besitzen, werden als mögliche Position der funktionellen Gruppe/Konjugats betrachtet.

 2-AAF m/z 224,1070; RT 14,48 min			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
 m/z 182,0964	 m/z 181,0880	 m/z 165,0691	 m/z 155,0852

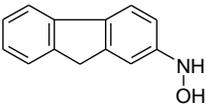
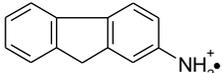
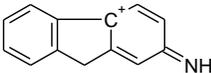
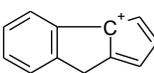
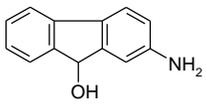
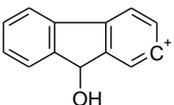
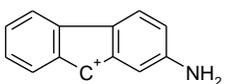
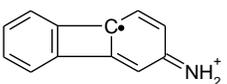
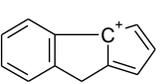
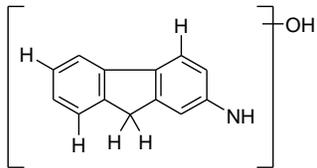
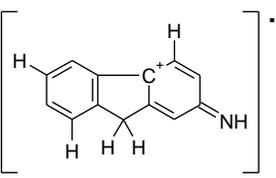
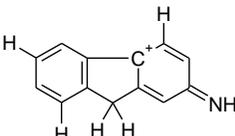
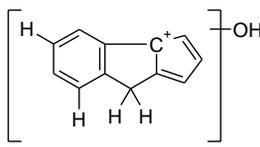
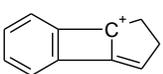
 NOH-AAF m/z 240,1019 (Standard)		
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3
 m/z 197,0833	 m/z 180,0802	 m/z 153,0701

 2-AAF-M1.1 m/z 374,1236; RT 4,45 min Die Fragmente sind exemplarisch für 7-Hydroxy-AF-O-Glucuronid dargestellt.		
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3
 m/z 198,0911	 m/z 197,0837	 m/z 181,0652

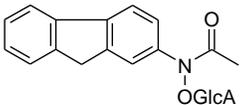
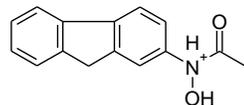
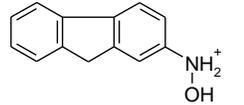
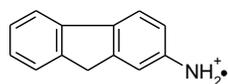
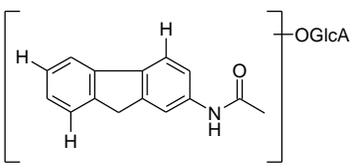
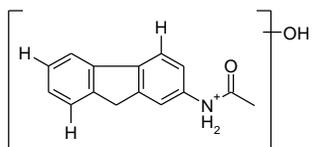
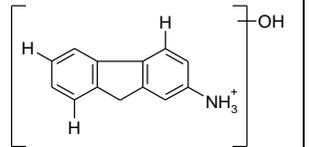
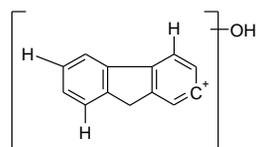
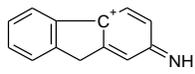
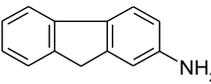
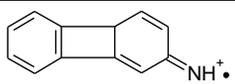
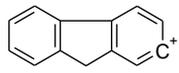
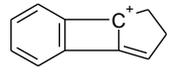
Fortsetzung Tabelle 5.19: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von 2-AAF

 <p>2-AAF-M1.2 <i>m/z</i> 374,1236; RT 5,89 min</p>			
Fragment 1		Fragment 2	
 <p><i>m/z</i> 198,0908</p>		 <p><i>m/z</i> 181,0882</p>	
 <p>2-AAF-M1.3 <i>m/z</i> 374,1236; RT 6,74 min</p>			
Fragment 1		Fragment 2	
 <p><i>m/z</i> 198,0836</p>		 <p><i>m/z</i> 180,0802</p>	
 <p>2-AAF-2.1 <i>m/z</i> 198,0913 RT 5,82 min Die Fragmente sind exemplarisch für 7-Hydroxy-2-AF dargestellt.</p>			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
 <p><i>m/z</i> 196,0750</p>	 <p><i>m/z</i> 181,0632</p>	 <p><i>m/z</i> 180,0796</p>	 <p><i>m/z</i> 153,0685</p>

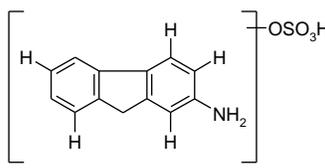
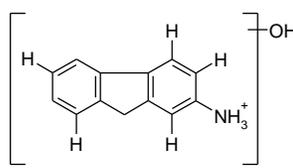
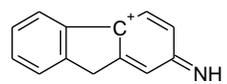
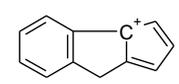
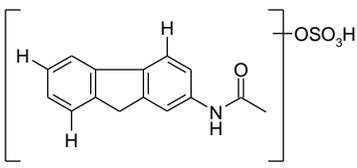
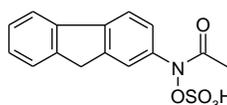
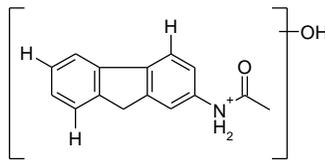
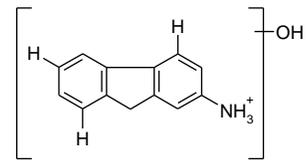
Fortsetzung Tabelle 5.19: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von 2-AAF

 2-AAF-M2.2 <i>m/z</i> 198,0913; RT 5,93 min			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	
 <i>m/z</i> 181,0863	 <i>m/z</i> 180,0778	 <i>m/z</i> 153,0701	
 2-AAF-M2.3 <i>m/z</i> 198,0913 RT 7,26 min			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
 <i>m/z</i> 181,0647	 <i>m/z</i> 180,0793	 <i>m/z</i> 167,0701	 <i>m/z</i> 153,0683
 2-AAF-M2.4 <i>m/z</i> 198,0913 RT 9,67 min			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
 <i>m/z</i> 181,0877	 <i>m/z</i> 180,0804	 <i>m/z</i> 169,0652	 <i>m/z</i> 141,0690

Fortsetzung Tabelle 5.19: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von 2-AAF

 2-AAF-M3.1 <i>m/z</i> 416,1334; RT 8,38 min			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	
 <i>m/z</i> 240,1017	 <i>m/z</i> 198,0910	 <i>m/z</i> 181,0883	
 2-AAF-M3.2, -M3.3, -M3.4 <i>m/z</i> 416,1340; RT 9,40, 10,97 und 11,26 min			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3 (M3.2)	Fragment 3 (M3.3)
 <i>m/z</i> 240,1018	 <i>m/z</i> 198,0909	 <i>m/z</i> 181,0634	 <i>m/z</i> 180,0805
 2-AAF-M4 <i>m/z</i> 182,0964; RT 9,63 min			
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	
 <i>m/z</i> 167,0724	 <i>m/z</i> 165,0693	 <i>m/z</i> 141,0690	

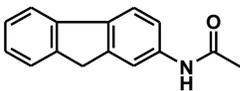
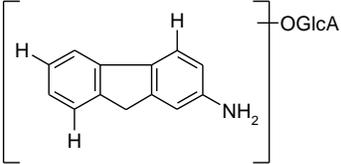
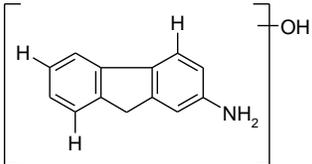
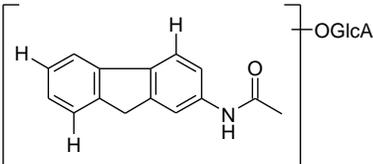
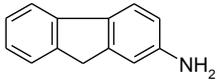
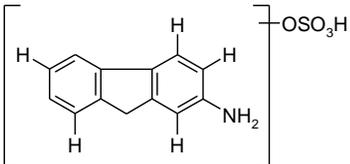
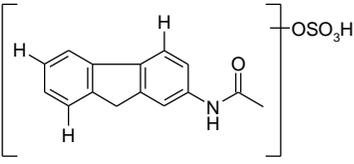
Fortsetzung Tabelle 5.19: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von 2-AAF

 2-AAF-M5 m/z 278,0482; RT 12,88 min		
Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3
 m/z 198,0905	 m/z 180,0808	 m/z 153,0699
 2-AAF-M6 m/z 320,0587; RT 13,07 min		
 oder		
Fragment 1	Fragment 2	
 m/z 240,1011	 m/z 198,0912	

Auf Grundlage der identifizierten Metaboliten wird die Biotransformation von 2-AAF in primären Rattenhepatozyten unter den im Rahmen dieser Arbeit vorliegenden Inkubationsbedingungen wie in Abbildung 5.12 gezeigt, abgeleitet.

Tabelle 5.20: Strukturvorschläge der identifizierten 2-AAF-Metaboliten

Positionen in generischen Formeln, die keine Protonen besitzen, werden als mögliche Position der funktionellen Gruppe/Konjugats betrachtet.

Substrat	Identifizierte 2-AAF-Metaboliten
 <p>2-Acetylaminofluoren $[M+H]^+ = 224,1074$ $\Delta -0,4$ mDa RT 14,48 min</p>	<p>2-AAF-M1.1, -M1.2, -M1.3 $C_{19}H_{20}NO_7$ RT 4,45; 5,89; 6,74 min $[M+H]^+ = 374,1236$ $\Delta 0,2$ mDa Hydroxy-2-AF-Glucuronide</p> 
	<p>2-AAF-M2.1, -M2.2, -M2.3, -M2.4 $C_{13}H_{12}NO$ RT 5,82; 5,93; 7,26; 9,67 min $[M+H]^+ = 198,0916$ $\Delta -0,3$ mDa Hydroxy-2-AF</p> 
	<p>2-AAF-M3.1, -M3.2, -M3.3, -M3.4 $C_{21}H_{22}NO_8$ RT 8,38; 9,40; 10,97; 11,26 min $[M+H]^+ = 416,1334$ $\Delta -1,0$ mDa Hydroxy-2-AAF-Glucuronide</p> 
	<p>2-AAF-M4 $C_{13}H_{12}N$ RT 9,63 min $[M+H]^+ = 182,0962$, $\Delta 0,2$ mDa 2-AF</p> 
	<p>2-AAF-M5 $C_{13}H_{12}NO_4S$ RT 12,88 min $[M+H]^+ = 278,0479$, $\Delta -0,3$ mDa Hydroxy-2-AF-Sulfat</p> 
	<p>2-AAF-M6 $C_{15}H_{14}NO_5S$ RT 13,07 min $[M+H]^+ = 320,0587$ $\Delta 0$ mDa Hydroxy-2-AAF-Sulfat</p> 

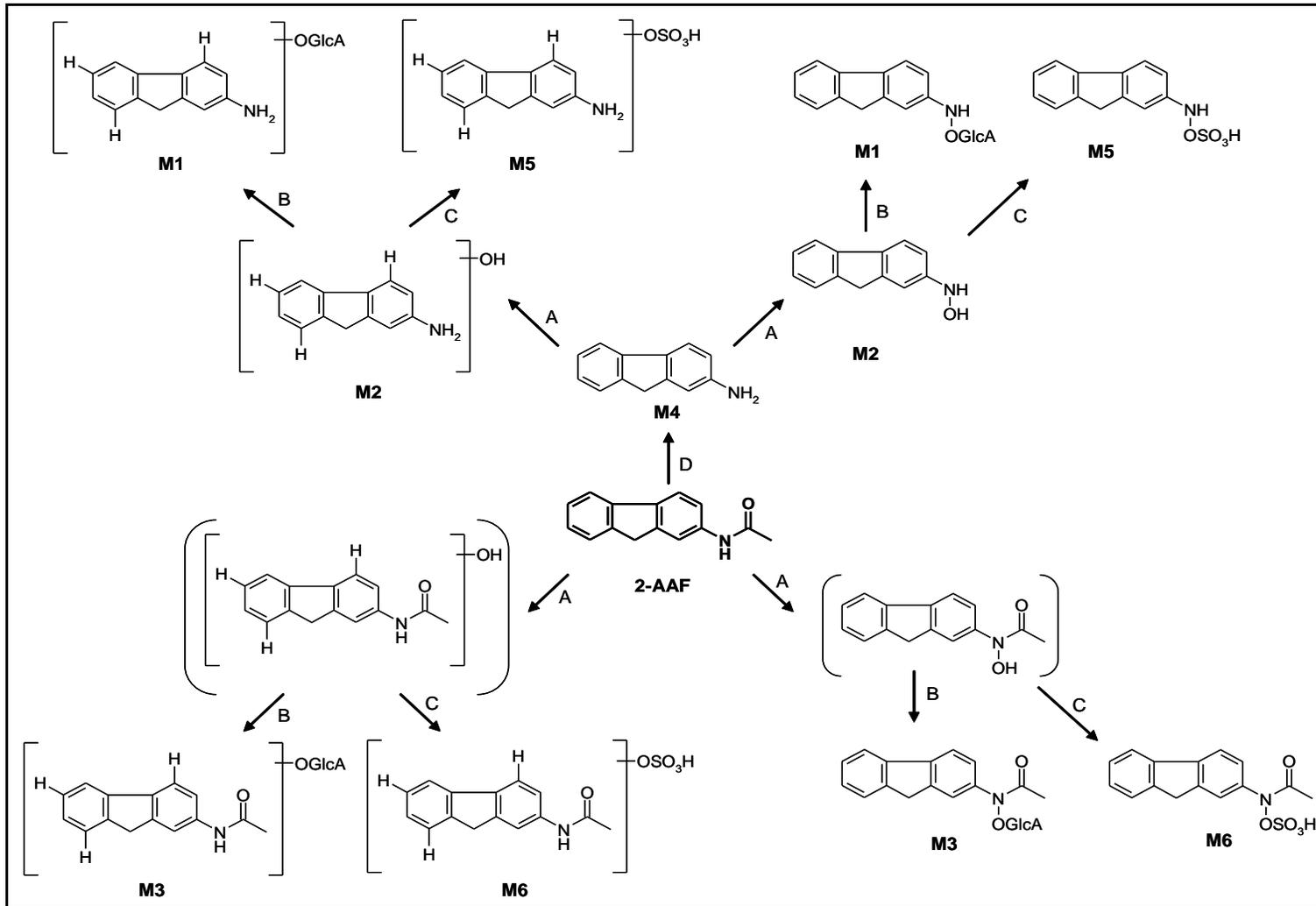


Abbildung 5.12: Metabolismus von 2-AAF in primären Rattenhepatozyten

Dargestellt sind die Metaboliten M, die durch die Strukturaufklärung identifiziert worden sind. [] Vorläufer, die nicht identifiziert werden konnten. Beteiligte Enzymsysteme sind: A) CYP, B) UGT, C) SULT, D) Deacetylasen (Heflich und Neft 1994)

5.2 Charakterisierung der 3T3-Fibroblasten-Kultur

5.2.1 Fremdstoffmetabolisierende Aktivität

5.2.1.1 AROD-Aktivitäten

Die AROD-Aktivität der 3T3-Fibroblasten wird in Anlehnung an das Zytotoxizitätsprotokoll an Tag 3, 7 und 10 aus dem Monolayer gemessen. Die Quantifizierung erfolgt anhand der Resorufinkalibration in der gleichen Matrix. Die Quantifizierungsgrenze wird durch die Inkubation ohne Zellen ermittelt und beträgt für EROD 0,4 pmol, für PROD 0,5 pmol und für BROD 0,1 pmol Resorufin. Diese Stoffmenge wird bei der Berechnung der Aktivität der Proben berücksichtigt.

Die Aktivitäten liegen in drei unabhängigen Experimenten zu jedem Zeitpunkt unterhalb der Quantifizierungsgrenze. Eine fremdstoffmetabolisierende Aktivität kann unter den gewählten Untersuchungsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

5.2.1.2 Untersuchung ausgewählter CYP-Enzyme mittels RT-PCR und Western Blot

Die Genexpressions- und Proteinanalysen der CYP1A und 2B-Isoenzyme in 3T3-Fibroblasten werden an der MLU und der TUM durchgeführt. Dazu werden Zelllysate aus drei verschiedenen Zellpassagen (P1 bis P3) hergestellt und zur Untersuchung an die Verbundpartner gesendet. Als Positivkontrolle (PK) wird bei der RT-PCR die murine Leberzelllinie M313 verwendet. Humanhepatozyten dienen im Western Blot als Positivkontrolle. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.13 dargestellt.

Weder in der RT-PCR noch im Western Blot können CYP1A- und CYP2B-spezifische Banden nachgewiesen werden. Dabei korrelieren die Ergebnisse mit den CYP-Aktivitätsuntersuchungen.

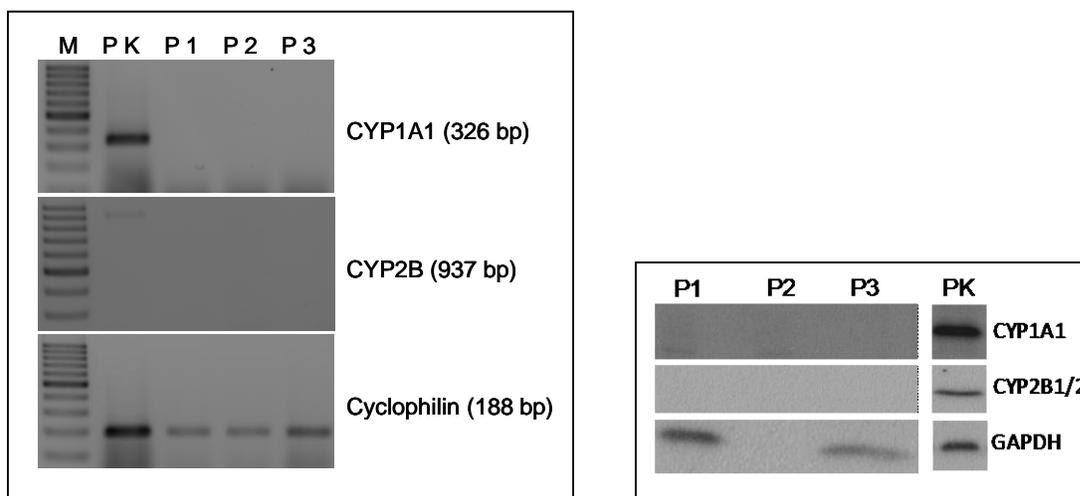


Abbildung 5.13: RT-PCR und Western Blot von CYP1A und CYP2B aus 3T3-Fibroblasten

Die RT-PCR wird an der MLU in Halle-Wittenberg und der Western Blot an der TU München durchgeführt. Die Zelllysate stammen aus drei 3T3-Zellpassagen (P1 bis P3). Links: RT-PCR: PK: M313-Zellen. Recht: Western Blot: PK: Humanhepatozyten.

5.2.2 Untersuchung der Proteratogene und Teratogene im 3T3-Zytotoxizitätstest

Die im Rahmen des Verbundprojekts ausgewählten *in vitro*-Embryotoxizitätstests umfassen den Embryonalen Stammzelltest, welcher im Rahmen des Projektes am BfR durchgeführt wird und die Kultur ganzer Rattenembryonen, die an der Charité Berlin bearbeitet wird. Die zu beiden Systemen dazugehörigen Zytotoxizitätsdaten aus der Kultur der 3T3-Fibroblasten werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert. Die differenzierten Fibroblasten dienen als Modell zur Abbildung der maternalen Toxizität, die in den Prädiktionsmodellen der Testsysteme berücksichtigt wird. Dazu werden nach den ECVAM-validierten Protokollen die Substanzen über zehn Tage in der 3T3-Kultur inkubiert und die Zytotoxizität mittels MTT-Test bestimmt. Die Daten aus dem Differenzierungs- und dem Zytotoxizitätstest werden zusätzlich an Tag 7 erhoben.

Um einen metabolischen Umsatz zu simulieren, werden ausgehend von den Ergebnissen der einzelnen Verbindungen, Mischungen in den molaren Verhältnissen von Proteratogen und Teratogen von 80:20, 50:50, 20:80, 10:90 und 1:99 im 3T3-Zytotoxizitätstest eingesetzt. Die IC_{50} -Werte (vgl. Tabelle 5.21) werden graphisch anhand der Konzentration-Wirkungskurve ermittelt (Anhang, Kap. 12.2). Die aufgetragene Konzentration der Mischungen ergibt sich aus der Summe der Konzentrationen der Einzelsubstanzen.

Tabelle 5.21: IC₅₀-Werte der Testsubstanzen aus dem Zytotoxizitätstest in 3T3-Fibroblasten
 Dargestellt sind die IC₅₀-Werte als Mittelwerte ± SD von Tag (d) 10 und 7 (n = 3). *¹: n = 1.

Mischungsverhältnis [%]	IC ₅₀ -Wert (d10)	IC ₅₀ -Wert (d7)	
CPA : Acr	µM	µM	
100 : 0	2281,7 ± 443,3	1490,0 ± 503,2	Giftung ↓
80 : 20	51,0 * ¹	39,8 ± 15,5	
50 : 50	18,4 ± 7,2	15,3 ± 7,4	
20 : 80	13,0 * ¹	9,0 * ¹	
10 : 90	10,0 * ¹	5,3 ± 1,4	
1 : 99	10,0 * ¹	6,3 ± 2,5	
0 : 100	2,4 ± 0,5	2,0 ± 0,9	
ABZ : ABZSO			
100 : 0	0,91 ± 0,04	0,6 ± 0,2	Entgiftung ↓
80 : 20	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,5	
50 : 50	2,1 ± 0,2	1,6 ± 0,2	
20 : 80	4,9 ± 1,0	4,1 ± 0,3	
10 : 90	8,4 ± 1,5	7,6 ± 1,0	
1 : 99	29,6 ± 9,8	23,3 ± 0,4	
0 : 100	17,1 ± 0,7	13,6 ± 2,8	
VPD : VPA			
100 : 0	> 3491	> 3491	Giftung ↓
80 : 20	> 3491 * ¹	> 3491 * ¹	
50 : 50	4470 * ¹	3360 * ¹	
20 : 80	3180 * ¹	2310 * ¹	
10 : 90	3130 * ¹	2130 * ¹	
1 : 99	3010 * ¹	2200 * ¹	
0 : 100	2462 ± 703	1704 ± 723	
2-AAF : NOH-AAF			
100 : 0	79,2 ± 11,7	77,0 ± 31,9	Giftung ↓
80 : 20	55,3 ± 13,5	56,8 ± 6,5	
50 : 50	28,5 ± 1,0	24,6 ± 1,7	
20 : 80	19,1 * ¹	16,9 * ¹	
10 : 90	18,7 ± 0,2	13,8 ± 1,6	
1 : 99	18,0 ± 0,2	12,5 ± 1,6	
0 : 100	13,7 ± 4,6	10,8 ± 3,8	

Die IC₅₀-Werte der Einzel- und Mischungsversuche an Tag 10 sind gegenüber Tag 7 erhöht. Die größten Unterschiede von 30 bis 35 % weisen CPA, ABZ und VPA auf. Die geringsten Abweichungen werden bei Acr und 2-AAF beobachtet. Der höhere IC₅₀-Wert an Tag 10 resultiert aus der 100%igen Konfluenz der Kontrollzellen an Tag 7, weshalb diese Ergebnisse als nicht valide bewertet werden. Die Ergebnisse von Tag 7 bilden die Grundlage der weiteren Darstellung.

Der Referenzmetabolit von CPA, Acr, besitzt eine um den Faktor 1000 höhere Zytotoxizität als das Proteratogen. Für VPD kann unter den gegebenen Versuchsbedingungen kein IC_{50} -Wert ermittelt werden. Die Zytotoxizität von VPA ist um den Faktor $> 1,5$ gegenüber VPD erniedrigt. Außerdem kann bei kleinen VPA-Konzentrationen ein formaler Anstieg der Vitalität auf über 150 % beobachtet werden (vgl. Anhang, Kap. 12.2). NOH-AAF ist um den Faktor 6 zytotoxischer als 2-AAF. Bei CPA, VPD und 2-AAF handelt es sich somit um eine metabolische Aktivierung. Für das Substanzpaar ABZ/ABZSO stellt sich heraus, dass der Metabolit um den Faktor 22 weniger zytotoxisch ist als die Ausgangssubstanz. ABZ wird hinsichtlich des Zielparameters der Zytotoxizität in 3T3-Zellen somit metabolisch entgiftet.

Die Ergebnisse der Mischungsversuche dienen der modellhaften Abschätzung des Mindestumsatzes der Proteratogene und des Teratogens durch die Hepatozyten, um eine metabolische (De-)Aktivierung im 3T3-Zytotoxizitätstest nachzuweisen. Diese Abschätzung berücksichtigt ausschließlich den Umsatz des (Pro-)Teratogens zu den ausgewählten Referenzmetaboliten. Als Mindestumsatz wird das Mischungsverhältnis angesehen, dessen IC_{50} -Wert sich signifikant (p -Wert $\leq 0,05$, t-Test nach Student) vom IC_{50} -Wert des Proteratogens (bei ABZ: des Teratogens) unterscheidet. Die Mischungsversuche zeigen, dass für die getesteten Substanzpaare CPA/Acr, VPD/VPA und 2-AAF/NOH-AAF eine Erhöhung der Zytotoxizität mit steigendem Anteil des Metaboliten nachgewiesen werden kann. Bei CPA/Acr wird durch das Mischungsverhältnis 80:20 eine signifikante Erniedrigung des IC_{50} -Wertes erreicht. Für VPD kann aufgrund des fehlenden IC_{50} -Wertes von VPD kein Mindestumsatz festgelegt werden. Bei 2-AAF/NOH-AAF ist ein Umsatz von 99 % 2-AAF notwendig, um eine signifikante Erniedrigung des IC_{50} -Wertes zu erreichen. Für ABZ/ABZSO-Mischungen resultiert eine Verringerung der Zytotoxizität mit steigendem Anteil des Metaboliten. Eine signifikante Erhöhung des IC_{50} -Wertes im Vergleich zu ABZ wird durch das Mischungsverhältnis 50:50 erreicht.

Bei den Mischungsversuchen wird beobachtet, dass die Zytotoxizität geringer ist, als dies aus den Einzelversuchen berechnet wurde. Die IC_{50} -Werte der 1:99-Mischungen der Substanzpaare CPA/Acr, VPD/VPA und AAF/NOH-AAF sind gegenüber den reinen Referenzteratogenen erhöht. Bei dem Substanzpaar ABZ/ABZSO ist der IC_{50} -Wert der 1:99 Mischung höher als der des reinen Sulfoxids (vgl. Tabelle 5.21).

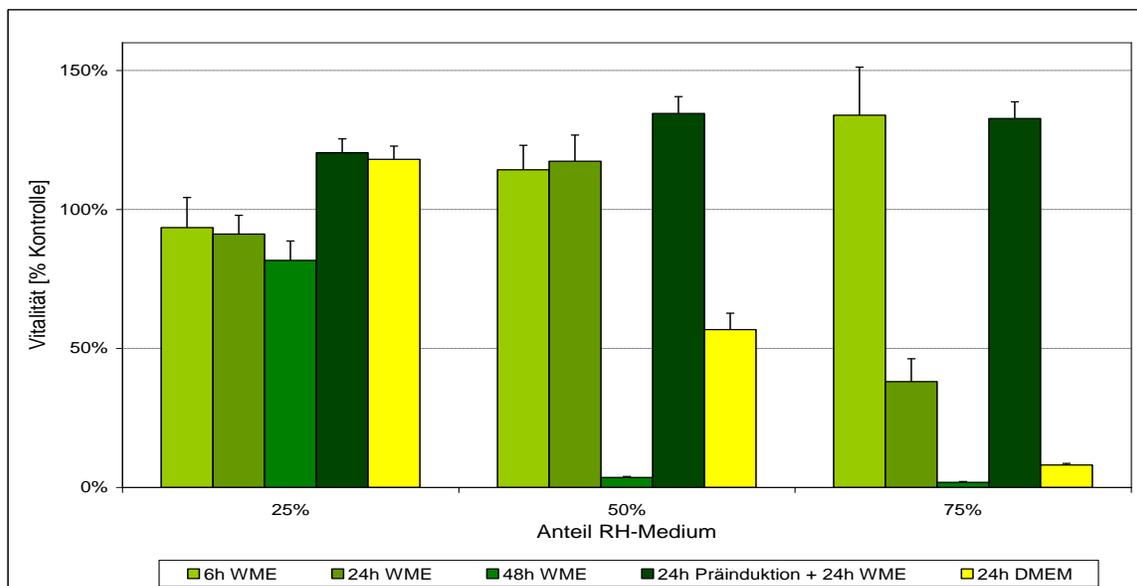
5.3 Überführung von *in vitro*-Metabolismusinkubaten in den EST und die WEC

5.3.1 Prüfung von *in vitro*-Metabolismusinkubaten in 3T3-Fibroblasten

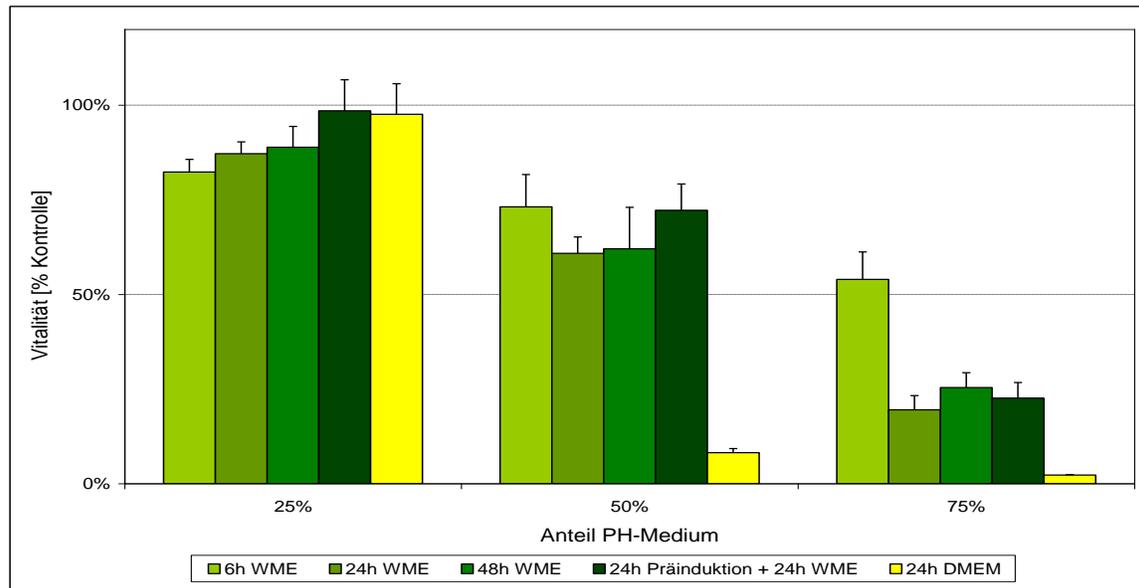
5.3.1.1 Toleranz gegenüber Hepatozyteninkubaten von Ratte, Schwein und Mensch

Die Überführung von Hepatozyteninkubaten in die Zielkulturen erfordert die Toleranz der Zellsysteme gegenüber inkubiertem Hepatozytenmedium. Um reine Mediumeffekte auszuschließen, werden Hepatozyteninkubate von Ratte, Schwein und Mensch in Mischungen mit frischem DMEM-Medium zu 25 %, 50 % und 75 % (v/v) in der 3T3-Zielkultur analog des Zytotoxizitätsprotokolls über sieben Tage inkubiert. Das Humanhepatozytenmedium wird außerdem zu 100 % (v/v) eingesetzt. Die Medienüberstände werden nach 6, 24 und 48 Stunden aus der basalen und nach 24 Stunden aus der induzierten Hepatozytenkultur gewonnen. Außerdem werden nach 24 Stunden Inkubate aus der basalen Ratten- und Schweinehepatozytenkultur auf der Basis von DMEM-Medium überführt. Exemplarisch sind die Vitalitäten der 3T3-Zellen aus je einem Überführungsexperiment graphisch in den Abbildungen 5.14 a-c dargestellt.

a)



b)



c)

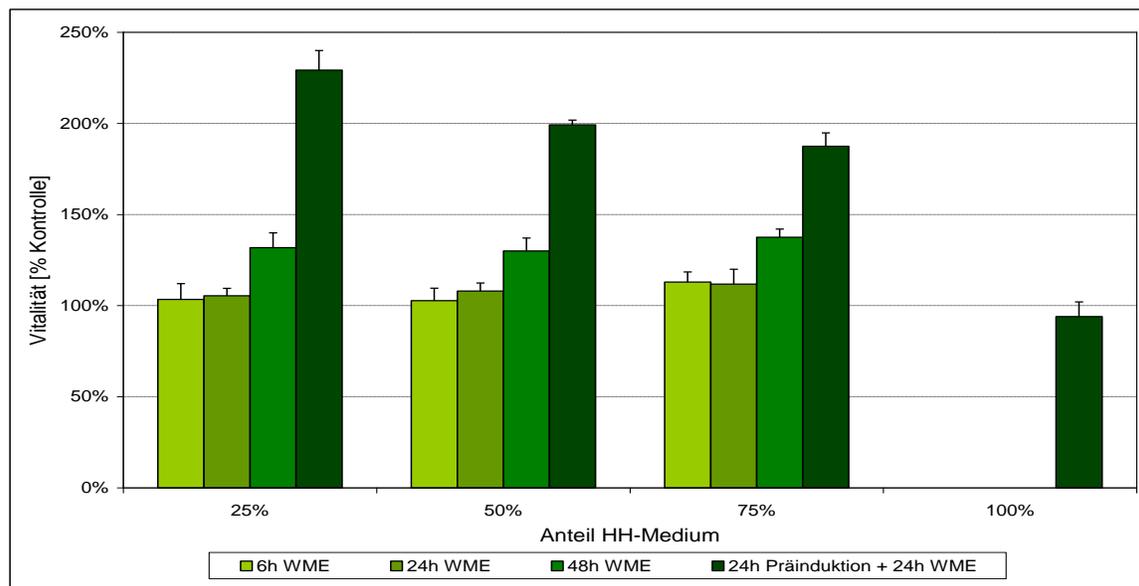


Abbildung 5.14: Einfluss von inkubiertem Hepatozytenmedium auf die Vitalität der 3T3-Zellen
 Dargestellt ist die Vitalität [% Kontrolle] \pm SD der 3T3-Zellen an Tag 7 aus der Sechsfachbestimmung innerhalb eines Experiments in Abhängigkeit des eingesetzten Anteils WME (grün)- und DMEM (gelb)-Hepatozytenmedium nach einer Kulturperiode von 6, 24 und 48 h (basal) und 24 h (induziert). a) RH: Rattenhepatozyten b) PH: Schweinehepatozyten und c) HH: Humanhepatozyten. Die Medienüberstände aus Schweine- und Humanhepatozyten stammen von der MLU bzw. TUM und werden bei BASF SE in den Zytotoxizitätstest eingesetzt.

Bei der Überführung des WME-Rattenhepatozytenmediums wird ein zeit- und kulturabhängiger Einfluss auf die Vitalität der 3T3-Fibroblasten beobachtet. Die Inkubate aus einer 6-stündigen Kultur unter basalen Bedingungen und einer 24-stündigen Kultur unter induzierten Bedingungen haben unabhängig vom gewählten Anteil keinen Einfluss auf die Vitalität. Nach 24 Stunden unter basalen Bedingungen sinkt bei einem Anteil von 75 % (v/v) RH-Medium die Vitalität unter 50 % der Kontrolle. Bei einem Anteil von 25 % und 50 % (v/v) wird eine der Kontrolle vergleichbare Vitalität erreicht. Nach 48 Stunden wird sowohl für den 75 %- als auch für den 50 %- (v/v) RH-Mediumanteil eine Vitalität kleiner 10 % der Kontrolle detektiert. Die Überführung von 25 % (v/v) des 48 Stunden-Inkubats zeigt eine der Kontrolle vergleichbare Vitalität.

Der Einsatz von WME-Schweinehepatozytenmedium in der Kultur der 3T3-Zellen weist eine deutliche Anteilsabhängigkeit auf. Unabhängig von der Kulturzeit auf Schweinehepatozyten wird bei einem Anteil von 25 % (v/v) eine der Kontrolle vergleichbare Vitalität erreicht. Bei steigendem Anteil PH-Medium wird eine Abnahme der Vitalität auf ca. 60 % bei 50 % (v/v) PH-Medium und 30 % bei 25 % (v/v) PH-Medium beobachtet.

Die Überführung von WME-Humanhepatozytenmedium ist sowohl von der Kulturzeit als auch vom eingesetzten Anteil unabhängig. Nach 6, 24 und 48 Stunden wird eine der Kontrolle vergleichbare Vitalität nachgewiesen. Bei der Überführung von 25 %, 50 % und 75 % (v/v) HH-Medium aus induzierten Humanhepatozyten steigt die Vitalität formal auf Werte von ca. 200 % der Kontrolle. Da dieser Effekt mögliche Substanz-induzierte Effekte überlagern könnte, werden zusätzlich 100 % (v/v) des HH-Mediums überführt. Auf diesem Weg kann eine der Kontrolle vergleichbare Vitalität erreicht werden.

Unter Berücksichtigung einer 24 Stunden-Hepatozyteninkubation werden für die Überführungsversuche 50 % (v/v) RH-Medium, 25 % (v/v) PH-Medium und 100 % (v/v) HH-Medium als akzeptabel bewertet.

Das aus einer 24 Stunden-Kulturperiode stammende DMEM-RH-Medium beeinträchtigt bei Einsatz von 25 % (v/v) die Vitalität der 3T3-Zellen nicht. Bei steigendem Anteil fällt die Vitalität auf ca. 50 % bzw. 10 % der Kontrolle. Eine ähnliche Abnahme der Vitalität wird durch DMEM-Medium beobachtet, welches zuvor auf Schweinehepatozyten inkubiert wurde. Da die 3T3-Zellen eine größere Toleranz gegenüber höheren Anteilen WME-Hepatozytenmedium aufweisen, wird das DMEM-Medium bei zukünftigen Inkubatüberführungen nicht mehr berücksichtigt.

5.3.1.2 Toleranz gegenüber Leberschnittinkubaten

Das Medium aus 6 und 24 Stunden-Kulturperiode von Leberschnitten der Ratte wird analog zum Hepatozytenmedium mit 10 % (v/v) Serum und 1 % (v/v) Glutamin und anschließend mit 25 %, 50 % und 75 % (v/v) frischem DMEM-Medium versetzt und in den 3T3-Zytotoxizitätstest eingesetzt. Der MTT-Test wird an Tag 7 durchgeführt. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Experiments in Abbildung 5.15 dargestellt.

Die Überführung von Inkubaten aus der basalen Leberschnittkultur nach 6 Stunden führt unabhängig des gewählten Anteils zu einer der Kontrolle vergleichbaren Vitalität. Nach 24 Stunden sinkt bei einem Anteil von 75 % (v/v) die Vitalität der 3T3-Zellen auf ca. 80 % ab. Der Einsatz von 25 % und 50 % (v/v) hat keinen Einfluss auf die Vitalität im Vergleich zur Kontrolle. Daraus folgt, dass Leberschnittinkubate nach 24 Stunden Inkubation zu 50 % (v/v) in den 3T3-Zytotoxizitätstest eingesetzt werden können. Inkubate aus induzierten Leberschnittkulturen wurden während der Methodenentwicklung nicht eingesetzt. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse aus der basalen Kultur wird aufgrund der vorliegenden Ergebnisse aus der Rattenhepatozytenkultur angenommen (vgl. Kap. 5.3.1.1).

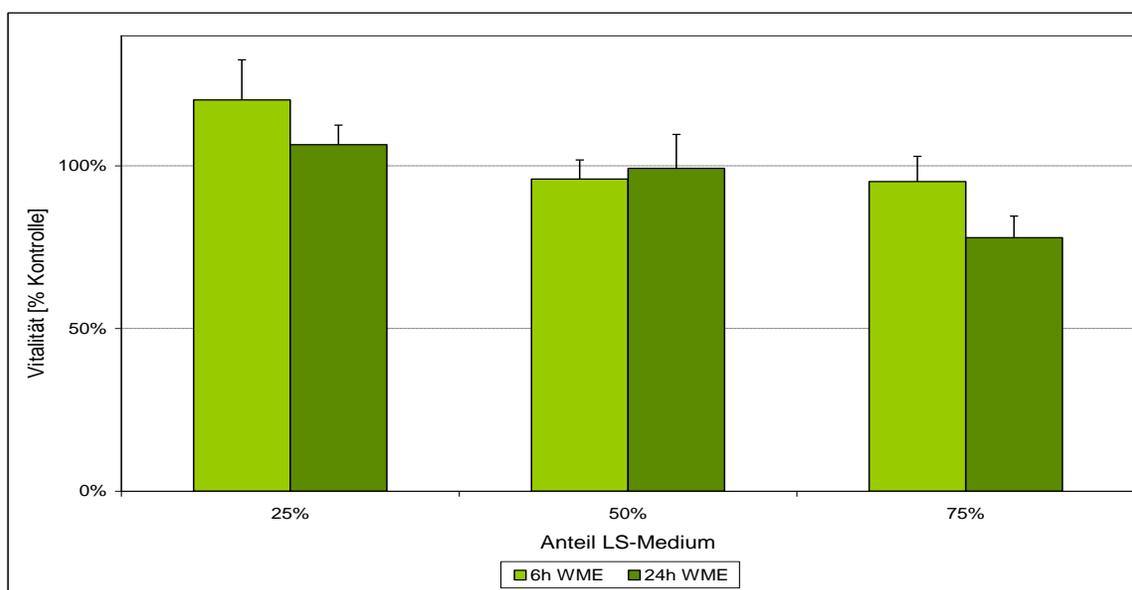


Abbildung 5.15: Einfluss von inkubiertem Leberschnittmedium der Ratte auf die Vitalität der 3T3-Zellen

Dargestellt ist die Vitalität [% Kontrolle] \pm SD der 3T3-Zellen an Tag 7 aus der Sechsfachbestimmung innerhalb eines Experiments in Abhängigkeit des eingesetzten Anteils Leberschnittmedium aus 6 und 24 Stunden Kultur. LS: Leberschnitte.

5.3.2 Cyclophosphamid

5.3.2.1 EST: 3T3-Fibroblasten

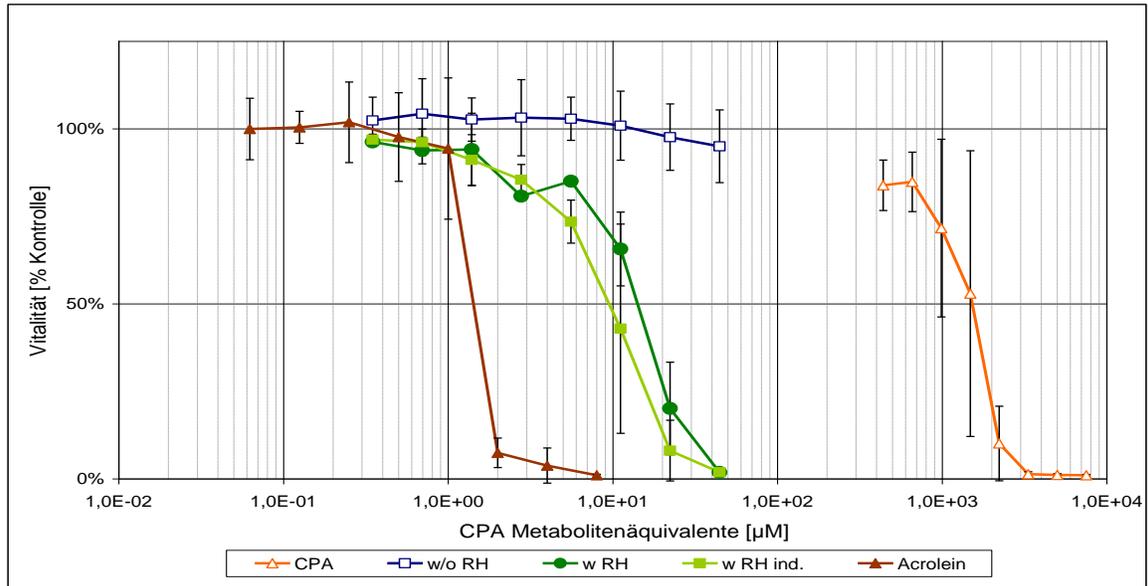
In der Kultur primärer Ratten- und Schweinehepatozyten werden 0,1 und 1 mM CPA für 24 Stunden unter induzierten Bedingungen inkubiert. In Rattenhepatozyten erfolgt zusätzlich die Inkubation unter basalen Bedingungen. In induzierten Humanhepatozyten werden 1 mM CPA ebenfalls für 24 Stunden inkubiert („aktive Inkubate“). Als inaktive Kontrolle dienen jeweils die Inkubationen ohne Zellen. Die Inkubate werden mit den Lösungsmittelüberständen verdünnt und zu 44,5 % (v/v, RH), zu 22,3 % (v/v, PH) und zu 89,1 % (v/v, HH) in den 3T3-Zytotoxizitätstest eingesetzt. Die aus drei unabhängigen Überführungen resultierenden Konzentrations-Wirkungskurven im Vergleich zu CPA und Acr sind in den Abbildungen 5.16 (RH), 5.17 (PH) und 5.18 (HH) dargestellt. Die IC_{50} -Werte werden in Metabolitenäquivalent-Konzentrationen auf Basis der in Hepatozyten eingesetzten Konzentration angegeben.

Im 3T3-Zytotoxizitätstest kann eine metabolische Toxifizierung von CPA durch die Präinkubation in Rattenhepatozyten nachgewiesen werden. Die IC_{50} -Werte der 0,1 mM-Inkubate betragen $15,0 \pm 2,8 \mu\text{M}$ (basal) und $11,3 \pm 3,9 \mu\text{M}$ (ind.) Sie sind um den Faktor 99 bzw. 131 kleiner und unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,01$) vom IC_{50} -Wert von CPA. Die IC_{50} -Werte des 1 mM-Inkubats sind um den Faktor 38 und ebenfalls signifikant erniedrigt und betragen $38,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$ (basal) und $39,2 \pm 8,5 \mu\text{M}$ (ind.). Das Inkubat mit der geringeren Substratkonzentration hat einen kleineren IC_{50} -Wert zur Folge. Ein Unterschied der Zytotoxizität zwischen den Inkubaten aus der basalen und der induzierten Hepatozytenkultur besteht nicht. Die Überstände aus den Inkubationen ohne Hepatozyten haben keinen Einfluss auf die Vitalität der 3T3-Zellen. Die IC_{50} -Werte sind $> 44,5 \mu\text{M}$ (100 μM -Inkubat) und $> 445 \mu\text{M}$ (1 mM-Inkubat).

Die Überführung von CPA-Inkubaten aus induzierten Schweinehepatozyten führt zu einer Abnahme der Vitalität der 3T3-Zellen im Vergleich zu den inaktiven Inkubaten. Die IC_{50} -Werte betragen $2,8 \pm 2,4 \mu\text{M}$ für das 0,1 mM-CPA-Inkubat und $23,2 \pm 21,2 \mu\text{M}$ für das 1 mM-CPA-Inkubat. Sie sind um den Faktor 532 und 64 kleiner als der IC_{50} -Wert von CPA. Wie bereits bei der Überführung der Rattenhepatozyteninkubate beobachtet, führt die geringere Substratkonzentration zu einem kleineren IC_{50} -Wert. Die metabolische Aktivierung von 0,1 mM CPA ist in Schweinehepatozyten ca. um den Faktor 4 größer als in Rattenhepatozyten (IC_{50} : $2,8 \mu\text{M}$ vs. $11,3 \mu\text{M}$). Sie unterliegt jedoch größeren Schwankungen. Die inaktiven Inkubate haben keinen Einfluss auf die Vitalität der 3T3-Zellen, die IC_{50} -Werte sind $> 22,3 \mu\text{M}$ und $> 222,5 \mu\text{M}$.

Die Präinkubation von CPA in Humanhepatozyten führt zu einer Erhöhung der Zytotoxizität im Vergleich zum Inkubat ohne Zellen. Der IC_{50} -Wert beträgt $194,7 \pm 141,4 \mu\text{M}$ und ist damit um den Faktor 7,6 kleiner als der IC_{50} -Wert von CPA. Im Vergleich zu Rattenhepatozyten ist die metabolische Aktivierung von 1 mM CPA ca. um den Faktor 5 kleiner (IC_{50} : $194,7 \mu\text{M}$ vs. $39,2 \mu\text{M}$). Sie unterliegt ähnlich wie bei Schweinehepatozyten großen Schwankungen. Das inaktive Inkubat beeinflusst die Vitalität der 3T3-Zellen nicht. Der IC_{50} -Wert ist $> 890 \mu\text{M}$.

a)



b)

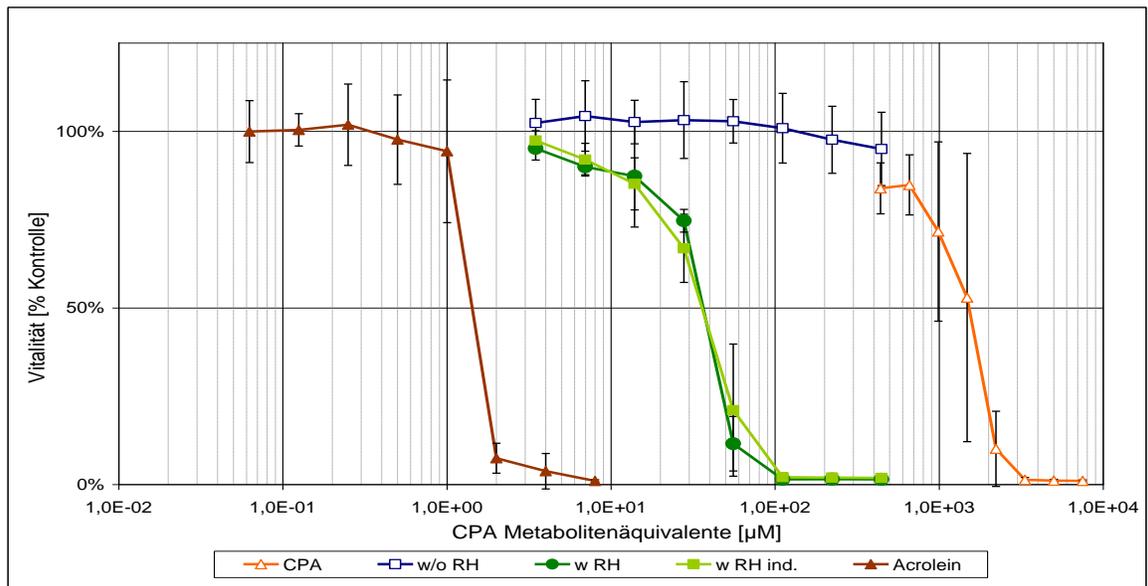
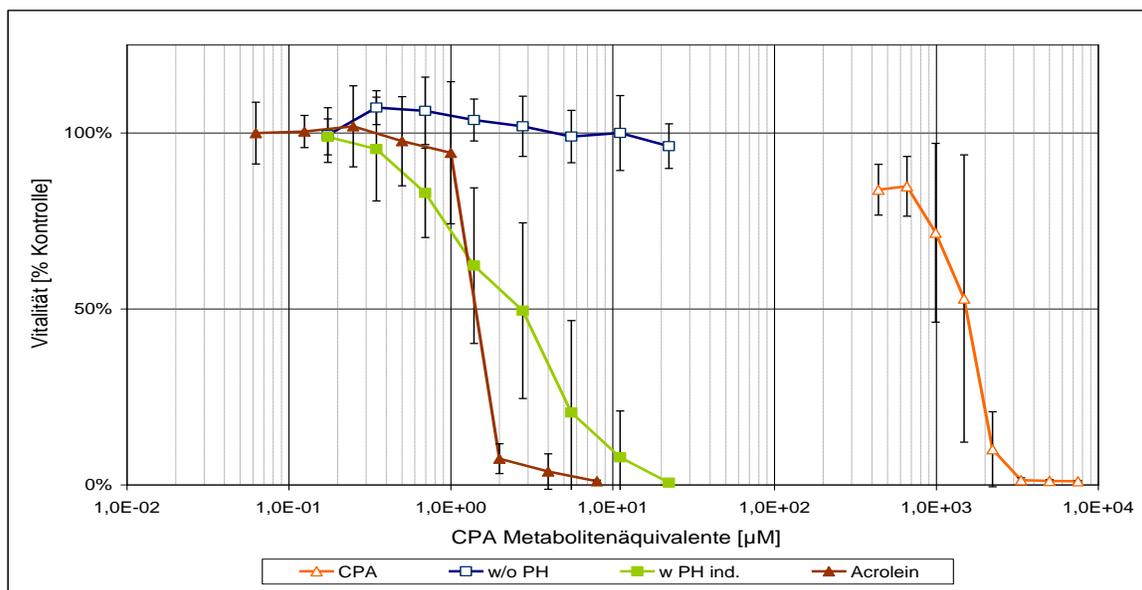


Abbildung 5.16: Konzentrations-Wirkungskurven von CPA-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im Vergleich mit CPA und Acr im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von CPA (Δ), Acrolein (\blacktriangle), CPA-Inkubate w/o RH für 24h (\square), CPA-Inkubate w RH für 24h (\bullet) und CPA-Inkubate w RH, ind. für 24h (\blacksquare). CPA-Ausgangskonzentration in RH a) 0,1 mM ($n = 3$) und b) 1 mM ($n = 3$). w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert, RH: Rattenhepatozyten.

a)



b)

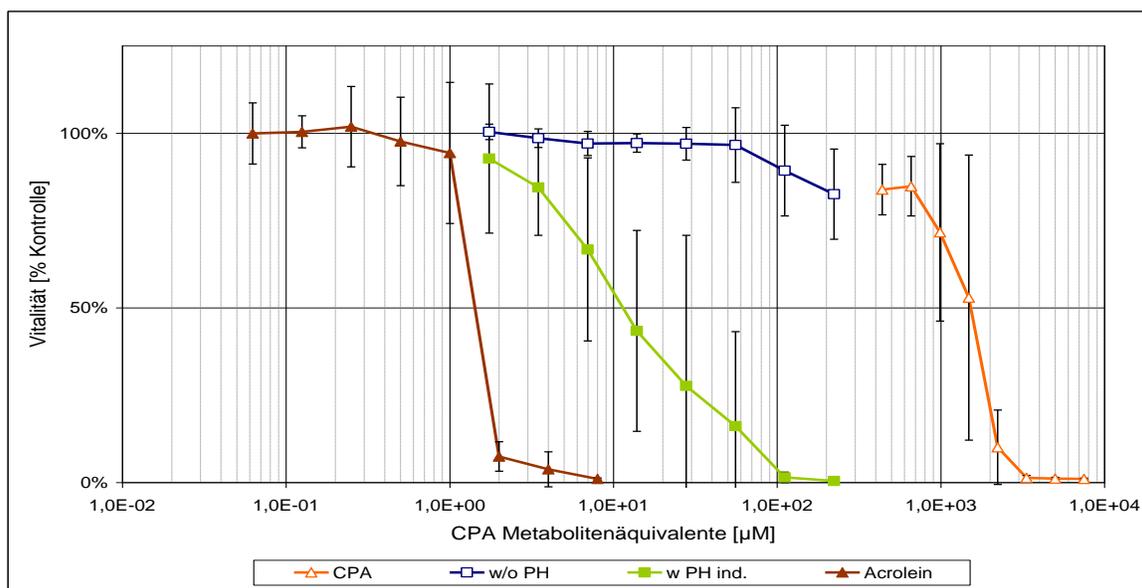


Abbildung 5.17: Konzentrations-Wirkungskurven von CPA-Inkubaten aus Schweinehepatozyten im Vergleich mit CPA und Acr im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten [% Kontrolle] \pm SD der 3T3-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von CPA (Δ), Acrolein (\blacktriangle), CPA-Inkubate w/o PH für 24h (\square), und CPA-Inkubate w PH, ind. für 24h (\blacksquare). CPA-Ausgangskonzentration in PH a) 0,1 mM (n = 3) und b) 1 mM (n = 3). w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert. Die Inkubate aus Schweinehepatozyten (PH) werden an der MLU gewonnen und bei BASF SE in den Zytotoxizitätstest eingesetzt.

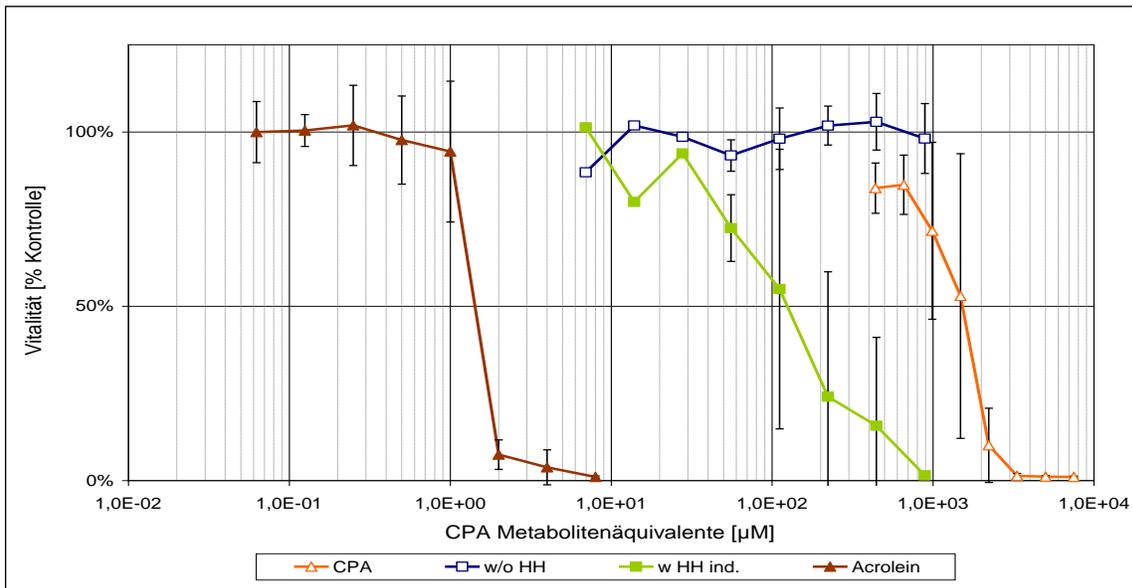


Abbildung 5.18: Konzentrations-Wirkungskurven von CPA-Inkubaten aus Humanhepatozyten im Vergleich mit CPA und Acr im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von CPA (Δ), Acrolein (\blacktriangle), CPA-Inkubate w/o HH für 24h (\square), und CPA-Inkubate w HH, ind. für 24h (\blacksquare). CPA-Ausgangskonzentration in HH: 1 mM ($n = 3$). w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert. Die Inkubate aus Humanhepatozyten (HH) werden an der TUM gewonnen und bei BASF SE in den Zytotoxizitätstest eingesetzt.

Quantitative Analyse der eingesetzten Medien:

Zur Überprüfung der Stabilität von CPA während des Überförungsprozesses werden Konzentrationsbestimmungen aus den Überförungsinkubaten der Rattenhepatozyten durchgeführt. Die Analyse erfolgt durch das Labor „Across Barriers“ (vgl. Kap. 4.2.4.1.1) Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.22 zusammengefasst.

Die Konzentrationen aus den 100 μ M-Inkubaten bestätigen die Ergebnisse aus den Analysen der Hepatozytenüberstände, welche direkt nach der Inkubation asserviert worden sind. Die Wiederfindungen betragen 100 %. Außerdem sind die CPA-Konzentrationen über den Zeitraum des Zytotoxizitätstests konstant. Die Abweichung der Konzentrationen der 1 mM-Inkubate gegenüber den analysierten Konzentrationen direkt nach der Hepatozyteninkubation beträgt im Durchschnitt 20 %. Während der Testperiode kommt es in den Proben „ohne RH“ und „mit RH, ind.“ zu einer weiteren Abnahme um ca. 10 % und in der Probe „mit RH“ zu einer Abnahme um 25 % der CPA-Konzentration.

Tabelle 5.22: Konzentrationsbestimmung von CPA in Überführungsmedien während des 3T3-Zytotoxizitätstests

Zu Beginn des 3T3-Zytotoxizitätstests (d0) wird den Hepatozytenüberständen frisches 3T3-Medium zugesetzt. Der Anteil Hepatozytenüberstand im Testmedium beträgt 44,5 % (v/v). Die Proben werden an Tag 0 und Tag 5 des Zytotoxizitätstests jeweils vor der Inkubation asserviert (n = 1). RH: Rattenhepatozyten.

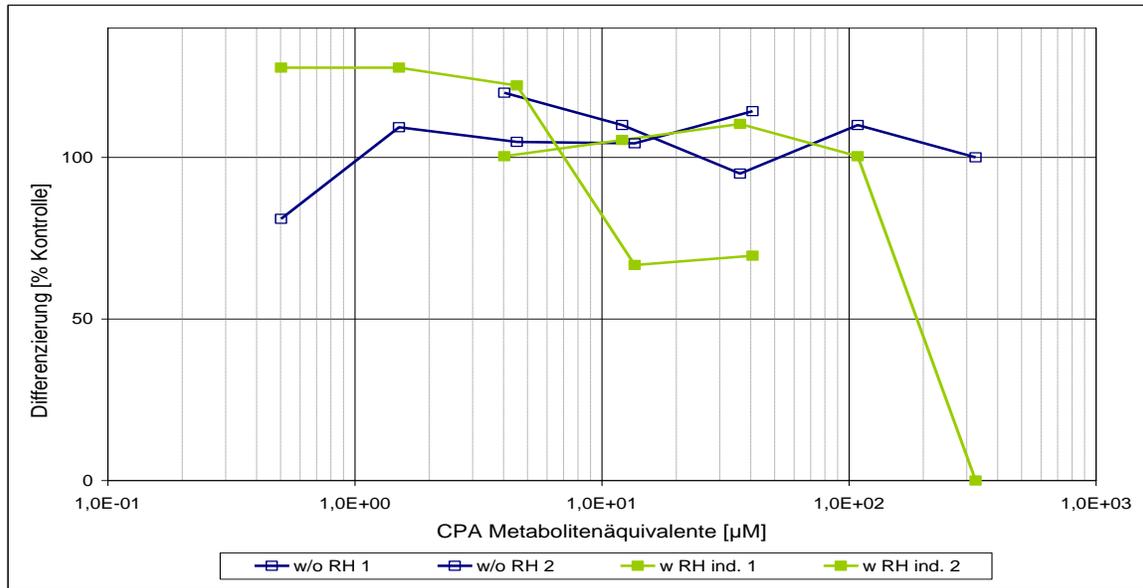
Inkubat	CPA-Konzentration in RH [µM]	Konzentrations-äquivalente im Zytotoxizitätstest [%]	Analysierte Konzentration d0 [µM]	Analysierte Konzentration d5 [µM]
ohne RH	100,0	44,5	32,9	44,8
mit RH	100,0	44,5	19,6	18,9
mit RH, ind.	100,0	44,5	21,6	20,4
ohne RH	1000,0	44,5	308,8	280,1
mit RH	1000,0	44,5	344,6	254,9
mit RH, ind.	1000,0	44,5	241,3	224,6

5.3.2.2 EST: ESZ-D3

In der Kultur primärer Rattenhepatozyten wird 1 mM CPA für 24 Stunden unter induzierten Bedingungen inkubiert. Außerdem werden Inkubationen ohne Hepatozyten durchgeführt. Die Inkubate werden am BfR mit Lösungsmittelüberständen verdünnt und zu 32,6 % (v/v) in den D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest eingesetzt. Die Abbildungen 5.19 a und b zeigen exemplarisch die Konzentrations-Wirkungskurven von zwei unabhängigen Überführungen. Die IC_{50}/ID_{50} -Werte werden in Metabolitenäquivalent-Konzentrationen auf Basis der in Hepatozyten eingesetzten Konzentration angegeben. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um unveröffentlichte Ergebnisse des Kooperationspartners BfR (Seiler, A., Kaltenhäuser, J.)

Im Differenzierungstest zeigt sich eine Abnahme der Ausbildung schlagender Kardiomyozyten unter dem Einfluss des CPA-Rattenhepatozyteninkubats. Der durch eines der Experimente ermittelte ID_{50} -Wert von 218 µM ist um den Faktor 7 gegenüber CPA erniedrigt (Daten nicht gezeigt). Das Inkubat „ohne Zellen“ hat weder einen Einfluss auf die Differenzierung noch auf die Vitalität der ESZ. Das Inkubat „mit Zellen“ führt dagegen zu einer Abnahme der Vitalität. Die IC_{50} -Werte von 98 µM und 32 µM sind um den Faktor 23 respektive 70 gegenüber CPA erniedrigt.

a)



b)

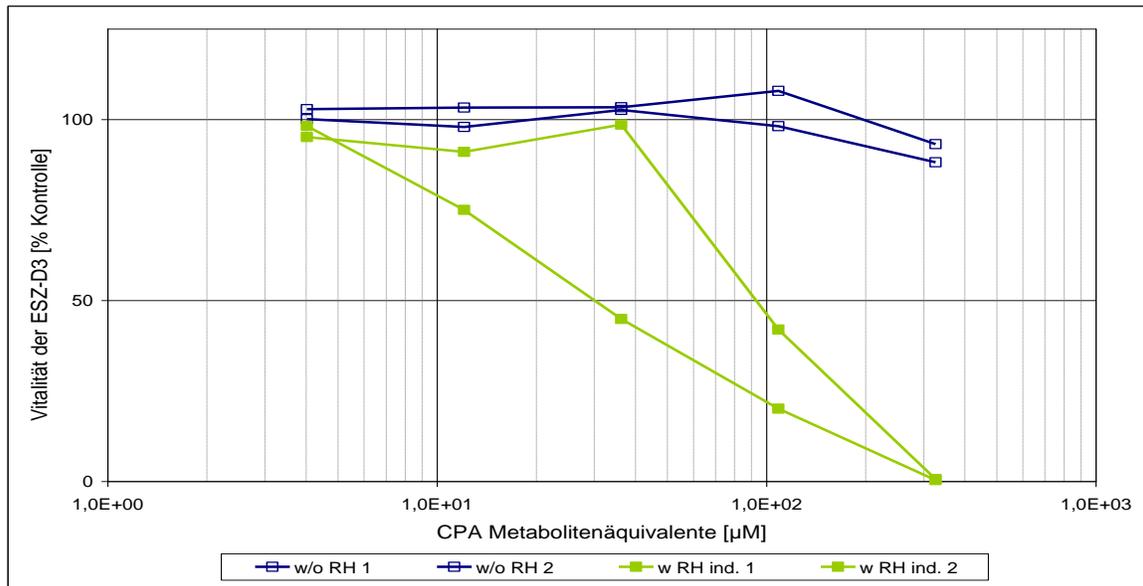


Abbildung 5.19: Konzentrations-Wirkungskurven von CPA-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im ESZ-D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest

Dargestellt ist a) die Differenzierung [% Kontrolle] und b) die Vitalität [% Kontrolle] der ESZ-D3 in Abhängigkeit der Konzentration von zwei CPA-Inkubaten w/o RH für 24h (□) und zwei CPA-Inkubaten w RH, ind. für 24h (■). CPA-Ausgangskonzentration in RH: 1 mM. w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert. Die Inkubate aus Rattenhepatozyten (RH) werden von BASF SE gewonnen und am BfR in den Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest eingesetzt (Seiler, A., Kaltenhäuser, J., unveröffentlichte Daten).

5.3.2.3 WEC

Die Präinkubation von CPA in induzierten Rattenhepatozyten wird in WEC-Medium durchgeführt. Der Überstand wird anschließend zu einem Anteil von 92,5% (v/v) in die WEC eingesetzt. Als inaktive Kontrolle werden Überstände aus Inkubationen ohne Rattenhepatozyten überführt. Die Durchführung und Auswertung erfolgt an der Charité Berlin. Die Konzentrations-Wirkungskurve resultiert aus der Auftragung der Konzentration der CPA-Metabolitenäquivalente gegen die Anzahl dysmorpher Embryonen normiert auf die Kontrolle (vgl. Abbildung 5.20). Außerdem werden folgende Parameter analysiert: Dottersackdurchblutung, TMS, Anzahl der Somiten, Scheitel-Steiß-Länge und Proteingehalt (vgl. Tabelle 5.23).

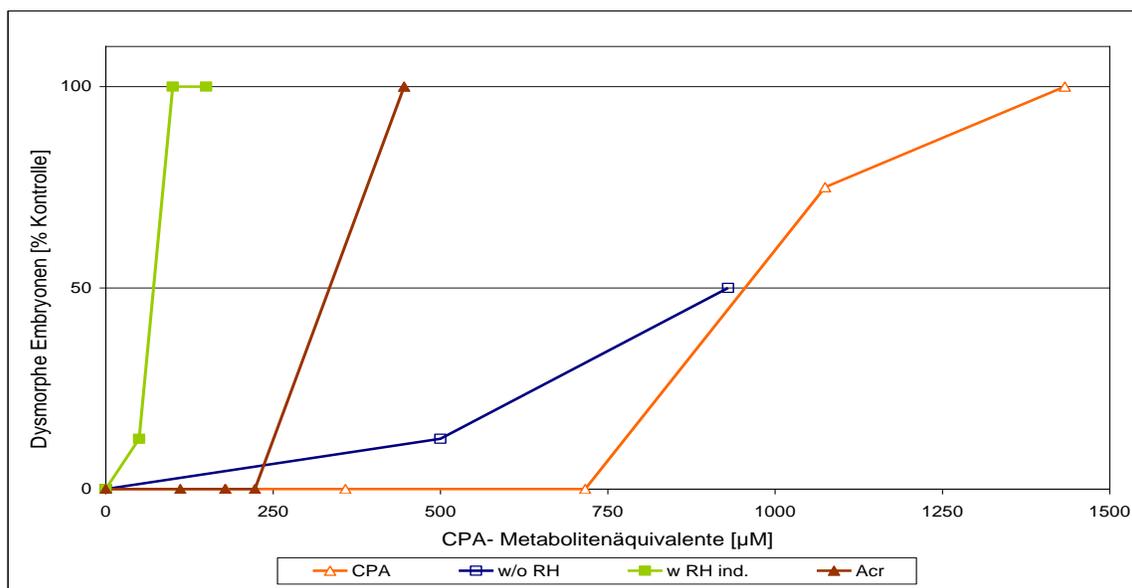


Abbildung 5.20: Konzentrations-Wirkungskurven von CPA-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im Vergleich mit CPA und Acr in der WEC

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungskurven von CPA (Δ), Acr (\blacktriangle), CPA-Inkubate w/o RH für 24h (\square), und CPA-Inkubate w RH, ind. für 24h (\blacksquare). CPA-Ausgangskonzentration in RH: 1 mM ($n = 1$). w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert. Die Inkubate aus Rattenhepatozyten (RH) werden von BASF SE gewonnen und an der Charité Berlin in die WEC eingesetzt.

Die Überführung von CPA-Inkubaten aus Rattenhepatozyten führt in der WEC zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Entwicklung der Embryonen im Vergleich zum inaktiven Inkubat. Sowohl anhand der Anzahl dysmorpher Embryonen (8 von 8) als auch der morphologischen Parameter TMS und der Anzahl der Somiten ist eine signifikante Zunahme des embryotoxischen Effekts ab einer Konzentration von 100 μM CPA-

Äquivalenten zu beobachten. Die höchste eingesetzte Konzentration von 150 μM führt zu einer signifikanten Abnahme der Parameter Dottersackdurchblutung, TMS, Somitenanzahl, Scheitel-Steiß-Länge und Proteingehalt. Alle Embryonen weisen morphologische Anomalien auf. Anhand der Anzahl dysmorpher Embryonen wird außerdem deutlich, dass das embryotoxische Potential des Hepatozyteninkubats größer ist als das des Referenzmetaboliten Acr. Das inaktive Inkubat führt hinsichtlich der Anzahl dysmorpher Embryonen und der morphologischen Parameter zu einem mit reinem CPA vergleichbaren Ergebnis.

Tabelle 5.23: Embryotoxizitätsparameter nach der Überführung von CPA-Inkubaten aus Rattenhepatozyten in die WEC

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus der Überführung von Rattenhepatozyteninkubaten (RH) ($n = 1$). w: mit RH, induziert, w/o: ohne RH. Die Inkubate aus Rattenhepatozyten (RH) werden von BASF SE gewonnen und an der Charité Berlin in die WEC eingesetzt.

CPA (μM)	Anzahl Embryonen	Dottersackdurchblutung	TMS	Anzahl Somiten	Scheitel-Steiß-Länge [mm]	Proteingehalt ($\mu\text{g}/\text{Embryo}$)	Anzahl dysmorpher Embryonen
0							
w	8	$2,88 \pm 0,35$	$37,0 \pm 0,9$	$25,5 \pm 1,1$	$2,99 \pm 0,26$	$125,6 \pm 31,7$	0
RH							
50							
w	8	$3,00 \pm 0,00$	$34,4 \pm 1,5$	$26,0 \pm 0,6$	$3,17 \pm 0,25$	$137,3 \pm 25,8$	1
RH			**				
100							
w	8	$2,00 \pm 0,93$	$29,3 \pm 2,5$	$21,3 \pm 2,3$	$2,91 \pm 0,28$	$110,3 \pm 30,4$	8
RH		*	**	*			**
150							
w	8	$1,00 \pm 0,00$	$17,6 \pm 2,6$	n.d.	$2,05 \pm 0,43$	$45,0 \pm 26,3$	8
RH		**	**		**	**	**
500							
w/o	8	$2,75 \pm 0,71$	$35,5 \pm 1,4$	$25,1 \pm 0,9$	$2,87 \pm 0,17$	$106,5 \pm 27,0$	1
RH			*				
930							
w/o	6	$2,50 \pm 0,55$	$33,0 \pm 3,2$	$25,0 \pm 0,7$	$2,89 \pm 0,18$	$107,9 \pm 22,7$	2
RH			**				

Scheitel-Steiß-Länge und Proteingehalt: Einfacher ANOVA und Dunnett-T3 Post Hoc Test; TMS, Somitenzahl: Mann-Whitney-U-Test; Dottersackdurchblutung: Kruskal-Wallis-Test; Anzahl dysmorpher Embryonen: Exakter Fisher-Test; *: $p < 0,05$ und **: $p < 0,01$; n.d.: nicht bestimmbar.

5.3.2.4 Übersicht der Ergebnisse aus den CPA-Inkubatüberführungen

In Tabelle 5.24 sind die IC_{50} -Werte aus den Überführungen der CPA-Inkubate der eingesetzten Hepatozytenspezies in den 3T3-Zytotoxizitätstest zusammengefasst. Es zeigt sich, dass eine signifikante Zunahme der Zytotoxizität durch die Inkubate nachgewiesen werden kann. Die Schweinehepatozyten weisen die größte Kapazität der metabolischen Aktivierung von CPA auf, gefolgt von Ratten- und Humanhepatozyten. Schweine- und Humanhepatozyten weisen vergleichsweise hohe Variabilitäten auf. Ein signifikanter Unterschied der IC_{50} -Werte durch Überstände aus der basalen Rattenhepatozytenkultur im Vergleich zur induzierten Kultur besteht nicht.

Im Differenzierungstest in ESZ-D3 wird eine abnehmende Tendenz der Ausbildung schlagender Kardiomyozyten durch das aktive CPA-Inkubat beobachtet. Die Zytotoxizität nimmt unter den gewählten Bedingungen im Vergleich zu CPA und zum inaktiven Inkubat zu. Somit kann eine metabolische Aktivierung von CPA durch Präinkubation in Rattenhepatozyten in den Zielkulturen des EST unter den gewählten Kultur- und Überführungsbedingungen gezeigt werden.

Eine metabolische Aktivierung von CPA durch Rattenhepatozyten kann in der WEC ebenfalls nachgewiesen werden. Bei einer Metabolitenäquivalent-Konzentration von 150 μM sind alle analysierten Parameter signifikant erniedrigt. Unter den Versuchsbedingungen hat das inaktive Inkubat keinen Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen.

Tabelle 5.24: Zusammenfassung der IC_{50} -Werte aus der Überführung von CPA-Inkubaten in den 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der graphisch ermittelten IC_{50} -Werte aus dem 3T3-Zytotoxizitätstest an Tag 7. RH: Rattenhepatozyten, PH: Schweinehepatozyten und HH: Humanhepatozyten. Die Inkubate aus RH und PH sowie das 1 mM-Inkubat aus HH führen zu einer signifikanten Erniedrigung des IC_{50} -Wertes im Vergleich zu CPA. w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert.

Inkubat	RH	PH	HH
0,1 mM w/o H	> 44,5 μM	> 22,3 μM	
0,1 mM w H	15,0 \pm 2,8 μM **		
0,1 mM w H, ind.	11,3 \pm 3,9 μM **	2,8 \pm 2,4 μM **	
1 mM w/o H	> 445,0 μM	> 222,5 μM	> 890,0 μM
1 mM w H	38,8 \pm 2,3 μM **		
1 mM w H ind.	39,2 \pm 8,5 μM **	23,2 \pm 21,2 μM **	194,7 \pm 141,4 μM *

*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$ (t-Test nach Student)

5.3.3 Albendazol

5.3.3.1 EST: 3T3-Fibroblasten

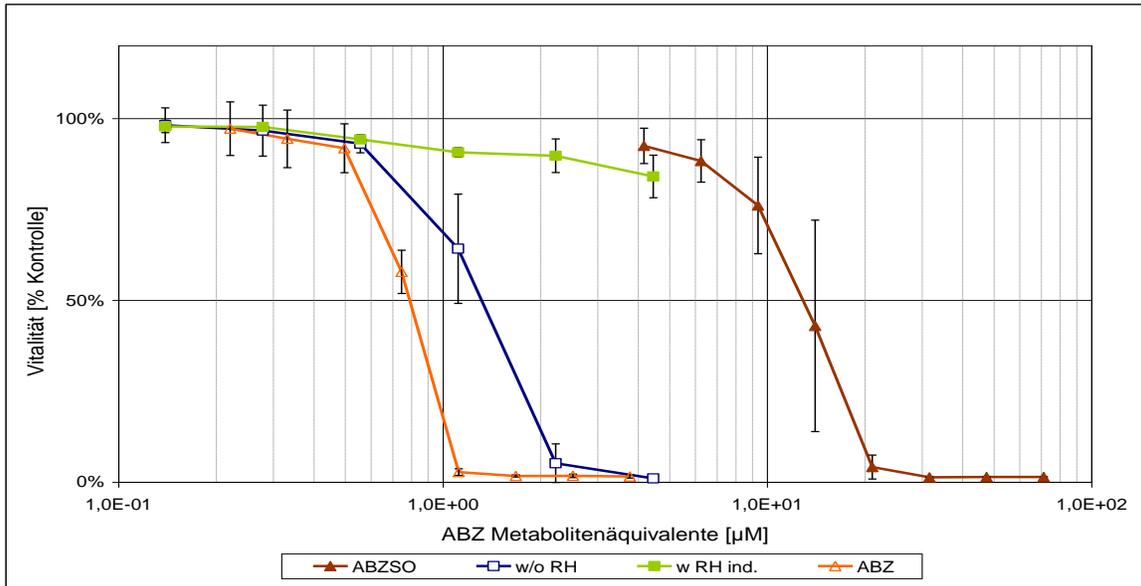
In der Kultur primärer Ratten- und Schweinehepatozyten werden 10 und 25 μM ABZ für 24 Stunden unter induzierten Bedingungen inkubiert. In induzierten Humanhepatozyten werden 25 μM ABZ ebenfalls für 24 Stunden inkubiert („aktive Inkubate“). Als inaktive Kontrolle werden jeweils Inkubationen ohne Hepatozyten durchgeführt. Die Inkubate werden mit Lösungsmittelüberständen verdünnt und zu 44,5 % (v/v, RH), 22,3 % (v/v, PH) und 89,1 % (v/v, HH) in den 3T3-Zytotoxizitätstest eingesetzt. Die von drei unabhängigen Überführungen resultierenden Konzentrations-Wirkungskurven im Vergleich zu ABZ und ABZSO sind in den Abbildungen 5.21 (RH), 5.22 (PH) und 5.23 (HH) dargestellt. Die IC_{50} -Werte werden in Metabolitenäquivalent-Konzentrationen auf Basis der in Hepatozyten eingesetzten Konzentration angegeben.

Bei dem metabolischen Umsatz von ABZ handelt es sich um eine Deaktivierungsreaktion (vgl. Kap. 5.2.2). Diese kann durch die Präinkubation von ABZ in der Kultur von Rattenhepatozyten nachgewiesen werden. Unter den gewählten Umständen haben die Medienüberstände aus den aktiven Inkubationen keinen Einfluss auf die Vitalität der 3T3-Zellen. Die IC_{50} -Werte sind $> 4,5 \mu\text{M}$ (10 μM -Inkubat) und $> 11,1 \mu\text{M}$ (25 μM -Inkubat). Daraus resultiert eine Erhöhung der IC_{50} -Werte um Faktor > 7 bzw. > 17 verglichen mit ABZ. Die aus den inaktiven Inkubaten resultierenden IC_{50} -Werte betragen $1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (10 μM -Inkubat) und $2,9 \pm 1,0 \mu\text{M}$ (25 μM -Inkubat). Sie liegen damit um den Faktor 2 bzw. 5 höher als der IC_{50} -Wert des reinen ABZ.

Die Präinkubation von ABZ in Schweinehepatozyten führt ebenfalls zu einer Erniedrigung der Zytotoxizität im Vergleich zu den Inkubaten ohne Zellen. Das 10 μM -Inkubat aus der aktiven Inkubation hat keinen Einfluss auf die Vitalität der 3T3-Zellen, der IC_{50} -Wert ist $> 2,3 \mu\text{M}$. Daraus folgt eine Erhöhung des IC_{50} -Wertes um den Faktor $> 3,5$. Der metabolische Umsatz von 25 μM ABZ unterliegt großen Schwankungen. Für diese Inkubate kann ein IC_{50} -Wert von $3,0 \pm 1,5 \mu\text{M}$ ermittelt werden, welcher um den Faktor 5 gegenüber reinem ABZ erhöht ist. Der Unterschied ist nicht signifikant. Die metabolische Deaktivierung von 25 μM ABZ ist in Schweinehepatozyten kleiner als in Rattenhepatozyten (IC_{50} : $3,0 \mu\text{M}$ vs. $> 11,1 \mu\text{M}$). Die aus der Überführung der inaktiven Überstände resultierenden IC_{50} -Werte betragen $0,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (10 μM -Inkubat) und $1,9 \pm 2,1 \mu\text{M}$ (25 μM -Inkubat) und sind mit ABZ vergleichbar.

Die Überführung des aktiven Inkubats aus Humanhepatozyten führt zu einer signifikanten Erhöhung des IC_{50} -Wertes um den Faktor 28 im Vergleich zu ABZ. Der IC_{50} -Wert beträgt $18,0 \pm 7,3 \mu\text{M}$. Aufgrund der beobachteten Variabilitäten des metabolischen Umsatzes von ABZ kann kein signifikanter Unterschied zwischen dem Inkubat mit und ohne Zellen festgestellt werden. Der IC_{50} -Wert aus dem inaktiven Inkubat beträgt $4,1 \pm 2,1 \mu\text{M}$ und ist gegenüber ABZ 7fach erhöht.

a)



b)

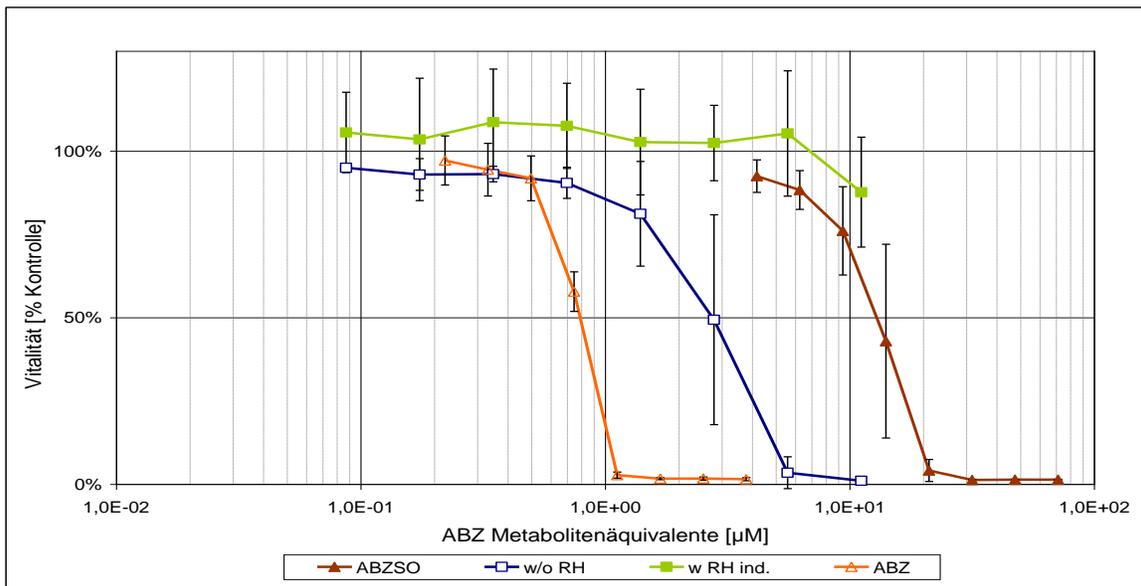
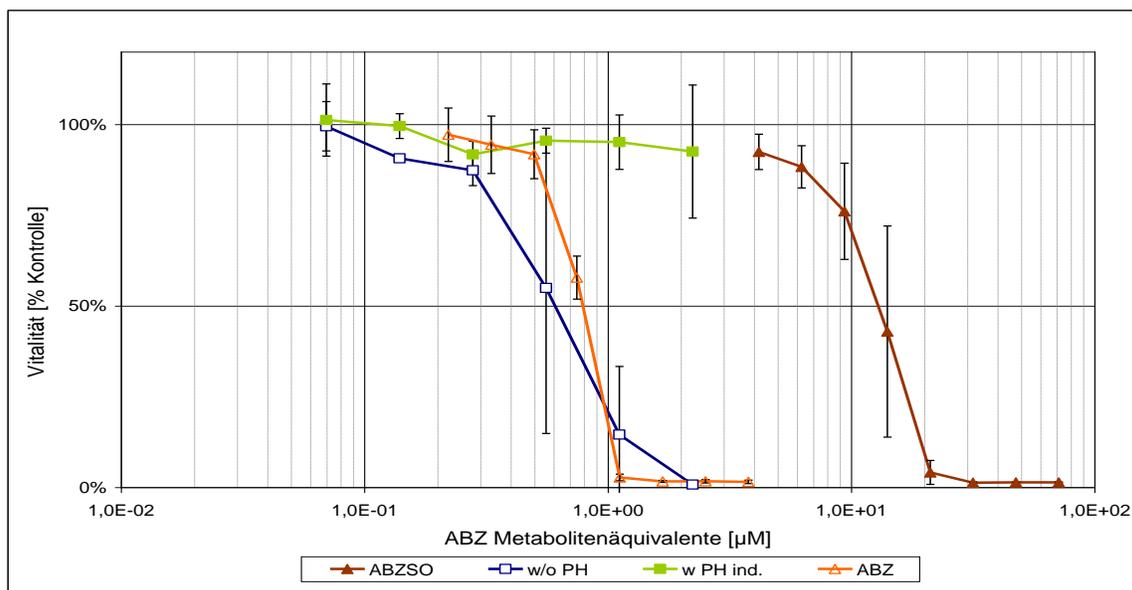


Abbildung 5.21: Konzentrations-Wirkungskurven von ABZ-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im Vergleich mit ABZ und ABZSO im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von ABZ (Δ), ABZSO (\blacktriangle), ABZ-Inkubate w/o RH für 24h (\square), und ABZ-Inkubate w RH, ind. für 24h (\blacksquare). ABZ-Ausgangskonzentration in RH a) 10 μ M (n = 3) und b) 25 μ M (n = 3). w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert, RH: Rattenhepatozyten.

a)



b)

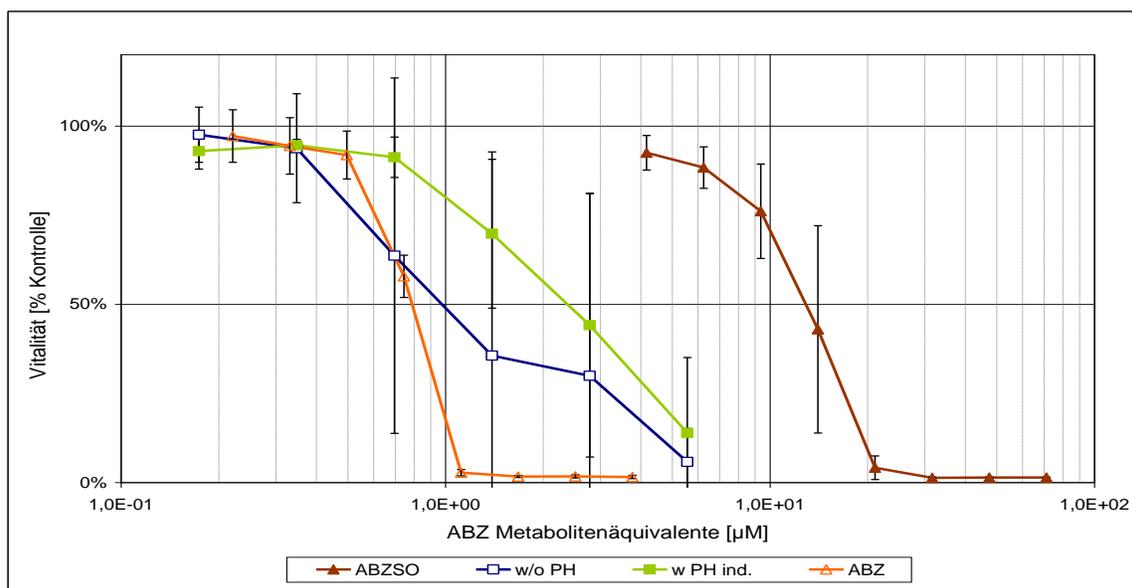


Abbildung 5.22: Konzentrations-Wirkungskurven von ABZ-Inkubaten aus Schweinehepatozyten im Vergleich mit ABZ und ABZSO im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von ABZ (Δ), ABZSO (\blacktriangle), ABZ-Inkubate w/o PH für 24h (\square), und ABZ-Inkubate w PH, ind. für 24h (\blacksquare). ABZ-Ausgangskonzentration in PH a) 10 μ M ($n = 2$) und b) 25 μ M ($n = 3$). w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert. Die Inkubate aus Schweinehepatozyten (PH) werden an der MLU gewonnen und bei BASF SE in den Zytotoxizitätstest eingesetzt.

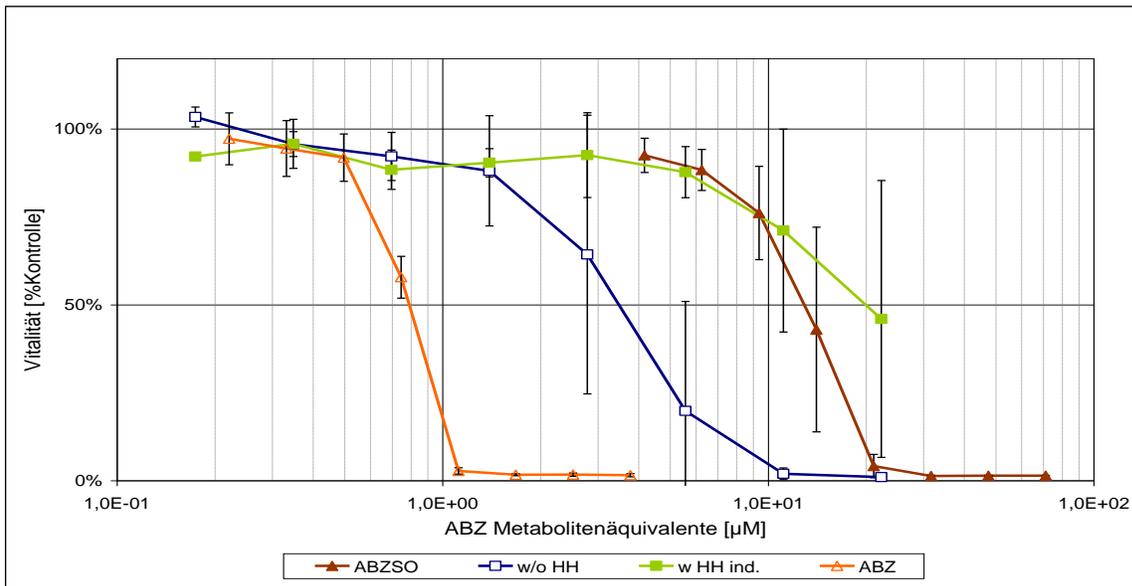


Abbildung 5.23: Konzentrations-Wirkungskurven von ABZ-Inkubaten aus Humanhepatozyten im Vergleich mit ABZ und ABZSO im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von ABZ (Δ), ABZSO (\blacktriangle), ABZ-Inkubate w/o HH für 24h (\square), und ABZ-Inkubate w HH, ind. für 24h (\blacksquare). ABZ-Ausgangskonzentration in HH: 25 μ M ($n = 3$). w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert. Die Inkubate aus Humanhepatozyten (HH) werden an der TUM gewonnen und bei BASF SE in den Zytotoxizitätstest eingesetzt.

Quantitative Analyse der eingesetzten Medien:

Zur Überprüfung der Stabilität von ABZ und ABZSO während des Überföhrungsprozesses werden Konzentrationsbestimmungen aus den Überföhrungsinkubaten der Rattenhepatozyten vom Zentrallabor deutscher Apotheker nach Kap. 4.2.4.1.2 durchgeföhrt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.25 zusammengefasst.

Die ABZ-Konzentrationen liegen im Durchschnitt 20 bis 30 % über den analysierten Konzentrationen direkt nach der Hepatozyteninkubation und bleiben konstant über den Zeitraum des Zytotoxizitätstests. Im Fall des 25 μ M ABZ-Inkubats ohne Zellen liegt die analysierte Konzentration an Tag 0 20 % unter und an Tag 5 30 % über der zu erwartenden Konzentration. Eine höhere Löslichkeit von ABZ in serumhaltigem Medium wurde bereits bei den WEC-Medium- und Leberschnittproben beobachtet (vgl. Kap. 5.1.5.2). Die ABZSO-Konzentration ist während der gesamten Testperiode stabil. Die Wiederfindung bezogen auf die Konzentration im Hepatozyteninkubat beträgt 100 %. Es kann weder in den Proben „ohne Zellen“ ABZSO, noch in den Proben aus induzierten Hepatozyten ABZ nachgewiesen werden.

Tabelle 5.25: Konzentrationsbestimmung von ABZ und ABZSO in Überführungsmedien während des 3T3-Zytotoxizitätstests

Zu Beginn des 3T3-Zytotoxizitätstests (d0) wird den Hepatozytenüberständen frisches 3T3-Medium zugesetzt. Der Anteil Hepatozytenüberstand im Testmedium beträgt 44,5 % (v/v). Die Proben werden an Tag 0 und Tag 5 des Zytotoxizitätstests jeweils vor der Inkubation asserviert (n = 1). RH: Rattenhepatozyten, n.n.: nicht nachweisbar.

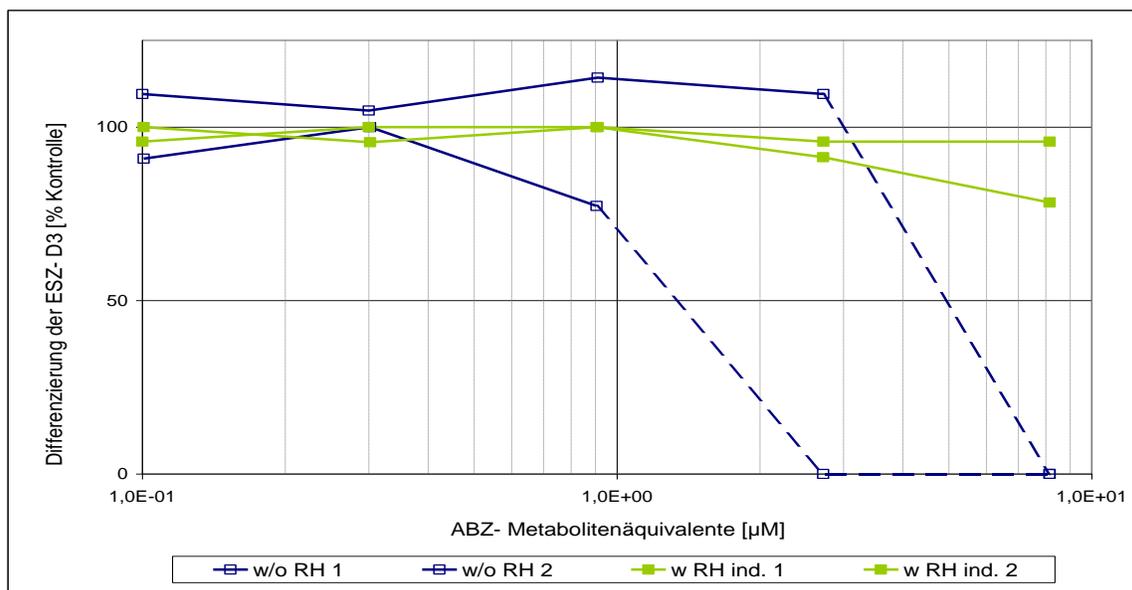
Inkubat	ABZ-Konzentration in RH [μM]	Konzentrations-äquivalente im Zytotoxizitätstest [%]	Analysierte Konzentration d0 [μM]		Analysierte Konzentration d5 [μM]	
			ABZ	ABZSO	ABZ	ABZSO
ohne RH	10,0	44,5	2,0	n.n.	2,2	n.n.
mit RH, ind.	10,0	44,5	n.n.	3,2	n.n.	3,1
ohne RH	25,0	44,5	3,0	n.n.	4,7	n.n.
mit RH, ind.	25,0	44,5	n.n.	7,7	n.n.	8,0

5.3.3.2 EST: ESZ-D3

In der Kultur primärer Rattenhepatozyten werden 25 μM ABZ für 24 Stunden unter induzierten Bedingungen inkubiert. Als Kontrolle werden Inkubationen ohne Hepatozyten durchgeführt. Die Inkubate werden am BfR mit Lösungsmittelüberständen verdünnt und zu 32,6 % (v/v) in den D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest eingesetzt. Die Abbildungen 5.24 a und b zeigen exemplarisch die Konzentrations-Wirkungskurven von zwei unabhängigen Überführungen. Die IC_{50} -Werte werden in Metabolitenäquivalent-Konzentrationen auf Basis der in Hepatozyten eingesetzten Konzentration angegeben. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um unveröffentlichte Ergebnisse des Kooperationspartners BfR (Seiler, A., Kaltenhäuser, J.)

Die höchste ABZ-Konzentration im inaktiven Inkubat führt im Differenzierungstest zum Absterben der EBs, sodass sich keine schlagenden Kardiomyozyten ausbilden (gestrichelte Linie). Im Zytotoxizitätstest wird eine Abnahme der Vitalität der ESZ-D3 beobachtet. Die IC_{50} -Werte betragen 1,7 μM und 2,0 μM . Das aktive Inkubat dagegen hat im gewählten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Differenzierung und Vitalität der ESZ-D3. Die IC_{50} - bzw. ID_{50} -Werte sind jeweils $> 8,2 \mu\text{M}$. Sowohl im Differenzierungs- als auch im Zytotoxizitätstest kann somit eine metabolische Deaktivierung von ABZ durch die Präinkubation in primären Rattenhepatozyten nachgewiesen werden.

a)



b)

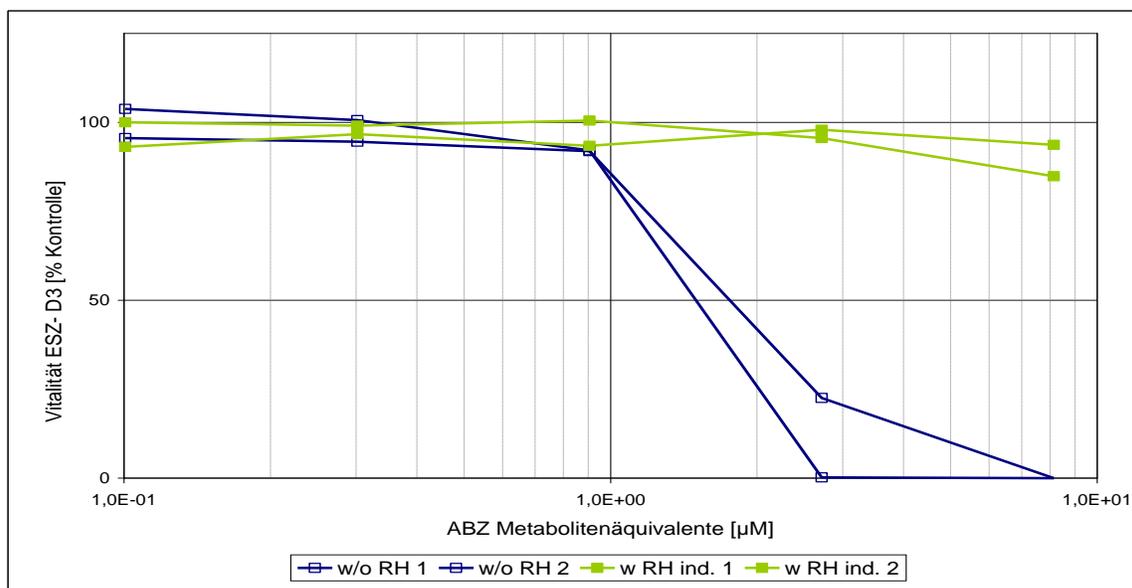


Abbildung 5.24: Konzentrations-Wirkungskurven von ABZ-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im ESZ-D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest

Dargestellt ist a) die Differenzierung [% Kontrolle] und b) die Vitalität [% Kontrolle] der ESZ-D3 in Abhängigkeit der Konzentration der ABZ-Inkubate w/o RH für 24h (□) und der ABZ-Inkubate w RH, ind. für 24h (■). Die gestrichelte Linie in Abb. a weist darauf hin, dass bei dieser Konzentration alle EBs bereits abgestorben sind. ABZ-Ausgangskonzentration in RH: 25 µM. w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert. Die Inkubate aus Rattenhepatozyten (RH) werden von BASF SE gewonnen und am BfR in den Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest eingesetzt (Seiler, A., Kaltenhäuser, J., unveröffentlichte Daten).

5.3.3.3 WEC

Die Präinkubation von ABZ in induzierten Rattenhepatozyten wird in WEC-Medium durchgeführt und anschließend zu einem Anteil von 92,5 % (v/v) in die WEC eingesetzt. Zur Kontrolle werden außerdem Inkubate ohne Rattenhepatozyten überführt. Die Durchführung und Auswertung erfolgt an der Charité Berlin. Die Konzentrations-Wirkungskurve resultiert aus der Auftragung der Konzentration der ABZ-Metabolitenäquivalente gegen die Anzahl dysmorpher Embryonen normiert auf die Kontrolle (vgl. Abbildung 5.25). Außerdem werden folgende Parameter analysiert: Dottersackdurchblutung, TMS, Anzahl der Somiten, Scheitel-Steiß-Länge und Proteingehalt (vgl. Tabelle 5.26).

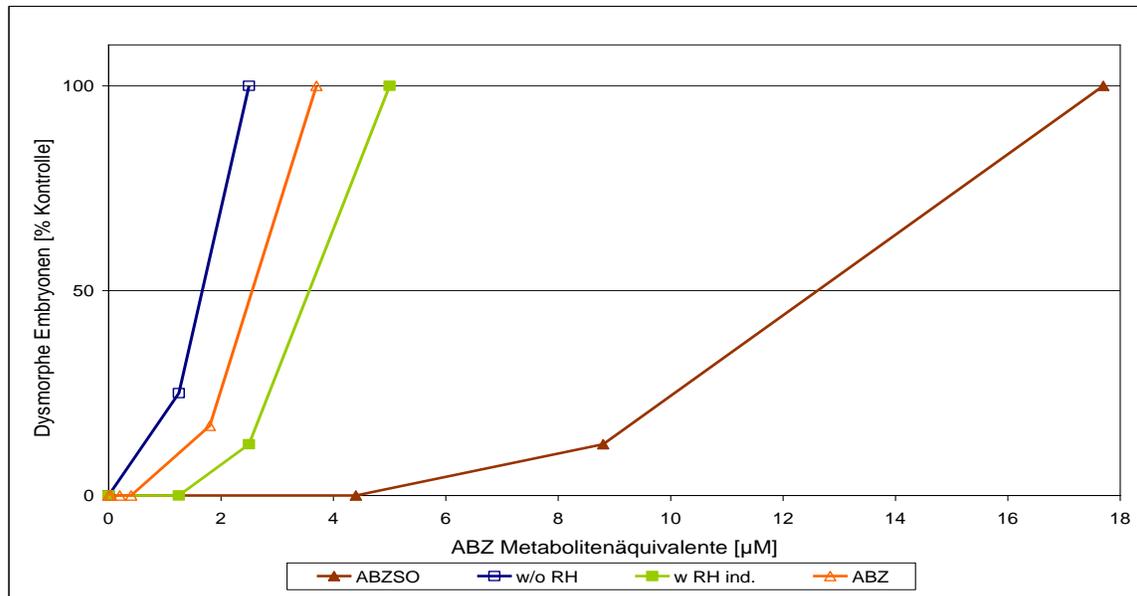


Abbildung 5.25: Konzentrations-Wirkungskurven von ABZ-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im Vergleich mit ABZ und ABZSO in der WEC

Exemplarisch dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungskurven von ABZ (Δ), ABZSO (\blacktriangle), ABZ-Inkubate w/o RH für 24h (\square), und ABZ-Inkubate w RH, ind. für 24h (\blacksquare). ABZ-Ausgangskonzentration in RH: 10 μM ($n = 1$). w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert, RH: Rattenhepatozyten. Die Inkubate aus Rattenhepatozyten (RH) werden von BASF SE gewonnen und an der Charité Berlin in die WEC eingesetzt.

Die Präinkubation von 25 μM ABZ in primären Rattenhepatozyten führt in der WEC zu einer Abnahme der embryotoxischen Effekte. Bei einer Konzentration von 2,5 μM ABZ-Äquivalenten weisen durch das aktive Inkubat 1 von 8 Embryonen abnorme Entwicklungen auf. Die morphologischen Parameter und der Proteingehalt sind mit der Kontrolle vergleichbar. Hingegen sind durch das inaktive Inkubat bei gleicher Konzentration alle

Embryonen geschädigt und die Dottersackdurchblutung, der TMS, die Anzahl der Somiten, die Scheitel-Steiß-Länge und der Proteingehalt sind signifikant reduziert. Ab einer Konzentration von 5 μM ABZ-Metabolitenäquivalente im aktiven Inkubat sind alle Embryonen geschädigt. Eine signifikante Abnahme der morphologischen Parameter und des Proteingehalts wird beobachtet.

Tabelle 5.26: Embryotoxizitätsparameter nach der Überführung von ABZ-Inkubaten aus Rattenhepatozyten in die WEC

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus der Überführung von Rattenhepatozyteninkubaten (RH) w: mit RH, induziert, w/o: ohne RH, *: $p < 0,05$ und **: $p < 0,01$

ABZ (μM)	Anzahl Embryonen	Dottersack-durchblutung	TMS	Anzahl Somiten	Scheitel-Steiß-Länge [mm]	Proteingehalt ($\mu\text{g}/\text{Embryo}$)	Anzahl dysmorpher Embryonen
0	8	2,75 \pm 0,71	36,5 \pm 2,1	25,9 \pm 1,4	3,06 \pm 0,30	141,9 \pm 31,1	0
1,25 w RH	8	3,00 \pm 0,00	34,6 \pm 3,6	25,9 \pm 1,1	3,03 \pm 0,25	146,4 \pm 30,1	0
2,5 w RH	8	3,00 \pm 0,00	35,4 \pm 4,4	25,8 \pm 1,0	3,00 \pm 0,33	141,0 \pm 33,2	1
5,0 w RH	8	1,00 \pm 0,00 **	22,1 \pm 2,1 **	22,3 \pm 0,6 *	2,55 \pm 0,31 *	78,3 \pm 19,1 **	8 **
1,25 w/o RH	8	2,13 \pm 0,64 **	31,0 \pm 6,0	25,8 \pm 1,3	2,98 \pm 0,40	133,0 \pm 39,7	2
2,5 w/o RH	8	1,00 \pm 0,00 **	14,0 \pm 4,6 **	n.d.	2,22 \pm 0,49 **	54,6 \pm 16,4 **	8 **

Scheitel-Steiß-Länge und Proteingehalt: Einfacher ANOVA und Dunnett-T3 Post Hoc Test; TMS, Somitenzahl: Mann-Whitney-U-Test; Dottersackdurchblutung: Kruskal-Wallis-Test; Anzahl dysmorpher Embryonen: Exakter Fisher-Test; *: $p < 0,05$ und **: $p < 0,01$; n.d.: nicht bestimmbar.

5.3.3.4 Übersicht der Ergebnisse aus den ABZ-Inkubatüberführungen

Die IC_{50} -Werte aus der Überführung von ABZ-Inkubaten der drei Hepatozytenspezies in den 3T3-Zytotoxizitätstest sind in Tabelle 5.27 zusammengefasst. Eine Erniedrigung der Zytotoxizität kann durch alle drei Hepatozytenspezies erreicht werden. Für die 25 μM -Inkubate aus Schweine- und Humanhepatozyten ist sie aufgrund beobachteter Variabilitäten der Umsätze nicht signifikant. Die Inkubation mit dem Induktionscocktail führt ähnlich wie bei CPA nicht zu einem signifikanten Unterschied der Zytotoxizität im Vergleich zur unbehandelten Hepatozytenkultur. Die Variabilität in der Vitalität der 3T3-Zellen durch inaktive Inkubate spiegelt die variierenden Wiederfindungen von 25 μM ABZ in den

Konzentrationsbestimmungen wider (vgl. Kap. 5.1.5.2). Die Überführung der aktiven ABZ-Inkubate aus der induzierten Rattenhepatozytenkultur in die ESZ-D3-Kultur führt darüber hinaus zur Abnahme der Differenzierungsinhibition und der Zytotoxizität im Vergleich zum inaktiven Inkubat. Die metabolische Deaktivierung von ABZ durch die Präinkubation in Rattenhepatozyten kann in der WEC ebenfalls nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 2,5 µM Metabolitenäquivalente im aktiven Inkubat werden der Kontrolle vergleichbare Ergebnisse erreicht. Hingegen weisen bei gleicher Konzentration im inaktiven Inkubat alle Embryonen morphologische Anomalien auf.

Tabelle 5.27: Zusammenfassung der IC₅₀-Werte aus der Überführung von ABZ-Inkubaten in den 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD der graphisch ermittelten IC₅₀-Werte aus dem 3T3-Zytotoxizitätstest an Tag 7. RH: Rattenhepatozyten, PH: Schweinehepatozyten und HH: Humanhepatozyten. w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert.

Inkubat	RH	PH	HH
10 µM w/o H	1,3 ± 0,2 µM	0,7 ± 0,3 µM	
10 µM w H	> 4,5 µM		
10 µM w H, ind.	> 4,5 µM	> 2,2 µM	
25 µM w/o H	2,9 ± 1,0 µM	1,9 ± 2,1 µM	4,1 ± 2,1 µM
25 µM w H	> 11,1 µM		
25 µM w H ind.	> 11,1 µM	3,0 ± 1,5 µM	18,0 ± 7,3 µM

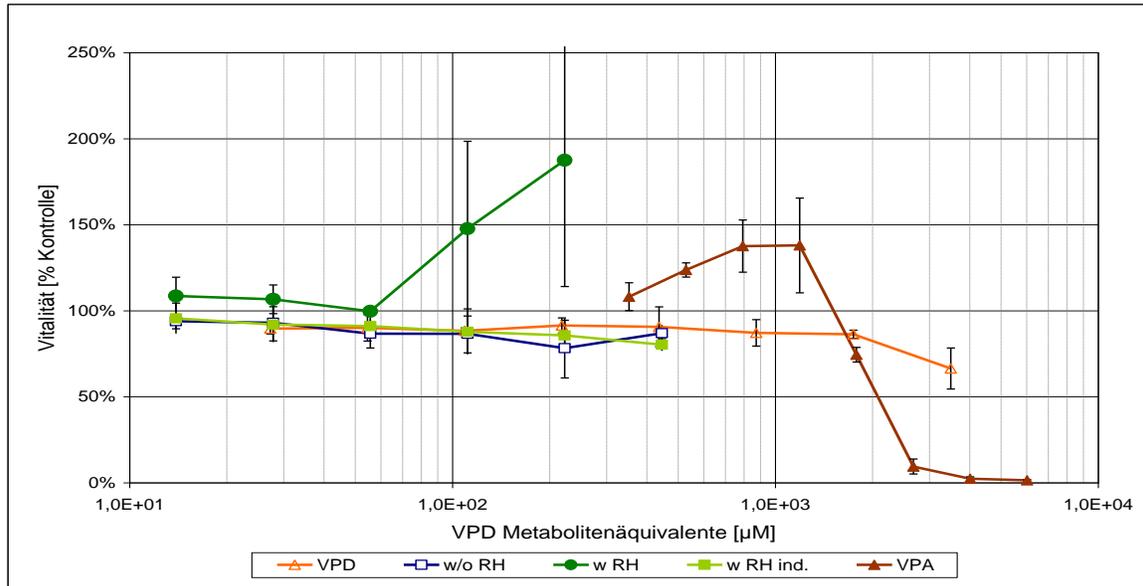
5.3.4 Valpromid

5.3.4.1 EST: 3T3-Fibroblasten

In der Kultur primärer Ratten- und Schweinehepatozyten werden 4 mM VPD für 24 Stunden sowohl unter basalen als auch unter induzierten Bedingungen inkubiert. In Rattenhepatozyten erfolgt zusätzlich die Inkubation von 1 mM VPD („aktive Inkubate“). Als inaktive Kontrolle dienen jeweils die Inkubationen ohne Hepatozyten. Die Inkubate werden mit Lösungsmittelüberständen verdünnt und zu 44,5 % (v/v, RH) und 22,3 % (v/v, PH) in den 3T3-Zytotoxizitätstest eingesetzt. Die von je zwei bzw. drei unabhängigen Überführungen resultierenden Konzentrations-Wirkungskurven im Vergleich zu VPD und VPA sind in den Abbildungen 5.26 (RH) und 4.27 (PH) dargestellt. Die IC_{50} -Werte werden in Metabolitenäquivalent-Konzentrationen auf Basis der in Hepatozyten eingesetzten Konzentration angegeben.

Die Überführung der Inkubate aus Ratten- und Schweinehepatozyten in den Zytotoxizitätstest beeinflusst die Vitalität der 3T3-Zellen nicht. Die IC_{50} -Werte liegen sowohl für das inaktive als auch für das aktive Inkubat oberhalb der maximal durch diese Methode erreichbaren Konzentration von 1,8 mM (RH) bzw. 0,9 mM (PH). Eine metabolische Aktivierung von VPD kann unter den gewählten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Dennoch wird ein Unterschied zwischen den Überständen aus der basalen und der induzierten Rattenhepatozytenkultur beobachtet: Ab einer Konzentration von ca. 0,1 mM VPD-Äquivalenten steigt unter basalen Bedingungen die Vitalität der Zellen formal auf 150 bis 200 % der Kontrolle an. Der Anstieg auf Werte oberhalb der Kontrolle wird bei Konzentrationen von ca. 1 mM reinem VPA ebenfalls nachgewiesen. Unter induzierten Bedingungen tritt dieser Effekt nicht auf. Ein mit dem Überstand aus der basalen Rattenhepatozytenkultur vergleichbarer Anstieg der Vitalität über 100 % der Kontrolle wird durch das analoge Inkubat aus Schweinehepatozyten nicht beobachtet.

a)



b)

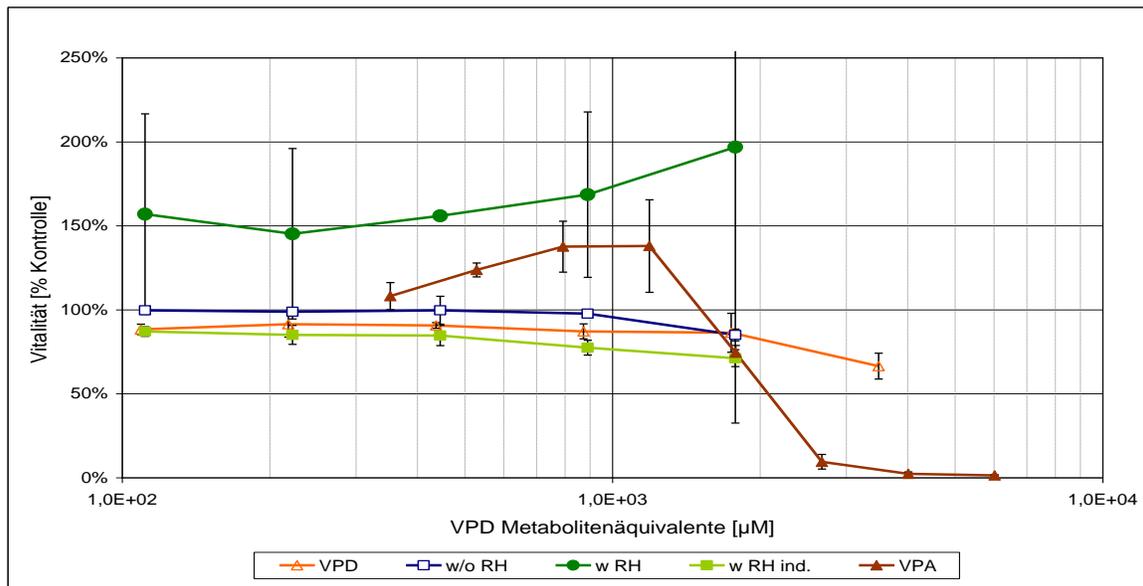


Abbildung 5.26: Konzentrations-Wirkungskurve von VPD-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im Vergleich zu VPD und VPA im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von VPD (Δ), VPA (\blacktriangle), VPD-Inkubate w/o RH für 24h (\square), VPD-Inkubate w RH für 24h (\bullet) und VPD-Inkubate w RH, ind. für 24h (\blacksquare). VPD-Ausgangskonzentration in RH a) 1 mM ($n = 2$) und b) 4 mM ($n = 2$). w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert, RH: Rattenhepatozyten.

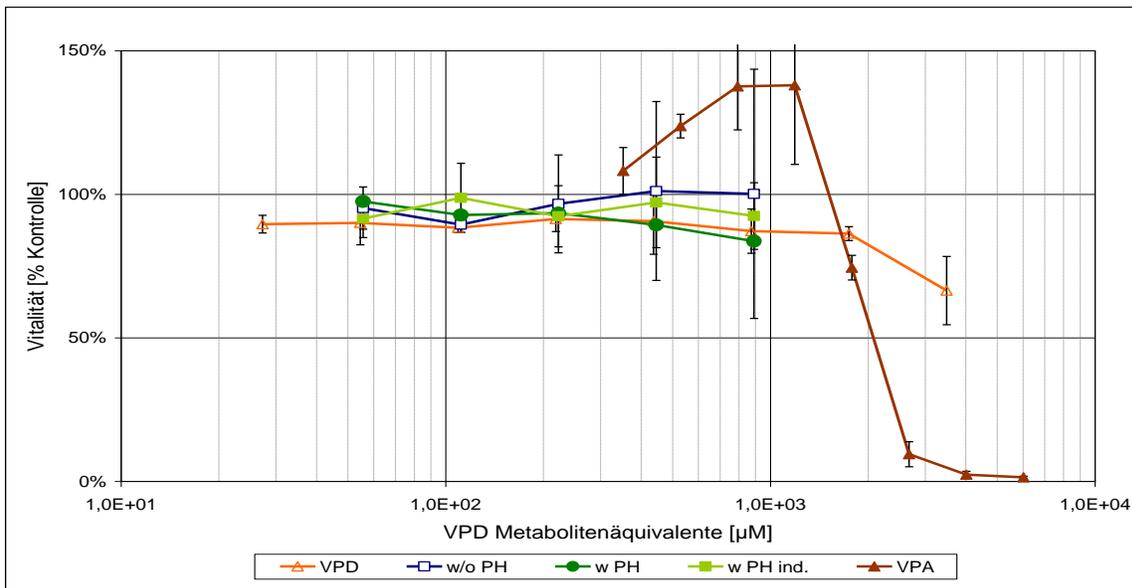


Abbildung 5.27: Konzentrations-Wirkungskurve von VPD-Inkubaten aus Schweinehepatozyten im Vergleich zu VPD und VPA im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von VPD (Δ), VPA (\blacktriangle), VPD-Inkubate w/o PH für 24h (\square), VPD-Inkubate w PH für 24h (\bullet) und VPD-Inkubate w PH, ind. für 24h (\blacksquare). VPD-Ausgangskonzentration in PH: 4 mM ($n = 2$). w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert. Die Inkubate aus Schweinehepatozyten (PH) werden an der MLU gewonnen und bei BASF SE in den Zytotoxizitätstest eingesetzt.

Quantitative Analyse der eingesetzten Medien:

Zur Überprüfung der Stabilität von VPD und VPA während des Überförungsprozesses werden Konzentrationsbestimmungen aus den Überförungsinkubaten der Rattenhepatozyten vom Zentrallabor deutscher Apotheker nach Kap. 4.2.4.1.3 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.28 zusammengefasst.

Die analysierten VPD-Konzentrationen der 1 mM VPD-Inkubate liegen an Tag 0 und 5 40 bis 50 % über der ermittelten Konzentration nach der Hepatozyteninkubation, entsprechen aber dem Anteil der nominal in Rattenhepatozyten eingesetzten VPD-Konzentration. Die Wiederfindung der VPD-Konzentration aus den 4 mM-Inkubaten beträgt 100 % an Tag 0 im Inkubat ohne Zellen und an Tag 5 auch im Inkubat mit Zellen. Die Konzentration ist über die Testperiode stabil. Die VPD-Konzentration im Inkubat mit Zellen sinkt um 40 % auf 0,9 mM. In keiner Probe kann VPA nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den Hepatozyteninkubaten überein, in denen ebenfalls kein VPA detektiert werden konnte (vgl. Kap. 5.1.5.3).

Tabelle 5.28: Konzentrationsbestimmung von VPD und VPA in Überführungsmedien während des 3T3-Zytotoxizitätstests

Zu Beginn des 3T3-Zytotoxizitätstests (d0) wird den Hepatozytenüberständen frisches 3T3-Medium zugesetzt. Der Anteil Hepatozytenüberstand im Testmedium beträgt 44,5 % (v/v). Die Proben werden an Tag 0 und Tag 5 des Zytotoxizitätstests jeweils vor der Inkubation asserviert (n = 1). RH: Rattenhepatozyten, n.n.: nicht nachweisbar.

Inkubat	VPD-Konzentration in RH [mM]	Konzentrations-äquivalente im Zytotoxizitätstest [%]	Analysierte Konzentration d0 [mM]		Analysierte Konzentration d5 [mM]	
			VPD	VPA	VPD	VPA
ohne RH	1	44,5	0,4 ± 0,1	n.n.	0,4 *	n.n.
mit RH	1	44,5	0,4 ± 0,1	n.n.	0,3 *	n.n.
ohne RH	4	44,5	1,6 ± 0,1	n.n.	1,5 ± 0,1	n.n.
mit RH	4	44,5	1,5 ± 0,2	n.n.	0,9 ± 0,04	n.n.

5.3.4.2 Übersicht der Ergebnisse aus den VPD-Inkubatüberführungen

In Tabelle 5.29 sind die IC_{50} -Werte aus der Überführung von VPD-Inkubaten von Ratten- und Schweinehepatozyten in den 3T3-Zytotoxizitätstest dargestellt. Weder durch die Präinkubation in Ratten- noch in Schweinehepatozyten kann eine metabolische Aktivierung von VPD im 3T3-Zytotoxizitätstest unter den gewählten Überführungsbedingungen nachgewiesen werden. Der Vitalitätsanstieg der 3T3-Zellen auf ca. 150 % der Kontrolle tritt sowohl durch reines VPA als auch durch das basale Rattenhepatozyteninkubat auf und wird durch das analoge Schweinehepatozyteninkubat nicht ausgelöst. Inkubate aus Humanhepatozyten wurden aufgrund der mit Ratten- und Schweinehepatozyten vergleichbaren analytischen Daten nicht im 3T3-Zytotoxizitätstest eingesetzt.

Tabelle 5.29: Zusammenfassung der IC_{50} -Werte aus der Überführung von VPD-Inkubaten in den 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der graphisch ermittelten IC_{50} -Werte aus dem 3T3-Zytotoxizitätstest an Tag 7. RH: Rattenhepatozyten und PH: Schweinehepatozyten. w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert.

	RH	PH
1 mM w/o H	> 0,5 mM	
1 mM w H	> 0,5 mM	
1 mM w H, ind.	> 0,5 mM	
4 mM w/o H	> 1,8 mM	> 0,9 mM
4 mM w H	> 1,8 mM	> 0,9 mM
4 mM w H ind.	> 1,8 mM	> 0,9 mM

5.3.5 2-Acetylaminofluoren

5.3.5.1 EST: 3T3-Fibroblasten

Zur Untersuchung der metabolischen Aktivierung von 2-AAF werden aufgrund der geringeren Suszeptibilität gegenüber höheren 2-AAF-Konzentrationen (vgl. Anhang, Kap. 12.1.2) und unter der Voraussetzung des vergleichbaren Umsatzes, Leberschnitte der Ratte herangezogen. 100 μM 2-AAF werden für 24 Stunden sowohl unter basalen als auch unter induzierten Bedingungen inkubiert. In Schweinehepatozyten können 100 μM 2-AAF ohne zytotoxische Effekte eingesetzt werden („aktive Inkubate“). Als inaktive Kontrolle werden Inkubationen ohne Leberschnitte bzw. Schweinehepatozyten durchgeführt. Die Inkubate werden mit Lösungsmittelüberständen verdünnt und zu 44,5 % (v/v, LS) und 22,3 % (v/v, PH, v/v) in den 3T3-Zytotoxizitätstest eingesetzt. Exemplarisch sind die Konzentrations-Wirkungskurven einer LS-Inkubation unter basalen und induzierten Bedingungen im Vergleich zu 2-AAF und NOH-AAF in den Abbildungen 5.28 (LS) und 5.29 (PH) dargestellt. Die IC_{50} -Werte werden in Metabolitenäquivalent-Konzentrationen auf Basis der in den Leberzellsystemen eingesetzten Konzentration angegeben.

Die Inkubate aus Leberschnitten und Schweinehepatozyten rufen im Vergleich zu den inaktiven Kontrollen keinen Vitalitätsunterschied der 3T3-Zellen hervor. Die IC_{50} -Werte liegen oberhalb der durch diese Methode erreichbaren Konzentrationen von 44,5 μM (LS) bzw. 22,3 μM (PH). Eine metabolische Aktivierung von 2-AAF im 3T3-Zytotoxizitätstest kann somit weder durch die Präinkubation in Rattenleberschnitten noch in Schweinehepatozyten nachgewiesen werden.

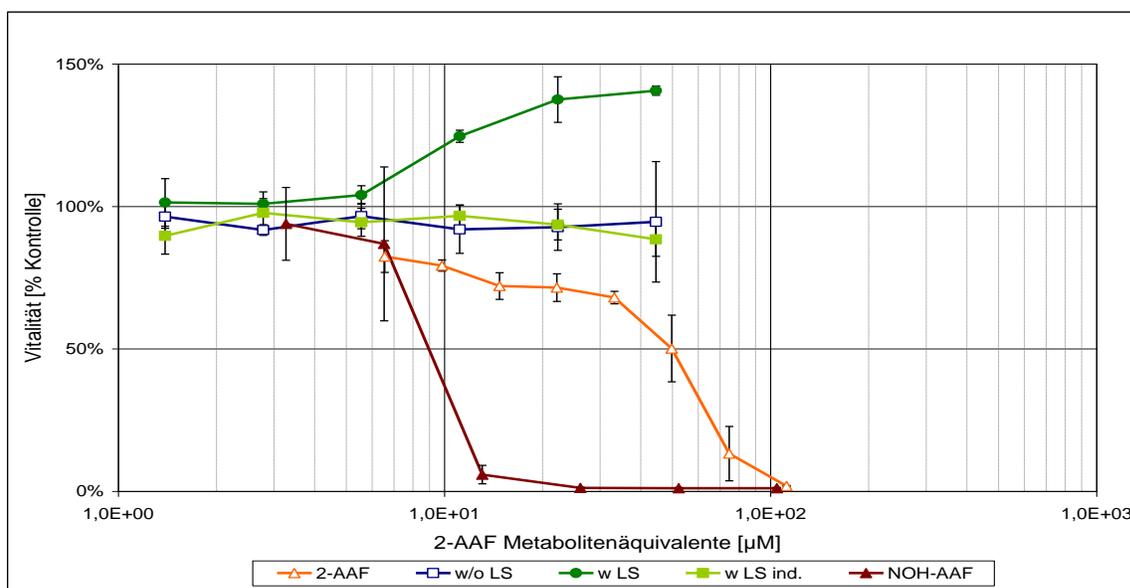


Abbildung 5.28: Konzentrations-Wirkungskurve von 2-AAF-Inkubaten aus Rattenleberschnitten im Vergleich zu 2-AAF und NOH-AAF im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von 2-AAF (Δ), NOH-AAF (\blacktriangle), 2-AAF-Inkubate w/o LS für 24h (\square) und 2-AAF-Inkubate w LS für 24h (\bullet), 2-AAF-Inkubate w LS, ind. für 24h (\blacksquare). 2-AAF-Ausgangskonzentration in LS: 100 μ M (n = 1). w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert, LS: Leberschnitte.

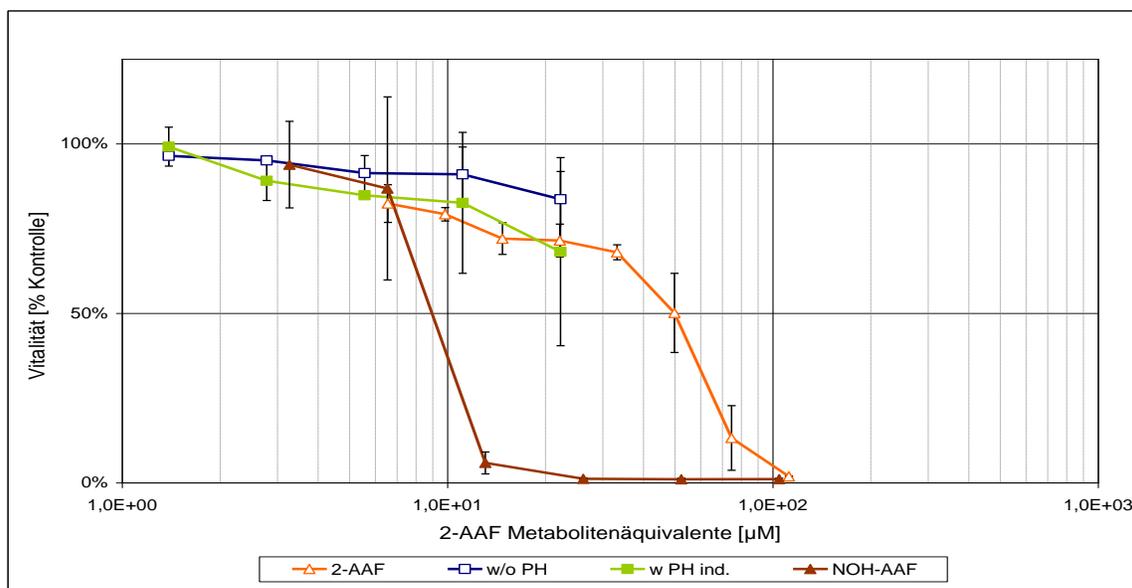


Abbildung 5.29: Konzentrations-Wirkungskurve von 2-AAF-Inkubaten aus Schweinehepatozyten im Vergleich zu 2-AAF und NOH-AAF im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von 2-AAF (Δ), NOH-AAF (\blacktriangle), 2-AAF-Inkubate w/o PH für 24h (\square), 2-AAF-Inkubate w PH, ind. für 24h (\blacksquare). 2-AAF-Ausgangskonzentration in PH: 100 μ M (n = 1). w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert. Die Inkubate aus Schweinehepatozyten (PH) werden an der MLU gewonnen und bei BASF SE in den Zytotoxizitätstest eingesetzt.

Quantitative Analyse der eingesetzten Medien:

Zur Überprüfung der Stabilität von 2-AAF während des Überförungsprozesses werden Konzentrationsbestimmungen aus den Überförungsinkubaten der Leberschnitte an Tag 5 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.30 zusammengefasst.

Die analysierten 2-AAF-Konzentrationen entsprechen einer Wiederfindung aus den Leberschnittinkubaten von 96 bis 106 %. 2-AAF ist über den Zeitraum des Zytotoxizitätstests im Kulturmedium stabil. NOH-AAF wird analog den Ergebnissen der Leberschnittinkubate nicht nachgewiesen.

Tabelle 5.30: Konzentrationsbestimmung von 2-AAF in Überförungsüberständen

Zu Beginn des 3T3-Zytotoxizitätstests (d0) wird den Leberschnittüberständen frisches 3T3-Medium zugesetzt. Der Anteil Leberschnittüberstand im Testmedium beträgt 44,5 % (v/v). Die Proben werden an Tag 5 des Zytotoxizitätstests jeweils vor der Inkubation asserviert (n = 1). LS: Leberschnitte, n.n.: nicht nachweisbar.

Inkubat	2-AAF-Konzentration in LS [μM]	Konzentrationsäquivalente im Zytotoxizitätstest [%]	Analysierte Konzentration d5 [μM]	
			2-AAF	NOH-AAF
ohne LS	100	44,5	39,5	n.n.
mit LS	100	44,5	2,2	n.n.

5.3.5.2 Übersicht der Ergebnisse aus den 2-AAF-Inkubationüberführungen

In Tabelle 5.31 sind die IC_{50} -Werte aus der Überführung von 2-AAF-Inkubaten von Rattenleberschnitten und Schweinehepatozyten in den 3T3-Zytotoxizitätstest dargestellt. Eine metabolische Aktivierung von 2-AAF im 3T3-Zytotoxizitätstest kann unter den gewählten Überführungsbedingungen weder durch Rattenleberschnittinkubate noch durch Inkubate aus Schweinehepatozyten nachgewiesen werden. Inkubate aus Humanhepatozyten wurden aufgrund der mit Rattenleberschnitten und Schweinehepatozyten vergleichbaren analytischen Daten nicht im 3T3-Zytotoxizitätstest eingesetzt.

Tabelle 5.31: Zusammenfassung der IC_{50} -Werte aus der Überführung von 2-AAF-Inkubaten in den 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der graphisch ermittelten IC_{50} -Werte aus dem 3T3-Zytotoxizitätstest an Tag 7. LS: Leberschnitte und PH: Schweinehepatozyten. w/o: ohne, w: mit, ind.: induziert.

	LS	PH
100 μ M w/o LS	> 44,5 μ M	
100 μ M w LS	> 44,5 μ M	
100 μ M w LS ind.	> 44,5 μ M	
100 μ M w/o H		> 22,3 μ M
100 μ M w H ind.		> 22,3 μ M

6 Diskussion

6.1 Primäre Hepatozyten und Leberschnitte der Ratte als *in vitro*-Metabolismussysteme für den EST und die WEC

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der metabolischen Aktivierung ausgewählter Proteratogene in zellulären Leber-*in vitro*-Systemen der Ratte, die zur Erweiterung und Optimierung des 3T3-Zytotoxizitätstests herangezogen werden. Dieser bildet einen Endpunkt in den *in vitro*-Embryotoxizitätstests EST und WEC (Genschow *et al.* 2004; Piersma *et al.* 2004). Da diese Testsysteme den maternalen Stoffwechsel aufgrund fehlender oder unzureichender fremdstoffmetabolisierender Aktivität nicht abbilden, können sie zur Erfassung von Proteratogenen aktuell nicht herangezogen werden. Dieses Defizit stellt einen Grund für die Ablehnung des EST und der WEC für regulatorische Zwecke dar (Coecke *et al.* 2006). Die Arbeit bildet ein Teilprojekt des BMBF-geförderten Vorhabens „Entwicklung eines Biotransformationssystems für die metabolische Aktivierung von validierten *in vitro*-Systemen zur Prüfung auf Embryotoxizität“. Die Bearbeitung des Projektes erfolgt in Zusammenarbeit mit dem BfR und der Charité-Universitätsmedizin in Berlin, welche die Embryotoxizitätseindpunkte bearbeiten, sowie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und der Technischen Universität München, welche zur Untersuchung speziesspezifischer Metabolitenprofile Schweine- und Humanhepatozyten einsetzen und für PCR- und Western Blot-Analysen verantwortlich sind.

Im Rahmen des BMBF-Projekts erfolgt die Integration metabolischer Aktivität in die Endpunkttests in Form einer Präinkubation der Testsubstanzen in den Hepatozytenkulturen und einer anschließenden Überführung der Inkubate. Diese Methode ist aufgrund der limitierten Vitalität und fremdstoffmetabolisierenden Aktivität der Hepatozyten die gegenüber der Kokultur bevorzugte Methode. Sie ermöglicht die Aufreinigung des Hepatozyteninkubats, eine konstante Exposition der Zielzellen mit den Testsubstanzen bzw. deren Metaboliten sowie geringe Abweichungen von den validierten Protokollen des EST und der WEC. Der für den Nährstoffbedarf der Zielzellen notwendige Zusatz frischen Mediums zum Hepatozyteninkubat hat jedoch die Verdünnung gebildeter Metaboliten zur

Folge. Darüber hinaus können Metaboliten aufgrund ihrer Flüchtigkeit oder Reaktivität in der Hepatozytenkultur bereits verdampfen bzw. abreagieren, sodass sie für die Überführung nicht mehr zur Verfügung stehen. Eine Kokultivierung ermöglicht die direkte Exposition der Zielzellen mit den gebildeten Metaboliten. Binder setzte dazu im Differenzierungstest des EST Hepatomzelllinien ein, welche eine unbegrenzte Vitalität und geringere Ansprüche an die Kulturbedingungen im Vergleich zu primären Zellen stellen (Binder 2008). Dies führte jedoch aufgrund der mangelnden fremdstoffmetabolisierenden Aktivität der Leberzellen nicht zum Nachweis einer metabolischen Aktivierung von CPA. In beiden Kombinationsmethoden ist eine Adaption der Kulturbedingungen der Zellsysteme notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wird zunächst die Anpassungsfähigkeit der *in vitro*-Biotransformationssysteme an die Medienbedingungen der Zielkulturen im Vergleich zu den gewählten Standardkulturbedingungen unter besonderer Berücksichtigung der Vitalität und der fremdstoffmetabolisierenden Aktivität optimiert. Anschließend erfolgt die Bewertung der Biotransformation der Testsubstanzen in primären Rattenhepatozyten und Leberschnitten im Hinblick auf den Erfolg der Überführung der Medienüberstände. Die Untersuchung der Testsubstanzen separat und in Mischung im 3T3-Zytotoxizitätstest bildet eine weitere Grundlage für die Beurteilung des Erfolgs einer metabolischen Aktivierung der Proteratogene, welche im Wesentlichen durch die Inkubatüberführung in die Zielkulturen zu bewerten ist.

6.1.1 Vitalität

Das unter Standardbedingungen zur Kultivierung primärer Hepatozyten verwendete Williams Medium E ist ein modifiziertes Medium aus der Gruppe der Minimalmedien nach *Eagle* (MEM). WME ist mit essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren, Spurenelementen und Antioxidantien wie Glutathion, α -Tocopherol und Ascorbinsäure angereichert, welche die während der Hepatozytengewinnung durch Ischämie und anschließender Reperfusion gebildeten reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und NO) abfangen können. ROS und NO werden u.a. für das Absterben und die Dedifferenzierung der Hepatozyten in Kultur verantwortlich gemacht (Elaut *et al.* 2006; Vinken *et al.* 2011). Die über die mitochondriale Reduktase-Aktivität (MTT) erfasste Vitalität der Rattenhepatozyten wird durch die Kultivierung im ESZ-D3-Medium DMEM im Vergleich zu WME über 48 Stunden nicht beeinträchtigt. DMEM wird auch von anderen Arbeitsgruppen als Standardkulturmedium für primäre Rattenhepatozyten verwendet

(Berthiaume *et al.* 1999; Kienhuis *et al.* 2007; LeCluyse *et al.* 1999; Richert *et al.* 2002). Somit wird unter Berücksichtigung der CYP-Aktivität das DMEM-Medium als für die Rattenhepatozytenkultur geeignet bewertet.

Die Verwendung von Medien mit einem Serumgehalt von > 90 % ist in der Kultur von Hepatozyten nicht beschrieben. Eine Abnahme der Vitalität der Hepatozyten nach 48 Stunden um ca. 35 % der Kontrolle wird beobachtet. Möglicherweise ist der Gehalt an Glukose zu gering und das Verhältnis von Nährstoffen im Vergleich zu Standardmedien unausgewogen, um eine dem WME-Kulturmedium vergleichbare Vitalität der Hepatozyten zu erreichen. Für eine Inkubatüberführung in die WEC wird unter Berücksichtigung der CYP-Aktivität und der Toleranz der sich entwickelnden Embryonen gegenüber inkubiertem Medium eine Testsubstanzinkubation in der Rattenhepatozytenkultur in einem Zeitfenster von 24 Stunden als durchführbar bewertet.

6.1.2 Enzymaktivitäten

6.1.2.1 Rattenhepatozyten

Für die Kombination zellulärer *in vitro*-Biotransformationssysteme mit *in vitro*-Embryotoxizitätstests spielt deren fremdstoffmetabolisierende Aktivität eine entscheidende Rolle. Sie wird anhand der Umsetzung der CYP-isoformspezifischen Substrate Ethoxy-, Pentoxy- und Benzyloxyresorufin sowie anhand des Metabolismus des Modellsubstrats Testosteron ermittelt. Außerdem werden mit Unterstützung der Verbundpartner aus Halle und München ausgewählte CYP-Enzyme mittels RT-PCR und Western Blot bestimmt.

Unter basalen Standardkulturbedingungen können in primären Rattenhepatozyten zu Inkubationsbeginn (0 Stunden) die AROD-vermittelten Aktivitäten von CYP1A, 2B und 3A analysiert werden. CYP1A1 wird zu diesem Zeitpunkt weder auf mRNA- noch auf Proteinebene nachgewiesen. Im Western Blot erscheint eine schwache Bande für CYP2B1/2. Das Ergebnis der Proteinexpression wird von Western Blot Analysen von Binda *et al.* bestätigt, welche zu Beginn der Kultur primärer Rattenhepatozyten kein CYP1A1/2 nachweisen konnten und ein schwaches Signal für CYP2B1/2 erhielten (Binda *et al.* 2003). Die analysierte EROD-Aktivität wird somit auf die Aktivität anderer Isoenzyme wie CYP1A2 und 2C6 zurückgeführt, welche ebenfalls die Deethylierung von Ethoxyresorufin katalysieren (Kobayashi *et al.* 2002). Da die Expression von CYP1A1 und 2B1 in der Leber unbehauelter männlicher Ratten, welche den Ursprung der Hepatozytenkultur bilden, sehr gering ist, fallen die Ergebnisse der Expressionsanalysen gemäß den Erwartungen aus

(Kocarek *et al.* 1993; Wortelboer *et al.* 1991). In der Rattenleber bilden CYP2C11 und 2C13 den größten Anteil der im ER vorkommenden CYP-Isoenzyme, deren Aktivität über den Testosteronmetabolismus durch die Bildung von 2 α -, 6 β - und 16 α -OHT sowie Androstendion nachgewiesen wird (Wang *et al.* 2009). Darüber hinaus sind die über die Resorufinderivate analysierten CYP-Isoformen 1A, 2B und 3A an der Bildung der analysierten Testosteronmetaboliten beteiligt. Neben den CYP2C-Isoenzymen 11 und 13 katalysieren CYP1A1/2 und CYP3A1/2 die Hydroxylierung an Position 6 β . 16 α -OHT und Androstendion können u.a. auf die Aktivität von CYP2B1/2 zurückgeführt werden (Arlotto *et al.* 1991; Wang *et al.* 2009). Die nachgewiesenen Phase-I-Metaboliten entsprechen dem vielfach in der Literatur dargestellten CYP-abhängigen metabolischen Profil von Testosteron in Rattenhepatozyten, in dem 2 α -, 6 β - und 16 α -OHT und Androstendion in vergleichbaren Anteilen als Hauptmetaboliten nachgewiesen worden sind (De Smet *et al.* 2001; Donato *et al.* 1994a; Langsch *et al.* 2009; Pfeiffer und Metzler 2004; Zurlo und Arterburn 1996). 15 α -OHT, dessen Bildung von CYP2A2 und CYP2C13 katalysiert wird, wurde von Langsch *et al.* ebenfalls detektiert (Langsch *et al.* 2009). Die Glucuronidase/Arylsulfatase-Inkubation ermöglicht neben dem Nachweis CYP-abhängiger Testosteronmetaboliten auch die Analyse von mit Glucuronsäure und / oder Sulfat konjugierten Metaboliten. Unter basalen Kulturbedingungen liegen nach 24 Stunden ca. 75 % der UV-spektrophotometrisch-detektierbaren Metaboliten konjugiert vor, darunter 35 % konjugiertes Testosteron. In vergleichbaren Anteilen werden 2 α - und 16 α -OHT nachgewiesen. 6 β -OHT, welches als Phase-I-Metabolit detektiert wurde, liegt nicht konjugiert vor. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Pfeiffer und Metzler, welche nach einer 24 Stunden-Inkubation von 200 μ M Testosteron in Rattenleberschnitten Konjugate von 2 α - und 16 α -OHT aber nicht von 6 β -OHT nachgewiesen haben (Pfeiffer und Metzler 2004). Sie beobachteten außerdem eine altersabhängige Konjugationsaktivität mit vermehrter Konjugation bei geringerem Alter. Das Alter von ca. 15 Wochen der in dieser Arbeit verwendeten Tiere und die hohe Konjugationsaktivität entspricht somit ebenfalls den Ergebnissen von Pfeiffer und Metzler (Pfeiffer und Metzler 2004). Die Wiederfindung über die Summe aller detektierbaren Metaboliten beträgt ca. 40 %. Dieser Effekt ist auf die Aktivität der Steroid-5 α -Reduktase zurückzuführen (Normington und Russell 1992). Dieses Enzym katalysiert die Bildung von Dihydrotestosteron und weiteren reduktiven Hydroxy-Testosteronmetaboliten, welche UV-spektrophotometrisch nicht zu erfassen sind (Sonderfan und Parkinson 1988).

Unter Standardinkubationsbedingungen liegen die bestimmten AROD-Aktivitäten in Rattenhepatozyten nach 48 Stunden unterhalb der Nachweisgrenze. Die Abnahme der Enzymaktivität in der Kollagen-Monolayerkultur primärer Rattenhepatozyten ist in der Literatur vielfach beschrieben (Coecke *et al.* 1999; Guillouzo *et al.* 1997; Kienhuis *et al.* 2007; Paine 1990). Zurlo und Arterburn beschreiben eine Abnahme der EROD- und PROD-Aktivität von 80 % bis 90 % innerhalb von 48 Stunden (Zurlo und Arterburn 1996). Die Arbeitsgruppe von Henkens kann nach 48 Stunden Kultur 40 % der zu Beginn der Kultur analysierten EROD-Aktivität und weniger als 20 % der ursprünglichen PROD-Aktivität nachweisen (Henkens *et al.* 2007). Untersuchungen von Donato *et al.* verzeichnen bereits nach 24 Stunden eine Abnahme der EROD-Aktivität um 40 %, der PROD-Aktivität um 60 % und der BROD-Aktivität um 50 % (Donato *et al.* 1994b). Als Gründe der auf die Dedifferenzierung der Hepatozyten zurückgeführten Reduktion der CYP-Aktivität werden zelluläre Stressreaktionen, die durch die Kollagenase-Perfusion ausgelöst werden, die Medienzusammensetzung, die extrazelluläre Matrix sowie die in der Monolayerkultur fehlende Ausbildung der Polarität der Hepatozyten entsprechend der *in vivo*-Situation diskutiert (Elaut *et al.* 2006; Guillouzo 1998; LeCluyse *et al.* 1999).

Für die Kombination primärer Rattenhepatozyten mit den *in vitro*-Embryotoxizitätstests in Form einer Präinkubation wird die Toleranz der Hepatozytenkultur gegenüber den verwendeten Medien der Zielkulturen untersucht. Außerdem wird überprüft, ob die Zielkulturen eine Akzeptanz gegenüber Hepatozytenmedium aufweisen (vgl. Kap. 6.3). Die Kultivierung der Rattenhepatozyten in DMEM führt zu Beginn der Kultur zu einer leicht aber nicht signifikant erniedrigten EROD-, PROD- und BROD-Aktivität im Vergleich zur Aktivität unter Standardbedingungen. Dies könnte auf den geringeren Anteil an Antioxidantien in DMEM zurückzuführen sein, welche die durch die Kollagenase-Perfusion gebildeten reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies abfangen können. Sie werden in direktem Zusammenhang mit dem Verlust der CYP-Aktivität diskutiert (Elaut *et al.* 2006; Lopez-Garcia 1998). Der Einsatz von DMEM in der Kultur primärer Rattenhepatozyten ohne signifikante Beeinträchtigungen der Vitalität oder fremdstoffmetabolisierenden Enzymaktivität wird durch häufig beschriebene Anwendungen in der Literatur bestätigt (De Smet *et al.* 2001; Kienhuis *et al.* 2007; Richert *et al.* 2002). Wie bereits unter Standardbedingungen beobachtet, liegen die ermittelten AROD-Aktivitäten sowohl in DMEM- als auch in WEC-Medium kultivierten Hepatozyten nach 48 Stunden unterhalb der Nachweisgrenze. Neben der auch durch klassische Kulturmedien erfolgten Reduktion der

CYP-Aktivität führt das WEC-Medium zu einer Abnahme der Vitalität um ca. 35 % nach 48 Stunden. Basierend auf den Ergebnissen nach 24 Stunden (Daten nicht gezeigt), wird eine Hepatozytenkultur mit WEC-Medium in Abhängigkeit des Umsatzes der Testsubstanzen als durchführbar bewertet.

Um die Abnahme der CYP-Aktivität während der Kulturperiode im Hinblick auf den Umsatz der Testsubstanzen zu reduzieren, wird die Kultur induziert. Aufgrund der Vielseitigkeit der Biotransformation der Testsubstanzen soll eine möglichst große Bandbreite fremdstoffmetabolisierender Enzyme induziert werden. Dies wird durch einen Induktionscocktail erreicht, welcher die klassischen Enzyminduktoren β -Naphthoflavon, Phenobarbital und Dexamethason enthält (Wortelboer *et al.* 1991). Die gewählten Substanzen führen untereinander zu Kreuzreaktionen, die zusätzlich den induktiven Effekt im Vergleich zur Einzelsubstanz steigern (Graham und Lake 2008; Pelkonen *et al.* 2008). Dabei werden neben CYPs auch Enzyme der Phase-II, darunter Isoenzyme der UGT, die Glutathion-S-Transferase A2 und die Dehydroepiandrosteron-Sulfotransferase (SULT2A1) induziert (Chang und Waxman 2005; Echchgadda *et al.* 2004). Die Effekte des Induktionscocktails werden anhand der EROD-, PROD- und BROD-Aktivität und der Protein- und Genexpression über die 48-stündige Kulturperiode untersucht. Die Kultivierung der Rattenhepatozyten erfolgt in WME-Medium. Die Inkubation mit dem Induktioscocktail führt nach 48 Stunden zu einer um den Faktor 56 im Vergleich zur basalen Initialaktivität erhöhten EROD-Aktivität. In Protein- und Genexpressionsanalysen erscheint eine deutliche Bande für CYP1A1. Kienhuis *et al.* berichten von einem synergistischen Effekt von β NF und Dex auf die CYP1A1-Expression und Zurlo und Arterburn beobachten eine Verdoppelung der EROD-Aktivität bei der Kombination von Dex (10 μ M) und β NF (25 μ M) im Vergleich zu β NF allein (Kienhuis *et al.* 2007; Zurlo und Arterburn 1996). In geringen Konzentrationen (< 1 μ M) steigert Dex ebenfalls die PB-vermittelte CYP2B1/2-Induktion. Mit Hilfe des Induktionscocktails wird eine PROD-Aktivität ermittelt, welche mit der zu Beginn der Kultur vorliegenden Aktivität vergleichbar ist (Sidhu und Omiecinski 1995; Waxman *et al.* 1990). Der Nachweis von CYP2B1/2 in den Protein- und Genexpressionsanalysen bestätigen die analysierte PROD-Aktivität. Die im Vergleich zur EROD-Aktivität weniger intensive Induktion der CYP2B1/2-Aktivität innerhalb der vergleichsweise kurzen Kulturperiode von 24 bis 48 Stunden wird in der Literatur ebenfalls beschrieben (De Smet *et al.* 2001; Donato *et al.* 1994a; Wortelboer *et al.* 1991). Untersuchungen von Waxman in primären Rattenhepatozyten zeigen nach 48 Stunden eine dreifache, dagegen nach sieben Tagen

eine 20fache PROD-Induktion durch die Inkubation von 750 μM PB im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Waxman *et al.* 1990). Der Vergleich mit den publizierten Ergebnissen ist jedoch durch die gewählten Parameter zur Bestimmung der Aktivität und die variierenden Kulturbedingungen (extrazelluläre Matrix, Medienzusammensetzung, Alter der Hepatozytenkultur), die Einfluss auf die CYP-Aktivität und besonders auf CYP2B1/2 haben, erschwert (LeCluyse *et al.* 1999). LeCluyse beobachtet bereits durch die Verwendung zwei verschiedener Kulturplatten eine Variabilität von bis zu 50 % der PROD-Induktion durch 100 μM PB nach drei Tagen (LeCluyse *et al.* 1999). Die von Waxman publizierte knapp 90fache Induktion der CYP2B1-Aktivität durch Behandlung der Rattenhepatozyten mit 750 μM PB und 1 μM Dex wird über die 16 β -Testosteron-Hydroxylase-Aktivität erhoben, welche neben der CYP2B1 auch die mittels PB und Dex induzierbare CYP3A1/2-Aktivität erfasst (Waxman *et al.* 1990). Die Erhöhung der überwiegend CYP3A-abhängigen BROD-Aktivität wird hauptsächlich durch das im Induktionscocktail enthaltene Dex induziert, wobei auch ein synergistischer Effekt mit PB anzunehmen ist (Waxman und Azaroff 1992). Hoen *et al.* setzen 10 μM Dex zur Induktion von CYP3A-Isoenzymen in primären Rattenhepatozyten ein, welches nach 48 Stunden eine Verdopplung der 6 β -Hydroxylase-Aktivität zur Folge hat (Hoen *et al.* 2000). Die Behandlung führt jedoch zu einer Inhibierung der PB-vermittelten CYP2B1/2-Induktion (Sidhu und Omiecinski 1995).

Die Enzyminduktion ist ein reversibler, von der Konzentration und der Dauer der Behandlung abhängiger Prozess (Pelkonen *et al.* 2008). Die Veränderung der Enzymaktivität nach dem Entzug der Induktoren wird in Rattenhepatozyten nach einer 24-stündigen Induktions- und einer sich anschließenden 24-stündigen Postinkubationsperiode untersucht. Die Enzyminduktion erfolgt in WME-Medium. In der Postinkubationsperiode werden die Hepatozyten sowohl in WME- als auch in WEC-Medium kultiviert. Das unter basalen Bedingungen getestete DMEM wird aufgrund der im Vergleich zu WME geringeren Verträglichkeit in den Zielkulturen des EST nicht berücksichtigt (vgl. Kap. 6.3). Die nach 48 Stunden unter WME-Bedingungen analysierte EROD-Aktivität ist im Vergleich zur Induktion über die gesamte Kulturperiode um 25 % und die BROD-Aktivität um 40 % reduziert. Die PROD-Aktivität bleibt konstant. Neben der Induktion der CYP-Enzyme wird anhand des Metabolitenprofils des Modellsubstrats Testosteron die Induktion der Phase-II-Enzyme deutlich. Die 24 Stunden-Inkubation in induzierten Rattenhepatozyten führt dazu, dass erst nach Inkubation mit Glucuronidase/Arylsulfatase UV-spektrophotometrisch

erfassbare Metaboliten nachgewiesen werden können. Die Wiederfindung ist verglichen mit der aus nicht-induzierten Zellen leicht erhöht, woraus folgt, dass der Induktionscocktail keinen Einfluss auf die Aktivität der 5 α -Reduktase besitzt. Den größten Anteil konjugierter Analyten bildet Testosteron (ca. 75 %), was zu der Annahme führt, dass die Konjugation eine direkte Konkurrenzreaktion zur CYP-abhängigen Hydroxylierung darstellt. Auch das Profil der Hydroxymetaboliten unterscheidet sich von dem unter basalen Bedingungen erhobenen Profil. Die Präsenz von 6 α - und 16 β -OHT, welche unter basalen Bedingungen nicht analysiert werden konnten, sind auf die Induktion von CYP2A1 und 2B1/2 zurückzuführen (Arlotto *et al.* 1991; Ringel *et al.* 2002). Der von Wortelboer *et al.* und Kot *et al.* beschriebene inhibierende Effekt von β NF auf CYP2C11 und die damit verbundene verminderte Bildung von 2 α - und 16 α -OHT kann beobachtet werden (Kot und Daniel 2007; Wortelboer *et al.* 1991). Obwohl β NF auch eine inhibierende Wirkung auf die CYP2B1/2-abhängige Bildung von 16 β -OHT hat (Kot und Daniel 2007), überwiegt hier möglicherweise der induzierende synergistische Effekt von PB und Dex. Die analysierten CYP-Aktivitäten werden durch Proteinexpressionsanalysen bestätigt, die eine klare Bande für CYP1A1 und 2B1/2 durch die Induktion aufweisen und zeigen, dass die Expression auch während die Postinkubationsperiode anhält.

Durch den Einsatz des Induktionscocktails werden Aktivitäten verschiedener CYP-Isoenzyme im Vergleich zur basalen Kultur sowohl gesteigert (CYP1A, 2B, 3A) als auch verringert (CYP2C11). Der UV-spektrophotometrische Nachweis ausschließlich konjugiert-vorliegender Testosteronmetaboliten verdeutlicht die Induktion der UGTs und der SULTs. Diese Einflüsse müssen bei der Inkubation von Testsubstanzen in der Postinkubationsperiode berücksichtigt werden, da funktionalisierte Metaboliten nicht oder in geringer Konzentration gebildet werden oder das Substrat direkt konjugiert wird. Häufig handelt es sich dabei um Entgiftungsreaktionen. Die Erfassung einer metabolischen Aktivierung von Proteratogenen in den Zielkulturen wäre unter diesen Bedingungen möglicherweise eingeschränkt.

Bei der Untersuchung zur Toleranz der Medienüberstände in den Zielkulturen des EST stellt sich in den ESZ-D3 eine erhöhte Toleranz gegenüber Inkubaten aus der induzierten Rattenhepatozytenkultur heraus. Dieser Effekt wird auf die Abnahme nekrotischer Prozesse in den Hepatozytenkulturen durch das im Induktionscocktail enthaltene Dex zurückgeführt. Verunreinigungen durch absterbende Zellen werden dadurch reduziert und die Toleranz der Zielzellen gegenüber aktivierten Medienüberständen erhöht. Somit werden ausschließlich

Inkubate aus der induzierten Rattenhepatozytenkultur in den D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest überführt. Da dieser Effekt im 3T3-Zytotoxizitätstest nicht beobachtet wird, können Inkubate nach 24 Stunden sowohl aus der basalen als auch der induzierten Kultur eingesetzt werden.

Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsuntersuchungen zeigen, dass die Kultur primärer Rattenhepatozyten über CYP-, UGT- und SULT-Aktivität verfügen. Die anhand der Strukturaufklärungsanalysen identifizierten Metaboliten der Testsubstanzen liefern darüber hinaus Hinweise über die Aktivität weiterer Phase-I- und Phase-II-Enzymen wie der ADH, der AIDH und der GST. Rattenhepatozyten werden somit als mögliches *in vitro*-System zur metabolischen Aktivierung von Proteratogen bewertet. Sie weisen im Gegensatz zu subzellulären Fraktionen eine länger anhaltende Enzymaktivität auf, welche nicht von der Zugabe von Kofaktoren abhängig ist.

Die CYP1A, 2B und 3A-abhängige AROD-Aktivität nach der Postinkubationsperiode mit WEC-Medium fällt zwar im Vergleich zu WME 60 bis 70 % geringer aus, führt aber zu einer nachweisbaren CYP-Aktivität der Rattenhepatozyten im Kulturmedium der WEC nach 48 Stunden. Unter Berücksichtigung der Toleranz der Rattenembryonen gegenüber inkubiertem WEC-Rattenhepatozytenmedium ermöglicht dieses Resultat und die nach 24 Stunden nur um 20 % verringerte Vitalität im Vergleich zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt) die Kombination primärer Rattenhepatozyten mit der WEC in Form der Präinkubation ohne weitere Extraktions- oder Verdünnungsmaßnahmen des Medienüberstandes.

6.1.2.2 Schweine- und Humanhepatozyten

Das metabolische Profil von Testosteron in Hepatozyten von Schwein und Mensch unterscheidet sich von dem der Rattenhepatozyten: Die CYP2B- und 3A-abhängigen Metaboliten 6 β -OHT und Androstendion werden als Hauptmetaboliten der Phase-I-Reaktion identifiziert. Testosteroninkubationen von Langsch et al. in primären Human- und Schweinehepatozyten liefern ebenfalls 6 β -OHT und Androstendion als Hauptmetaboliten, wobei der Anteil Androstendion in Schweinehepatozyten gegenüber Humanhepatozyten überwiegt (Langsch *et al.* 2009). Dies wird auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet. Die vergleichbare Aktivität der CYP-Isoenzyme und ein daraus resultierendes Testosteronmetabolitenprofil in Schweine- und Humanhepatozyten wird in Untersuchungen

von Donato, et al., Monshouwer et al. und Waxman et al. bestätigt (Donato *et al.* 1999; Monshouwer *et al.* 1998; Waxman *et al.* 1988). Der Anteil konjugierter Testosteronmetaboliten ist in beiden Kulturen vergleichbar und liegt zwischen 40 und 45 % der UV-spektrophotometrisch detektierbaren Metaboliten. In Schweinehepatozyten wird hauptsächlich 16 α -OHT, welches neben Androstendion durch CYP2B gebildet wird, konjugiert. Testosteron bildet dagegen in Humanhepatozyten ein bevorzugtes Substrat der UGT bzw. der SULT. Unter den gewählten Bedingungen beträgt der Umsatz in Schweinehepatozyten ca. 99 % und in Humanhepatozyten ca. 82 %.

Die Induktion der Schweine- und Humanhepatozyten führt im Gegensatz zu Rattenhepatozyten nicht zu einer Zunahme konjugierter Metaboliten. In Schweinehepatozyten wird ein CYP2B-abhängiger Anstieg der Androstendion-Konzentration beobachtet, welcher auf die additive Wirkung von PB und Dex zurückgeführt wird. Die von Monshouwer et al. nachgewiesene Induktion der 6 β -Hydroxylase-Aktivität durch 1,5 mM PB nach 48 Stunden kann aufgrund geringerer Konzentration und Inkubationsperiode nicht gezeigt werden (Monshouwer *et al.* 1998). In Humanhepatozyten wird durch die Induktion ein Umsatzanstieg von 10 % beobachtet. Die Wiederfindung geht dagegen um 50 % zurück, was zur Annahme führt, dass reduzierende Enzyme durch den Induktionscocktail beeinflusst werden. Für eine mit den Ergebnissen von Hengstler et al. vergleichbare Zunahme der 6 β -Hydroxylase-Aktivität um 100 % nach 72 Stunden durch 3-Methylcholanthren (25 μ M) und PB (0,75 mM) wird die 24-stündige Induktionsperiode als nicht ausreichend bewertet (Hengstler *et al.* 2000a).

6.1.2.3 Leberschnitte der Ratte

Leberschnitte stellen aufgrund ihrer Gewebestruktur ein der *in vivo*-Situation nahe gelegenes *in vitro*-System dar und werden häufig für *in vitro*-Metabolismusstudien verwendet (Gokhale *et al.* 1995; Martignoni *et al.* 2004). Ihre Eignung zur metabolischen Aktivierung von Proteratogenen wird in diesem Kapitel diskutiert.

Die fremdstoffmetabolisierende Aktivität innerhalb einer Kulturperiode von 24 Stunden in der 6-well-Kultur wird anhand der EROD-, PROD- und BROD-Aktivität und des Testosteronmetabolismus analysiert. Die zu Inkubationsbeginn (0 Stunden) ermittelten EROD- und BROD- Aktivitäten sind gegenüber den Ergebnissen von Lake et al. vierfach erhöht (Lake *et al.* 1993). Die publizierten Aktivitäten nach 48 Stunden liegen bei den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen bereits unterhalb der Nachweisgrenze (Lake *et al.* 1993). Die EROD-Aktivität ist wie in der Hepatozytenkultur auf die Aktivität weiterer CYP-

Isoenzyme wie CYP1A2 und 2C6 zurückzuführen, da CYP1A1 in der Leber unbehandelter männlicher Ratten nicht nachgewiesen werden kann (Lake *et al.* 1993). Wie aus der Hepatozytenkultur bekannt, nehmen der CYP-Gehalt und die CYP-vermittelten AROD-Aktivitäten in Leberschnitten der Ratte im Laufe der Kulturperiode ab (Gokhale *et al.* 1995; Lake *et al.* 1993; Olinga *et al.* 1997). Nach 24 Stunden ist ausschließlich die CYP2B- und 3A-vermittelte BROD-Aktivität nachweisbar. Untersuchungen von Hashemi *et al.* konnten nach 24 Stunden die CYP1A- und 2B-vermittelte Deethylierung von Ethoxycoumarin nachweisen (Hashemi *et al.* 1999a). Die Annahme, dass der CYP-Gehalt in Leberschnitten aufgrund von Zell-Zell-Kontakten und der Kollagenase-freien Präparation besser konserviert sei als in der Hepatozytenkultur wurde bereits 1992 von Wright und Paine widerlegt (Wright und Paine 1992). Auch im Fall der Leberschnitte werden Dedifferenzierungsprozesse in den Hepatozyten diskutiert, die für die Abnahme leberspezifischer Funktionen verantwortlich sind (de Graaf *et al.* 2000; de Graaf *et al.* 2007).

6 β - 16 α -, 2 α -OHT und Androstendion werden als Hauptmetaboliten des Phase-I-Metabolismus von Testosteron identifiziert, wobei ihr Anteil geringer ausfällt als in der basalen Hepatozytenkultur. Testosteroninkubationen (250 μ M, 20 min) in Hepatozyten und Leberschnitten der Ratte von Ekins *et al.* liefern ein vergleichbares Metabolitenprofil, welches gegenüber der Hepatozytenkultur ebenfalls eine geringere Konzentration der Metaboliten aufweist (Ekins *et al.* 1995). Der Effekt wird auf die unterschiedliche Verteilungsgeschwindigkeit des Substrats in den beiden Biotransformationssystemen zurückgeführt, welche auch einen Einfluss auf den Umsatz der eingesetzten Testsubstanzen besitzt (vgl. Kap. 6.1.3). Das Profil konjugierter Metaboliten ist mit dem aus der basalen Rattenhepatozytenkultur vergleichbar. 2 α -OHT und Testosteron bilden im Einklang mit den Ergebnissen von Pfeiffer und Metzler die Hauptkonjugationssubstrate (Pfeiffer und Metzler 2004). Über das metabolische Profil von Testosteron werden demnach neben den bereits über die AROD-Bestimmung erhobenen Aktivitäten von CYP1A, 2B und 3A auch die der rattenspezifischen Isoenzyme CYP2C11 und 2C13 und die Aktivität der konjugierenden Enzyme UGT und SULT in der 24-stündigen Kulturperiode nachgewiesen. Das Alter der Tiere, deren Leber für die Präparation verwendet wird, ist gegenüber den Tieren für die Hepatozytenpräparation erhöht, sodass von einer geringeren Konjugationsrate in Leberschnitten ausgegangen werden kann (Pfeiffer und Metzler 2004).

Der Induktionscocktail wird genutzt, um die Induzierbarkeit der CYP-Aktivität in Leberschnitten innerhalb von 24 Stunden zu untersuchen. Ziel ist, die Induktion zu nutzen, um einen höheren Testsubstanzumsatz in der nachfolgenden Inkubationsperiode zu erreichen. Die Aktivität nach 6 Stunden ist mit dem unter basalen Bedingungen vergleichbar, woraus folgt, dass nach dieser Zeit keine induktive Wirkung auf die CYP-Enzyme vorhanden ist. Nach 12 Stunden Induktion nimmt die CYP-Aktivität ab. Die CYP2B1/2-abhängige PROD-Aktivität fällt unter die Nachweisgrenze. Im Vergleich zu basalen Kulturbedingungen wird EROD-Aktivität nachgewiesen. Der Induktionscocktail hat demnach einen nachweisbaren Einfluss auf die CYP1A- nicht aber auf die CYP2B-Aktivität. Die im Vergleich zur CYP1A-Induktion langsamere und weniger intensive CYP2B-Induktion wurde in der Hepatozytenkultur ebenfalls beobachtet (Donato *et al.* 1994a; Mingoia *et al.* 2007; Zurlo und Arterburn 1996). Die 24 Stunden-Inkubation mit dem Induktionscocktail bewirkt einen Anstieg aller über die Desalkylierung der Resorufinderivate erhobenen CYP-Aktivitäten. Im Vergleich zu den Aktivitäten zu Inkubationsbeginn ist die EROD-Aktivität sechsfach erhöht, die PROD- und BROD-Aktivitäten entsprechen den Ausgangswerten. Somit kann durch den Induktionscocktail nach 24 Stunden die direkt nach der Präparation vorliegende CYP2B und 3A-Aktivität wieder erreicht werden.

Obwohl nach 6 Stunden kein induktiver Effekt auf die CYP-Aktivität beobachtet wurde, wird nach einer darauffolgenden 24 Stunden-Postinkubationsperiode unter basalen Bedingungen sowohl EROD- als auch BROD-Aktivität nachgewiesen. Die EROD-Aktivität ist mit der Aktivität zu Inkubationsbeginn vergleichbar. Die BROD-Aktivität beträgt ca. 5 % der Ausgangsaktivität. Daraus folgt, dass die kurze Behandlung mit dem Induktionscocktail ausreicht, um nach einer 24 Stunden-Postinkubationsperiode CYP-Aktivitäten in Leberschnitten nachzuweisen. Das Profil der regio- und stereoselektiven Hydroxylierung von Testosteron wird durch die 6 Stunden Induktion gering beeinflusst: 2 β -OHT kann im Unterschied zu basalen Bedingungen konjugiert nachgewiesen werden, was auf eine Induktion von CYP3A zurückzuführen ist (vgl. BROD-Aktivität). Eine Induktion der 2 β -, nicht aber der 6 β -Hydroxylase in intakten Schnitten beobachteten Glöckner *et al.* nach einer 24 Stunden-Behandlung mit 1 μ M Dex (Gloeckner *et al.* 2008). Der Anteil konjugierter Metaboliten ist gegenüber den nicht-konjugierten leicht erhöht, sodass von einem induktiven Effekt des Induktionscocktails auf die Phase-II-Enzyme UGT und SULT ausgegangen werden kann, der schwächer ausfällt als in der Hepatozytenkultur. Einen Grund für die geringe Wiederfindung der Testosteronanalyten gegenüber der Hepatozytenkultur stellt die Aktivität der Steroid-5 α -Reduktase dar, welche die Bildung UV-

spektrophotometrisch nicht detektierbarer Metaboliten katalysiert (Normington und Russell 1992). Darüber hinaus kann die weitere Verteilung im Gewebe für eine geringere Konzentration der Metaboliten im Überstand verantwortlich sein.

Die Untersuchungen zur Enzymaktivität in Leberschnitten der Ratte haben gezeigt, dass innerhalb der 24 Stunden-Kulturperiode unter den gewählten Kulturbedingungen sowohl Funktionalisierungs- als auch Konjugationsreaktionen stattfinden, die über den Einsatz des Induktionscocktails gesteigert werden können. Somit stellen Leberschnitte unter Berücksichtigung der Verträglichkeit der Medienüberstände in den Zielkulturen ein mögliches *in vitro*-Biotransformationssystem für die Aktivierung von Proteratogenen dar.

6.1.3 Metabolismus der Proteratogene und Teratogene

Der Erfolg der Kombination eines *in vitro*-Biotransformationssystems mit den *in vitro*-Embryotoxizitätstests hängt neben der Toleranz der Zellsysteme gegenüber veränderten Kulturbedingungen von der Bildung und Stabilität der aktiven Metaboliten in der Hepatozytenkultur ab. Eine ausreichende Löslichkeit und Stabilität der Testsubstanz im Kulturmedium ohne zytotoxischen Einfluss auf die Hepatozytenkultur ist ebenso erforderlich wie die Aufnahme und Biotransformation der Substanz in den Zellen. Um diese Parameter zu untersuchen, werden sowohl Zytotoxizitätstests als auch quantitative Analysen der Pro- und Teratogene aus den Inkubaten durchgeführt. Aussagen über die Bildung weiterer Metaboliten werden über Strukturaufklärungsanalysen getroffen. Anhand dieser Daten und den Ergebnissen aus den Zielkulturen der Embryotoxizitätstests (vgl. Kap. 6.2) kann eine Abschätzung über den Erfolg einer Überführung getroffen werden.

6.1.3.1 Cyclophosphamid

Die höchste in der Hepatozytenkultur eingesetzte Konzentration von 1 mM CPA hat nach 24 Stunden im MTT-Test keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. In Untersuchungen zur metabolischen Aktivierung von CPA in primären Rattenhepatozyten von van Aerts werden ebenfalls 1 mM CPA über 18 Stunden ohne Beeinträchtigung der Vitalität inkubiert (van Aerts *et al.* 1993). Die Abnahme der Vitalität innerhalb von 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle liefert Hinweise auf die metabolische Umsetzung von CPA, die, hypothetisch auf die Bildung und die zytotoxische Wirkung von Acr reduziert, mehr als 10 % betragen muss, da 100 µM Acr keinen Einfluss auf die Vitalität der Hepatozyten haben. Die quantitativen Analysen zeigen, dass CPA über den gewählten Konzentrationsbereich vollständig löslich

und über eine 24 Stunden-Inkubationsperiode ohne metabolisches System stabil ist. Nach 48 Stunden bei 37 °C nimmt die CPA-Konzentration in den inaktiven Inkubaten ab. Dieser Effekt wird auf die von Gallelli beschriebene Hydrolyse der Phosphoramid-Bindung zurückgeführt (Gallelli 1967). Die Abnahme der CPA-Konzentration in den aktiven Inkubaten nach 24 Stunden resultiert demnach aus der Biotransformation in den Hepatozyten. Trotz einer anhand der Enzymaktivitätstests nachgewiesenen CYP2B1/2-Induktion wird in den quantitativen Analysen kein erhöhter Umsatz von CPA in den induzierten Inkubaten beobachtet. CYP2B1/2 ist neben 2C6 und 2C11 hauptverantwortlich für die Hydroxylierung von CPA an Position 4 (Clarke und Waxman 1989; Oesch-Bartlomowicz *et al.* 2001). Die berechneten Umsätze von 20 bis 40 % bestätigen die Annahme, dass die nach 48 Stunden auftretende Zytotoxizität auf die Bildung zytotoxischer Metaboliten wie Acr und Phosphoramid Mustard zurückzuführen ist. Der niedrigere relative Umsatz im höher konzentrierten Inkubat basiert auf einer Sättigung der enzymatischen Reaktionen. Absolut steigen die Metabolitenkonzentrationen im Inkubat mit höherer CPA-Konzentration. Die Abnahme der CPA-Konzentration im 0,1 mM-Inkubat ist mit Untersuchungen von van Aerts *et al.* vergleichbar, welche nach einer 18 Stunden-Inkubation von 0,3 mM CPA in unbehandelten primären Rattenhepatozyten einen Umsatz von 50 % beobachten (van Aerts *et al.* 1993). Der Umsatz von 0,1 mM CPA in Leberschnitten ist mit dem aus der Hepatozytenkultur vergleichbar. Jedoch wird ein höherer Umsatz bei 1 mM CPA nachgewiesen, der zeigt, dass sich in diesem System die enzymatischen Reaktionen noch nicht in der Sättigung befinden. Unter der Annahme, dass der Umsatz von CPA vollständig zu Acr erfolgt, kann aufgrund der Ergebnisse aus den Mischungsversuchen in 3T3-Zellen (vgl. Kap. 6.2) und in ESZ-D3 (Daten nicht gezeigt) eine Erhöhung der Zytotoxizität im Vergleich zu reinem CPA erwartet werden.

In WEC-Medium liegt die Wiederfindung von CPA sowohl in nicht-inkubierten Proben als auch in Inkubaten ohne metabolisches System nach 24 Stunden zwischen 50 und 60 %, wodurch im 1 mM-Inkubat kein Umsatz berechnet werden kann. Möglicherweise tritt eine Hydrolyse von CPA unter den gewählten Mediumbedingungen auf. Der Umsatz im 0,1 mM-Inkubat ist mit 18 % geringer als unter Standardbedingungen. Dies könnte auf die im Vergleich zur Postinkubation mit Standardmedium erniedrigte enzymatische Aktivität zurückzuführen sein (vgl. Kap. 6.1.2.1). Auf der Grundlage der analysierten Konzentrationen können in der WEC dennoch Effekte auf die Entwicklung der Embryonen erwartet werden.

Zur detaillierteren Bestimmung der durch die Hepatozyten gebildeten Metaboliten werden auf Basis der 0,1 mM CPA-Inkubate in Standardhepatozytenmedium Strukturaufklärungsanalysen mittels hochauflösender Q-TOF LC/MS und MS/MS durchgeführt, die eine Identifizierung der Summenformel anhand der akkuraten Masse ermöglicht.

Der einzige im TIC-Chromatogramm identifizierbare Metabolit ist Carboxyphosphamid (CPA-M4), dem die CYP2B1/2-abhängige Hydroxylierung an Position 4 und eine anschließende Oxidation des offenen Aldophosphamids durch AIDHs vorausgegangen ist (Zhang *et al.* 2005). Es handelt sich um einen stabilen Metaboliten, den van Aerts *et al.* ebenfalls als Hauptmetaboliten in CPA-Inkubaten aus männlichen primären Rattenhepatozyten identifizierten (van Aerts *et al.* 1995). Alle weiteren CPA-Metaboliten werden aufgrund ihrer geringen Konzentration über die Abfrage der akkuraten Masse nachgewiesen, welche basierend auf den bereits von van Aerts und Zhang publizierten Daten durchgeführt wird (van Aerts *et al.* 1995; Zhang *et al.* 2005). Für Cyclophosphamid, Glutathionylcyclophosphamid (CPA-M3), Carboxyphosphamid (CPA-M4) und Iminocyclophosphamid (CPA-M7) liegen aussagekräftige MS/MS-Spektren vor. Die in Kapitel 5.1.6.1 dargestellten Fragment von CPA werden von MS/MS-Analysen von Liu *et al.* bestätigt (Liu *et al.* 2005). Ein vergleichbares Fragmentierungsmuster weist Iminocyclophosphamid bei RT 11,62 min auf. Glutathionylcyclophosphamid wird über die schrittweise Fragmentierung von Glutathion identifiziert und die Ammoniak- und Acrylsäureabspaltungen im MS/MS-Spektrum von Carboxyphosphamid liefern den Beweis, dass es sich um einen nicht-zyklischen Metaboliten von CPA handelt. CPA-M1, -M2 und -M6 bei RT 4,85 min, 5,63 min und 9,32 min können anhand ihrer akkuraten Masse, eines nachgewiesenen Natrium-Addukts, welche jeweils ein dazugehöriges Chlor-Isotopenmuster liefern, im aktivierten Inkubat identifiziert werden. Obwohl es sich bei 4-Hydroxycyclophosphamid (CPA-M6, RT 9,32 min) um ein instabiles zyklisches Halbaminale handelt, unterstützt der Nachweis der Wasserabspaltung aus dieser Verbindung die Argumentation (vgl. Kap. 12.1.3.1, Massenchromatogramm über m/z 259,0164). Aus dem abiotischen Zerfall von Aldophosphamid entsteht neben Acrolein der sog. Phosphoramid Mustard (CPA-M2), dessen akkurate Masse bei RT 5,63 min gefunden wird. Bei RT 4,85 min wird eine akkurate Masse von m/z 380,1105 detektiert, die auf ein Glutathionaddukt eines von AIDHs gebildeten Oxidationsproduktes von Acrolein schließen lässt. Der Nachweis der akkuraten Masse im negativen ESI-Modus unterstützt dabei die Annahme, dass es sich um ein GSH-Addukt der Propionsäure handelt. Das Postulat wird durch Untersuchungen von Parent *et al.* unterstützt, welche nach oraler und i.v.-Applikation

von Acrolein im Urin von Sprague-Dawley-Ratten N-Acetyl-S-2-Carboxyethylcystein nachgewiesen haben. Dies entspricht der Mercaptursäure der Glutathionylpropionsäure (Parent *et al.* 1998). Es wird angenommen, dass die hohe Flüchtigkeit und die mögliche Bindung an nukleophile Proteine in den Hepatozyten aufgrund der elektrophilen Eigenschaft dazu führen, dass Acr im Überstand nicht nachgewiesen werden kann und damit in den Zielkulturen nicht oder nur in geringer Konzentration verfügbar ist. Da neben der zytotoxischen Wirkung des Acroleins die DNA-schädigende Wirkung des Phosphoramid Mustards (CPA-M2) eine entscheidende Rolle in der Zyto- und Embryotoxizität von CPA spielt (Ozolins 2010), kann, bei ausreichender Konzentration, die Überführung des Medienüberstands dennoch zu einer Erniedrigung der IC₅₀- und ID₅₀-Werte in den Zielkulturen führen. Darüber hinaus wird festgestellt, dass eine Vielzahl weiterer Metaboliten Bestandteile der für die Überführung vorgesehenen Inkubate bilden, welche möglicherweise zusätzlichen Einfluss auf den Nachweis einer metabolischen (De-)Aktivierung haben können. Somit zeigt sich, dass Rattenhepatozyten unter den gewählten Kulturbedingungen über die enzymatische Aktivität zur metabolischen Aktivierung von CPA verfügen.

6.1.3.2 Albendazol und Albendazolsulfoxid

Die getestete Konzentration ABZ von 10 µM, welche keinen zytotoxischen Einfluss auf die Rattenhepatozyten aufweist, wurde aufgrund der IC₅₀-Werte in den Zielkulturen als zu gering bewertet um, bei angenommenem vollständigen Umsatz von ABZ zu ABZSO, die Erniedrigung der Toxizitätspunkte zu erreichen. Die in Folge der Erhöhung der Konzentration auf 25 µM ABZ eintretende Abnahme der Vitalität der Hepatozyten um ca. 30 % innerhalb von 24 Stunden wird unter Berücksichtigung des Umsatzes als akzeptabel bewertet. In Untersuchungen von Baliharova *et al.* und Velik *et al.* wurde auch nach 48 Stunden Inkubation von bis zu 50 µM ABZ in primären Rattenhepatozyten keine Zytotoxizität beobachtet (Baliharova *et al.* 2003a; Velik *et al.* 2003). Die von Baliharova eingesetzte höhere Zelldichte könnte für die geringere Suszeptibilität gegenüber höheren ABZ-Konzentrationen verantwortlich sein (Baliharova *et al.* 2003b). ABZSO zeigt bis 10 µM keine Zytotoxizität. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit Arbeiten von Baliharova *et al.* (Baliharova *et al.* 2003b).

ABZ wird in den gewählten Konzentrationen bereits in der basalen Hepatozytenkultur innerhalb von 24 Stunden vollständig umgesetzt. Dabei werden ca. 7 µM (10 µM-Inkubat) und 16 µM (25 µM-Inkubat) ABZSO gebildet, was einem Anteil von 70 bis 80 % entspricht.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen auch Baliharova et al. und Velik et al. nach 24 und 48 Stunden-Inkubationen von 5 μM und 10 μM ABZ in primären Rattenhepatozyten (Baliharova *et al.* 2003b; Velik *et al.* 2003) Die Inkubation von 10 μM in der Kultur der Leberschnitte führt zu einem mit primären Hepatozyten vergleichbaren Umsatz. ABZSO wird ebenfalls in vergleichbaren Konzentrationen nachgewiesen, sodass unter Berücksichtigung der nötigen Verdünnung im 3T3- und D3-Zytotoxizitäts- und D3-Differenzierungstest eine Erhöhung der IC_{50} - bzw. ID_{50} -Werte durch die Inkubate erwartet werden kann.

Die Induktion steigert die Bildung von ABZSO nicht. Dies könnte sowohl auf die über den Cocktail nicht-induzierbare FMO-Aktivität als auch auf eine für den Testsubstanzumsatz unzureichende Enzyminduktionsperiode von 24 Stunden zurückzuführen sein. Bereits bei CPA konnte kein Effekt auf den Umsatz beobachtet werden. Häufig werden in der Literatur Induktionsperioden von mehr als 48 Stunden gewählt (Hengstler *et al.* 2000a; Wortelboer *et al.* 1991). Eine längere Induktionsperiode könnte jedoch den CYP1A1-abhängigen Abbau des aktiven Metaboliten ABZSO positiv beeinflussen.

Die Überführung der Medienüberstände in die WEC lässt aufgrund des Umsatzes von 56 %, davon 75 % zu ABZSO, eine metabolische Detoxifizierung erwarten. Da die Wiederfindung von ABZ in Inkubaten ohne Zellen mit dem Proteingehalt des Mediums ansteigt, könnte eine mögliche Adhäsion von ABZ an die Collagenbeschichtung oder die Oberfläche der Zellkulturgefäße durch erhöhte Proteinbindung verringert sein. Trotz der niedrigen Wiederfindung in Standardhepatozytenmedium ist davon auszugehen, dass ABZ von den Zellen aufgenommen wird, da deutlich mehr ABZSO gebildet wird, als ABZ nach 24 Stunden im inaktiven Inkubat nachgewiesen werden kann. Eine abiotische Oxidation zu ABZSO erfolgt nicht.

Zur Bestimmung weiterer durch die Hepatozyten gebildeter Metaboliten werden auf Basis der 25 μM ABZ-Inkubate Strukturaufklärungsanalysen mittels Q-TOF LC/MS und MS/MS durchgeführt. Der bereits durch die quantitativen Analysen beschriebene Hauptmetabolit ABZSO wird auch im TIC-Chromatogramm als größter Metabolitenpeak identifiziert. Das Fragmentierungsmuster des Metaboliten ist mit dem von ABZ vergleichbar. Neben der Methanolabspaltung wird sowohl die Abspaltung des Alkylrestes als auch die radikalische Spaltung der Thio-Benzimidazol-Bindung nachgewiesen. Die analysierten Hauptfragmente von ABZ und ABZSO (Fragment 1 bzw. 3, Tabelle 5.16) werden durch massenspektrometrische Analysen von Zhu et al. bestätigt, welche in MRM-Experimenten m/z 234,0 bzw. m/z 208,0 als selektives Fragment zur Quantifizierung von ABZ bzw.

ABZSO heranziehen (Zhu *et al.* 2011). ABZSO wird CYP1A1-abhängig zu ABZSO₂ oxidiert (Baliharova *et al.* 2003c), welches aufgrund der bei ABZ und ABZSO bereits dargestellten charakteristischen Fragmentierung identifiziert wird. Hauptfragment 1 bei m/z 266,0593 wird auch von Zhu *et al.* als selektives Fragment zur Quantifizierung von ABZSO₂ genutzt (Zhu *et al.* 2011).

Neben der in der Literatur beschriebenen Oxidation des Schwefels (Baliharova *et al.* 2003b; Velik *et al.* 2003) können auch Hydroxylierungsprodukte nachgewiesen werden. Von ABZ wird eine Hydroxy-Verbindung identifiziert. Während im MS/MS-Spektrum sowohl eine Wasser- als auch Cyclopropanol-Abspaltung eine C-Hydroxylierung vermuten lässt, liefert die Fragmentierung keine Hinweise auf die Position der Hydroxylgruppe. Das β -C-Atom ist für eine Oxidation aufgrund eines stabileren Übergangszustandes gegenüber der ω -Position bevorzugt. Infolge der Identifikation des bisher nicht publizierten 3-Carboxy-ABZ (ABZ-M6) kann eine Hydroxylierung in ω -Position dennoch nicht ausgeschlossen werden. Eine schnelle, von ADH und AIDH katalysierte Oxidation könnte die Erklärung für das Auffinden von nur einem Hydroxy-ABZ-Isomer sein.

Die Konjugation mit Sulfat oder Glucuronsäure könnte zusätzlich eine Konkurrenzreaktion zur Oxidation darstellen und bevorzugt an ω -Hydroxy-ABZ erfolgen, da auch hier nur je ein Isomer nachgewiesen wird. Eine Konjugation an 2-Hydroxy-ABZ kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Das Postulat, dass es sich bei der Oxo-Verbindung (ABZ-M7) bei RT 8,80 min um 2-Oxo-ABZ handelt, basiert auf der Bildung von 2-Hydroxy-ABZ, welches möglicherweise langsamer ADH-abhängig oxidiert oder konjugiert wird. Die Hydroxylierung der elektronenreichen α -Position zum Schwefel wird durch den Nachweis von 6-Mercapto-ABZ (ABZ-M10) bestätigt, dem Produkt der oxidativen Desalkylierung des Alkylthioethers. (Eisenbrand *et al.* 2005b)

Von Hydroxy-ABZSO werden im Unterschied zu Hydroxy-ABZ zwei Isomere in unterschiedlicher Intensität nachgewiesen. Das MS/MS-Spektrum weist korrespondierende Fragmente zu Hydroxy-ABZ auf, lässt aber keine Aussage über die Positionen der Hydroxylgruppe zu. Anhand von Untersuchungen von Hennessy kann vermutet werden, dass es sich beim größeren Anteil um 2-Hydroxy-ABZSO handelt (Hennessy *et al.* 1989). Hennessy weist nach oraler Applikation von ABZ an Schafen sowohl 2-Hydroxy-ABZSO als auch 2-Hydroxy-ABZSO₂ und deren Konjugate als biliäre Hauptmetaboliten nach (Hennessy *et al.* 1989). Da sich im Fall von Diastereomeren vermutlich nur die Position der Methylgruppe ändert, die RT sich aber mit 2 min deutlich voneinander unterscheiden, wird eine ω - und (ω -1)-Hydroxylierung von ABZSO postuliert. Konjugate von Hydroxy-ABZSO

werden nicht gefunden. Das durch eine Carbamat-Hydrolyse gebildete ABZ-2-Aminosulfoxid (ABZ-M1) wird durch Untersuchungen von Gyurik bestätigt (Gyurik *et al.* 1981). Die Konjugation von ABZ mit Glucuronsäure kann aufgrund des Nachweises von drei Isomeren an den drei N-Atomen beschrieben werden. Diese Metaboliten wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Albendazol wird von primären Rattenhepatozyten unter basalen Bedingungen innerhalb von 24 Stunden vollständig umgesetzt. Ein Unterschied zur Inkubation unter induzierten Bedingungen besteht nicht. Als Hauptmetabolit entsteht ABZSO, gefolgt von den Hydroxymetaboliten von ABZ und ABZSO. Damit ist das metabolische Profil von ABZ mit dem des Menschen vergleichbar, in dem ABZSO in Plasma, Urin und Galle nach oraler Aufnahme den größten Anteil bildet (Marriner *et al.* 1986). Unter den gewählten Bedingungen sind primäre Rattenhepatozyten dazu geeignet, den humanen Metabolismus von ABZ abzubilden. Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 5.2.2 wird eine metabolische Deaktivierung im EST und der WEC erwartet.

6.1.3.3 Valpromid und Valproinsäure

Valpromid und Valproinsäure werden für 24 und 48 Stunden bis zu einer Konzentration von 1 mM ohne Beeinträchtigung der mittels MTT-Test erhobenen Vitalität in primären Rattenhepatozyten inkubiert. Im Hinblick auf die in den Zielkulturen erhobenen IC_{50} -Werte (vgl. Kap. 5.2.2) wird die VPD-Konzentration in Hepatozyten als zu gering angesehen. Durch die begrenzte Löslichkeit von VPD im Kulturmedium ist eine Inkubation bis 4 mM möglich, welche nach 48 Stunden keinen Einfluss auf die Vitalität der Rattenhepatozyten hat. Die mittels WST-1-Test erhobene Vitalität primärer Rattenhepatozyten fällt in Untersuchungen von Kiang *et al.* nach einer 24 Stunden Inkubation von 1 mM VPA bereits um 50 % (Kiang *et al.* 2010). Die Verwendung verschiedener Zelldichten und Kultursysteme (Monolayer vs. Sandwich-Kultur) wird für die unterschiedlichen Sensibilitäten der Hepatozyten gegenüber VPD verantwortlich gemacht.

Die quantitativen Analysen zeigen, dass VPD in Standardhepatozyten- und WEC-Medium über 48 Stunden stabil ist. Unter basalen Bedingungen kann ein 30 %iger Umsatz von 1 mM VPD ermittelt werden, der nach 48 Stunden zum Nachweis von 13,8 μ M VPA führt. Dieses Ergebnis ist mit Untersuchungen von Binder vergleichbar, der nach einer 48 Stunden-Inkubation von 0,4 mM VPD in HepG2-Zellen 12 μ M VPA nachweist (Binder 2008). Der Einsatz von 4 mM VPD hat einen geringeren relativen Umsatz zur Folge, welcher auf eine Substrathemmung zurückgeführt werden kann. VPD-Konzentrationen

größer 0,5 mM führen in den Arbeiten von Hettwer et al. ebenfalls zu einem verringerten Nachweis von VPA (Hettwer *et al.* 2010). In den vorliegenden Untersuchungen wird VPA weder unter basalen noch unter induzierten Bedingungen nach 24 Stunden nachgewiesen. Da die Enzyme, die für die Hydrolyse von VPD verantwortlich sind, noch nicht identifiziert wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Umsatzsteigerung durch die Induktion zu erwarten ist. In Leberschnitten wird kein Umsatz von VPD beobachtet, was auf eine unzureichende Verteilung von VPD in den Schnitten innerhalb von 24 Stunden zurückgeführt wird. Unter WEC-Mediumbedingungen kann ebenfalls kein Umsatz berechnet werden. Die Simulation eines Umsatzes von VPD zu VPA im 3T3-Zytotoxizitätstest hat gezeigt, dass ein Umsatz von 50 % zu VPA notwendig ist, um eine signifikante Erniedrigung des IC₅₀-Wertes zu erreichen (vgl. Kap. 5.2.2). Da die VPA-Konzentration nach 48 Stunden 0,8 % des IC₅₀-Wertes von VPA beträgt, wäre bei einer Überführung des 48 Stunden-Inkubats nicht mit einer Erhöhung der Zytotoxizität zu rechnen.

Anhand der metabolischen Profile aus den Strukturaufklärungsanalysen, welche auf den 4 mM Inkubaten basieren, wird deutlich, dass durch CYP-Enzyme gebildete Isomere von Hydroxy-VPD den größten Anteil gebildeter Metaboliten darstellen. Eines der Isomere wird möglicherweise bevorzugt von ADHs zu Oxo-VPD oxidiert. Außerdem kann eine N-Glucuronsäure-Konjugation anhand der spezifischen Abspaltung des Konjugats in den MS/MS-Experimenten detektiert werden. Der Nachweis eines N-Glucuronids liefert Hinweise darauf, dass die Induktion der Hepatozyten im Fall von VPD nicht zur Bildung von VPA sondern der Konjugation von VPD mit Glucuronsäure führt.

Eine O-Konjugation von VPA wird von Dickinson et al. beschrieben (Dickinson *et al.* 1979). Sie wird im Rahmen dieser Arbeit, möglicherweise aufgrund zu geringer VPA-Konzentration oder Konkurrenzreaktionen wie der mitochondrialen β -Oxidation, nicht nachgewiesen. Sowohl von VPD als auch von VPA werden drei von fünf möglichen Dehydrierungsprodukten nachgewiesen. Dies könnte in einer nicht vollständigen chromatographischen Auftrennung der E/Z-Isomere begründet sein. Sie können sowohl CYP-katalysiert im ER als auch über die β -Oxidation in den Mitochondrien gebildet werden (Jurima-Romet *et al.* 1996; Omtzigt *et al.* 1992). 4-en-VPA bildet den Vorläufer von 2,4-dien-VPA, welches wiederum mit GSH konjugiert werden kann. Vier Isomere eines GSH-Addukts von VPA werden anhand der charakteristischen Fragmentierung von Glutathion nachgewiesen. Fragmente 1 und 2 (vgl. Tabelle 5.17) werden von LC-MS/MS- Analysen von Tang und Abbott bestätigt (Tang und Abbott 1996). Der Nachweis von VPA-Metaboliten verdeutlicht, dass VPA von den Rattenhepatozyten weiter verstoffwechselt wird und somit nur in geringer Konzentration

im Überstand vorliegt. Die Induktion hat aufgrund der Induktion von Phase-II-Enzymen eine erhöhte Bildung des N-Glucuronids von VPD zur Folge, welche möglicherweise eine Konkurrenzreaktion zur Bildung von VPA darstellt. Eine Aussage, ob das ebenfalls embryotoxische S-4-en-VPA im Überstand vorliegt, kann nicht getroffen werden (Eikel *et al.* 2006b). Die zellulären Leber-*in vitro*-Systeme der Ratte sind demnach nicht zur metabolischen Aktivierung von VPD geeignet. Unklar bleibt, durch welche Enzyme die Hydrolyse von VPD zu VPA, wie sie *in vivo* beobachtet wird, stattfindet und warum dies in Hepatozytenkulturen *in vitro* nur zu einem geringen Teil erfolgt. Unter den gewählten Bedingungen ist eine Erniedrigung der Endpunkte im EST und der WEC nicht zu erwarten.

6.1.3.4 2-Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-2-Acetylaminofluoren

Die Hepatotoxizität von 2-AAF und NOH-AAF im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 μM wird in primären Hepatozyten nach 24 und 48 Stunden erhoben. Nach 24 Stunden wird bei einer 2-AAF-Konzentration von 10 μM ein Rückgang der Vitalität um ca. 30 % der Kontrolle beobachtet. Dagegen bewirkt bereits 1 μM NOH-AAF eine Abnahme um 70 % im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Arbeit von Holme und Soderlund, in der NOH-AAF im Vergleich zu 2-AAF nach ca. 19 Stunden in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 100 μM zu einem Anstieg des LDH-Spiegels im Überstand primärer Rattenhepatozyten führt (Holme und Soderlund 1985).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Inkubation von 2-AAF in für den Nachweis einer metabolischen Aktivierung im 3T3-Zytotoxizitätstest ausreichend hoher Konzentration von ca. 100 μM in primären Rattenhepatozyten ohne zytotoxischen Effekt nicht möglich ist. Die Wiederfindung von 10 μM 2-AAF in Hepatozytenmedium beträgt in der nicht-inkubierten Probe ca. 60 % und weist auf eine unzureichende Löslichkeit hin. Im Leberschnittinkubat tritt die Präzipitation von 2-AAF möglicherweise aufgrund des Serumgehalts des Mediums nicht auf. Da weder im MTT-Test, noch anhand des LDH- und ALT-Spiegels im Überstand ein zytotoxischer Effekt durch 2-AAF nach 24 Stunden beobachtet wird, stellen Leberschnitte ein alternatives *in vitro*-Biotransformationssystem zur metabolischen Aktivierung von 2-AAF dar. Die geringere Suszeptibilität der Leberschnitte gegenüber höheren 2-AAF-Konzentrationen wird auf das Metabolitenprofil zurückgeführt. Da die Biotransformation von 2-AAF und die Bildung zytotoxischer Metaboliten von dessen Kinetik abhängig sind, wird vermutet, dass aufgrund der langsameren Verteilung im Gewebe der Leberschnitte ein anderes, weniger zytotoxisches Metabolitenprofil entsteht als in der Einzelzellkultur.

Die quantitativen Analysen ergeben sowohl für die Hepatozyten- als auch für die Leberschnittkultur einen vergleichbaren 2-AAF Umsatz von 80 bis 100 %. Der ausgewählte Referenzmetabolit NOH-AAF kann in den Inkubaten nicht erfasst werden. Die in Rattenhepatozyten auftretende Zytotoxizität wird dennoch auf die metabolische Aktivierung von 2-AAF und damit der Bildung zytotoxischer Metaboliten, darunter NOH-AAF zurückgeführt. Ein einprozentiger Umsatz von 10 μM 2-AAF zu NOH-AAF würde ausreichen, um zu einer Abnahme der Vitalität um ca. 30 % nach 24 Stunden zu führen. Darüber hinaus besitzen weitere, in der Literatur beschriebene 2-AAF-Metaboliten männlicher Rattenhepatozyten wie der Sulfatester von NOH-AAF, 2-AF und dessen N-Hydroxy-Derivat sowie 2-AAF zytotoxisches Potenzial und tragen außerdem zur embryotoxischen Wirkung bei (Dybing *et al.* 1979; Faustman-Watts *et al.* 1983; Faustman-Watts *et al.* 1984a; Heflich und Neft 1994; Kriek 1992). Die Embryo- und Zytotoxizität beruht auf der hohen Reaktivität der genannten Metaboliten gegenüber nukleophilen Proteinen und DNS-Basen, die zur Bildung von Addukten und damit zur Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels und der embryonalen/fetalen Entwicklung führt (Faustman-Watts *et al.* 1984b; Heflich und Neft 1994).

Zur Bestimmung weiterer 2-AAF-Metaboliten werden Strukturaufklärungsanalysen mittels Q-TOF LC/MS und MS/MS durchgeführt. Dazu wird das Inkubat der Hepatozytenkultur herangezogen, welches ohne die Präzipitation des Mediumproteins und einem möglichen Verlust von Metaboliten in die HPLC injiziert werden kann. Basierend auf bereits publizierten Daten von Heflich und Neft werden 2-AAF-Metaboliten aufgrund ihrer z.T. geringen Konzentration über ihre akkurate Masse identifiziert (Heflich und Neft 1994).

2-AAF wird anhand der Keten- und darauffolgenden Ammoniakabspaltung identifiziert. Daneben wird eine radikalische Fragmentierung über die Abspaltung eines Acetyl- und Cyanidradikals beobachtet. Vergleichbare Fragmente detektieren Möller und Gustafsson bei LC-MS/EI-Analysen von 2-AAF (Moeller und Gustafsson 1986).

In den Strukturaufklärungsanalysen kann NOH-AAF ebenfalls nicht nachgewiesen werden. In Arbeiten von Holme *et al.* kann nach dreistündiger Inkubation von 0,1 bis 0,5 mM 2-AAF ebenfalls kein NOH-AAF im Überstand primärer Rattenhepatozyten detektiert werden (Holme *et al.* 1986). Darüber hinaus können auch die in der Literatur beschriebenen 3-, 5-, 7- oder 9-Hydroxy-2-AAF-Isomere nicht detektiert werden (Diez Ibanez *et al.* 1989; Dybing *et al.* 1979). Dagegen wird das Deacetylierungsprodukt von 2-AAF, 2-AF und vier Hydroxy-2-AF-Isomere nachgewiesen.

2-AF (2-AAF-M4) wird sowohl anhand einer Methylradikal-Abspaltung, bei der es sich vermutlich um C9 handelt, und einer übergeordneten Ammoniakabspaltung identifiziert. Die Auswertung der Fragmentierung der Hydroxy-2-AF-Metaboliten führt aufgrund einer Hydroxylradikal-Abspaltung, wie sie im NOH-AAF-Standard und in Arbeiten von Iorio *et al.* ebenfalls beobachtet wird, und einer darauffolgenden Cyanwasserstoff-Abspaltung zu der Annahme, dass es sich bei Isomer 2 um NOH-AF handelt (Iorio *et al.* 1985). Die im Vergleich zu den weiteren Hydroxy-AF-Isomeren geringe Intensität von NOH-AF deutet auf dessen hohe Reaktivität hin, welche dazu führt, dass dieser Metabolit im Überstand nur in geringen Konzentrationen vorliegt. Die Vermutung, dass es sich bei Isomer 4 aufgrund einer ebenfalls vorhandenen Hydroxylradikal-Abspaltung um ein N-Hydroxy-Derivat handelt wird durch die Anwesenheit des Fragments 1 (vgl. Tabelle 5.19) widerlegt, welches aus einer Methylimin-Abspaltung und damit aus einer Stickstoffabspaltung aus dem Molpeak hervorgeht. Die möglichen Positionen der Hydroxylgruppe im Isomer 1 und 4 können aufgrund des positiven mesomeren Effekts der Aminogruppe am Fluoren, welcher die Elektronendichte im Ring erhöht, auf die ortho- und para-Positionen (1, 3, 5 oder 7) beschränkt werden (Dybing *et al.* 1979). Die Fragmentierung des Isomers 3 führt in Analogie zur radikalischen Fragmentierung an C9 von 2-AF zu der Annahme, dass sich die Hydroxylgruppe am C9 des 2-AF befindet. Fragment 3 (vgl. Tabelle 5.19) wird in Analysen von Hydroxy-2-AAF-Isomeren von Möller und Gustafsson ebenfalls ausschließlich für 9-OH-AAF detektiert (Moeller und Gustafsson 1986).

Die fehlende Detektion von Hydroxy-2-AAF-Metaboliten wird sowohl auf eine hohe Deacetylase-Aktivität, die zur Bildung der Hydroxy-AF-Metaboliten führt, als auch auf die Aktivität der UGT und SULT zurückgeführt, die bereits im Metabolitenprofil von Testosteron gezeigt werden konnte.

Die Summenformeln von vier Glucuroniden und einem Sulfatester von Hydroxy-2-AAF werden nachgewiesen. In den MS/MS-Spektren der Glucuronide werden Fragmente unterschiedlicher Masse/Ladungs-Verhältnisse beobachtet, welche die Position des Konjugats vermuten lassen. Im Spektrum des Isomers 1 bei RT 8,38 min zeigen sich nach der Abspaltung der Glucuronsäure zwei Fragmente, welche aus einer Keten- und Hydroxylradikal-Abspaltung hervorgehen, wie sie im analysierten NOH-AAF-Standard ebenfalls vorliegt. Aufgrund dieser Analogie wird angenommen, dass es sich um das N-O-Glucuronid von 2-AAF handelt. Die möglichen Positionen des Konjugats in den Isomeren 2, 3 und 4 können aufgrund der bevorzugten Hydroxylierung auf C1, 3, 5, 7 und 9 beschränkt werden. Bei Isomer 2 ist eine N-Glucuronidierung von Hydroxy-2-AAF möglich. Eine

Aussage über die Position des Sulfatesters kann anhand der vorliegenden Fragmentierung nicht getroffen werden. Ebenso wie bei den Glucuroniden könnte sie sich in Position 1, 3, 5, 7, oder 9 befinden.

Neben freien Hydroxy-2-AF-Isomeren werden drei Isomere eines Glucuronsäurekonjugats und ein Sulfatester nachgewiesen (2-AAF.M1 und -M5). Isomer 2 der Glucuronide von 2-AF zeigt eine der Konjugatabspaltung nachgeschaltete Hydroxylradikal-Abspaltung (vgl. 2-AAF-M3.1). Möglicherweise handelt es sich um das N-O-Glucuronid von 2-AF. In Isomer 3 bildet Fragment 2 (vgl. Tabelle 5.19), welches aus der vollständigen Abspaltung der Glucuronsäure (194) hervorgeht, die stabilste Verbindung. Da diese Abspaltung hauptsächlich in acylischen und benzylichen Positionen beobachtet wird, wird angenommen, dass es sich um ein Konjugat von 9-OH-2-AF handelt. In Isomer 1 wird an Stelle einer Wasser- oder Hydroxylradikal-Abspaltung eine Ammoniakabspaltung beobachtet, welche zu der Annahme führt, dass sich ein mögliches O-Glucuronid an Position 5 oder 7 befindet. An diesen Positionen ist eine Wasserabspaltung ohne die Zerstörung des aromatischen Systems nicht möglich, welche als unwahrscheinlich betrachtet wird. In Isomer 1 kann ein N-Glucuronid von Hydroxy-2-AF nicht ausgeschlossen werden.

Anhand des vorliegenden Fragmentierungsspektrums kann über die Position des Sulfatesters am 2-AF keine Aussage getroffen werden. Aufgrund der bevorzugten Hydroxylierung an C1, 3, 5, 7 und 9 werden diese Positionen als wahrscheinlich betrachtet. Ein NOH-Sulfatester wird sowohl für 2-AAF als auch für 2-AF aufgrund der kleinen Halbwertszeit ausgeschlossen (Heflich und Neft 1994). Der Nachweis von je einem Sulfat-Konjugat im Vergleich zu drei respektive vier Glucuronsäurekonjugaten von Hydroxy-2-AF und -2-AAF wird auf die geringere Kapazität der SULT aufgrund des in engen Grenzen zur Verfügung stehenden Kofaktors 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) zurückgeführt. Die Konjugation mit Glucuronsäure ist bei höheren Substratkonzentrationen die bevorzugte Konjugationsform (Eisenbrand *et al.* 2005b).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die aktiven Metaboliten von 2-AAF, NOH-AF und NOH-AAF und deren Sulfatester sowie 2-AAAF, im Medienüberstand primärer Hepatozyten nicht nachgewiesen werden können. Da Ring-hydroxylierte Metaboliten und Konjugate als deaktivierende Biotransformationsreaktionen betrachtet werden, wird auf Basis der analysierten Metaboliten weder in 3T3-Zellen noch in den Differenzierungsendpunkten des EST und der WEC der Nachweis einer metabolischen Aktivierung erwartet (Diez Ibanez *et al.* 1989). Die fehlende Bildung embryo- oder zytotoxischer 2-AAF-

Metaboliten im Überstand primärer Rattenhepatozyten wird sowohl auf deren Reaktivität als auch auf die speziesspezifische Biotransformation zurückgeführt, die dazu führt, dass aktive Metaboliten bereits in der Zelle an Nukleophile addieren oder konjugiert werden und somit nur in geringen Konzentrationen im Überstand vorliegen. Obwohl in Leberschnitten eine langsamere Verteilung des Substrats und somit ein verändertes Metabolitenprofil nach 24 Stunden zu erwarten ist, wird angenommen, dass aufgrund der gleichen Spezies auch in diesem Biotransformationssystem keine embryo- und zytotoxische Metaboliten im Überstand vorliegen.

6.2 Untersuchung der Proteratogene und Teratogene im 3T3-Zytotoxizitätstest

Vor der Überführung der Medienüberstände aus den Hepatozytenkulturen in die Zielkulturen erfolgt die Bestimmung der Halbhemmkonzentrationen der Testsubstanzen im 3T3-Zytotoxizitätstest. Die Untersuchung erfolgt sowohl nach dem ECVAM-validierten zehntägigen Standardprotokoll (Genschow *et al.* 2004) als auch nach der von Buesen *et al.* publizierten verkürzten Methode, welche die Bestimmung der Zytotoxizität an Tag 7 vorsieht (Buesen *et al.* 2009). Die daraus resultierenden Ergebnisse werden im Gegensatz zu den an Tag 10 erhobenen IC_{50} -Werten als valide bewertet, da anhand von Wachstumskurven ermittelt wurde, dass sich die Kontrollzellen an Tag 7 bereits in der Konfluenz befinden. Die Untersuchung der ausgewählten Pro- und Teratogene in definierten Mischungen dient dazu, die zur Erhöhung bzw. Erniedrigung der Zytotoxizität notwendigen Umsätze der Testsubstanzen in den Hepatozyten abschätzen zu können.

Die Halbhemmkonzentration von CPA nach sieben und zehn Tagen beträgt ca. 2 mM und ist damit geringer als in den Arbeiten von Bremer *et al.* und Hettwer *et al.*, die bis zu einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ (3,5 mM) keine zytotoxische Wirkung auf die 3T3-Zellen feststellen konnten (Bremer *et al.* 2002; Hettwer *et al.* 2010). Dieser Effekt ist möglicherweise auf die eingesetzte Zellpassage und den Testsubstanzenansatz zurückzuführen. Eine daraus folgende fehlerhafte Vorhersage durch das Prädiktionsmodell im EST ist aufgrund der hohen Konzentration nicht zu erwarten. Der um den Faktor 1000 geringere IC_{50} -Wert von Acr bildet eine für den Erfolg einer metabolischen Aktivierung bevorzugte Grundlage, da eine vergleichsweise geringe Bildung des Metaboliten ausreicht, um eine Erhöhung der Zytotoxizität zu erzielen. In Mischungsversuchen von CPA und Acr

wird dieser Umsatz simuliert. Eine signifikante Erniedrigung des IC_{50} -Wertes kann bei einem angenommenen CPA-Umsatz von 20 % zu Acr erreicht werden. Da der Umsatz in den Hepatozyten zwischen 25 und 40 % beträgt, Acr aber nicht nachgewiesen werden kann, bleibt offen, ob die Konzentration des neben Acr für die Zytotoxizität und Embryotoxizität verantwortlichen Phosphoramid Mustards ausreicht, um die Erniedrigung des IC_{50} -Wertes zu erreichen. Darüber hinaus wird beobachtet, dass die Zytotoxizität von Acr in Anwesenheit von variablen Konzentrationen CPA geringer ausfällt, sodass neben der Konzentration des aktiven Metaboliten auch die verbleibende Konzentration des Proteratogens oder weiterer Metaboliten den Effekt in den Zielkulturen beeinflussen kann.

Die ermittelten IC_{50} -Werte von ABZ und ABZSO an Tag 7 sind mit den Werten von Tag 10 vergleichbar. Bei der Untersuchung stellt sich heraus, dass ABZ ein zytotoxischeres Potenzial besitzt als ABZSO. Vergleichbare Beobachtungen machen Kaltenhäuser et al. und Binder im D3-Differenzierungstest des EST und in der WEC (Binder 2008; Kaltenhäuser *et al.* 2010). Auch im Zebrafisch-Embryotoxizitätstest und im Micromass Test besitzt ABZ im Vergleich zu ABZSO die größere embryotoxische Potenz (Carlsson *et al.* 2011; Whittaker und Faustman 1991). Die in dieser Arbeit ermittelten IC_{50} -Werte von ABZ und ABZSO sind mit denen von Binder vergleichbar (Binder 2008). Folgender Erklärungsansatz für die Diskrepanz zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Daten wird diskutiert: Die embryotoxische Wirkung von ABZSO *in vivo* wird auf den „First-Pass-Effekt“ von ABZ und die Plasmakonzentration des Hauptmetaboliten ABZSO zurückgeführt (Cristofol *et al.* 1997; Delatour *et al.* 1984). In *in vivo*-Studien von Cristofol et al. ist ABZ nach 6 Stunden im Plasma nicht mehr nachweisbar, kann jedoch sowohl im Embryo als auch im Amnion nachgewiesen werden, sodass eine Beteiligung von ABZ an der Entstehung von Missbildungen nicht ausgeschlossen werden kann (Cristofol *et al.* 1997). Sowohl ABZ als auch ABZSO besitzen eine Affinität zu Tubulin und führen zu Proliferationsinhibition embryonaler und adulter Zellen (Lacey und Watson 1985; Rolin *et al.* 1989a). Darüber hinaus sind metabolisch kompetente Zellen gegenüber ABZ weniger sensitiv als metabolisch inkompetente Zellen, was zur Annahme führt, dass es sich bei der Oxidation zu ABZSO um eine metabolische Entgiftung handelt (Rolin *et al.* 1989a). Die Ergebnisse der *in vitro*-Tests werden von Whittaker et al. auf eine verringerte Penetration von ABZSO in die Zelle aufgrund der höheren Polarität des Sulfoxids und einer daraus resultierenden Reduktion der Interaktion mit den Zielproteinen zurückgeführt (Whittaker und Faustman 1991).

Die Simulation des Umsatzes von ABZ zu ABZSO in den Mischungsversuchen ergibt, dass ein 80%iger Umsatz notwendig ist, um eine Erniedrigung der Zytotoxizität zu erzielen. Diese kann auf der Grundlage der quantitativen Analysen erwartet werden. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der Mischungen, dass bei gleichbleibender ABZ-Konzentration ein steigender Anteil ABZSO keinen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von ABZ hat. Im umgekehrten Fall wird ab einem Anteil von 10 % ABZ eine zunehmende Zytotoxizität bei gleichbleibender nicht-zytotoxischer ABZSO-Konzentration beobachtet. Dieser Effekt könnte auf die von Whittaker et al. publizierte Theorie der, verglichen mit ABZ, geringeren Aufnahme von ABZSO in die Zelle zurückgeführt werden (Whittaker und Faustman 1991). Somit besitzt das bei unvollständigem Umsatz in der Hepatozytenkultur verbleibende ABZ noch einen Einfluss auf die Vitalität der 3T3-Zellen.

Die an Tag 7 und 10 erhobenen IC_{50} -Werte von VPA betragen $1,7 \pm 0,7$ mM bzw. $2,5 \pm 0,7$ mM und stimmen mit den Werten, die in der ECVAM-Validierungsstudie sowie von Buesen et al. und Riebeling et al. erhoben wurden, überein. (Buesen et al. 2009; Genschow et al. 2004; Riebeling et al. 2011) Bei der Inkubation von VPA wird im Konzentrationsbereich von ca. 0,6 bis 1,2 mM ein formaler Anstieg der mittels MTT-Test erhobenen Vitalität auf 140 % der Kontrolle beobachtet, welcher in publizierten Konzentrations-Wirkungskurven von VPA ebenfalls auftreten (Binder 2008; Buesen et al. 2009; Festag et al. 2007; Hettwer et al. 2010). Möglicherweise kommt es aufgrund der β -Oxidation von VPA zu ungesättigten Säurederivaten zu einer Beeinflussung der mitochondrialen Enzymaktivität, welche zur Vitalitätsbestimmung genutzt wird (Omtzigt et al. 1992). Die Inkubation von VPD führt dagegen nicht zu einer Vitalität größer 100 % der Kontrolle. Ein IC_{50} -Wert von VPD kann unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht ermittelt werden. Bis zu einer VPD-Konzentration von 3,5 mM ist eine Vitalitätsabnahme von 30 bis 35 % der Kontrolle zu beobachten. Die von Hettwer et al. maximal eingesetzte VPD-Konzentration von 2,1 mM führt zu einer Vitalitätsabnahme von ca. 15 %, welches in Übereinstimmung mit der in dieser Arbeit getroffenen Beobachtung ist (Hettwer et al. 2010). Die Mischungsversuche zeigen, dass ab einem 50%igen Umsatz von VPD zu VPA eine Erniedrigung des IC_{50} -Wertes erreicht werden kann. Da in der Hepatozytenkultur innerhalb von 24 Stunden der Umsatz von 1 mM VPD ca. 30 % beträgt und VPA nicht nachgewiesen werden kann, ist unter Berücksichtigung einer möglichen Zytotoxizität der über die Strukturaufklärung identifizierten Metaboliten nicht mit einer Erfassung einer metabolischen Aktivierung in den Zielkulturen zu rechnen. Der überwiegende Einfluss der VPA-

Konzentration in den Mischungen auf die Vitalität der 3T3-Zellen kann über den gesamten Konzentrationsbereich festgestellt werden. Bei konstanter, nicht-zytotoxischer VPD-Konzentration nimmt die Vitalität mit steigender VPA-Konzentration ab. Umgekehrt kann keine Erhöhung der Vitalität bei steigendem Anteil VPD und konstanter VPA-Konzentration festgestellt werden. Bei ausreichender Bildung von VPA hätte im Unterschied zu CPA die im Inkubat verbleibende VPD-Konzentration vermutlich nur einen geringen Einfluss auf die Vitalität der 3T3-Zellen.

Die Embryotoxizität von 2-AAF wurde bisher *in vitro* im Zebrafisch-Test und in der WEC mit dem Zusatz einer S9-Fraktion und entsprechenden Kofaktoren untersucht (Faustman-Watts *et al.* 1983; HISAOKA 1958). Im Rahmen des BMBF-Projektes werden 2-AAF und der aktive Metabolit NOH-AAF erstmalig im EST eingesetzt. Im 3T3-Zytotoxizitätstest ist NOH-AAF um den Faktor 6 zytotoxischer als 2-AAF. Die IC_{50} -Werte von Tag 7 sind mit den Werten von Tag 10 vergleichbar. Aus den Mischungsversuchen resultiert ein notwendiger 2-AAF-Umsatz von 50 % zu NOH-AAF, um den IC_{50} -Wert zu erniedrigen. Da 2-AAF in Rattenhepatozyten und -leberschnitten vollständig umgesetzt wird, NOH-AAF aber nicht nachgewiesen werden kann, bleibt offen, ob die identifizierten Metaboliten im Inkubat, welche ebenfalls embryotoxische Wirkung besitzen, eine Zunahme der Zytotoxizität hervorrufen können (Faustman-Watts *et al.* 1985; Faustman-Watts *et al.* 1984a). Wie im Fall von VPD besitzt der Metabolit in den Mischungen einen größeren Einfluss auf die Vitalität der 3T3-Zellen. Im Fall einer ausreichend hohen Konzentration NOH-AAF hätte eine verbleibende AAF-Konzentration im Inkubat vermutlich nur einen geringen Einfluss auf die Vitalität der 3T3-Zellen.

Die Zytotoxizitätsdaten zeigen, dass mit Ausnahme von CPA und VPA, welche im millimolaren Konzentrationsbereich größere Schwankungen aufweisen, die IC_{50} -Werte von Tag 7 mit den Werten von Tag 10 vergleichbar sind. Das Ergebnis wird durch Untersuchungen von zehn Testsubstanzen im verkürzten EST von Buesen *et al.* bestätigt (Buesen *et al.* 2009). Die Verkürzung des Protokolls um drei Tage hat keinen Einfluss auf die Vorhersagekraft des Prädiktionsmodells und wird auf Basis der Wachstumskurve der 3T3-Zellen als valide bewertet. Daraus folgt, dass die Zytotoxizität der Inkubate aus den Hepatozytenkulturen ausschließlich an Tag 7 erhoben wird. Der Erfolg des Nachweises einer metabolischen (De-)Aktivierung hängt dabei wesentlich von den IC_{50} -Werten der Pro- und Teratogen ab. Je größer ihr Abstand ist (> Faktor 10), desto geringere Umsätze in den

Hepatozytenkulturen sind notwendig, um eine Zunahme (oder Abnahme) der Zytotoxizität zu erreichen. Der Nachweis einer metabolischen Aktivierung für CPA sollte basierend auf diesen Daten leichter erbracht werden können als für VPD.

6.3 Überführung von *in vitro*-Metabolismusinkubaten in den EST und die WEC

Die Kombination eines zellulären Biotransformationssystems mit den *in vitro*-Embryotoxizitätstests EST und WEC erfordert die Anpassung der Kulturbedingungen. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Präinkubationsmethode für den 3T3-Zytotoxizitätstest beruht, unter Zumischung verschiedener Anteile frischen Mediums, auf der Toleranz der 3T3-Zellen gegenüber inkubiertem Hepatozytenmedium. Somit können Inkubate aus Standardhepatozytenkulturen zur Überführung genutzt werden. Das außerdem untersuchte DMEM-Medium, welches in 3T3-Zellen eingesetzt wird, führt in vergleichbaren Mischungen zu einer geringeren Vitalität der Zellen. Der generell niedrigere Nährstoffgehalt des Mediums, welcher aufgrund der hohen Stoffwechselaktivität der Hepatozyten während der Kulturperiode weiter abnimmt, wird für die geringere Toleranz verantwortlich gemacht. Eine höhere Toleranz gegenüber inkubiertem WME-Medium wird bei der Überführung in den D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest ebenfalls festgestellt. Die Filtration des Medienüberstandes nach der Testsubstanzinkubation dient zur Abtrennung abgestorbener Hepatozyten und Zelltrümmer, welche die Proliferation und Vitalität der Zielzellen einschränken können. Im Rahmen dieser Arbeit kann keine Beeinträchtigung der Filtration auf die Konzentration der Testsubstanzen oder deren Metaboliten festgestellt werden. Analytische Untersuchungen zur Überprüfung der Stabilität der Testsubstanz werden im Laufe der Testperiode durchgeführt. Die Induktion der Hepatozyten führt neben der Steigerung der fremdstoffmetabolisierenden Aktivität zu einer höheren Toleranz der 3T3- und D3-Zellen gegenüber Inkubaten aus der Postinduktionsperiode. Dieser Effekt wird auf das Glucocorticoid Dexamethason zurückgeführt, welches nekrotische Prozesse und das Absterben der Hepatozyten verringert und damit eine höhere Reinheit des Medium für die Überführung garantiert. In den Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest in D3-Zellen können ausschließlich Inkubate aus der induzierten Hepatozytenkultur zu einem Anteil von 40 % (v/v) eingesetzt werden.

Bei der Überführung der Medienüberstände aus den drei Hepatozytenspezies in die 3T3-Kultur wird eine unterschiedliche Toleranz der Zellen festgestellt. Inkubate aus Rattenhepatozyten und Leberschnitten können zu 50 % (v/v) eingesetzt werden. Medienüberstände aus Schweine- und Humanhepatozyten werden bis zu einem Anteil von 25 % bzw. 100 % (v/v) von den 3T3-Zellen toleriert. Dieses Resultat wird sowohl auf einen möglicherweise variierenden Verbrauch von Nährstoffen aufgrund unterschiedlicher Stoffwechselaktivität als auch auf den Einfluss der von den jeweiligen Hepatozyten abgegebenen Stoffwechselprodukte auf die Vitalität und Proliferation der 3T3-Zellen zurückgeführt.

Für die Überführung von Medienüberständen in die WEC werden die Rattenhepatozyten zunächst für 24 Stunden mit dem Induktionscocktail inkubiert, da nach anschließender Inkubation mit WEC-Medium noch CYP-Aktivität nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus werden in den quantitativen Analysen Testsubstanzumsätze berechnet, welche mit denen unter WME-Standardbedingungen vergleichbar sind. Aufgrund der Toleranz der Embryonen gegenüber in der Rattenhepatozytenkultur inkubiertem WEC-Medium kann durch den Zusatz von 7,5 % (v/v) HBSS eine Inkubatüberführung unter geringer Verdünnung der Metaboliten erreicht werden.

Bei den nun folgenden ermittelten Halbhemmkonzentrationen aus den Inkubaten handelt es sich um Metabolitenäquivalente der ursprünglich in den Hepatozyten eingesetzten Substratkonzentration.

6.3.1 Cyclophosphamid

Die Präinkubation von CPA in den Hepatozytenkulturen von Ratte, Schwein und Mensch und die Überführung der Medienüberstände nach dem entwickelten Protokoll führen im 3T3-Zytotoxizitätstest zu einer signifikanten Erniedrigung des IC_{50} -Wertes im Vergleich zu nicht-inkubiertem CPA. Die Analysen der mit frischem Medium versetzten 0,1 mM-CPA-Inkubate aus Rattenhepatozyten zeigen, dass eine Lagerung von Tag 0 bis Tag 5 ohne Beeinträchtigung der CPA-Konzentration möglich ist. Im 1 mM-Inkubat wird eine CPA-Hydrolyse von max. 25 % beobachtet, wodurch jedoch keine Veränderung der Konzentration-Wirkungskurve beobachtet wird. Die IC_{50} -Werte von durchschnittlich 13 μ M im 0,1 mM-Inkubat und 39 μ M im 1 mM-Inkubat aus Rattenhepatozyten entsprechen einem anhand der Mischungsversuche simulierten CPA-Umsatz von 50 % respektive 20 % zu Acr. Da diese mit den berechneten Umsätzen gut übereinstimmen, Acr aber nicht nachgewiesen

werden kann, wird die Zunahme der Zytotoxizität auf die Anwesenheit von Phosphoramid Mustard zurückgeführt. Dabei handelt es sich um ein DNS-alkylierendes, zytotoxisches Agens, welches aus dem abiotischen Zerfall von 4-Hydroxy-CPA hervorgeht und neben Acr für die Zytotoxizität und Teratogenität von CPA verantwortlich ist (Ozolins 2010; Zhang *et al.* 2005). Der Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven der Inkubate aus der basalen und induzierten Rattenhepatozytenkultur von 0,1 und 1 mM CPA spiegelt die Ergebnisse aus den quantitativen Analysen wider, in denen kein Umsatzunterschied festgestellt werden kann. Der IC_{50} -Wert aus dem 0,1 mM-Inkubat ist kleiner als der aus dem 1 mM-Inkubat. Obwohl im 1 mM-Inkubat eine höhere absolute Metabolitenkonzentration vorliegt, welche einen niedrigeren IC_{50} -Wert erwarten lässt, ist das Konzentrationsverhältnis von Metabolit(en) zu CPA für die zytotoxische Wirkung entscheidend. Die in den Mischungsversuchen bereits festgestellte Abnahme der Zytotoxizität bei steigender CPA-Konzentration und konstanter, in der Einzelsubstanzuntersuchung zytotoxischer Acr-Konzentration bestätigt die geringere Zytotoxizität des 1 mM CPA-Inkubats. Obwohl innerhalb von 24 Stunden kein vollständiger CPA-Umsatz in Rattenhepatozyten festgestellt werden kann und das Inkubat um 50 % verdünnt wird, wird eine Abnahme des IC_{50} -Wertes um den Faktor 100 bis 130 beobachtet. Binder kann in einer 3T3-Kokultur mit HepG2- und H4IIE-Zellen keine Beeinträchtigung der Vitalität der 3T3-Zellen und damit keine metabolische Aktivierung von CPA feststellen (Binder 2008).

Die Überführung von CPA-Inkubaten aus induzierten Schweinehepatozyten führt trotz eines Inkubatanteils von 22,3 % (v/v) zu geringeren IC_{50} -Werten als die Inkubate der Rattenhepatozyten. Die IC_{50} -Werte von ca. 3 μ M aus dem 0,1 mM-Inkubat und ca. 23 μ M aus dem 1 mM-Inkubat entsprechen einem anhand der Mischungsversuche simulierten CPA-Umsatz von mehr als 50 % zu Acr, der allerdings großen Variabilitäten unterliegt. Obwohl Schweinehepatozyten unter basalen Bedingungen eine geringe CYP2B-abhängige PROD-Aktivität aufweisen (Szotakova *et al.* 2004), kann mithilfe des vermehrten Anteils von Androstendion im Metabolitenprofil von Testosteron eine Induktion des CYP-Isoenzymes 2B22 in Betracht gezogen werden, welches in Schweinehepatozyten für die Hydroxylierung von CPA an Position 4 und die daraus folgende Entstehung der aktiven Metaboliten Acr und Phosphoramid Mustard verantwortlich ist (Clarke und Waxman 1989; Zhang *et al.* 2005). Die Überführung des 0,1 mM CPA-Inkubats führt zu einem um den Faktor 532 kleineren IC_{50} -Wert als nicht-inkubiertes CPA. Der aus dem 1 mM-Inkubat resultierende

höhere IC₅₀-Wert beruht, wie bereits bei den Inkubaten aus Rattenhepatozyten beobachtet, auf dem nicht-umgesetzten Anteil CPA im Inkubat.

Trotz der im Vergleich zu den Ratten- und Schweinehepatozyteninkubaten ca. 90 %igen Überführung der Inkubate aus Humanhepatozyten wird eine Abnahme des IC₅₀-Wertes im Vergleich zu nicht-inkubiertem CPA um den Faktor 8 ermittelt. Der IC₅₀-Wert von 194 µM entspricht einem anhand der Mischungsversuche simulierten CPA-Umsatz von weniger als 20 % zu Acr, der außerdem großen Variabilitäten unterliegt. Die Überführung eines geringer konzentrierten CPA-Inkubats könnte aufgrund des Einflusses von nicht-umgesetztem CPA auf die Vitalität der 3T3-Zellen zu einem niedrigeren IC₅₀-Wert führen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die metabolische Aktivierung von CPA in Ratten- und Schweinehepatozyten vergleichbar und höher als in Humanhepatozyten ist. Dies ist auf die im Vergleich zur Rattenhepatozyten geringere fremdstoffmetabolisierende Aktivität von Humanhepatozyten *in vitro* zurückzuführen (Hengstler *et al.* 2000b; Steinberg *et al.* 1999). Die im Rahmen des BMBF-Projekts erhobenen analytischen Daten der Inkubate bestätigen diese Beobachtung (Daten für Schweine- und Humanhepatozyten nicht gezeigt). Im Vergleich zu permanenten Zelllinien verfügen alle drei eingesetzten Hepatozytenspezies über eine für die Biotransformation von CPA ausreichende enzymatische Aktivität.

Die Überführung von CPA-Inkubaten in den D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest führt zu widersprüchlichen Ergebnissen. In beiden Tests wird eine metabolische Aktivierung von CPA durch die Abnahme der ID₅₀- und IC₅₀-Werte im Vergleich zu nicht-inkubiertem CPA nachgewiesen. Da der ID₅₀-Wert (218 µM) größer als die IC₅₀-Werte (98 µM und 32 µM) ist, findet die Differenzierung unter zytotoxischen Bedingungen statt und ist damit biologisch nicht plausibel. Darüber hinaus basiert die Validität des EST auf der Tatsache, dass die Zytotoxizität in den adulten 3T3-Fibroblasten geringer ist als in den embryonalen D3-Zellen. Da auch dies nicht der Fall ist, würde durch das Prädiktionsmodell des EST keine Aussage über eine erfolgreiche metabolische Aktivierung von CPA getroffen werden können. In Arbeiten von Hettwer *et al.* resultiert eine sechsstündige Präinkubation von 10 bis 100 µM CPA in murinen Hepatozyten und eine anschließende Inkubatüberführung in den Differenzierungstest in einer Abnahme des ID₅₀-Wertes um den Faktor 70 (Hettwer *et al.* 2010). Da von Hettwer *et al.* aufgrund von Kontaminationen keine Zytotoxizitätsdaten erhoben werden konnten, ist ein Vergleich nicht möglich (Hettwer *et al.* 2010).

Die Überführung von CPA-Inkubaten aus Rattenhepatozyten führt in der WEC zu einer gegenüber reinem Acr erhöhten Anzahl dysmorpher Embryonen. Der TMS, die Anzahl der Somiten und der Proteingehalt sind ebenfalls signifikant gegenüber inaktiven Inkubaten erniedrigt. Dieses Resultat wird auf die Anwesenheit von Phosphoramid Mustard zurückgeführt, welches in Arbeiten von Mirkes et al. ebenfalls zu malformierten Embryonen führt (Mirkes *et al.* 1981). Van Aerts et al. konnten bei der Überführung von CPA-Inkubaten (300 µM) aus der Hepatozytenkultur Aroclor 1254-induzierter männlicher Ratten in die WEC eine signifikante Abnahme des TMS und eine Zunahme der Anzahl dysmorpher Embryonen feststellen (van Aerts *et al.* 1993). Als Kontrolle für die Bildung mutagener Metaboliten wurden in diesen Arbeiten die Inkubate außerdem im Ames-Test eingesetzt, wobei die Zunahme der Revertanten mit den teratogenen Effekten der gleichen Inkubate in der WEC korreliert (van Aerts *et al.* 1993).

Die metabolische Aktivierung von CPA kann aufgrund der fremdstoffmetabolisierenden Aktivität der eingesetzten primären Hepatozytenkulturen anhand der entwickelten Präinkubationsmethode im 3T3-Zytotoxizitätstest und der WEC nachgewiesen werden. Im D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest sind weitere Überführungsexperimente erforderlich, um die Präinkubationsmethode abschließend bewerten zu können.

6.3.2 Albendazol

Die Präinkubation von ABZ in den induzierten Hepatozytenkulturen von Ratte, Schwein und Mensch und die Überführung der Medienüberstände führen im 3T3-Zytotoxizitätstest zu einer Abnahme der Zytotoxizität im Vergleich zu nicht-inkubiertem ABZ. Da die Induktion keinen Einfluss auf die ABZSO-Konzentration hat (vgl. Kap. 6.1.3.2), sind ausschließlich die Konzentrations-Wirkungskurven der induzierten Inkubate dargestellt. Eine Inkubat-überführung aus der basalen Rattenhepatozytenkultur führt ebenfalls nicht zu einer Beeinträchtigung der Vitalität der 3T3-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Überprüfung der ABZ und ABZSO-Konzentrationen in den mit frischem 3T3-Medium verdünnten Inkubaten aus Rattenhepatozyten weist neben der Stabilität der Analyten über den Zeitraum des Zytotoxizitätstests eine Zunahme der Wiederfindung von ABZ gegenüber serumfreiem Hepatozytenmedium vor der Herstellung des Mediums für den 3T3-Zytotoxizitätstest auf. Dieser Effekt wird auf eine erhöhte Serumproteinbindung von ABZ im Überführungsmedium zurückgeführt. Ein IC₅₀-Wert aus den aktiven Inkubaten aus Rattenhepatozyten kann erwartungsgemäß nicht ermittelt werden, da die ABZSO-Konzentrationen durch die für die

Überführung notwendige Verdünnung geringer sind als der IC_{50} -Wert von reinem ABZSO. Vergleichbares gilt für das 10 μ M ABZ-Inkubat aus Schweinehepatozyten. Der IC_{50} -Wert von 3 μ M aus dem 25 μ M-Inkubat aus Schweinehepatozyten resultiert aus Variabilitäten des ABZ-Umsatzes und entspricht einem anhand der Mischungsversuche simulierten ABZ-Umsatz von 20 bis 80 % zu ABZSO. Die Untersuchung des 25 μ M-Inkubats aus induzierten Humanhepatozyten liefert einen mit ABZSO vergleichbaren IC_{50} -Wert, was auf die geringe Verdünnung des Inkubats und damit der ABZSO-Konzentration zurückgeführt wird. Obwohl für die ABZ-Inkubationen in Ratten-, Schweine- und Humanhepatozyten die gleiche ABZ-Stammlösung verwendet wird, werden unterschiedliche IC_{50} -Werte durch die inaktiven Inkubate ermittelt, welche zusätzlich großen Schwankungen unterliegen. Neben der Abnahme der Löslichkeit steigender ABZ-Konzentrationen wird eine unterschiedliche Adhäsion von ABZ durch die Verwendung verschiedener Kollagenbeschichtungen vermutet. Zusammengefasst entsprechen die Ergebnisse aus der Überführung von aktiven ABZ-Inkubaten in den 3T3-Zytotoxizitätstest den aus den analytischen Untersuchungen und den Ergebnissen aus den Zytotoxizitätstests mit reinem ABZ und ABZSO abgeleiteten Erwartungen. Eine metabolische Deaktivierung von ABZ kann sowohl mit Ratten- als auch mit Schweine- und Humanhepatozyten nachgewiesen werden.

Im Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest in ESZ-D3 führt reines ABZ ebenso wie im 3T3-Zytotoxizitätstest zu geringeren IC_{50} - und ID_{50} -Werten als ABZSO (Kaltenhäuser *et al.* 2010). Die Überführung von aktivierten ABZ-Inkubaten aus induzierten Rattenhepatozyten führt zu einer Erhöhung der Anzahl differenzierter Kardiomyozyten und zu einer Erniedrigung der zytotoxischen Wirkung auf die ESZ-D3. Die Ableitung eines IC_{50} - oder ID_{50} -Wertes durch das aktive Inkubat ist erwartungsgemäß nicht möglich, da die ABZSO-Konzentration durch die notwendige Verdünnung zu gering ist. Die auftretende Zytotoxizität durch die inaktiven ABZ-Inkubate mit vergleichbarer ABZ-Konzentration ist möglicherweise für das Absterben der EBs verantwortlich. Der IC_{50} -Wert von reinem ABZ beträgt ca. 0,4 μ M (Kaltenhäuser *et al.* 2010). Wie bereits bei der Überführung des inaktiven 25 μ M Inkubats aus Rattenhepatozyten in den 3T3-Zytotoxizitätstest beobachtet, ist der aus dem Einsatz des Rattenhepatozyteninkubats resultierende IC_{50} -Wert von ca. 2 μ M in ESZ-D3 um den Faktor 5 im Vergleich zu reinem ABZ erhöht. Dies wird auf eine nicht vollständige Löslichkeit von 25 μ M ABZ in den eingesetzten Medien zurückgeführt, welche durch die analytischen Analysen bestätigt wird. Durch die Präinkubation von ABZ in induzierten Rattenhepatozyten kann eine metabolische Deaktivierung somit auch im Differenzierungs- und

Zytotoxizitätstest in ESZ-D3 nachgewiesen werden. Eine Berechnung des embryotoxischen Potenzials im Prädiktionsmodell des EST ist jedoch aufgrund nicht ermittelbarer IC_{50} und ID_{50} -Werte nicht möglich.

In der WEC führt ABZ bei geringeren Konzentrationen zu Entwicklungsstörungen als ABZSO (Kaltenhäuser *et al.* 2010). Die Überführung aktiver ABZ-Inkubate mit einer Metabolitenäquivalentkonzentration von 2,5 μ M führt in der WEC im Vergleich zu einem äquimolaren inaktiven Inkubat zur Abnahme der Anzahl dysmorpher Embryonen und zu mit der Kontrolle vergleichbaren morphologischen Parametern. Da die notwendige Verdünnung des Inkubats für die WEC im Vergleich zum EST geringer ist, ist der ermittelte Umsatz von ca. 50 % und die Bildung von ca. 4 μ M ABZSO in den induzierten Rattenhepatozyten ausreichend, um die metabolische Deaktivierung von ABZ in der WEC nachzuweisen.

Die Kombination der Embryotoxizitätstests EST und WEC mit primären Rattenhepatozyten in Form einer Präinkubation führen zur Abnahme der Zytotoxizität respektive der Differenzierungsinhibition von ABZ. Dieses Resultat bestätigt die auf den Ergebnissen der quantitativen Analysen sowie den Einzelsubstanzuntersuchungen in den Zielkulturen beruhenden Erwartungen.

Beobachtungen von Whittaker und Faustman sowie Carlsson *et al.* über das größere embryotoxische Potenzial von ABZ im Vergleich zu ABZSO in *in vitro*-Embryotoxizitätstests, werden im Rahmen des BMBF-Projekts bestätigt (Carlsson *et al.* 2011; Whittaker und Faustman 1991). Obwohl dies nicht den Ergebnissen aus den *in vivo*-Studien mit ABZ entspricht, können anhand der geringen Effektkonzentrationen beide Substanzen als embryotoxisch eingestuft werden, wobei ABZ die toxischere Potenz besitzt (Binder 2008).

6.3.3 Valpromid

Die Präinkubation von VPD in den basalen und induzierten Hepatozytenkulturen von Ratte und Schwein und die Überführung der Medienüberstände führen im 3T3-Zytotoxizitätstest nicht zum Nachweis einer metabolischen Aktivierung. Das Ergebnis ist aufgrund der quantitativen Analyse der Rattenhepatozyteninkubate zu erwarten, da der Umsatz von VPD zwischen 11 und 28 % liegt und VPA in einer Konzentration von 14 μ M nur nach einer 48 Stunden-Inkubation von 1 mM VPA nachgewiesen werden kann. Ein VPD-Umsatz von 50 % zu VPA wäre notwendig, um basierend auf den durchgeführten Mischungsversuchen eine Erhöhung der Zytotoxizität zu erreichen (vgl. Kap. 6.2). Die über die Strukturaufklärungsanalysen identifizierten VPD-Metaboliten haben darüber hinaus keinen

Einfluss auf die Vitalität der 3T3-Zellen. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Hydroxy-Isomere von VPD und VPA sowie deren Konjugate, deren Bildung als metabolische Deaktivierung bewertet wird. Bemerkenswert ist der formale Anstieg der Vitalität der 3T3-Zellen nach der Überführung des Inkubats aus der basalen Hepatozytenkultur auf über 150 % der Kontrolle, welcher durch das Inkubat aus der induzierten Kultur nicht beobachtet wird. Dieser, bei reinem VPA beobachtete Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve (vgl. Kap. 5.2.2 und (Buesen *et al.* 2009; Festag *et al.* 2007), wird auf VPD-Metaboliten zurückgeführt, welche möglicherweise die mitochondriale Enzymaktivität beeinflussen, welche für die Vitalitätsbestimmung genutzt wird (Omtzigt *et al.* 1992). Es wird angenommen, dass diese Metaboliten aufgrund der induzierten Phase-II-Enzyme (vgl. Kap. 5.1.3.3) im induzierten Inkubat bereits konjugiert vorliegen und keinen Einfluss auf die Enzymaktivität in den Mitochondrien haben. Der Einsatz des Induktionscocktails in Rattenhepatozyten könnte demnach auch bei der Biotransformation von VPD einen negativen Einfluss auf die Bildung der aktiven Metaboliten haben, wie sie bereits bei ABZ diskutiert wurde (vgl. Kap. 6.3.2.).

VPD wurde bereits von Binder und Hettwer *et al.* als Proteratogen zur Entwicklung eines metabolisch aktiven ESTs herangezogen (Binder 2008; Hettwer *et al.* 2010). Weder die von Binder entwickelte Kokultur der D3-Zellen mit der humanen Hepatomzelllinie HepG2 noch die Überführung von Medienüberständen aus primären Maushepatozyten in den D3-Differenzierungstest von Hettwer *et al.* führen zu einer Erhöhung der Differenzierungs-inhibition (Binder 2008; Hettwer *et al.* 2010). Ein von Hettwer *et al.* vermuteter human-spezifischer VPD-Metabolismus wurde in Inkubationen in primären Humanhepatozyten nicht bestätigt. Die VPA-Konzentration war zwar gegenüber Maushepatozyten erhöht, dennoch reichte der Umsatz von 10 % zu VPA für eine metabolische Aktivierung in diesen Arbeiten nicht aus (Hettwer *et al.* 2010). Durch welche Enzyme die Hydrolyse von VPD zu VPA *in vivo* stattfindet und warum dies in der Hepatozytenkultur nicht in gleichem Umfang beobachtet wird, bleibt offen.

6.3.4 2-Acetylaminofluoren

Für die Identifikation des Proteratogens 2-AAF im 3T3-Zytotoxizitätstest ist nach den durchgeführten Mischungsversuchen ein Umsatz von 50 % zu NOH-AAF in den primären Hepatozytenkulturen notwendig (vgl. Kap. 5.2.2). Obwohl der Umsatz von 2-AAF in primären Rattenhepatozyten und Leberschnitten mehr als 90 % beträgt, ist aufgrund des fehlenden Nachweises des aktiven Metaboliten NOH-AAF nicht mit einer Erniedrigung des

IC₅₀-Wertes im Vergleich zu nicht-inkubiertem 2-AAF zu rechnen. Die Annahme wird durch die Überführung von 2-AAF-Inkubaten aus Rattenleberschnitten in den 3T3-Zytotoxizitätstest bestätigt. Die aktiven Inkubate haben keinen Einfluss auf die Vitalität der 3T3-Zellen. Die Überführung eines 2-AAF-Inkubats aus Rattenhepatozyten innerhalb der Methodvalidierung führt ebenfalls nicht zu einer Erhöhung der Zytotoxizität gegenüber den nicht-inkubierten Proben (Daten nicht gezeigt). Weitere 2-AAF-Metaboliten wie bspw. der Sulfatester von NOH-AAF, NOH-2-AF und 2-AAAF, welche ebenfalls zyto- und embryotoxisches Potenzial besitzen, werden innerhalb der Strukturaufklärungsanalysen nicht sicher nachgewiesen (Dybing *et al.* 1979; Faustman-Watts *et al.* 1983; Faustman-Watts *et al.* 1984a). Glucuronsäurekonjugate von Hydroxy-2-AF und 2-AAF bilden die Hauptmetaboliten in den Inkubaten der Rattenhepatozyten. Anhand des vergleichbaren Testosteronmetabolitenprofils in den *in vitro*-Metabolismussystemen der Ratte wird angenommen, dass auch in Leberschnitten die C-Hydroxylierung und die Konjugation von 2-AAF mit Glucuronsäure im Vordergrund stehen. Bei diesen Reaktionen handelt es sich typischerweise um Deaktivierungsprozesse, welche durch die Induktion weiter verstärkt werden (Dybing *et al.* 1979; Heflich und Neft 1994). Da NOH-AAF aufgrund von Deacetylierung oder Konjugationsreaktionen im Überstand nicht vorliegt, wird angenommen, dass auch eine Kokultur mit den Zielkulturen des EST und der WEC nicht zum Nachweis einer metabolischen Aktivierung führen würde. Basierend auf diesen Ergebnissen werden Rattenhepatozyten und Leberschnitte somit für den Nachweis einer metabolischen Aktivierung von 2-AAF im Rahmen der entwickelten Präinkubationsmethode als nicht geeignet bewertet.

Die Inkubate aus Schweinehepatozyten führen bei größerer Verdünnung zu einer Abnahme der Vitalität der 3T3-Zellen, jedoch nicht zur Erfassung eines IC₅₀-Wertes. Der Rückgang der Vitalität wird auf den Nachweis von 2 bis 4 µM NOH-AAF in Inkubaten aus Schweinehepatozyten zurückgeführt (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus weisen Schweinehepatozyten im Unterschied zu Rattenhepatozyten eine geringere Suszeptibilität gegenüber vergleichbaren 2-AAF-Konzentrationen auf. Diese Beobachtung haben bereits Holme und Soderlund 1985 bei der Inkubation von 2-AAF in primären Hepatozyten von Ratte, Maus, Hamster und Meerschweinchen beschrieben (Holme und Soderlund 1985). Rattenhepatozyten sind die gegenüber 2-AAF bzw. dessen aktiven Metaboliten NOH-AAF empfindlichste Spezies. Dieser Effekt wird auf eine speziesspezifische Biotransformation von 2-AAF zurückgeführt. Da erst die Deacetylierung oder Sulfatierung von NOH-AAF für dessen hohe Reaktivität gegenüber Nukleophilen verantwortlich ist, werden speziess-

spezifische Affinitäten gegenüber NOH-AAF und Aktivitäten der Deacetylasen und Sulfatasen angenommen (Dybing *et al.* 1979; Meerman *et al.* 1981). Glatt berichtet von einem Defekt der SULT1A in Schweinehepatozyten, welche möglicherweise für die Bildung des Sulfatesters verantwortlich ist (Glatt 2002). Dies könnte zur Folge haben, dass NOH-AAF im Überstand von Schweinehepatozyten nachgewiesen werden kann. Die verminderte Bildung zytotoxischer Metaboliten könnte darüber hinaus eine Erklärung für die geringere Suszeptibilität der Schweinehepatozyten gegenüber 2-AAF sein. Die geringere Empfindlichkeit von Rattenleberschnitten gegenüber 2-AAF wird auf die Serumproteinbindung und eine von der Verteilung innerhalb des Gewebes abhängigen Biotransformation von 2-AAF zurückgeführt (vgl. Kap. 6.1.3.4).

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Protokoll zur Integration fremdstoff-metabolisierender Aktivität in den 3T3-Zytotoxizitätstest ermöglicht den Einsatz von Medienüberständen aus verschiedenen Hepatozytenspezies, wodurch speziesspezifische Suszeptibilitäten gegenüber Testsubstanzen und Unterschiede in der Biotransformation genutzt oder überwunden werden können. Möglicherweise könnte damit in den Embryotoxizitätsempfindlichkeiten durch Inkubate aus Schweinehepatozyten eine metabolische Aktivierung von 2-AAF nachgewiesen werden, welche durch Inkubate aus Rattenhepatozyten und Leberschnitten nicht zu erwarten ist.

7 Fazit und Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Präinkubationsmethode ermöglicht die Kombination primärer Hepatozyten mit dem 3T3-Zytotoxizitätstest, welcher einen Bestandteil des *in vitro*-Embryotoxizitätstests EST darstellt. Die Methode beruht auf der Toleranz der 3T3-Zellen gegenüber inkubierten Medienüberständen aus Hepatozytenkulturen von Ratte, Schwein und Mensch. Durch eine Sterilfiltration der Inkubate konnte erreicht werden, dass, entgegen den Beobachtungen von Hettwer et al., der Zytotoxizitätstest ohne Kontamination über sieben Tage durchgeführt werden kann (Hettwer et al. 2010). Ein Verlust von Substrat oder Metaboliten wurde bei den eingesetzten Testsubstanzen nicht beobachtet. Sowohl in der WEC als auch im Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest in D3-Zellen können Inkubate aus Rattenhepatozyten überführt werden. Die entwickelte Methode stellt eine Möglichkeit zur Kombination zellulärer Leber-*in vitro*-Systeme mit den *in vitro*-Embryotoxizitätstests EST und WEC dar, ist aber nicht als standardisierte Alternativmethode zur Prüfung von Proteratogenen zu bewerten.

Die Bildung und Stabilität der aktiven Metaboliten sowie die Übertragbarkeit des metabolischen Profils der Testsubstanzen *in vitro* auf das zu erwartende Metabolitenprofil *in vivo* stellen Grenzen der entwickelten Methode dar.

Eine Verlängerung der Induktionsperiode in Hepatozyten hätte die Erhöhung der enzymatischen Aktivität der CYP-Enzyme und der UGT zur Folge, welche sich in Abhängigkeit der zu untersuchenden Substanz wiederum auf deren Umsetzung auswirken würde. Anhand analytischer Methoden sollte der Einfluss der Enzyminduktion auf das Metabolitenprofil untersucht werden. Ein Vergleich mit publizierten Plasma- oder Uteruskonzentrationen von Metaboliten *in vivo* oder anhand von „physiologically based pharmacokinetic modelling“ (PBPK-modelling) gewonnenen Metabolitenkonzentrationen könnte dabei Hinweise auf Effektkonzentrationen *in vivo* liefern. Die analytische Untersuchung der Stabilität und des Umsatzes der Testsubstanz in den Hepatozytenkulturen stellt somit eine hilfreiche Möglichkeit dar, den Erfolg einer metabolischen Aktivierung abzuschätzen und gegebenenfalls Modifizierungen am vorgeschlagenen Protokoll vorzunehmen.

Der Einsatz von in Alginat-Mikrokapseln verpackte Hepatozyten („alginate microspheres“), welche eine längere Lebensdauer und Enzymaktivität aufweisen als Hepatozyten in der Monolayerkultur, stellt eine weitere Möglichkeit dar, primäre Hepatozyten mit den Zielkulturen in Form einer Kokultur zu kombinieren (Ringel *et al.* 2005). Reaktive und/oder flüchtige aktive Metaboliten könnten somit die Zielzellen direkt erreichen. Eine mit permanenten Hepatomzelllinien entwickelte Kokulturmethode von Binder führte im EST aufgrund geringer Enzymaktivität der eingesetzten Systeme nicht zum Nachweis einer metabolischen Aktivierung von CPA (Binder 2008).

Die Präinkubation der Testsubstanzen in Schweinehepatozyten führte zu mit Rattenhepatozyten vergleichbaren Ergebnissen im 3T3-Zytotoxizitätstest. Die Inkubatüberführungen aus Humanhepatozyten weisen auf einen im Vergleich zu den beiden anderen Spezies geringeren Umsatz der Testsubstanzen hin. Da die Biotransformation von Fremdstoffen in Schweinehepatozyten eine größere Analogie zu Humanhepatozyten aufweist als Rattenhepatozyten und bei der Isolierung eine ausreichend hohe Zahl Schweinehepatozyten gewonnen werden kann, könnten diese Zellen als Alternative zur Abbildung des humanen Metabolitenprofils einer Testsubstanz dienen (Langsch *et al.* 2009). Dies könnte durch die Untersuchung weiterer humanrelevanter Proteratogene wie 2-Methoxyethanol, Phenytoin und Trimethadion evaluiert werden.

Die Identifizierung der Metaboliten einer Testsubstanz, welche mit Hilfe von spezies-spezifischen zellulären Leber-*in vitro*-Systemen und adäquaten Analysemethoden durchgeführt werden kann, und deren Synthese und separate Untersuchung im EST und/oder der WEC unterliegt zwar einem längeren und kostenintensivieren Prozess, stellt aber im Fall von stabilen Metaboliten, die in zu geringen Konzentrationen gebildet werden, eine alternative Methode zur Prüfung auf Embryotoxizität *in vitro* dar (Coecke *et al.* 2006). PBPK-Modelling könnte dabei Hinweise über die Testsubstanz- bzw. Metabolitenkonzentration in den Zielzellen liefern, welche im Inkubat erreicht werden sollte.

8 Abkürzungsverzeichnis

β-NF	β-Naphtoflavon
2-AAAF	Acetoxy-2-Acetylaminofluoren
2-AAF	2-Acetylaminofluoren
2-AF	2-Aminofluoren
ABZ	Albendazol
ABZSO	Albendazolsulfoxid
ACN	Acetonitril
Acr	Acrolein
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
BROD	Benzyloxyresorufin-O-debenzylase
BSA	Bovine Serum Albumin
CPA	Cyclophosphamid
CYP	Cytochrom P450-Enzym
Dex	Dexamethason
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EROD	Ethyoxyresorufin-O-deethylase
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESZ	Embryonale Stammzellen
ESZ-D3	Murine embryonale Stammzellen der Linie D3
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales Rinderserum
FMO	Flavin-abhängige Monooxygenase
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
G-6-P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferasen
HBSS	Hank´s buffered salt solution

HPLC/ LC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ICH	International Conference on Harmonisation
KG	Körpergewicht
LOD	Detektionsgrenze
LOQ	Quantifizierungsgrenze
MLU	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MTT	Methyltetrazoliumbromid
NADPH	Nikotinamidadeninucleotidphosphat
NCS	Newborn calf serum
NOH- AAF	N-Hydroxy-2-Acetylaminofluoren
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OHT	Hydroxytestosteron
PB	Phenobarbital
PBS ⁻ / oder ^{+/+}	Phosphate buffered saline, ohne oder mit Ca / Mg
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
PROD	Pentoxeresorufin-O-depentylase
Q TOF-MS	Quadrupole Time-of-Flight-Massenspektrometrie
QSAR	Quantitative structure / activity relationship
REACH	Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals
RH / PH / HH	Ratten- / Schweine- / Humanhepatozyten
RT	Retentionszeit
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SULT	Sulfotransferasen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUM	Technische Universität München
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
VPA	Valproinsäure
VPD	Valpromid
WME (C / I)	Williams Medium E (complete / incomplete)

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Reproduktionszyklus der Säugetiere	3
Abbildung 1.2: Schema der CYP- katalysierten Reaktion.....	10
Abbildung 1.3: Strukturformel von Cyclophosphamid	18
Abbildung 1.4: Strukturformel von Albendazol	21
Abbildung 1.5: Strukturformel von Valpromid.....	24
Abbildung 1.6: Strukturformel von 2-Acetylaminofluoren	26
Abbildung 4.1: Enzymatische Spaltung von Alkoxyresorufin-Derivaten	44
Abbildung 4.2: Induktionsprotokoll primärer Rattenhepatozyten	46
Abbildung 4.3 Enzyminduktion in Rattenleberschnitten	48
Abbildung 4.4: Stereo- und regioselektiver Metabolismus von Testosteron	49
Abbildung 4.5: Aufbau eines Q-TOF-Massenanalysators.....	57
Abbildung 4.6: Inkubationsprotokoll für die Überführung von Inkubaten in den 3T3-Zytotoxizitätstest	70
Abbildung 4.7 Inkubationsprotokoll für die Überführung von Rattenhepatozyteninkubaten in den D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest	72
Abbildung 4.8: Inkubationsprotokoll für primäre Hepatozyten für die Überführung von Inkubaten in die WEC	73
Abbildung 5.1: Metabolisches Profil von Testosteron in Rattenhepatozyten.....	83
Abbildung 5.2: Metabolisches Profil von Testosteron in Leberschnitten der Ratte.....	85
Abbildung 5.3: RT-PCR Produkte von CYP1A1 und CYP2B1/2 aus primären Rattenhepatozyten ...	86
Abbildung 5.4: Western Blot von CYP1A1 und 2B1/2 aus primären Rattenhepatozyten	87
Abbildung 5.5: LC/MS-Chromatogramme der CPA-Inkubate aus primären Rattenhepatozyten.....	100
Abbildung 5.6: Biotransformation von Cyclophosphamid in primären Rattenhepatozyten	102
Abbildung 5.7: LC/MS-Chromatogramme der ABZ-Inkubate aus primären Rattenhepatozyten	110
Abbildung 5.8: Metabolismus von ABZ in primären Rattenhepatozyten	113
Abbildung 5.9: LC/MS-Chromatogramme der VPD-Inkubate aus primären Rattenhepatozyten.....	118
Abbildung 5.10: Metabolismus von VPD in primären Rattenhepatozyten	120
Abbildung 5.11: LC/MS-Chromatogramme der 2-AAF-Inkubate aus primären Rattenhepatozyten .	124
Abbildung 5.12: Metabolismus von 2-AAF in primären Rattenhepatozyten.....	131
Abbildung 5.13: RT-PCR und Western Blot von CYP1A und CYP2B aus 3T3-Fibroblasten	133
Abbildung 5.14: Einfluss von inkubiertem Hepatozytenmedium auf die Vitalität der 3T3-Zellen.....	137

Abbildung 5.15: Einfluss von inkubiertem Leberschnittmedium der Ratte auf die Vitalität der 3T3-Zellen	139
Abbildung 5.16: Konzentrations-Wirkungskurven von CPA-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im Vergleich mit CPA und Acr im 3T3-Zytotoxizitätstest.....	142
Abbildung 5.17: Konzentrations-Wirkungskurven von CPA-Inkubaten aus Schweine-hepatozyten im Vergleich mit CPA und Acr im 3T3-Zytotoxizitätstest.....	143
Abbildung 5.18: Konzentrations-Wirkungskurven von CPA-Inkubaten aus Humanhepatozyten im Vergleich mit CPA und Acr im 3T3-Zytotoxizitätstest.....	144
Abbildung 5.19: Konzentrations-Wirkungskurven von CPA-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im ESZ-D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest	146
Abbildung 5.20: Konzentrations-Wirkungskurven von CPA-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im Vergleich mit CPA und Acr in der WEC	147
Abbildung 5.21: Konzentrations-Wirkungskurven von ABZ-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im Vergleich mit ABZ und ABZSO im 3T3-Zytotoxizitätstest	152
Abbildung 5.22: Konzentrations-Wirkungskurven von ABZ-Inkubaten aus Schweine-hepatozyten im Vergleich mit ABZ und ABZSO im 3T3-Zytotoxizitätstest	153
Abbildung 5.23: Konzentrations-Wirkungskurven von ABZ-Inkubaten aus Humanhepatozyten im Vergleich mit ABZ und ABZSO im 3T3-Zytotoxizitätstest	154
Abbildung 5.24: Konzentrations-Wirkungskurven von ABZ-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im ESZ-D3-Differenzierungs- und Zytotoxizitätstest	157
Abbildung 5.25: Konzentrations-Wirkungskurven von ABZ-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im Vergleich mit ABZ und ABZSO in der WEC.....	158
Abbildung 5.26: Konzentrations-Wirkungskurve von VPD-Inkubaten aus Rattenhepatozyten im Vergleich zu VPD und VPA im 3T3-Zytotoxizitätstest.....	162
Abbildung 5.27: Konzentrations-Wirkungskurve von VPD-Inkubaten aus Schweine-hepatozyten im Vergleich zu VPD und VPA im 3T3-Zytotoxizitätstest.....	163
Abbildung 5.28: Konzentrations-Wirkungskurve von 2-AAF-Inkubaten aus Rattenleber-schnitten im Vergleich zu 2-AAF und NOH-AAF im 3T3-Zytotoxizitätstest.....	167
Abbildung 5.29: Konzentrations-Wirkungskurve von 2-AAF-Inkubaten aus Schweine-hepatozyten im Vergleich zu 2-AAF und NOH-AAF im 3T3-Zytotoxizitätstest.....	167
Abbildung 12.1: Testosteron Metabolitenprofil aus Schweinehepatozyten a) basal b) induziert	241
Abbildung 12.2: Testosteron Metabolitenprofil aus Humanhepatozyten a) basal b) induziert.....	243
Abbildung 12.3: LDH-Aktivität in Rattenleberschnitten und im Medienüberstand	245

Aus Gründen der Übersicht sind die im Anhang dargestellten Chromatogramme und Spektren im Abbildungsverzeichnis nicht aufgeführt.

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht regulatorisch anerkannter Alternativmethoden	2
Tabelle 1.2: <i>In vitro</i> -Metabolismusmodelle.....	15
Tabelle 3.1: Stammlösungen der Referenzsubstanzen	30
Tabelle 4.1: Kulturbedingungen primärer Hepatozyten der Ratte.....	40
Tabelle 4.2 Substanzkonzentrationen im Zytotoxizitätstest in Rattenhepatozyten	43
Tabelle 4.3: AROD-Inkubationslösung für primäre Rattenhepatozyten	45
Tabelle 4.4: „Mastermix“ für die CYP-Aktivitätsbestimmung in der mikrosomalen Fraktion	47
Tabelle 4.5: Chromatographische Bedingungen der Testosteron-Analytik.....	50
Tabelle 4.6: Zeitpunkte der Probennahme zur Konzentrationsbestimmung	52
Tabelle 4.7: Chromatographische Bedingungen der CPA-Analyse	53
Tabelle 4.8: Chromatographische Bedingungen der ABZ/ABZSO-Analyse	54
Tabelle 4.9: Chromatographische Bedingungen der VPD/VPA-Analyse.....	55
Tabelle 4.10: Chromatographische Bedingungen der AAF/NOH-AAF-Analyse	56
Tabelle 4.11: Q-TOF LC/MS-Parameter für die Analyse von CPA-Inkubaten	58
Tabelle 4.12: Übersicht der MS/MS-Experimente der im Full Scan detektierten CPA-Analyten	59
Tabelle 4.13: Q-TOF LC/MS-Parameter für die Analyse von ABZ-Inkubaten	59
Tabelle 4.14: Übersicht der MS/MS-Experimente der im Full Scan detektierten ABZ-Analyten	60
Tabelle 4.15: Q-TOF LC/MS Parameter für die Analyse von VPD-Inkubaten	61
Tabelle 4.16: Übersicht der MS/MS-Experimente der im Full Scan detektierten VPD-Analyten	61
Tabelle 4.17: Q-TOF LC/MS-Parameter für die Analyse von 2-AAF-Inkubaten	62
Tabelle 4.18: Übersicht der MS/MS-Experimente der im Full Scan detektierten 2-AAF-Analyten	62
Tabelle 4.19: AROD-Inkubationsmedium für 3T3-Zellen	64
Tabelle 4.20: Substanzkonzentrationen im Zytotoxizitätstest in 3T3-Fibroblasten.....	65
Tabelle 4.21: Kulturbedingungen der verwendeten <i>in vitro</i> -Metabolismus- und Embryotoxizitätssysteme.....	67
Tabelle 4.22: Konzentrationen der Testsubstanzen in den Hepatozytenkulturen zur Überführung in den 3T3-Zytotoxizitätstest	71
Tabelle 5.1: Einfluss der Testsubstanzen auf die Vitalität der Rattenhepatozyten	75
Tabelle 5.2: Vitalität primärer Rattenhepatozyten unter Zielkulturbedingungen	76
Tabelle 5.3: CYP-Aktivität in Rattenhepatozyten unter Standard- und Zielkulturbedingungen	78
Tabelle 5.4: CYP-Aktivität unter induzierenden Bedingungen	78
Tabelle 5.5 CYP-Aktivität nach Induktions- und Postinkubationsperiode	79

Tabelle 5.6: Basale AROD-Aktivitäten von Leberschnitten.....	80
Tabelle 5.7: AROD-Aktivitäten von Leberschnitten unter induzierenden Bedingungen	81
Tabelle 5.8: Analyten des Testosteronmetabolismus	82
Tabelle 5.9: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von CPA in Rattenhepatozyten- und -leberschnittinkubaten	89
Tabelle 5.10: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von ABZ und ABZSO in Rattenhepatozyten und- leberschnittinkubaten	91
Tabelle 5.11: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von VPD und VPA in Rattenhepatozyten und -leberschnittinkubaten	93
Tabelle 5.12: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von 2-AAF und NOH-AAF in Rattenhepatozyten- und -leberschnittinkubaten.....	95
Tabelle 5.13: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von CPA	99
Tabelle 5.14: Strukturvorschläge identifizierter CPA-Metaboliten.....	101
Tabelle 5.15: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von ABZ	106
Tabelle 5.16: Strukturvorschläge identifizierter ABZ-Metaboliten	111
Tabelle 5.17: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von VPD	116
Tabelle 5.18: Strukturvorschläge identifizierter VPD-Metaboliten.....	119
Tabelle 5.19: Spezifische Fragmente aus den MS/MS-Experimenten von 2-AAF	125
Tabelle 5.20: Strukturvorschläge der identifizierten 2-AAF-Metaboliten.....	130
Tabelle 5.21: IC ₅₀ -Werte der Testsubstanzen aus dem Zytotoxizitätstest in 3T3-Fibroblasten.....	134
Tabelle 5.22: Konzentrationsbestimmung von CPA in Überführungsmedien während des 3T3-Zytotoxizitätstests	145
Tabelle 5.23: Embryotoxizitätsparameter nach der Überführung von CPA-Inkubaten aus Rattenhepatozyten in die WEC	148
Tabelle 5.24: Zusammenfassung der IC ₅₀ -Werte aus der Überführung von CPA-Inkubaten in den 3T3-Zytotoxizitätstest	149
Tabelle 5.25: Konzentrationsbestimmung von ABZ und ABZSO in Überführungsmedien während des 3T3-Zytotoxizitätstests	155
Tabelle 5.26: Embryotoxizitätsparameter nach der Überführung von ABZ-Inkubaten aus Rattenhepatozyten in die WEC	159
Tabelle 5.27: Zusammenfassung der IC ₅₀ -Werte aus der Überführung von ABZ-Inkubaten in den 3T3-Zytotoxizitätstest	160
Tabelle 5.28: Konzentrationsbestimmung von VPD und VPA in Überführungsmedien während des 3T3-Zytotoxizitätstests	164
Tabelle 5.29: Zusammenfassung der IC ₅₀ -Werte aus der Überführung von VPD-Inkubaten in den 3T3-Zytotoxizitätstest	165
Tabelle 5.30: Konzentrationsbestimmung von 2-AAF in Überführungsüberständen.....	168

Tabelle 5.31: Zusammenfassung der IC_{50} -Werte aus der Überführung von 2-AAF-Inkubaten in den 3T3-Zytotoxizitätstest	169
Tabelle 12.1: Testosteron-Metabolitenprofil aus Rattenhepatozyten.....	239
Tabelle 12.2: Testosteron-Metabolitenprofil aus Schweinehepatozyten.....	240
Tabelle 12.3: Testosteron-Metabolitenprofil aus Humanhepatozyten.....	242
Tabelle 12.4: Vitalität von Rattenleberschnitten nach Inkubation mit 2-AAF	244

11 Literaturverzeichnis

Anderson, D., Bishop, J. B., Garner, R. C., Ostrosky-Wegman, P., and Selby, P. B. (1995). Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutation Research* **330**, 115-181.

Andrews, J. E., Ebron-McCoy, M., Bojic, U., Nau, H., and Kavlock, R. J. (1995). Validation of an *in Vitro* Teratology System Using Chiral Substances: Stereoselective Teratogenicity of 4-yn-Valproic Acid in Cultured Mouse Embryos. *Toxicology and Applied Pharmacology* **132**, 310-316.

Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le, C. T., Langouet, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2006). Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos.* **34**(1), 75-83.

Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**(5-6), 737-747.

Arlotto, M. P., Trant, J. M., and Estabrook, R. W. (1991). Measurement of Steroid Hydroxylation Reactions by High-Performance Liquid-Chromatography As Indicator of P450 Identity and Function. *Methods in Enzymology* **206**, 454-462.

Asteinza, J., Camacho-Carranza, R., Reyes-Reyes, R. E., Dorado-Gonzalez, V., and Espinosa-Aguirre, J. J. (2000). Induction of cytochrome P450 enzymes by albendazole treatment in the rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **9**, 31-37.

Baek, D. H., An, S. Y., Park, J. H., Choi, Y. C., Park, K. D., Kang, J. W., Choi, K. S., Park, S. H., Whang, M. Y., Han, J., Kim, J. H., Kim, H. S., Geum, D., and Yoo, T. M. (2011). Transferability of a modified embryonic stem cell test using a new endpoint for developmental neurotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 1-13.

Baliharova, V., Skalova, L., Maas, R. F. M., De Vrieze, G., Bull, S., and Fink-Gremmels, J. (2003a). The effects of benzimidazole anthelmintics on P4501A in rat hepatocytes and HepG2 cells. *Research in Veterinary Science* **75**(1), 61-69.

Baliharova, V., Velik, J., Lamka, J., Balarinova, R., and Skalova, L. (2003b). The effects of albendazole and its metabolites on hepatic cytochromes P450 activities in mouflon and rat. *Research in Veterinary Science* **75**(3), 231-239.

Baliharova, V., Velik, J., Tahotna, L., Lamka, J., and Skalova, L. (2003c). The effects of benzimidazole anthelmintics on cytochrome P4501A activities in pig hepatocytes. *Drug Metabolism Reviews* **35**, 70.

Berthiaume, F., Tompkins, R. G., and Yarmush, M. L. (1999). Isolation and long-term maintenance of adult rat hepatocytes in culture. *Methods Mol. Med.* **18**, 447-456.

- Bialer, M. (1991). Clinical Pharmacology of Valpromide. *Clinical Pharmacokinet.* **20**(2), 114-122.
- Bialer, M., Rubinstein, A., Raz, I., and Abramsky, O. (1984). Pharmacokinetics of Valpromide After Oral-Administration of A Solution and A Tablet to Healthy-Volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology* **27**(4), 501-503.
- Binda, D., Lasserre-Bigot, D., Bonet, A., Thomassin, M., Come, M. P., Guinchard, C., Bars, R., Jacqueson, A., and Richert, L. (2003). Time course of cytochromes P450 decline during rat hepatocyte isolation and culture: effect of L-NAME. *Toxicology in Vitro* **17**(1), 59-67.
- Binder, M. Untersuchungen zur Bioaktivierung eines *in vitro* Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen der Maus (*Mus musculus* L.). 2008.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Blaauboer, B. J. (2002). The necessity of biokinetic information in the interpretation of in vitro toxicity data. *Altern. Lab Anim* **30 Suppl 2**, 85-91.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2), 248-254.
- Bremer, S., Pellizzer, C., Coecke, S., Paparella, M., and Catalani, P. (2002). Detection of the embryotoxic potential of cyclophosphamide by using a combined system of metabolic competent cells and embryonic stem cells. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **30**(1), 77-85.
- Brown, N. A., and Fabro, S. (1981). Quantitation of rat embryonic development in vitro: A morphological scoring system. *Teratology* **24**, 65-78.
- Buesen, R., Genschow, E., Slawik, B., Visan, A., Spielmann, H., Luch, A., and Seiler, A. (2009). Embryonic Stem Cell Test Remastered: Comparison between the Validated EST and the New Molecular FACS-EST for Assessing Developmental Toxicity In Vitro. *Toxicological Sciences* **108**(2), 389-400.
- Bull, S., Langezaal, I., Clothier, R., and Coecke, S. (2001). A Genetically Engineered Cell-based System for Detecting Metabolism-mediated Toxicity. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **29**, 703-716.
- Burke, M. D., and Mayer, R. T. (1974). Ethoxyresorufin - Direct Fluorimetric Assay of A Microsomal O-Dealkylation Which Is Preferentially Inducible by 3-Methylcholanthrene 13. *Drug Metabolism and Disposition* **2**(6), 583-588.
- Capece, B. P. S., Navarro, M., Arcalis, T., Castells, G., Toribio, L., Perez, F., Carretero, A., Ruberte, J., Arboix, M., and Cristofol, C. (2003). Albendazole sulphoxide enantiomers in pregnant rats embryo concentrations and developmental toxicity. *Veterinary Journal* **165**(3), 266-275.
- Capece, B. P. S., Virkel, G. L., and Lanusse, C. E. (2009). Enantiomeric behaviour of albendazole and fenbendazole sulfoxides in domestic animals: Pharmacological implications. *Veterinary Journal* **181**(3), 241-250.

- Carlsson, G., Patring, J., Ulleras, E., and Oskarsson, A. (2011). Developmental toxicity of albendazole and its three main metabolites in zebrafish embryos. *Reprod. Toxicol.* **32**(1), 129-137.
- Cezar, G., Quam, J., Smith, A., Rosa, G., Piekarczyk, M., Brown, J., Gage, F., and Muotri, A. (2007). Identification of small molecules from human embryonic stem cells using metabolomics. *Stem Cells Development* **16**, 869-882.
- Chang, T. K., and Waxman, D. J. (2005). Pregnane X receptor-mediated transcription. *Methods Enzymol.* **400**, 588-598.
- Chang, T. K. H., Weber, G. F., Crespi, C. L., and Waxman, D. J. (1993). Differential Activation of Cyclophosphamide and Ifosfamide by Cytochrome-P-450-2B and Cytochrome-P450-3A in Human Liver-Microsomes. *Cancer Research* **53**(23), 5629-5637.
- Chapin, R., Augustine-Rauch, K., Beyer, B., Daston, G., Finnell, R., Flynn, T., Hunter, S., Mirkes, P., O'Shea, K. S., Piersma, A., Sandler, D., Vanparys, P., and van Maele-Fabry, G. (2008). State of the Art in Developmental Toxicity Screening Methods and a Way Forward: A Meeting Report Addressing Embryonic Stem Cells, Whole Embryo Culture, and Zebrafish. *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* **83**, 446-456.
- Chatot, C. L., Klein, N. W., Clapper, M. L., Resor, S. R., Singer, W. D., Russman, B. S., Holmes, G. L., Mattson, R. H., and Cramer, J. A. (1984). Human serum teratogenicity studied by rat embryo culture:epilepsy, anticonvulsant drugs, and nutrition. *Epilepsia* **25**, 205-216.
- Chhibber, G., and Gilani, S. H. (1986). Acrolein and Embryogenesis - An Experimental-Study. *Environmental Research* **39**(1), 44-49.
- Clarke, L., and Waxman, D. J. (1989). Oxidative-Metabolism of Cyclophosphamide - Identification of the Hepatic Monooxygenase Catalysts of Drug Activation. *Cancer Research* **49**(9), 2344-2350.
- Coecke, S., Ahr, H., Blaauboer, B. J., Bremer, S., Casati, S., Castell, J., Combes, R., Corvi, R., Crespi, C. L., Cunningham, M. L., Elaut, G., Eletti, B., Freidig, A., Gennari, A., Ghersi-Egea, J. F., Guillouzo, A., Hartung, T., Hoet, P., Ingelman-Sundberg, M., Munn, S., Janssens, W., Ladstetter, B., Leahy, D., Long, A., Meneguz, A., Monshouwer, M., Morath, S., Nagelkerke, F., Pelkonen, O., Ponti, J., Prieto, P., Richert, L., Sabbioni, E., Schaack, B., Steiling, W., Testai, E., Vericat, J. A., and Worth, A. (2006). Metabolism: A bottleneck in in vitro toxicological test development - The report and recommendations of ECVAM workshop 54. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **34**(1), 49-84.
- Coecke, S., Rogiers, V., Bayliss, M., Castell, J., Doehmer, J., Fabre, G., Fry, J., Kern, A., and Westmoreland, C. (1999). The use of long-term hepatocyte cultures for detecting induction of drug metabolising enzymes: The current status - ECVAM hepatocytes and metabolically competent systems task force report. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **27**(4), 579-638.
- Cristofol, C., Navarro, M., Franquelo, C., Valladares, J. E., Carretero, A., Ruberte, J., and Arboix, M. (1997). Disposition of netobimin, albendazole, and its metabolites in the pregnant rat: Developmental toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **144**(1), 56-61.

Dayan, A. D. (2003). Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop.* **86**(2-3), 141-159.

de Graaf, I., Tajima, O., Groten, J. P., and Wolterbeek, A. P. (2000). Intercellular communication and cell proliferation in precision-cut rat liver slices: effect of medium composition and DDT. *Cancer Lett.* **154**(1), 53-62.

de Graaf, I. A. M., Groothuis, G. M. M., and Olinga, P. (2007). Precision-cut tissue slices as a tool to predict metabolism of noval drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **3**(6), 879-898.

De Smet, K., Cavin, C., Vercruyssen, A., and Rogiers, V. (2001). Collagen type I gel cultures of adult rat hepatocytes as a screening induction model for cytochrome P450-dependent enzymes. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **29**(2), 179-192.

Delatour, P., Benoit, E., Besse, S., and Boukraa, A. (1991). Comparative Enantioselectivity in the Sulfoxidation of Albendazole in Man, Dogs and Rats. *Xenobiotica* **21**(2), 217-221.

Delatour, P., Garnier, F., Benoit, E., and Longin, C. (1984). A Correlation of Toxicity of Albendazole and Oxfendazole with Their Free Metabolites and Bound Residues. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **7**(2), 139-145.

Delatour, P., Parish, R. C., and Gyurik, R. J. (1981). Albendazole - A Comparison of Relay Embryotoxicity with Embryotoxicity of Individual Metabolites. *Annales de Recherches Veterinaires* **12**(2), 159-167.

Dickinson, R. G., Harland, R. C., Ilias, A. M., Rodgers, R. M., Kaufman, S. N., Lynn, R. K., and Gerber, N. (1979). Disposition of valproic acid in the rat: dose-dependent metabolism, distribution, enterohepatic recirculation and choleric effect. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **211**(3), 583-595.

Diez Ibanez, M. A., Chessebeuf-Padieu, M., and Padieu, P. (1989). Gas chromatographic-mass spectrometric study of deacetylation and oxidation of 2-acetylaminofluorene by rat liver epithelial cell lines upon cocarcinogen induction. *J. Chromatogr.* **488**(1), 237-248.

Donato, M. T., Bassi, A. M., Gomezlechon, M. J., Penco, S., Herrero, E., Adamo, D., Castell, J. V., and Ferro, M. (1994a). Evaluation of the Xenobiotic Biotransformation Capability of 6 Rodent Hepatoma-Cell Lines in Comparison with Rat Hepatocytes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **30A**(9), 574-580.

Donato, M. T., Castell, J. V., and Gomez-Lechon, M. J. (1999). Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J. Hepatol.* **31**(3), 542-549.

Donato, M. T., Castell, J. V., and Gomez-Lechon, M. J. (1994b). Cytochrome P450 activities in pure and co-cultured rat hepatocytes. Effects of model inducers. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* **30A**(12), 825-832.

Dybing, E., Soderlund, E., Haug, L. T., and Thorgeirsson, S. S. (1979). Metabolism and activation of 2-acetylaminofluorene in isolated rat hepatocytes. *Cancer Res.* **39**(8), 3268-3275.

- Echchgadda, I., Song, C. S., Oh, T. S., Cho, S. H., Rivera, O. J., and Chatterjee, B. (2004). Gene regulation for the senescence marker protein DHEA-sulfotransferase by the xenobiotic-activated nuclear pregnane X receptor (PXR). *Mech. Ageing Dev.* **125**(10-11), 733-745.
- Eikel, D., Hoffmann, K., Zoll, K., Lampen, A., and Nau, H. (2006a). S-2-pentyl-4-pentynoic hydroxamic acid and its metabolite S-2-pentyl-4-pentynoic acid in the NMRI-exencephaly-mouse model: pharmacokinetic profiles, teratogenic effects, and histone deacetylase inhibition abilities of further valproic acid hydroxamates and amides. *Drug Metabolism and Disposition* **34**, 612-620.
- Eikel, D., Lampen, A., and Nau, H. (2006b). Teratogenic effects mediated by inhibition of histone deacetylases: Evidence from quantitative structure activity relationships of 20 valproic acid derivatives. *Chemical Research in Toxicology* **19**(2), 272-278.
- Eisenbrand, G., Metzler, M., and Hennecke, F. J. (2005a). Bestimmung der Exposition durch krebserzeugende Stoffe. In *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner 3*. Auflage ed., pp. 169-189.
- Eisenbrand, G., Metzler, M., and Hennecke, F. J. (2005b). Toxikokinetik. In *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner 3*. Auflage ed., pp. 9-54.
- Ekins, S. (1996). Past, present, and future applications of precision-cut liver slices for in vitro xenobiotic metabolism. *Drug Metabolism Reviews* **28**(4), 591-623.
- Ekins, S., Murray, G. I., Burke, M. D., Williams, J. A., Marchant, N. C., and Hawksworth, G. M. (1995). Quantitative Differences in Phase-I and Phase-II Metabolism Between Rat Precision-Cut Liver Slices and Isolated Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* **23**(11), 1274-1279.
- Ekins, S., Ring, B. J., Grace, J., Robie-Belle, D. J., and Wrighton, S. A. (2000). Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **44**(1), 313-324.
- Elaut, G., Henkens, T., Papeleu, P., Snykers, S., Vinken, M., Vanhaecke, T., and Rogiers, V. (2006). Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Current Drug Metabolism* **7**(6), 629-660.
- Ellis-Hutchings, R. G., and Carney, E. W. (2010). Whole Embryo Culture: A "New" Technique That Enabled Decades of Mechanistic Discoveries. *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* **89**(4), 304-312.
- ESAC (2002). The use of scientifically validated *in vitro* tests for embryotoxicity. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **30**, 265-273.
- Fantel, A. G., Greenaway, J. C., Juchau, M. R., and Shepard, T. H. (1979). Teratogenic bioactivation of cyclophosphamide in vitro. *Life Sciences* **25**, 67-72.
- Faustman-Watts, E., Greenaway, J. C., Namkung, M. J., Fantel, A. G., and Juchau, M. R. (1983). Teratogenicity In Vitro of 2-Acetylaminofluorene - Role of Biotransformation in the Rat. *Teratology* **27**(1), 19-28.

Faustman-Watts, E. M., Greenaway, J. C., Namkung, M. J., Fantel, A. G., and Juchau, M. R. (1984a). Teratogenicity in vitro of 2 Deacetylated Metabolites of N-Hydroxy-2-Acetylaminofluorene. *Toxicology and Applied Pharmacology* **76**(1), 161-171.

Faustman-Watts, E. M., Namkung, M. J., Greenaway, J. C., and Juchau, M. R. (1985). Analysis of metabolites of 2- acetylaminofluorene generated in an embryo culture system- Relationship of biotransformation to teratogenicity *in vitro*. *Biochemical Pharmacology* **34**(16), 2953-2959.

Faustman-Watts, E. M., Yang, H. Y., Namkung, M. J., Greenaway, J. C., Fantel, A. G., and Juchau, M. R. (1984b). Mutagenic, cytotoxic, and teratogenic effects of 2-acetylaminofluorene and reactive metabolites in vitro. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **4**(3), 273-283.

Festag, M., Viertel, B., Steinberg, P., and Sehner, C. (2007). An in vitro embryotoxicity assay based on the disturbance of the differentiation of murine embryonic stem cells into endothelial cells. II. Testing of compounds. *Toxicology in Vitro* **21**(8), 1631-1640.

Fisher, R., Nau, H., Gandolfi, A. J., and Brendel, K. (1991). Toxicity of Valproic Acid in Liver Slices from Sprague-Dawley Rats and Domestic Pigs. *Toxicology in Vitro* **5**(3), 201-205.

Flick, B., and Klug, S. (2006). Whole embryo culture: An important tool in developmental toxicology today. *Current Pharmaceutical Design* **12**(12), 1467-1488.

Gallelli, J. F. (1967). Stability studies of drugs used in intravenous solutions. I. *Am. J. Hosp. Pharm.* **24**(8), 425-433.

Gebhardt, R., Hengstler, J. G., Muller, D., Glockner, R., Buenning, P., Laube, B., Schmelzer, E., Ullrich, M., Utesch, D., Hewitt, N., Ringel, M., Hilz, B. R., Bader, A., Langsch, A., Koose, T., Burger, H. J., Maas, J., and Oesch, F. (2003). New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: Metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metabolism Reviews* **35**(2-3), 145-213.

Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Pohl, I., Seiler, A., Clemann, N., Bremer, S., and Becker, K. (2004). Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **32**(3), 209-244.

Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Seiler, A., Brown, N., Piersma, A., Brady, M., Clemann, N., Huuskonen, H., Paillard, F., Bremer, S., and Becker, K. (2002). The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: Results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **30**(2), 151-176.

Glatt, H. (2002). Sulphotransferases. In *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics* (C.Ioannides, Ed.), 1 ed., pp. 353-441. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex.

Glatt, H., Gemperlein, I., Turchi, G., Heinritz, H., Doehmer, J., and Oesch, F. (1987). Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Molecular Toxicology* **1**, 313-334.

- Gloeckner, R., Lieder, A., and Lupp, A. (2008). Determination of CYP activity in precision-cut liver slices: whether to use intact slices or slice homogenate. *Anal. Bioanal. Chem.* **392**(6), 1167-1172.
- Gokhale, M., Bunton, T., Zurlo, J., and Yager, J. (1995). Cytochrome P-450 1A1/1A2 induction, albumin secretion, and histological changes in cultured rat liver slices. *In Vitro Toxicology* **8**(4), 357-368.
- Gonzalez, F. J., and Korzekwa, K. R. (1995). Cytochromes P450 expression systems. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 369-390.
- Graham, M. J., and Lake, B. G. (2008). Induction of drug metabolism: Species differences and toxicological relevance. *Toxicology* **254**(3), 184-191.
- Guillouzo, A. (1998). Liver cell models in in vitro toxicology. *Environmental Health Perspectives* **106**, 511-532.
- Guillouzo, A., Morel, F., Langouet, S., Maheo, K., and Rissel, M. (1997). Use of hepatocyte cultures for the study of hepatotoxic compounds. *Journal of Hepatology* **26**, 73-80.
- Gyurik, R. J., Chow, A. W., Zaber, B., Brunner, E. L., Miller, J. A., Villani, A. J., Petka, L. A., and Parish, R. C. (1981). Metabolism of Albendazole in Cattle, Sheep, Rats, and Mice. *Drug Metabolism and Disposition* **9**(6), 503-508.
- Hales, B. F. (1981). Modification of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide in rats with the inducers of the cytochrome P-450. *Teratology* **24**, 1-11.
- Hales, B. F. (1982). Comparison of the Mutagenicity and Teratogenicity of Cyclophosphamide and Its Active Metabolites, 4-Hydroxycyclophosphamide, Phosphoramidate Mustard, and Acrolein. *Cancer Research* **42**(8), 3016-3021.
- Handschin, C., and Meyer, U. A. (2003). Induction of drug metabolism: The role of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews* **55**(4), 649-673.
- Hashemi, E., Dobrota, M., Till, C., and Ioannides, C. (1999a). Structural and functional integrity of precision-cut liver slices in xenobiotic metabolism: a comparison of the dynamic organ and multiwell plate culture procedures. *Xenobiotica* **29**(1), 11-25.
- Hashemi, E., Till, C., and Ioannides, C. (1999b). Stability of Phase II conjugation systems in cultured precision-cut rat hepatic slices. *Toxicology in Vitro* **13**(3), 459-466.
- Heflich, R. H., and Neft, R. E. (1994). Genetic Toxicity of 2-Acetylaminofluorene, 2-Aminofluorene and Some of Their Metabolites and Model Metabolites. *Mutation Research-Reviews in Genetic Toxicology* **318**(2), 73-174.
- Hengstler, J. G., Ringel, M., Biefang, K., Hammel, S., Milbert, U., Gerl, M., Klebach, M., Diener, B., Platt, K. L., Bottger, T., Steinberg, P., and Oesch, F. (2000a). Cultures with cryopreserved hepatocytes: applicability for studies of enzyme induction. *Chemico-Biological Interactions* **125**(1), 51-73.

- Hengstler, J. G., Utesch, D., Steinberg, P., Platt, K., Diener, B., Ringel, M., Swales, N., Fischer, T., Biefang, K., Gerl, M., Bottger, T., and Oesch, F. (2000b). Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metabolism Reviews* **32**(1), 81-118.
- Henkens, T., Vinken, M., Vanhaecke, T., and Rogiers, V. (2007). Modulation of CYP1A1 and CYP2B1 expression upon cell cycle progression in cultures of primary rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro* **21**(7), 1253-1257.
- Hennessy, D. R., Steel, J. W., Lacey, E., Eagleson, G. K., and Prichard, R. K. (1989). The disposition of albendazole in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **12**(4), 421-429.
- Hettwer, M., Reis-Fernandes, M. A., Iken, M., Ott, M., Steinberg, P., and Nau, H. (2010). Metabolic activation capacity by primary hepatocytes expands the applicability of the embryonic stem cell test as alternative to experimental animal testing. *Reproductive Toxicology* **30**(1), 113-120.
- HISAOKA, K. K. (1958). The effects of 2-acetylaminofluorene on the embryonic development of the zebrafish. II. Histochemical studies. *Cancer Res.* **18**(6), 664-667.
- Ho, P. C., Abbott, F. S., Zanger, U. M., and Chang, T. K. H. (2003). Influence of CYP2C9 genotypes on the formation of a hepatotoxic metabolite of valproic acid in human liver microsomes. *The Pharmacogenomics Journal* **3**, 335-342.
- Hoen, P. A., Commandeur, J. N., Vermeulen, N. P., Van Berkel, T. J., and Bijsterbosch, M. K. (2000). Selective induction of cytochrome P450 3A1 by dexamethasone in cultured rat hepatocytes: analysis with a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay section sign. *Biochem. Pharmacol.* **60**(10), 1509-1518.
- Holme, J. A., and Soderlund, E. J. (1985). Species differences in the cytotoxic and genotoxic effects of 2-acetylaminofluorene and its primary metabolites 2-aminofluorene and N-OH-2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis* **6**(3), 421-425.
- Holme, J. A., Trygg, B., and Soderlund, E. (1986). Species differences in the metabolism of 2-acetylaminofluorene by hepatocytes in primary monolayer culture. *Cancer Res.* **46**(4 Pt 1), 1627-1632.
- Iorio, M. A., Mazzeo-Farina, A., Seneca, L., and Boniforti, L. (1985). N-Hydroxy-2-aminofluorene Derivatives: Chemical Reactivity and Product Identification by Mass Spectrometry. *Biomedical Mass Spectrometry* **12**(1), 30-37.
- Izumi, T. (1962a). Congenital skeletal abnormalities in offspring of mice induced by administration of 2-acetylaminofluorene during pregnancy. *Acta Anat. Nippon* **37**, 250-259.
- Izumi, T. (1962b). Developmental anomalies in offspring of mice induced by administration of 2-acetylaminofluorene during pregnancy. *Acta Anat. Nippon* **37**, 239-249.
- Jancova, P., Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* **154**(2), 103-116.

- Jurima-Romet, M., Abbott, F. S., Tang, W., Huang, H. S., and Whitehouse, L. W. (1996). Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins C and E in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicology* **112**(1), 69-85.
- Kaltenhäuser, J., Eckardt, K., Hofbeck, C., Gruber, U., Luch, A., Seiler, A., and Stahlmann, R. (2010). Effects of albendazole and its sulfoxide in two validated in vitro tests for developmental toxicity. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **381**(1)(Abstract).
- Kiang, T. K., Teng, X. W., Karagiozov, S., Surendradoss, J., Chang, T. K., and Abbott, F. S. (2010). Role of oxidative metabolism in the effect of valproic acid on markers of cell viability, necrosis, and oxidative stress in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Sci.* **118**(2), 501-509.
- Kiang, T. K. L., Ho, P. C., Reza-Anari, M., Tong, V., Abbott, F. S., and Chang, T. K. H. (2006). Contribution of CYP2C9, CYP2A6, and CYP2B6 to Valproic Acid Metabolism in Hepatic Microsomes from Individuals with the CYP2C9*1/*1 Genotype. *Toxicological Sciences* **94**(2), 261-271.
- Kiang, T. K. L., Teng, X. W., Surendradoss, J., Karagiozov, S., Abbott, F. S., and Chang, T. K. H. (2011). Glutathione depletion by valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes: Role of biotransformation and temporal relationship with onset of toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **252**(3), 318-324.
- Kienhuis, A. S., Wortelboer, H. M., Maas, W. J., van Herwijnen, M., Kleinjans, J. C. S., van Delft, J. H. M., and Stierum, R. H. (2007). A sandwich-cultured rat hepatocyte system with increased metabolic competence evaluated by gene expression profiling. *Toxicology in Vitro* **21**(5), 892-901.
- Kitchin, K. T., Schmid, B. P., and Sanyal, M. K. (1981). Teratogenicity of cyclophosphamide in a coupled microsomal activating/embryo culture system. *Biochemical Pharmacology* **30**, 59-64.
- Klein, N. W., Vogler, M. A., Chatot, C. L., and Pierro, L. J. (1980). The use of cultured rat embryos to evaluate the teratogenic activity of serum: cadmium and cyclophosphamide. *Teratology* **21**, 199-208.
- Klug, S., Lewandowski, C., and Neubert, D. (1985). Modification and Standardization of the Culture of Early Postimplantation Embryos for Toxicological Studies. *Archives of Toxicology* **58**(2), 84-88.
- Kobayashi, K., Urashima, K., Shimada, N., and Chiba, K. (2002). Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat. *Biochem. Pharmacol.* **63**(5), 889-896.
- Kocarek, T. A., Schuetz, E. G., and Guzelian, P. S. (1993). Expression of multiple forms of cytochrome P450 mRNAs in primary cultures of rat hepatocytes maintained on matrigel. *Mol. Pharmacol.* **43**(3), 328-334.
- Kot, M., and Daniel, W. A. (2007). Effect of cytochrome P450 (CYP) inducers on caffeine metabolism in the rat. *Pharmacol. Rep.* **59**(3), 296-305.

- Kriek, E. (1992). 50 Years of Research on N-Acetyl-2-Aminofluorene, One of the Most Versatile Compounds in Experimental Cancer-Research. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **118**(7), 481-489.
- Lacey, E., and Watson, T. R. (1985). Structure-Activity-Relationships of Benzimidazole Carbamates As Inhibitors of Mammalian Tubulin, Invitro. *Biochemical Pharmacology* **34**(7), 1073-1077.
- Lake, B. G., Beamand, J. A., Japenga, A. C., Renwick, A., Davies, S., and Price, R. J. (1993). Induction of Cytochrome-P-450-Dependent Enzyme-Activities in Cultured Rat-Liver Slices. *Food and Chemical Toxicology* **31**(5), 377-&.
- Langsch, A., Giri, S., Acikgoz, A., Jasmund, I., Frericks, B., and Bader, A. (2009). Interspecies difference in liver-specific functions and biotransformation of testosterone of primary rat, porcine and human hepatocyte in an organotypical sandwich culture. *Toxicol. Lett.* **188**(3), 173-179.
- LeCluyse, E., Bullock, P., Madan, A., Carroll, K., and Parkinson, A. (1999). Influence of extracellular matrix overlay and medium formulation on the induction of cytochrome P-450 2B enzymes in primary cultures of rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* **27**(8), 909-915.
- LeCluyse, E. L., Bullock, P. L., and Parkinson, A. (1996). Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **22**(1-2), 133-186.
- Lee, M. S., Lee, Y. J., Kim, B. J., Shin, K. J., Chung, B. C., Baek, D. J., and Jung, B. H. (2009). The relationship between glucuronide conjugate levels and hepatotoxicity after oral administration of valproic acid. *Archives of Pharmacal Research* **32**(7), 1029-1035.
- Lenk, W., and Rosenbauer- Thilmann, R. (1993). Metabolism of 2-Acetylaminofluorene .1. Metabolism in vitro of 2-Acetylaminofluorene and 2-Acetylaminofluoren-9-One by Hepatic-Enzymes. *Xenobiotica* **23**(3), 241-257.
- Lerche-Langrand, C., and Toutain, H. J. (2000). Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology* **153**(1-3), 221-253.
- Liebsch, M., Grune, B., Seiler, A., Butzke, D., Oelgeschlager, M., Pirow, R., Adler, S., Riebeling, C., and Luch, A. (2011). Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Archives of Toxicology* **85**(8), 841-858.
- Lilienblum, W. (2008). Alternative methods to animal experiments. What can they afford in the safety testing of chemical substances under REACH? *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* **51**(12), 1434-1443.
- Liu, Z., Chan, K. K., and Wang, J. J. (2005). Tandem mass spectrometric analysis of cyclophosphamide, ifosfamide and their metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**(18), 2581-2590.
- Loescher, W., and Nau, H. (1985). Pharmacological Evaluation of Various Metabolites and Analogues of Valproic Acid. *Neuropharmacology* **24**(5), 427-435.

- Lopez-Garcia, M. P. (1998). Endogenous nitric oxide is responsible for the early loss of P450 in cultured rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **438**(3), 145-149.
- Lotlikar, P. D., Enemoto, M., Miller, J. A., and Miller, E. C. (1967). Species Variations in the N- and Ring- Hydroxylation of 2- Acetylaminofluorene and Effects of 3- Methylcholanthrene Pretreatment. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **125**, 341-346.
- Luijten, M., Verhoef, A., Westerman, A., and Piersma, A. H. (2008). Application of a metabolizing system as an adjunct to the rat whole embryo culture. *Toxicology in Vitro* **22**(5), 1332-1336.
- Mantovani, A., Ricciardi, C., Stazi, A. V., and Macri, C. (1995a). Effects Observed on Gestational Day-13 in Rat Embryos Exposed to Albendazole. *Reproductive Toxicology* **9**(3), 265-273.
- Mantovani, A., Macri, C., Ricciardi, C., and Stazi, A. V. (1995b). Histological alterations in gestational day 13 rat embryos from albendazole-treated dams. *Congenital Anomalies* **35**(4), 455-466.
- Marriner, S. E., Morris, D. L., Dickson, B., and Bogan, J. A. (1986). Pharmacokinetics of albendazole in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **30**(6), 705-708.
- Martignoni, M., Groothuis, G. M., and de, K. R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert. Opin. Drug Metab Toxicol.* **2**(6), 875-894.
- Martignoni, M., Monshouwer, M., de Kanter, R., Pezzetta, D., Moscone, A., and Grossi, P. (2004). Phase I and phase II metabolic activities are retained in liver slices from mouse, rat, dog, monkey and human after cryopreservation. *Toxicology in Vitro* **18**(1), 121-128.
- Marx-Stoelting, P., Adriaens, E., Ahr, H. J., Bremer, S., Garthoff, B., Gelbke, H. P., Piersma, A., Pellizzer, C., Reuter, U., Rogiers, V., Schenk, B., Schwengberg, S., Seiler, A., Spielmann, H., Steemans, M., Stedman, D. B., Vanparys, P., Vericat, J. A., Verwei, M., Van De Water, F., Weimer, M., and Schwarz, M. (2009). A Review of the Implementation of the Embryonic Stem Cell Test (EST) The report and recommendations of an ECVAM/ReProTect Workshop. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **37**(3), 313-328.
- Meerman, J. H., Beland, F. A., and Mulder, G. J. (1981). Role of sulfation in the formation of DNA adducts from N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in rat liver in vivo. Inhibition of N-acetylated aminofluorene adduct formation by pentachlorophenol. *Carcinogenesis* **2**(5), 413-416.
- Menegola, E., Di Renzo, F., Broccia, M. L., Prudenziati, M., Minucci, S., Massa, V., and Giavini, E. (2010). Inhibition of histone deacetylase activity on specific embryonic tissues as a new mechanism for teratogenicity. *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* **75**, 392-398.
- Mingoia, R. T., Nabb, D. L., Yang, C. H., and Han, X. (2007). Primary culture of rat hepatocytes in 96-well plates: Effects of extracellular matrix configuration on cytochrome

P450 enzyme activity and inducibility, and its application in in vitro cytotoxicity screening. *Toxicology in Vitro* **21**(1), 165-173.

Mirkes, P. E. (1985). Cyclophosphamide Teratogenesis: A Review. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* **5**, 75-88.

Mirkes, P. E., Fantel, A. G., Greenaway, J. C., and Shepard, T. H. (1981). Teratogenicity of Cyclophosphamide Metabolites - Phosphoramidate Mustard, Acrolein, and 4-Ketocyclophosphamide in Rat Embryos Cultured In vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* **58**(2), 322-330.

Mirkes, P. E., Greenaway, J. C., Rogers, J. G., and Brundrett, R. B. (1984). Role of Acrolein in Cyclophosphamide Teratogenicity in Rat Embryos In vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* **72**(2), 281-291.

Moeller, L., and Gustafsson, J. A. (1986). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of 2-nitrofluorene and its derivatives. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **13**(12), 681-688.

Monshouwer, M., van't Klooster, G. A. E., Nijmeijer, S. M., Witkamp, R. F., and van Miert, A. S. J. P. (1998). Characterization of cytochrome P450 isoenzymes in primary cultures of pig hepatocytes. *Toxicology in Vitro* **12**(6), 715-723.

Monteith, D. K., and Strom, S. C. (1990). A comparison of the inhibition of deacetylase in primary cultures of rat and human hepatocytes effecting metabolism and DNA- binding of 2-acetylaminofluorene. *Cell Biology and Toxicology* **6**(3), 269-285.

Moroni, P., Buronfosse, T., Longinsauvageon, C., Delatour, P., and Benoit, E. (1995). Chiral Sulfoxidation of Albendazole by the Flavin Adenine Dinucleotide-Containing and Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases from Rat-Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **23**(2), 160-165.

Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **65**(1-2), 55-63.

Nau, H., Zierer, R., Spielmann, H., Neubert, D., and Gansau, C. (1981). A New Model for Embryotoxicity Testing - Teratogenicity and Pharmacokinetics of Valproic Acid Following Constant-Rate Administration in the Mouse Using Human Therapeutic Drug and Metabolite Concentrations. *Life Sciences* **29**(26), 2803-2813.

Navarro, M., Canut, L., Carretero, A., Cristofol, C., Perez-Aparicio, F. J., Arboix, H., and Ruberte, J. (1999). Developmental toxicity in rat fetuses exposed to the benzimidazole netobimin. *Reproductive Toxicology* **13**(4), 295-302.

Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I. R., Sato, R., and Waterman, M. R. (1987). The P450 Gene Superfamily - Recommended Nomenclature. *Dna-A Journal of Molecular & Cellular Biology* **6**(1), 1-11.

New, D. A. T. (1978). Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biological Reviews* **53**, 81-122.

New, D. A. T., Coppola, P. T., and Cockroft, D. L. (1976). Improved development of headfold rat embryos in culture resulting from low oxygen and modifications of the culture serum. *Journal of Reprod. Fert.* **48**, 219-222.

Normington, K., and Russell, D. W. (1992). Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. *J. Biol. Chem.* **267**(27), 19548-19554.

Oesch-Bartlomowicz, B., Richter, B., Becker, R., Vogel, S., Padma, P. R., Hengstler, J. G., and Oesch, F. (2001). cAMP-dependent phosphorylation of CYP2B1 as a functional switch for cyclophosphamide activation and its hormonal control in vitro and in vivo. *International Journal of Cancer* **94**(5), 733-742.

Oglesby, L. A., Ebron, M. T., Beyer, P. E., Carver, B. D., and Kavlock, R. J. (1986). Coculture of Rat Embryos and Hepatocytes - Invitro Detection of A Proteratogen. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* **6**(2), 129-138.

Okada, A., Noyori, H., Yagen, B., Shimshoni, J. A., Bialer, M., and Fujiwara, M. (2009). Anticonvulsant Profile and Teratogenic Evaluation of Potent New Analogues of a Valproic Acid Urea Derivative in NMRI Mice. *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* **86**(5), 394-401.

Olinga, P., Groen, K., Hof, I. H., DeKanter, R., Koster, H. J., Leeman, W. R., Rutten, A. A. J. J., VanTwillert, K., and Groothuis, G. M. M. (1997). Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **38**(2), 59-69.

Omtzigt, J. G., Nau, H., Los, F. J., Pijpers, L., and Lindhout, D. (1992). The disposition of valproate and its metabolites in the late first trimester and early second trimester of pregnancy in maternal serum, urine, and amniotic fluid: effect of dose, co-medication, and the presence of spina bifida. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **43**(4), 381-388.

Omura, T., and Sato, R. (1964b). The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for its Hemoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **239**, 2370-2378.

Omura, T., and Sato, R. (1964a). The Carbon Monoxide- binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. *Journal of Biological Chemistry* **239**, 2379-2385.

Ozolins, T. R. S. (2010). Cyclophosphamide and the Teratology Society: An Awkward Marriage. *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* **89**(4), 289-299.

Ozolins, T. R. S., Oglesby, L. A., Wiley, M. J., and Wells, P. G. (1995). In-Vitro Murine Embryotoxicity of Cyclophosphamide in Embryos Cocultured with Maternal Hepatocytes - Development and Application of A Murine Embryo-Hepatocyte Coculture Model. *Toxicology* **102**(3), 259-274.

- Paine, A. J. (1990). The Maintenance of Cytochrome-P-450 in Rat Hepatocyte Culture - Some Applications of Liver-Cell Cultures to the Study of Drug-Metabolism, Toxicity and the Induction of the P-450 System. *Chemico-Biological Interactions* **74**(1-2), 1-31.
- Paquette, J. A., Kumpf, S. W., Streck, R. D., Thomson, J. J., Chapin, R. E., and Stedman, D. B. (2008). Assessment of the Embryonic Stem Cell Test and application and use in the pharmaceutical industry. *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* **83**(2), 104-111.
- Parent, R. A., Douglas, E. P., Schrimpf, M. K., Talaat, R. E., Doane, R. A., Caravello, H. E., Lee, S. J., and Sharp, D. E. (1998). Metabolism and Distribution of [2,3-¹⁴C]Acrolein in Sprague Dawley Rats. *Toxicological Sciences* **43**, 110-120.
- Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Drocourt, L., Assenat, E., Larrey, D., Pichard-Garcia, L., Vilarem, M. J., and Maurel, P. (2004). Cross-talk between xenobiotic detoxication and other signalling pathways: clinical and toxicological consequences. *Xenobiotica* **34**(7), 633-664.
- Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Duret, C., ujat-Chavanieu, M., Vilarem, M. J., and Maurel, P. (2008). The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: Crosstalk and consequences. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **48**, 1-32.
- Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., and Raunio, H. (2008). Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology* **82**(10), 667-715.
- Pfeiffer, E., and Metzler, M. (2004). Effect of bisphenol A on drug metabolising enzymes in rat hepatic microsomes and precision-cut rat liver slices. *Archives of Toxicology* **78**(7), 369-377.
- Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A., and Klein, P. S. (2001). Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *Journal of Biological Chemistry* **276**(39), 36734-36741.
- Philip, P. A., Ali-Sadat, S., Doehmer, J., Kocarek, T., Akhtar, A., Lu, H., and Chan, K. K. (1999). Use of V79 cells with stably transfected cytochrome P450 cDNAs in studying the metabolism and effects of cytotoxic drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **43**, 59-67.
- Piersma, A. H. (1993). *Session 3B: Teratological/Toxicological Aspects- Validation Studies, Industrial Applications* Whole Embryo Culture and Toxicity Testing. *Toxicology in Vitro* **7**(6), 763-768.
- Piersma, A. H., Attenon, P., Bechter, R., Govers, M. J. A. P., Krafft, N., Schmid, B. P., Stadler, J., Verhoef, A., and Verseil, C. (1995). Interlaboratory Evaluation of Embryotoxicity in the Postimplantation Rat Embryo Culture. *Reproductive Toxicology* **9**(3), 275-280.
- Piersma, A. H., Genschow, E., Verhoef, A., Spanjersberg, M. Q. I., Brown, N. A., Brady, M., Burns, A., Clemann, N., Seiler, A., and Spielmann, H. (2004). Validation of the postimplantation rat whole-embryo culture test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **32**(3), 275-307.

- Piersma, A. H., Vanaerts, L. A. G. J., Verhoef, A., Garbisberkvens, J. M., Robinson, J. E., Peereboomstegeman, J. H. J. C., and Peters, P. W. J. (1991). Biotransformation of Cyclophosphamide in Postimplantation Rat Embryo Culture Using Maternal Hepatocytes in Coculture. *Pharmacology & Toxicology* **69**(1), 47-51.
- Piscopo, S. E., and Smoak, I. W. (1997). Comparison of effects of albendazole sulfoxide on in vitro produced bovine embryos and rat embryos. *American Journal of Veterinary Research* **58**(9), 1038-1042.
- Plant, N. (2004). Strategies for using *in vitro* screens in drug metabolism. *Drug Discovery Today* **9**(7), 328-336.
- Price, R. J., Ball, S. E., Renwick, A. B., Barton, P. T., Beamand, J. A., and Lake, B. G. (1998). Use of precision-cut rat liver slices for studies of xenobiotic metabolism and toxicity: comparison of the Krumdieck and Brendel tissue slicers. *Xenobiotica* **28**(4), 361-371.
- Radatz, M., Ehlers, K., Yagen, B., Bialer, M., and Nau, H. (1998). Valnoctamide, valpromide and valnoctic acid are much less teratogenic in mice than valproic acid. *Epilepsy Research* **30**, 41-48.
- Rettie, A. E., Boberg, M., Rettenmeier, A. W., and Baillie, T. A. (1988). Cytochrome P-450-catalyzed Desaturation of Valproic Acid *in Vitro*- Species differences, induction effects, and mechanistic studies. *Journal of Biological Chemistry* **263**(27), 13733-13738.
- Richert, L., Binda, D., Hamilton, G., Viollon-Abadie, C., Alexandre, E., Bigot-Lasserre, D., Bars, R., Coassolo, P., and LeCluyse, E. (2002). Evaluation of the effect of culture configuration on morphology, survival time, antioxidant status and metabolic capacities of cultured rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro* **16**(1), 89-99.
- Riebeling, C., Hayess, K., Peters, A. K., Steemans, M., Spielmann, H., Luch, A., and Seiler, A. E. M. (2012). Assaying embryotoxicity in the test tube: Current limitations of the embryonic stem cell test (EST) challenging its applicability domain. *Critical Reviews in Toxicology* **42**(5), 443-464.
- Riebeling, C., Pirow, R., Becker, K., Buesen, R., Eikel, D., Kaltenhauser, J., Meyer, F., Nau, H., Slawik, B., Visan, A., Volland, J., Spielmann, H., Luch, A., and Seiler, A. (2011). The Embryonic Stem Cell Test as Tool to Assess Structure-Dependent Teratogenicity: The Case of Valproic Acid. *Toxicological Sciences* **120**(2), 360-370.
- Ringel, M., Oesch, F., Gerl, M., Klebach, M., Quint, M., Bader, A., Bottger, T., and Hengstler, J. G. (2002). Permissive and suppressive effects of dexamethasone on enzyme induction in hepatocyte co-cultures. *Xenobiotica* **32**(8), 653-666.
- Ringel, M., von Mach, M. A., Santos, R., Feilen, P. J., Brulport, M., Hermes, M., Bauer, A. W., Schormann, W., Tanner, B., Schon, M. R., Oesch, F., and Hengstler, J. G. (2005). Hepatocytes cultured in alginate microspheres: an optimized technique to study enzyme induction. *Toxicology* **206**(1), 153-167.
- Rolin, S., Souhailielamri, H., Batt, A. M., Levy, M., Bagrel, D., and Siest, G. (1989b). Study of the *In vitro* Bioactivation of Albendazole in Human-Liver Microsomes and Heptoma Cell-Lines. *Cell Biology and Toxicology* **5**(1), 1-14.

Rolin, S., Souhailielamri, H., Batt, A. M., Levy, M., Bagrel, D., and Siest, G. (1989a). Study of the In vitro Bioactivation of Albendazole in Human-Liver Microsomes and Heptoma Cell-Lines. *Cell Biology and Toxicology* **5**(1), 1-14.

Roy, P., Yu, L. J., Crespi, C. L., and Waxman, D. J. (1999). Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metabolism and Disposition* **27**(6), 655-666.

Rücker, G., Neugebauer, M., and Willems, G. G. (2008). Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Lehrbuch zur spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysemethoden, Stuttgart.

Russel, W. M. F., and Burch, R. L. (1959). The principles of humane experimental techniques, p. 238 S. Methuen, London.

Sadler, T. W., Horton, W. E., and Warner, C. W. (1982). Whole Embryo Culture - A Screening Technique for Teratogens. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* **2**(3-4), 243-253.

Seglen, P. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in Cell Biology* **13**, 29-83.

Seiler, A., Oelgeschlager, M., Liebsch, M., Pirow, R., Riebeling, C., Tralau, T., and Luch, A. (2011). Developmental toxicity testing in the 21st century: the sword of Damocles shattered by embryonic stem cell assays? *Archives of Toxicology* **85**, 1361-1372.

Seiler, A., Visan, A., Buesen, R., Genschow, E., and Spielmann, H. (2004). Improvement of an in vitro stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test. *Reproductive Toxicology* **18**(2), 231-240.

Seiler, A. E. M., and Spielmann, H. (2011). The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro. *Nature Protocols* **6**(7), 961-978.

Seiler, A. E., Buesen, R., Visan, A., and Spielmann, H. (2006). Use of murine embryonic stem cells in embryotoxicity assays - The embryonic stem cell test. In *Methods in Molecular Biology: 329 Embryonic Stem Cell Protocols: Second Edition: Volume 1 ed.*, pp. 371-395. HUMANA PRESS INC.

Sha, K., and Winn, L. M. (2010). Characterization of Valproic Acid-Initiated Homologous Recombination. *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* **89**(2), 124-132.

Sidhu, J. S., and Omiecinski, C. J. (1995). Modulation of xenobiotic-inducible cytochrome P450 gene expression by dexamethasone in primary rat hepatocytes. *Pharmacogenetics* **5**(1), 24-36.

Sonderfan, A. J., and Parkinson, A. (1988). Inhibition of steroid 5 alpha-reductase and its effects on testosterone hydroxylation by rat liver microsomal cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* **265**(1), 208-218.

- Spielmann, H. (2005). Predicting the risk of developmental toxicity from in vitro assays. *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**, 375-380.
- Spielmann, H., Seiler, A., Bremer, S., Hareng, L., Hartung, T., Ahr, H., Faustman, E., Haas, U., Moffat, G. J., Nau, H., Vanparys, P., Piersma, A., Sintes, J. R., and Stuart, J. (2006). The practical application of three validated in vitro embryotoxicity tests - The Report and Recommendations of an ECVAM/ZEBET Workshop (ECVAM Workshop 57). *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **34**(5), 527-538.
- Spielmann, H., Pohl, I., Doering, B., Liebsch, M., and Moldenhauer, F. (1997). The embryonic stem cell test, an in vitro embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. *In Vitro Toxicology* **10**(1), 119-127.
- Spilman, S. D., and Byard, J. L. (1981). Metabolism of 2-Acetylaminofluorene in Primary Rat Hepatocyte Cultures. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **7**(1), 93-106.
- Steinberg, P., Fischer, T., Kiulies, S., Biefang, K., Platt, K. L., Oesch, F., Bottger, T., Bulitta, C., Kempf, P., and Hengstler, J. (1999). Drug metabolizing capacity of cryopreserved human, rat, and mouse liver parenchymal cells in suspension. *Drug Metabolism and Disposition* **27**(12), 1415-1422.
- Szotakova, B., Baliharova, V., Lamka, J., Nozinova, E., Wsol, V., Velik, J., Machala, M., Neca, J., Soucek, P., Susova, S., and Skalova, L. (2004). Comparison of in vitro activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep. *Research in Veterinary Science* **76**(1), 43-51.
- Takeuchi, T., Sugimoto, T., Nashida, N., and Kobayashi, Y. (1988). Evaluation of the Cytotoxicity of Sodium Valproate on Primary Cultured Rat Hepatocytes. *Neuropediatrics* **19**, 158-161.
- Tang, W., and Abbott, F. S. (1996). Bioactivation of a toxic metabolite of valproic acid, (E)-2-propyl-2,4-pentadienoic acid, via glucuronidation. LC/MS/MS characterization of the GSH-glucuronide diconjugates. *Chem. Res. Toxicol.* **9**(2), 517-526.
- Teruel, M. T., Felipe, A. E., Solana, H. D., Sallovit, J. M., and Lanusse, C. E. (2003). Placental and fetal toxicity of albendazole sulphoxide in Wistar rats. *Veterinary and Human Toxicology* **45**(3), 131-136.
- Thomson, J., Johnson, K., Chapin, R., Stedman, D., Kumpf, S., and Ozolins, T. R. S. (2011). Not a Walk in the Park: The ECVAM Whole Embryo Culture Model Challenged With Pharmaceuticals and Attempted Improvements With Random Forest Design. *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* **92**(2), 111-121.
- Turnbull, D. M., Bone, A. J., Bartlett, K., Koundakjian, P. P., and Sherratt, H. S. A. (1983). The Effects of Valproate on Intermediary Metabolism in Isolated Rat Hepatocytes and Intact Rats. *Biochemical Pharmacology* **32**(12), 1887-1892.
- Uibel, F., Muehleisen, A., Koehle, C., Weimer, M., Stummann, T. C., Bremer, S., and Schwarz, M. (2010). ReProGlo: A new stem cell-based reporter assay aimed to predict embryotoxic potential of drugs and chemicals. *Reproductive Toxicology* **30**(1), 103-112.

- van Aerts, L. A. G. J., Hahne, S. J. M., Oostendorp, A. G. M., Pertijs, J. C. L. M., Fijneman, P. H. S., Bos, R. P., Peereboom, J. H. J. C., and Noordhoek, J. (1993). Sex Difference in Aroclor-1254 Induction of Rat Hepatocytes - Consequences for In-Vitro Embryotoxicity and Mutagenicity of Cyclophosphamide. *Toxicology in Vitro* **7**(6), 769-775.
- van Aerts, L. A. G. J., Peereboomstegeman, J. H. J. C., and Noordhoek, J. (1995). Production of Cyclophosphamide Metabolites by Primary Hepatocyte Cultures from Male and Pregnant Rats - Effect of Aroclor-1254 Pretreatment. *Toxicology in Vitro* **9**(2), 151-156.
- van Dartel, D. A. M., Pennings, J. L. A., Hendriksen, P. J. M., van Schooten, F., and Piersma, A. H. (2009). Early gene expression changes during embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes and their modulation by monobutyl phthalate. *Reproductive Toxicology* **27**(2), 93-102.
- van Dartel, D. A. M., and Piersma, A. H. (2011). The embryonic stem cell test combined with toxicogenomics as an alternative testing model for the assessment of developmental toxicity. *Reproductive Toxicology* **32**(2), 235-244.
- Velik, J., Baliharova, V., Skalova, L., Szotakova, B., Wsol, V., and Lamka, J. (2003). Stereospecific biotransformation of albendazole in mouflon and rat-isolated hepatocytes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **26**(4), 297-302.
- Vinken, M., Decrock, E., Doktorova, T., Ramboer, E., De, V. E., Vanhaecke, T., Leybaert, L., and Rogiers, V. (2011). Characterization of spontaneous cell death in monolayer cultures of primary hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **85**(12), 1589-1596.
- Wang, H., Cheng, J. D., Montgomery, D., and Cheng, K. C. (2009). Evaluation of the binding orientations of testosterone in the active site of homology models for CYP2C11 and CYP2C13. *Biochem Pharmacol* **78**, 406-413.
- Waxman, D. J., Attisano, C., Guengerich, F. P., and Lapenson, D. P. (1988). Human-Liver Microsomal Steroid-Metabolism - Identification of the Major Microsomal Steroid-Hormone 6-Beta-Hydroxylase Cytochrome-P-450 Enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **263**(2), 424-436.
- Waxman, D. J., and Azaroff, L. (1992). Phenobarbital Induction of Cytochrome-P-450 Gene-Expression. *Biochemical Journal* **281**, 577-592.
- Waxman, D. J., Morrissey, J. J., Naik, S., and Jauregui, H. O. (1990). Phenobarbital induction of cytochromes P-450. High-level long-term responsiveness of primary rat hepatocyte cultures to drug induction, and glucocorticoid dependence of the phenobarbital response. *Biochem. J.* **271**(1), 113-119.
- West, P. R., Weir, A. M., Smith, A. M., Donley, E. L. R., and Cezar, G. G. (2010). Predicting human developmental toxicity of pharmaceuticals using human embryonic stem cells and metabolomics. *Toxicology and Applied Pharmacology* **247**(1), 18-27.
- Whitlow, S., Burgin, H., and Clemann, N. (2007). The embryonic stem cell test for the early selection of pharmaceutical compounds. *Altex-Alternativen zu Tierexperimenten* **24**(1), 3-7.

- Whittaker, S. G., and Faustman, E. M. (1991). Effects of Albendazole and Albendazole Sulfoxide on Cultures of Differentiating Rodent Embryonic-Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **109**(1), 73-84.
- Whittaker, S. G., and Faustman, E. M. (1992). Effects of Benzimidazole Analogs on Cultures of Differentiating Rodent Embryonic-Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **113**(1), 144-151.
- Wortelboer, H. M., Dekruif, C. A., Vaniersel, A. A. J., Falke, H. E., Noordhoek, J., and Blaauboer, B. J. (1991). Comparison of Cytochrome P450 Isoenzyme Profiles in Rat-Liver and Hepatocyte Cultures - the Effects of Model Inducers on Apoproteins and Biotransformation Activities. *Biochemical Pharmacology* **42**(2), 381-390.
- Wright, M. C., and Paine, A. J. (1992). Evidence That the Loss of Rat-Liver Cytochrome-P450 Invitro Is Not Solely Associated with the Use of Collagenase, the Loss of Cell-Cell Contacts and Or the Absence of An Extracellular-Matrix. *Biochemical Pharmacology* **43**(2), 237-243.
- Wrighton, S. A., Ring, B. J., and VandenBranden, M. (1995). The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies. *Toxicol. Pathol.* **23**(2), 199-208.
- Yu, L. J., Drewes, P., Gustafsson, K., Brain, E. G. C., Hecht, J. E. D., and Waxman, D. J. (1999). In vivo modulation of alternative pathways of P-450-catalyzed cyclophosphamide metabolism: Impact on pharmacokinetics and antitumor activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **288**(3), 928-937.
- Zhang, J., Tian, Q., Chan, S. Y., Li, S. C., and Zhou, S. F. (2005). Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. *Drug Metabolism Reviews* **37**, 611-703.
- Zhu, X., Wang, S., Liu, Q., Xu, Q., Zhang, C., Xu, S., Wang, X., Li, D., and Hu, H. (2011). Simultaneous determination of benzimidazoles and their metabolites in plasma using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic studies in rabbits. *J. AOAC Int.* **94**(3), 839-846.
- zur Nieden, N. I., Davis, L. A., and Rancourt, D. E. (2010). Monolayer cultivation of osteoprogenitors shortens duration of the embryonic stem cell test while reliably predicting developmental osteotoxicity. *Toxicology* **277**(1-3), 66-73.
- zur Nieden, N. I., Kempka, G., and Ahr, H. J. (2004). Molecular multiple endpoint embryonic stem cell test - a possible approach to test for the teratogenic potential of compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology* **194**(3), 257-269.
- zur Nieden, N. I., Ruf, L. J., Kempka, G., Hildebrand, H., and Ahr, H. J. (2001). Molecular markers in embryonic stem cells. *Toxicology in Vitro* **15**(4-5), 455-461.
- Zurlo, J., and Arterburn, L. M. (1996). Characterization of a primary hepatocyte culture system for toxicological studies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **32**(4), 211-220.

Sonstige

„Agilent Q - TOF LC/MS Techniques and Operation“ Seminarunterlagen freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG.

12 Anhang

12.1 Charakterisierung zellulärer Biotransformationssysteme

12.1.1 Testosteron-Metabolismus

200 μM Testosteron werden für 24 Stunden in den Hepatozytenkulturen von Ratte, Schwein und Mensch inkubiert. Um den Einfluss des Induktionscocktails auf den Testosteronmetabolismus zu untersuchen, werden außerdem 200 μM Testosteron in induzierten Hepatozytenkulturen für 24 Stunden inkubiert. Der in Ratten- und Schweinehepatozyten eingesetzte Induktionscocktail besteht aus 0,1 μM Dexamethason, 100 μM Phenobarbital und 10 μM β -Naphthoflavon. Der Induktionscocktail für Humanhepatozyten enthält neben 100 μM Phenobarbital und 10 μM β -Naphthoflavon, 100 μM Dexamethason und zusätzlich 100 μM Rifampicin.

12.1.1.1 Primäre Rattenhepatozyten

Die Präparation der Rattenhepatozyten, die Testosteroninkubation sowie die chromatographische Analyse der Inkubate erfolgt bei BASF SE. Die Aufarbeitung und Analyse der Proben ist in Kap. 4.2.2.2 beschrieben. In Tabelle 12.1 sind die Analyten aus dem aktiven Inkubat, normiert auf die Testosteronkonzentration im inaktiven Inkubat, von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Tabelle 12.1: Testosteron-Metabolitenprofil aus Rattenhepatozyten

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD bzw. (min;max Wert) der Analyten aus dem aktiven Inkubat normiert auf die Testosteronkonzentration im inaktiven Inkubat (basal: n = 3, induziert: n = 2). Wiederfindung: basal: 37%, induziert: 42%. n.n.: nicht nachweisbar.

Analyten	basal [%]	induziert [%]
Testosteron	2,0 \pm 2,6	n.n.
6 β -OHT	2,4 \pm 3,4	n.n.
16 α -OHT	1,4 \pm 0,9	n.n.
2 α -OHT	1,8 \pm 1,8	n.n.
15 α -OHT	1,0 \pm 1,4	n.n.
Androstendion	0,5 \pm 0,6	n.n.
Testosteron, konj.	12,6 (6,8 ; 18,4)	31,6 (15,8 ; 47,4)
6 α -OHT, konj.	n.n.	0,4 (0,0 ; 0,9)
6 β -OHT, konj.	n.n.	2,1 (0,0 ; 4,2)
16 α -OHT, konj.	4,2 (0,0 ; 8,5)	1,7 (0,5 ; 2,9)
16 β -OHT, konj.	0,1 (0,0 ; 0,2)	1,8 (0,9 ; 2,6)
2 α -OHT, konj.	6,2 (0,6 ; 11,7)	4,0 (1,0 ; 7,0)
15 α -OHT, konj.	n.n.	0,1 (0,0 ; 0,2)

12.1.1.2 Primäre Schweinehepatozyten

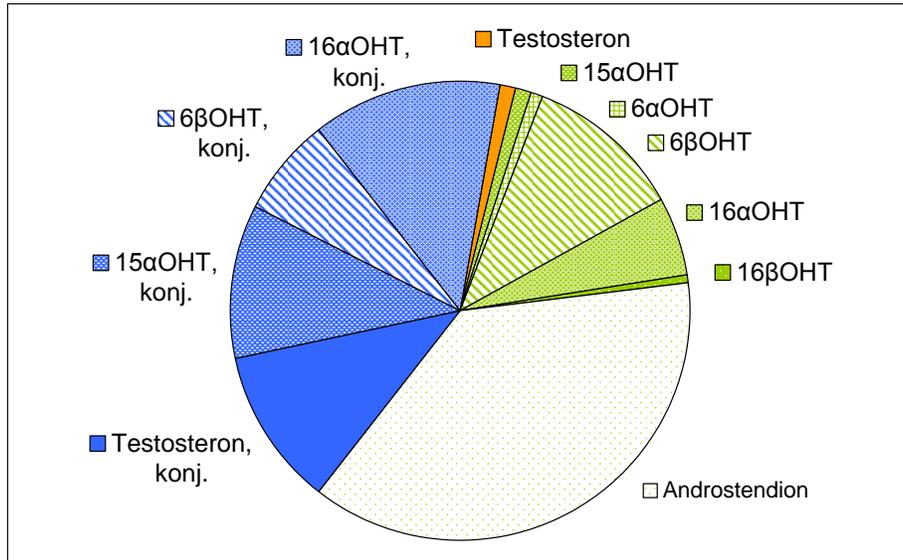
Die Präparation der Schweinehepatozyten sowie die Testosteron-Inkubation werden an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Die Medienüberstände werden zur Analyse an die BASF SE gesendet. Die Aufarbeitung und Analyse der Proben ist in Kap. 4.2.2.2 beschrieben. In Tabelle 12.2 sind die Analyten aus dem aktiven Inkubat, normiert auf die Testosteronkonzentration im inaktiven Inkubat, von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Abbildung 12.1 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

Tabelle 12.2: Testosteron-Metabolitenprofil aus Schweinehepatozyten

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Analyten aus dem aktiven Inkubat normiert auf die Testosteronkonzentration im inaktiven Inkubat ($n = 3$). Wiederfindung: basal: 52%, induziert: 60%. n.n.: nicht nachweisbar

Analyten	basal [%]	induziert [%]
Testosteron	0,6 \pm 0,7	0,2 \pm 0,3
6 α -OHT	0,5 \pm 0,7	0,3 \pm 0,2
6 β -OHT	6,0 \pm 3,5	7,4 \pm 7,1
16 α -OHT	3,1 \pm 2,0	2,2 \pm 1,8
16 β -OHT	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,2
2 α -OHT	n.n.	0,3
Androstendion	20,5 \pm 9,3	33,0 \pm 31,8
15 α -OHT	0,6 \pm 0,7	0,4
Testosteron, konj.	6,0 \pm 0,7	9,9 \pm 9,9
6 β -OHT, konj.	3,7 \pm 3,3	3,2 \pm 3,1
16 α -OHT, konj.	7,3 \pm 9,4	2,8 \pm 2,0
15 α -OHT, konj.	5,9 \pm 7,7	0,6 \pm 0,5

a)



b)

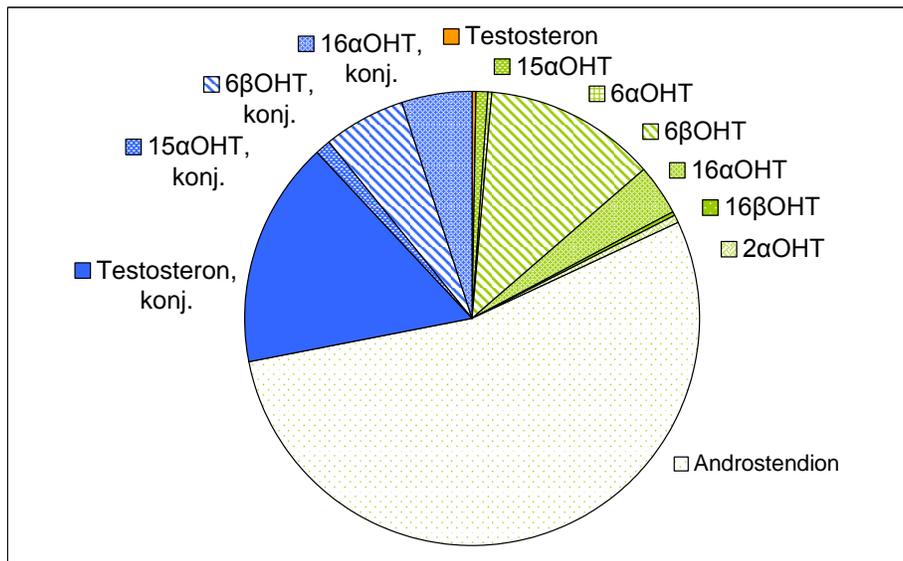


Abbildung 12.1: Testosteron Metabolitenprofil aus Schweinehepatozyten a) basal b) induziert
 Dargestellt sind die Anteile der Analyten aus der a) 24h Inkubation (basal, n = 3) und b) 24h Inkubation (induziert, n = 3). Die Konzentrationen einzelner Metaboliten sind auf die Summe der Konzentration der detektierten Metaboliten normiert. Der Umsatz beträgt jeweils 99 %. Dargestellt sind in orange) Anteil des nicht-metabolisierten Testosterons, in grün) Phase-I-Metaboliten und in blau) Phase-II-Metaboliten. OHT: Hydroxytestosteron; konj.: konjugiert.

12.1.1.3 Primäre Humanhepatozyten

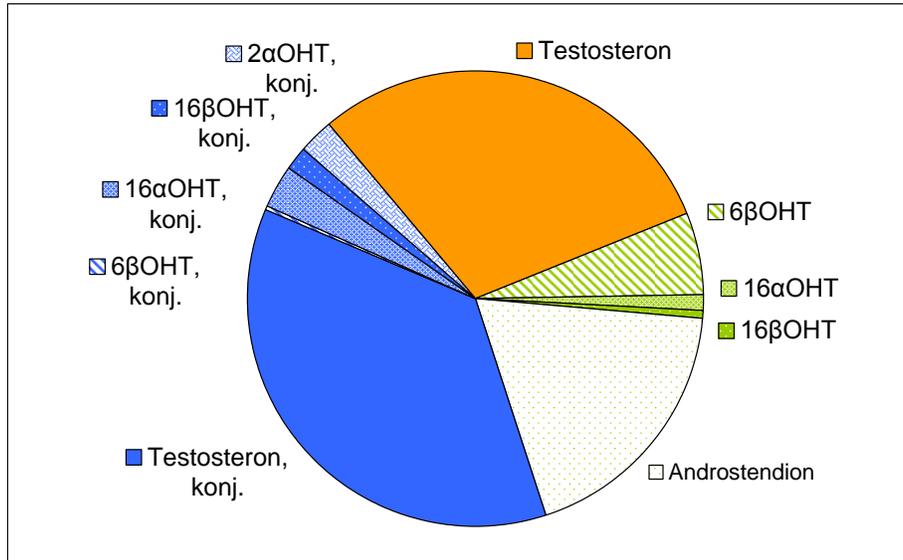
Die Präparation der Humanhepatozyten sowie die Testosteron-Inkubation werden an der Technischen Universität München durchgeführt. Die Medienüberstände werden zur Analyse an die BASF SE gesendet. Die Aufarbeitung und Analyse der Proben ist in Kap. 4.2.2.2 beschrieben. In Tabelle 12.3 sind die Analyten aus dem aktiven Inkubat, normiert auf die Testosteronkonzentration im inaktiven Inkubat, von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Abbildung 12.2 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

Tabelle 12.3: Testosteron-Metabolitenprofil aus Humanhepatozyten

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Analyten aus dem aktiven Inkubat normiert auf die Testosteronkonzentration im inaktiven Inkubat (n = 3). Wiederfindung: basal: 61 %, induziert: 37 %.

Analyten	basal [%]	induziert [%]
Testosteron	18,4 \pm 4,2	9,5 \pm 16,5
6 β -OHT	3,6 \pm 3,3	3,7 \pm 2,6
16 α -OHT	0,8 \pm 0,6	1,3 \pm 0,3
16 β -OHT	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,2
Androstendion	11,3 \pm 4,6	8,0 \pm 9,4
Testosteron, konj.	22,4 \pm 13,3	9,6 \pm 5,4
6 β -OHT, konj.	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1
16 α -OHT, konj.	1,8 \pm 0,8	2,0 \pm 1,0
16 β -OHT, konj.	1,1 \pm 0,3	0,9 \pm 0,4
2 α -OHT, konj.	1,6 \pm 1,4	0,8 \pm 0,2

a)



b)

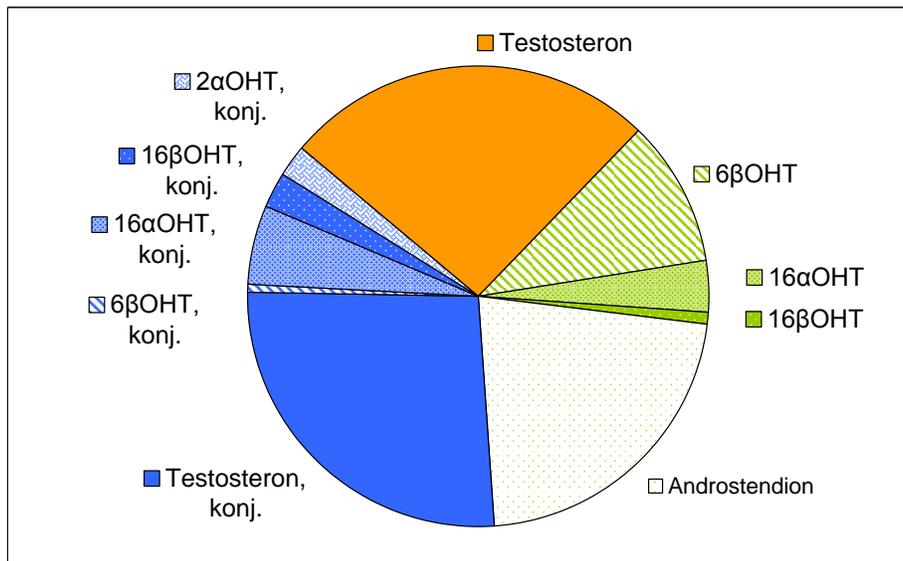


Abbildung 12.2: Testosteron Metabolitenprofil aus Humanhepatozyten a) basal b) induziert
 Dargestellt sind die Anteile der Analyten aus der a) 24h Inkubation (basal, n = 3) und b) 24h Inkubation (induziert, n = 3). Die Konzentrationen einzelner Metaboliten sind auf die Summe der Konzentration der detektierten Metaboliten normiert. Der Umsatz beträgt a) 82 % und b) 91 %. Dargestellt sind in orange) Anteil des nicht-metabolisierten Testosterons, in grün) Phase-I-Metaboliten und in blau) Phase-II-Metaboliten. OHT: Hydroxytestosteron; konj.: konjugiert.

12.1.2 Zytotoxizität von 2-AAF in Rattenleberschnitten

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von 2-AAF in Rattenleberschnitten werden je zwei gleichbehandelte Schnitte nach einer 24 Stunden-Inkubation mit einer Ultraschallsonde in 50 mM Tris-HCl-Puffer homogenisiert und bei 1000 x g 10 min bei 4°C zentrifugiert.

MTT-Test

Für den MTT-Test (vgl. Kap. 4.2.1) werden 10 µl des Homogenats für 30 min bei 37°C in Anwesenheit von 0,5 mg/ml MTT und dem Kofaktor NADH in 50 mM Tris-HCl-Puffer inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Isopropanol werden je dreimal 200 µl der Lösung in eine Mikrowellplatte überführt und bei 570 nm und 690 nm photometrisch gemessen. Die Ergebnisse der behandelten Schnitte werden auf die Kontrolle normiert (vgl. Tabelle 12.4).

Tabelle 12.4: Vitalität von Rattenleberschnitten nach Inkubation mit 2-AAF

Dargestellt sind die Mittelwert ± SD der mittels MTT-Test erhobenen Vitalität normiert auf die Kontrolle nach 24-stündiger Inkubation von 10 und 100 µM 2-AAF in Rattenleberschnitten (n = 3).

2-AAF-Konzentration	Vitalität [% Kontrolle]
10 µM	99,6 ± 5,0
100 µM	103,7 ± 1,4

LDH-Aktivität

Für die Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität (LDH) wird neben dem Schnitt-homogenat auch der Medienüberstand der jeweiligen Inkubation herangezogen. Die Messung erfolgt in einem Hitachi-Pipettierroboter. Sie unterliegt dem Prinzip des Umsatzes von Lactat zu Pyruvat in Anwesenheit von NAD⁺ und LDH. Die Bildung von NADH wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Ein Anstieg der LDH-Aktivität im Medium deutet auf das Absterben von Zellen hin.

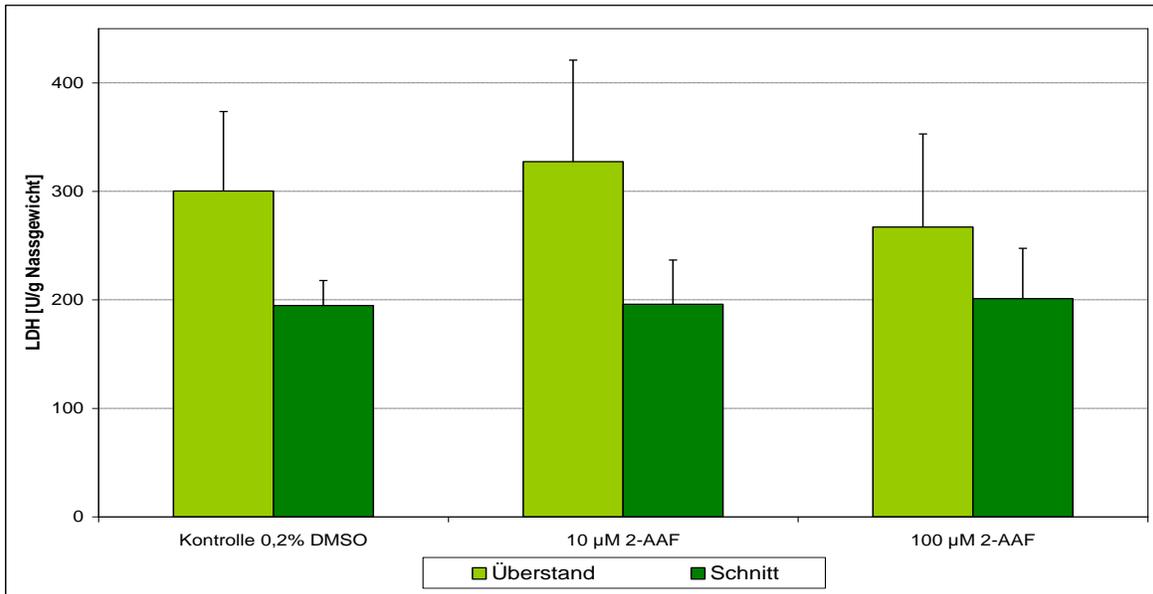


Abbildung 12.3: LDH-Aktivität in Rattenleberschnitten und im Medienüberstand

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der LDH-Konzentration im Schnitthomogenat und im Medienüberstand von Rattenleberschnitten nach 24-stündiger Inkubation von 10 und 100 µM 2-AAF ($n = 2$).

Die mittels MTT-Test erhobene Vitalität der Leberschnitte nach 24-stündiger Inkubation von 10 und 100 µM 2-AAF beträgt zwischen 99 und 104 % der Kontrolle (vgl. Tabelle 12.4). Die LDH-Aktivitäten im Homogenat und im Medienüberstand der mit 2-AAF inkubierten Leberschnitte sind mit der Kontrolle vergleichbar (vgl. Abbildung 12.3). 2-AAF kann somit bis zu einer Konzentration von 100 µM für 24 Stunden in der Kultur von Rattenleberschnitten ohne zytotoxischen Effekt inkubiert werden.

12.1.3 Strukturaufklärung

12.1.3.1 Cyclophosphamid

CPA wird in Rattenhepatozyten unter basalen Bedingungen für 24 Stunden inkubiert. Die Konzentration beträgt 100 μM . Die Inkubate werden zur Strukturaufklärung der Metaboliten mittels Q-TOF LC/MS analysiert. Im Folgenden sind beispielhaft die Full Scan- und Fragmentierungsspektren sowie die Massenchromatogramme der Analyten aus einem aktiven Inkubat abgebildet. Bei Signalen innerhalb der Massenchromatogramme, welche keinem Metaboliten zugeordnet worden sind, kann es sich sowohl um Isotopen- als auch um Matrixpeaks handeln. Die Darstellung der Metaboliten erfolgt nach ihrer Retentionszeit (vgl. Kap. 5.1.6.1). Bei den Strukturformeln innerhalb der Fragmentierungsspektren handelt es sich um Strukturvorschläge identifizierter Metaboliten.

CPA

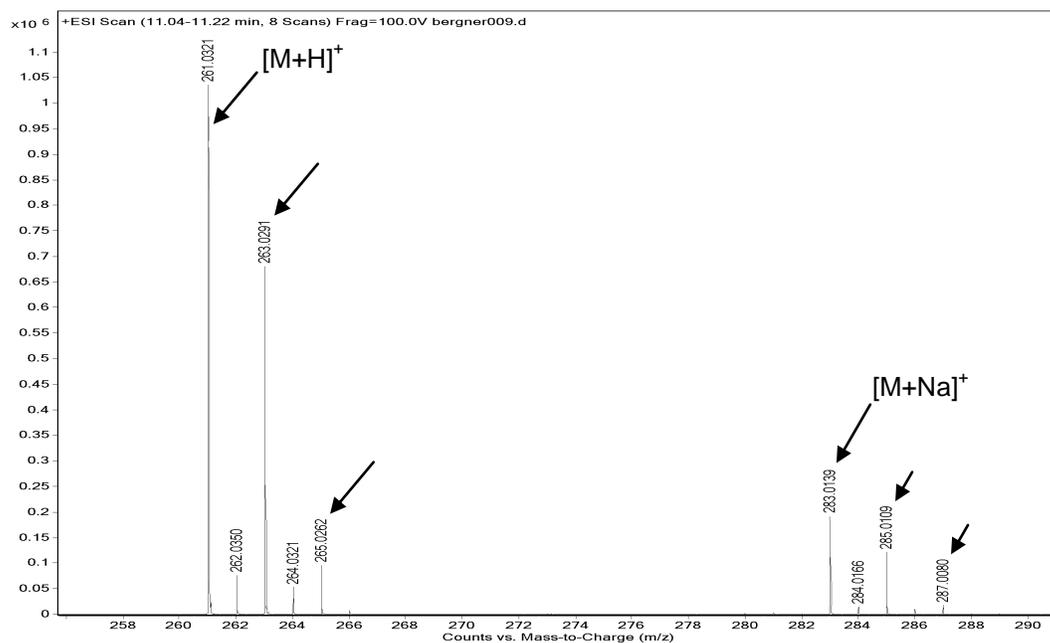
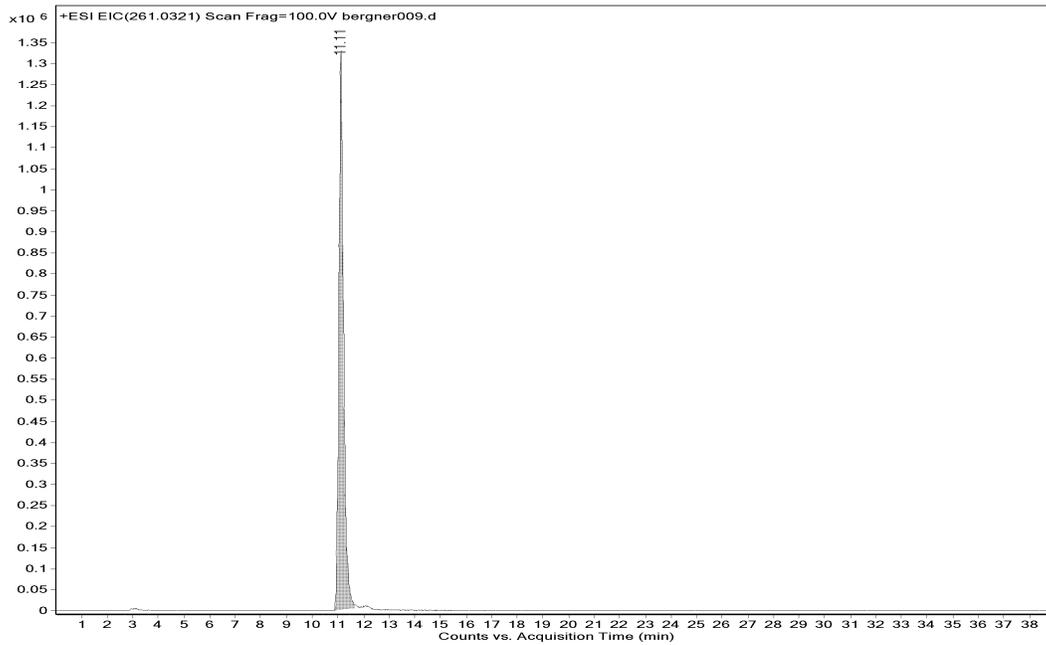


Abbildung 10.4: Massenspektrum von CPA bei RT 11,11 min aus der aktiven Inkubation von 100 μM CPA in primären Rattenhepatozyten. $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 261,0321 und $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 283,0139. \rightarrow $^{35/37}\text{Cl}-[\text{M}+\text{H}]^+$ und $^{37/37}\text{Cl}-[\text{M}+\text{H}]^+$.

a)



b)

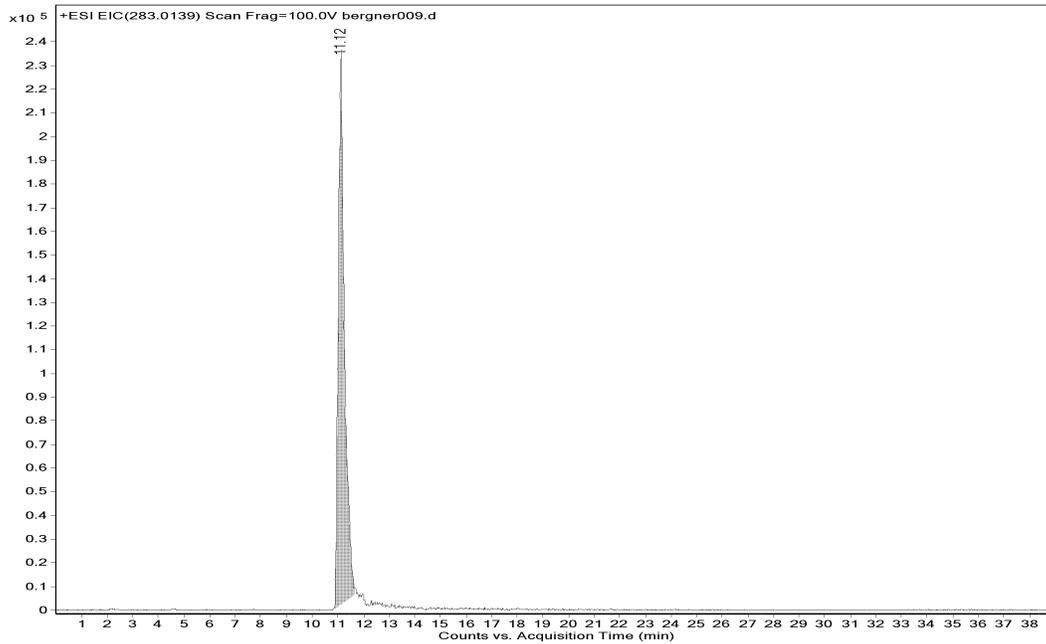


Abbildung 10.5: Massenchromatogramme von CPA über a) m/z 261,0321 und b) m/z 283,0139 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten.

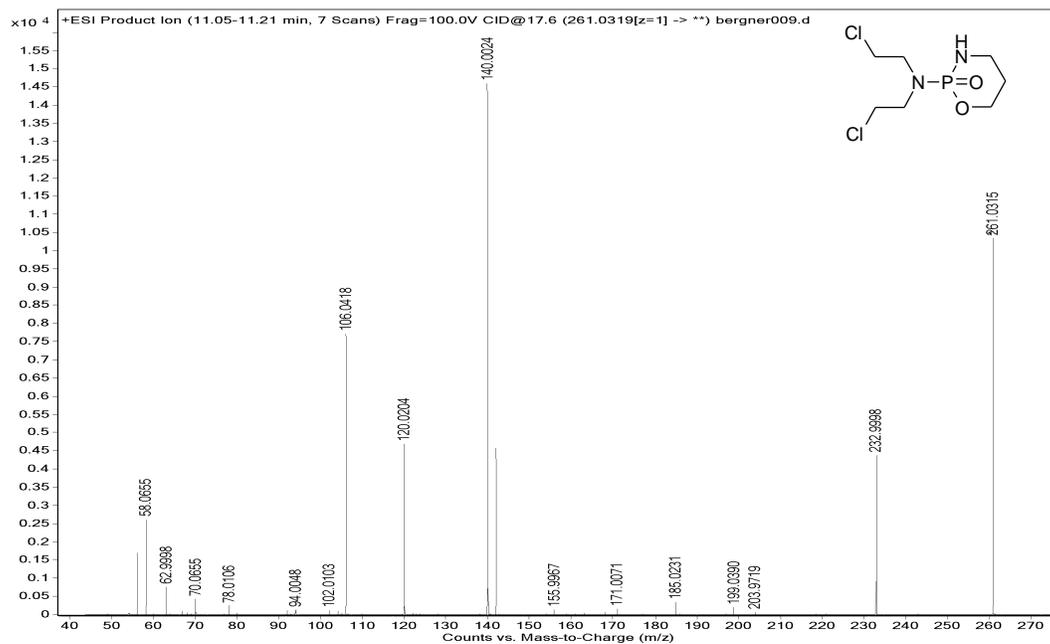
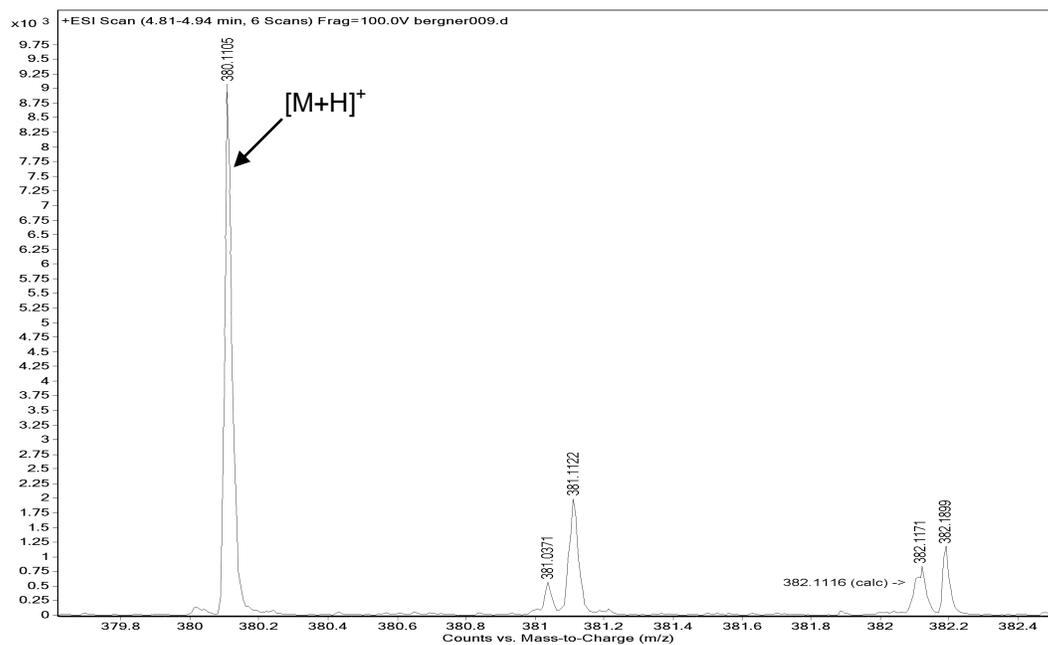


Abbildung 10.6: MS/MS-Spektrum von CPA. $[M+H]^+$: m/z 261,0321. Fragment 1: m/z 232,9998, Fragment 2: m/z 142,0186, Fragment 3: m/z 140,0024, Fragment 4: m/z 106,0418.

CPA-M1

a)



b)

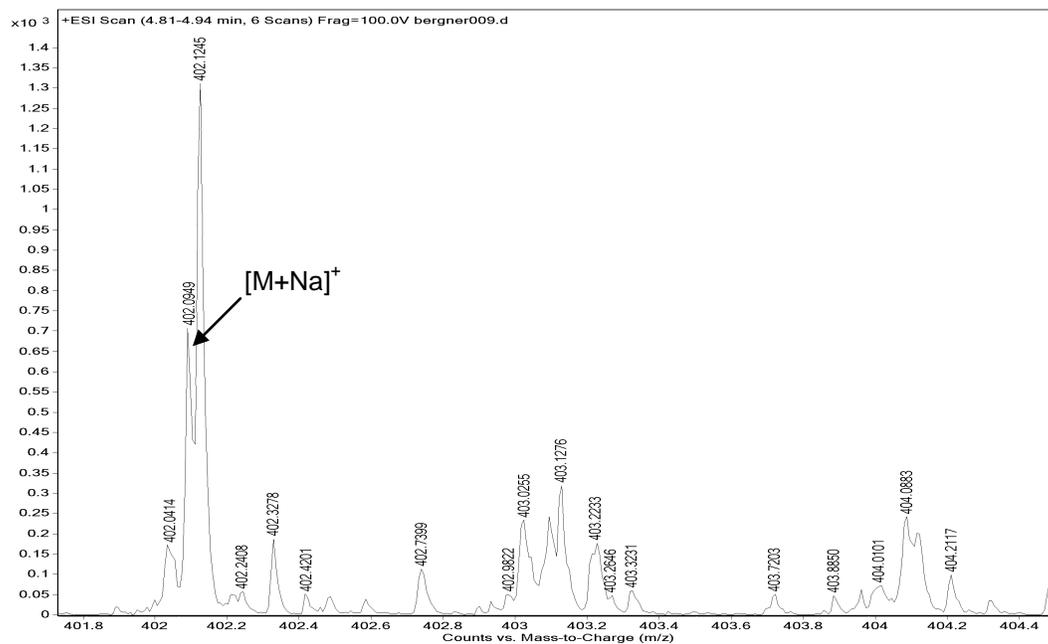
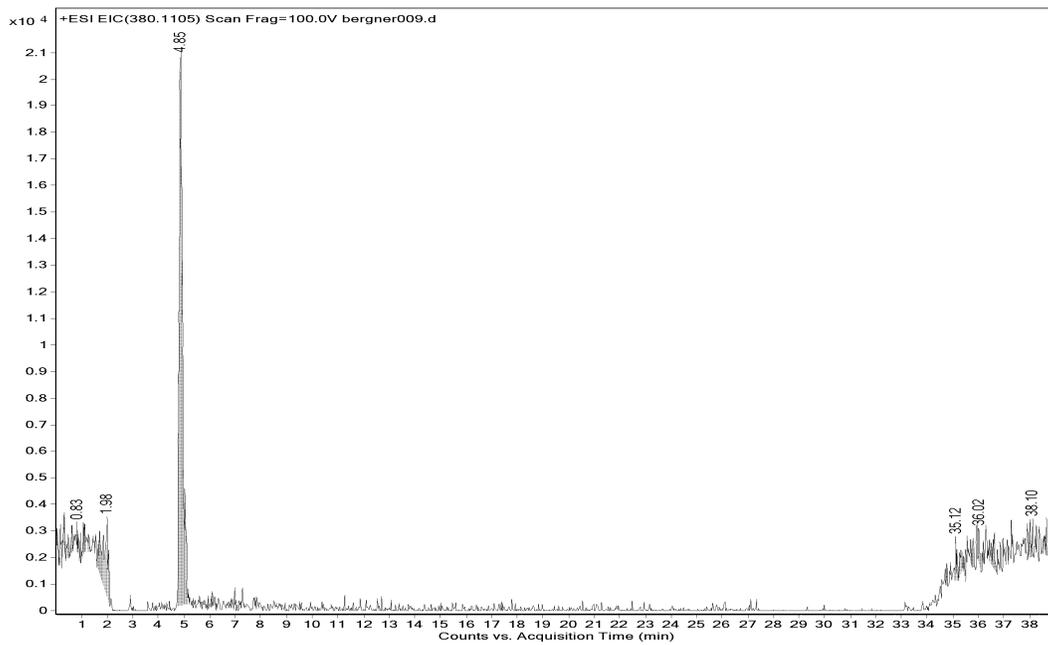


Abbildung 10.7: Massenspektren von CPA-M1 bei RT 4,85 min aus der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten. a) $[M+H]^+$: m/z 380,1105 und b) $[M+Na]^+$: m/z 402,0949.

a)



b)

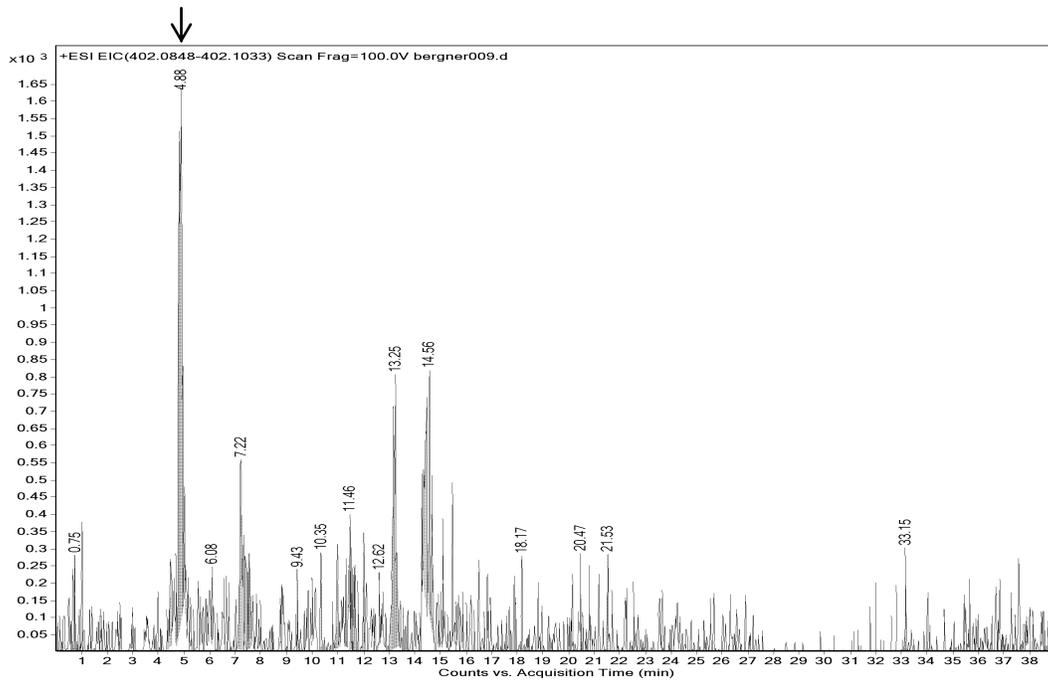


Abbildung 10.8: Massenchromatogramme von CPA-M1 über a) m/z 380,1105 und b) m/z 402,0848-402,1033 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten.

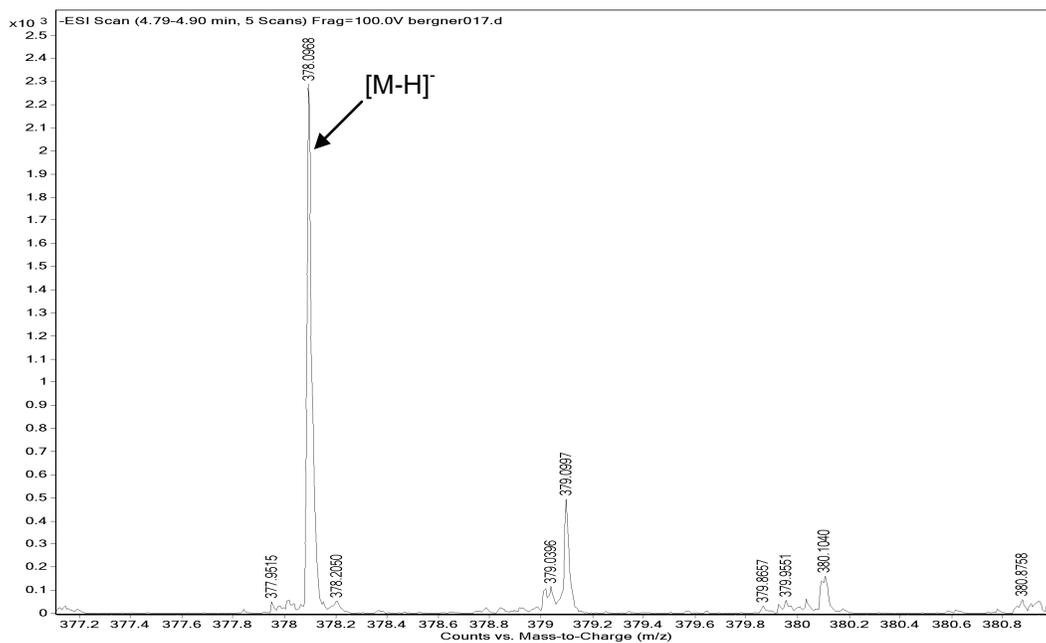


Abbildung 10.9: Massenspektrum von CPA-M1 bei RT 4,85 min aus der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten. [M-H]⁻: m/z 378,0968.

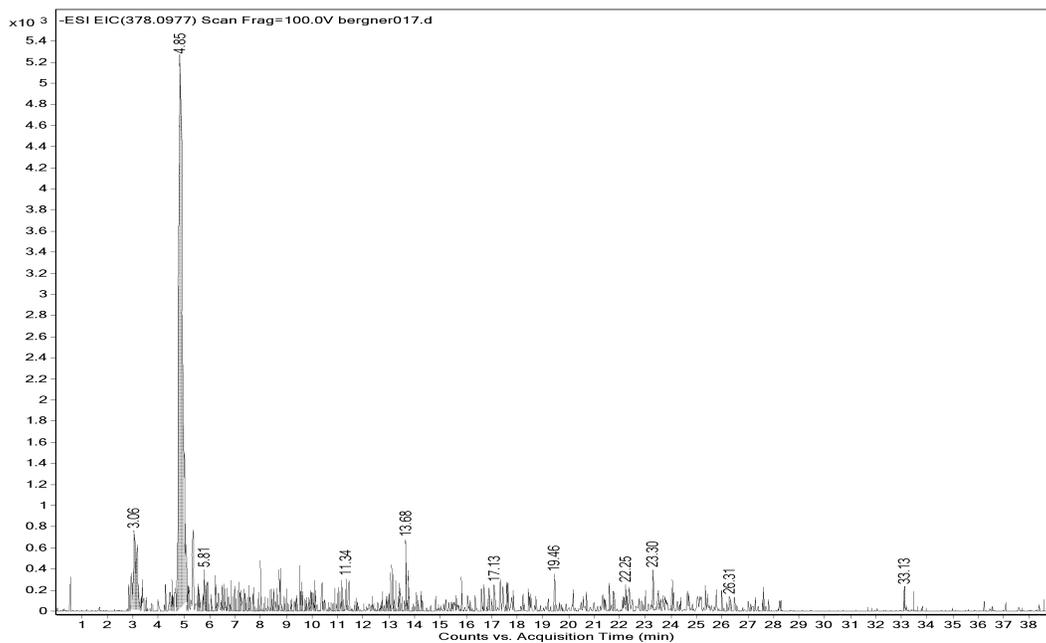
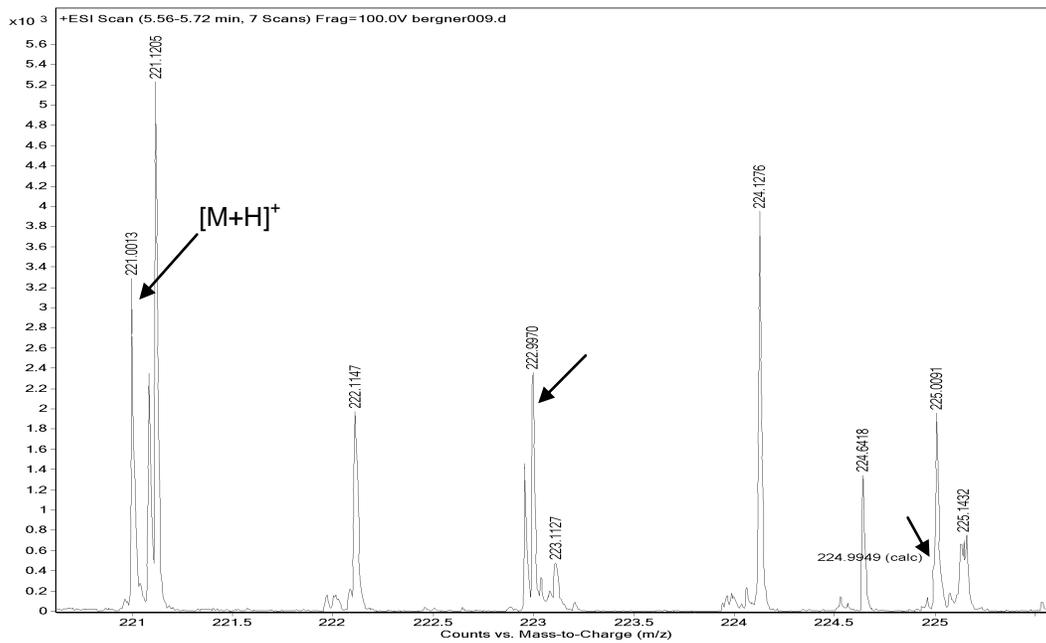


Abbildung 10.10: Massenchromatogramm von CPA-M1 über m/z 378,0977 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten.

CPA-M2

a)



b)

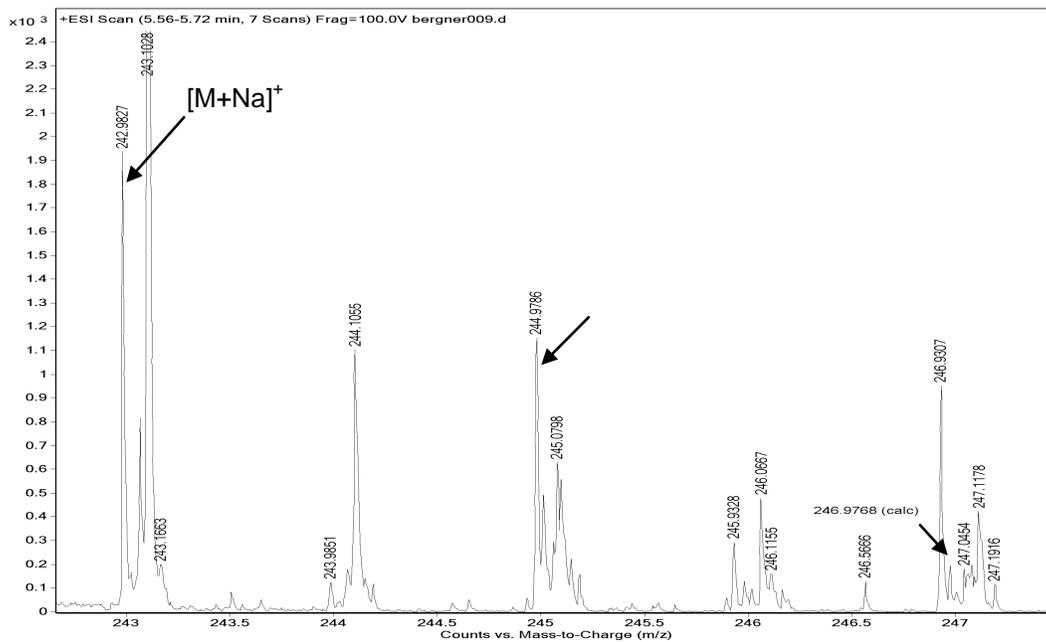
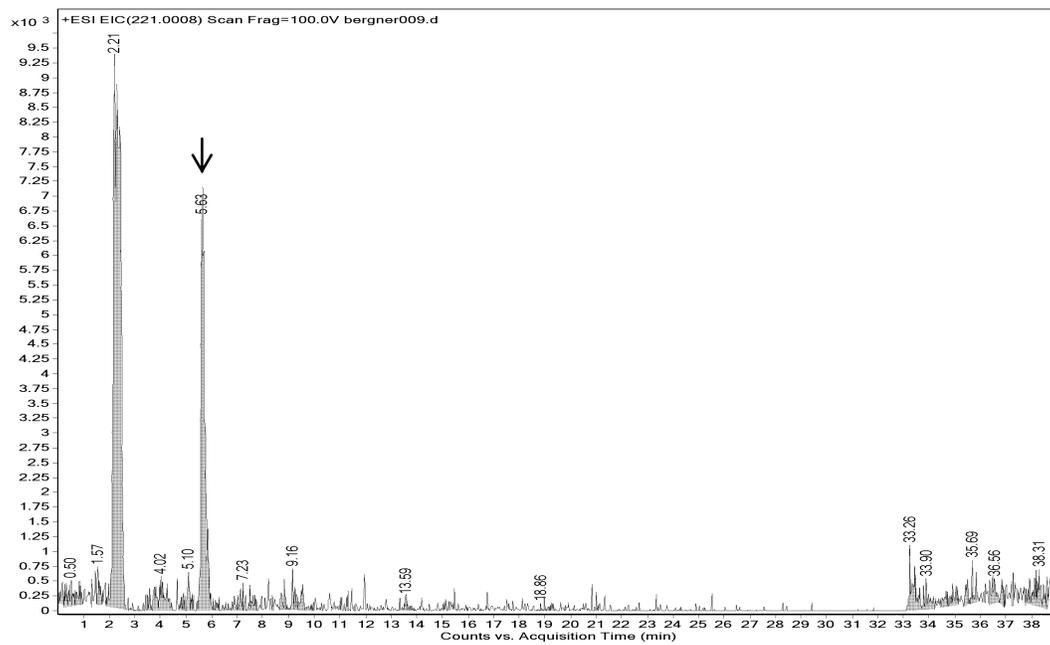


Abbildung 10.11: Massenspektren von CPA-M2 bei RT 5,63 min aus der aktiven Inkubation von 100 μM CPA in primären Rattenhepatozyten. a) $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 221,0003 und b) $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 242,9827. \rightarrow $^{35/37}\text{Cl}-[\text{M}+\text{H}]^+$ und $^{37/37}\text{Cl}-[\text{M}+\text{H}]^+$.

a)



b)

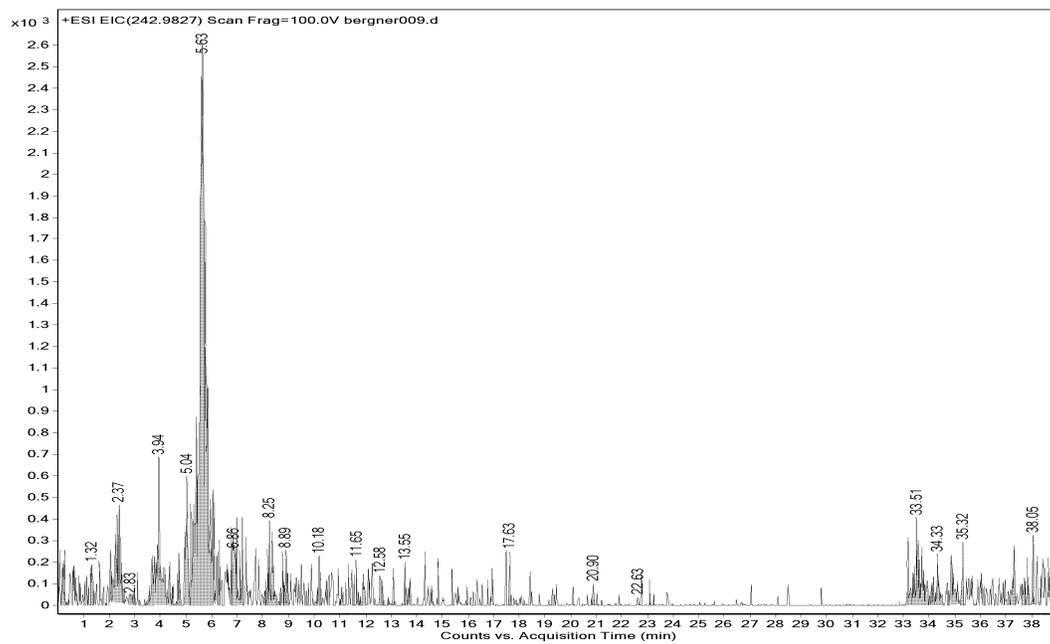


Abbildung 10.12: Massenchromatogramme von CPA-M3 über a) m/z 221,0008 und b) m/z 242,9827 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 100 μM CPA in primären Rattenhepatozyten.

CPA-M3

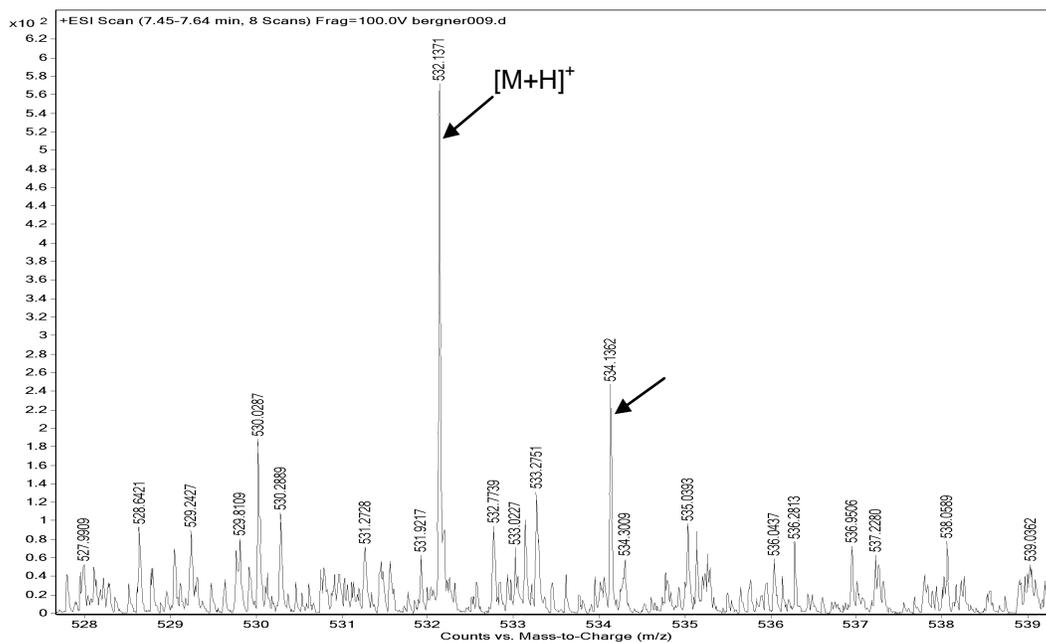


Abbildung 10.13: Massenspektrum von CPA-M3 bei RT 7,56 min aus der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten. [M+H]⁺: m/z 532,1371. \rightarrow ³⁷Cl-[M+H]⁺.

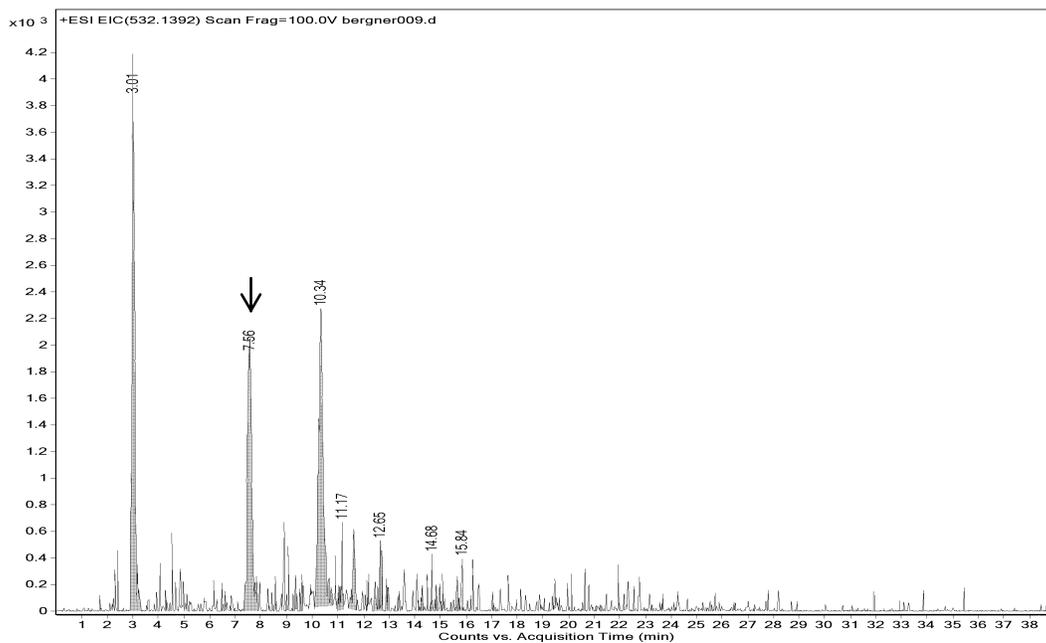


Abbildung 10.14: Massenchromatogramm von CPA-M3 über m/z 532,1392 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten.

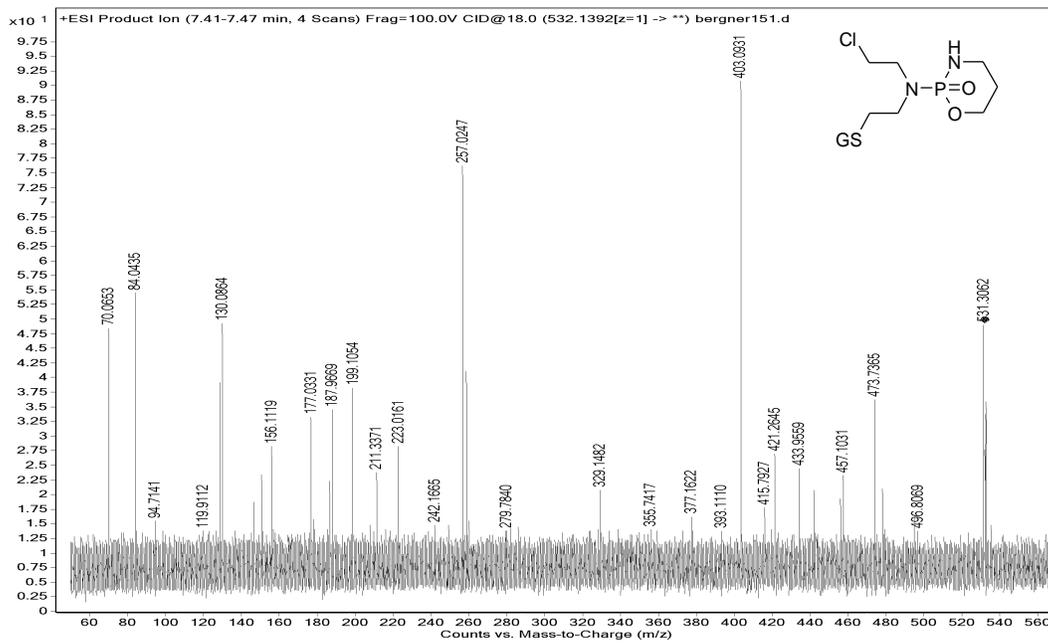


Abbildung 10.15: MS/MS-Spektrum von CPA-M3. $[M+H]^+$: m/z 532,1392. Fragment 1: m/z 403,0931, Fragment 2: m/z 257,0247.

CPA-M4

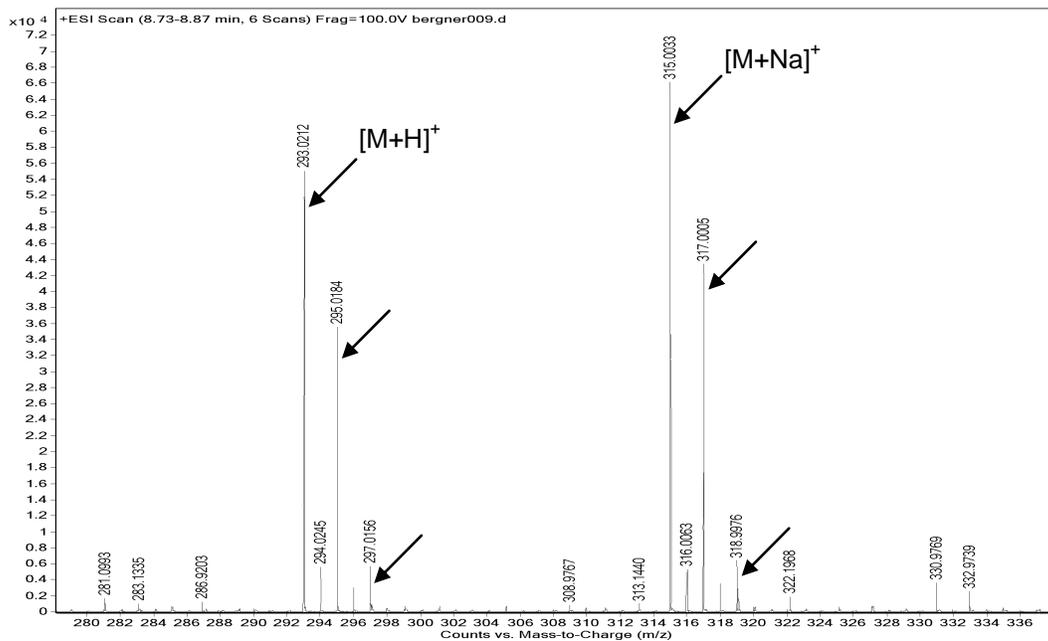
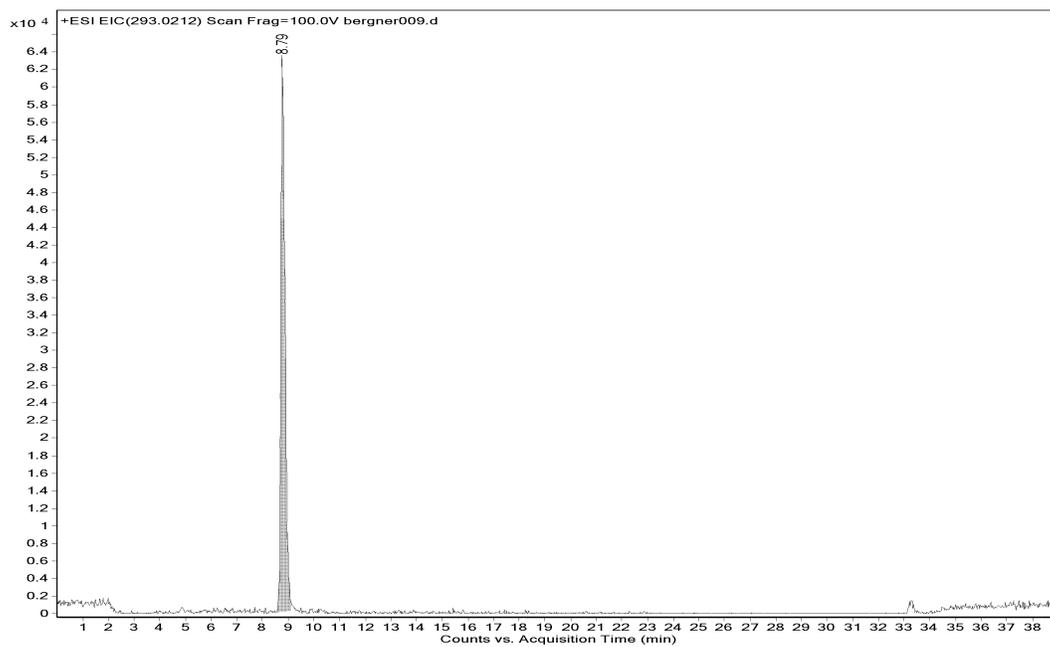


Abbildung 10.16: Massenspektrum von CPA-M4 bei RT 8,79 min aus der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 293,0212 und $[M+Na]^+$: m/z 315,0033. \rightarrow $^{35/37}\text{Cl}-[M+H]^+$ und $^{37/37}\text{Cl}-[M+H]^+$.

a)



b)

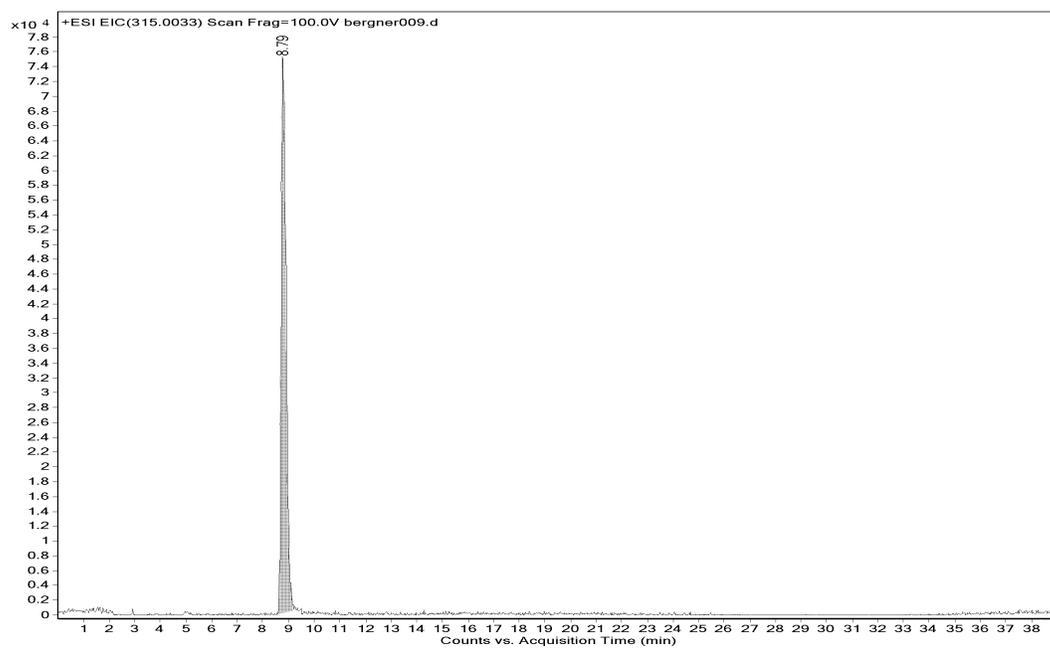


Abbildung 10.17: Massenchromatogramme von CPA-M4 über a) m/z 293,0212 und b) m/z 315,0033 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten.

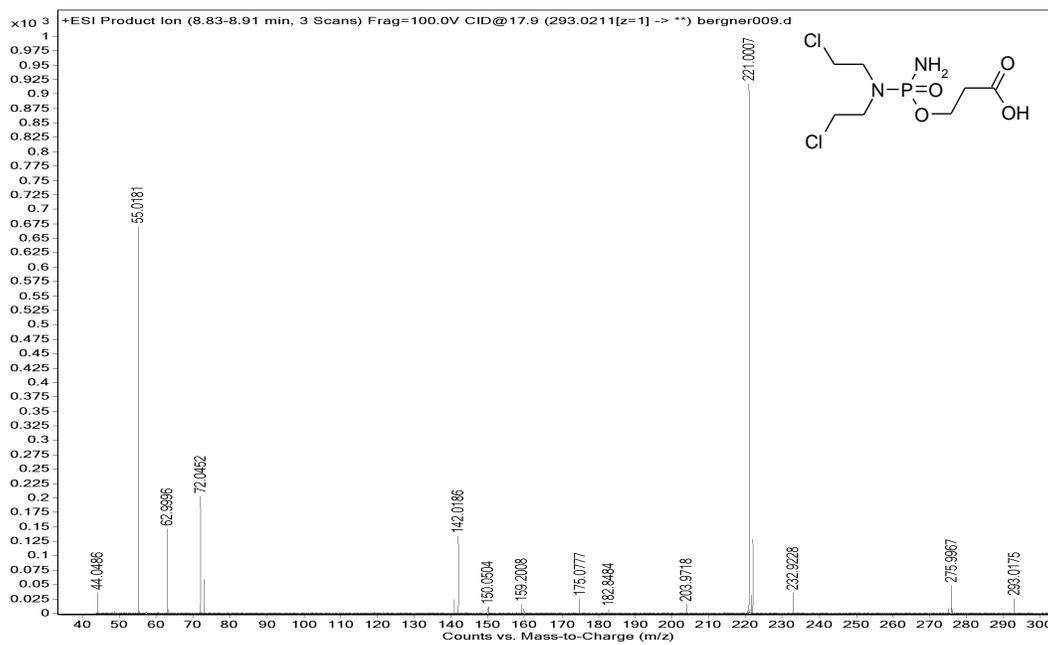
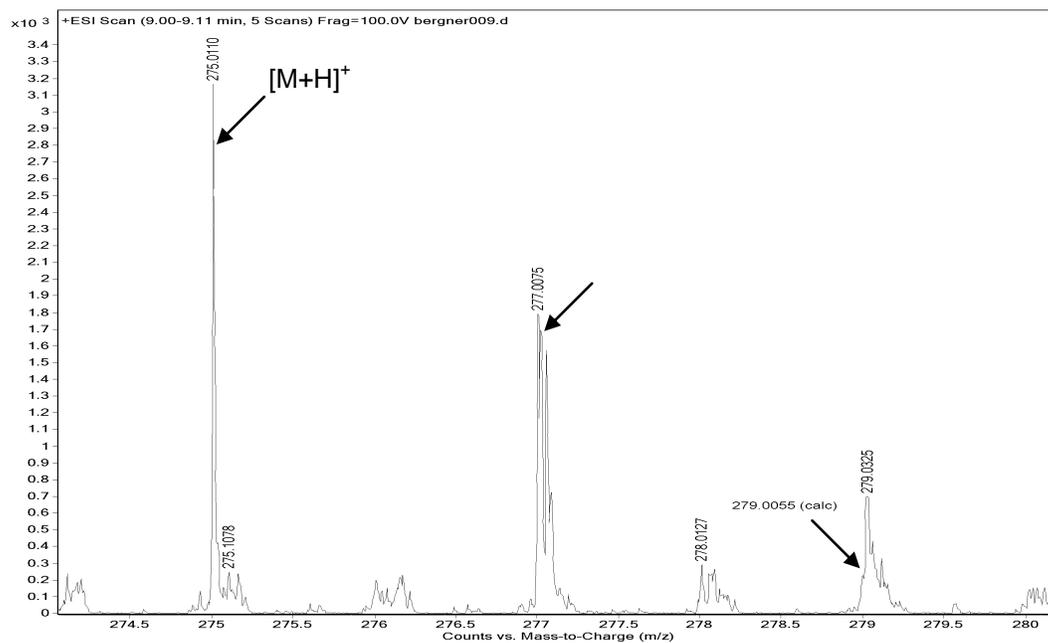


Abbildung 10.18: MS/MS-Spektrum von CPA-M4. $[M+H]^+$: m/z 293,0211. Fragment 1: m/z 221,0007, Fragment 2: m/z 142,0186, Fragment 3: m/z 62,9996.

CPA-M5

a)



b)

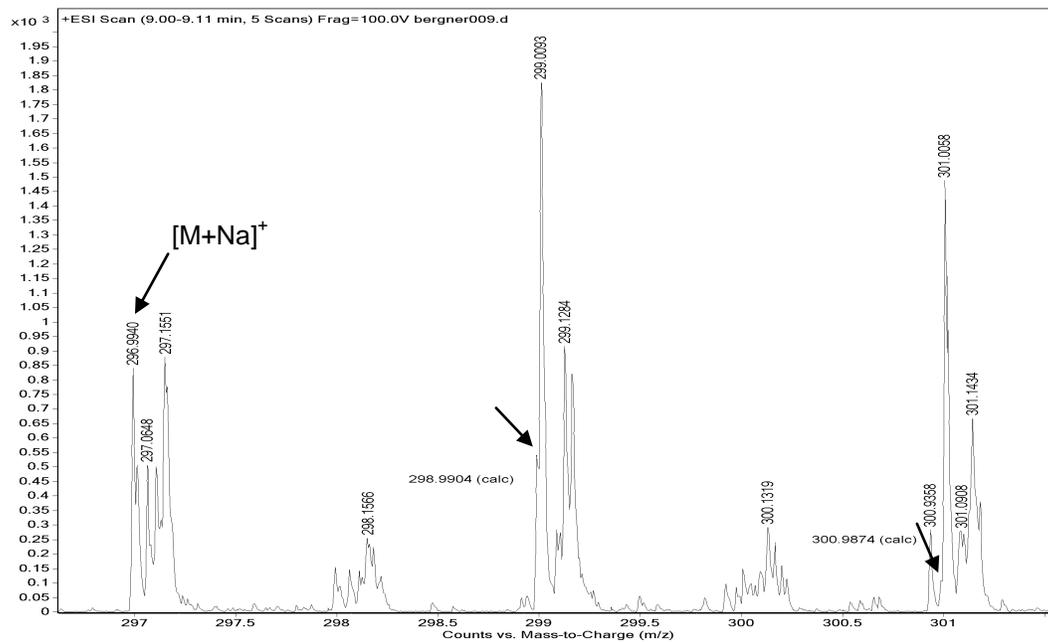
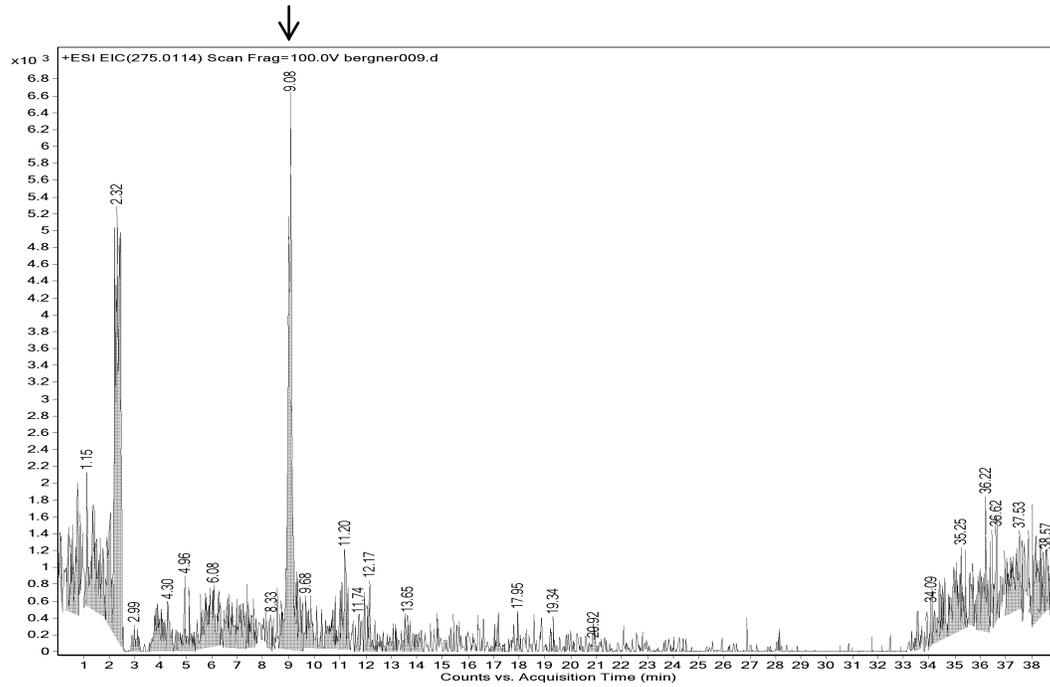


Abbildung 10.19: Massenspektrum von CPA-M5 bei RT 9,08 min aus der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten. a) $[M+H]^+$: m/z 275,0110 und b) $[M+Na]^+$: m/z 296,9940. \rightarrow $^{35/37}\text{Cl}$ - $[M+H]^+$ und $^{37/37}\text{Cl}$ - $[M+H]^+$.

a)



b)

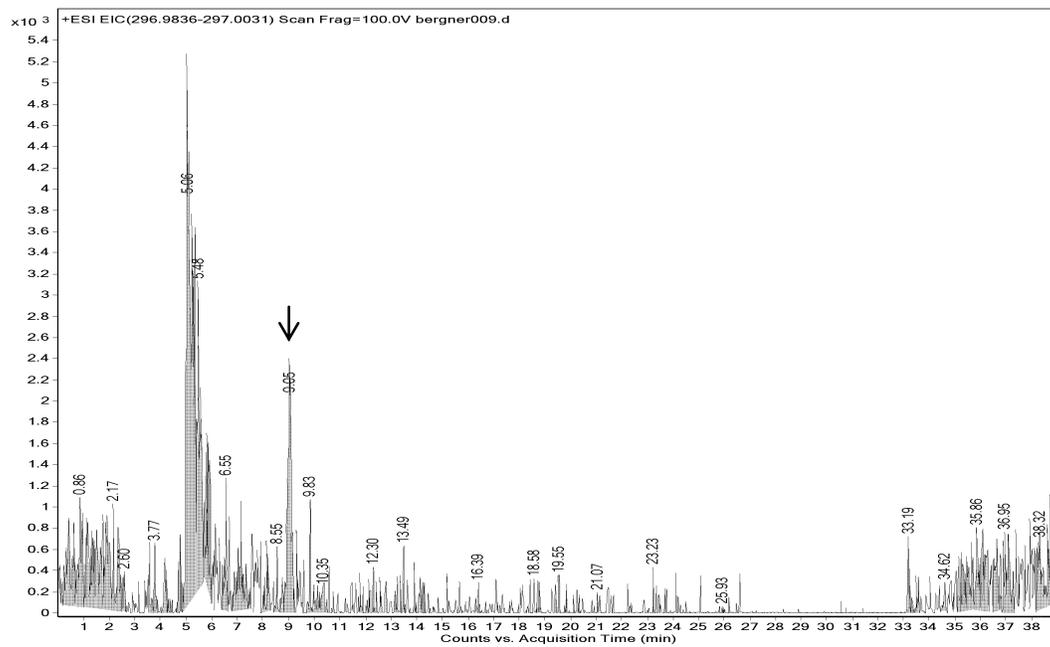


Abbildung 10.20: Massenchromatogramme von CPA-M5 über a) m/z 275,0114 und b) m/z 296,9836-297,0031 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 100 μM CPA in primären Rattenhepatozyten.

CPA-M6

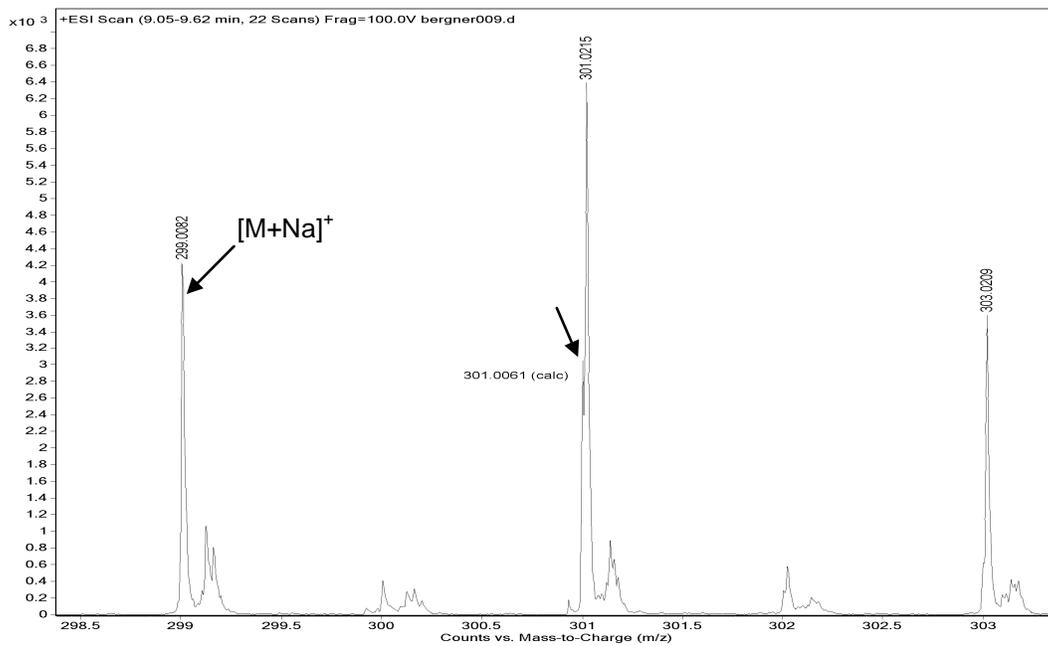
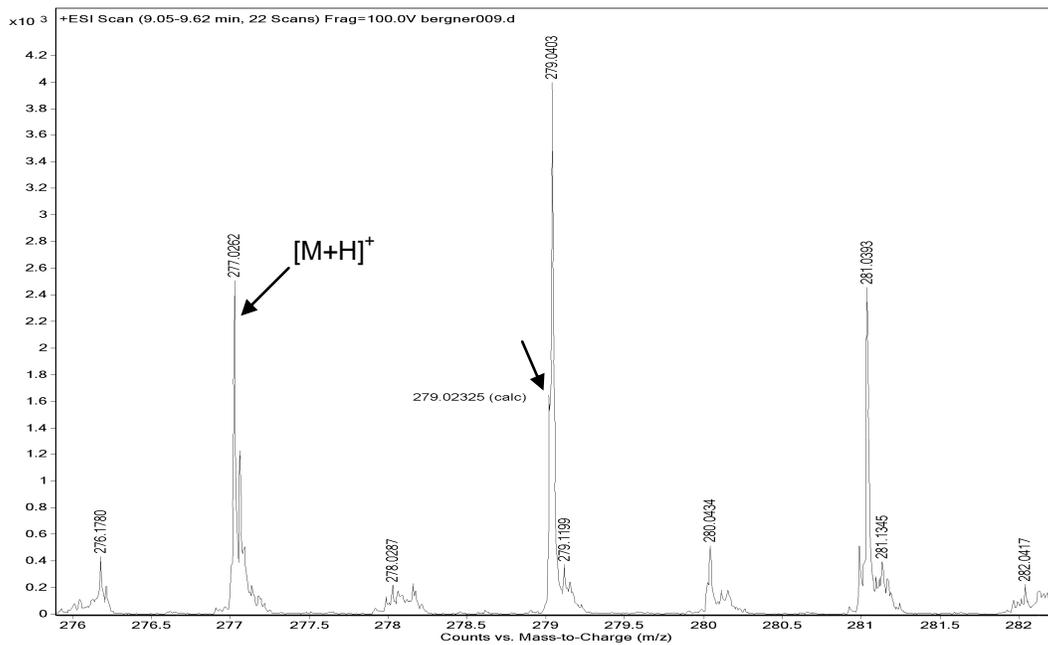
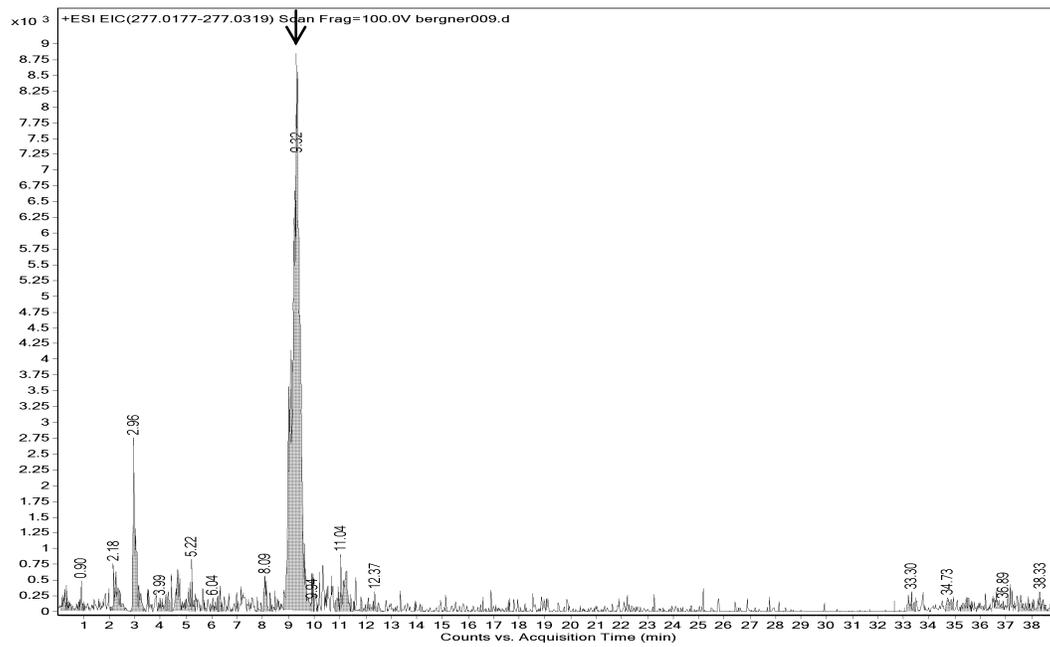


Abbildung 10.21: Massenspektrum von CPA-M6 bei RT 9,32 min aus der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten. a) $[M+H]^+$: m/z 277,0262 und b) $[M+Na]^+$: m/z 299,0082. \rightarrow $^{35/37}\text{Cl}-[M+H]^+$

a)



b)

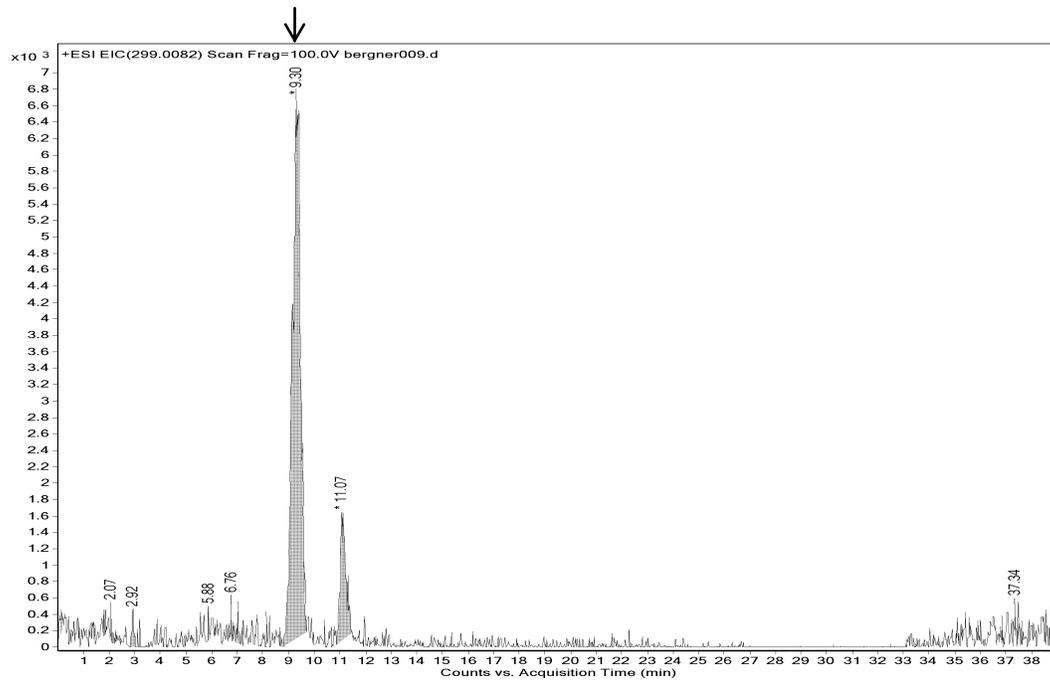
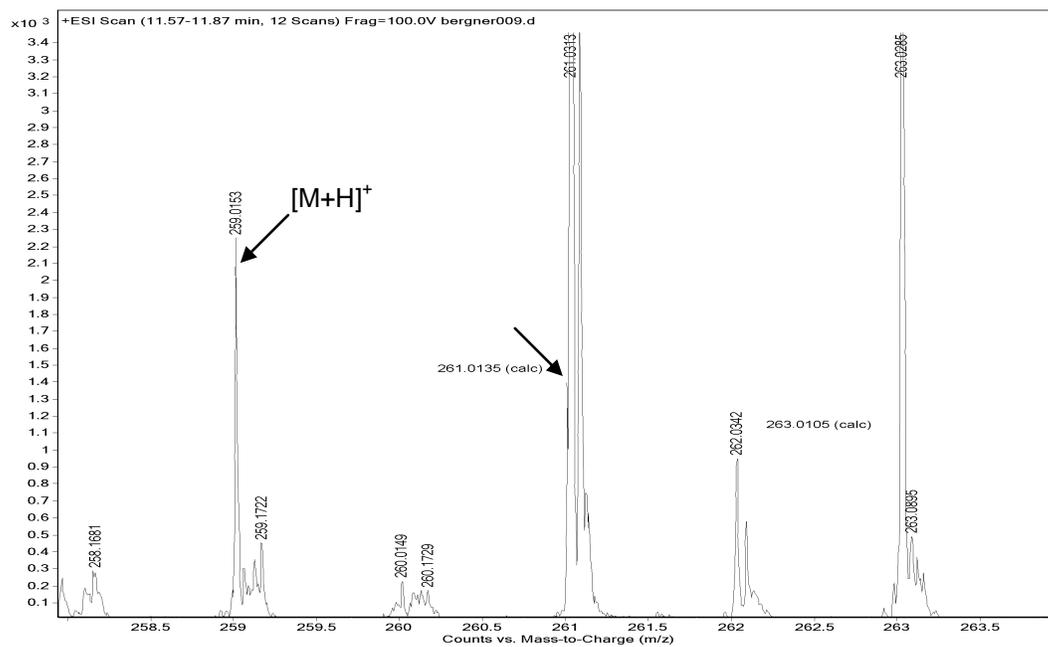


Abbildung 10.22: Massenchromatogramme von CPA-M6 über a) m/z 277,0,177-277,0319 und b) m/z 299,0082 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten.

CPA-M7

a)



b)

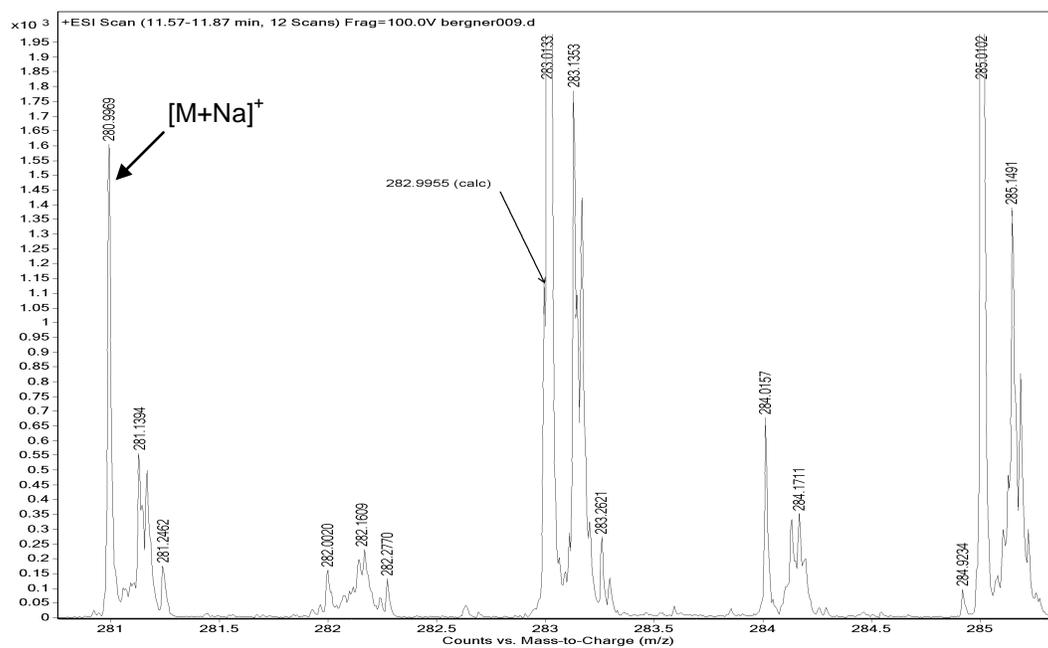
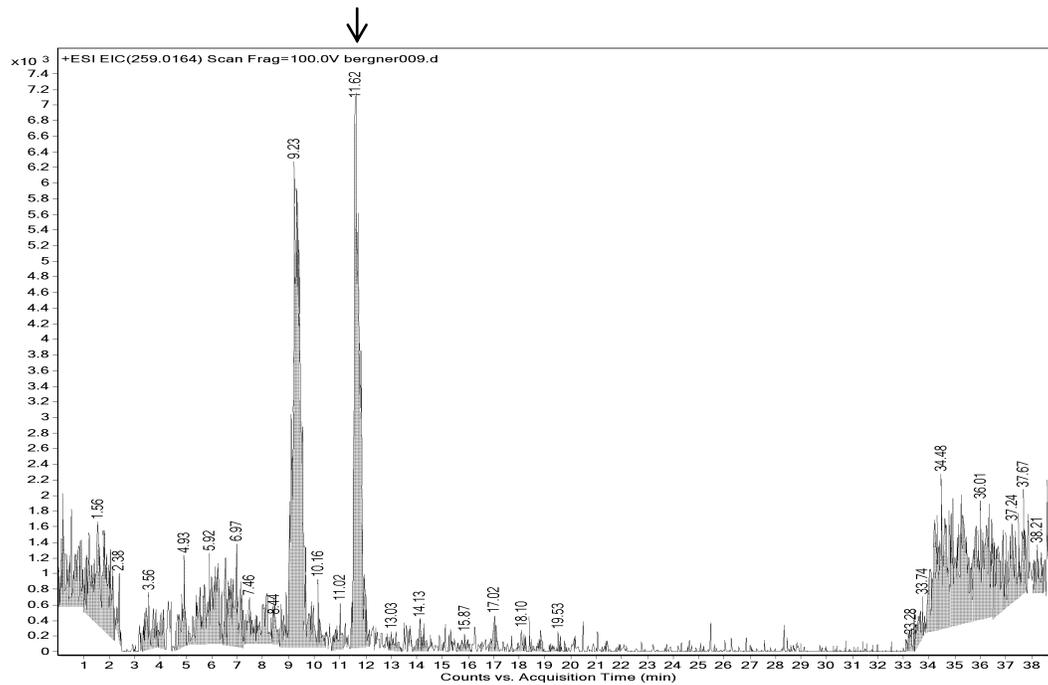


Abbildung 10.23: Massenspektren von CPA-M7 bei RT 11,62 min aus der aktiven Inkubation von 100 μM CPA in primären Rattenhepatozyten. a) $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 259,0153 und b) $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 280,9969, \rightarrow $^{35/37}\text{Cl}-[\text{M}+\text{H}]^+$.

a)



b)

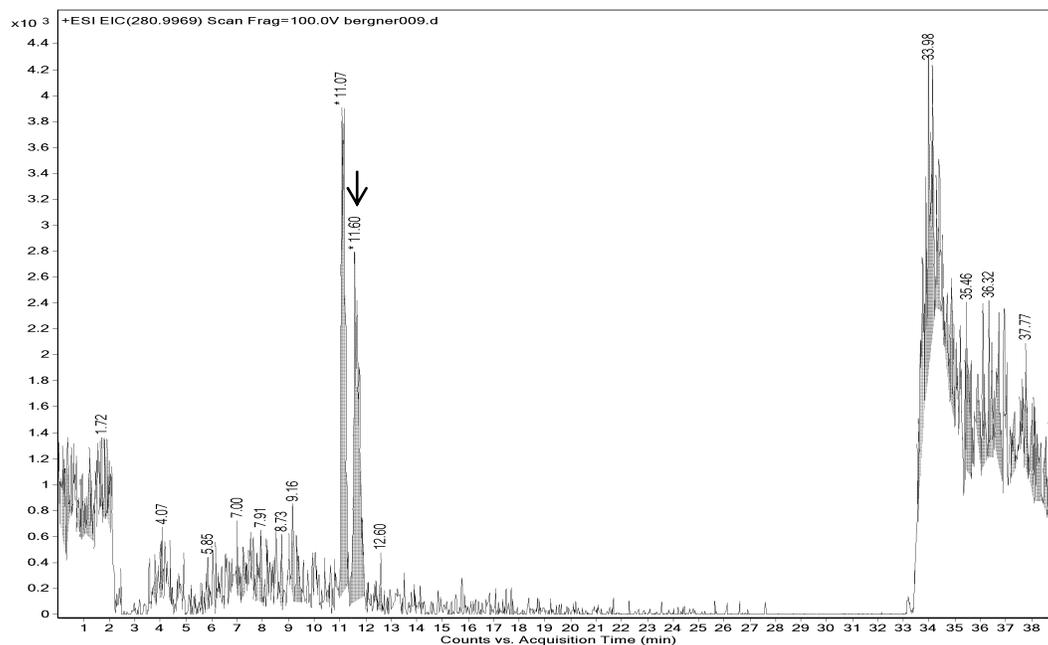


Abbildung 10.24: Massenchromatogramme von CPA-M7 über a) m/z 259,0153 und b) m/z 280,9969 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 100 μ M CPA in primären Rattenhepatozyten. Das Signal in a) bei RT 9,23 min resultiert aus der „in-source“-Wasserabspaltung von CPA-M6.

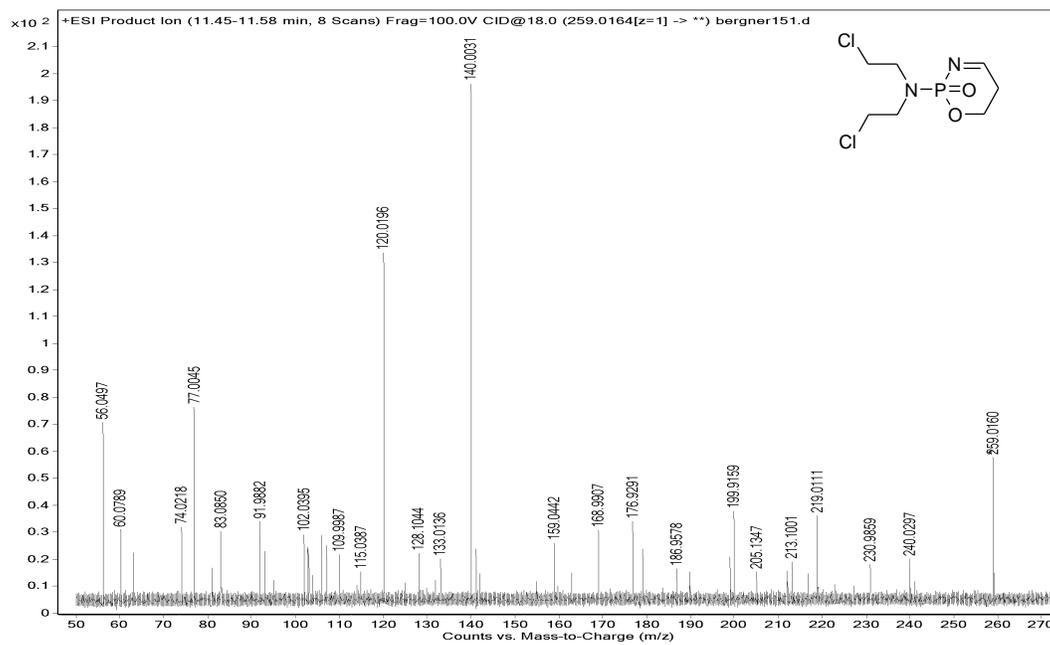


Abbildung 10.25: MS/MS-Spektrum von CPA-M7. $[M+H]^+$: m/z 259,0153. Fragment 1: m/z 230,9858, Fragment 2: m/z 140,0031, Fragment 3: m/z 120,0196.

12.1.3.2 Albendazol

ABZ wird in Rattenhepatozyten unter basalen Bedingungen für 24 Stunden inkubiert. Die Konzentration beträgt 25 μM . Die Inkubate werden zur Strukturaufklärung der Metaboliten mittels Q-TOF LC/MS analysiert. Im Folgenden sind beispielhaft die Full Scan- und Fragmentierungsspektren sowie die Massenchromatogramme der Analyten aus einem aktiven Inkubat abgebildet. Bei Signalen innerhalb der Massenchromatogramme, welche keinem Metaboliten zugeordnet worden sind, kann es sich sowohl um Isotopen- als auch um Matrixpeaks handeln. Die Darstellung der Metaboliten erfolgt nach ihrer Retentionszeit (vgl. Kap. 5.1.6.2). Bei den Strukturformeln innerhalb der Fragmentierungsspektren handelt es sich um Strukturvorschläge identifizierter Metaboliten.

ABZ

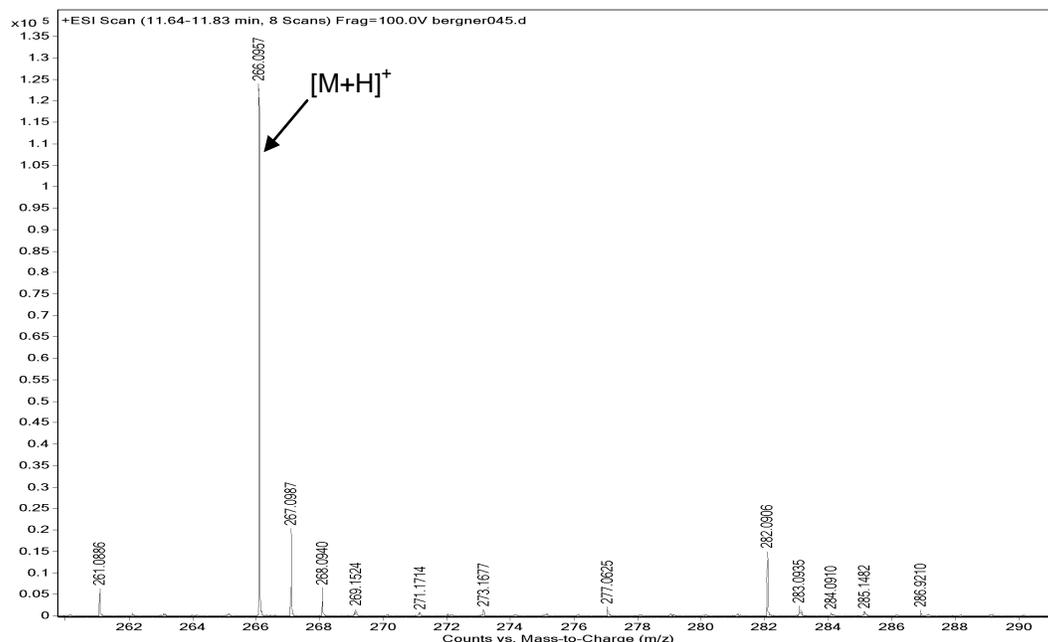


Abbildung 10.26: Massenspektrum von ABZ bei RT 11,73 min aus der aktiven Inkubation von 25 μM ABZ in primären Rattenhepatozyten. $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 266,0957.

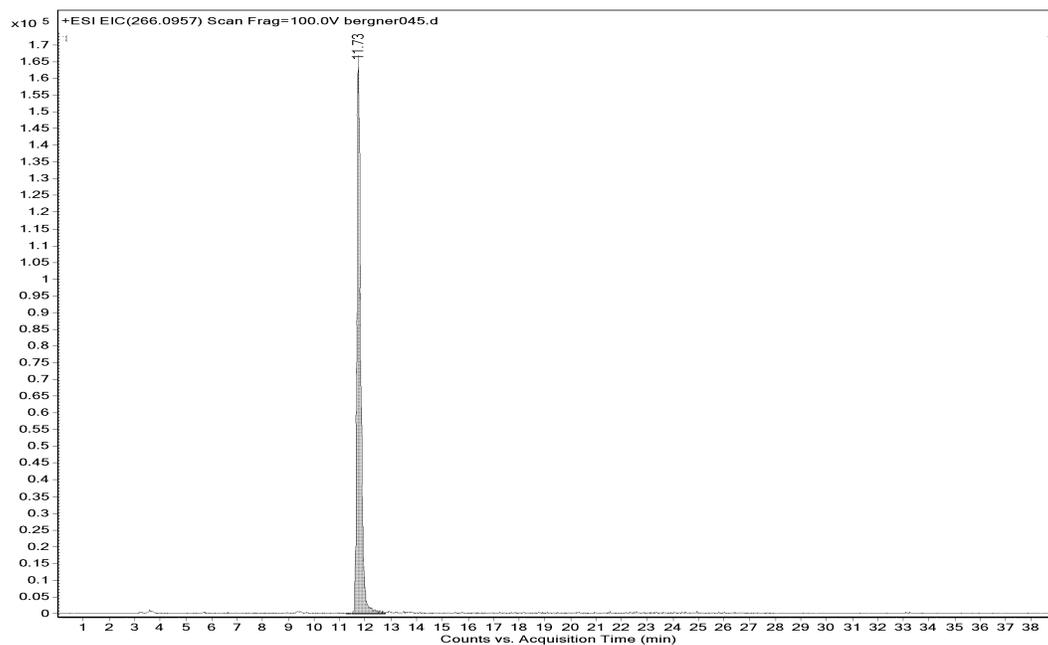


Abbildung 10.27: Massenchromatogramm von ABZ über m/z 266,0957 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten.

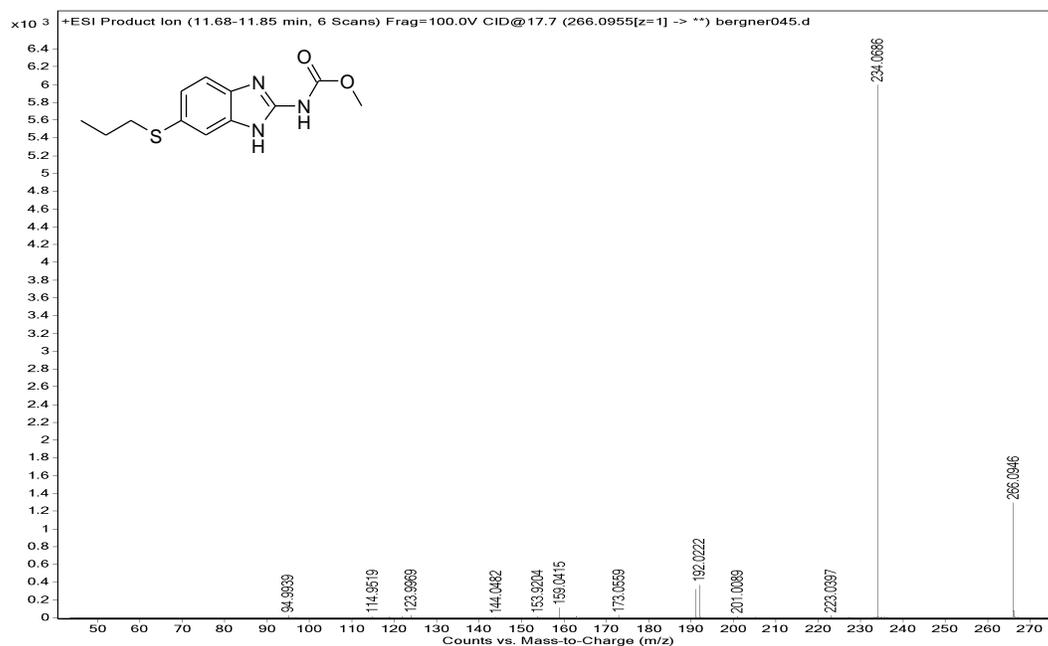


Abbildung 10.28: MS/MS-Spektrum von ABZ. $[M+H]^+$: m/z 266,0955. Fragment 1: m/z 234,0686, Fragment 2: m/z 192,0224, Fragment 3: m/z 159,0415.

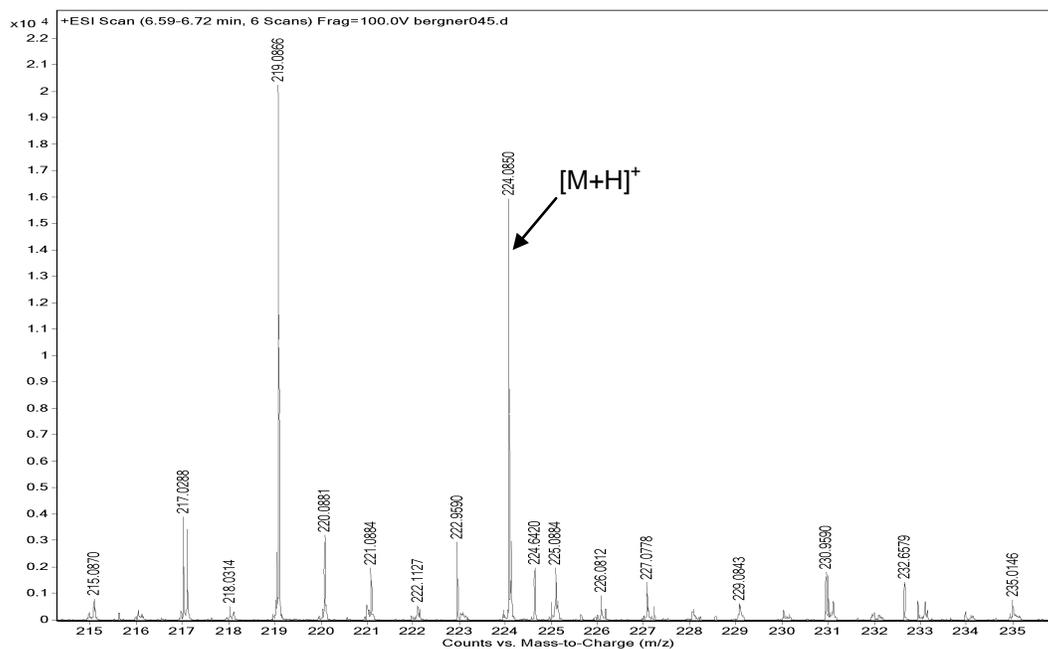
ABZ-M1

Abbildung 10.29: Massenspektrum von ABZ-M1 bei RT 6,64 min aus der aktiven Inkubation von 25 μM ABZ in primären Rattenhepatozyten. $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 224,0850.

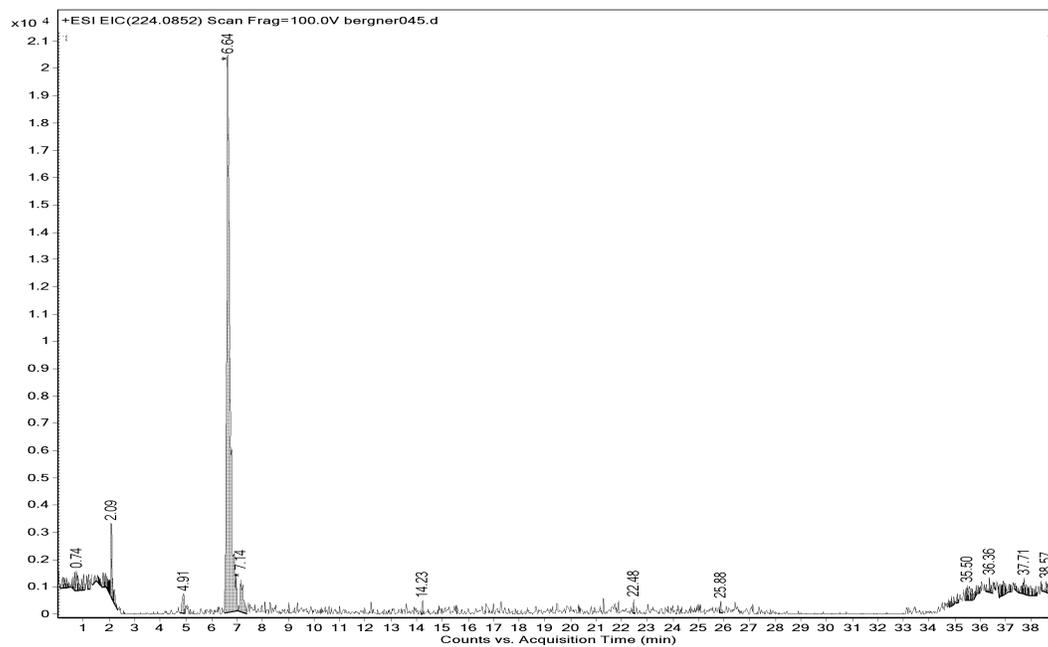


Abbildung 10.30: Massenchromatogramm von ABZ-M1 über m/z 224,0853 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μM ABZ in primären Rattenhepatozyten.

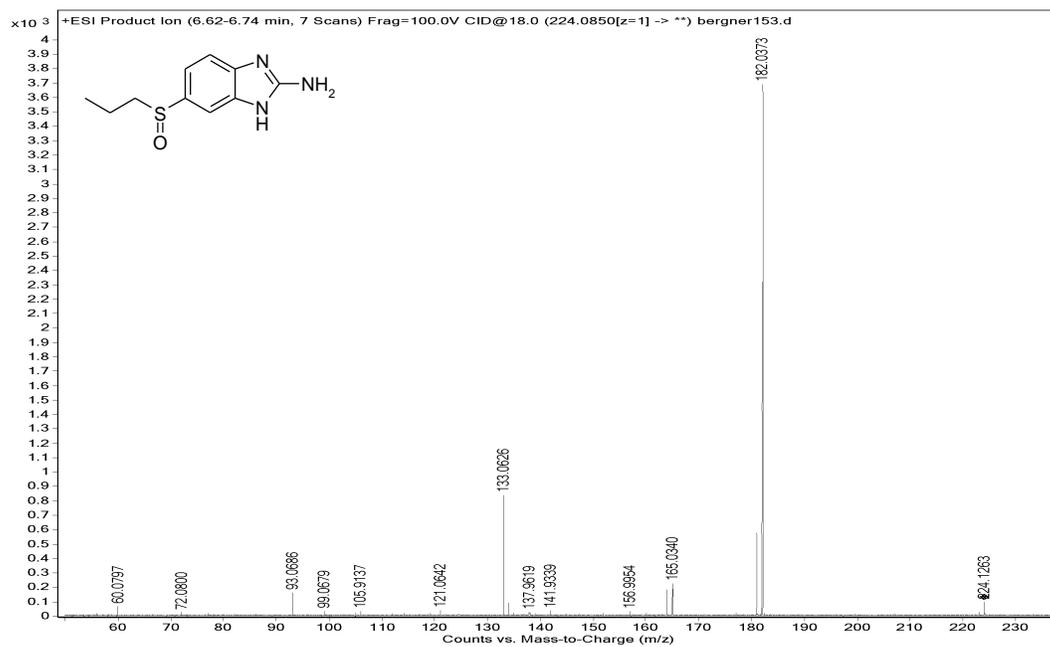
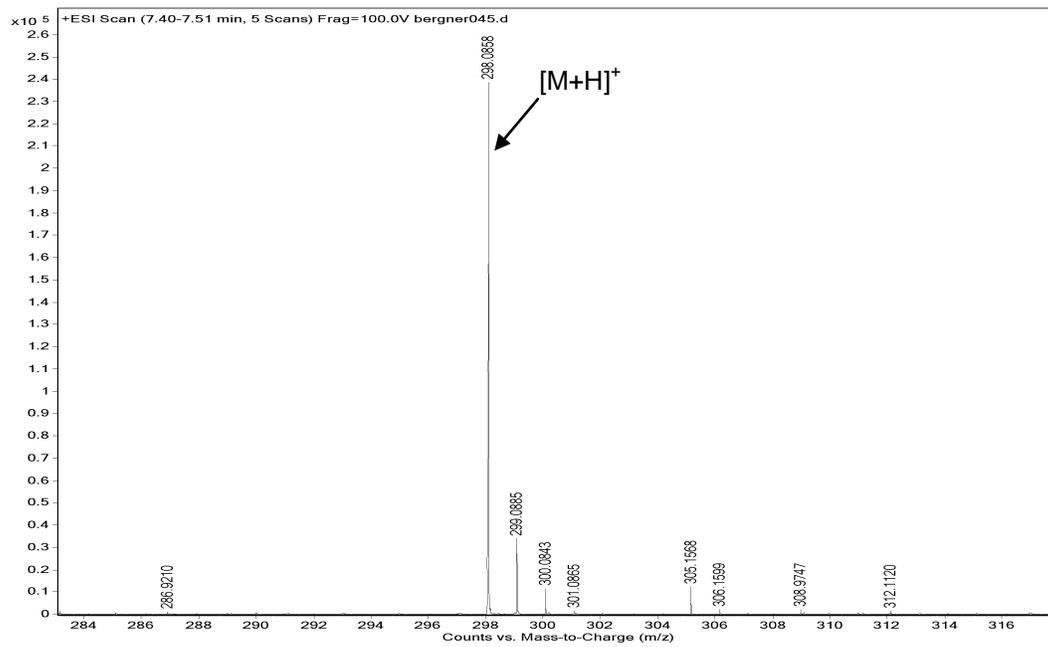


Abbildung 10.31: MS/MS-Spektrum von ABZ-M1. $[M+H]^+$: m/z 224,0850. Fragment 1: m/z 182,0373, Fragment 2: m/z 133, 0626.

ABZ-M2

a)



b)

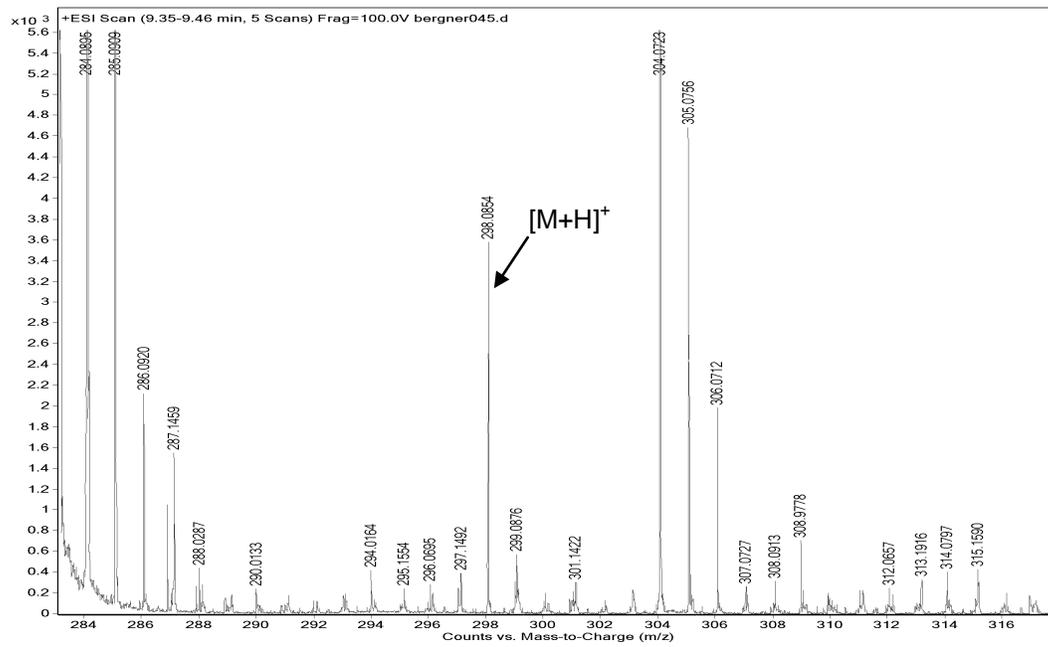


Abbildung 10.32: Massenspektren von ABZ-M2 bei a) RT 7,45 min und b) RT 9,41 min aus der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten. [M+H]⁺: m/z 298,0858.

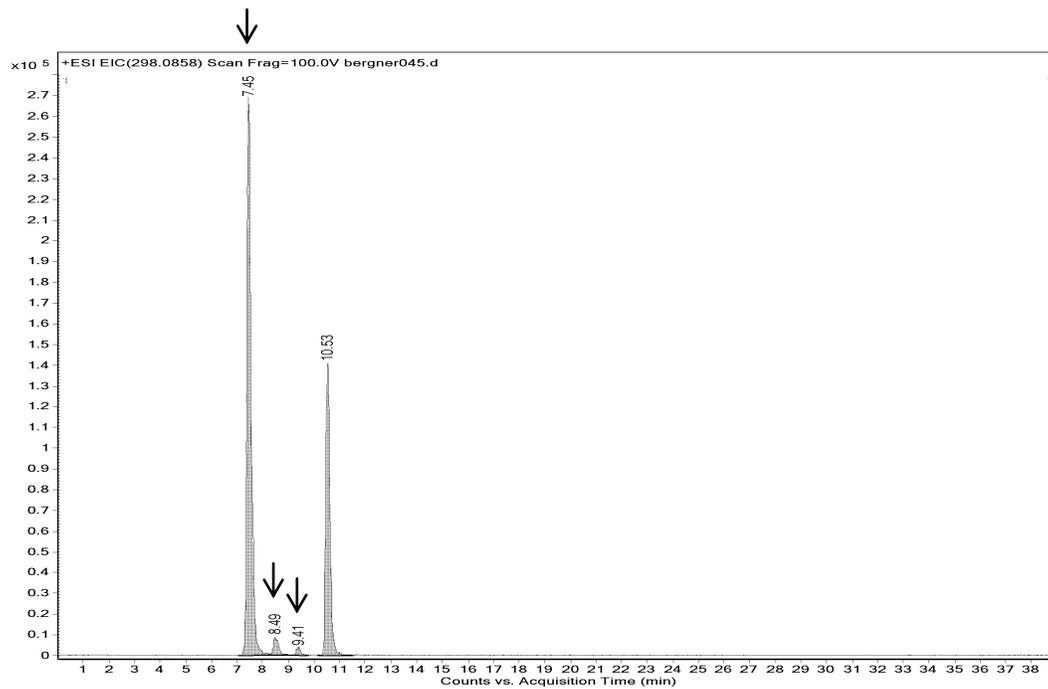
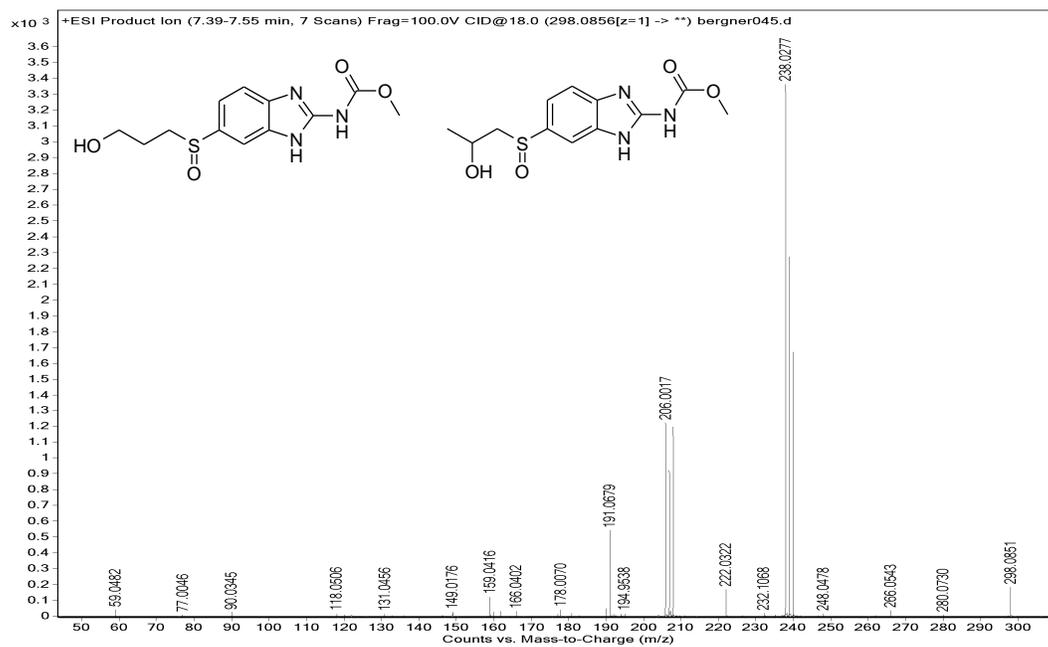


Abbildung 10.33: Massenchromatogramm von ABZ-M2 über m/z 298,0858 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μM ABZ in primären Rattenhepatozyten. Bei dem Signal bei RT 10,53 handelt es sich um ABZ-M11.

ABZ-M2.1

a)



b)

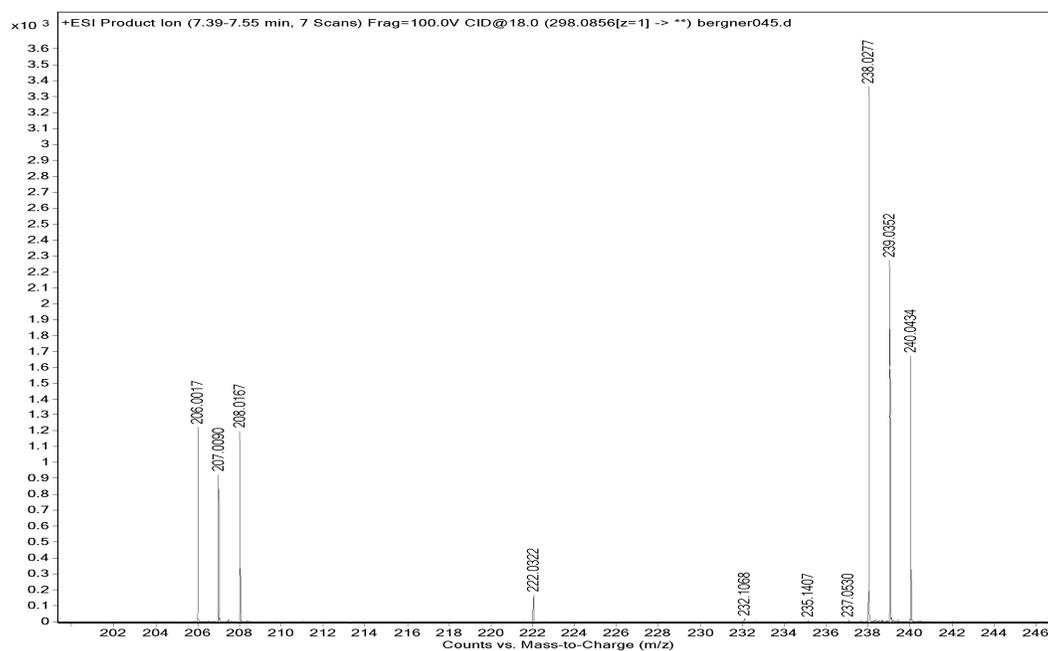


Abbildung 10.34: MS/MS-Spektrum von ABZ-M2.1. $[M+H]^+$: m/z 298,0851. a) Gesamtes Massenspektrum, b): Ausschnitt. Fragment 1: m/z 240,0434, Fragment 2: m/z 238,0277, Fragment 3: m/z 206,0017, Fragment 4: m/z 191,0679. Von ABZ-M2.2 liegt kein MS/MS-Spektrum vor.

ABZ-M3

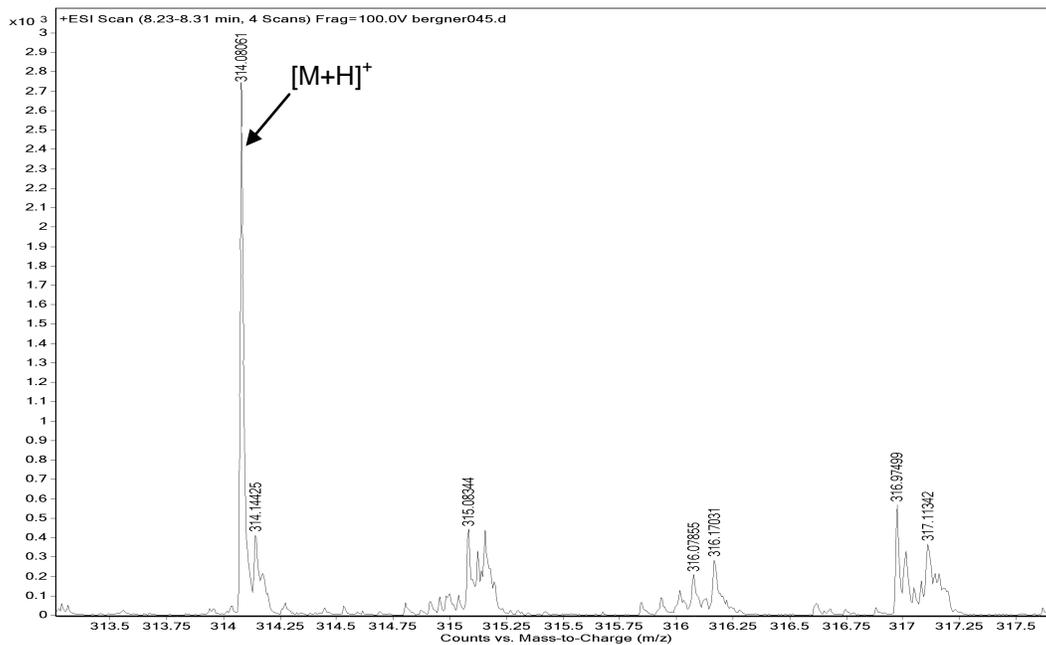


Abbildung 10.35: Massenspektrum von ABZ-M3 bei RT 8,27 min aus der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten. [M+H]⁺: m/z 314,0806.

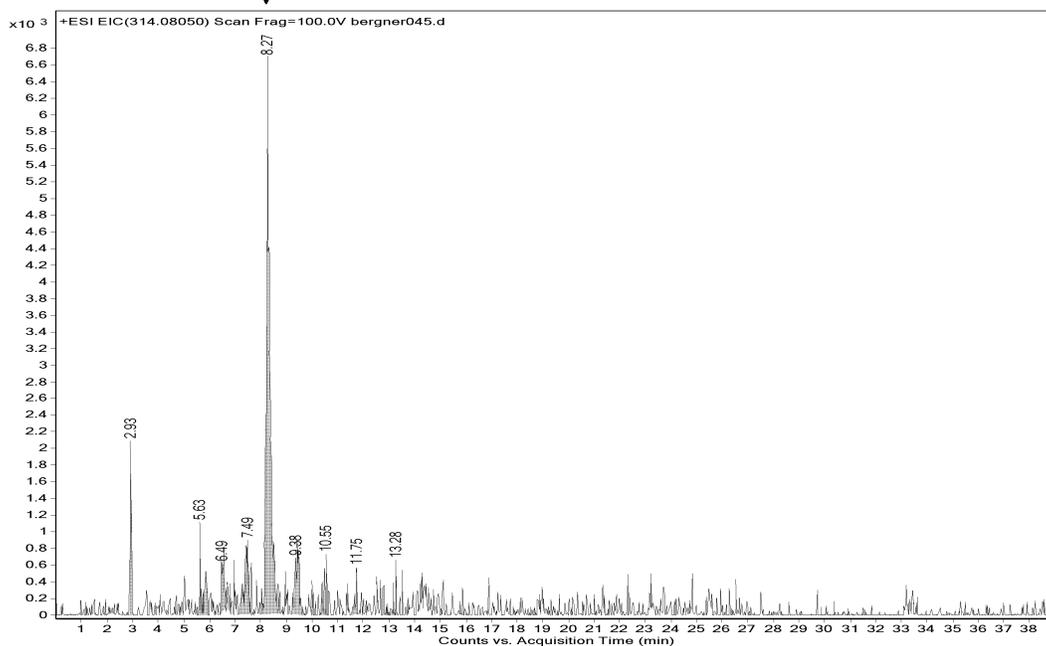


Abbildung 10.36: Massenchromatogramm von ABZ-M3 über m/z 314,0805 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten.

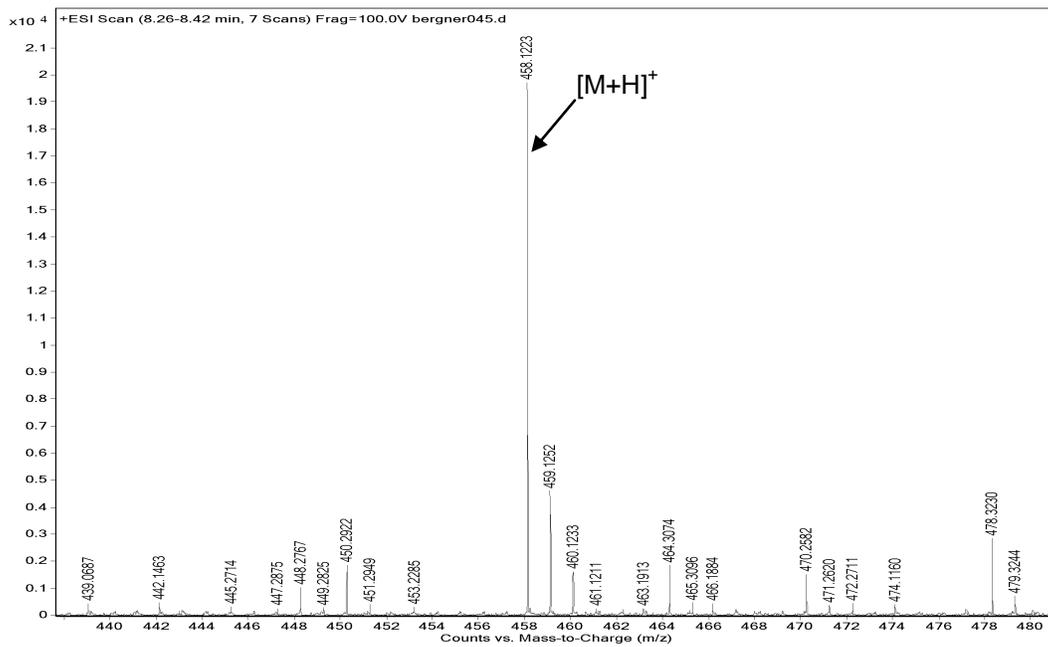
ABZ-M4

Abbildung 10.37: Massenspektrum von ABZ-M4 bei RT 8,34 min aus der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten. [M+H]⁺: m/z 458,1223.

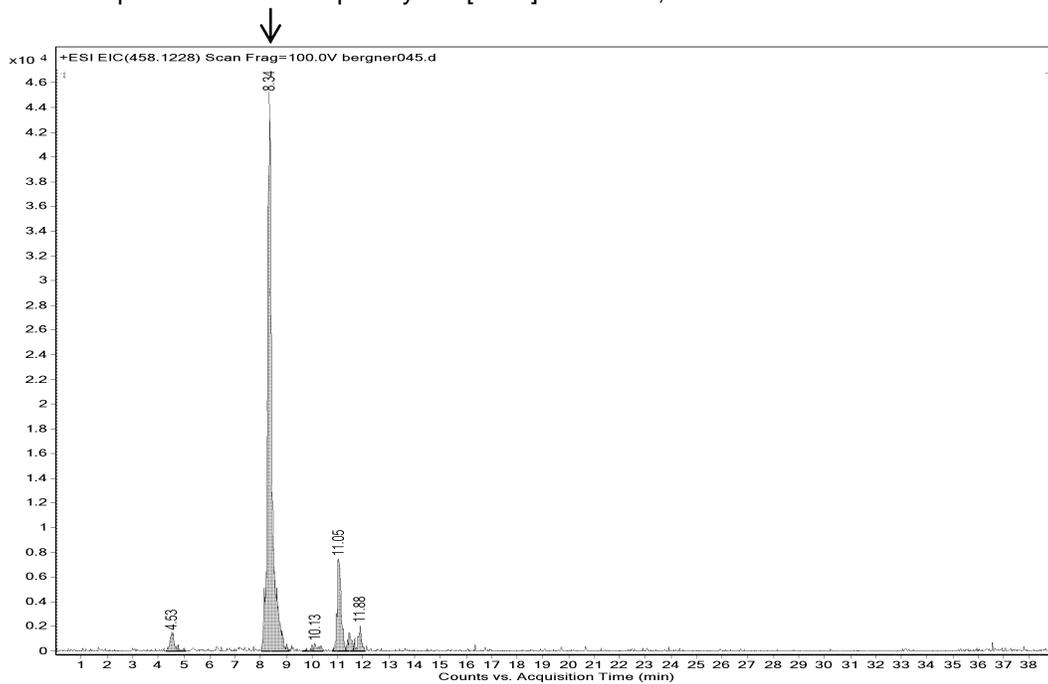


Abbildung 10.38: Massenchromatogramm von ABZ-M4 über m/z 458,1228 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten.

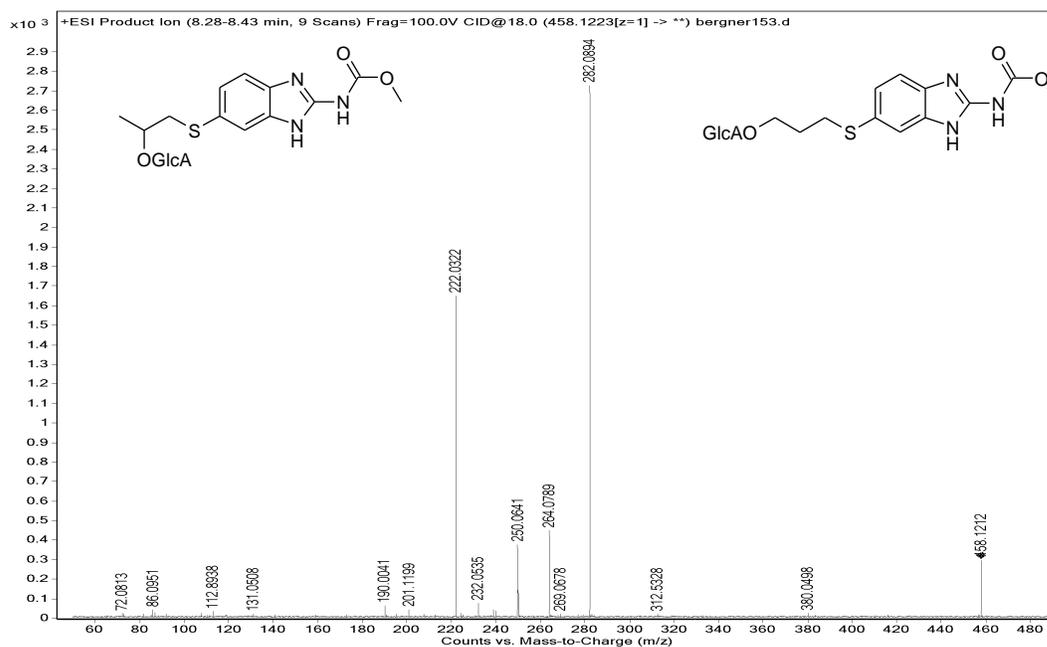


Abbildung 10.39: MS/MS-Spektrum von ABZ-M4. $[M+H]^+$: m/z 458,1212. Fragment 1: m/z 282,0894, Fragment 2: m/z 222,0322, Fragment 3: m/z 190,0041.

ABZ-M5

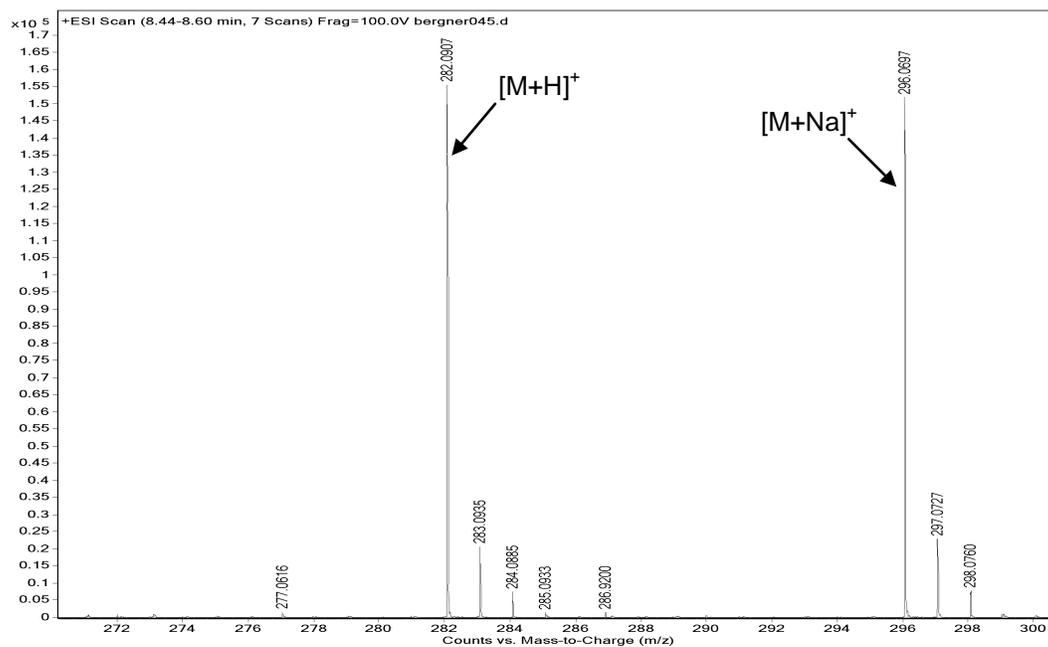


Abbildung 10.40: Massenspektrum von ABZ-M5 bei RT 8,47 min aus der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 282,0907 und $[M+Na]^+$: m/z 296,0697.

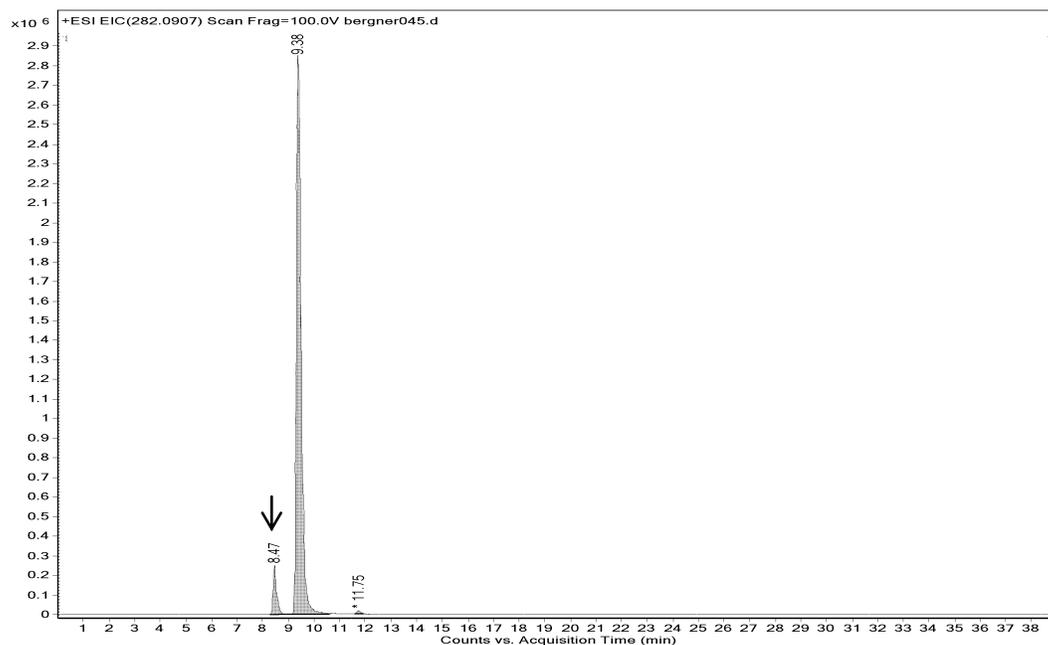


Abbildung 10.41: Massenchromatogramm von ABZ-M5 über m/z 282,0907 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μM ABZ in primären Rattenhepatozyten. Bei RT 9,38 min handelt es sich um ABZ-M9.

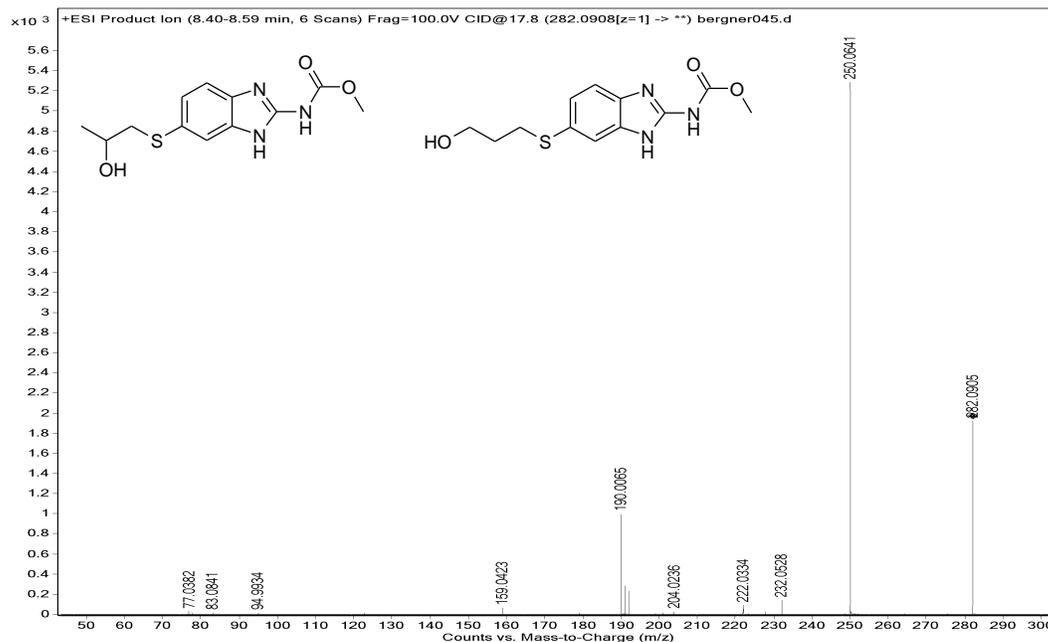


Abbildung 10.42: MS/MS-Spektrum von ABZ-M5. $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 282,0908. Fragment 1: m/z 250,0641, Fragment 2: m/z 222,0334, Fragment 3: m/z 192,0219, Fragment 4: m/z 190,0065.

ABZ-M6

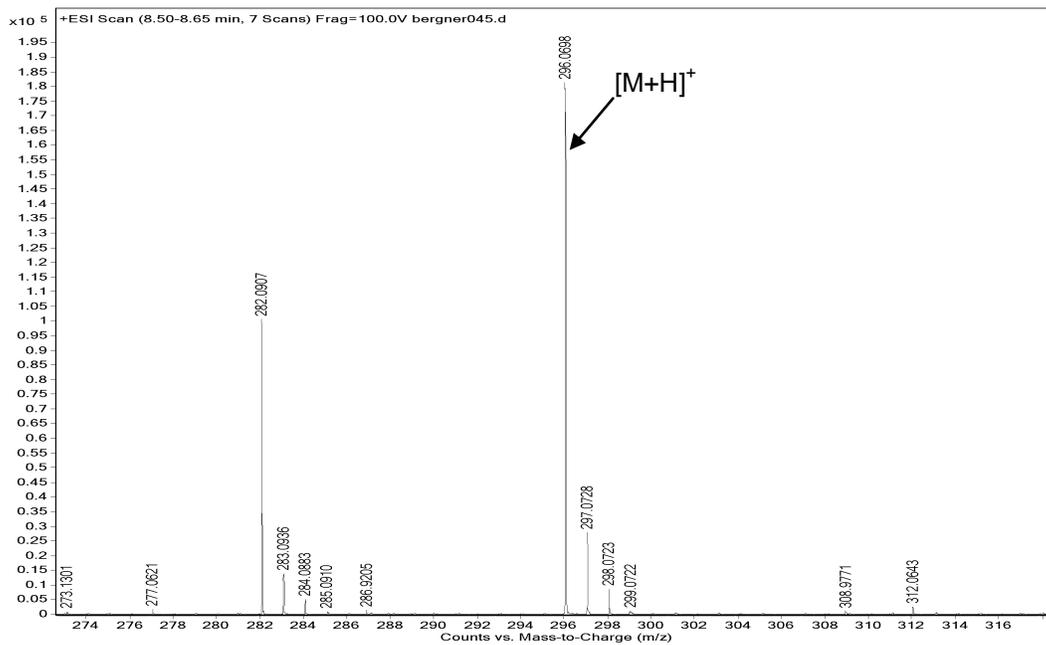


Abbildung 10.43: Massenspektrum von ABZ-M6 bei RT 8,56 min aus der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten. [M+H]⁺: m/z 296,0698.

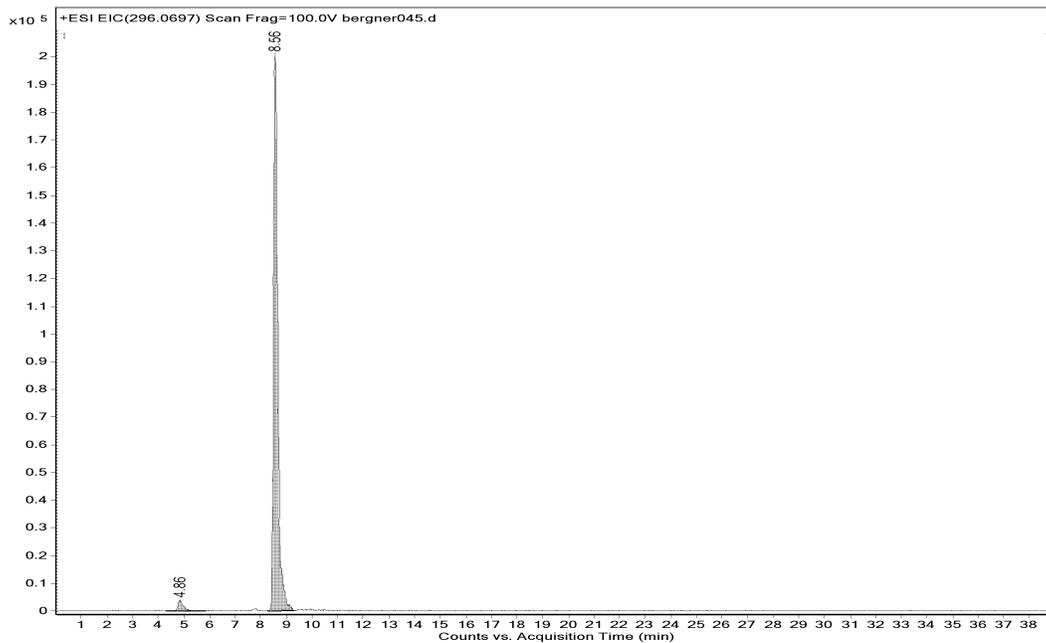


Abbildung 10.44: Massenchromatogramm von ABZ-M6 über m/z 296,0697 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten.

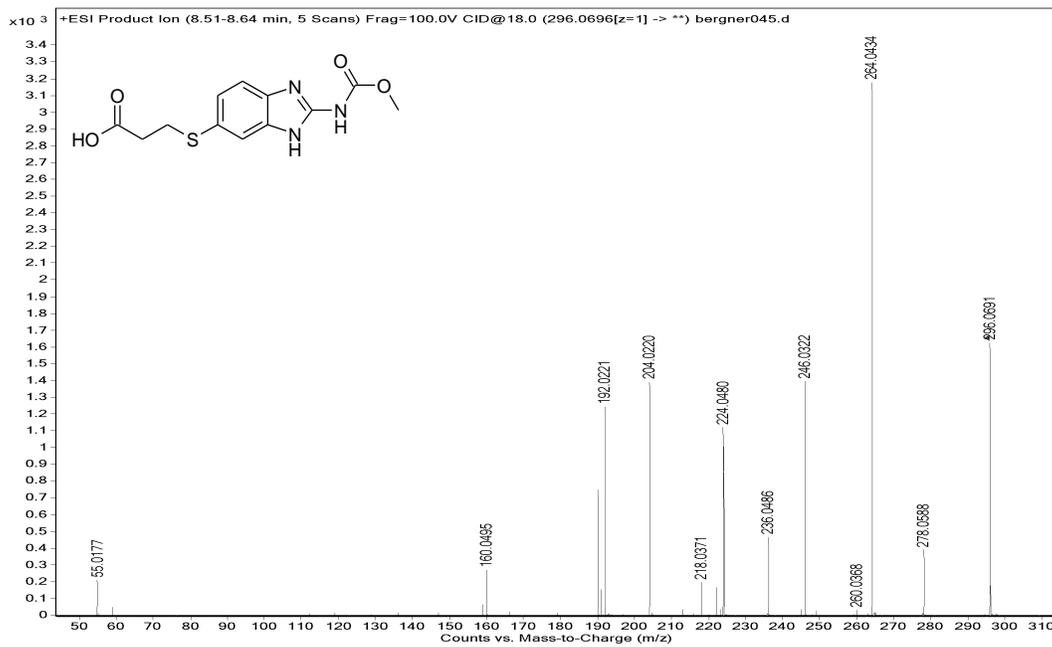


Abbildung 10.45: MS/MS-Spektrum von ABZ-M6. $[M+H]^+$: m/z 296,0696. Fragment 1: m/z 264,0434, Fragment 2: m/z 246,0322, Fragment 3: m/z 218,0371, Fragment 4: m/z 190,0066.

ABZ-M7

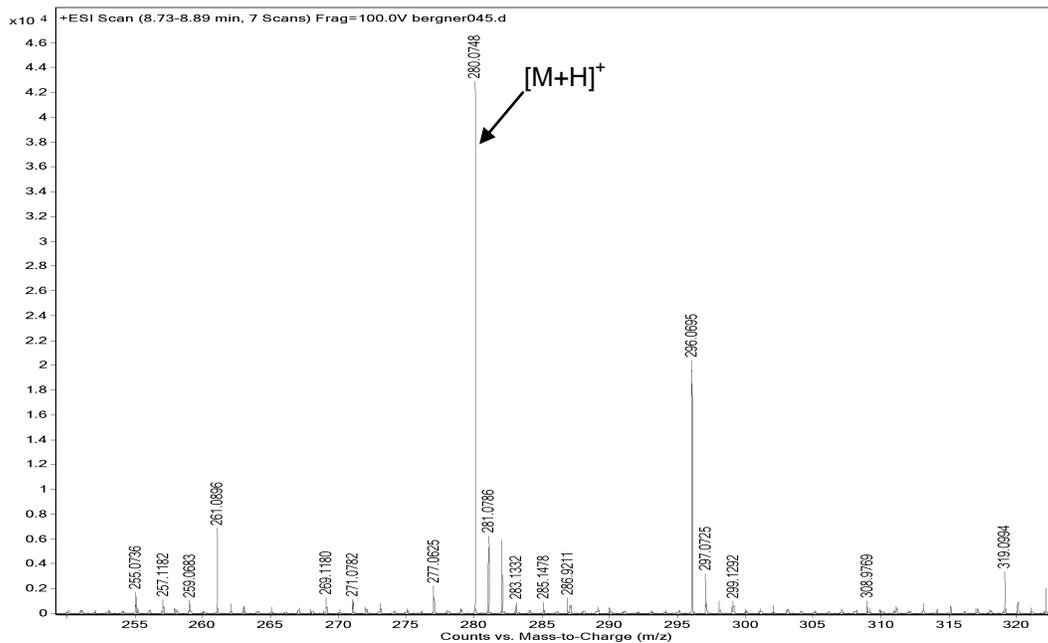


Abbildung 10.46: Massenspektrum von ABZ-M7 bei RT 8,80 min aus der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 280,0748.

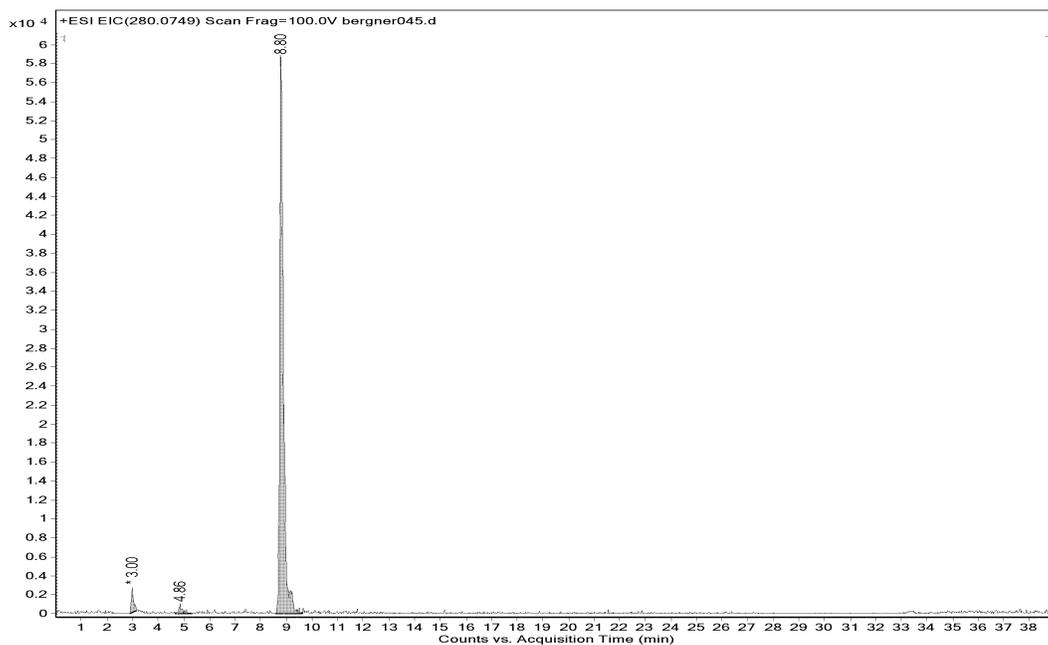


Abbildung 10.47: Massenchromatogramm von ABZ-M7 über m/z 280,0749 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten.

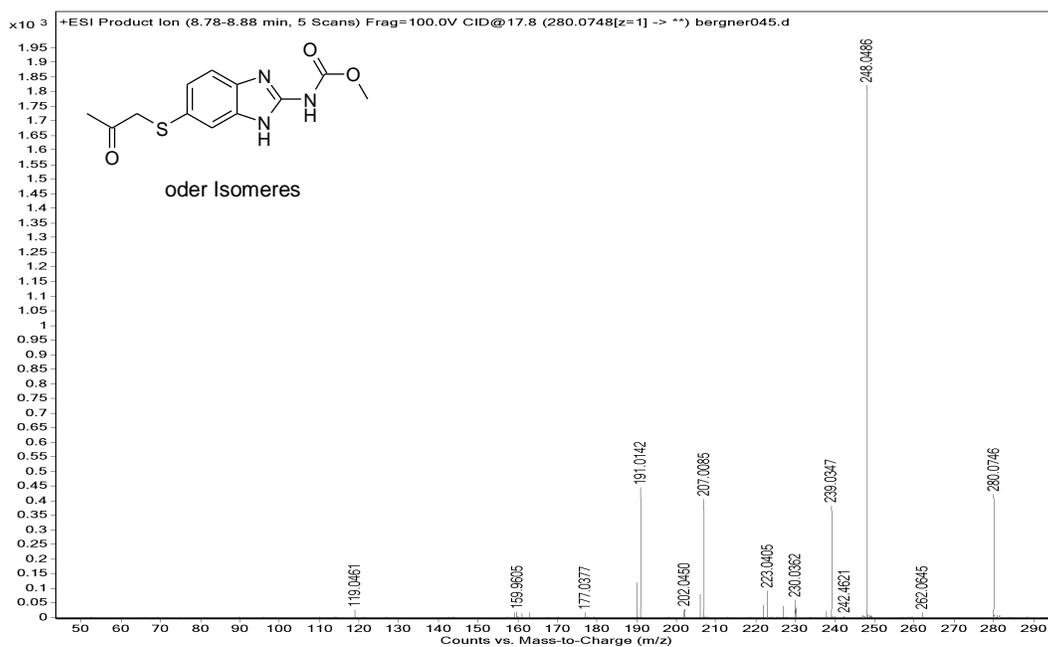


Abbildung 10.48: MS/MS-Spektrum von ABZ-M7. $[M+H]^+$: m/z 280,0746. Fragment 1: m/z 248,0486, Fragment 2: m/z 239,0347, Fragment 3: m/z 207,0085, Fragment 4: m/z 191,0142.

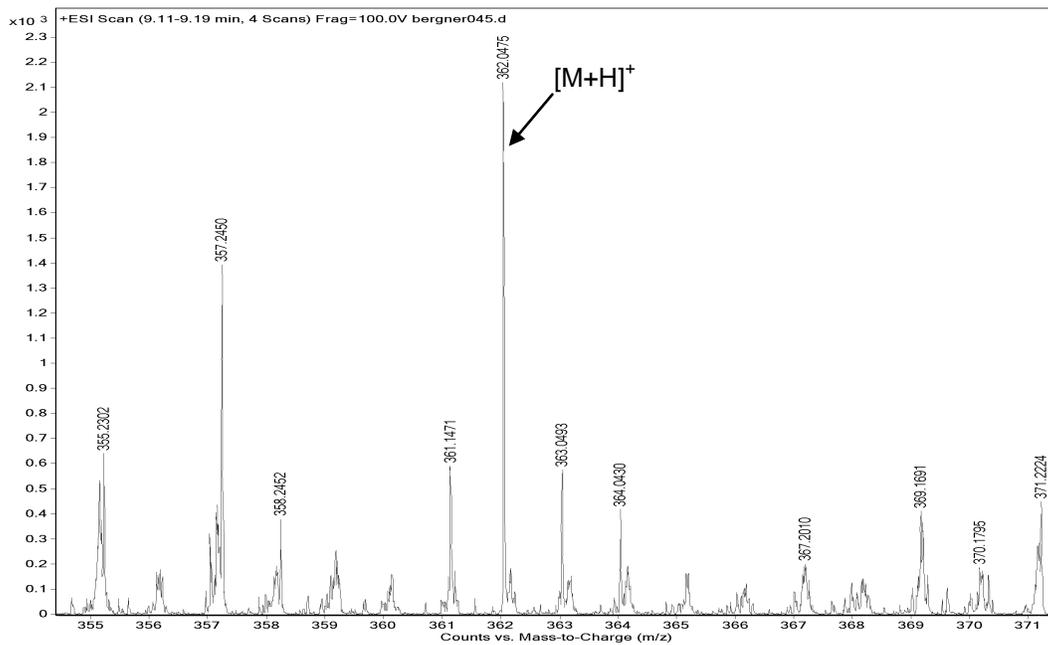
ABZ-M8

Abbildung 10.49: Massenspektrum von ABZ-M8 bei RT 9,16 min aus der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten. [M+H]⁺: m/z 362,0475.

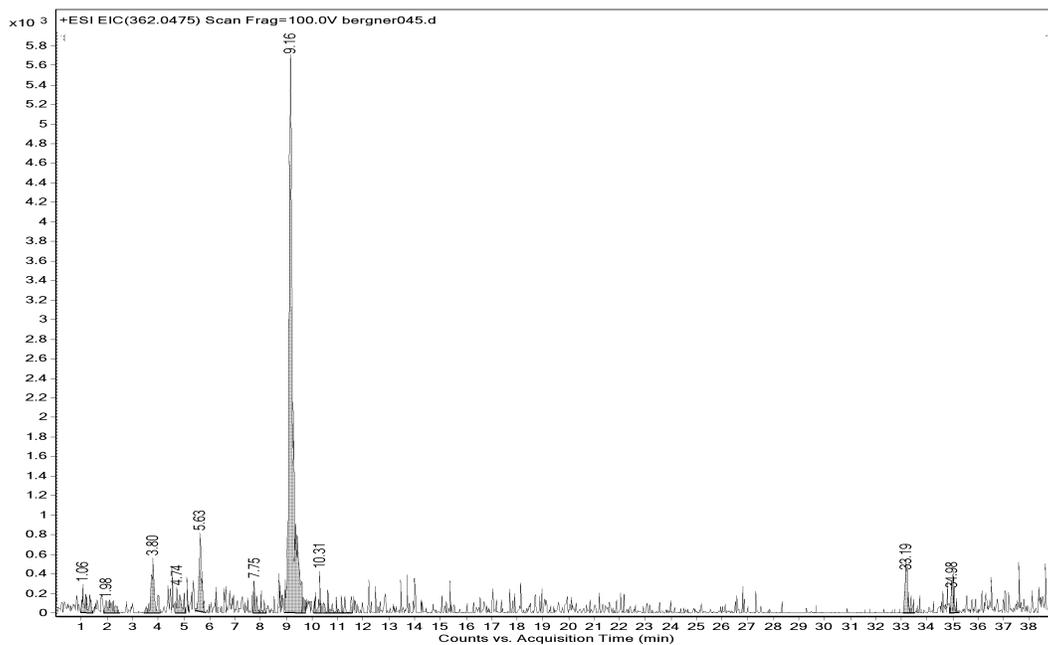


Abbildung 10.50: Massenchromatogramm von ABZ-M8 über m/z 362,0475 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten.

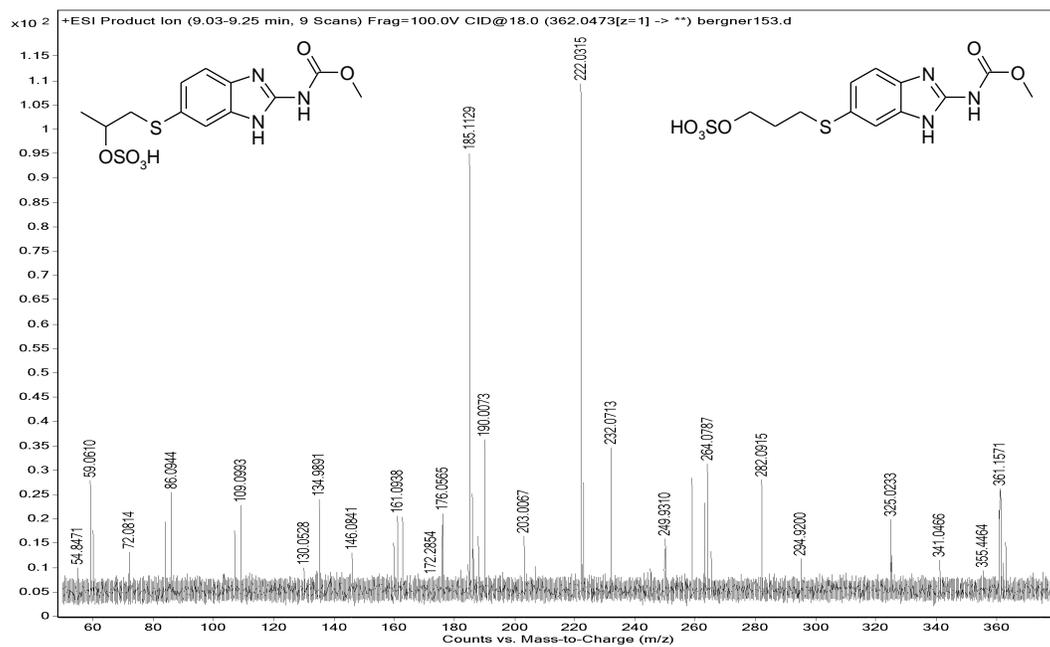


Abbildung 10.51: MS/MS-Spektrum von ABZ-M8. $[M+H]^+$: m/z 362,0473. Fragment 1: m/z 282,0915, Fragment 2: m/z 222,0315, Fragment 3: m/z 190,0073.

ABZ-M9

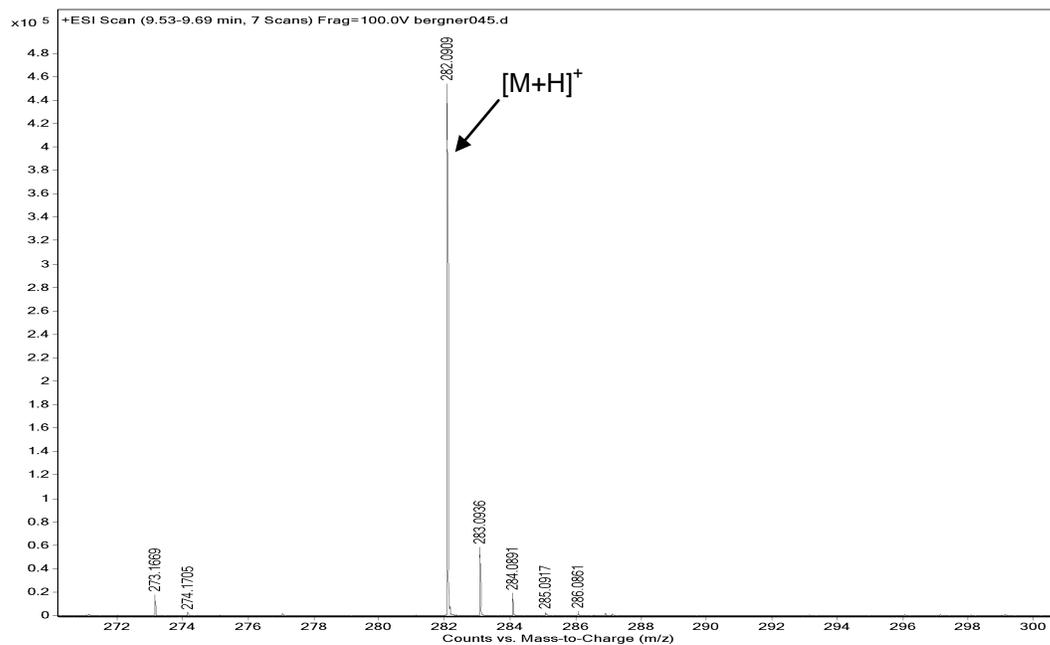


Abbildung 10.52: Massenspektrum von ABZ-M9 bei RT 9,38 min aus der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 282,0909.

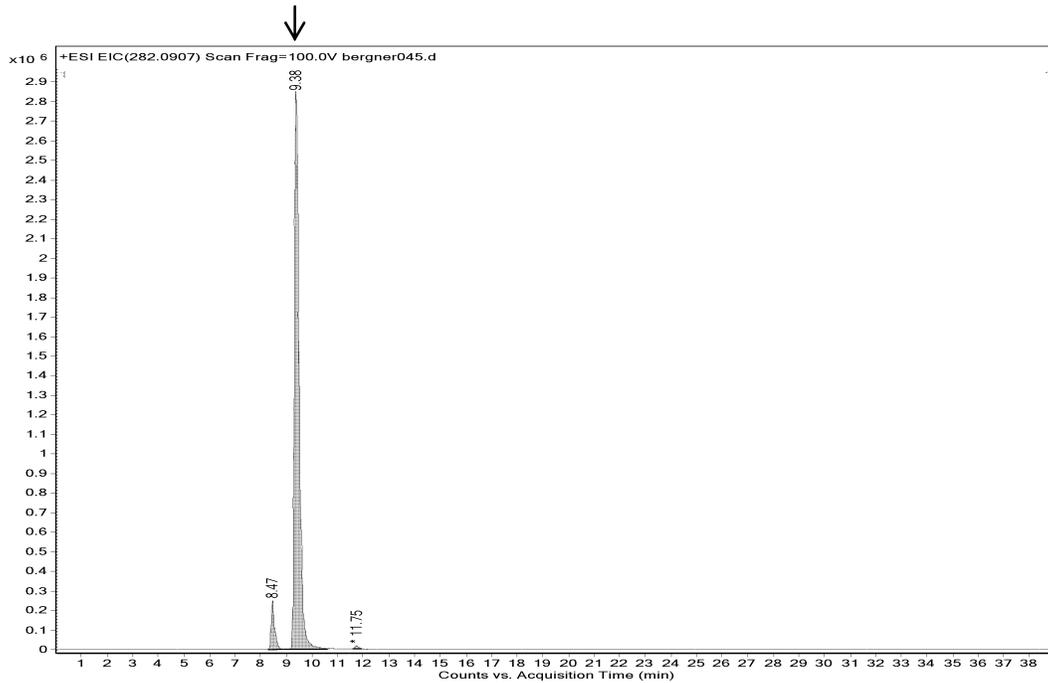


Abbildung 10.53: Massenchromatogramm von ABZ-M9 über m/z 282,0907 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μM ABZ in primären Rattenhepatozyten. Bei dem Signal bei RT 8,47 min handelt es sich um ABZ-M5.

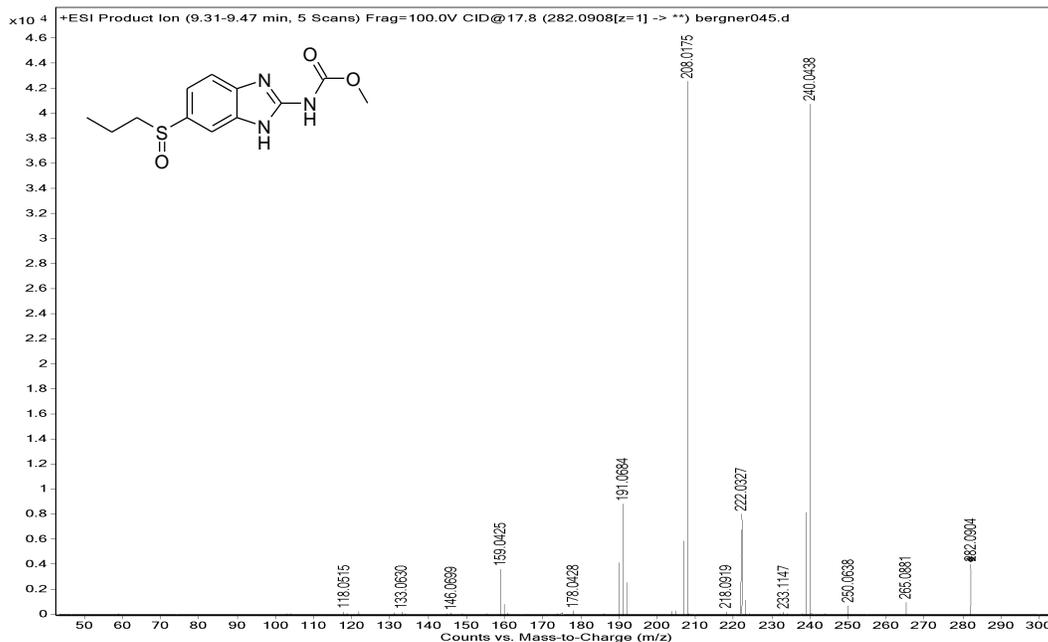


Abbildung 10.54: MS/MS-Spektrum ABZ-M9. $[M+H]^+$: m/z 282,0904. Fragment 1: m/z 240,0438, Fragment 2: m/z 222,0327, Fragment 3: m/z 208,0175, Fragment 4: m/z 191,0684.

ABZ-M10

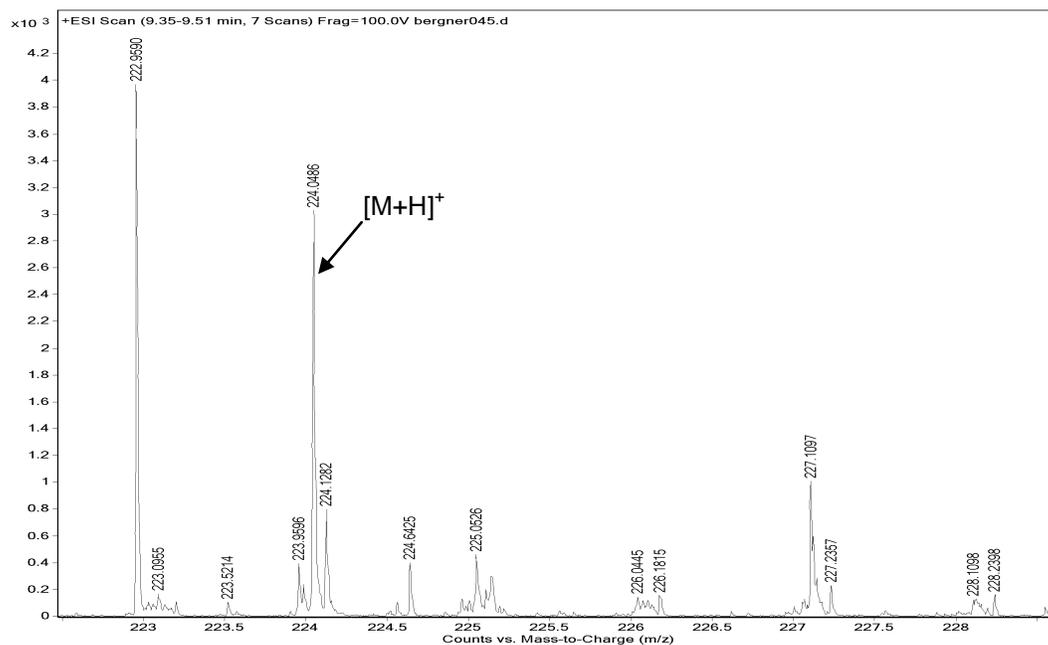


Abbildung 10.55: Massenspektrum von ABZ-M10 bei RT 9,43 min aus der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten. [M+H]⁺: m/z 224,0486.

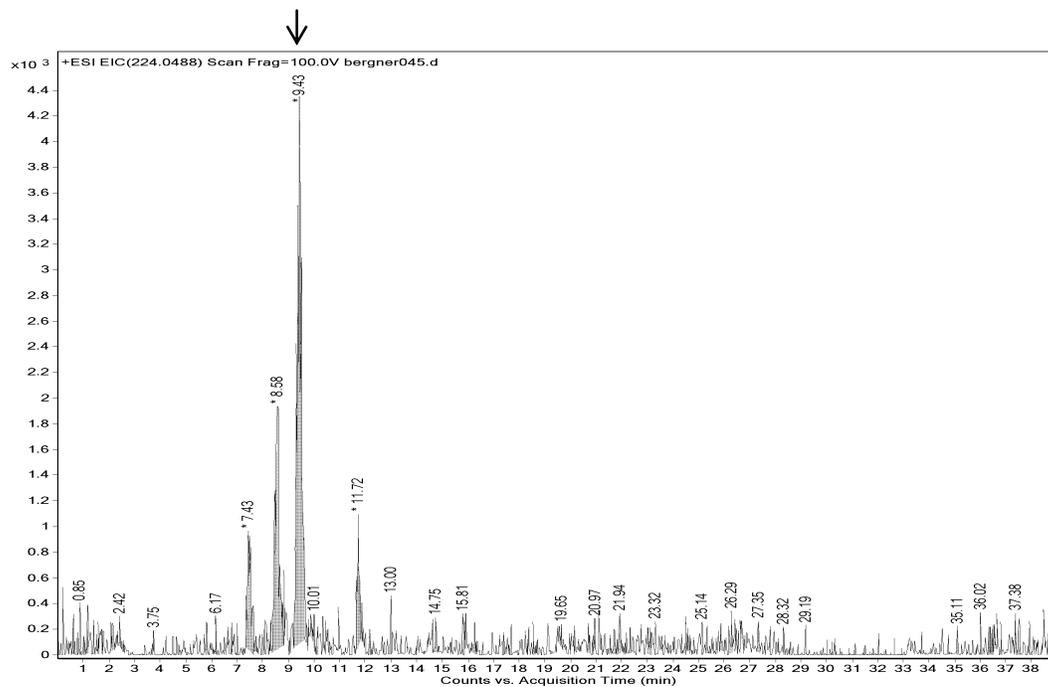


Abbildung 10.56: Massenchromatogramm von ABZ-M10 über m/z 224,0486 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten.

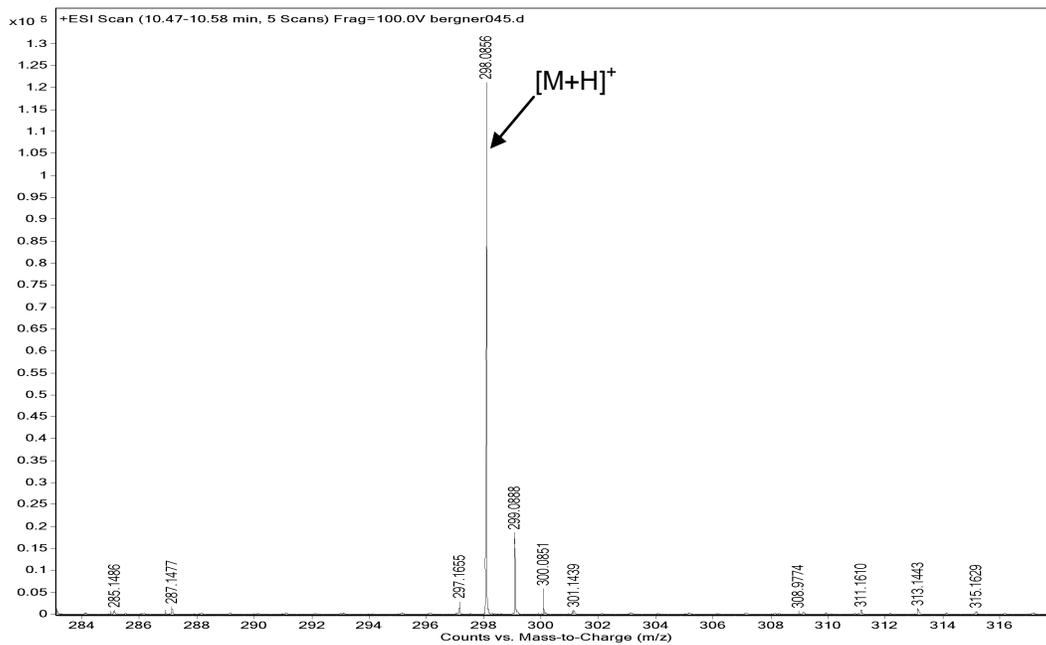
ABZ-M11

Abbildung 10.57: Massenspektrum von ABZ-M11 bei RT 10,53 min aus der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 298,0856.

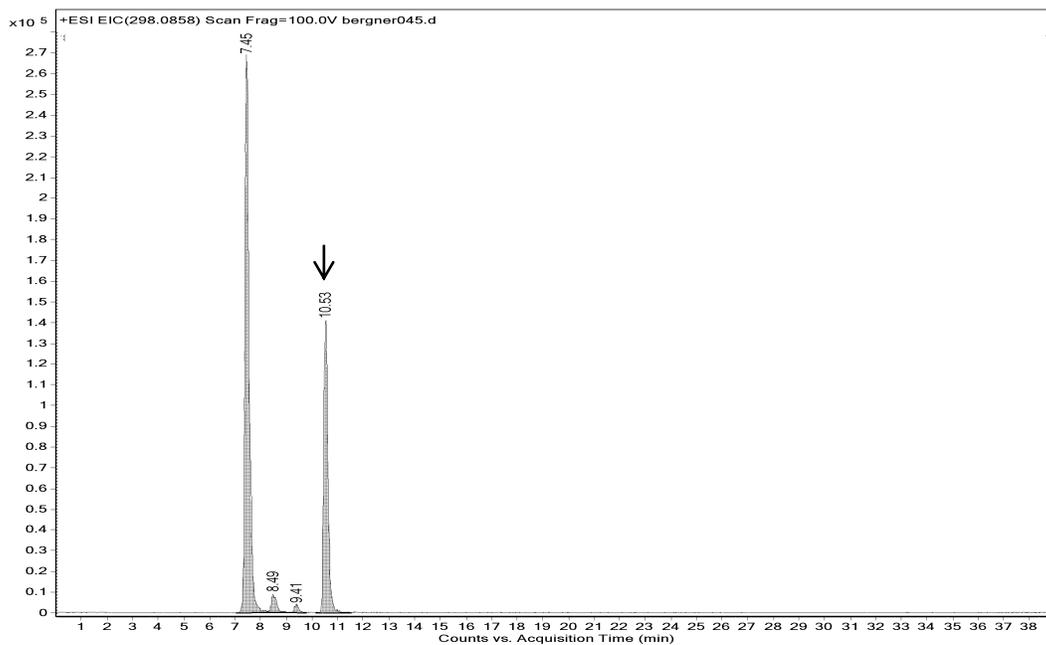


Abbildung 10.58: Massenchromatogramm von ABZ-M11 über m/z 298,0858 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten. Bei den Signalen bei RT 7,45, 8,49 und 9,41 min handelt es sich um ABZ-M2.

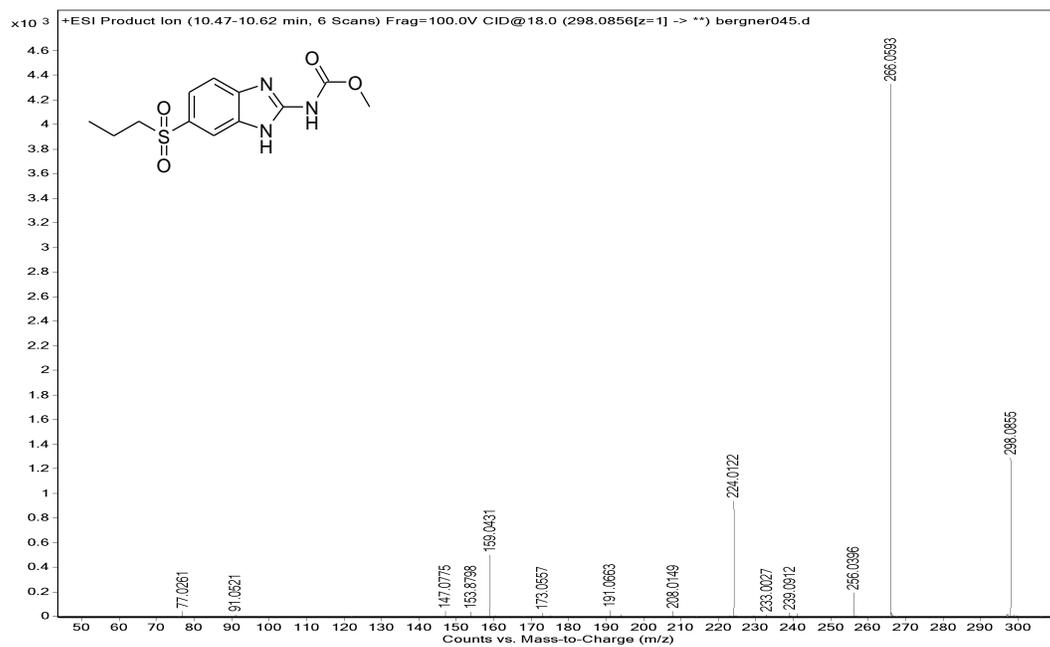
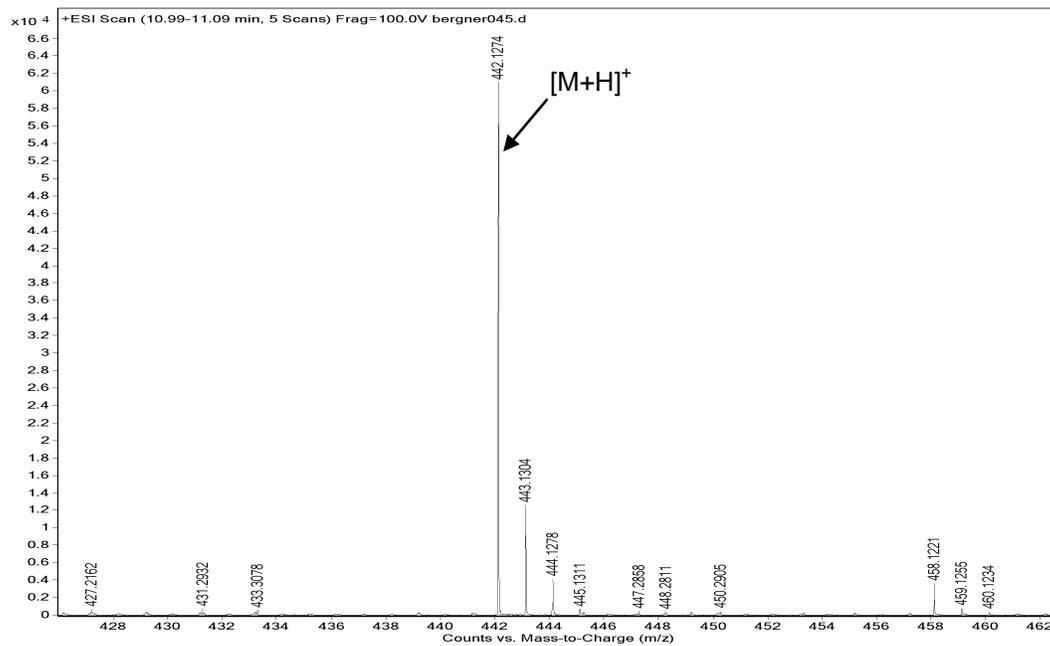


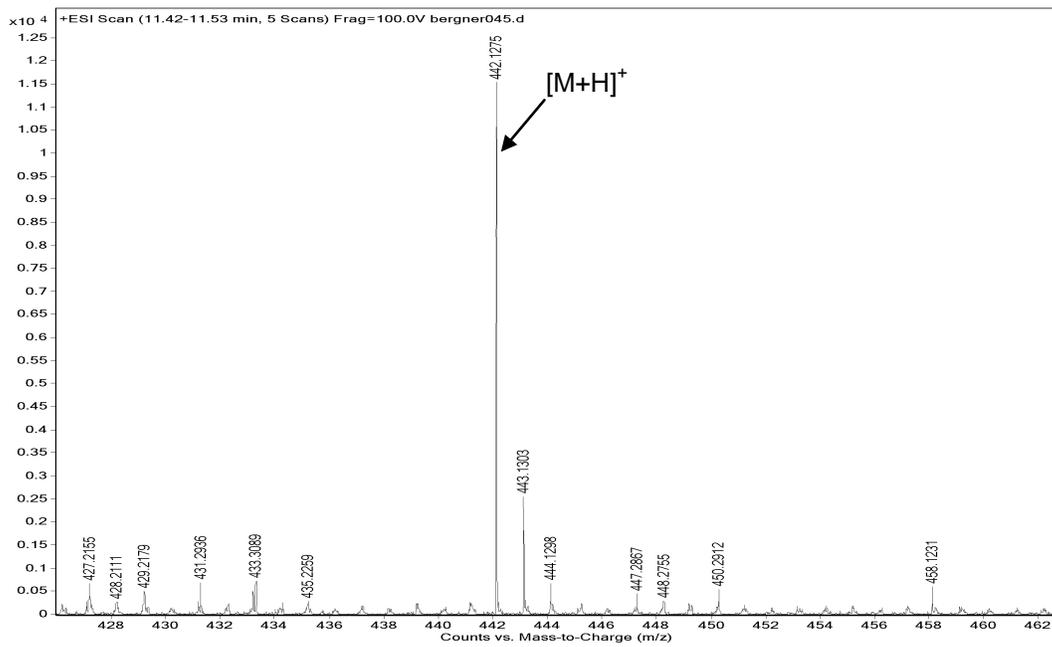
Abbildung 10.59: MS/MS-Spektrum von ABZ-M11. $[M+H]^+$: m/z 298,0856. Fragment 1: m/z 266,0593, Fragment 2: m/z 224,0122, Fragment 3: m/z 159,0431.

ABZ-M12

ABZ-M12.1



ABZ-M12.2



ABZ-M12.3

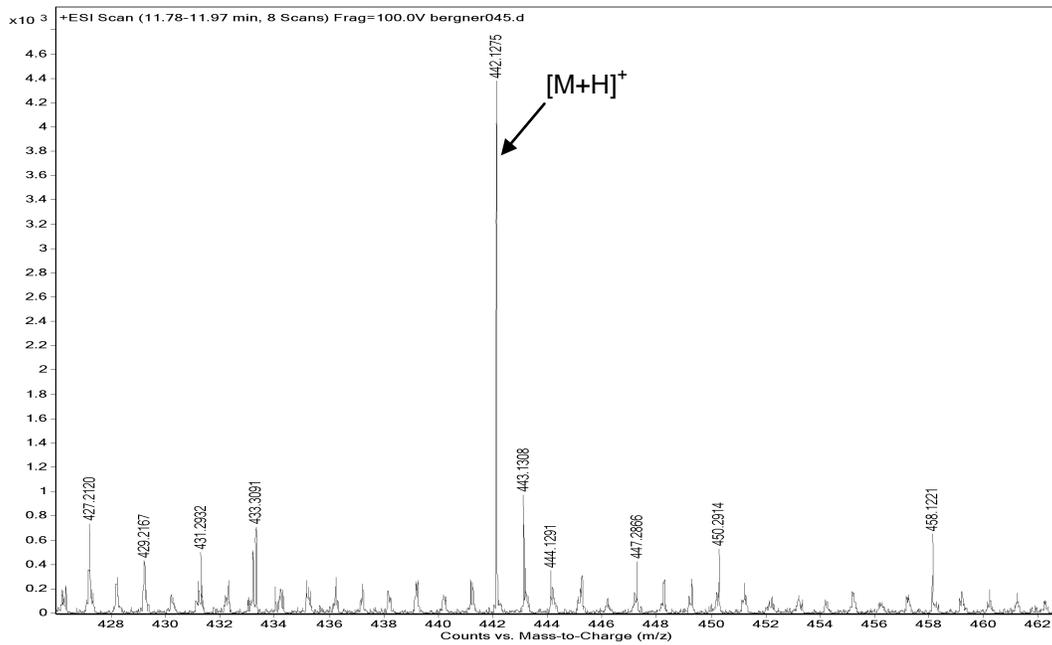


Abbildung 10.60: Massenspektren von ABZ-M12.1-12.3 bei RT 11,04 min, 11,47 min und 11,88 min aus der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 442,1274.

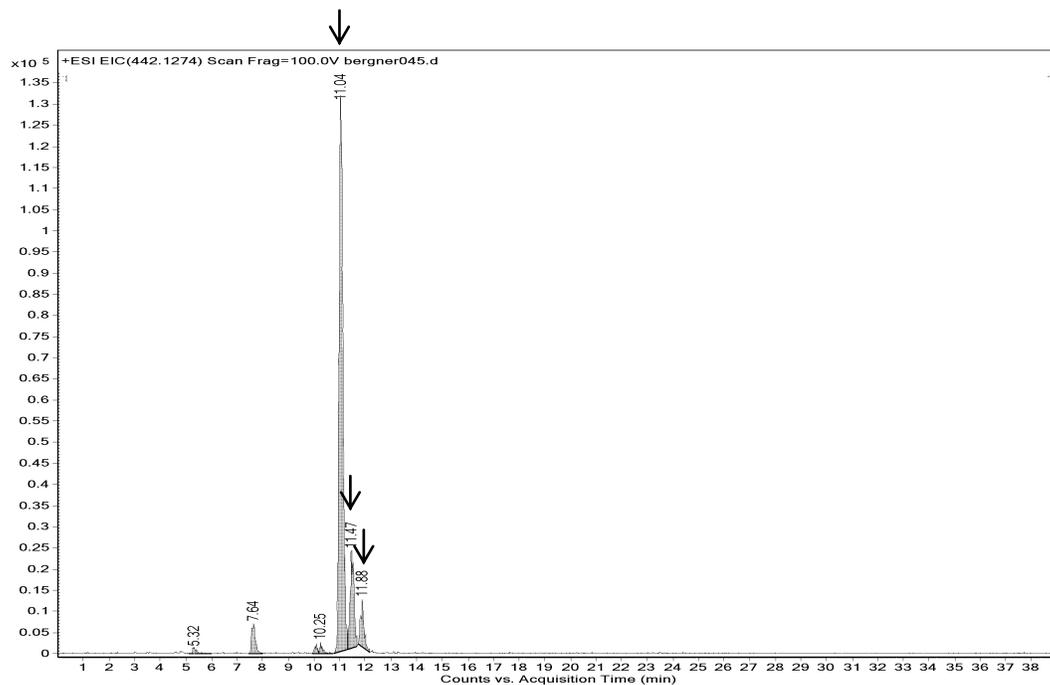
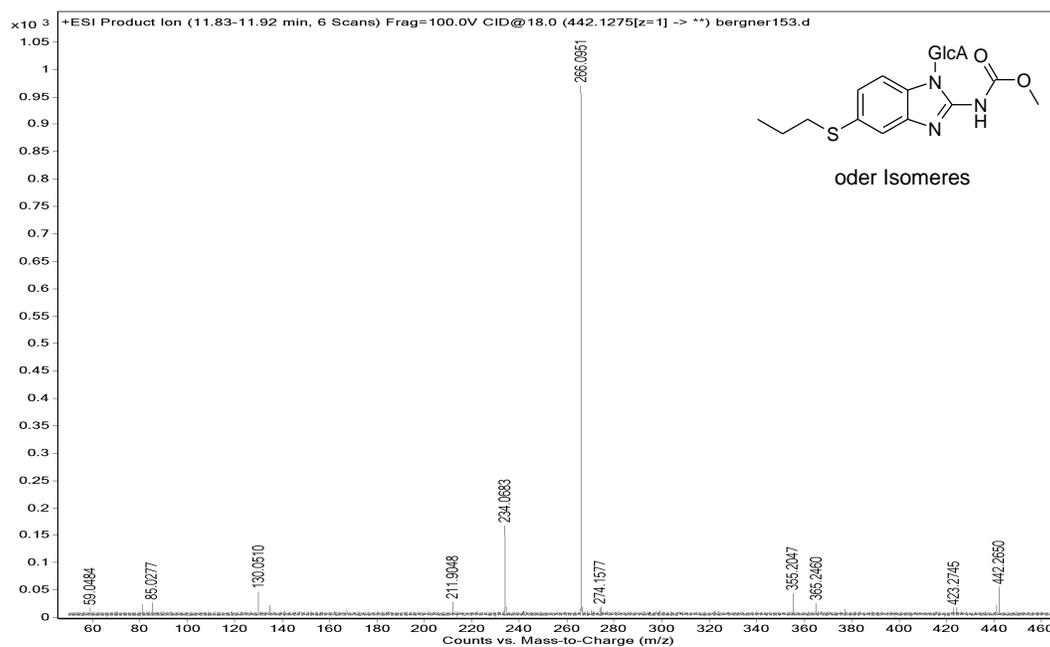
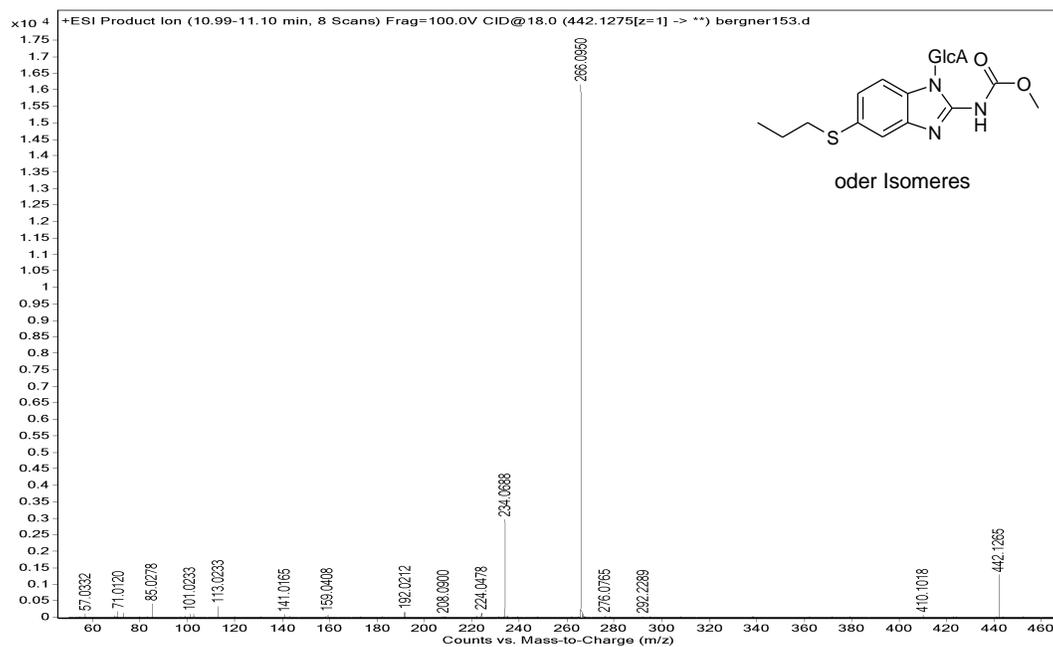


Abbildung 10.61: Massenchromatogramm von ABZ-M11 über m/z 442,1274 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 25 μ M ABZ in primären Rattenhepatozyten.

ABZ-M12.1



ABZ-M12.2



ABZ-M12.3

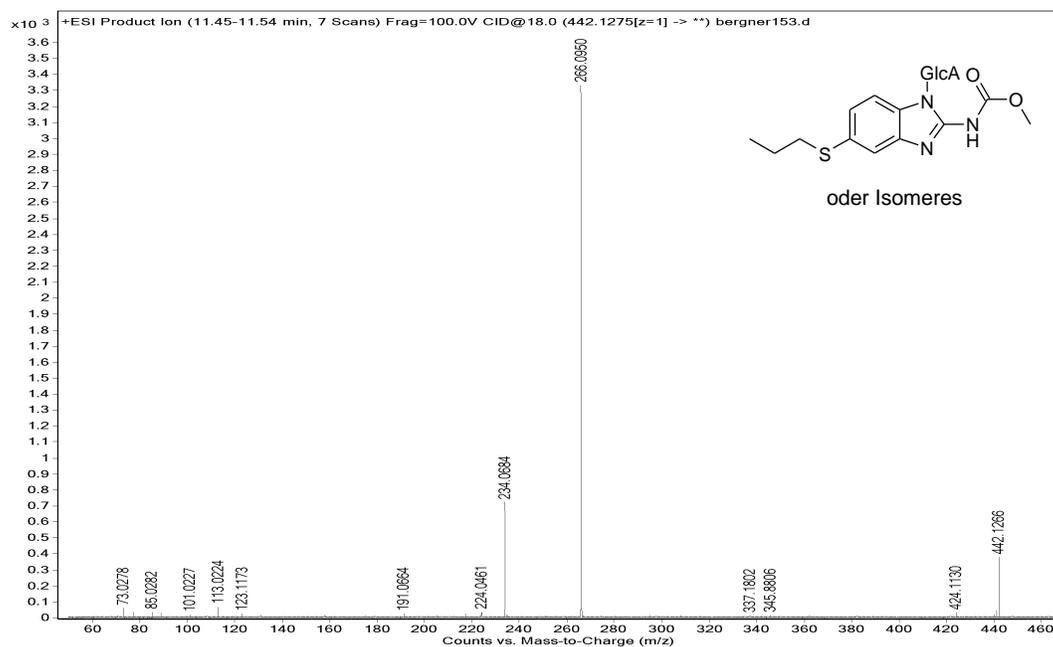


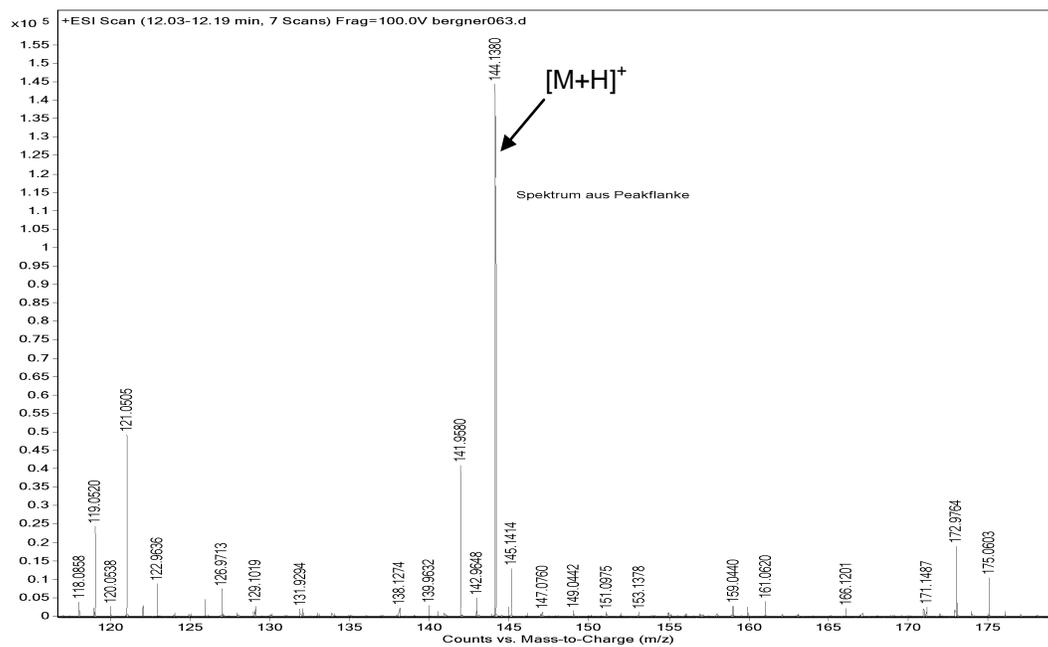
Abbildung 10.62: MS/MS-Spektren von ABZ-M12-Isomeren. $[M+H]^+$: m/z 442,1275. Fragment 1: m/z 266,0950, Fragment 2: m/z 234,0688.

12.1.3.3 Valpromid

VPD wird in Rattenhepatozyten unter basalen Bedingungen für 24 Stunden inkubiert. Die Konzentration beträgt 4 mM. Die Inkubate werden zur Strukturaufklärung der Metaboliten mittels Q-TOF LC/MS analysiert. Im Folgenden sind beispielhaft die Full Scan- und Fragmentierungsspektren sowie die Massenchromatogramme der Analyten aus einem aktiven Inkubat abgebildet. Bei Signalen innerhalb der Massenchromatogramme, welche keinem Metaboliten zugeordnet worden sind, kann es sich sowohl um Isotopen- als auch um Matrixpeaks handeln. Die Darstellung der Metaboliten erfolgt nach ihrer Retentionszeit (vgl. Kap. 5.1.6.3). Bei den Strukturformeln innerhalb der Fragmentierungsspektren handelt es sich um Strukturvorschläge identifizierter Metaboliten.

VPD

a)



b)

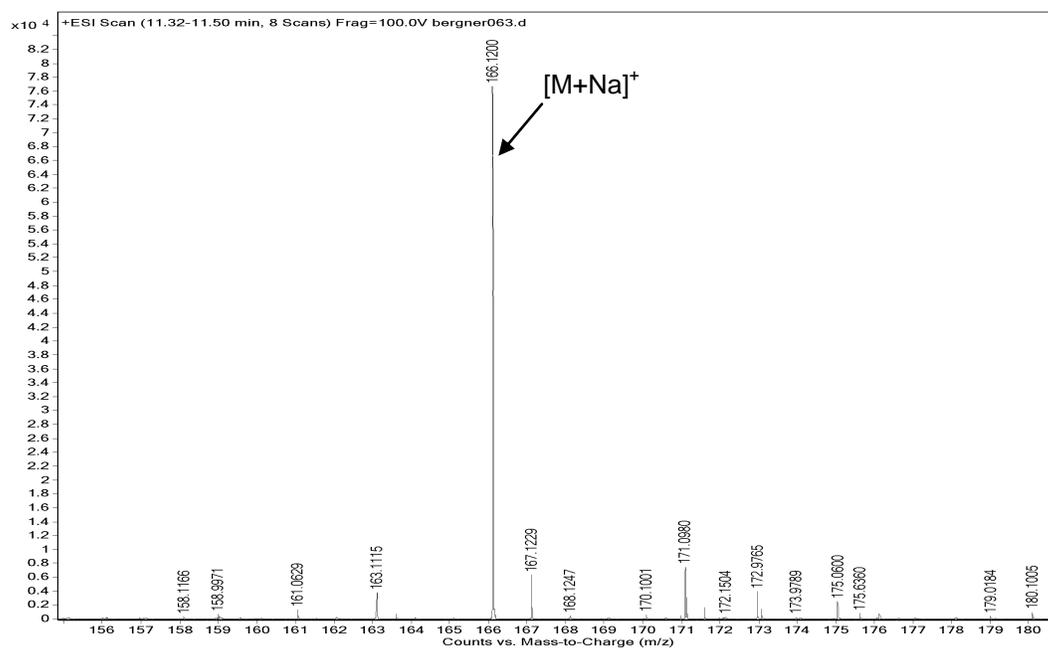
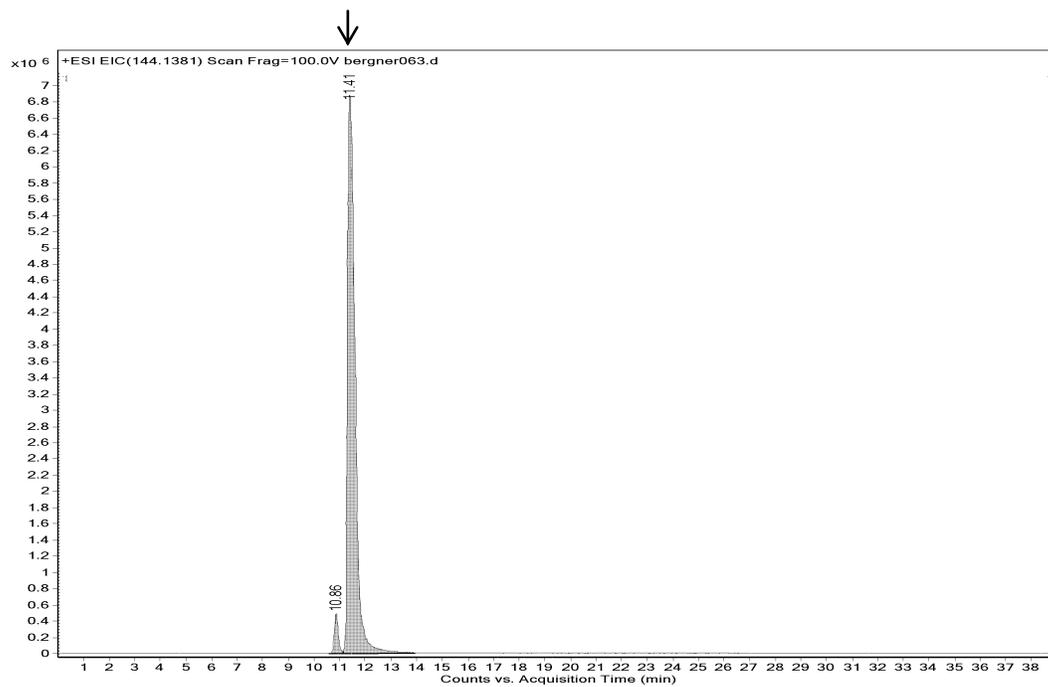


Abbildung 10.63: Massenspektren aus der Peakflanke von VPD bei RT 11,41 min aus der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 144,1381 und $[M+Na]^+$: m/z 166,1200.

a)



b)

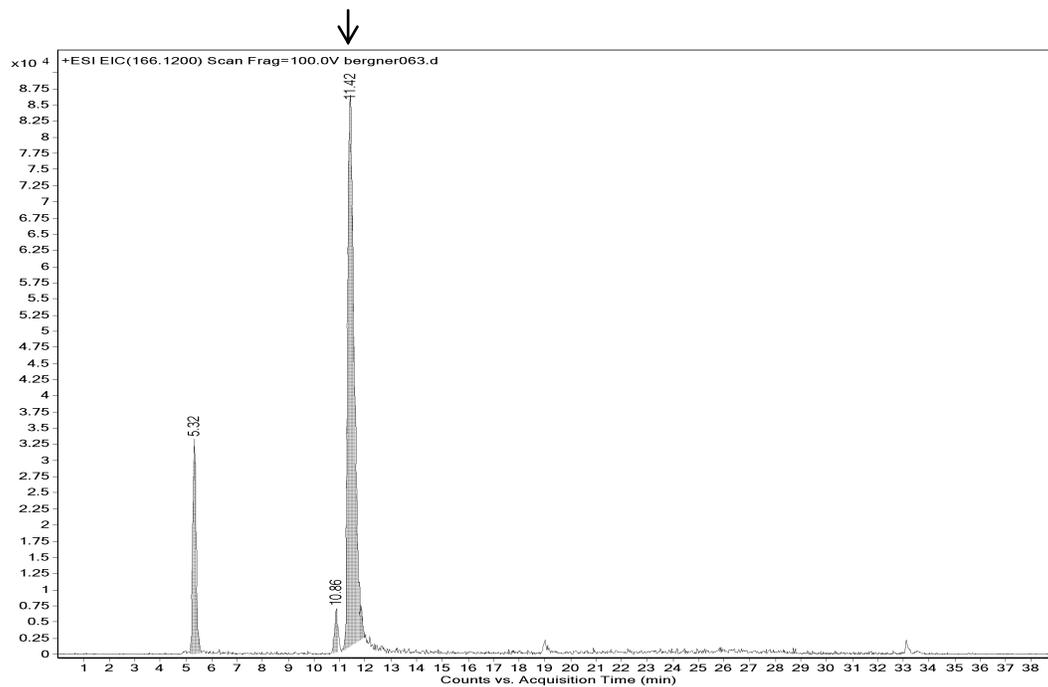


Abbildung 10.64: Massenchromatogramme von VPD über a) m/z 144,1381 und b) m/z 166,1200 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten.

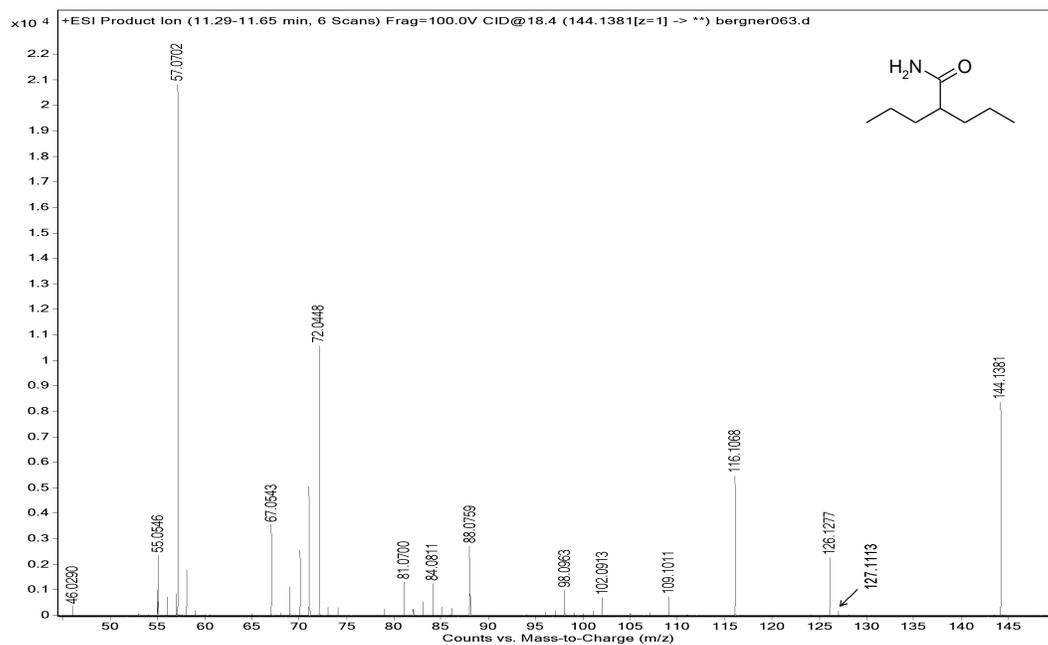
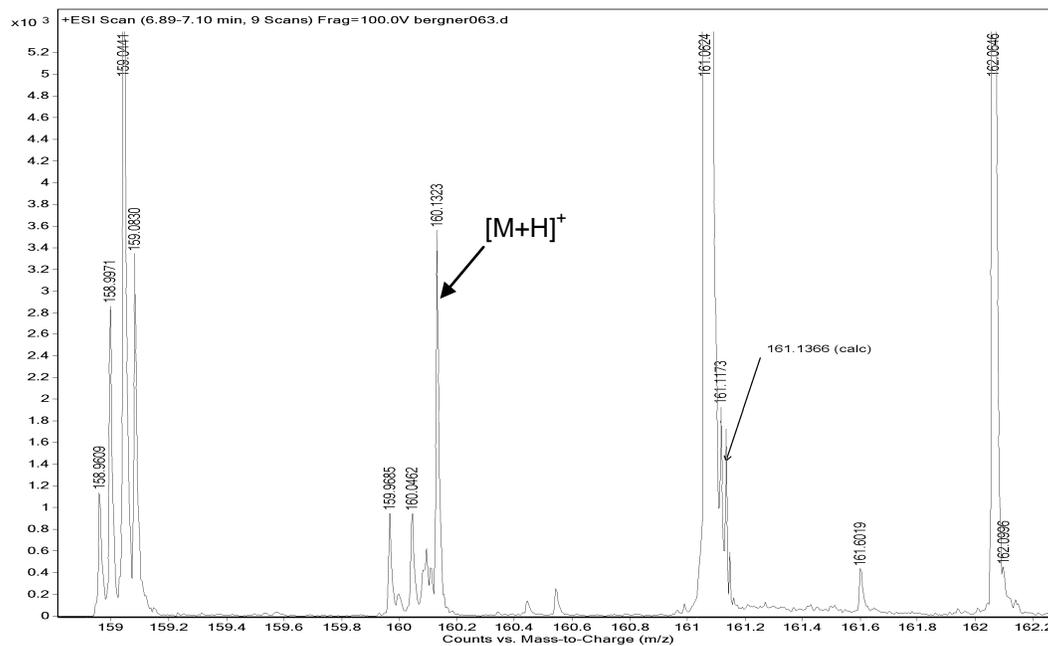


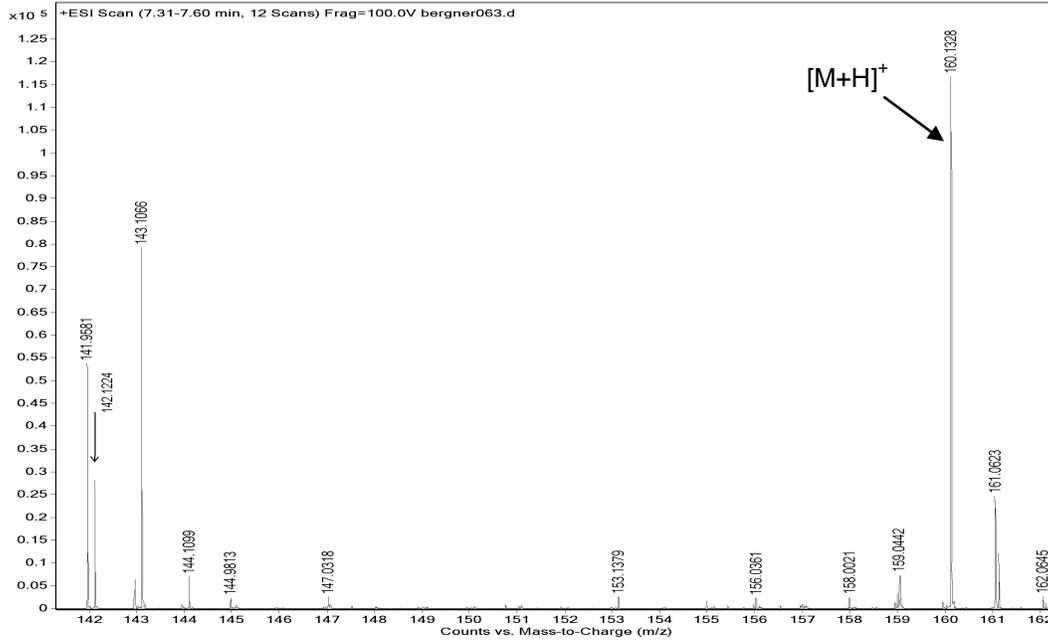
Abbildung 10.65: MS/MS-Spektrum von VPD. $[M+H]^+$: m/z 144,1377. Fragment 1: m/z 102,0913, Fragment 2: m/z 85,0651, Fragment 3: m/z 72,0448, Fragment 4: m/z 57,0702.

VPD-M1

VPD-M1.1



VPD-M1.2



VPD-M1.3

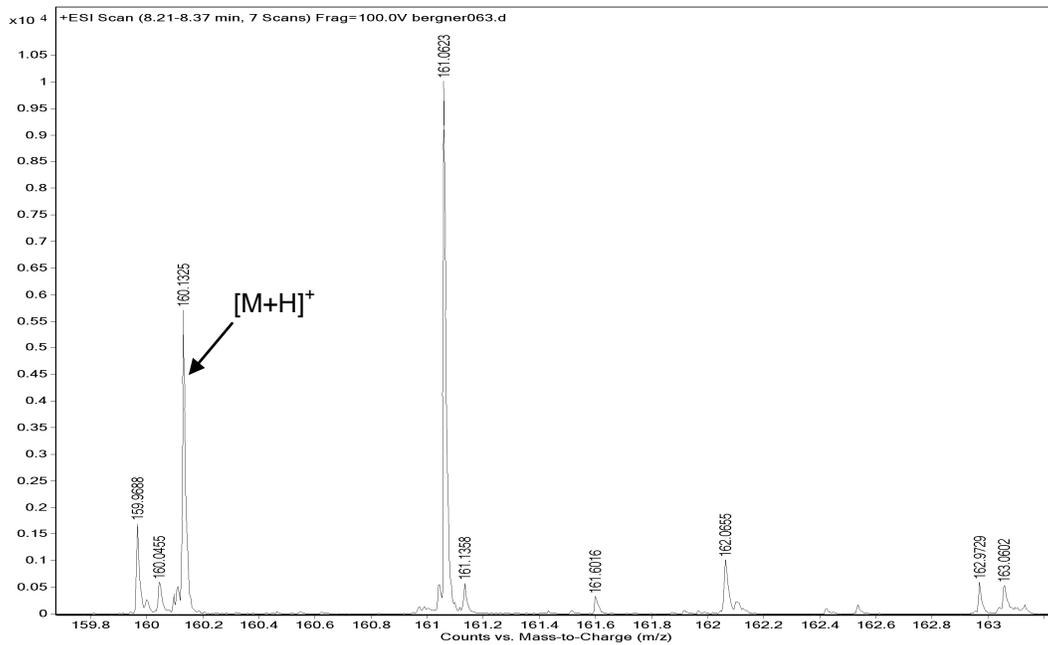


Abbildung 10.66: Massenspektren von VPD-M1.1-M1.3 bei RT 7,01 min, RT 7,39 min, RT 8,27 min aus der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 160,1323.

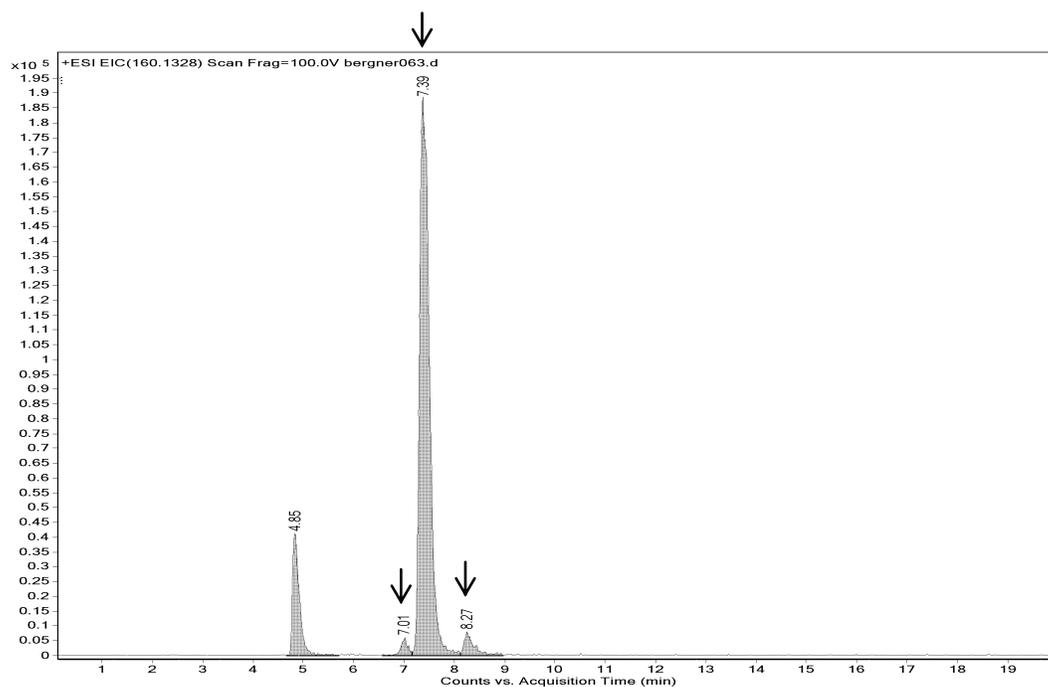
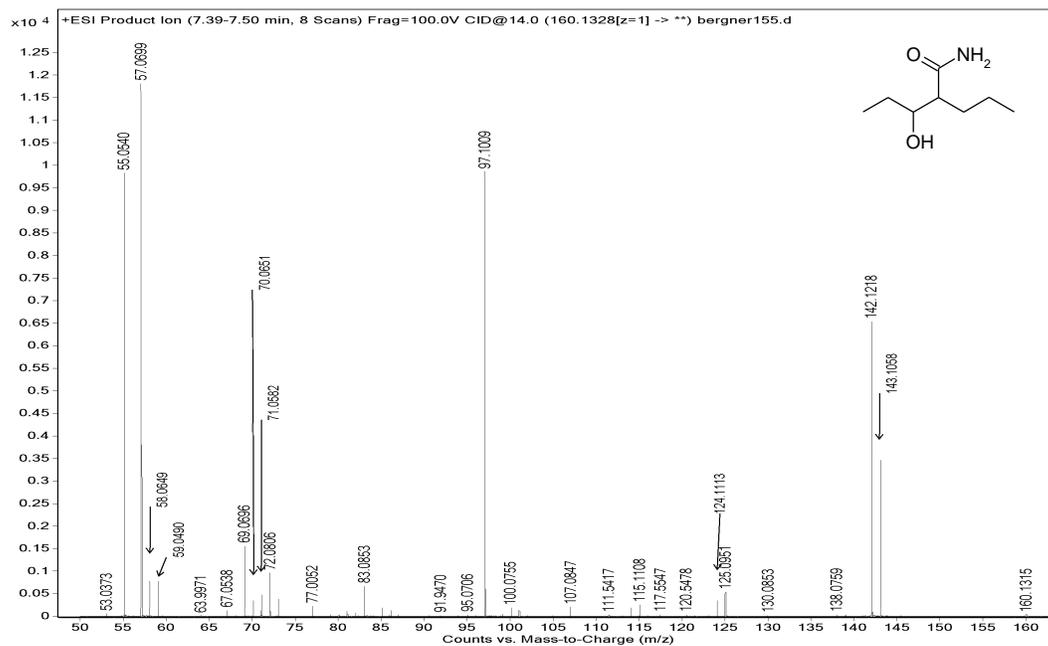


Abbildung 10.67: Massenchromatogramm von VPD-M1 über m/z 160,1328 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten. Bei dem Signal bei RT 4,85 min handelt es sich um einen Matrixpeak.

VPD-M1.2



VPD-M1.3

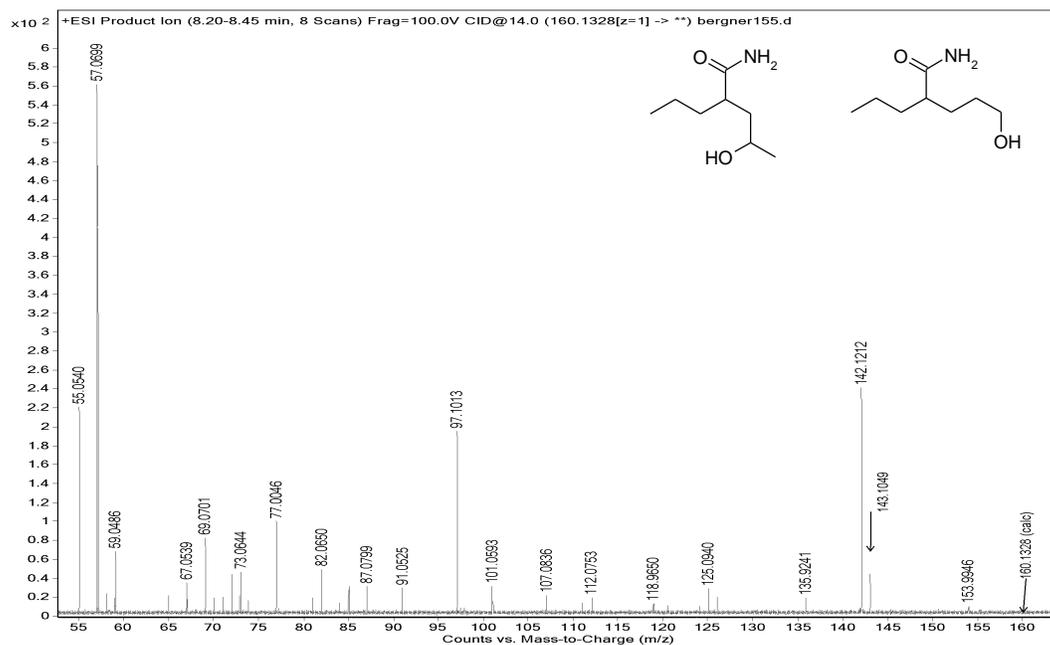
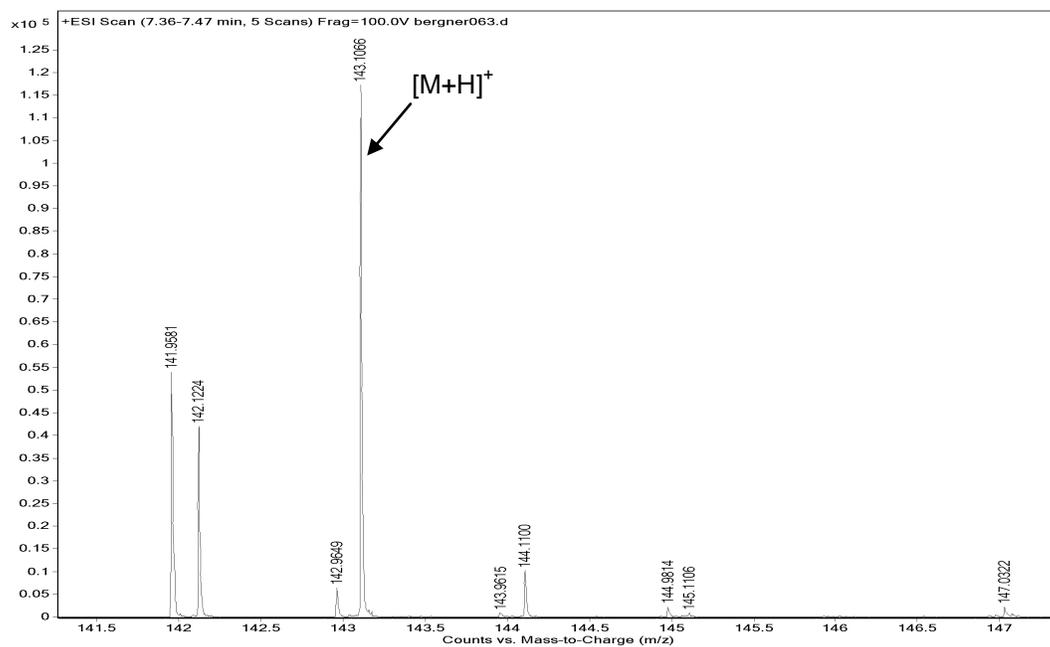


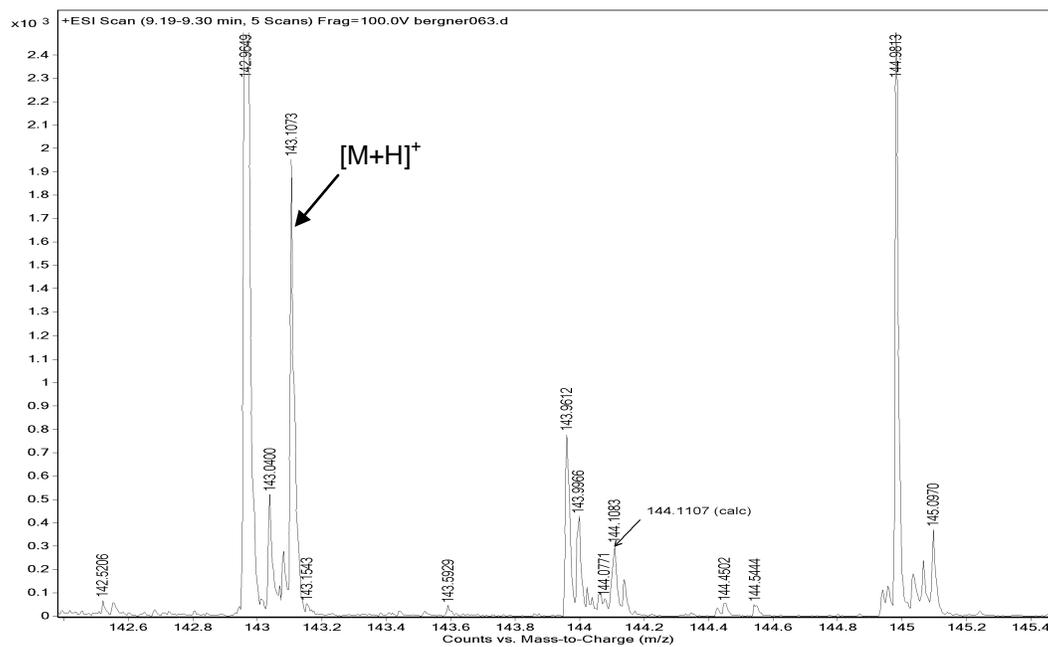
Abbildung 10.68: MS/MS-Spektren von VPD-M1.2 und M1.3. $[M+H]^+$: m/z 160,1328. Fragment 1: m/z 142,1218, Fragment 2: m/z 125,0940, Fragment 3: m/z 97,1009, Fragment 4: m/z 55,0540.

VPD-M2

VPD-M2.1



VPD-M2.2



VPD-M2.3

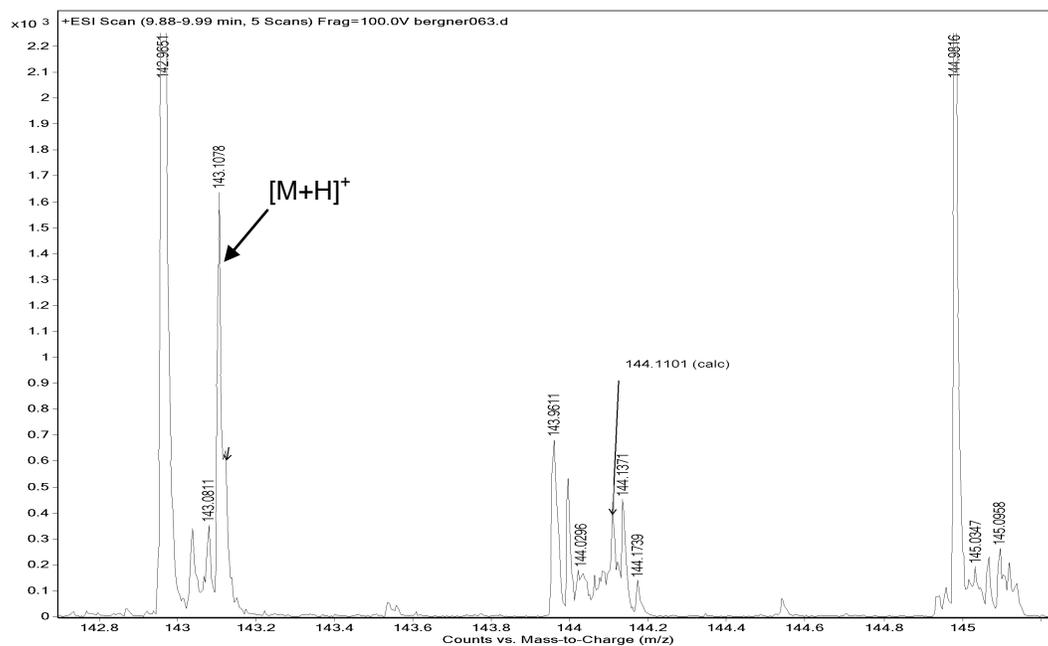


Abbildung 10.69: Massenspektren von VPD-M2.1-M2.3 bei RT 7,40 min, RT 9,23 min, RT 9,96 min aus der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 143,1066.

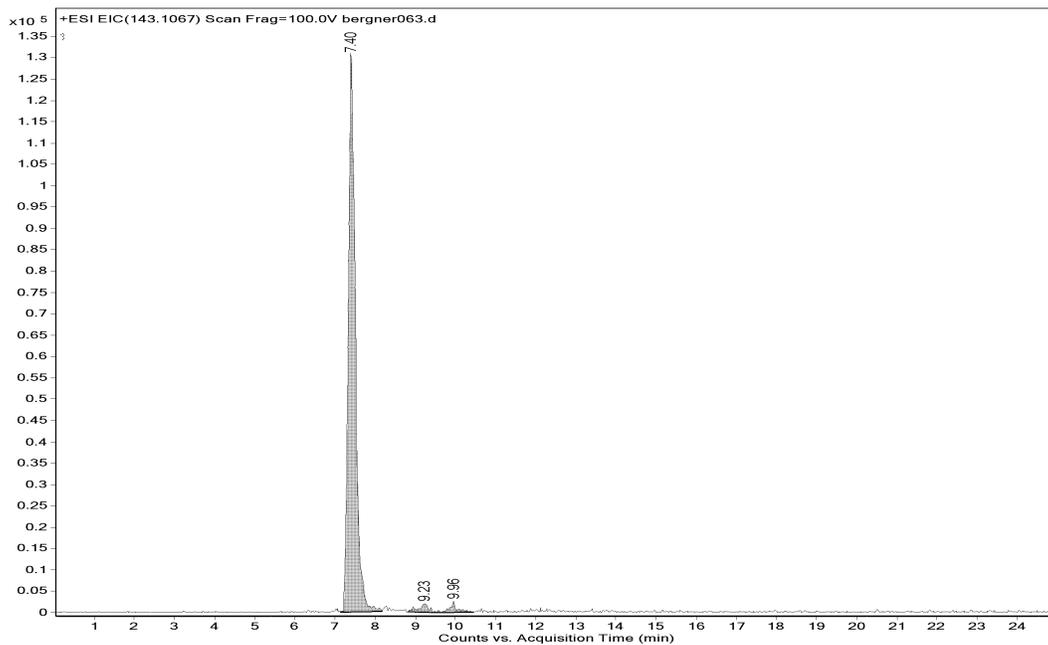


Abbildung 10.70: Massenchromatogramm von VPD-M2 über m/z 143,1067 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten.

VPD-M2.1

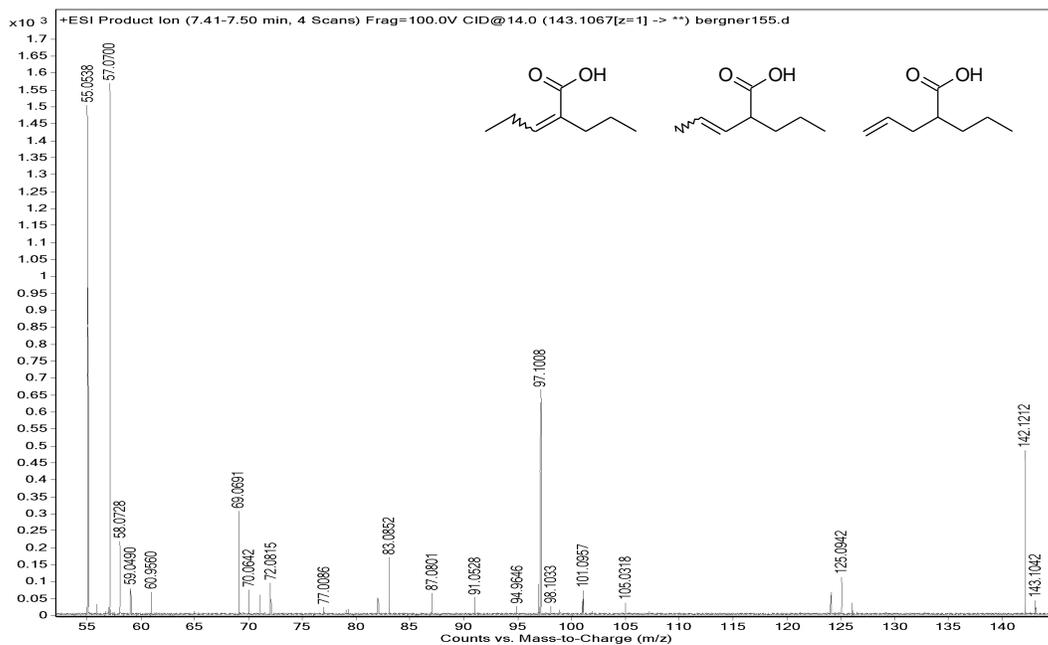
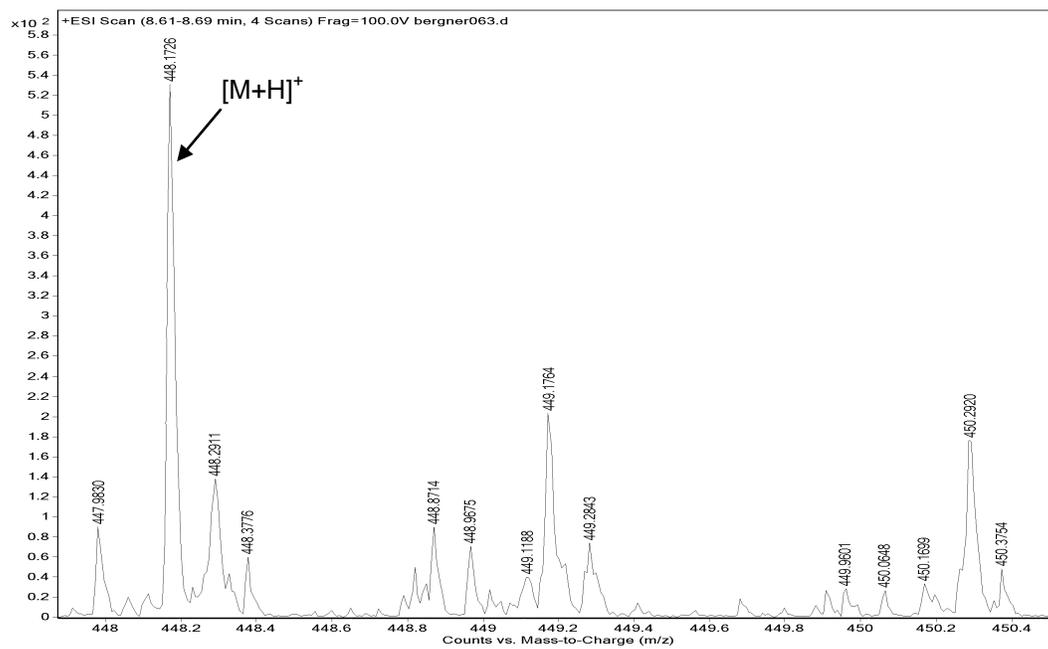


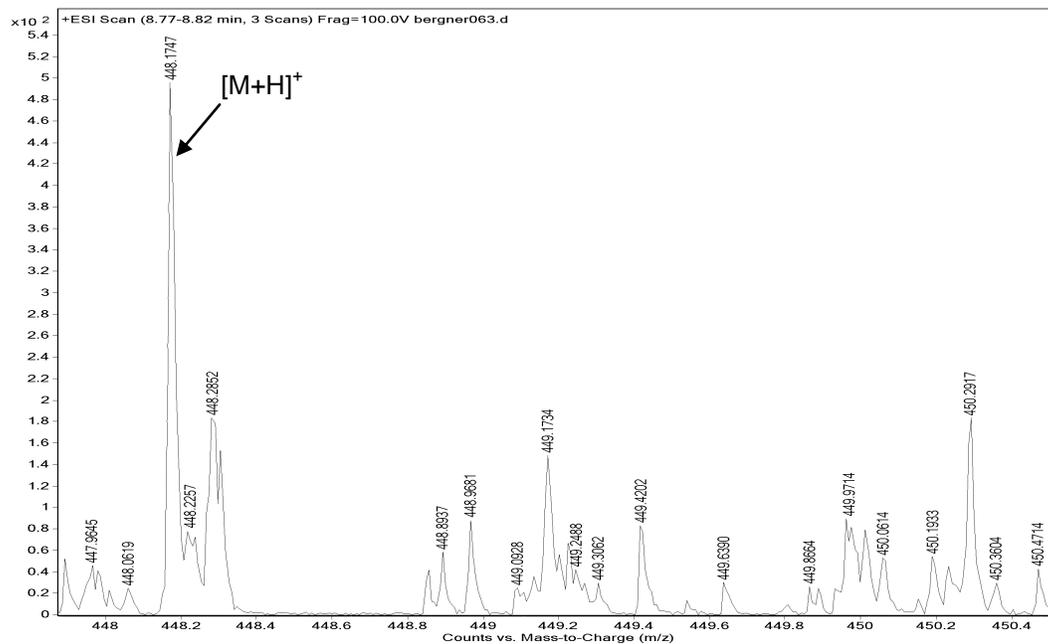
Abbildung 10.71: MS/MS-Spektrum von VPD-M2.1. $[M+H]^+$: m/z 143,1539. Fragment 1: m/z 125,0942, Fragment 2: m/z 97,1008, Fragment 3: m/z 69,0691, Fragment 4: m/z 55,0538. Von VPD-M2.2 und M2.3 liegt kein MS/MS-Spektrum vor.

VPD-M3

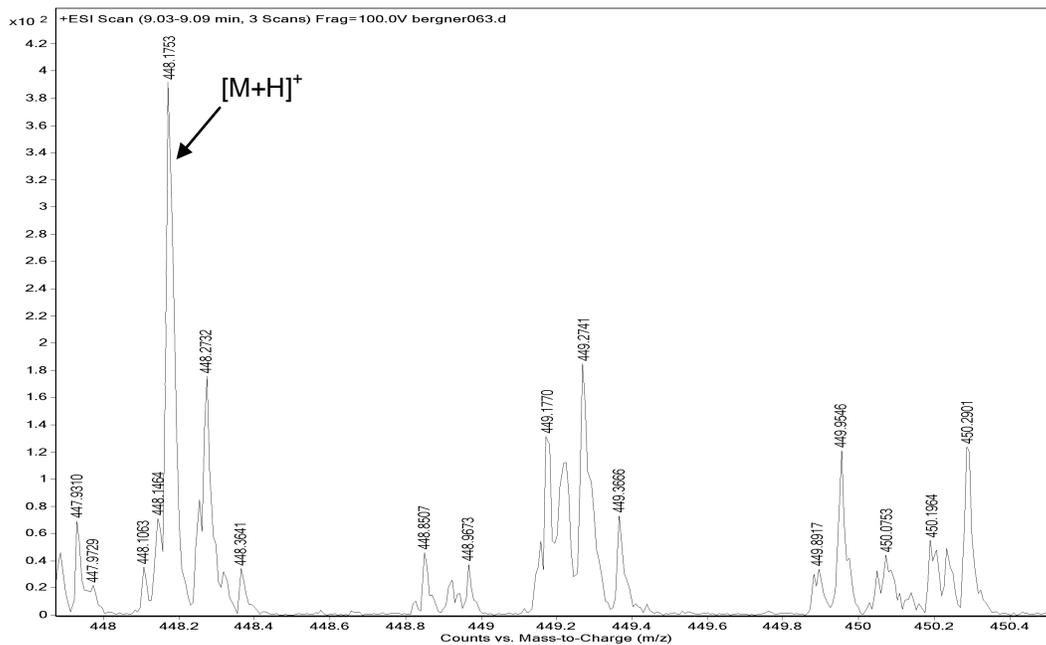
VPD-M3.1



VPD-M3.2



VPD-M3.3



VPD-M3.4

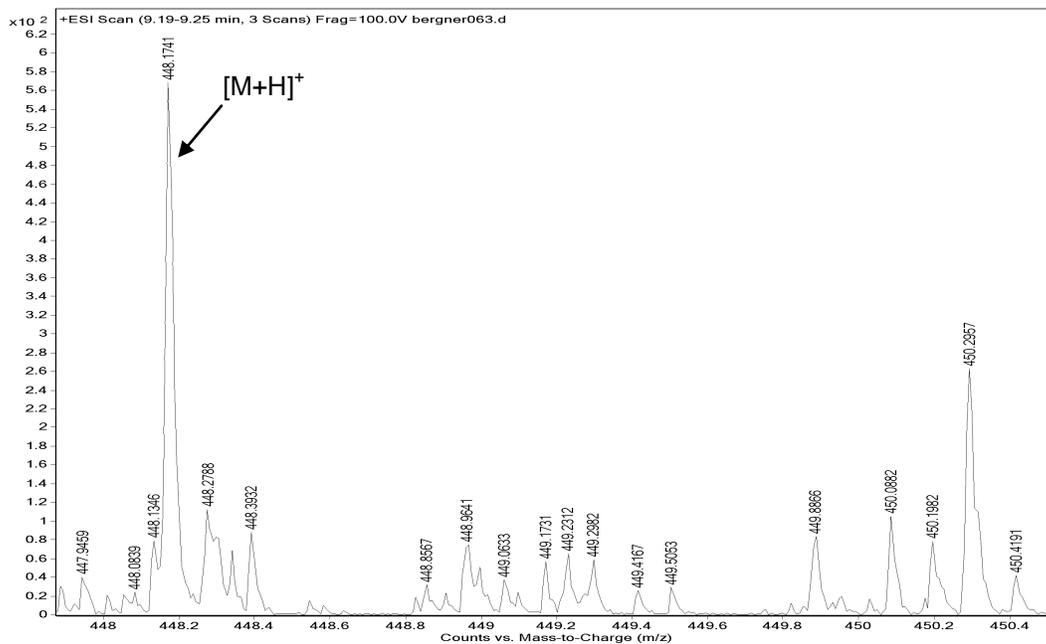


Abbildung 10.72: Massenspektren von VPD-M3.1-M3.4 bei RT 8,64 min, RT 8,79 min, RT 9,06 min RT 9,24 min aus der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 448,1726.

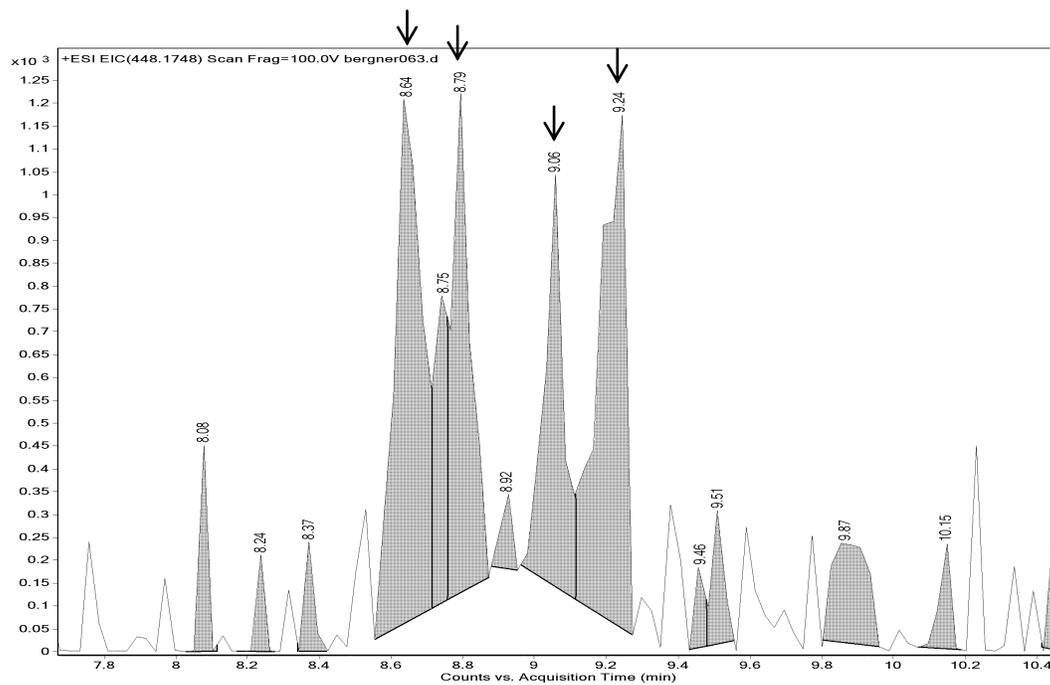
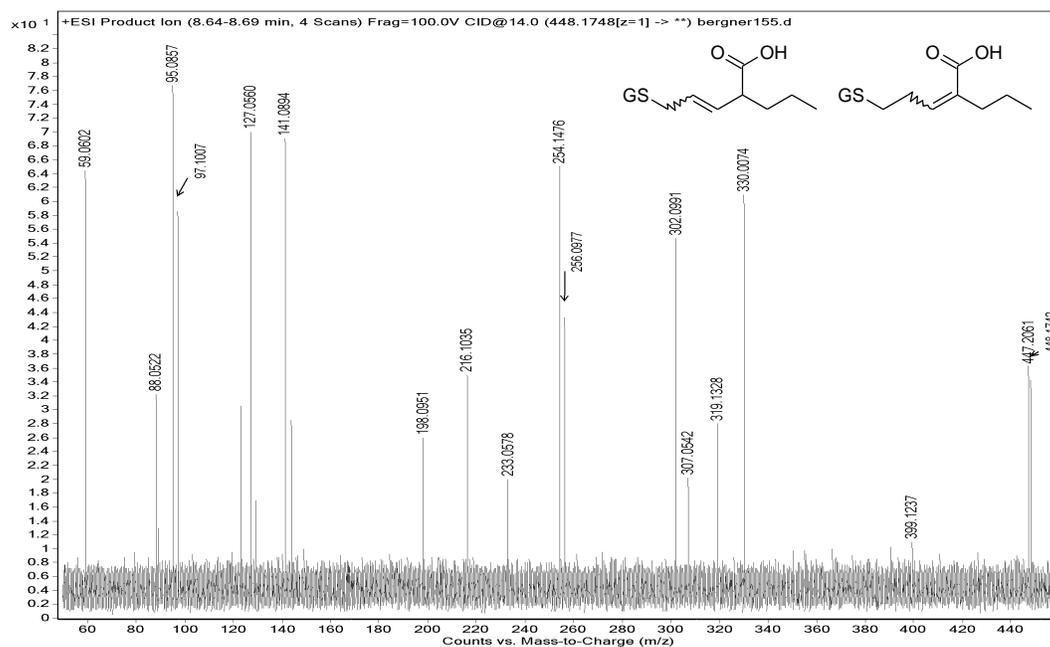
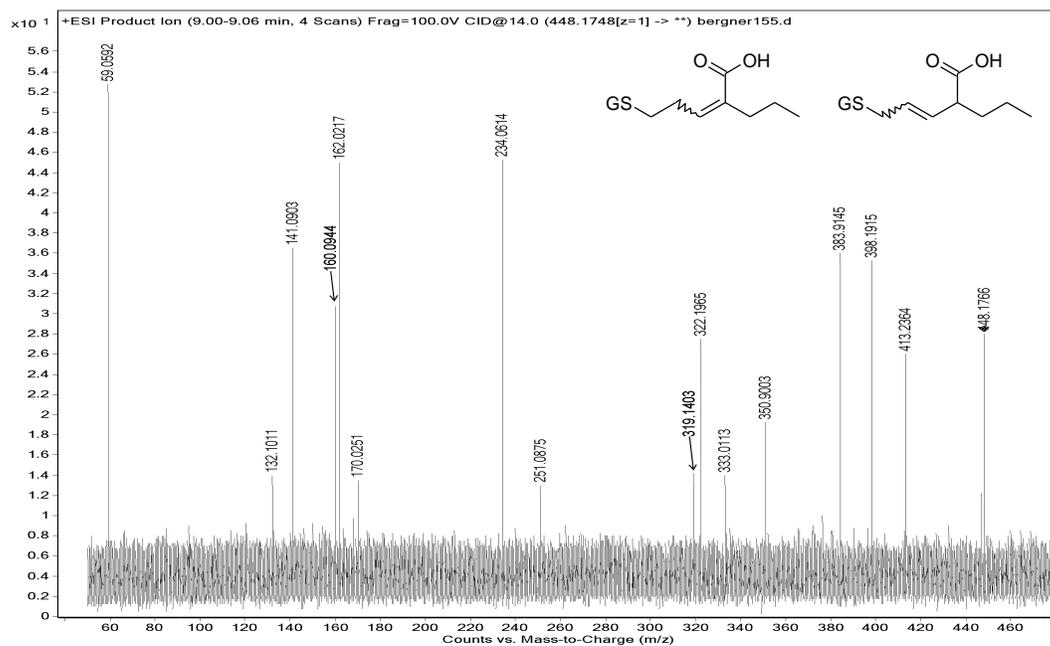


Abbildung 10.73: Massenchromatogramm von VPD-M3 über m/z 448,1748 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten.

VPD-M3.1



VPD-M3.2



VPD-M3.4

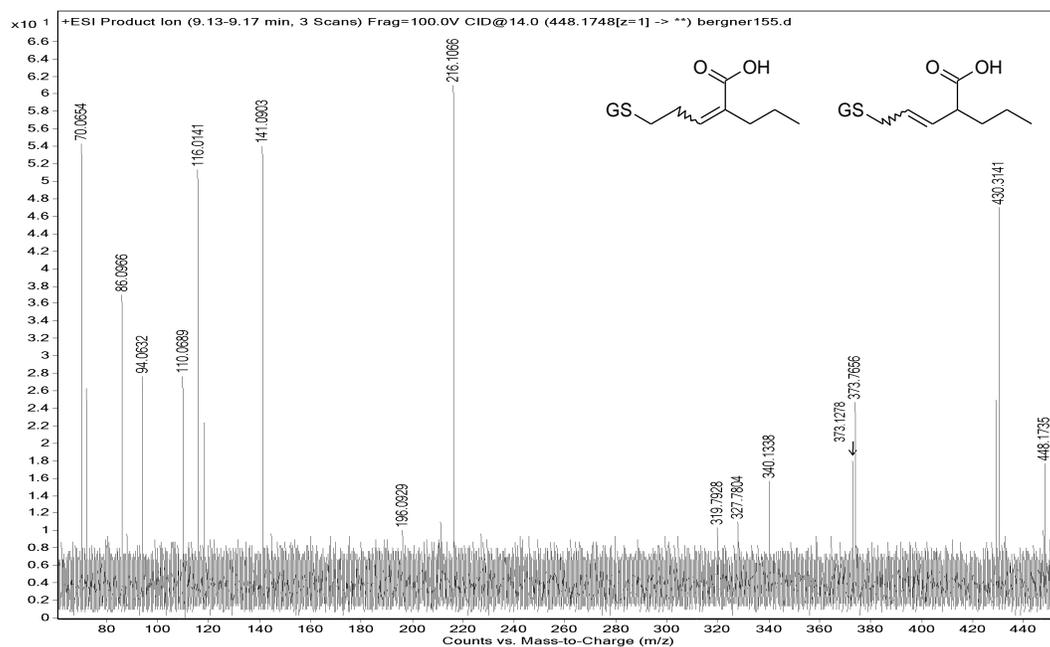


Abbildung 10.74: MS/MS-Spektren von VPD-M3.1, M3.2 und M3.4. $[M+H]^+$: m/z 448,1742. Fragment 1: m/z 319,1328, Fragment 2: m/z 216,1035, Fragment 3: m/z 141,0894, Fragment 4: m/z 95,0857. Von VPD-M3.3 liegt kein MS/MS-Spektrum vor.

VPD-M4

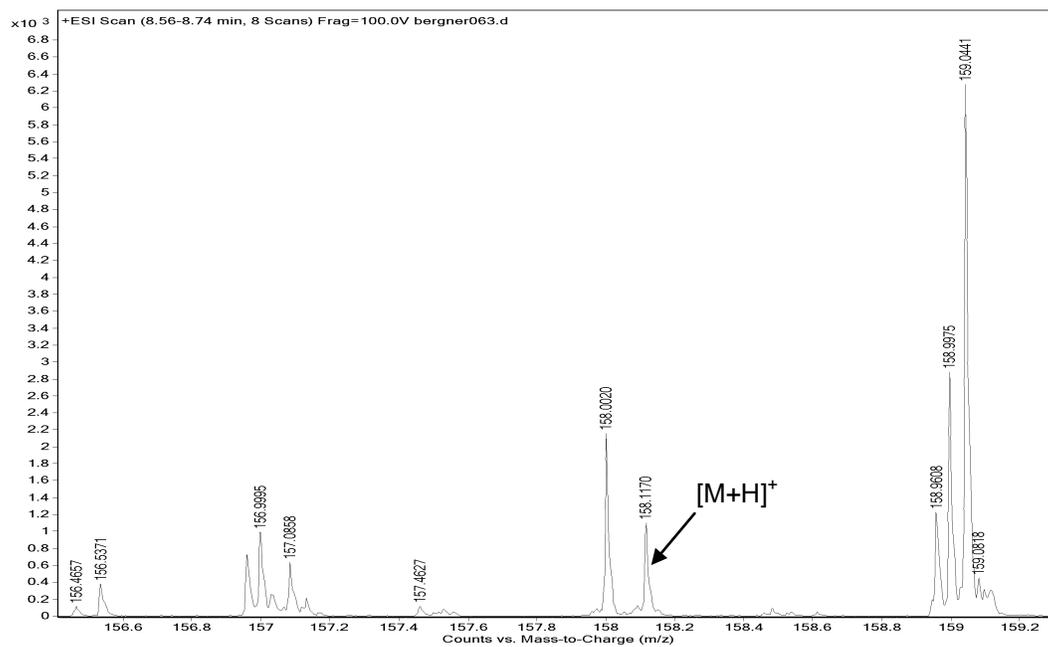


Abbildung 10.75: Massenspektrum von VPD-M4 bei RT 8,66 min aus der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten. [M+H]⁺: m/z 158,1170.

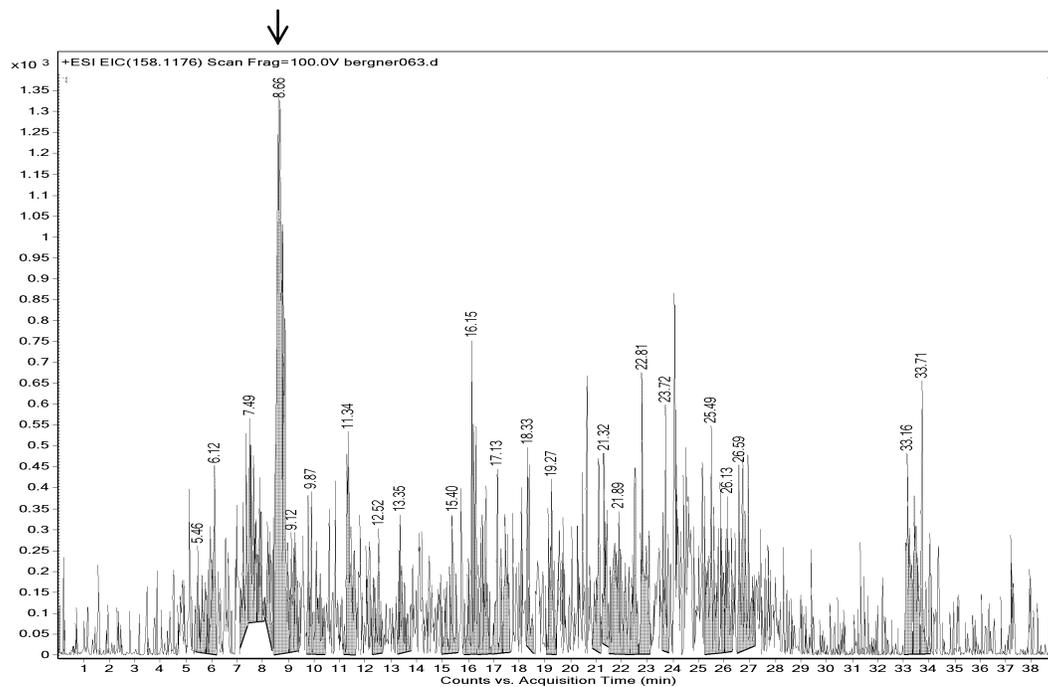


Abbildung 10.76: Massenchromatogramm von VPD-M4 über m/z 158,1176 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten.

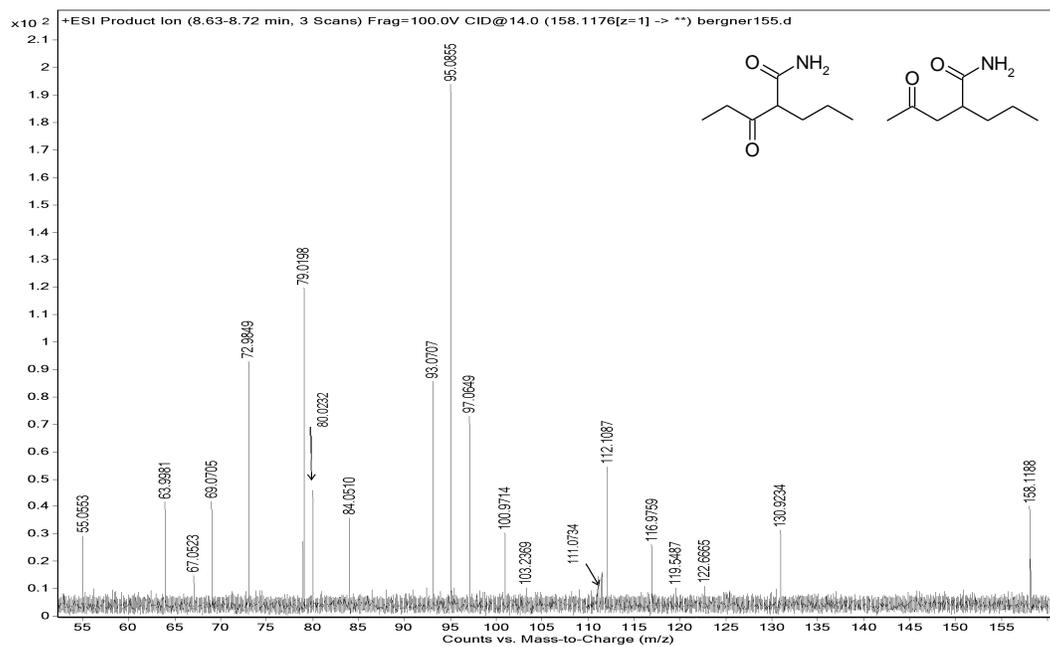


Abbildung 10.77: MS/MS-Spektrum von VPD-M4. $[M+H]^+$: m/z 158,1188. Fragment 1: m/z 112,1087, Fragment 2: m/z 95,0855, Fragment 3: m/z 55,0553.

VPD-M5

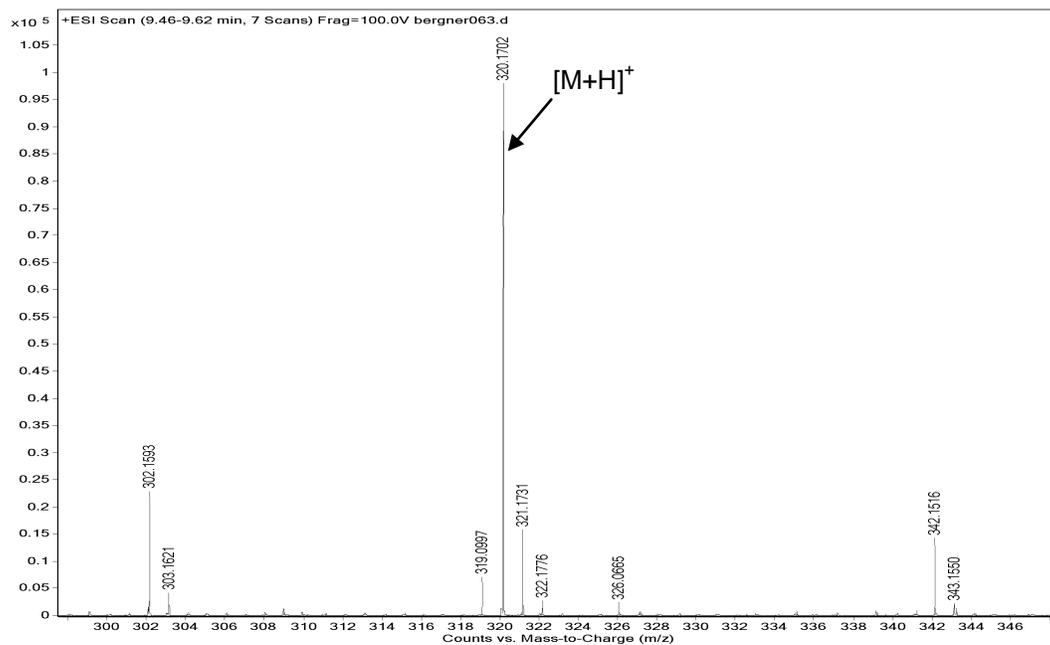


Abbildung 10.78: Massenspektrum von VPD-M5 bei RT 9,47 min aus der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 320,1702.

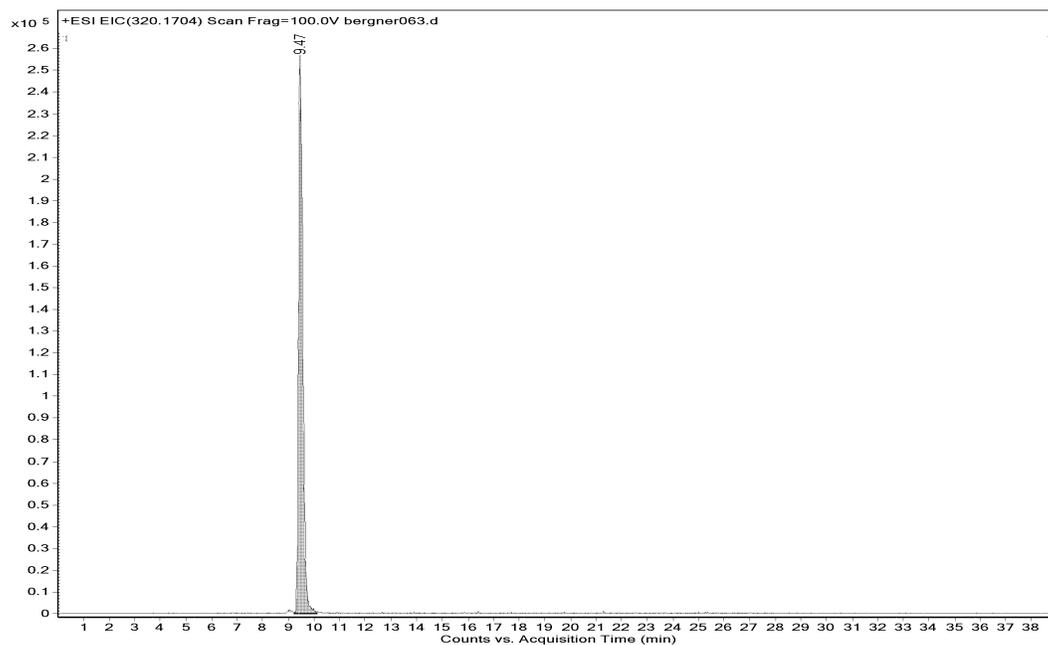


Abbildung 10.79: Massenchromatogramm von VPD-M5 über m/z 320,1704 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten.

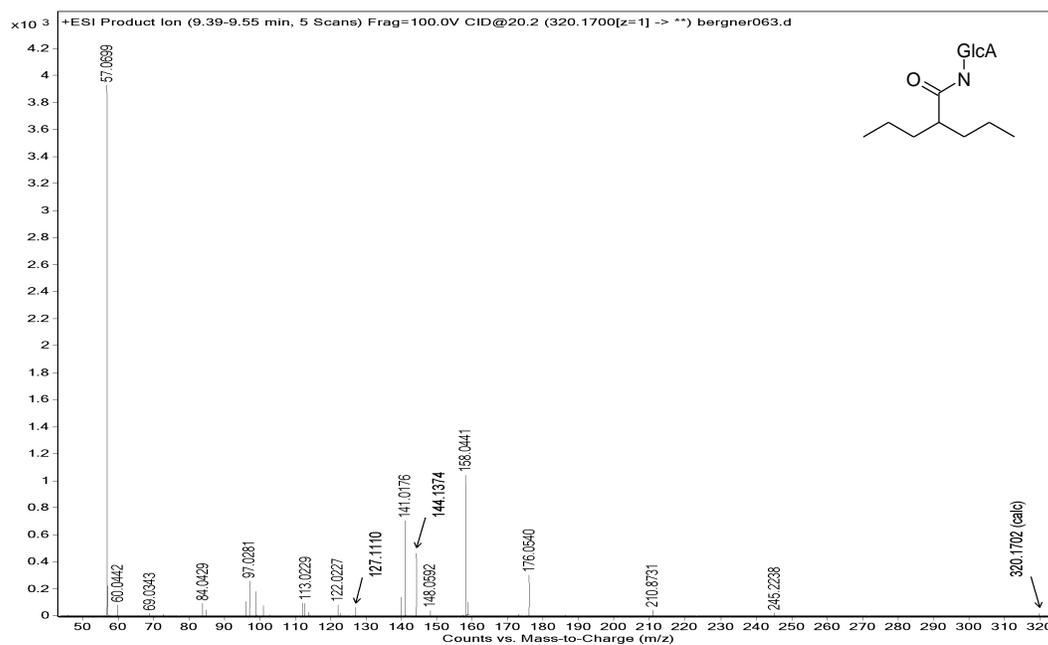
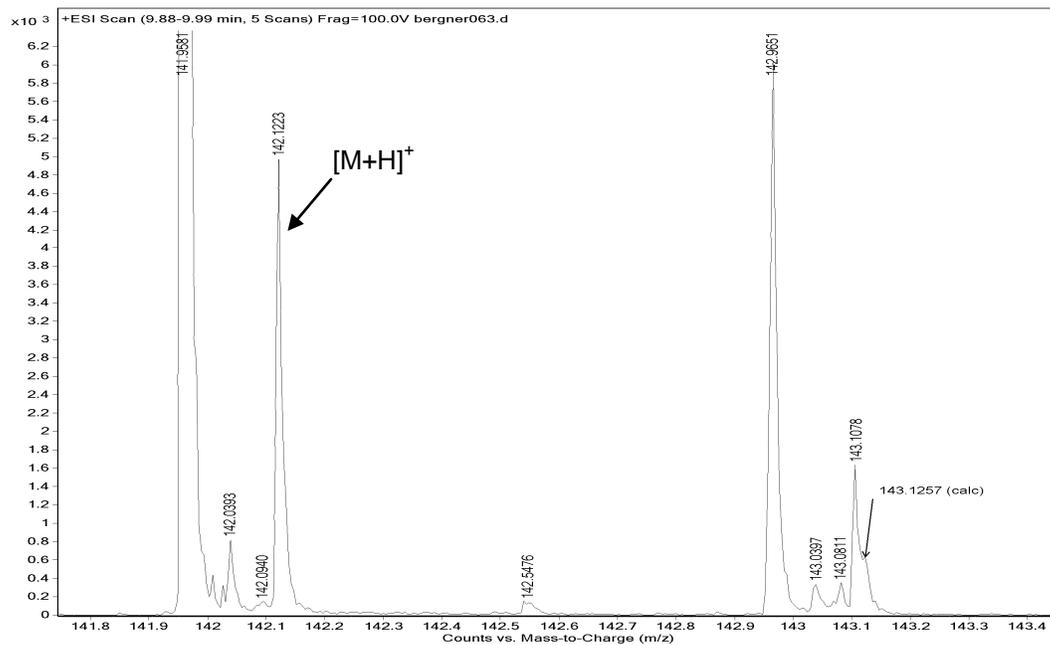


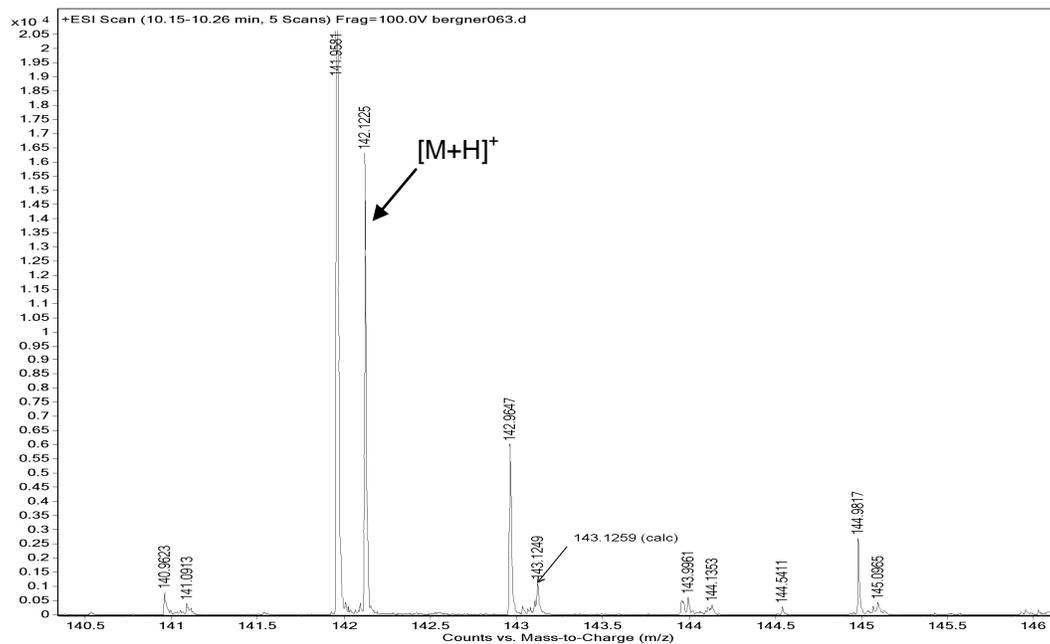
Abbildung 10.80: MS/MS-Spektrum von VPD-M5. $[M+H]^+$: m/z 320,1702. Fragment 1: m/z 144,1374, Fragment 2: m/z 57,0699.

VPD-M6

VPD-M6.1



VPD-M6.2



VPD-M6.3

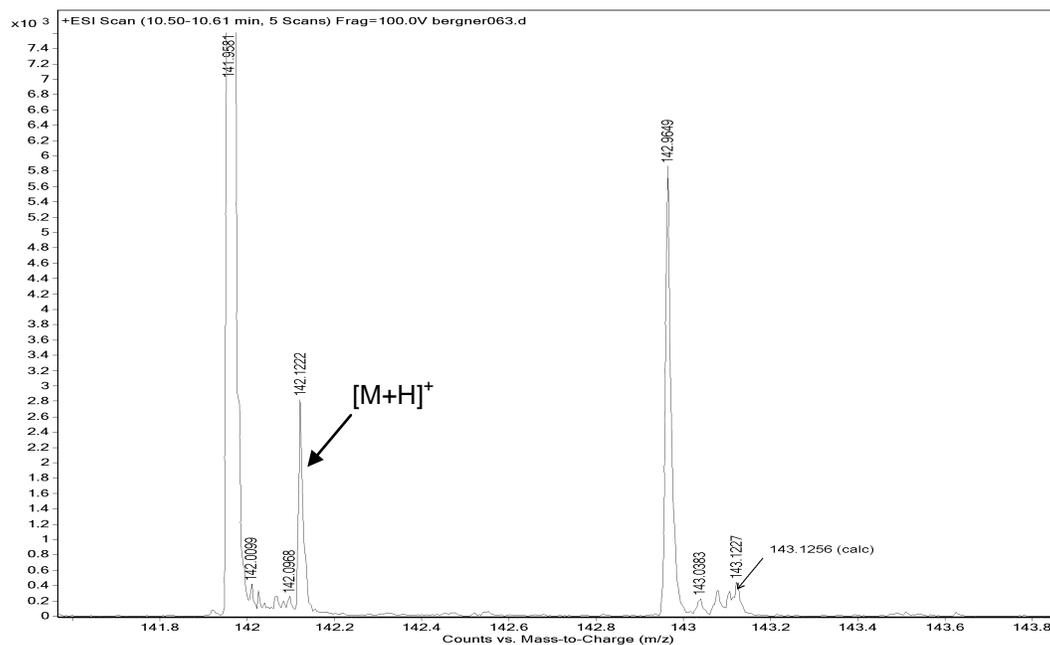


Abbildung 10.81: Massenspektren von VPD-M6.1-M6.3 bei RT 9,94 min, RT 10,21, RT 10,54 min aus der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten. [M+H]⁺: m/z 142,1223.

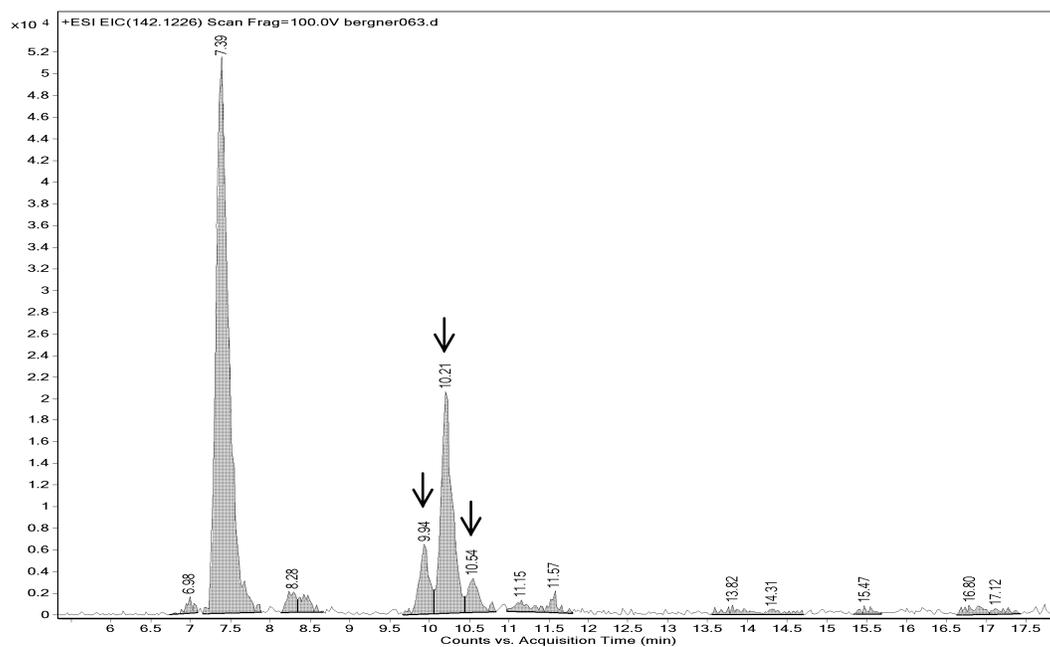
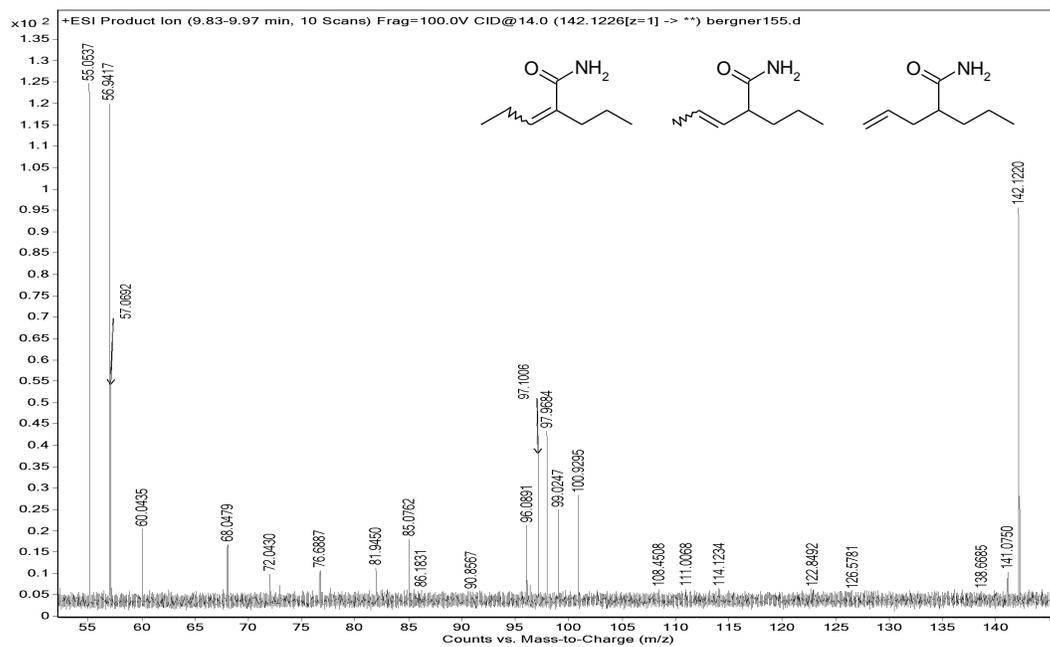
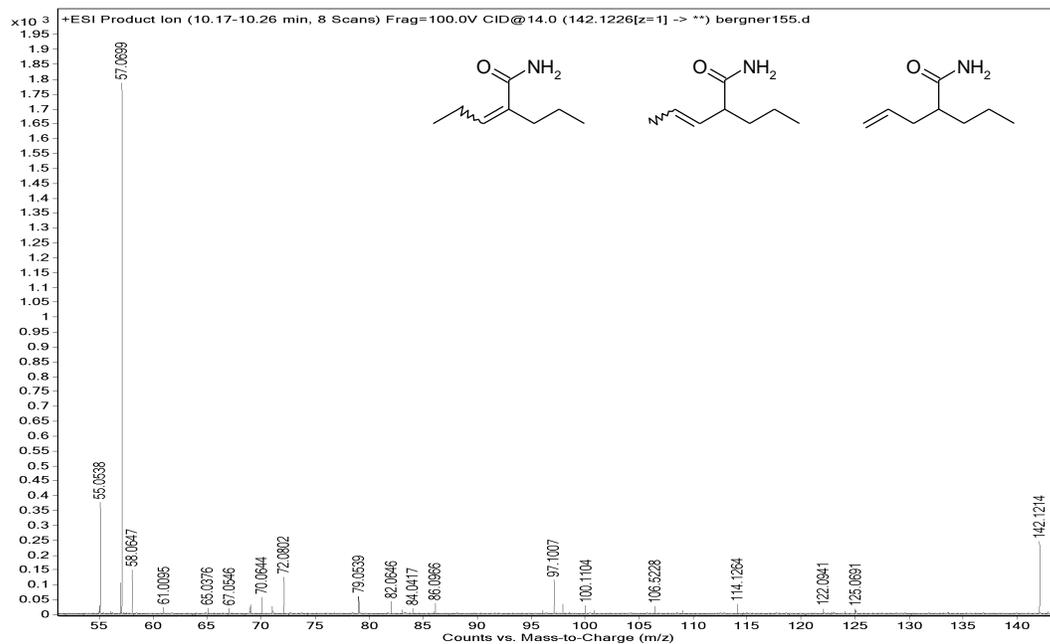


Abbildung 10.82: Massenchromatogramm von VPD-M6 über m/z 142,1226 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten. Bei dem Signal bei RT 7,39 min handelt es sich um eine „in-source-Wasserabspaltung“ von VPD-M1.2 (vgl. Massenspektrum M1.2).

VPD-M6.1



VPD-M6.2



VPD-M6.3

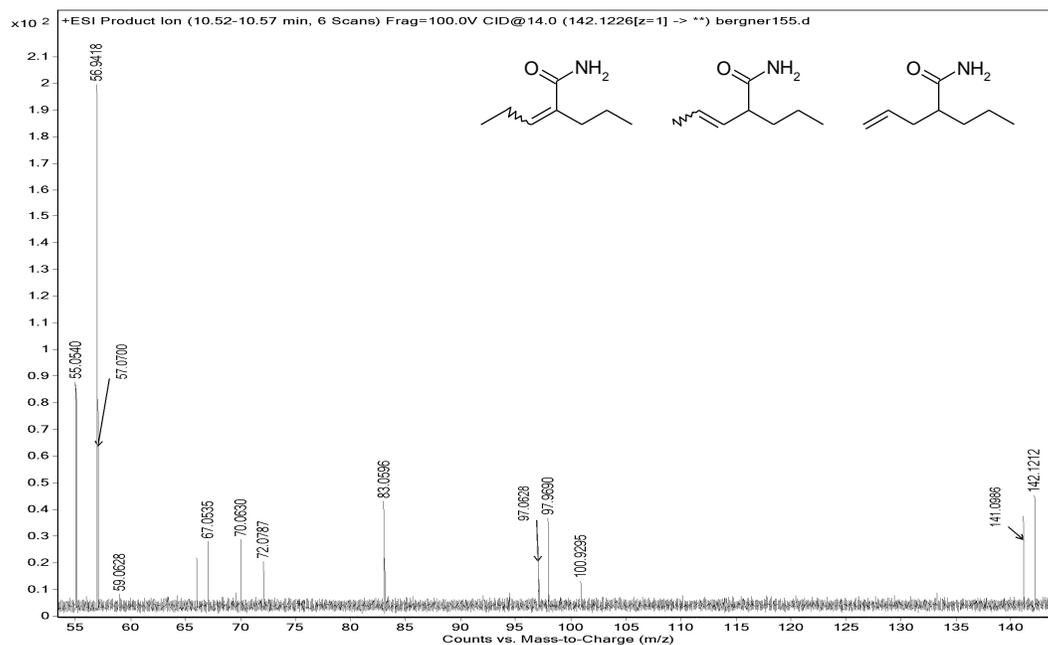


Abbildung 10.83: MS/MS-Spektren von VPD-M6.1, M6.2 und M6.3. $[M+H]^+$: m/z 142,1220. Fragment 1: m/z 125,0940, Fragment 2: m/z 97,1009, Fragment 3: m/z 57,0702, Fragment 4: m/z 55,0538.

VPD-M7

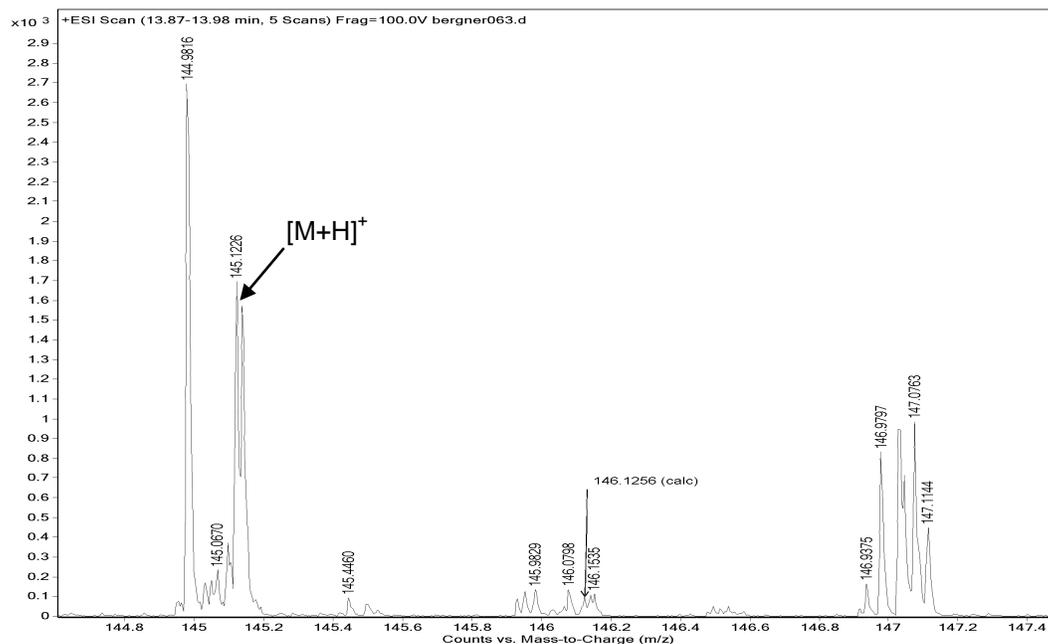


Abbildung 10.84: Massenspektrum von VPD-M7 bei RT 13,91 min aus der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 145,1226.

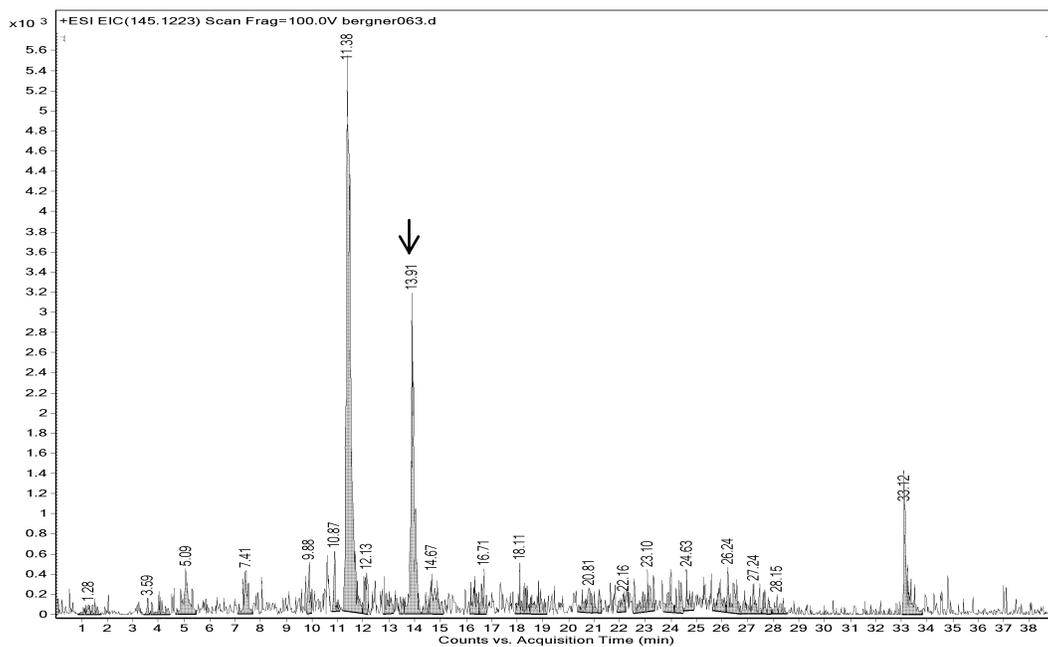


Abbildung 10.85: Massenchromatogramm von VPD-M7 über m/z 145,1223 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 4 mM VPD in primären Rattenhepatozyten.

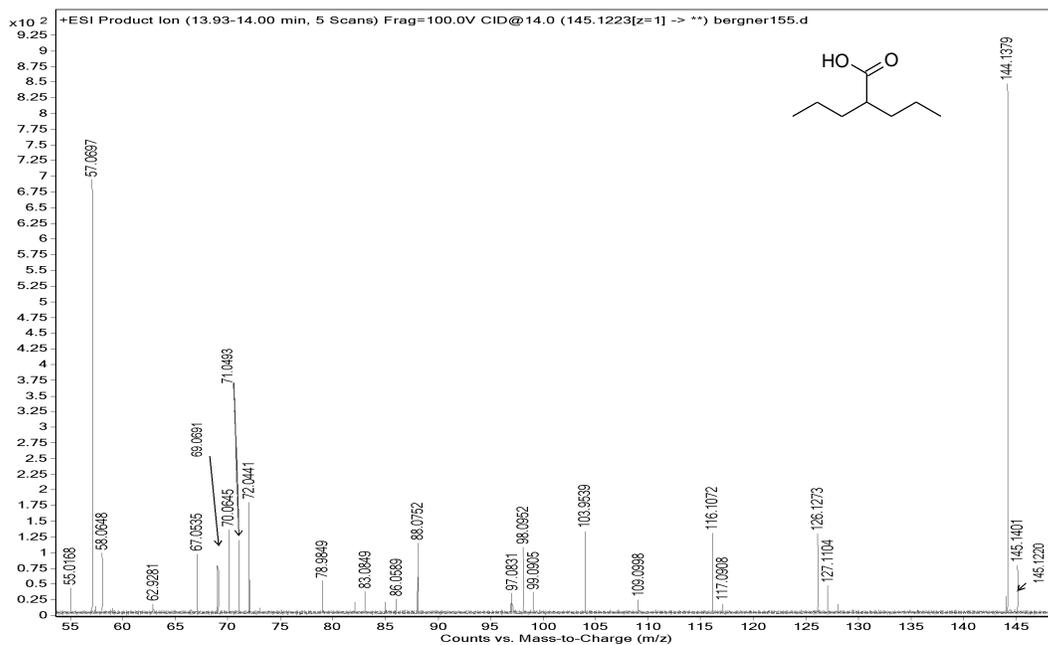


Abbildung 10.86: MS/MS-Spektrum von VPD-M7. $[M+H]^+$: m/z 145,1220. Fragment 1: m/z 127,1104, Fragment 2: m/z 117,0908.

12.1.3.4 2-Acetylaminofluoren

2-AAF wird in Rattenhepatozyten unter basalen Bedingungen für 24 Stunden inkubiert. Die Konzentration beträgt 10 μM . Die Inkubate werden zur Strukturaufklärung der Metaboliten mittels Q-TOF LC/MS analysiert. Im Folgenden sind beispielhaft die Full Scan- und Fragmentierungsspektren sowie die Massenchromatogramme der Analyten aus einem Inkubat abgebildet. Bei Signalen innerhalb der Massenchromatogramme, welche keinem Metaboliten zugeordnet worden sind, kann es sich sowohl um Isotopen- als auch um Matrixpeaks handeln. Die Darstellung der Metaboliten erfolgt nach ihrer Retentionszeit (vgl. Kap. 5.1.6.4). Neben den Inkubaten aus der Hepatozytenkultur wird ein NOH-AAF-Standard unter den gleichen Bedingungen fragmentiert und zur Aufklärung analysierter Metaboliten herangezogen. Bei den Strukturformeln innerhalb der Fragmentierungsspektren handelt es sich um Strukturvorschläge identifizierter Metaboliten.

NOH-AAF

Standard



Abbildung 10.87: MS/MS-Spektrum von NOH-AAF. $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 240,1019. Fragment 1: m/z 197,0833, Fragment 2: m/z 180,0802, Fragment 3: m/z 153,0701.

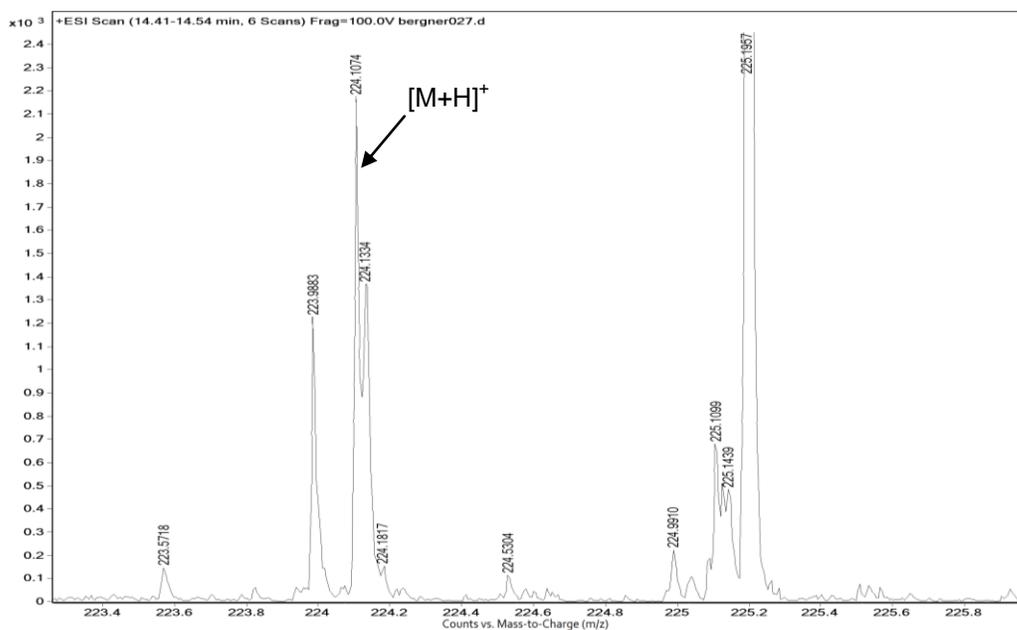
2-AAF

Abbildung 10.88: Massenspektrum von 2-AAF bei RT 14,48 min aus der aktiven Inkubation von 10 μ M 2-AAF in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 224,1074.

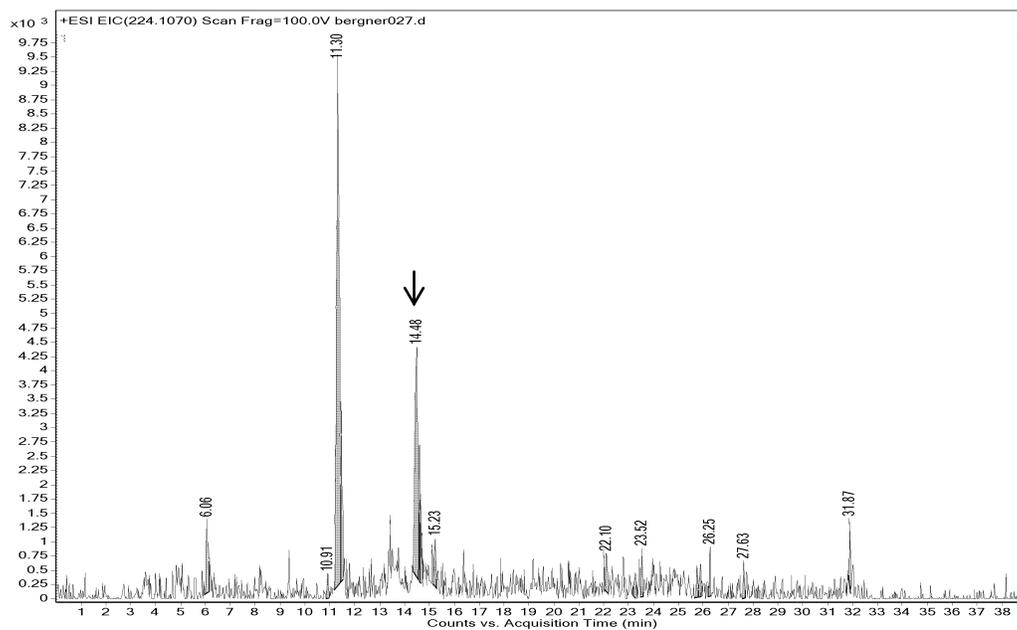


Abbildung 10.89: Massenchromatogramm von 2-AAF über m/z 224,1070 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 10 μ M 2-AAF in primären Rattenhepatozyten.

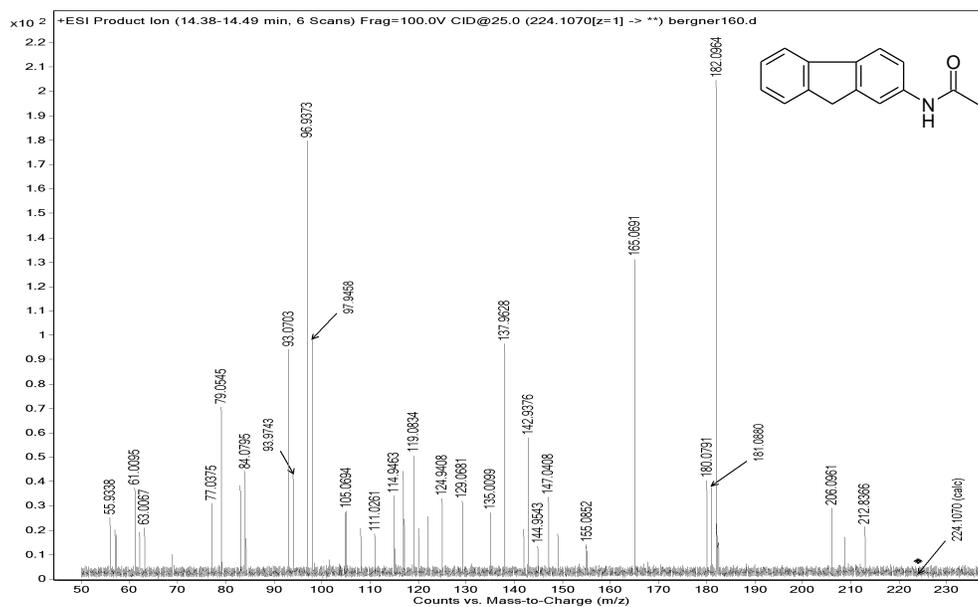
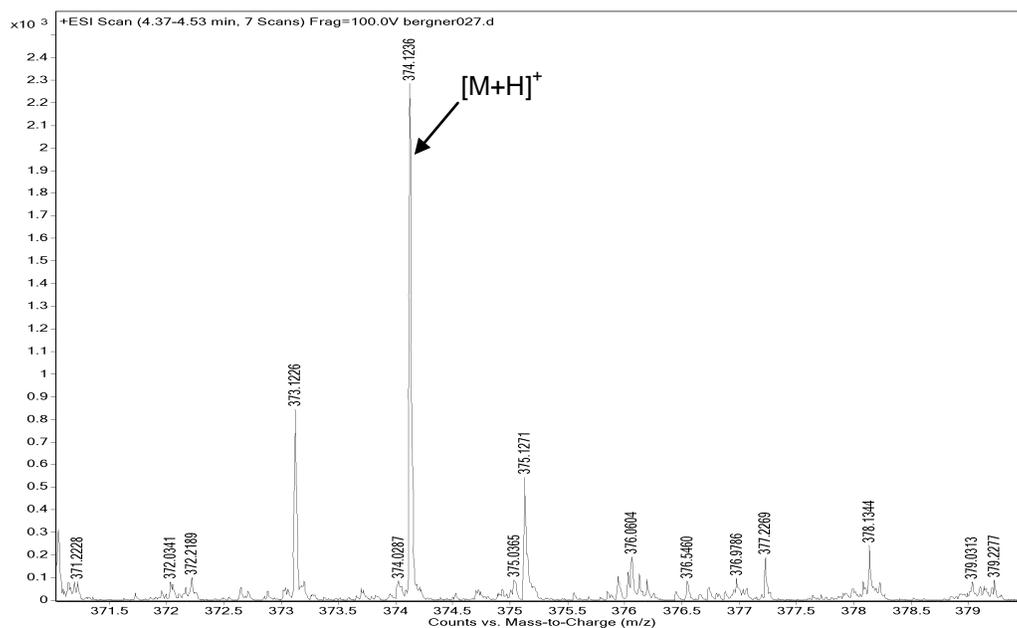


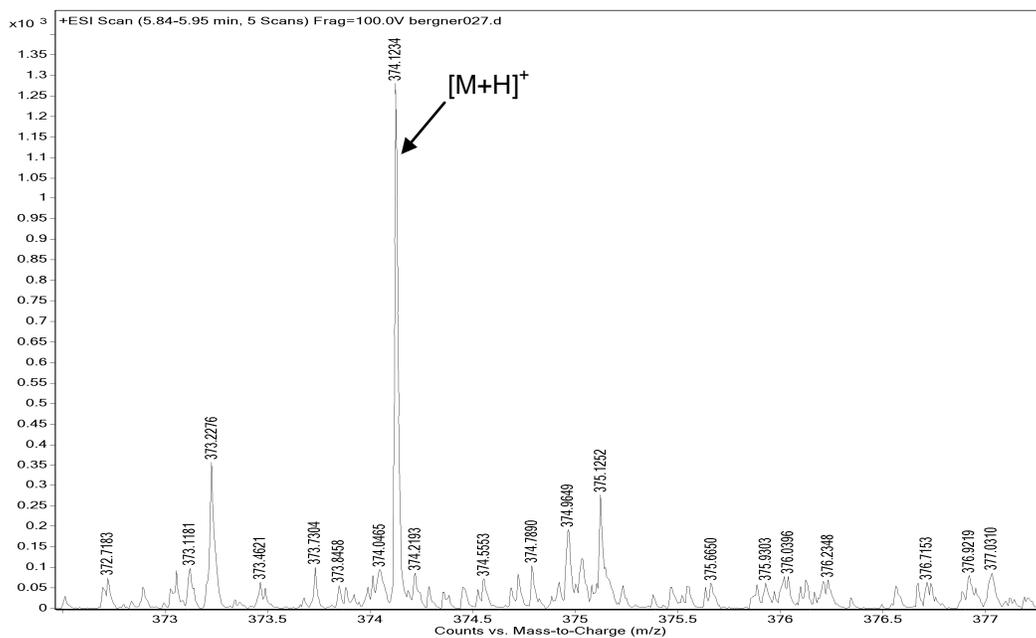
Abbildung 10.90: MS/MS-Spektrum von 2-AAF. $[M+H]^+$: m/z 224,1067 bei RT 11,30 min. Fragment 1: m/z 182,0964, Fragment 2: m/z 181,0880, Fragment 3: m/z 165,0691, Fragment 4: m/z 155,0852.

2-AAF-M1

2-AAF-M1.1



2-AAF-M1.2



2-AAF-M1.3

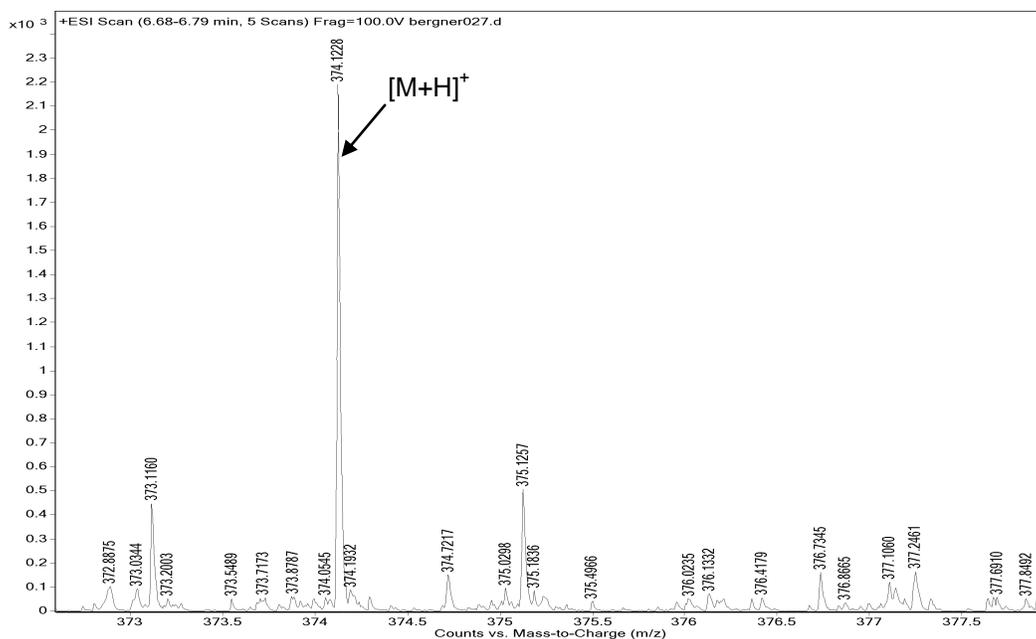


Abbildung 10.91: Massenspektren von 2-AAF-M1.1 - M1.3 bei RT 4,45 min, RT 5,89 min, RT 6,74 min aus der aktiven Inkubation von 10 μ M 2-AAF in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 374,1236.

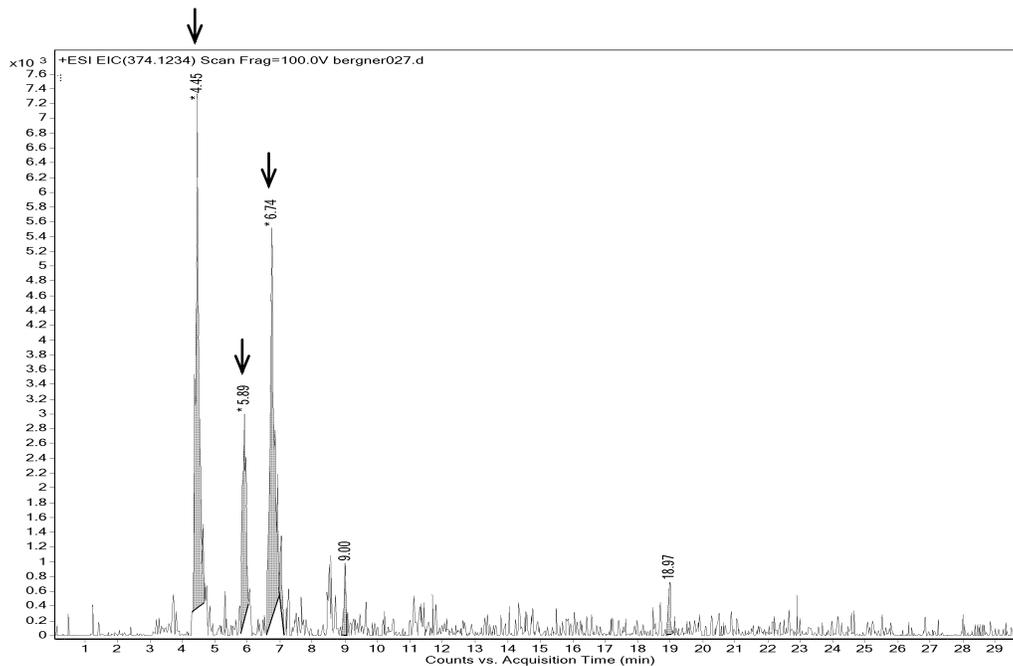


Abbildung 10.92: Massenchromatogramm von 2-AAF-M1 über m/z 374,1234 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 10 μM 2-AAF in primären Rattenhepatozyten.

2-AAF-M1.1

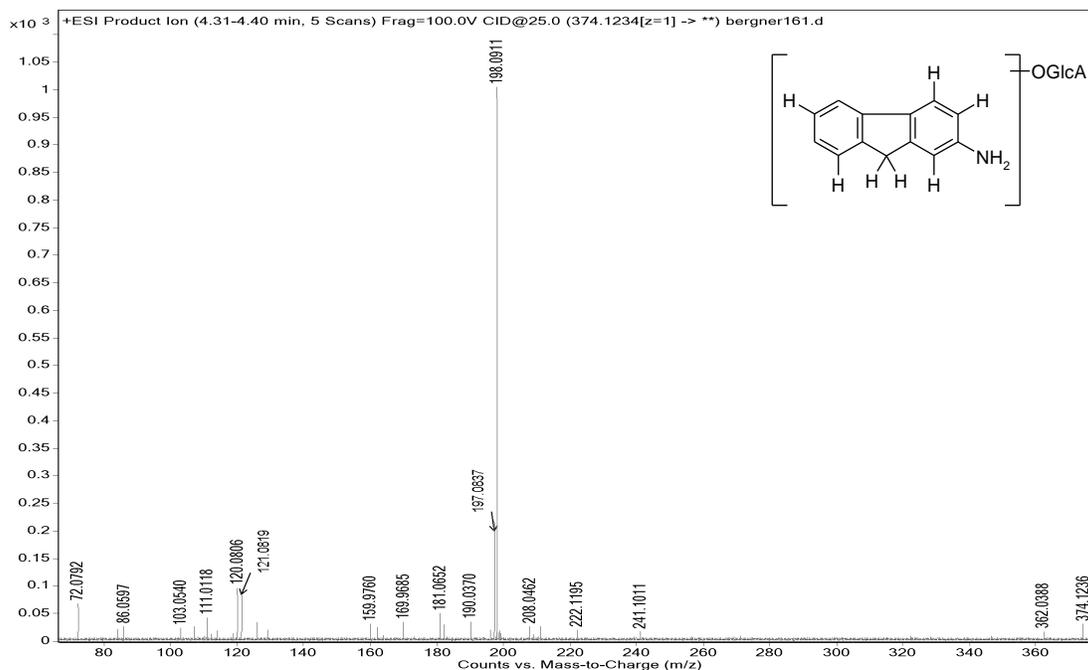


Abbildung 10.93: MS/MS-Spektren von 2-AAF-M1.1. $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 374,1236. Fragment 1: m/z 198,0911, Fragment 2: m/z 197,0837, Fragment 3: m/z 181,0652.

2-AAF-M1.2

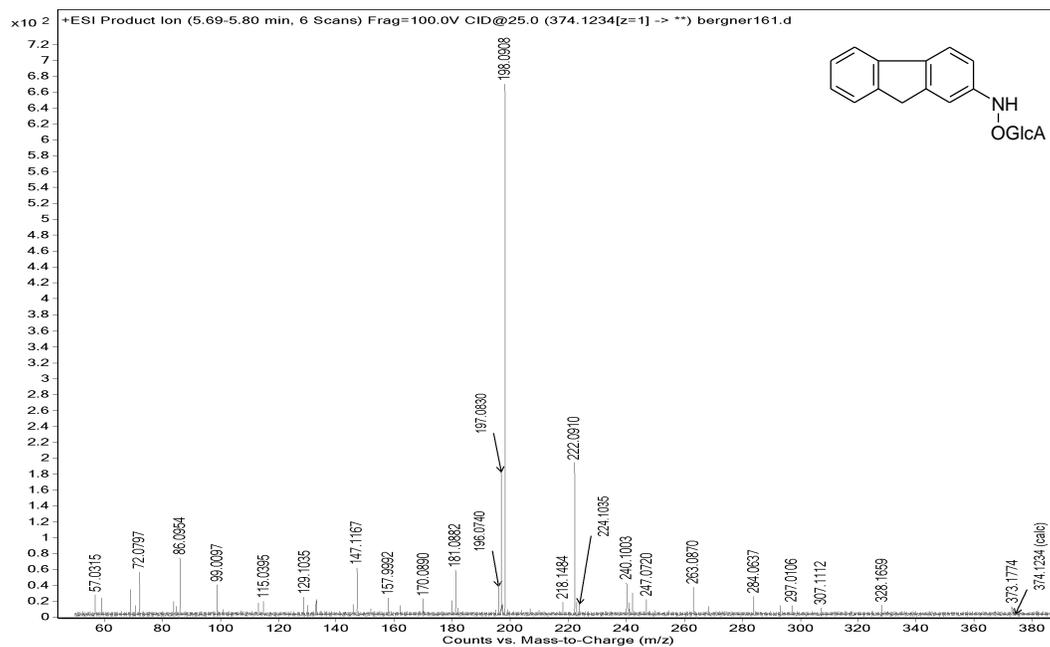


Abbildung 10.94: MS/MS-Spektren von 2-AAF-M1.2. $[M+H]^+$: m/z 374,1234. Fragment 1: m/z 198,0908, Fragment 2: m/z 181,0882.

2-AAF-M1.3

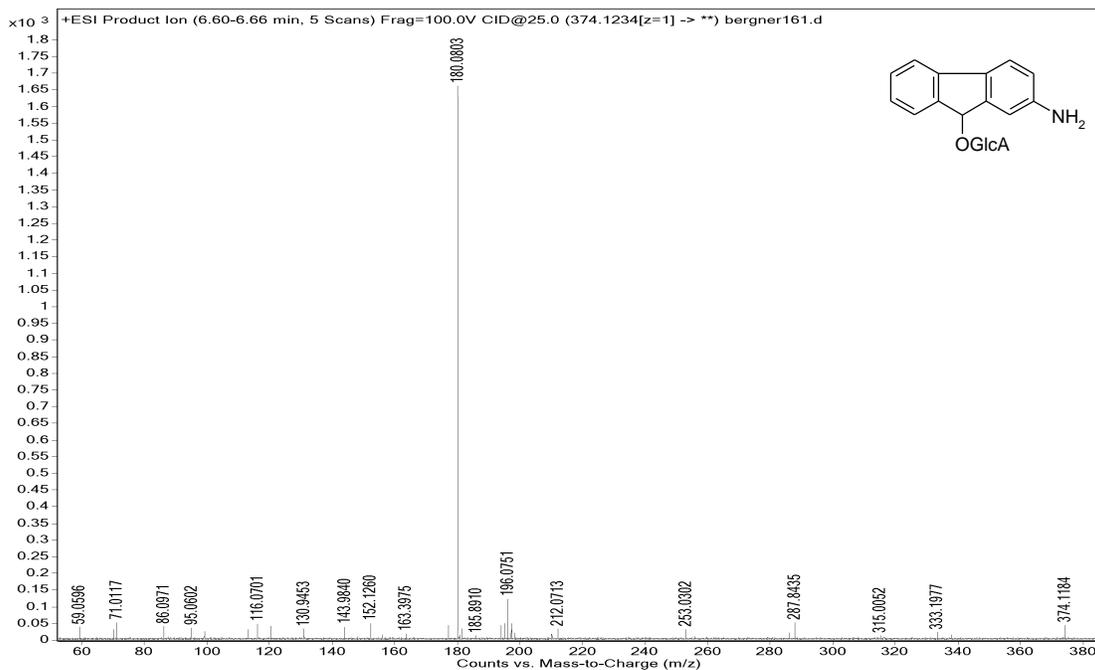
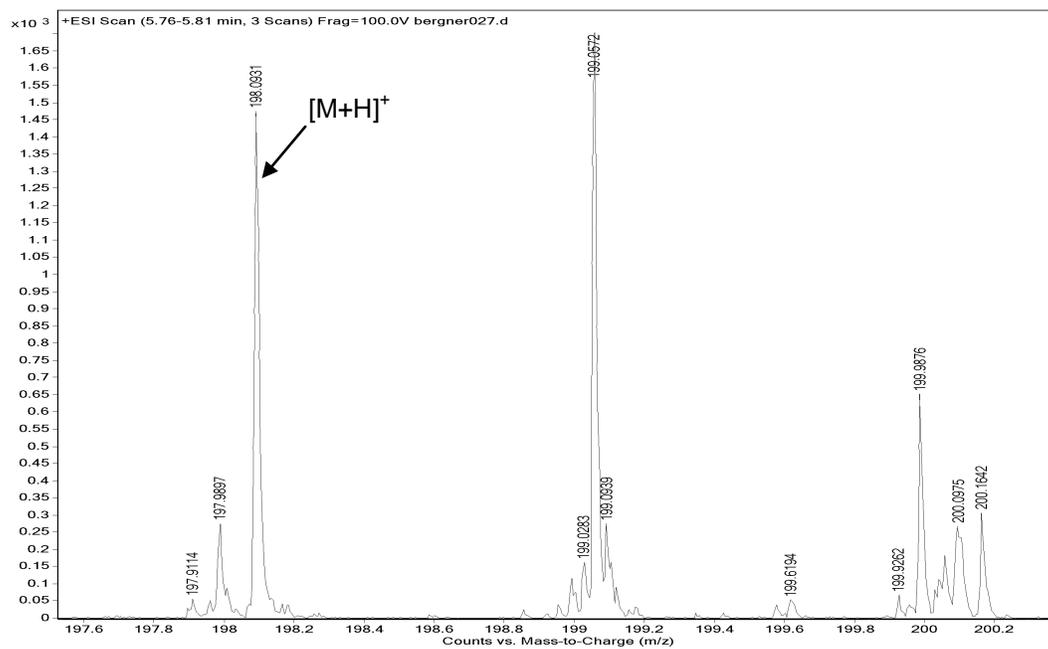


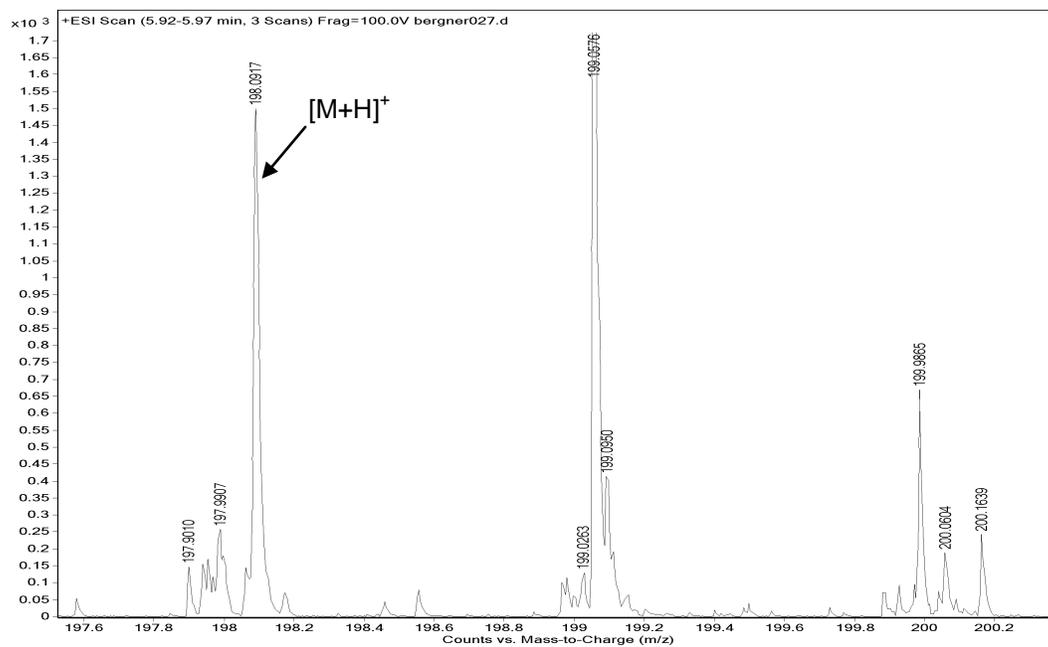
Abbildung 10.95: MS/MS-Spektren von 2-AAF-M1.3. $[M+H]^+$: m/z 374,1236. Fragment 1: m/z 198,0836, Fragment 2: m/z 180,0802.

2-AAF-M2

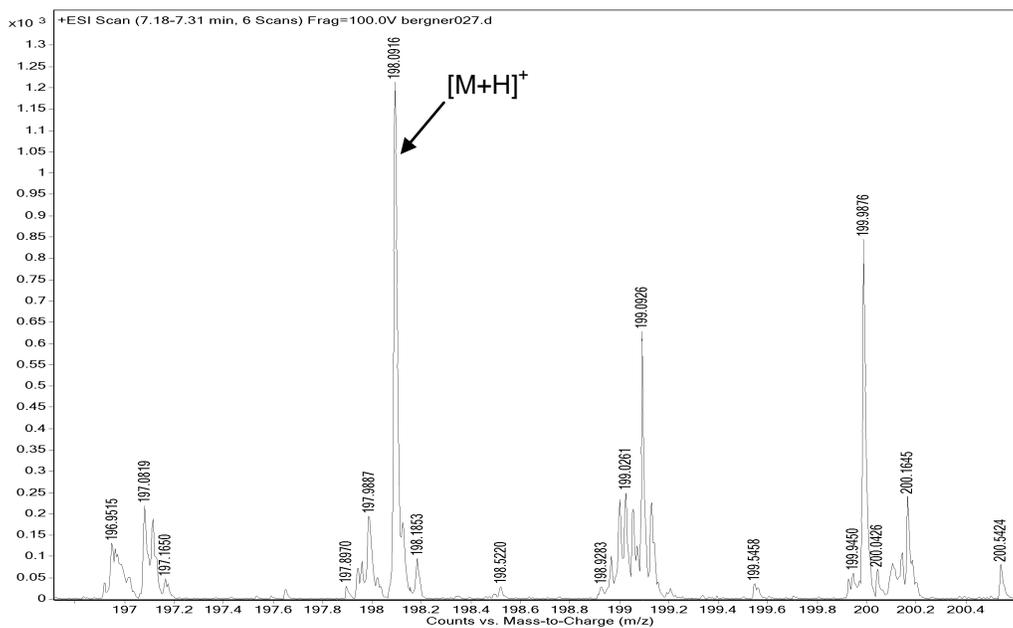
2-AAF-M2.1



2-AAF-M2.2



2-AAF-M2.3



2-AAF-M2.4

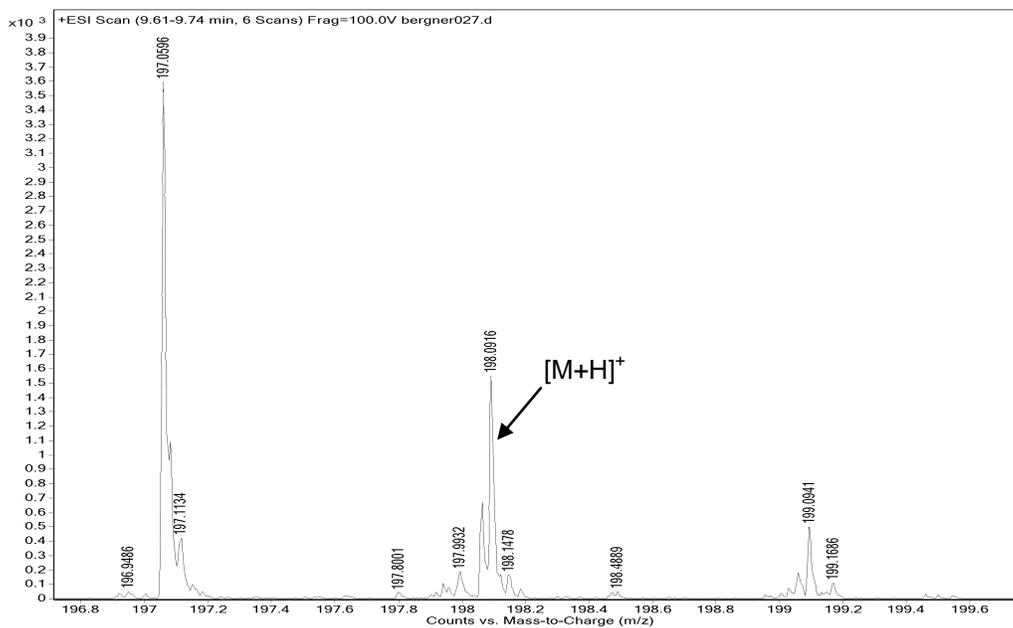


Abbildung 10.96: Massenspektren von 2-AAF-M2.1 - M2.4 bei RT 5,82 min, RT 5,93 min, RT 7,26 min, RT 9,66 min aus der aktiven Inkubation von 10 μ M 2-AAF in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 198,0916.

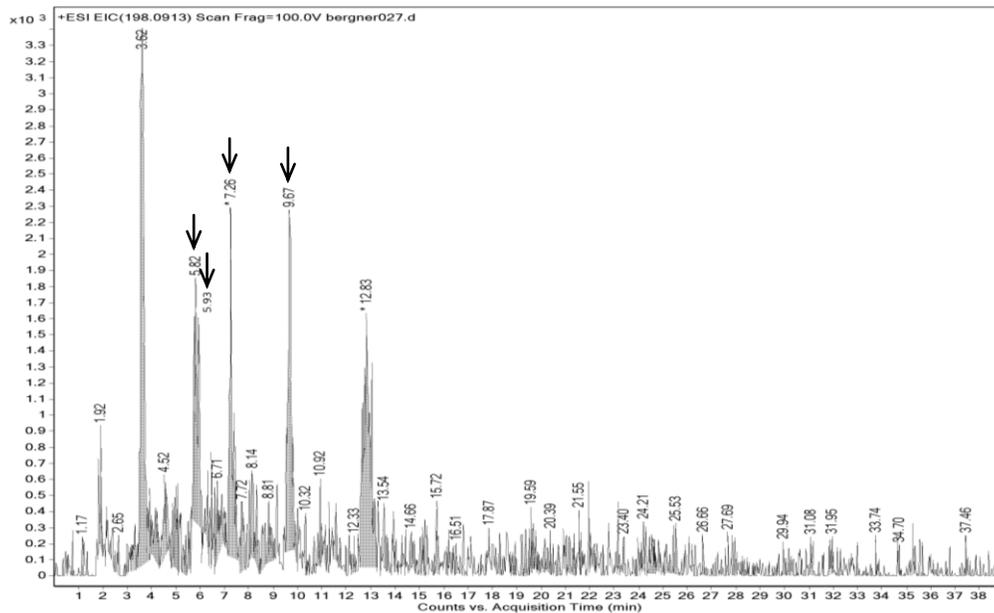


Abbildung 10.97: Massenchromatogramm von 2-AAF-M2 über m/z 198,0913 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 10 μM 2-AAF in primären Rattenhepatozyten.

2-AAF-M2.1

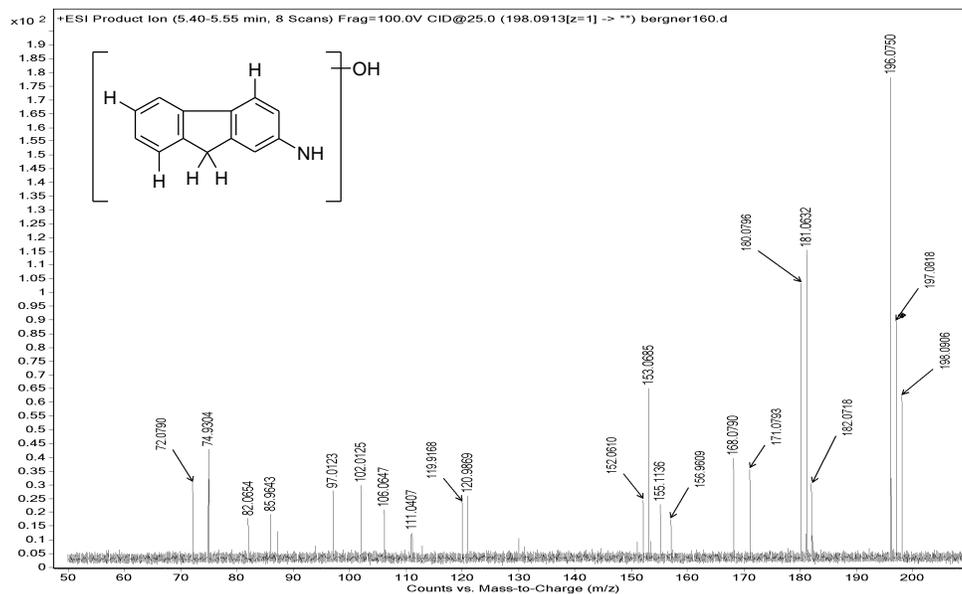


Abbildung 10.98: MS/MS-Spektren von 2-AAF-M2.1. $[M+H]^+$: m/z 198,0916. Fragment 1: m/z 196,0750, Fragment 2: m/z 181,0632, Fragment 3: m/z 180,0796, Fragment 4: m/z 153,0685.

2-AAF-M2.2

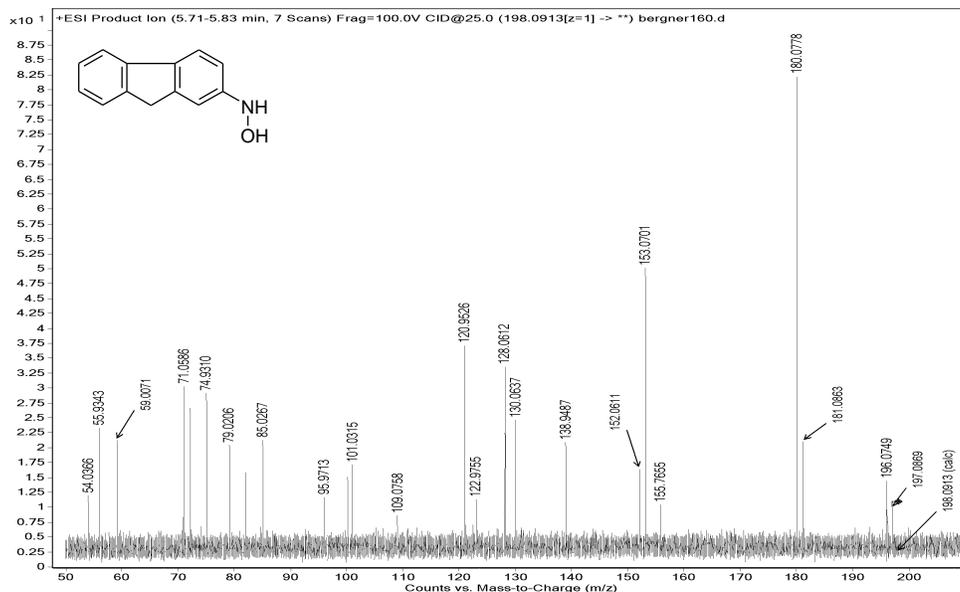


Abbildung 10.99: MS/MS-Spektren von 2-AAF-M2.2. $[M+H]^+$: m/z 198,0913. Fragment 1: m/z 181,0863, Fragment 2: m/z 180,0778, Fragment 3: m/z 153,0701.

2-AAF-M2.3

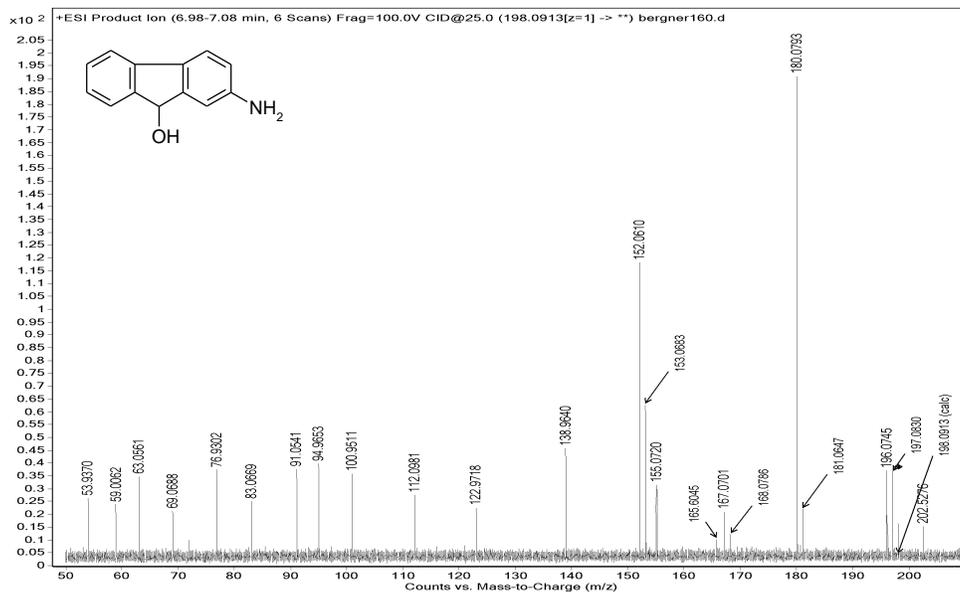
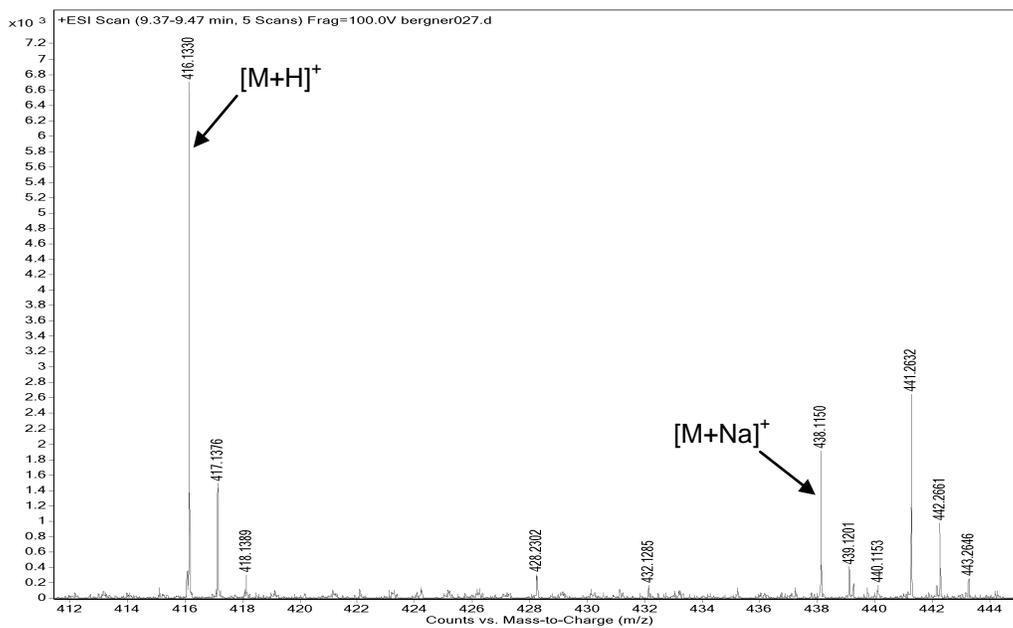
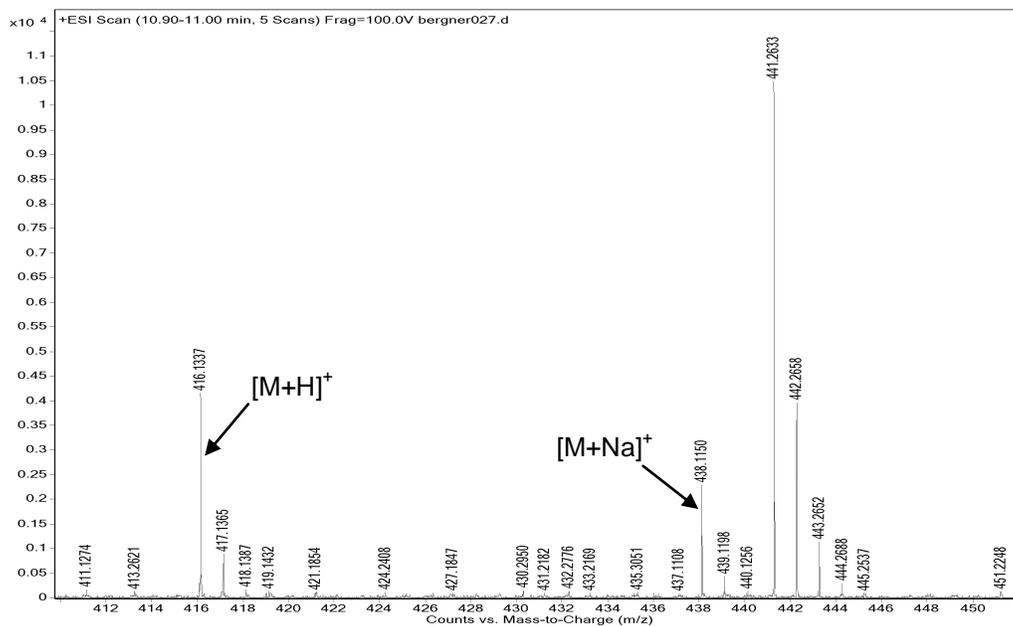


Abbildung 10.100: MS/MS-Spektren von 2-AAF-M2.3. $[M+H]^+$: m/z 198,0913. Fragment 1: m/z 181,0847, Fragment 2: m/z 180,0793, Fragment 3: m/z 167,0701, Fragment 4: m/z 153,0683.

2-AAF-M3.2



2-AAF-M3.3



2-AAF-M3.4

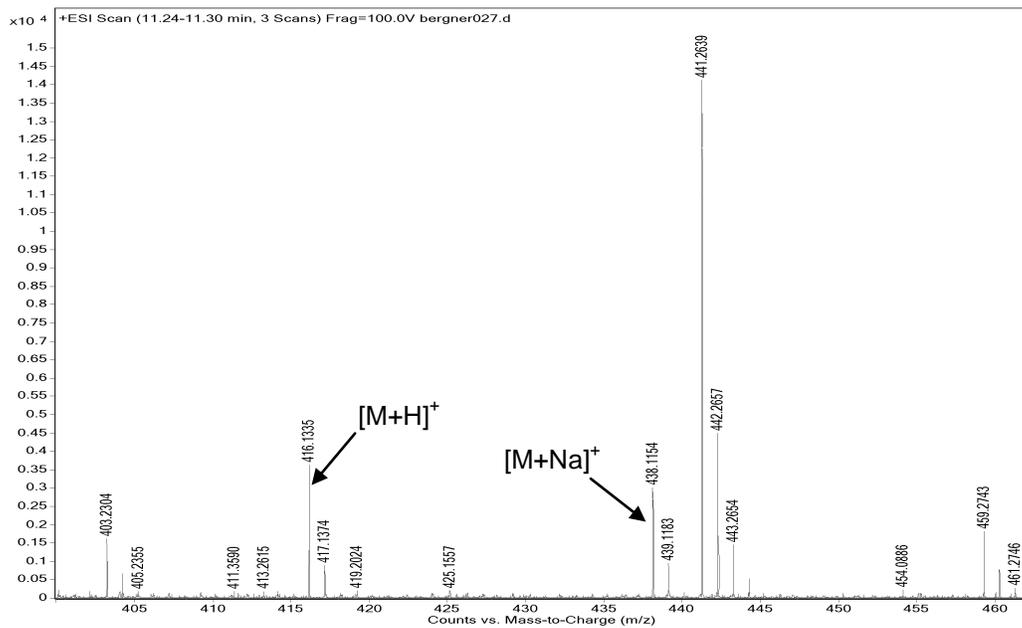


Abbildung 10.102: Massenspektren von 2-AAF-M3.1 - M3.4 bei RT 8,38 min, RT 9,40 min, RT 10,97 min, RT 11,26 min aus der aktiven Inkubation von 10 μ M 2-AAF in primären Rattenhepatozyten. $[M+H]^+$: m/z 416,1334, $[M+Na]^+$: m/z 438,1154.

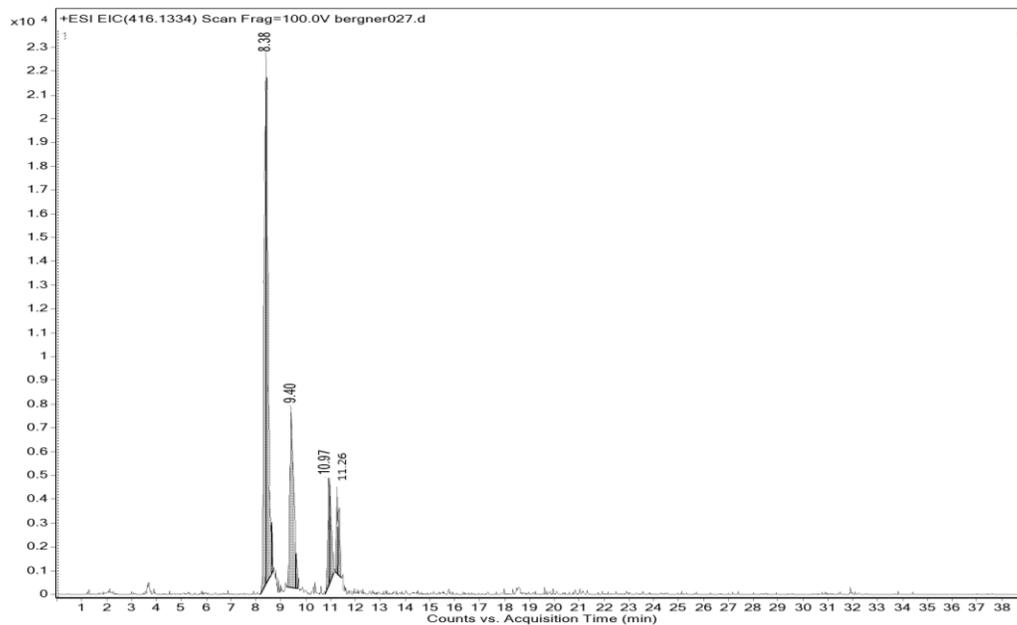


Abbildung 10.103: Massenchromatogramm von 2-AAF-M3 über m/z 416,1334 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 10 μ M 2-AAF in primären Rattenhepatozyten.

2-AAF-M3.1

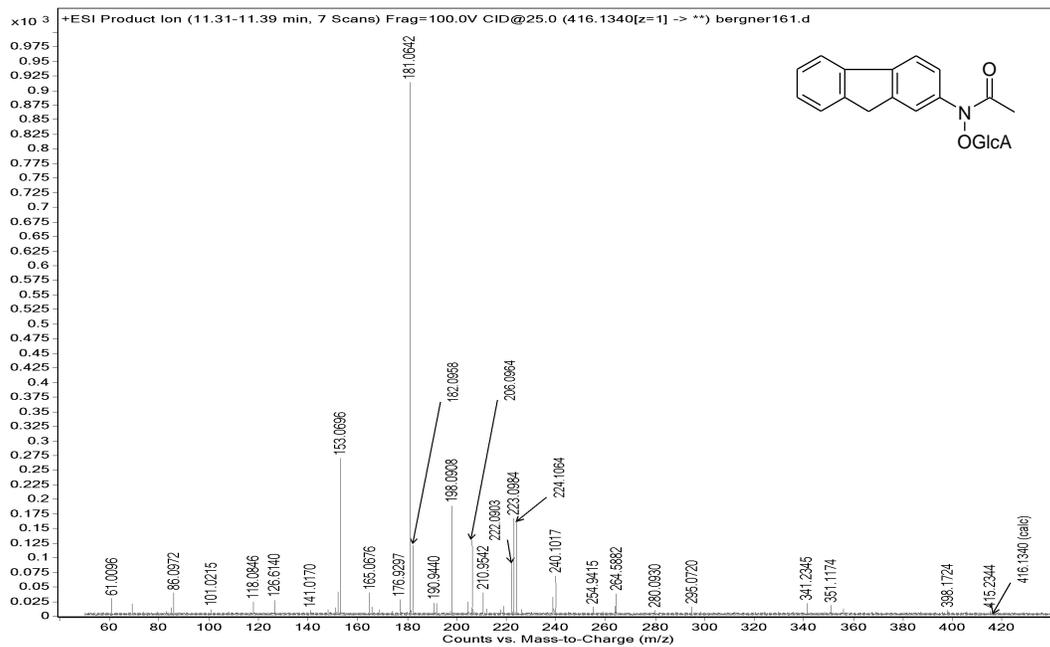
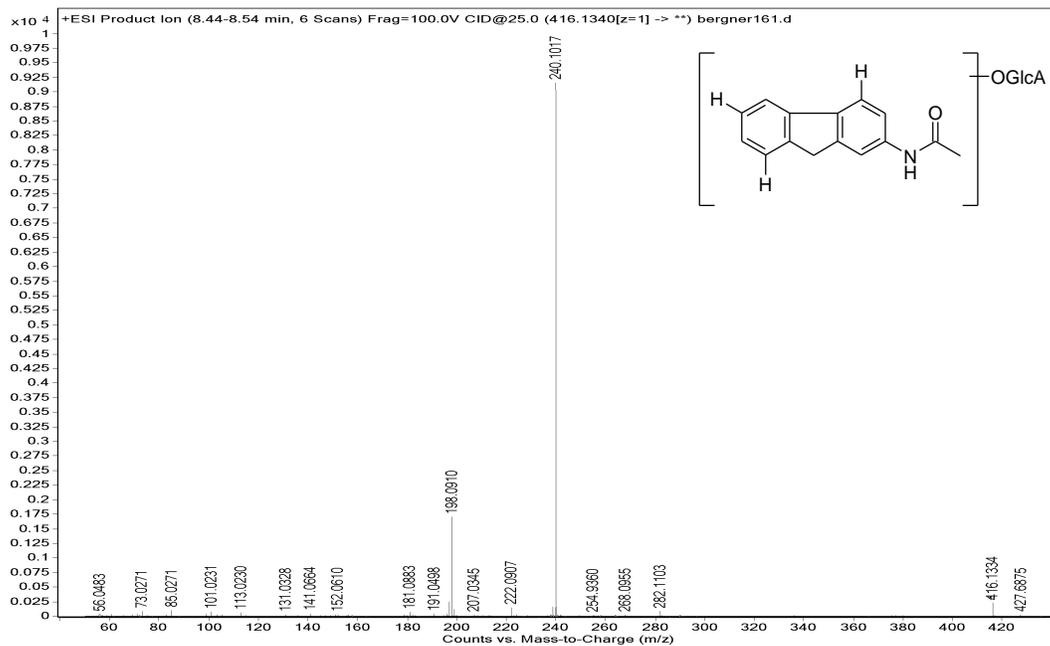
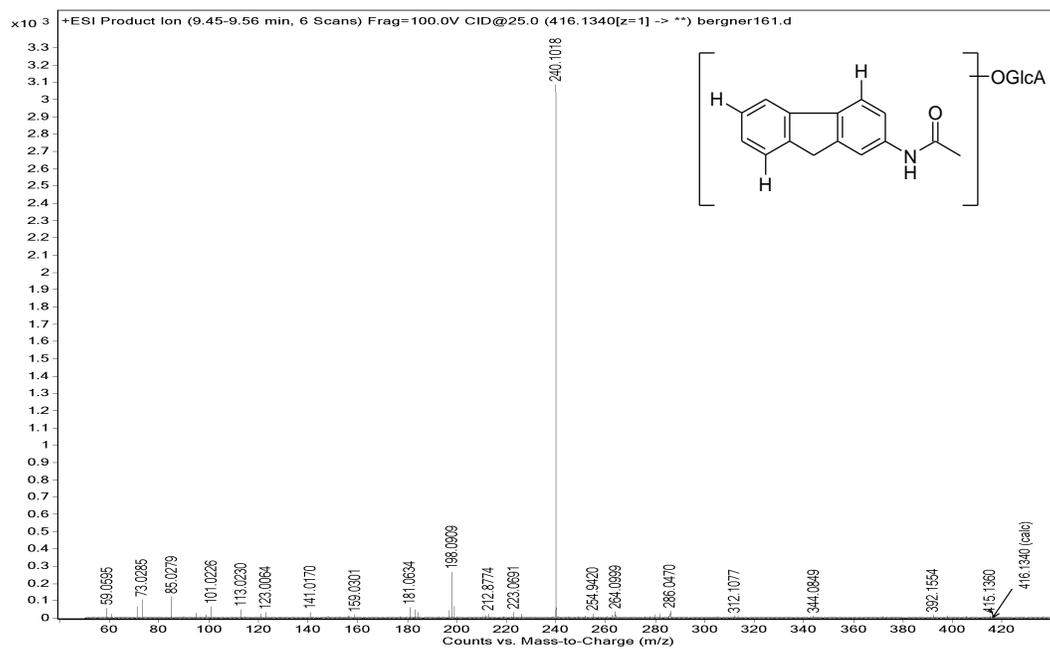


Abbildung 10.104: MS/MS-Spektrum von 2-AAF-M3.1. $[M+H]^+$: m/z 416,1309. Fragment 1: m/z 240,1017, Fragment 2: m/z 198,0910, Fragment 3: m/z 181,0883.

2-AAF-M3.2



2-AAF-M3.3



2-AAF-M3.4

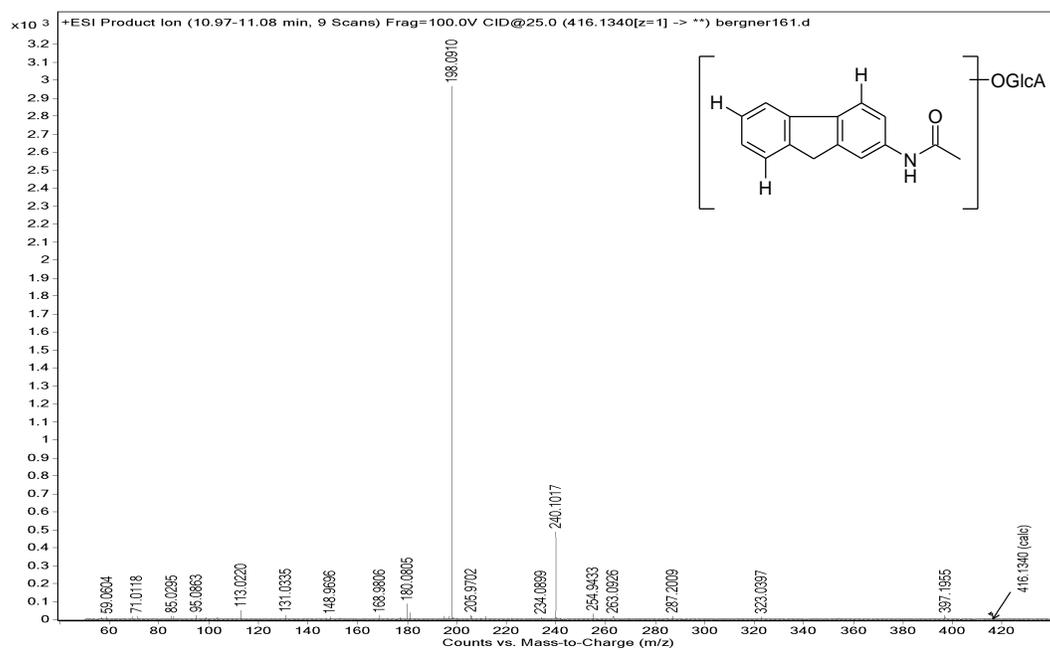


Abbildung 10.105: MS/MS-Spektren von 2-AAF-M3.2, M3.3, M3.4. $[M+H]^+$: m/z 416,1340. Fragment 1: m/z 240,1018, Fragment 2: m/z 198,0909, Fragment 3: m/z 181,0634, Fragment 4: m/z 180,0805.

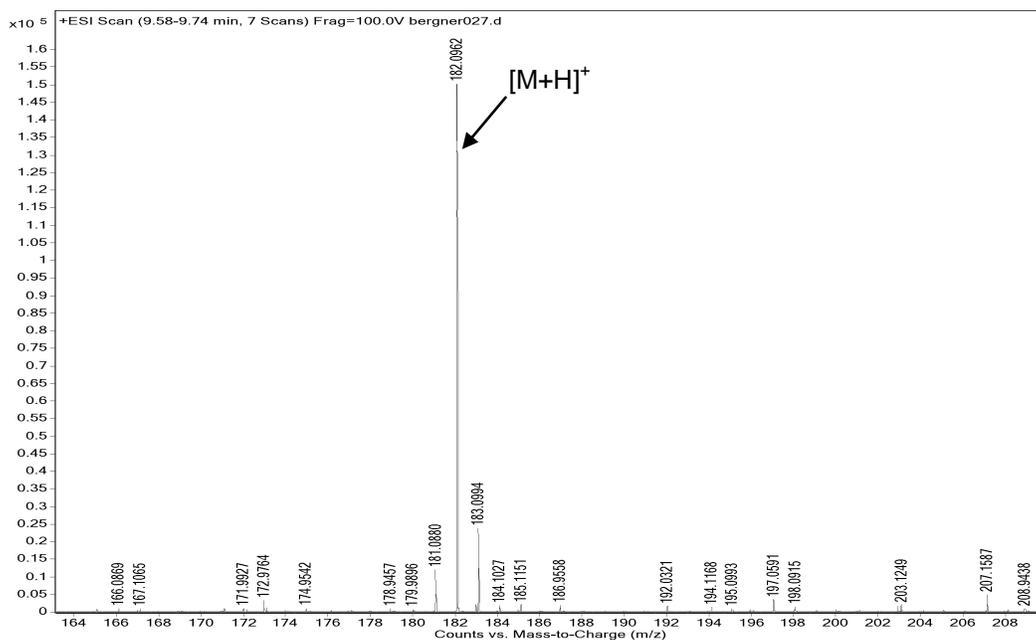
2-AAF-M4

Abbildung 10.106: Massenspektrum von 2-AAF-M4 bei RT 9,63 min aus der aktiven Inkubation von 10 µM 2-AAF in primären Rattenhepatozyten. [M+H]⁺: *m/z* 182,0962.

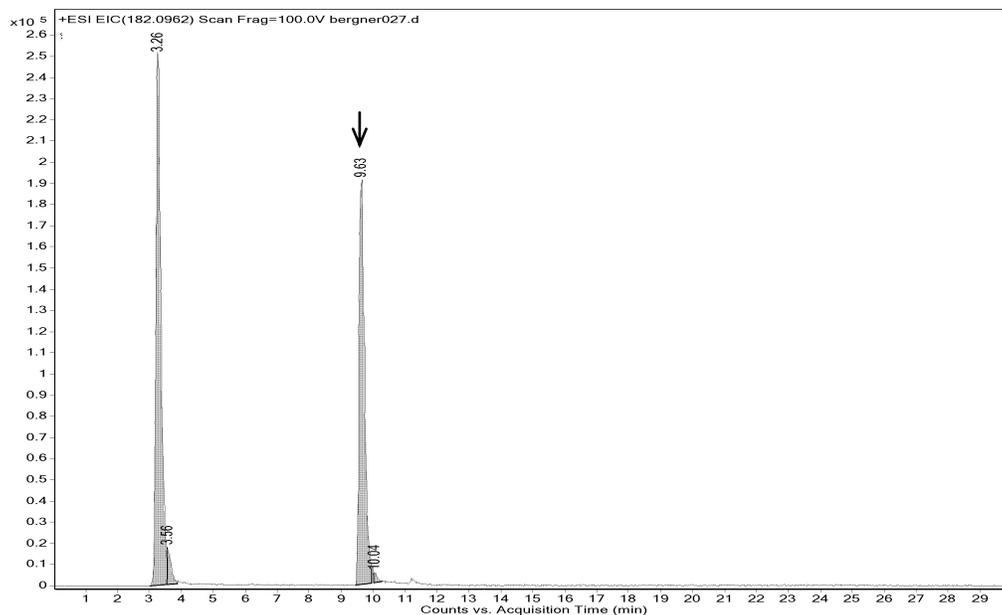


Abbildung 10.107: Massenchromatogramm von 2-AAF-M4 über *m/z* 182,0962 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 10 µM 2-AAF in primären Rattenhepatozyten.

2-AAF-M4

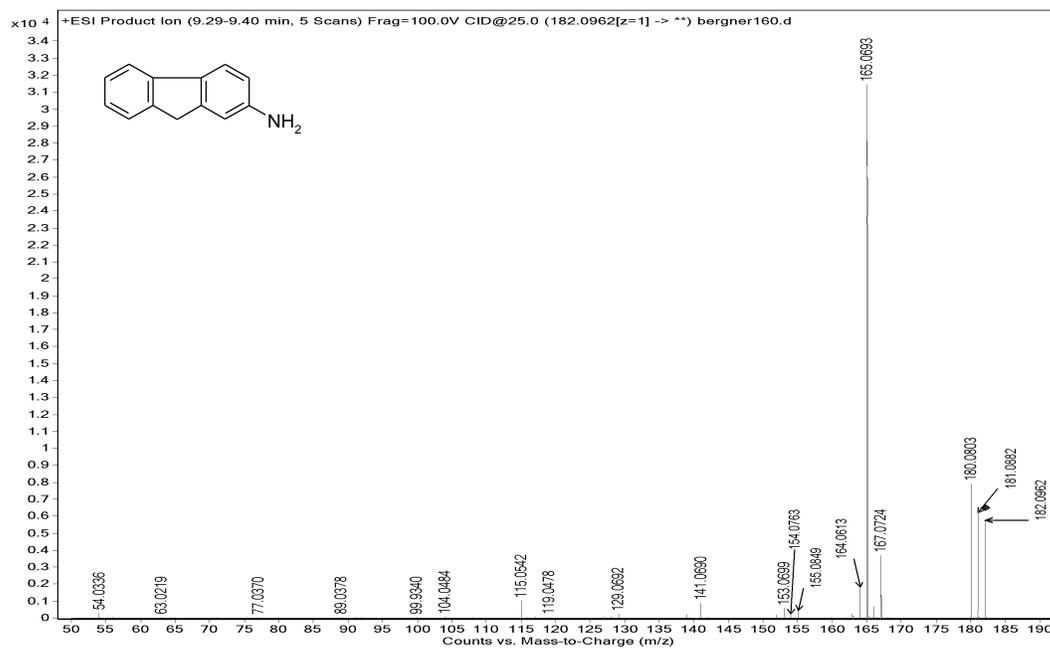


Abbildung 10.108: MS/MS-Spektren von 2-AAF-M4. $[M+H]^+$: m/z 182,0962. Fragment 1: m/z 167,0724, Fragment 2: m/z 165,0693, Fragment 3: m/z 141,0690.

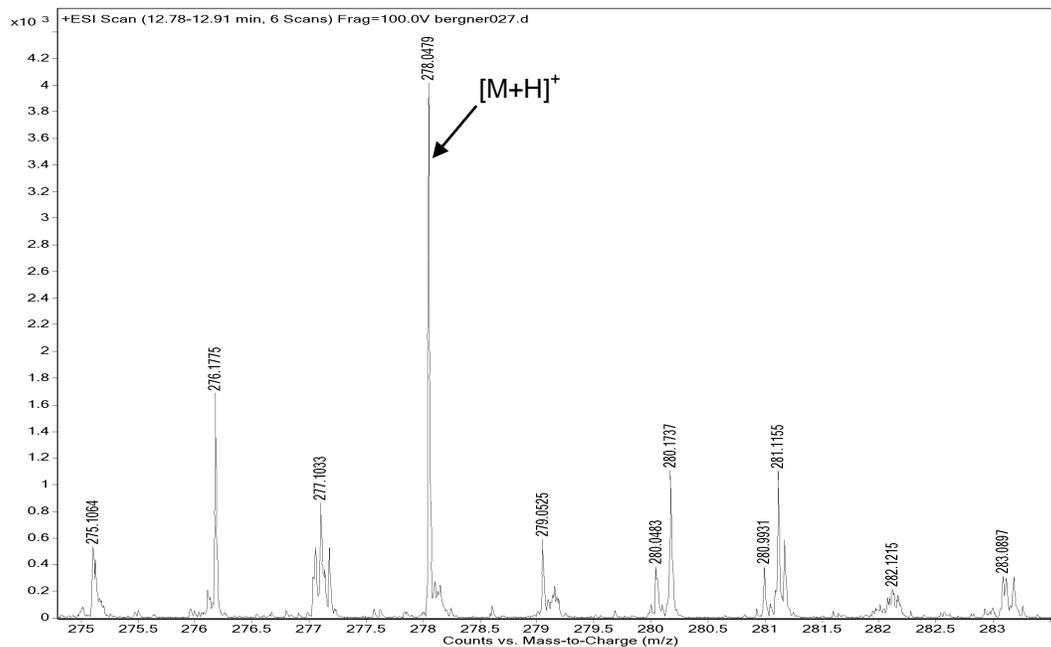
2-AAF-M5

Abbildung 10.109: Massenspektrum von 2-AAF-M5 bei RT 12,88 min aus der aktiven Inkubation von 10 μM 2-AAF in primären Rattenhepatozyten. $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 278,0479.

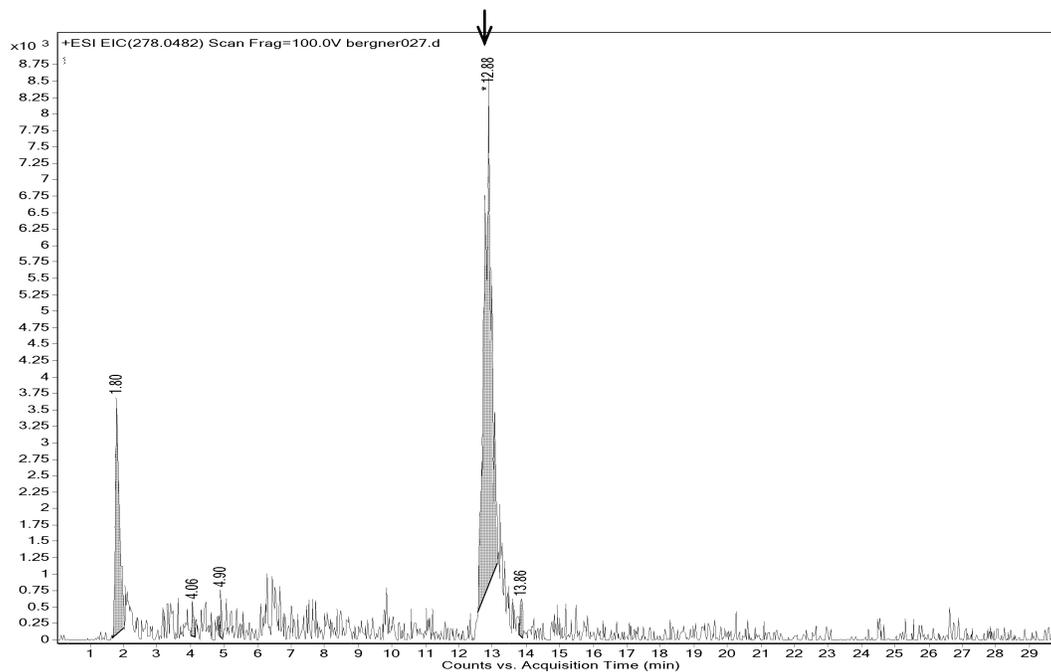


Abbildung 10.110: Massenchromatogramm von 2-AAF-M5 über m/z 278,0482 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 10 μM 2-AAF in primären Rattenhepatozyten.

2-AAF-M5

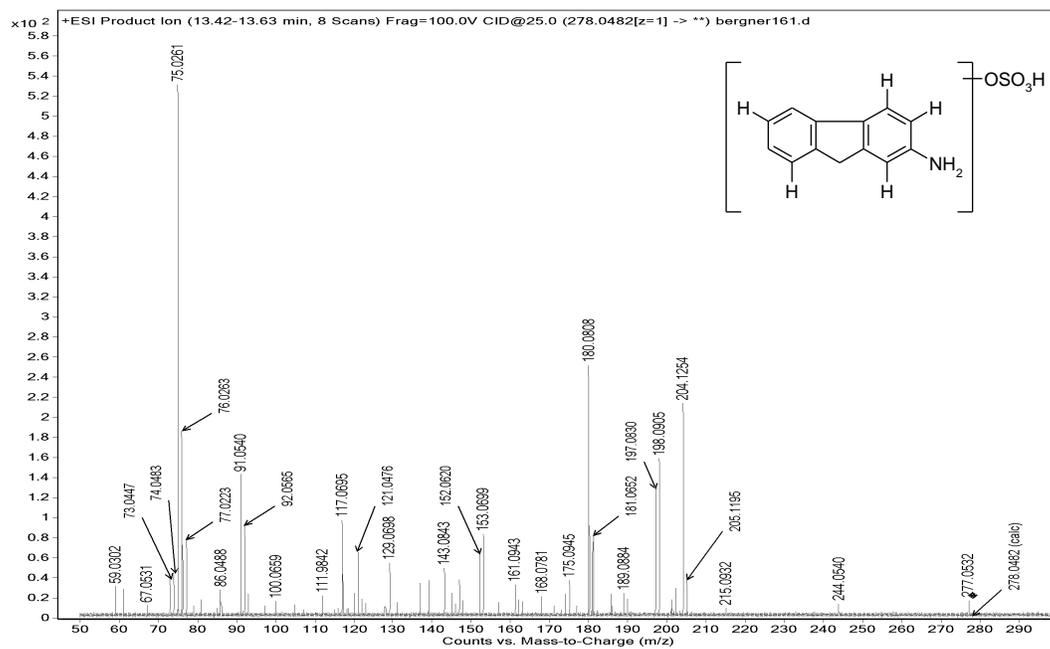


Abbildung 10.111: MS/MS-Spektrum von 2-AAF-M5. $[M+H]^+$: m/z 278,0482, Fragment 1: m/z 198,0905, Fragment 2: m/z 180,0808, Fragment 3: m/z 153,0699.

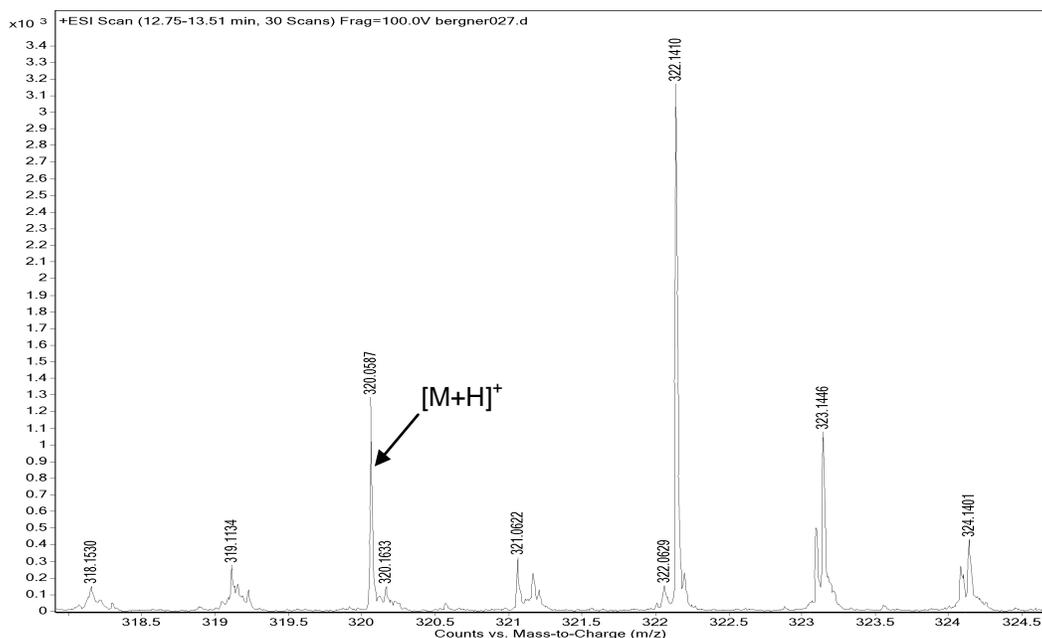
2-AAF-M6

Abbildung 10.112: Massenspektrum von 2-AAF-M6 bei RT 13,07 min aus der aktiven Inkubation von 10 μ M 2-AAF in primären Rattenhepatozyten. [M+H]⁺: m/z 320,0587.

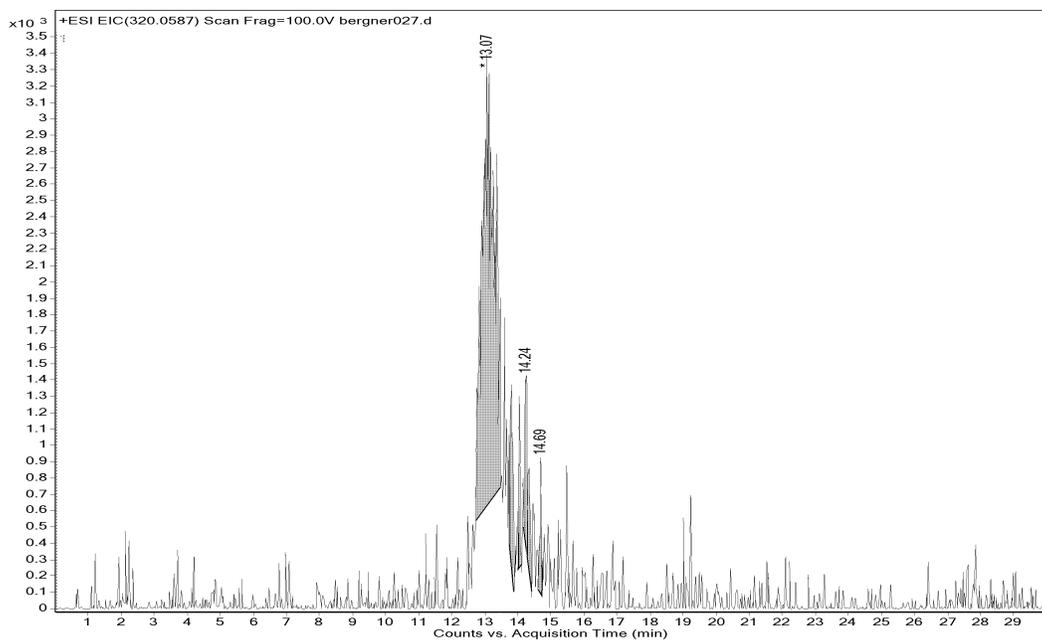


Abbildung 10.113: Massenchromatogramm von 2-AAF-M6 über m/z 320,0587 aus dem Full Scan der aktiven Inkubation von 10 μ M 2-AAF in primären Rattenhepatozyten.

2-AAF-M6

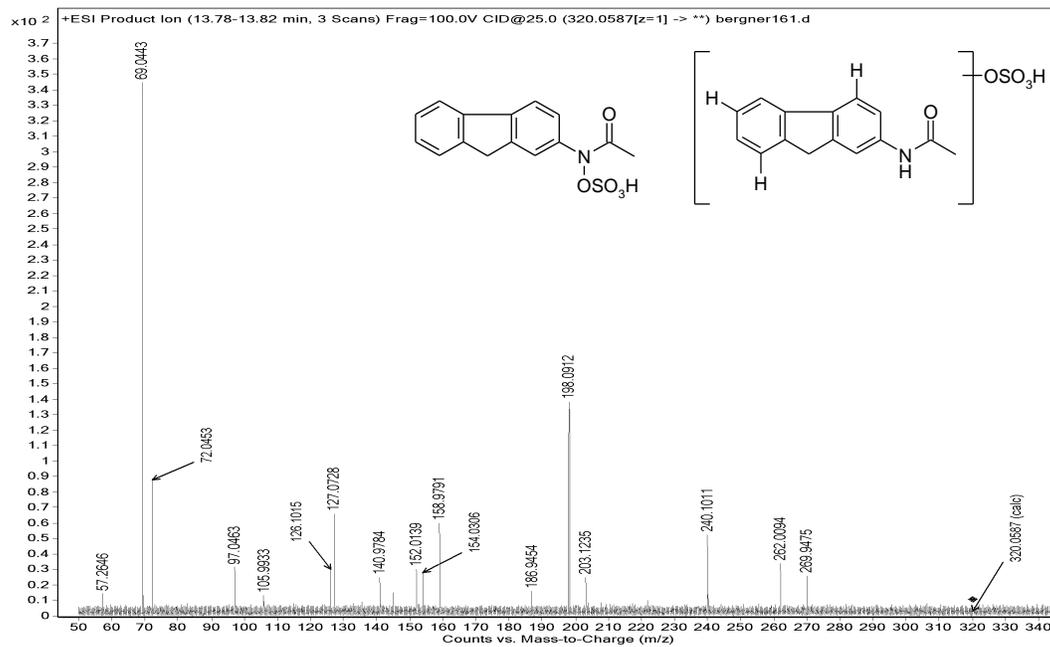


Abbildung 10.114: MS/MS-Spektren von 2-AAF-M6. $[M+H]^+$: m/z 320,0587. Fragment 1: m/z 240,1011, Fragment 2: m/z 198,0912.

12.2 Untersuchung der Proteratogene und Teratogene im 3T3-Zytotoxizitätstest

Die Testsubstanzen sowie die ausgewählten Metaboliten werden im 3T3-Zytotoxizitätstest eingesetzt. Nach 7 und 10 Tagen wird die Vitalität der 3T3-Zellen mittels MTT-Test erhoben. Die daraus resultierenden Konzentrations-Wirkungskurven sind in den Abbildungen 12.115 bis 12.118 dargestellt.

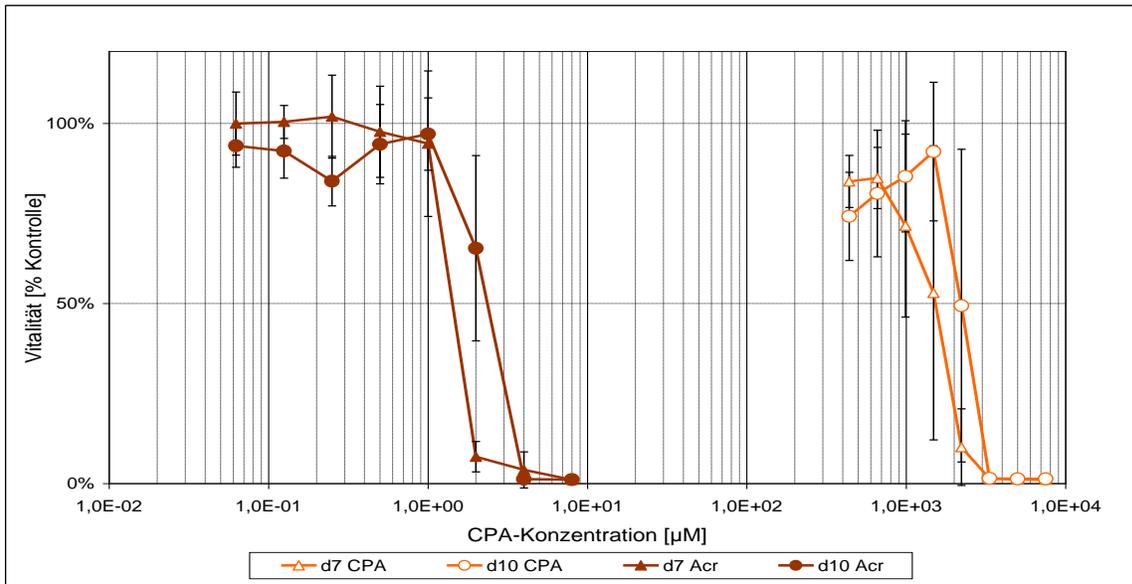


Abbildung 10.115: Konzentrations-Wirkungskurven von CPA und Acr im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen nach 7 und 10-tägiger Inkubation von CPA und Acr. Die IC_{50} -Werte betragen für CPA $1490,0 \pm 503,2$ (d7) und $2281,7 \pm 443,3$ μ M (d10) und für Acr $2,0 \pm 0,9$ μ M (d7) und $2,4 \pm 0,5$ μ M (d10).

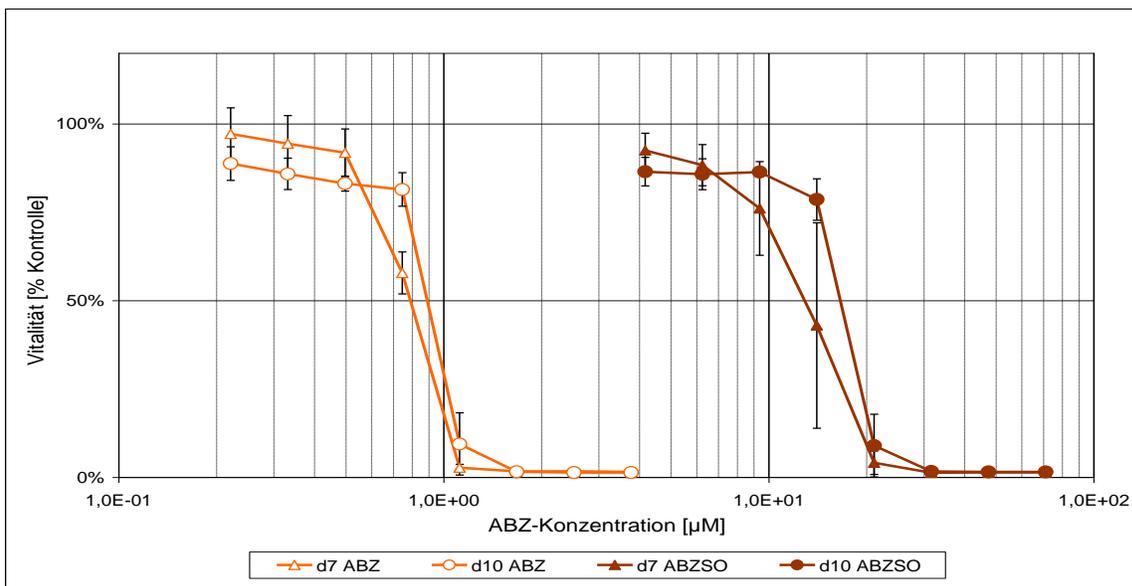


Abbildung 10.116: Konzentrations-Wirkungskurven von ABZ und ABZSO im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen nach 7 und 10-tägiger Inkubation von ABZ und ABZSO. Die IC_{50} -Werte betragen für ABZ $0,6 \pm 0,2$ (d7) und $0,91 \pm 0,04$ μ M (d10) und für ABZSO $13,6 \pm 2,8$ μ M (d7) und $17,1 \pm 0,7$ μ M (d10).

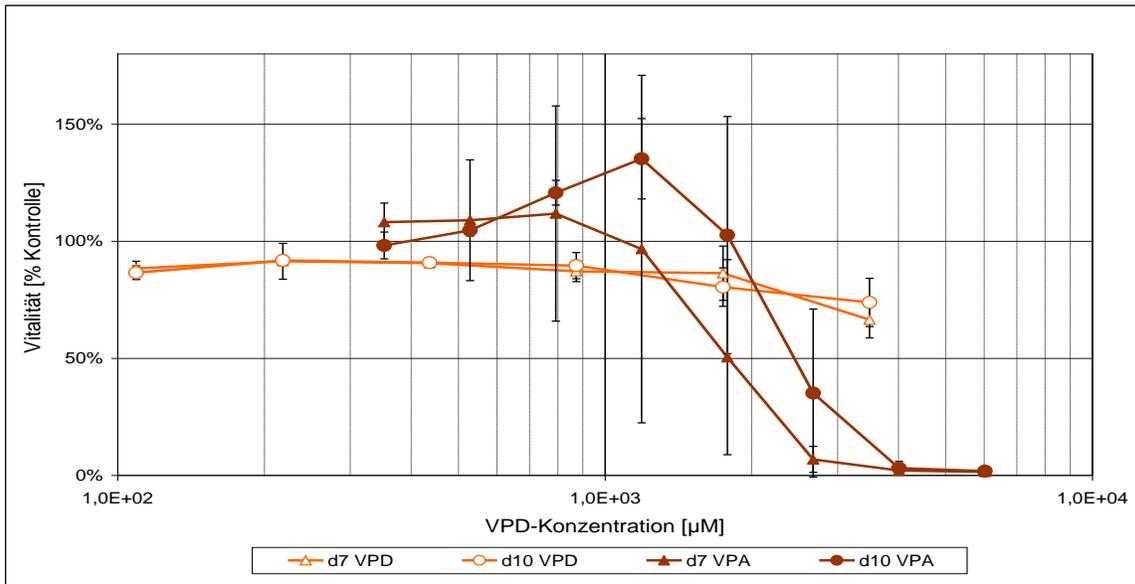


Abbildung 10.117: Konzentrations-Wirkungskurven von VPD und VPA im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen nach 7 und 10-tägiger Inkubation von VPD und VPA. Die IC_{50} -Werte betragen für VPD > 3491 (d7) und (d10) und für VPA $1703,5 \pm 722,8$ μ M (d7) und $2461,8 \pm 702,8$ μ M (d10).

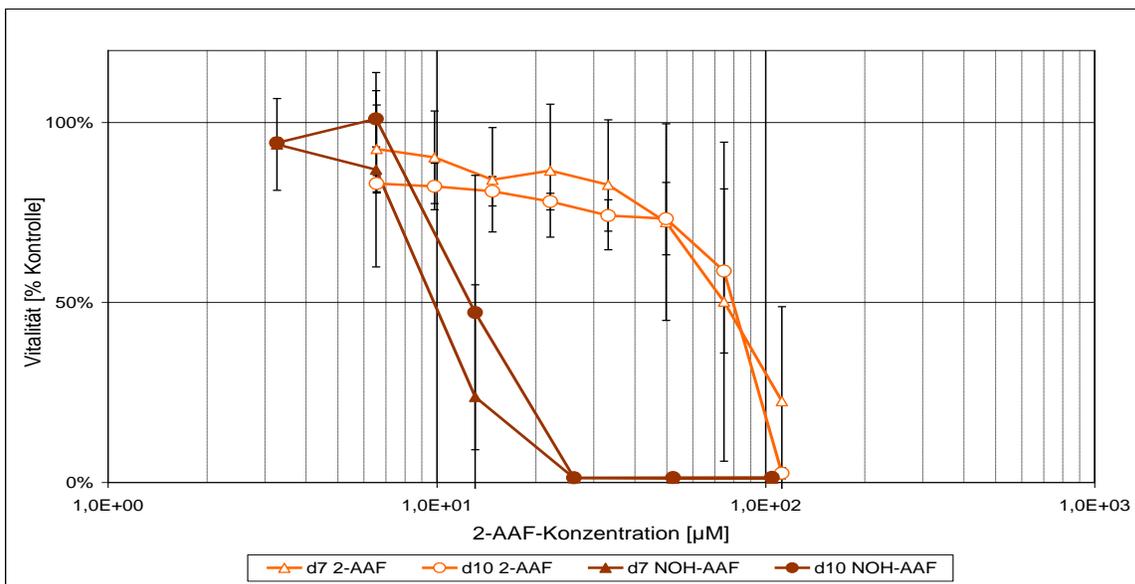


Abbildung 10.118: Konzentrations-Wirkungskurven von 2-AAF und NOH-AAF im 3T3-Zytotoxizitätstest

Dargestellt sind die Vitalitäten \pm SD [% Kontrolle] der 3T3-Zellen nach 7 und 10-tägiger Inkubation von 2-AAF und NOH-AAF. Die IC_{50} -Werte betragen für 2-AAF $77,0 \pm 31,9$ (d7) und $79,2 \pm 11,7$ μ M (d10) und für NOH-AAF $10,8 \pm 3,8$ μ M (d7) und $13,7 \pm 4,6$ μ M (d10).

Wissenschaftliche Publikationen & Kongressbeiträge

S. Ehnert, L. Schyschka, **A. Noß**, D. Knobloch, J. Kleeff, P. Büchler, S. Gillen, U. Stöckle, J. Burkhart, E. Fabian and A.K. Nussler (2011) "Further characterization of autologous NeoHepatocytes for in vitro toxicity testing". *Toxicology In Vitro*, 25(6) p. 1203–1208.

Bernshausen, T., **Noß, A.**, Böhn, S.N., Fabian, E, Kamp, H.G., Kaufmann, T., Koch, M., Wesse, P., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2009) „Metabolic competence of the chicken embryo used in the toxicity screening test (CHEST) as an *in vitro* test system for teratogenicity and embryotoxicity“. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacology*, 379, 1.

Noß, A., Böhme, I., Ehnert, S., Hempel, M., Unger, M., Christ, B., Fabian, E., Nüssler, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2010) „Evaluation of hepatocytes from three species for integrating metabolic activity into embryotoxicity-tests *in vitro*“. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacology*, 381, 1.

Bergner, A., Fabian, E., v. Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2011) „Incorporation of xenobiotic metabolism into cytotoxicity testing in balb/c 3T3 fibroblasts: Metabolic activation of CPA as a proof of principle“. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacology*, 383, 1.

Geplante Publikationen

Stahlmann, R., Bergner, A., Boehme, I., Christ, B., Eckardt, K., Fabian, E., Kaltenhaeuser, J., Nuessler, A.K., Schyschka, L., Seiler, A.

Combination of biotransformation competence with validated embryotoxicity tests:

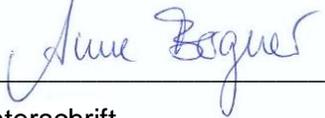
(1) Embryonic Stem Cell Test (EST), Whole Embryo Culture (WEC) and Implementation of Primary Hepatocytes.

(2) Metabolically Active Embryonic Stem Cell Test and Whole Embryo Culture as Exemplified for Cyclophosphamide and Albendazole. *Reproductive Toxicology* (to be submitted; 2013)

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde zu keinem früheren Zeitpunkt weder im Inland noch im Ausland einer anderen Hochschule zum Zwecke der Promotion vorgelegt. Frühere Promotionsversuche bestehen nicht.

Ludwigshafen, den 15.Mai 2013



A handwritten signature in blue ink, reading "Anne Bogner", is written over a horizontal line.

Unterschrift

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Jan G. Hengstler für seine Unterstützung und die Bereitschaft, das Erstgutachten zu erstellen sehr herzlich danken.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Robert Landsiedel für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, meine Dissertation in der Experimentellen Toxikologie und Ökologie der BASF SE in Ludwigshafen anzufertigen.

Mein herausragender Dank gilt Herrn Dr. Eric Fabian für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und für die interessanten und konstruktiven Diskussionen, welche maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank für alles!

Herrn Prof. Andreas Nüssler danke ich herzlich für die Korrektur des Manuskripts sowie die Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens und die wertvollen wissenschaftlichen Hinweise im Laufe der Projektarbeit.

Herrn Dr. Burkhard Flick danke ich herzlich für den fachlichen Austausch, im Besonderen über die Schwerpunkte der *in vitro*-Embryotoxizitätstests.

Ich danke ganz besonders den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Labors „Biokinetik“, „Entwicklung von Alternativmethoden“ und „Mutagenese“ der BASF SE, die mich herzlich aufgenommen und stets für eine nette Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Ohne diese wertvolle Unterstützung hätte diese Arbeit nicht gelingen können. Danke euch allen!

An Matthias Münch richte ich meinen ausdrücklichen Dank für seine außergewöhnliche Unterstützung während der Strukturaufklärungsanalysen. Herrn Dr. Reinhard Dötzer, Herrn Dr. Wolfgang Dreher, Herrn Dr. Michael Speitling und dem gesamten Team des Labors „Strukturaufklärung“ der BASF SE in Limburgerhof danke ich für die großzügige Arbeitsmöglichkeit und die lehrreichen Diskussionen.

Meinen Mitdoktorandinnen und Bürokolleginnen Katharina Guth und Veronika Blatz sowie Caroline Bauch, Annemarie Hess und den Wissenschaftlern aus der allmontäglichen Runde der Fachtoxikologen danke ich herzlich für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und die konstruktiven Gespräche.

Herrn Prof. Ralf Stahlmann, Herrn Prof. Bruno Christ, Herrn Prof. Andreas K. Nüssler, Frau Dr. Andrea Seiler, Frau Dr. Kathrin Eckardt, Frau Dr. Ilka Böhme, Frau Dr. Lilianna Schyschka, Frau Dr. Johanna Kaltenhäuser sowie allen Mitarbeitern des BMBF-Verbundprojektes danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch sowie die Überlassung der Ergebnisse aus den Inkubatüberführungen der Rattenhepatozyten.

Nicht zuletzt richtet sich mein tief empfundener Dank meinem lieben Mann Markus sowie meiner ganzen Familie, welche die Grundlagen für diese Arbeit ermöglichten und besonders in schwierigen Zeiten stets ermutigende Worte gefunden haben und mir bedingungslos zur Seite stehen. DANKE!
