

**Anwendung der hochaufgelösten
bildgebenden MALDI-MS zur Aufklärung
der räumlichen Verteilung des
Acetaminophens und seiner
Biotransformationsprodukte sowie von
Taurocholaten in der Leber von Mäusen
in Folge einer Acetaminophen
Intoxikation**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der

Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von:

M. Sc. Selahaddin Sezgin

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Michael Spiteller
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Jan G. Hengstler

Zusammenfassung

Überdosierungen an APAP führen zu hepatotoxischen Auswirkungen in der Leber von Säugetieren. Die Hepatotoxizität ist u.a. eine Folge der metabolischen Aktivierung des Acetaminophens durch CYP. Dabei treten pericentrale Schadensmuster in den Leberläppchen auf. Es fehlten bisher Informationen über die räumlich-zeitliche Verteilung vom APAP und seinen Biotransformationsprodukten in der Leber bis zur Veröffentlichung von Teilen dieser vorliegenden Arbeit. Um die Fragestellung zu beantworten, wurde eine Methode basierend auf der leistungsstarken HR-MALDI-MSI Technik entwickelt. Dadurch konnte die Verteilung vom APAP, seinen Hauptmetaboliten APAP-GLC und APAP-SUL und seinem Addukt APAP-GSH in der Leber von C57BL/6 Mäusen, denen APAP intraperitoneal verabreicht wurde und deren Leber sowohl zeit- als auch dosisabhängig beprobt wurden, detektiert werden. Zuvor wurden intensive Anstrengungen unternommen, um das toxische Intermediat NAPQI im Lebergewebe durch MALDI-MSI zu erfassen. Ziel war es, Informationen über seinen Bildungs- und Wirkungsort im Lebergewebe zu gewinnen. Hervorzuheben ist dabei ein Versuchsansatz bei dem H_2S zur Derivatisierung von NAPQI eingesetzt wurde. Diese innovative Methode könnte zudem das Portfolio an Derivatisierungsmöglichkeiten für MALDI-MSI Experimente erweitern. Allerdings konnte das NAPQI weder direkt noch über seine artifiziellen Derivate im Lebergewebe detektiert werden, was vermutlich auf einen Mangel an nicht-abreagiertem NAPQI im Lebergewebe zurückzuführen ist. Die durch Gewebehistologie unterstützte Superpositionierung von Ionendichtebildern unter Einbeziehung der Eigenschaften verschiedener Imaging Software ermöglichte es, präferentielle Verteilungen der Analyten bezüglich der metabolischen Zonen zu erfassen. Während für APAP, APAP-SUL und APAP-GLC keine zonale Verteilung festgestellt werden konnte, konnte eine präferentielle Bildung des APAP-GSHs sowie ein schwerpunktmäßiger Abbau des GSHs in der pericentralen Zone verortet werden. Der Abbau an GSH war aber nicht ausschließlich auf die pericentralen Zonen beschränkt, sondern konnte auch für die periportalen Zonen demonstriert werden. 120 min nach der APAP Injektion konnte ein Influx an APAP-GSH und an Taurocholaten von den Gallengefäßen in die pericentrale Zone und von dort ins Blut beobachtet werden. Dieser massive Eintrag von Gallensäuren beweist, dass sich ein „sekundäres“ Toxizitätsevent ereignet, welches vormals durch die Aktivierung des APAPs in der Leber gestartet wurde.

Abstract

Acetaminophen induces hepatotoxicity in the liver of mammal organisms, after the uptake of an overdose. It is well reported, that CYP mediated activation of APAP is thereby causing a pericentral damage pattern in the liver lobules. However, no direct spatio-temporal information about the distribution pattern of APAP and its biotransformation products in the liver were available until the publication of parts of this work. Herein, the development of an analytical method based on of the sophisticated HR-MALDI-MSI technique is reported. The aim was to detect the distribution of APAP, its main metabolites APAP-GLC and APAP-SUL and adduct APAP-GSH, known to be formed during detoxification of the toxic intermediate metabolite NAPQI by GSH, in the liver of C57BL/6 mice, which were treated intraperitoneally with APAP and whose livers were collected in a time-and dose-dependent manner. Previously, intensive efforts were put in the analytical investigation of the toxic intermediate NAPQI from liver tissue by MALDI-MSI since its detection would have revealed valuable information about its sites of formation and impact. For this purpose, an innovative derivatization approach with H₂S gas was applied, which in general, could also enrich the portfolio of derivatization methodologies used for MALDI-MSI experiments. However, the detection of NAPQI and its on-tissue derivatization attempts failed, presumably due to the lack of unreacted NAPQI in the liver. Histology-directed superposition of ion density images in consideration of special features of different imaging software made it possible to determine the differences in the distribution pattern of the analytes. While no specific zonation could be detected for APAP, APAP-SUL and APAP-GLC, a preferential formation of APAP-GSH and depletion of GSH in the pericentral zones of the lobule were revealed. However, the depletion of GSH was not restricted to pericentral zones but was also demonstrated for the periportal areas. 120 min after APAP injection a series of drastic events happened: APAP-GSH as well as taurocholates entered from the bile vessels into the pericentral zone and from there leaked into the systemic blood circulation. The massive leakage of bile acids into the hepatocytes is providing the evidence of a “secondary” toxicity event initiated by the activation of APAP in the liver.

Danksagung

An allererster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Michael Spittler für die Aufnahme in seinem Arbeitskreis und für die Möglichkeit meine Masterarbeit und im Anschluss diese vorliegende Doktorarbeit in einem sehr interessanten und zukunftsweisenden Themengebiet der Massenspektrometrie und in einem hervorragend ausgestatteten Labor anfertigen zu dürfen. Von den richtungsweisenden Diskussionen konnte ich wertvolle Ideen und Anregungen für meine Arbeiten gewinnen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Jan G. Hengstler vom Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der Technischen Universität Dortmund (IfaDo) bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens der vorliegenden Doktorarbeit und für die kooperative Zusammenarbeit im Rahmen der gemeinsamen Projekte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Sebastian Zühlke und Herrn Dr. Kusari für die wertvolle Betreuung im Rahmen vieler gemeinsam erforschter Fragestellungen und Projekte. Ebenso möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Ferdinand M. Talontsi für die Zusammenarbeit in den ausgeführten Projektarbeiten im ersten Promotionsjahr bedanken.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Ahmed Ghallab (ehem. IfaDo, mittlerweile Associate Professor an der Fak. Für Tiermedizin, South Valley Universität, Ägypten) für die erfolgreiche und für mich sehr lehrreiche Zusammenarbeit bedanken, durch welche diese Arbeit möglich wurde. Bei Herrn Dr. Lars Küpfer (Bayer AG) bedanke ich mich für die Übernahme der pharmakokinetischen Berechnungen.

Für die kompetente Beratung bei aufkommenden technischen Problemen an der AP-SMALDI Ionenquelle wie auch an den Massenspektrometern möchte ich mich bei Herrn Dr. Karl-Christian Schäfer von der TransMIT GmbH in Gießen, und bei Frau Dr. Kerstin Strupat und Herrn Andreas Reiners, beide von der Thermo Scientific GmbH in Bremen, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Simon Kriegler und Herrn Mirko Schmidt, beide von der Technischen Universität Dortmund, für Ihre Unterstützung bei den aufwändigen statistischen Analysen der MALDI-MSI Daten. Ferner danke ich Frau Simone Keil und Frau Brigitte Begher-Tibbe vom IfaDo für kompetente technische Assistenz.

Bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe am Institut für Umweltforschung (INFU) bedanke ich mich für die angenehme und kameradschaftliche Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Dennis Eckelmann, Herrn Michael Kubicki, Frau Gabriele Harde und Frau Cornelia Stolle für den wertvollen Austausch zur Meisterung des Arbeitsalltags.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern für ihre langjährige Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 MALDI-MSI und seine Anwendungen in der klinischen Diagnostik.....	9
1.2 Imaging Software.....	12
1.3 Quantitative MALDI-MSI.....	16
1.4 Hepatotoxizität von Acetaminophen (Paracetamol).....	19
1.5 Metabolische Zonen im Leberlobul.....	22
1.6 Ziel der Arbeit.....	26
2. Voruntersuchungen, Optimierungen und Konzeption des kinetischen und dosisabhängigen Experiments	29
2.1 Leberextraktion und Messung via HPLC-MS.....	30
2.2 Untersuchungen zur Realisierbarkeit der Detektion von NAPQI via MALDI-MSI.....	33
2.2.1 Transformation des NAPQIs in Pufferlösung und in Methanol.....	33
2.2.2 Voruntersuchungen zum NAPQI via MALDI-MSI.....	43
2.2.3 Versuch zur photochemischen Stabilisierung von NAPQI.....	48
2.2.4 Derivatisierung des NAPQIs mit Sulfid (S ²⁻).....	51
2.2.5 Zusammenfassung zu den Voruntersuchungen zur Analytik vom NAPQI.....	56
2.3 Optimierung der Probenvorbereitung für MALDI-MSI Experimente.....	57
2.3.1 Matrixscreening via MALDI-MS.....	57
2.3.2 Präparation der Leberschnitte für MALDI-MSI Experimente.....	59
2.3.3 Einstellung der Laserspotbreiten und der räumlichen (spatialen) Scanauflösung.....	61
2.3.4 Untersuchung von Signalinterferenzen und Artefakten auf dem Lebergewebe.....	63
2.3.5 Zusammenfassung der Optimierungsversuche für die MALDI-MSI Experimente.....	69
2.4 Entwicklung einer quantitativen HPLC-Messmethode zur Quantifizierung von APAP und seinen Transformationsprodukten sowie der Gallensäuren.....	70
2.5 Konzeption des kinetischen und dosisabhängigen Experiments.....	75
3. Kinetisches und dosisabhängiges Experiment	77
3.1 Kinetisches Experiment.....	78
3.1.1 Makropathologie.....	78
3.1.2 Hämatoxylin und Eosin Färbung.....	79
3.1.3 CYP2E1 immunhistochemische Färbung.....	79
3.1.4 GSH Konzentration in den Leberhomogenatlösungen.....	79
3.1.5 Transaminaseaktivität (ALT, AST).....	80
3.1.6 Quantitative HPLC-Ergebnisse.....	82
3.1.6.1 APAP, Metaboliten und Addukte.....	82
3.1.6.2 TCS und TCDS.....	84
3.1.7 MALDI-MSI Ergebnisse.....	85
3.1.7.1 Allgemeines.....	85

3.1.7.2 APAP	86
3.1.7.3 APAP-GLC und APAP-SUL	88
3.1.7.4 APAP-GSH und APAP	90
3.1.7.5 TCS, TCDS und mögliche Isomere	95
3.1.7.6 Metaboliten und Konjugate von APAP im enterohepatischen Kreislauf	102
3.1.7.7 Hypothesen zu den APAP-GSH Resultaten	104
3.2 Dosisabhängiges Experiment.....	106
3.2.2 Quantitative HPLC-Ergebnisse	107
3.2.2.1 APAP, Metabolite und Addukte	107
3.2.2.2 TCS und TCDS	109
3.2.3 MALDI-MSI Ergebnisse	110
3.2.3.1 APAP, Metaboliten und Addukte	110
3.2.3.2 TCS	112
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse vom kinetischen und dosisabhängigen Experiment	113
4. Diskussion.....	116
4.1 Voruntersuchungen, Optimierungen und Konzeption des kinetischenund dosisabhängigen Experiments	117
4.2 Kinetisches und dosisabhängiges Experiment	120
4.3 Beurteilung der angewandten MALDI-MSI Methode	123
5. Experimentelles	129
5.1 Vorversuche und Optimierungen.....	130
5.1.1 Extraktion der Leberproben für die Vorversuche.....	130
5.1.2 Ansetzen der PBS-Lösung	130
5.1.3 Erklärung zu den Abweichungen in den Retentionszeiten der untersuchten Analyten in Kapitel 2.....	131
5.1.4 On-Tissue Derivatisierungsversuch durch Applikation von Natriumsulfid via Sprayverfahren.....	131
5.2 Präparation der Versuchstiere und Verabreichung von APAP.....	132
5.3 Mikroskopie.....	133
5.4 MALDI-MSI	134
5.4.1 Einstellungen der quellenspezifischen und massenspektrometrischen Parameter für MALDI-MSI Versuche.....	134
5.4.2 Auswertung der MALDI-MSI Daten.....	135
5.5 HPLC-MS Experimente.....	137
5.5.1 Präparation der Blutplasmaextrakte.....	137
5.5.2 Einstellung der spezifischen Parameter für die HPLC-MS Versuche	138
5.6 Histochemische Färbungen	141
5.6.1 Hämatoxylin und Eosin Färbung.....	141
5.6.2 CYP2E1 immunhistochemische Färbung	141
5.7 Aktivität der Transaminasen und Glutathion Assay	142

5.8 Statistische Analysen	142
5.9 Verzeichnisse	143
5.9.1 Chemikalienverzeichnis	143
5.9.2 Materialverzeichnis	144
5.9.3 Geräteverzeichnis	144
6. Anhang	145
6.1 Vorversuche	146
6.1.1 Tabelle: NAPQI Transformationsprodukte in PBS bzw. methanolischer Lösung	146
6.1.2 Geschätzte On-Tissue Detektionslimits der untersuchten Analyten	146
6.1.3 Transformationsprodukte des NAPQIs in PBS Lösung mit GSH	149
6.1.4 Transformationsprodukte von NAPQI aus seiner Reaktion mit H ₂ S	150
6.1.5 Analyse des H ₂ S begasten Positivkontrollgewebes mit der Mirion Software	155
6.2 Kinetisches und dosisabhängiges Experiment	156
6.2.1 Pharmakokinetische Daten	156
6.2.2 APAP-OME	158
6.2.3 MALDI-MSI/MS für APAP-GSH und TCS	158
6.2.3 Zonale Partition für APAP-GSH und GSH	160
6.3 Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit	162
6.4 Abkürzungsverzeichnis	162
6.5 Abbildungsverzeichnis	166
6.6 Tabellenverzeichnis	169
7. Bibliografie	170

1. Einleitung

1.1 MALDI-MSI und seine Anwendungen in der klinischen Diagnostik

Die bildgebende Matrix-assistierte Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie (*engl.* Matrix-assisted desorption/ionization mass spectrometry imaging, MALDI-MSI) findet in den letzten Jahren immer mehr Einzug in das Repertoire der klinischen Diagnostik (*Franck 2009, Hui 2013, Aichler 2015).

Das Prinzip dieser leistungsfähigen Technik beruht darauf, dass von komplexen biologischen Oberflächen, abstrakte Informationen in Form spektraler Daten gewonnen werden können. Massenspektrometrische Daten werden so mit histologischen und strukturellen Merkmalen z.B. entlang eines exzidierten tierischen Gewebestücks zweidimensional (x, y -Koordinaten) verknüpft. Über das gemessene Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) lassen sich so verschiedene endogene wie auch exogene Stoffe (tentative) zuordnen. Abhängig von der technischen Kapazität des angekoppelten Massenspektrometers können ferner auch Ionenfragmentierungsexperimente (MALDI-MSI/MS) durchgeführt werden, die zur Strukturaufklärung der untersuchten Verbindungen beitragen können (Römpp 2013).

Durch diese Eigenschaften rückte die Technik in den Fokus von Bemühungen, um beispielsweise diagnostische und prognostische Biomarker für eine Reihe von Krebs- oder neurodegenerativen Erkrankungen zu entdecken (Ucal 2017).

Mit MALDI-MSI lassen sich eine Vielzahl von Stoffklassen in einem weiten Massenbereich detektieren. Häufige Anwendungen in der Literatur beziehen sich in der Regel auf die *Peptidomik* und *Proteomik* (Goodwin 2008) sowie auf die *Lipidomik* (Berry 2011). Die Verbesserung der Leistungsfähigkeit der Massenspektrometer bezüglich ihrer Massenauflösung und Sensitivität ermöglichte es zunehmend auch kleinere Moleküle < 500 Da (störungsfrei) zu detektieren und zu visualisieren (Goodwin 2016).

Viele Arbeiten befassen sich ebenso eingehend mit der Absorption, Verteilung, dem Metabolismus und der Exkretion von Arzneimitteln und sonstigen Xenobiotika in Tiermodellen, bei der die MALDI-MSI Technik genutzt wird. Eine Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit der Verteilung eines zur Behandlung schizophrener Psychosen eingesetzten Medikaments, nämlich des Olanzapins, und seines Hauptmetaboliten *N*-desmethyl-olanzapin in der Mausniere. Durch die Untersuchungen kamen sie zu dem

Schluss, dass das Olanzapin nach 6 h der Applikation bereits nahezu vollständig zu seinem Metaboliten umgesetzt wurde. Dieser lagerte sich insbesondere im Nierenbecken ab, von wo aus es zur Exkretion von Urin und sonstigen Ausscheidungen von der Niere kommt (Bonnel 2011). Eine andere Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit der Detektion und Quantifizierung von Chlordecon, eines Orgonochlorids, das zeitweise als Pestizid gegen Rüsselkäfer in Bananenplantagen eingesetzt wurde. Dieser Stoff hat den Effekt, dass es die schädigenden Auswirkungen toxischer Stoffe in der Leber erhöht. Chlordecon wurde als Chlordecon-Hydrat vom Lebergewebe detektiert und mit einem Versuchsansatz über MALDI-MSI quantifiziert (Lagarrigue 2014). Diese Arbeit wird in Kapitel 1.2 detailliert beschrieben.

Als Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz dieser Technik ist in erster Linie die Expertise des Anwenders zu nennen, der MALDI taugliche Proben den Anforderungen entsprechend präparieren muss. Daneben muss der Experte imstande sein die anfallenden Datenmengen wissenschaftlich valide prozessieren und interpretieren zu können. Außerdem kommt es bei Anwendungen mit großen Probenmengen, wie sie in der klinischen Anwendung in der Regel benötigt werden (Replikate), auf die Robustheit der Ergebnisse und auf die Geschwindigkeit der Diagnostik (Messzeit) an; das zuletzt genannte Parameter ist dabei häufig (noch) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Data Mining. Es wird daher zunehmend über die Entwicklung von sogenannten Hochdurchsatzverfahren berichtet (Groseclose 2008, McDonnell 2010). Von technischer Seite her setzen die Entwickler von MALDI-Quellen, wie zum Beispiel die Bruker Daltonik GmbH in Bremen, Deutschland, auf die Konzeption von Hochdurchsatz-Messanlagen (s. rapifleX™ MALDI Tissue typer™).

Die einstellbare laterale Auflösung der Quelle in x- und y-Richtung bestimmt, welche Strukturmerkmale auf dem gemessenen Gewebestück aufgelöst werden können und ist daher eine wichtige Kenngröße für die Performance einer MALDI-Quelle. Gängige hochauflösende MALDI-Quellen, wie zum Beispiel die AP-SMALDI10 von der Firma TransMIT GmbH in Gießen, Deutschland, erreichen dabei Auflösungen von $\leq 10 \mu\text{m}$ (Römpp 2013). So konnten zum Beispiel Lipide, Nukleinbasen und Cholesterin mit $7,5 \mu\text{m}$ Auflösung auf einzelnen HeLA-Zellen visualisiert werden (Schober 2012).

Allerdings wird auch diese Eigenschaft laufend verbessert und die neuen Generationen von MALDI-Quellen, schaffen laterale Auflösungen $< 5 \mu\text{m}$ sollen. Zum

Vergleich: Die kleinsten Durchmesser für menschliche intrahepatische Gallengänge werden mit 15 μm angegeben (Roskams 2004).

Häufig werden bildgebende MALDI-Experimente als zweidimensionale MALDI-MSI (2D-MALDI-MSI) Messungen durchgeführt, d.h. es werden in der Regel Einzel(quer)schnitte aus größeren Gewebestücken herausgeschnitten und gemessen. Auf die Frage, wie der Stoff im gesamten Gewebe verteilt ist, wird dabei nicht eingegangen. Für klinische Anwendungen ist aber die Frage nach der Verteilung einer Substanz im gesamten Gewebestück oder in einer Biopsie-Probe interessant. Mit der von Thiele et. al. beschriebenen Versuchsstrategie ließ sich mithilfe des dreidimensionalen MALDI-MSI (3D-MALDI-MSI) Verfahrens die Distribution eines Stoffes in einer dreidimensional modellierten Matrix annähernd modellieren. Für das Verfahren wurden Informationen von drei verschiedenen Techniken, nämlich der Magnetresonanztomographie (MRT), der MALDI-MSI und von histologischen Färbungen kombiniert. Zunächst wird der gesamte Gewebestück mit MRT gescannt, um seine 3D Struktur zu erhalten. Der Block wurde daraufhin in möglichst viele dünne konsekutive (serielle) Schnitte, z.B. in einem Kryostaten, aufgeteilt. Alle Schnitte wurden digital und niedrigaufgelöst aufgenommen (gescannt). Die Bilder wurden zueinander in Bezug gesetzt; jede individuelle Sektion bildete einen zweidimensionalen Koordinaten-Datensatz. Durch die Bilderfassungs-Software MeVisLab von MeVis Medical Solutions AG in Bremen, Deutschland, erfolgte die räumliche 3D-Rekonstruktion des gesamten Gewebes basierend auf den massenspektrometrischen Daten der MALDI-MSI Messungen und den räumlichen Daten von der MRT. Ebenso werden für die 3D- Rekonstruktion hochaufgelöste Bilder der histologischen Schnitte, die ebenfalls aus dem Gewebe geschnitten worden sind, mit den übrigen Daten fusioniert und mit den molekularen Informationen aus den MALDI-Messungen korreliert. Durch Korrelation von Daten aus den genannten Techniken kamen im 3D-Modell sehr große und komplexe Datenmengen zusammen. Fortschrittliche Algorithmen, die in Imaging Software wie die SCILS Lab (3D) von SCILS in Bremen, Deutschland, integriert sind, helfen bei der Reduktion und Eliminierung von Signalrauschen, was die Datenmengen erheblich reduziert. Durch das Peak-Picking können bekanntlich eine Vielzahl von Ionendichtebildern generiert werden, deren Pixel Masseninformationen tragen, die mit einem Masse- zu Ladungsverhältnis eines Stoffes korrespondieren. Diese Datensätze können durch ein

entsprechendes Tool des SCILS Lab Programms in Clustern zusammengefasst werden. Cluster sind dabei Gruppen von Substanzen, die ein ähnliches Verteilungsmuster bezüglich der Segmente auf dem Gewebe aufweisen. Jedem Cluster wird eine Farbe zugeordnet und mit dieser auf dem Gewebe visualisiert (Thiele 2014). Die 3D-MALDI-MSI Methode konnte auch erfolgreich für einzelne Zellen angewandt werden (Duenas 2017).

1.2 Imaging Software

Nach aktuellem Stand existieren eine Reihe von verschiedenen Softwareprogrammen zur Prozessierung von Spektraldaten, die in bildgebenden MALDI Experimenten generiert werden. Zu nennen sind hier etwa firmeneigene Softwarepakete, die in der Regel nur firmenspezifische Datentypen öffnen und prozessieren können (z.B. flexImaging von der Bruker GmbH in Bremen, Deutschland). In den letzten Jahren drangen Firmen oder Tochterfirmen von Großunternehmen auf den Markt, die einen beachtlichen Teil ihres Umsatzes durch Entwicklung und Vertrieb von Imaging Software erwirtschafteten (z.B. die Firma ImaBiotech in Loos, Frankreich oder SCILS in Bremen, Deutschland) (siehe auch: <https://ms-imaging.org>, aufgerufen am 01.05.19). Zudem bieten einige universitäre Arbeitskreise selbstentwickelte Programme als Open-Source Software an und verbessern diese ständig weiter (Parry 2013, Bemis 2015). Die Hauptfunktion eines jeden Imaging Programms besteht darin Ionendichtebilder bezüglich ausgewählter m/z aus dem Ensemble der Spektraldaten zu extrahieren und anzuzeigen. Dies geschieht innerhalb der vom Nutzer gewünschten Massentoleranz (Massenfenster), welche zum Beispiel in parts per million (ppm) angegeben wird. Die Extraktion kann abhängig vom jeweiligen Imaging Programm erhebliche Berechnungszeiten am Computer beanspruchen (Schwartz 2015).

Die weitere Prozessierung der Daten kann über viele Wege erfolgen. Die Programme generieren die Ionendichtebilder zunächst mit einer absoluten Intensitätsskala. Durch manuelle Manipulation der unteren und oberen Grenzen der Intensitätsskalen können Rauschsignale eliminiert (*engl.* Denoising) oder niedrig intensive Signale akzentuiert werden. Viele Programme bieten basierend auf komplexen Algorithmen auch eine automatische Denoising-Funktion an. Ein weiterer in vielen Imaging Softwarepaketen eingebauter Korrekturfaktor ist die Möglichkeit Signale von Analyten auf den

Totalionenstrom (*engl.* Total Ion Current, TIC) zu normieren, wie zum Beispiel beim Programm ImageQuest™ von Thermo Scientific in Bremen, Deutschland. Inhomogenitäten auf dem Gewebe bedingt durch morphologische Unterschiede oder unregelmäßige Kristallisation der applizierten Matrix können so (teilweise) aufgehoben werden. Ein sehr hilfreiches Werkzeug der SCILS Lab Software kann automatisch sogenannte Hotspots eliminieren. Hotspot-Signale besitzen Spitzenintensitäten im Ionendichtebild resultierend aus einem oder wenigen Pixelansammlungen, die häufig diffus verteilt sind und für die keine systematische Distribution erkennbar ist. Die Intensitätswerte dieser Pixel können mehrere Vielfache der Durchschnittsintensität auf dem Gewebe betragen. Hotspots können ebenso aufgrund von Unregelmäßigkeiten auf dem Gewebe entstehen, aber auch aus softwarebedingten Rechenfehlern resultieren (Alexandrov 2012).

Basisstatistische Auswertungen gehören zum Repertoire vieler Imaging Programme. Sie ermöglichen die Berechnung von Durchschnittssignalintensitäten und Standardabweichungen für Analyten bezüglich des gesamten Scanareals oder eines definierten Segments (*engl.* Region of Interest [ROI]) im Messbereich. Die frei herunterladbare MSISReader Software bietet eine relativ einfach zu bedienende Plattform für solche Analysen an (Robichaud 2013). Werden ROIs definiert, so ist die komparative Analyse zwischen den definierten Segmenten interessant. Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt worden ist, besteht mit der SCILS Lab Software die Möglichkeit verschiedene m/z -Werte miteinander zu korrelieren und durch multivariate Verfahren wie die Hauptkomponentenanalyse den Spektraldaten Eigenwerte zuzuordnen, um sie schlussendlich in Clustern zusammenfassen zu können und bestimmten Segmenten auf dem Gewebe zuzuordnen (Trede 2012). So lassen sich Zweckbeziehungen zwischen Stoffen mit unterschiedlichen m/z erkennen und gegebenenfalls interpretieren. Diese Beziehungen können etwa zwischen dem Parent Ion eines Stoffes und seinen Addukt- und Fragmentationen erkannt werden. Möglicherweise können durch diese Herangehensweise auch neue bisher unbekannte Metaboliten eines Stoffes entdeckt werden. Durch mit morphologischen Informationen verglichenen Clusterdaten lassen sich zudem Vermutungen darüber anstellen, warum gewisse Stoffe eine Häufung in den betrachteten Segmenten aufweisen.

Mehrere Imaging Softwareprogramme haben bereits leistungsfähige Quantifizierungstools, die die Einbeziehung des internen Standards für die

Quantifizierung erlauben, entwickelt. Hierbei sind vor allem die Softwareprogramme MSIQuant (Lagarrigue 2014, Källback 2016) und Quantinetix (www.imabiotech.com) zu nennen.

Einige Imaging Programme haben auch einzigartige Tools, die sich bei anderen Programmen nicht finden lassen und für zusätzlichen Informationsgewinn sorgen können. In diesem Zusammenhang ist z.B. das Programm Mirion von der TransMIT GmbH (Gießen, Deutschland) zu nennen. Mit dieser Software lassen sich große Stacks an Ionendichtebildern in einem definierten Massenbereich relativ schnell generieren durch die gescrollt werden kann. Sind Morphologie und sonstige Strukturmerkmale der Probe vorab bekannt, so kann anhand der distinkten Verteilung eines Stoffes das zugehörige m/z selektiert und zusätzlich prozessiert werden (Farbgebung, Normalisierung, etc.). Die Ionendichtebilder können auch nach ihrer Pixeldichte auf dem Ionendichtebild (*engl.* Coverage rate) gefiltert werden. Erfahrungen zeigen, dass es sich bei generierten m/z mit Coverage rates > 80 % zumeist um Matrixionen handelt. Ein weiteres Tool ist der sogenannte fraktionale Massenfilter. Dieser Filter ist vor allem dann nützlich, wenn zielgerichteter nach bestimmten Stoffklassen gesucht wird. Es wird ein Filter für den ersten Nachkommastellenwert des hochaufgelösten m/z eingestellt. Werden beispielsweise gezielt Phospholipide gesucht, empfiehlt es sich einen fraktionalen Massenfilter von 0,4 – 0,6 einzustellen. Für weitere Informationen über Mirion wird auf die Literatur verwiesen (Paschke 2013).

Das „Image Overlay“ Tool befähigt den Anwender, das Ionendichtebild multipel mit weiteren Abbildungen zu superpositionieren. Diese können wie in Kap. 1.1 erläutert wurde, dass über ein manuelles oder digitales Lichtmikroskop aufgenommene optische Bild des gemessenen Schnittes vor und nach der Matrixapplikation oder ein entsprechend aufgenommenes histologisches Bild eines seriell geschnittenen Gewebeschnitts sein. Zudem ist der Vergleich zu einem mit MRT aufgenommenen Bild möglich. Multiple Superpositionsmöglichkeiten bieten vor allem die Programme MALDIVision von der Fa. Premier Biosoft in Palo Alto, CA, USA und die bereits vorgestellte SCILS Lab Software an.

Aus den bisher geschilderten Punkten wird deutlich, dass Imaging Software interessante Werkzeuge für die Datenprozessierung und Bildmanipulation bieten. Um

das bereits am Anfang dieses Kapitels angesprochene Problem der Kompatibilität von MALDI-Dateiformaten mit unterschiedlichen Imaging Software zu lösen, beteiligten sich im Rahmen des europäischen Verbundprojekts Computis mehrere Forschungsgruppen bei der Entwicklung eines standardisierten konvertierbaren Dateiformats (www.computis.org, aufgerufen am 01.05.19). Analog zum mzML Standarddateiformat für massenspektrometrische Daten wurde für Spektraldaten das mit Bildgebungsinformationen (Koordinaten) verknüpfte imzML (*engl.* Imaging mass spectrometry data format) Dateiformat entworfen. Das Imaging mzML Dateiformat ist folgendermaßen aufgebaut: Es besteht zu einem Teil aus einer kleinen Textdatei (.xml), die allgemeine Informationen (Metadaten) über das bildgebende Experiment (optional) enthält. Die Angaben beziehen etwa auf Proben-, Instrument-, oder Messparameter und können externen Forschern, die mit den Daten arbeiten wollen, wichtige Informationen liefern. Die zweite Komponente ist die binary Datei (.ibd) und enthält die Spektraldaten. Binary deshalb, weil je nach genutztem Massenspektrometer die Spektraldaten entweder über den „Continuous“ (z.B. TOF-Systeme) oder „Processed“ Modus (z.B. Orbitrap) gespeichert werden. Im „Continuous“ Modus werden bei den Messdaten für alle m/z (ausgewählt nach einem gewissen Toleranzfenster) Intensitäten gespeichert (auch bei Nullmessungen). Der zu den Intensitätswerten zugehörige m/z Array bleibt demnach gleich und wird nur einmalig abgespeichert. Im „Processed“ Modus durchlaufen die Spektraldaten vor dem Abspeichern noch eine Vorprozessierung wie Peak-Picking und automatische Rauschreduktion. Da diese Operation für jeden Koordinatenpunkt im Messbereich durchgeführt wird, sind unterschiedliche m/z Arrays mit Intensitätsarrays verknüpft. Die erhaltene Datenmenge ist damit größer als beim „Continuous“ Modus. Die korrespondierenden Binary und XML Dateien werden über einen Hexadezimalcode (Universially Unique Identifier, [UUID]) miteinander verknüpft (Schramm 2012).

Rohspektraldateien, die mit firmeneigener Software erzeugt werden, können durch Konverter (<https://ms-imaging.org/wp/imzml/software-tools/>, aufgerufen am 01.05.19) in imzML Datenformate überführt werden. Einige Imaging Programme, wie z.B. Image Quest, bieten bereits einen eingebauten Konverter an.

Die Etablierung dieses Datenformats ist ein weiterer Meilenstein in der Weiterentwicklung von Software für bildgebende Massenspektrometrie. Die Zahl der mit imzML kompatiblen Imaging Programme nimmt stetig zu. Ursprünglich entwickelt

für Bruker Applikationen, bietet nun auch SCILS Lab die Möglichkeit imzML Daten zu öffnen und zu bearbeiten an. Durch das imzML können Experimentaldaten von verschiedenen bildgebenden Experimenten, wie zum Beispiel der MALDI der Sekundärionen-MS (SIMS) oder Desorption-Elektrosprayionisation-MS (DESI-MS) miteinander verglichen werden. Zudem lassen sich Daten aus einem Experiment in mehreren imzML kompatiblen Imaging Programmen öffnen und so verschiedene Tools für die Bildmanipulation nutzen. Der Austausch von Messdaten zwischen klinischen und biologischen (Forschungs)einrichtungen und Anwendern wird erheblich erleichtert (Schramm 2012, *Römpf 2015). Öffentliche Datenbanken wie zum Beispiel Proteomexchange (<http://www.proteomexchange.org/>, aufgerufen am 01.05.19) (**Römpf 2015) und Metaspace (<http://metaspace2020.eu/>, aufgerufen am 01.05.19) (Palmer 2016) bevorzugen Uploads von bildgebenden Experimentaldaten im imzML Format.

Auch für die eigene vorliegende Arbeit stellte sich das Format als nützlich heraus. Um Semiquantifizierungen der MALDI Messdaten durchführen zu können, wurden Rohdaten in das imzML Format überführt und mit dem MSIRreader Programm prozessiert.

1.3 Quantitative MALDI-MSI

Die Verwendung eines internen markierten Standards für ein quantitatives bildgebendes MALDI-Verfahren (quant-MALDI-MSI) ermöglicht es Signale des zu quantifizierenden Analyten von einer externen Konzentrationsreihe und von einer unbekannt Probe auf die absoluten Oberflächenintensitäten des internen Standards zu normieren. Anschließend wird die Analyt-Signalintensität mit der Kalibrierkurve korreliert, um die absolute Oberflächenkonzentration des Analyten zu berechnen. Ein Beispiel für eine Applikation dieser Methode ist die bereits in Kap. 1.1 genannte Arbeit von Lagarrigue et. al.. Dabei wurde $^{13}\text{C}_{10}$ – markiertes Chlordecon mit einer definierten Menge in die Matrixlösung beigemischt und durch ein Sprühverfahren auf eine Leberproben von Mäusen aufgebracht, denen Chlordecan zugeführt wurde. Auf der Kontrolllebersektion befand sich eine gespottete Kalibrierreihe von Chlordecon mit unterschiedlichen Konzentrationen. Basierend auf dieser Reihe konnte eine Korrelationskurve bezüglich der auf den internen Standard $^{13}\text{C}_{10}$ -Chlordecon

normierten Signalintensitäten erstellt werden. Die unbekannte Konzentration an Chlordecon (als Hydrat detektiert), welches ebenso auf das markierte Chlordecon normiert wurde wird durch Bezug auf diese Kalibrierkurve bestimmt. Durch den Einsatz eines internen Standards konnten Effekte, die aus Inhomogenitäten auf dem Gewebe beispielsweise bedingt durch unterschiedliche lokale Kristallisation der Matrix und damit einhergehend die unterschiedliche Extraktion des Analyten, reduziert werden (Lagarrigue 2014).

In einer anderen Anwendung werden hingegen gute Übereinstimmungen (> 90 %) für die Konzentrationswerte vom Ricampifin, einem Antibiotikum gegen Mykobakterien, vom quant-MALDI-MSI Experiment und den ermittelten Konzentrationen aus den HPLC-MS/MS-Messungen für den Extrakt einer Mausleber erhalten. Die guten Übereinstimmungen konnten allerdings nur dann beobachtet werden, wenn der interne Standard sowie die analytischen Standards zuerst auf der Leber aufgetragen und die Schnitte danach mit Matrix besprüht wurden (Chumbley 2016).

Bei externen Kalibrierverfahren ohne einen internen Standard muss auf anderweitige Korrekturfaktoren zurückgegriffen werden. Von einer Arbeitsgruppe wurde dazu ein sogenannter „Gewebeextinktionskoeffizient“ (*engl.* tissue extinction coefficient [TEC]) eingeführt. Dabei wurde sowohl auf einen freien Glasträger wie auch auf das gewünschte Kontrollgewebe eine Matrix/Analyt-Mischung appliziert. Die Signalintensitäten vom Gewebe wurden in Verhältnis gesetzt zu der durchschnittlichen Intensität, welche vom Glasträger erhalten wurde. So wurde ein Faktor der < 1 liegt erhalten. Für den Analyten Propranolol wurden dabei durchschnittliche TEC-Werte von 0,38 (Ratten-Magengewebe) und 0,06 (Rattenlebergewebe) erhalten, was verdeutlicht, dass Ionensuppressionseffekte von der Oberfläche des Leberschnitts um ein Vielfaches größer sind als vom Magengewebe. Die Kalibrierreihe wurden auf dem Glasträger aufgenommen. TEC-Werte wurden mit den analytischen Signalen verrechnet und mit der Kalibrierkurve korreliert. Der Vorteil der Methode ist, dass für Geweben mit heterogenen Strukturmerkmalen unterschiedliche TEC-Werte mit den Signalen aus einem jeweiligen Segment in Beziehung gesetzt werden können (Hamm 2012).

Trotz vieler Anwendungen der quant-MALDI-MSI sollte dennoch ein kritischer Blick auf ihre Schwächen geworfen werden. Erfolgt die Applikation des internen Standards wie

in (Lagarrigue 2014) beschrieben ist, durch Beimischung zur Matrixlösung und anschließendem Auftragen über eine Sprayapplikation, so wird davon ausgegangen, dass die Extraktion des internen Standards in das Kristallgitter der Matrix vergleichbar ist mit dem Einbau des in einem Lösungsmittel als Makrotropfen aufgetragenen oder gespotteten Analyts auf dem Kontrollgewebe. Davon ist jedoch nicht auszugehen, zumal bei der Sprayapplikationen mit feinem Sprühnebel es bereits in der Luft zur Kristallisation von einem Teil der Mikrotröpfchen kommen kann (Bouschen 2010). Durch die Methode von Chumbley 2016 kann dieses Problem umgegangen werden, da hier der interne Standard sowie die Referenzstandards für die Analyten auf dieselbe Art und Weise auf die Gewebeproben aufgetragen werden. Der automatische Spotter für die Tropfen hatte eine laterale Auflösung von 250 μm , während die höchste eingestellte Auflösung für die Bildgebung bei 350 μm lag. Es ist zu erwarten, dass die Analytmigration durch das Spotten von Tropfen für hochaufgelöste Bildgebungsverfahren ($< 20 \mu\text{m}$) einen höheren Impact auf die Ergebnisse haben sollte. Aus eigenen Erfahrungen konnte zudem die Erkenntnis gewonnen werden, dass bei manuell auf das Lebergewebe aufgetragenen Tropfen (Wasser- oder Wasser-Organik-Mischungen als Lösungsmittel) der Analyt nicht gleichmäßig über das Tropfen verteilt wird. Häufig sind zum Rand des Tropfens hin höhere Signalintensitäten feststellbar. Anhand mikroskopischer Aufnahmen ist festzustellen, dass Biomaterial vom Gewebe durch Spreiten des Tropfens an den Tropfenrand transportiert wird. Es ist daher nicht von derselben Ionensuppression auf dem Tropfenareal wie auf einem nicht mit einem Makrotropfen benetzten Gewebe auszugehen. Dadurch kann sich der Signalresponse auf dem benetzten Negativkontrollgewebe zum Analyten enthaltenden Positivkontrollgewebe unterscheiden. Andere Gruppen strebten die Erhöhung der biomimetischen Natur des Experiments an, indem sie Wasser/Organik-Mischungen durch physiologische Homogenatlösungen des jeweiligen Gewebetyps ersetzen und Interne wie Referenzstandards in diese Lösungen beimengen. Allerdings wird auch durch diesen Ansatz das oben geschilderte Problem von aufgetragenen Tropfen auf dem Gewebe nicht überwunden. Auch aufgetragene Tropfen von Homogenatlösungen können die Heterogenität des gemessenen Gewebes mit unterschiedlichen Arealen der Ionensuppression nicht voll und ganz widerspiegeln. Zu guter Letzt ist noch der Aufwand quantitativer Methoden zu nennen, wenn mit einer umfangreichen Anzahl an Proben gearbeitet wird (Ellis 2014).

1.4 Hepatotoxizität von Acetaminophen (Paracetamol)

Acetaminophen [APAP], chemisch: *N*-Acetyl-*p*-aminophenol und im europäischen Raum kommerziell unter dem Namen Paracetamol vertrieben und bekannt, war im Jahre 2016 eines der meisten verkauften Arzneimittel in Deutschland. Vom Paracetamol – ratiopharm Präparat wurden 15,4 Mio. Packungen verkauft (aus: DHS, IMS Health, Jahrbuch Sucht, Mai 2018, S. 89f).

APAP hat einen fiebersenkenden (antipyretischen) und schmerzstillenden (analgetischen) Effekt auf den Wirkorganismus. Die therapeutischen Effekte werden vor allem auf die Hemmung unterschiedlicher Cyclooxygenasen (COX) zurückgeführt, wodurch die Bildung pyretisch oder algetisch wirkenden Prostaglandinen gehemmt wird (Flower 1972, Hinz 2008). Gleichzeitig soll es serotonerge Signale verstärken (Pickering 2008), und mit dem Endocannabinoidsystem wechselwirken, indem es den Abbau analgetisch wirksamer Cannabinoide hemmt (Anderson 2008).

In der Presse wird häufig von Unfällen durch zu häufige Einnahme von Einzeldosen aber auch Suizidversuchen durch Überdosierung von APAP berichtet. Einige Forscher fordern aufgrund möglicher und erheblicher Nebenwirkungen die Einführung der absoluten Rezeptpflicht auch für geringe Mengen (<http://www.spiegel.de/gesundheit/diagnose/paracetamol-forscher-fordern-rezeptpflicht-a-995812.html>, aufgerufen am 10.06.19). Eine Rezeptpflicht für den Erwerb von Mengen über 10 g wurde bereits seit April des Jahres 2009 eingeführt (Arzneimittelverschreibungsverordnung vom 21.12.2005, S. 14 und 37, Bundesministerium der Justiz und Verbraucherschutz und Bundesamt für Justiz).

In einer Studie wurde berichtet, dass ein Sechstel aller registrierten Patienten für eine Lebertransplantation aufgrund akutem Leberversagens Geschädigte mit einer übermäßigen Einnahme an APAP waren (Gülmez 2015).

Paracetamol wird im humanen Körper gut absorbiert; die Bioverfügbarkeit bei oraler Einnahme erreicht Werte > 85 % und das Arzneimittel geht relativ schnell in die systemische Blutzirkulation über (Hodgman 2012).

APAP wird in den Hepatozyten der Leber durch enzymatische Katalyse mit Uridin-5'-diphosphoglucuronosyltransferasen (UDP-GT) bzw. Sulfotransferasen (SULT) in die wasserlöslicheren Formen APAP Glucuronid (APAP-GLC) und APAP Sulfat (APAP-

SUL) überführt und (größtenteils) über Niere oder Galle ausgeschieden (Mutlib 2006, Runge-Morris 2009). Ein Teil des APAPs wird auch unverändert ausgeschieden. Bei Aufnahme von Mengen, die die therapeutischen Dosen deutlich überschreiten, wird von einem zunehmenden Teil des APAPs durch enzymatische Oxidation mit Cytochrom P450 Enzymen das Acetaminophen *N*-Hydroxamid in der Leber gebildet aus dem durch Dehydratisierung das hoch-reaktive Phase-I-Metabolit *N*-Acetyl-*p*-Benzochinonimin (NAPQI) entsteht. Einige Studien bezweifeln allerdings die Bildung von intermediärem APAP *N*-Hydroxamid und verweisen stattdessen auf eine Zweielektronenoxidation des APAPs zum NAPQI (Hinson 1981, Fisher 1985). Das NAPQI Metabolit wird hauptsächlich durch das körpereigene Glutathion entgiftet. Bei großen Mengen an gebildetem NAPQI und Überschreiten der Entgiftungskapazitäten der Leber reagiert das NAPQI mit endogenen Biomolekülen, wobei es vornehmlich zur Adduktbildung mit hepatischen Proteinen vom Cytosol oder von den Mitochondrien der Hepatozyten kommt (Wilson 1982, Hinson 2004). In einer Studie wird außerdem berichtet, dass reaktive Intermediate des APAPs die Selenocystein-Einheiten der Thioredoxin-Reductase Enzyme TrxR1 und TrxR2 im Cytosol wie auch in den Mitochondrien angreift und damit die antioxidative Aktivität dieser Enzyme inhibiert wird (Jan 2014). Bei Vergiftungen wird Überdosis Patienten als Gegenmittel *N*-Acetyl-3-cystein (NAC) verabreicht (Heard 2008).

Durch Konjugation mit dem Glutathion, teilweise katalysiert durch Glutathion S-transferasen (GSTs), wird das Acetaminophen Glutathion Konjugat (APAP-GSH) gebildet. In der Folge kann dieser durch Hydrolyse zum 3-Cysteinylnacetaminophen (APAP-CYS) und anschließender Acetylierung zum *N*-Acetyl-3-cysteinylnacetaminophen (APAP-NAC) abgebaut werden. Diese Verbindungen werden vom Organismus zumeist renal ausgeschieden (Mazaleuskaya 2015). Ein deutlich kleinerer Anteil des APAPs kann auch über einen alternativen Phase-II-Weg über das Acetaminophen Catechol zum 3-Methoxyacetaminophen (APAP-OME) übergehen (Wilson 1982, Dahlin 1984). Die Entstehung weiterer Nebenmetaboliten wie des *N*-Acetyl-meta-aminophenols (AMAP), 3-Nitroacetaminophens, Di-Acetaminophens (Di-APAP) etc. sollte nicht unerwähnt bleiben. Diese Nebenmetaboliten spielen aber für die Pharmakologie des APAPs eine eher untergeordnete Rolle (Bales 1984, Hadi 2013, Trettin 2014a).

Warum die Bildung von APAP Proteinaddukten zum Absterben von Leberzellen führt, soll hier kurz erläutert werden: Durch Reaktion von NAPQI mit Leberproteinen kommt es insbesondere in den Mitochondrien der Hepatozyten zum oxidativen Stress durch vermehrte Bildung/Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies (z.B. $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2) (engl. Reactive Oxygen Species [ROS]) (McGill 2012), wodurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird. Zunächst erfolgt die Aktivierung der c-Jun N-Terminal Kinase. Diese lagert sich in den Mitochondrien an und verstärkt ihrerseits den oxidativen Stress. Dadurch wird die Translokation des Bax Proteins in die Mitochondrien katalysiert. Bax führt zu Veränderungen in der Permeabilität der mitochondrialen Membran und leitet dadurch den programmierten Zelltod der Hepatozyten ein (Ramachandran 2017, Hu 2016, Sezgin 2018).

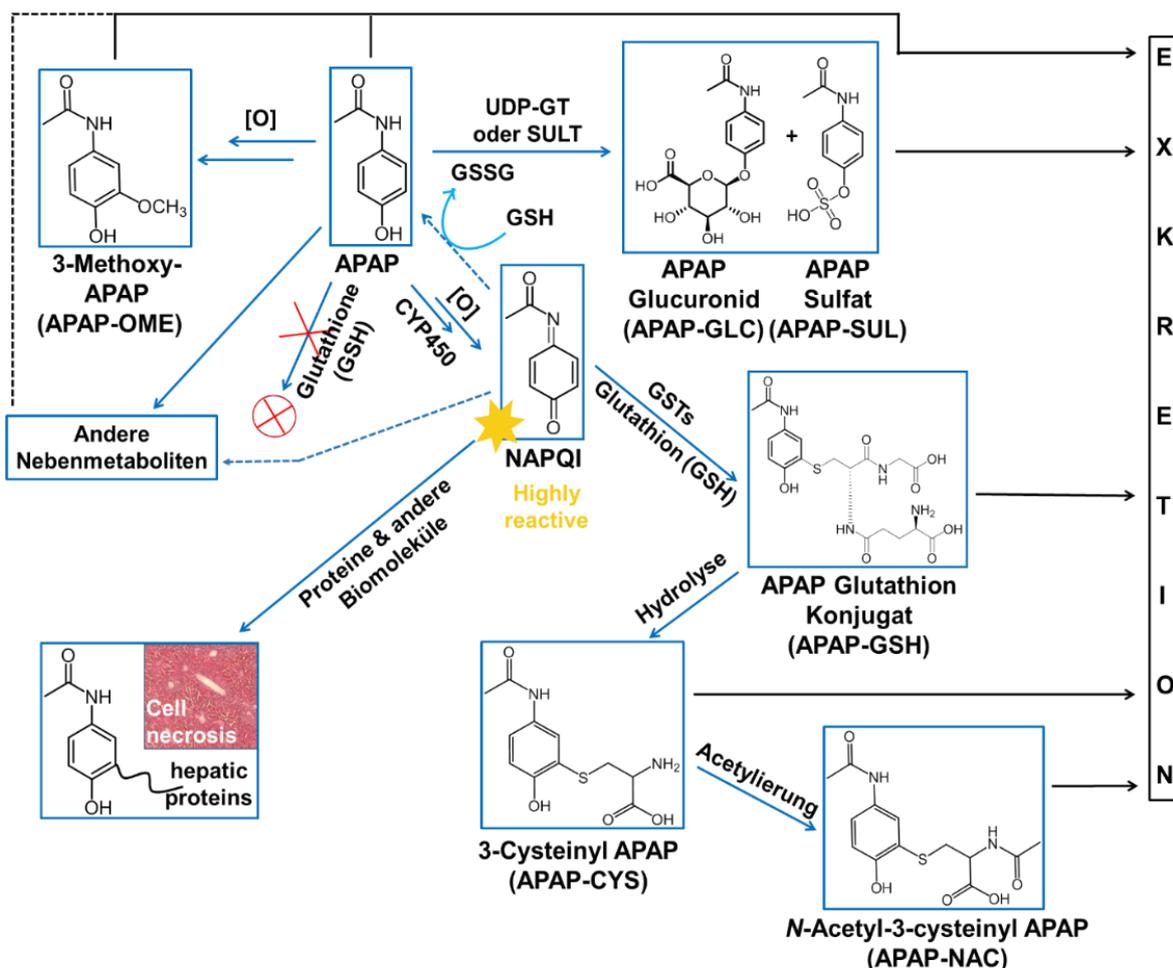


Abbildung 1: Metabolismus des Acetaminophens in Säugetieren

In einigen Studien wird auch auf die Relevanz entstehender reaktiver Stickstoffspezies (*engl.* Reactive Nitrogen Species [RNS]) für die Acetaminophen Toxizität eingegangen, was ebenso mit mitochondrialem oxidativem Stress verknüpft ist. Immunhistochemische Analysen stießen in den Zellen im zentrilobularen Bereich der Leber, in denen sich Acetaminophen-Proteinaddukte gebildet hatten, auf Nitrotyrosin. Es wurde festgestellt, dass sich das Nitrotyrosin nach der Formierung von APAP-Protein Addukten gebildet hatte. Für die Entstehung des Nitrotyrosins wird die Reaktion von Tyrosin mit Peroxonitrit (ONOO^-) vermutet. Das Peroxynitrit selbst ist ein Produkt aus einer schnellen spontan ablaufenden Reaktion zwischen dem Nitrosylradikal NO^\bullet und dem Superoxid $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Hinson 1998, Knight 2001, Hinson 2004, Mello 2016). Abhängig von ihrer Reaktivität verteilen sich ROS und RNS durch Diffusionsvorgänge sowohl intra- als auch interzellulär, sorgen lokal für Veränderungen der Reduktions-Oxidations-Gleichgewichte in den Zellen und können ebenso zu lokalen strukturellen Schäden an den Zellorganellen und der gesamten Zelle führen (Mello 2016).

1.5 Metabolische Zonen im Leberlobul

Ein wichtiges Merkmal der Leberphysiologie ist, dass sie eine metabolische Zonierung bezüglich Stoffwechselfvorgängen wie den Biosynthesen und Abbauzyklen endogener Stoffe aber auch der xenobiotischen Metabolisierung aufzeigt. Wie schon erwähnt wurde, sind Cytochrom P450 Enzyme, davon vornehmlich der Untertyp CYP2E1, an der metabolischen Aktivierung des APAPs zum NAPQI beteiligt. In der Regel haben die CYP Enzyme aber die Aufgabe an der Entgiftung vieler Verbindungen in für die Physiologie des Organismus erträgliche Level mitzuwirken, bevor diese in den systemischen Blutkreislauf gelangen (Hoehme 2010). Die Leber ist dabei folgendermaßen in den Blutkreislauf integriert: Über die Leberpfortader (Portalvene) wird nährstoffreiches Blut aus dem Magen-Darm-Trakt, von der Milz, Gallenblase und Bauchspeicheldrüse zur Leber transportiert. Diese mischt sich mit dem sauerstoffreichen Blut von der hepatischen Arterie, die das Blut vom Herz transportiert und über Sinusoide in der Leber verteilt. Die ausgehenden Zentralvenen vereinigen sich zur hepatischen Vene und transportieren das Blut von der Leber zum Herzen zurück, wodurch der Kreis der systemischen Blutzirkulation für die Leber geschlossen

wird (Bechstein 2018). Um ein Verständnis über die metabolische Zonierung zu entwickeln, muss der Aufbau des Lebergewebes näher betrachtet werden: Die Leber ist aus annähernd hexagonalen Läppchen (Leberlobulen), die Durchmesser um die 300 µm besitzen (Hoehme 2010), konstituiert. CYP450 Enzyme werden präferentiell in den sog. Pericentralen (PC) Zonen dieser Läppchen exprimiert. Diese Zone ist peripher um die Zentralvenen situiert (Godoy 2013). Diesem schließen sich eine mittlere (MZ) und periportale (PP) Zone an. Die Portaltriade bestehend aus der Portalvene, der hepatischen Arterie und dem Gallengang befindet sich in der letzteren Zone. Viele Stoffwechselforgänge laufen in den Hepatozyten ab, die das Grundgerüst der Läppchen bilden und wie Perlen an einer Kettenschnur aus mehreren benachbarten Einheiten aufgebaut sind und an der Zentralvene münden (Godoy 2013). Ganze Hepatozyten von Mäusen haben Durchmesser um die 20 µm und besitzen zumeist ein oder zwei Zellnuclei mit Ausmaßen um die 7 – 12 µm (Martin 2002). Das Blut fließt von der PP in Richtung der PC Zone; beim Durchlaufen des Läppchens nimmt der Sauerstoffpartialdruck um ca. 1/3 ab (von 60 – 70 mmHg auf 25 – 35 mmHg) (Allen 2003). Neben dem sinusoidalen Netzwerk (Abb. 2B), welches das Leberläppchen durchsetzt, existiert ein feines Netzwerk aus den *Canaliculi biliferi* (Gallencanaliculi), die Verbindungen, wie z.B. Gallensäuren von den Hepatozyten aufnehmen und in Richtung der größeren Gallengänge in der PP-Zone transportieren. Die Gallencanaliculi haben Durchmesser um die 1 µm. Die Leber ist über den sogenannten enterohepatischen Kreislauf mit der Gallenblase und dem Duodenum verbunden (Boyer 2013). Primär finden Biotransformationen von Stoffen vor allem in der Leber und im Darm statt; die physikochemischen Eigenschaften der Stoffe beeinflusst ihre Resorption über den Darm bzw. ihren Übergang in den Blutkreislauf maßgeblich (Martinez 2002).

Weitere leberspezifische Zellen sind vor allem die sogenannten hepatischen Sternzellen, die sich vorwiegend im Dissé-Raum zwischen den Hepatozyten und den sinusoidalen Endothelzellen aufhalten, die Kupffer-Zellen in den Sinusoiden und die Fibroblasten in der PP Zone. Für Informationen über ihre Funktionen und ihre Rolle bei Entgiftungsmechanismen wird auf die Literatur verwiesen (Jaeschke 2002, Roberts 2007, Godoy 2013).

Basierend auf intelligenten mathematischen Modellierungssystemen unter Einbeziehung experimenteller Daten, werden Anstrengungen zur Erstellung „virtueller

Organismen“ am Rechner unternommen, welche möglichst realitätsnahe Vorhersagen über metabolische Umwandlungen, Intoxikations- und Regenerationsmechanismen der Leber ermöglichen sollen. In einer Studie wurde ein mathematisches räumlich-temporales Modell für die Tetrachlormethan (CCl₄) Vergiftung und die anschließende Regeneration des Leberläppchens entworfen.

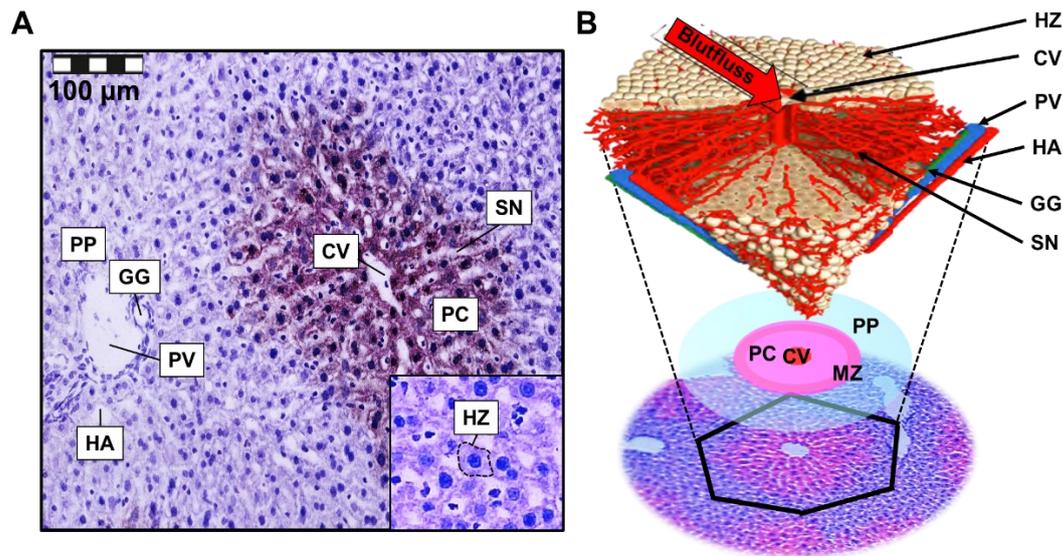


Abbildung 2: Aufbau eines Leberläppchens und des Lebergewebes mit schematisch dargestellter metabolischer Zonierung.

2A: CYP2E1-Antikörperfärbung eines Mausleberschnitts. 2B: Computermodell eines Leberläppchens und stark vereinfachte schematische Zonierung. PP: Periportale Zone, MZ: Mittlere Zone, PC: Pericentrale Zone, CV: Zentralvene, PV: Portalvene, HA: Hepatische Arterie, GG: Gallengang, SN: Sinusoid, HZ: Hepatozyt. (Abbildung des computermodellierten Lebers mit freundlicher Genehmigung vom IfaDo eingefügt)

Von experimenteller Seite her wurde dazu zunächst die Geometrie des Läppchens rekonstruiert. Durchschnittliche Anzahl und Größe der Hepatozyten und Hepatozytenreihen wurden den einzelnen Zonen (PP, MZ, und PC) zugeordnet. Es folgten die kinetische Betrachtung der Zelltodvorgänge und der Bromdesoxyuridin Inkorporation in die Zellen, um das Zellwachstums für alle relevanten Zonen des Leberläppchens zu erfassen. Diese Messdaten wurden zur Rekonstruktion eines computergestützten Modells genutzt, in dem das Verhalten einzelner Zellen definiert nach einzelnen Parametern (Migrationsaktivität, Polarität, Zellteilung zu einem gegebenen Zeitpunkt, Fähigkeit zur Reihenbildung etc.) untersucht wurden. Die

Modellierung hat gezeigt, dass es anfänglich zu Zerstörungen von Hepatozytschichten peripher um die Zentralvene in der PC Zone am Tag der CCl₄ Applikation kommt. Gebietsweise kommt es bis Tag 3 auch außerhalb der PC Zone zum Verlust der strukturellen Integrität in den Zellen des Läppchens. Bereits ab Tag 2 sind Regenerationsprozesse beginnend in der PC Zone zu beobachten. Die Zellproliferation weitet sich ab Tag 4 auch auf die peripheren Bereiche aus, und am siebten Tag ist die Leber nahezu komplett regeneriert. Besonders ausschlaggebend für die Regeneration der Zellen und des Ensembles waren insbesondere die Parameter Polarität und Orientierungsfähigkeit der Zellen in ausgerichteten Reihen (Hoehme 2007). In einer weiteren Studie wird ein metabolisches Modell mit einem räumlich-zeitlichem Modell kombiniert, um z.B. den Umsatz des Ammoniaks bei der Entgiftung in der Leber zu berechnen. So konnte das Modell adäquate Vorhersagen für die Konzentration der Metabolite, die bei der Ammoniakvergiftung und darauffolgender Leberregeneration entstehen, für verschiedene Zeitpunkte in der hepatischen Vene treffen, wobei die Inflow-Konzentrationen des Ammoniaks durch die Pfortader experimentell ermittelt und feste Werte in die Berechnungen einbezogen wurden (Schliess 2014). In einer anderen Forschungsarbeit führten die Berechnungen der Ammoniakumsetzung in der Leber die Forscher auf die Spur einer anderen Verbindung, die eine erhebliche Rolle bei der Ammoniakdetoxifikation spielen soll (Ghallab 2016).

Zur Ermittlung der räumlich-zeitlichen Verteilung von Xenobiotika entlang des Lebergewebes dienen in den oben beschriebenen Beispielen in der Regel histologische Färbemethoden als empirische Informationsquellen. Diese Methoden liefern allerdings keine abstrakten Informationen zu den betrachteten Stoffen selbst und sind daher als „indirekte“ Belege für die Verteilungen der Stoffe zu betrachten.

Bildgebende Verfahren wie die HR-MALDI-MSI bieten hingegen die Möglichkeit akkurate molekulare (Struktur)informationen zu den betrachteten Analyten zuzuordnen. Da bei einer MALDI-MSI Messung häufig auch eine Vielzahl weiterer Verbindungen detektiert wird, können Beziehungen und Einflüsse des Xenobiotikums mit und auf endogene Substanzen zusätzlich untersucht werden.

Experimentaldaten aus bildgebenden massenspektrometrischen Verfahren liefern damit sinnvolle Erkenntnisse zur Erstellung von Computermodellen bzw. auch für deren kritische Überprüfung.

1.6 Ziel der Arbeit

Für APAP, seine Addukte und Metaboliten existierten bisher keine direkten Informationen bezüglich ihrer räumlich-zeitlichen Verteilung im Lebergewebe. Das Ziel dieser Arbeit war es daher dieser Frage anhand eines Tiermodellversuchs nachzugehen.

Die vorhandene Instrumentierung ermöglichte bildgebende Messungen mit einer unter ambienten Bedingungen und atmosphärischem Druck arbeitenden MALDI-Quelle imagine10™ von der TransMIT GmbH in Gießen, Deutschland, die räumlich hochaufgelösten Messungen $< 10 \mu\text{m}$ erlaubt. Die Quelle ist an einen Q Exactive™ Massenspektrometer von Thermo Scientific in Bremen, Deutschland, gekoppelt, wodurch eine hohe Massenauflösung bis 140.000 @ m/z 200 einstellbar ist. Damit erfüllt die AP-SMALDI Q Exactive (*engl.* Atmospheric Pressure-Scanning Microprobe MALDI) Apparatur die volle technische Voraussetzung für die Analytik kleiner Moleküle, wie sie hier im Projekt für APAP und seine Biotransformationsprodukte wie auch möglicher endogener Substanzen, die von der APAP Intoxikation affiziert werden, erfolgen soll. Dennoch kann die Analytik solcher kleinen Moleküle $< m/z$ 500 trotz der hohen Massenauflösung den analytischen Chemiker (Anwender) vor ernsthafte Herausforderungen stellen. Damit die Erfassung möglichst vieler relevanter Informationen aus dem MALDI Experiment gelang, mussten Probenpräparations- und Messprotokolle aufwändig optimiert werden. Die optimierte Methode sollte die Detektion der untersuchten Stoffe interferenz- und artefaktfrei erlauben, damit es nicht zu Verfälschungen der Messergebnisse in den Ionendichtebilder kam. Die Lokalisation der verschiedenen metabolischen Pfade des APAPs im Lebergewebe war dabei das vordergründige Ziel. Zunächst stand die Detektion des NAPQIs aus dem Phase-I-Metabolismus im Fokus. Die Möglichkeit, dass NAPQI trotz seiner Reaktivität stabilisiert werden könnte und noch hinreichend noch nicht abreagiertes NAPQI im Positivkontrollgewebe vorkommt, wurde von vorneherein nicht ausgeschlossen. Von

daher wurden mehrere Ansätze zur Derivatisierung des NAPQIs, u.a. auch durch eine neuartige Derivatisierungsmethode durch Begasung mit H₂S Gas unternommen.

Basierend auf den gesammelten Erkenntnissen aus mehreren Vorversuchen, wurde ein sinnvolles experimentelles Set-Up in Zusammenarbeit mit dem IfaDo herausgearbeitet: Labormäusen, denen APAP in die Bauchhöhle injiziert wurde, wurden Leberproben in einem kinetischen Experiment in den Zeitpunkten 0*, 5, 15, 30, 60, 120, 240 und 480 min entnommen. Die Injektionsmenge in diesem Versuch war 300 mg kg⁻¹ Körpergewicht und lag damit in der Nähe der mittleren letalen Dosis (LD50) für Mäuse bei oraler Aufnahme von APAP (Kadatz 1965). In einem dosisabhängigen Versuch wurden Mäusen zwei niedrigere Dosen, nämlich 56 und 167 mg kg⁻¹ und eine für die meisten Versuchstiere tödlich endende Dosis von 500 mg kg⁻¹ Körpergewicht injiziert und die Leberproben nach 30 min der Injektion entnommen. Mit dem ersten Experiment werden neben der räumlichen auch die zeitliche Verteilung der Analyten demonstriert, während in dem zweiten Experiment die Effekte unterschiedlicher Dosen untersucht werden sollte.

Spektraldaten aus de wurden mit histologisch gefärbten Schnitten (CYP2E1 Immunfärbung) korreliert, um die metabolischen Zonen (PP und PC Zonen) voneinander unterscheiden zu können. Es wurden serielle Schnitte aufgenommen, damit ein morphologischer Vergleich der Schnitte möglich wurde. Weitere Gewebeschnitte wurden zusätzlich noch mit der Hämatoxylin-Eosin Färbung akzentuiert, um Bereiche mit Zelltod zum Beispiel durch Zellkernfragmentierung zu visualisieren.

Begleitend zu den MALDI-Ergebnissen wurden APAP und seine Umwandlungsprodukte und zudem Taurocholate aus dem Blutplasma quantifiziert. Die Probenentnahmen erfolgten analog zu den Zeitpunkten der Leberentnahme. Blutproben wurden aus der Pfortader, hepatischen Vene und der rechten Herzkammer beprobt. Für das quant-HPLC-MS Screening wurde eine chromatographische Methode entwickelt. Außerdem erfolgten die Bestimmung von Leberwerten, die Quantifizierung von GSH in Homogenatlösungen von der Leber und die Berechnung pharmakokinetischer Parameter basierend auf quantifizierten Konzentrationen vom HPLC-MS Experiment.

Für die Differenzierung von APAP und seiner Biotransformationsprodukte auf dem Lebergewebe in Bezug auf die relevanten metabolischen Zonen wurden relative Quantifizierungsoperationen für die Analytsignale durchgeführt. Dadurch ließ sich der Differenzierungsgrad der Analyten bezüglich der Zonen determinieren.

Ein weiteres Untersuchungsfeld der Arbeit sind die Auswirkungen der APAP Intoxikation auf die Gallensäureverteilung, u.a. von Taurocholsäure (TCS), in den von der Hepatotoxizität betroffenen Bereichen der Leber.

Ferner soll diese Doktorarbeit die sinnvolle Verknüpfung von Informationen aus drei unterschiedlichen Imaging Programmen demonstrieren, die ihre Beiträge zur Bearbeitung der Forschungsfragen leisteten.

Schlussendlich werden die Ergebnisse aus allen Teilexperimenten sinnvoll miteinander verknüpft und diskutiert. Prognosen, Konzepte und Modellierungen aus der Literatur bezüglich Substanzen, die ein zentrilobulares Schadensbild wie APAP hervorrufen, werden im Lichte der neuen Erkenntnisse diskutiert. Abgerundet wird die Arbeit mit einer finalen Beurteilung der entwickelten Messmethode auch hinsichtlich höherer Durchsatzfähigkeit und damit einer möglichen Anwendbarkeit in der klinischen Diagnostik.

2. Voruntersuchungen, Optimierungen und Konzeption des kinetischen und dosisabhängigen Experiments

2.1 Leberextraktion und Messung via HPLC-MS

Sowohl die ESI- als auch die MALDI-Ionisation werden als sanfte Ionisationsmethoden bezeichnet, weil wenig bis kaum auftretenden Fragmentierungsereignissen für das Molekülion. Die Ionisationsgüte für die untersuchten Analyten ist häufig erfahrungsgemäß vergleichbar, wobei es geringe Unterschiede geben kann, wie z.B., dass die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von doppelt- und mehrfach geladenen Ionen über die ESI wahrscheinlicher ist als über die MALDI-Ionisation.

Daher bot es sich zunächst als Vorversuch an, Leberproben von Mäusen mit und ohne APAP Injektion zu extrahieren und unter Einbeziehung der chromatographischen Dimension, welche in der MALDI-Technik fehlt, zu analysieren. Verbindungen von Interesse wurden über ihre monoisotopischen m/z und Referenzstandards (Di-APAP nur tentative über das m/z) identifiziert. Anhand der Ergebnisse konnte vorab eine qualitative Einschätzung gewonnen werden, welche Substanzen in der Leber gebildet wurden.

Extrakte aus negativem Kontrollleber (keine APAP Injektion) und Leber von Mäusen, deren Leber nach 30 min APAP Injektion entnommen worden (Applikationsmenge: 300 mg mL⁻¹) wurden miteinander verglichen. Das Extraktionsverfahren ist im Kapitel 5.1.1 beschrieben.

In den folgenden Abbildungen 3 – 5 werden die Chromatogramme für die Analysen zu den Extrakten aus APAP positiven und APAP negativen Proben gegenübergestellt.

Acetaminophen wurde mit relativ hohen Signalintensitäten (> E6) detektiert. Offensichtlich lag ein nicht unwesentlicher Teil des Arzneimittels zu diesem Zeitpunkt in der Leber in noch umgewandelter Form vor. NAPQI und APAP-*N*-hydroxamid konnten anhand der Chromatogramme nicht nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass wie schon oben in der Einleitung diskutiert worden ist, das NAPQI nur von einem geringen Teil des verabreichten APAPs gebildet wird und aufgrund seiner hohen Reaktivität zügig weiterreagiert.

Die Detektion des APAP-GSHs und seines Breakdown-Produkts APAP-NAC offenbarten, dass sich NAPQI und auch APAP-CYS zwischenzeitlich gebildet haben sollten. APAP-CYS wurde lediglich als In-Source Fragment aus dem APAP-NAC detektiert. Die Hauptmetaboliten APAP-GLC und APAP-SUL wurden ebenso gebildet.

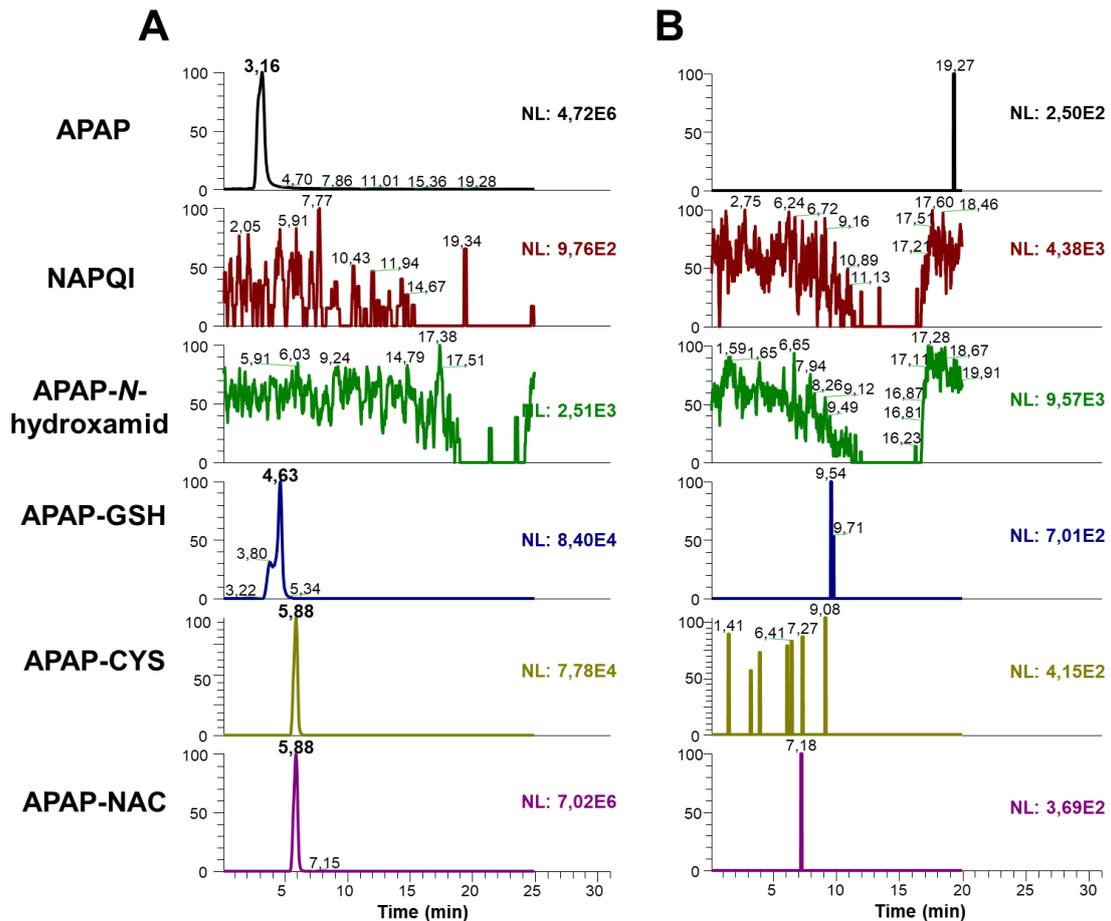


Abbildung 3: APAP und Addukte vom Aktivierungspfad über die Bildung des NAPQIs.

NAPQI, APAP-*N*-hydroxamid, APAP-GSH, APAP-CYS und APAP-NAC aus HPLC-MS Messungen vom Leberextrakt. Isolation der XICs mit einem Toleranzfenster von ± 2 ppm. 3A: Positive Leberkontrolle (nach 30 min APAP Injektion). 3B: Negative Leberkontrolle (keine APAP Injektion).

Das Nebenmetabolit APAP-OME konnte nicht nachgewiesen, hingegen aber zwei Isomere des Di-APAPs tentative zugeordnet werden.

Zumal auch die Auswirkungen der APAP-Intoxikation auf die Zirkulation der Galle in der Leber untersucht werden sollte, sind u.a. auch die Signale der Taurocholsäure (TCS) und Taurochenodeoxycholsäure (TCDS) und ebenso von deren Präkursor Taurin in den Chromatogrammen dargestellt.

Das ebenso detektierte Primärmetabolit Glutamin steht in enger Beziehung mit der Glutathionsynthese in der Leber und hat ebenso einen toxisitätsmindernden Effekt bei

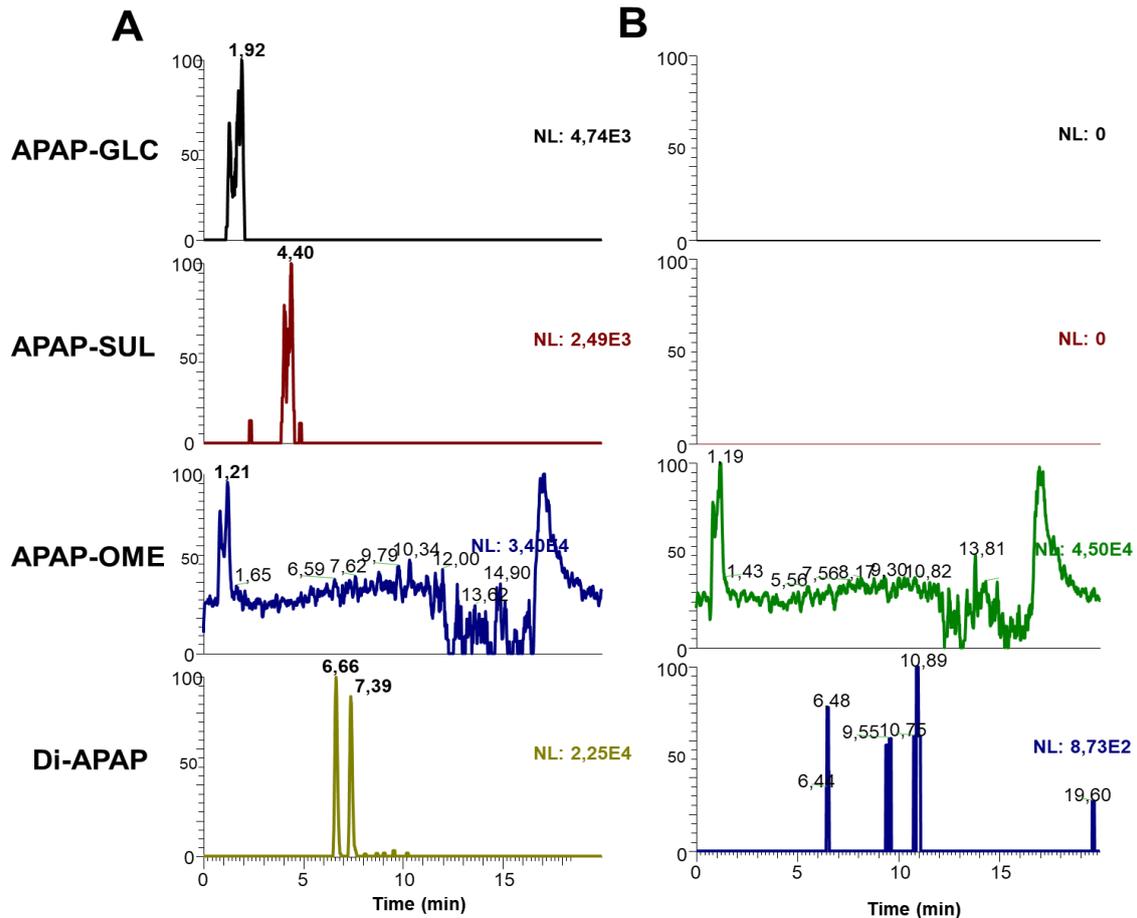


Abbildung 4: APAP und Metaboliten vom Phase-II Metabolismus.

APAP-GLC, APAP-SUL, APAP-OME. Außerdem gezeigt: Di-APAP. HPLC-Messungen vom Leberextrakt. Toleranzfenster ± 2 ppm. 4A: Positive Leberkontrolle (nach 30 min APAP Injektion). 4B: Negative Leberkontrolle (keine APAP Injektion).

APAP-Intoxikationen (Hong 1992, Brovedan 2018). Mit Ausnahme des DI-APAPs erfolgte die Zuordnung der Stoffe über kommerziell erhältliche Referenzstandards.

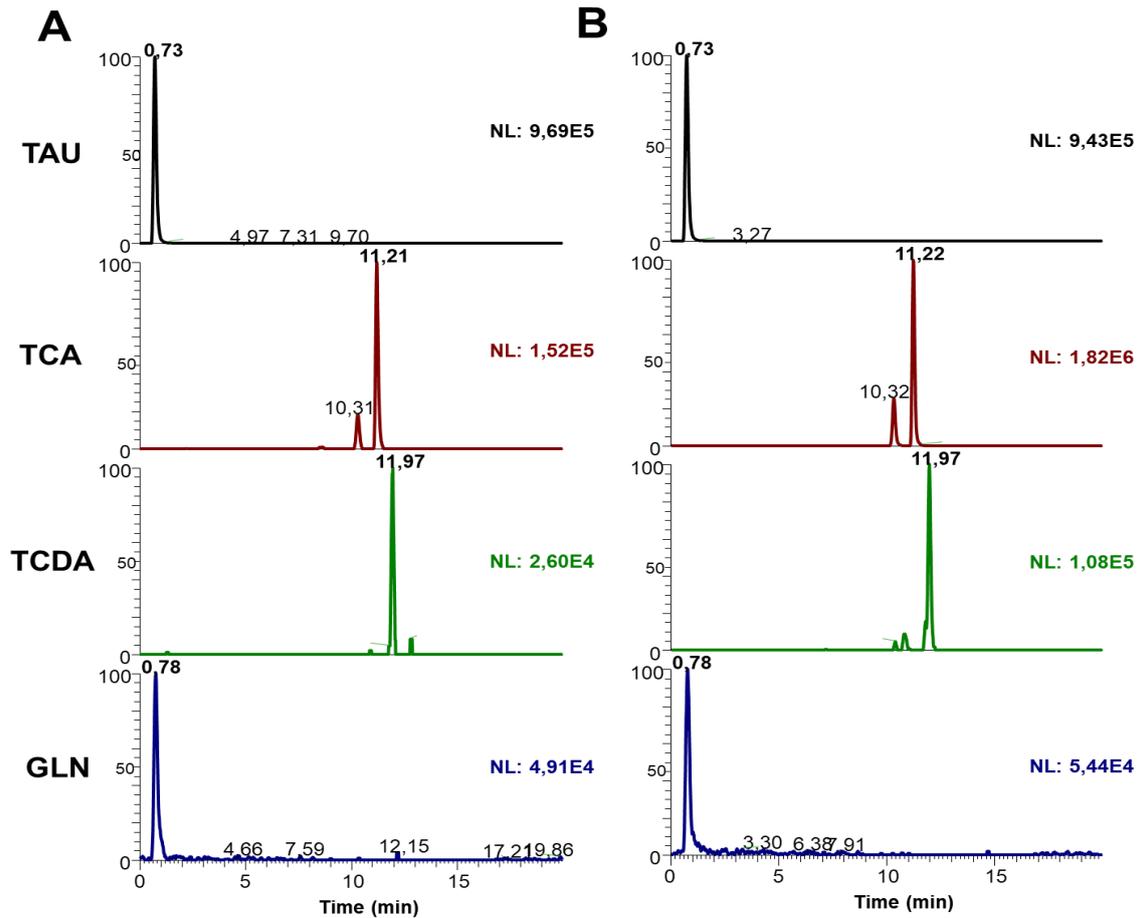


Abbildung 5: Bedeutende Verbindungen für Stoffwechselforgänge in der Leber.

Taurin (TAU), TCS, TCDS und Glutamin (GLN). 5A. (nach 30 min APAP Injektion).
5B: Negative Leberkontrolle (keine APAP Injektion).

2.2 Untersuchungen zur Realisierbarkeit der Detektion von NAPQI via MALDI-MSI

2.2.1 Transformation des NAPQIs in Pufferlösung und in Methanol

Zunächst wurde untersucht, wie die Analytik von NAPQI unter HPLC-ESI-MS Bedingungen aussieht, wenn NAPQI sowohl in physiologischer PBS Puffer Lösung (pH=7,4) (s. Kapitel 5.1.2) als auch in nicht-physiologischer methanolischer Lösung angesetzt und gemessen wird. Dazu wurde ein NAPQI Standard (99 %) von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH in Steinheim, Deutschland, verwendet. Lösungen mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ NAPQI wurde in beiden Medien hergestellt. Die Messung via HPLC-ESI-MS erfolgte sofort nach dem Ansetzen der Lösungen. Das

NAPQI wird dabei mit einem Retentionszeit-Shift von ca. 0,2 min (R_t : 4,55 min) zum APAP (R_t : 4,37 min) detektiert. Wird angenommen, dass NAPQI und APAP einen

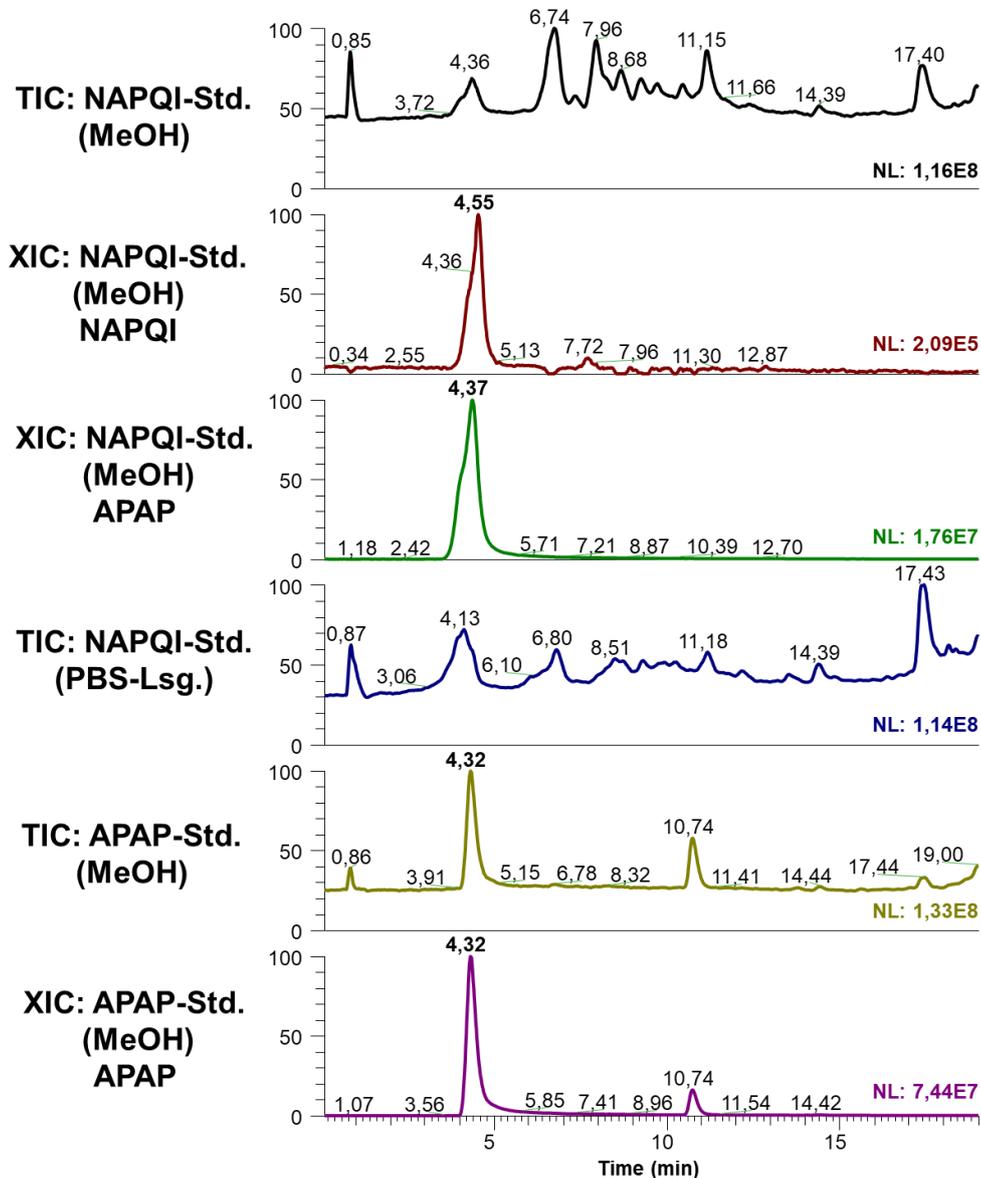


Abbildung 6: NAPQI in PBS- und methanolischer Lösung verglichen mit APAP in MeOH

Angesetzte Konzentrationen: jeweils $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

annähernd ähnlichen Responsefaktor für die angewandte Technik besitzen, könnte interpretiert werden, dass wahrscheinlich ein überwiegender Teil des NAPQIs durch (Auto)reduktion in PBS- oder methanolischer Lösung zum APAP übergeht. Anhand

des faktoriellen Intensitätsverhältnisses wurde ein Unterschied von fast 85 zugunsten des APAP beobachtet. Daneben findet sich eine große Zahl weiterer relativ abundanter Peaks in beiden NAPQI Standardlösungen, auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Das APAP selbst ist relativ reaktionsträge und wenn vom Peak bei der R_t 10,7 min im Chromatogramm abgesehen wird, ist der Standard relativ rein. Dieses Signal konnte nicht sinnvoll zu einem Addukt, Fragment, Kondensat, Oligomer oder sonstigem Umwandlungsprodukt des APAPs zugeordnet werden. Das NAPQI ist, wenn überhaupt nur in Spuren zu finden. Möglicherweise resultieren diese Spuren aufgrund von Kontamination des APAP Standards mit NAPQI oder aus einer geringen (Auto)oxidation des APAPs zum NAPQI.

Es ist nicht davon auszugehen, dass die zwischen 6 bis 18 min detektierten abundanten Peaks von Verunreinigungen im NAPQI Standard resultieren können, zumal der Lieferant einen Reinheitsgrad von 99 % für sein Produkt angibt. Weitere Information betreffend der Stabilität von NAPQI sind angegeben: NAPQI wurde unter Schutzatmosphäre verpackt (Argon) verpackt und ist empfindlich gegenüber Luft, Feuchtigkeit und Licht ([https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/a7300?lang=de®ion=DE&gclid=EAlaIqobChMI0tHOiKny3QIVRbTtCh0Amg-
EAAYASAAEgL4g_D_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/a7300?lang=de®ion=DE&gclid=EAlaIqobChMI0tHOiKny3QIVRbTtCh0Amg-
EAAYASAAEgL4g_D_BwE), aufgerufen am 29.08.18).

Zudem ist NAPQI eine Elektronenmangelverbindung, welches aus einer Zwei-Elektronenreaktion und zweifacher Deprotonierung aus dem APAP unter Beteiligung katalytischer Spezies wie der CYP 450 Enzyme gebildet wird (Hinson 1981).

Vermutlich hat NAPQI ähnlich wie bei *para*-Chinonen ein hohes Bestreben reduziert zu werden, insbesondere in polaren und protischen Lösungsmitteln (z.B. H_2O und $MeOH$). Für *p*-Chinone werden dabei in der Literatur sukzessive Kaskaden aus Protonierungs- und (Einzel)elektronentransfers postuliert (Bauscher 1992, Van de Vondele 2006).

Vergleichbar ablaufende Redoxvorgänge über transiente Radikalspezies sind ebenso für den Übergang des APAPs zum NAPQI und umgekehrt zu erwarten. Es wird in der Literatur von möglichen zwischenzeitlich entstehenden radikalischen Spezies, den *p*-Benzosemichinonimininen und ebenso von einer radikalischen Aktivierung des NAPQIs über Einzelelektronen-Transfer Reaktionen (*engl.* Single Electron Transfer Reaction [SET]) berichtet (Fischer 1984, Potter 1985, Potter 1987, Parkinson 2013). *In vivo* kann

NAPQI auch über eine Redoxreaktion mit reduziertem GSH, wobei oxidiertes Glutathion (GSSG) entsteht oder durch Interaktion mit dem Redoxpaar NADPH/NADP, direkt zum APAP reduziert werden. Möglich sind auch Komproportionierungsreaktionen des APAPs mit dem NAPQI zu den *p*-Benzosemichinonimininen und umgekehrt Disproportionierungen der Radikale zu diesen beiden Spezies (Potter 1986).

Dass CYP P450 Enzyme Stoffumwandlungen auch über Ein-Elektronen Oxidationen katalysieren können, wird in der Literatur erwähnt (Guengerich 1996, Guengerich 2007).

Aus mit Peroxidasen katalysierten Reaktionen von APAP konnten eine Reihe von oligomeren APAP Einheiten isoliert und charakterisiert werden. Zum Beispiel bildeten sich *in vitro* Dimere, Trimere und Tetramere des APAPs. Vornehmlich waren diese Stoffe über die 3'- und 5'-Positionen des APAPs miteinander verknüpft. Verbindungen mit Verknüpfungen zwischen dem Stickstoff und den 3' und 5'-C-Positionen des aromatischen Systems konnten ebenso nachgewiesen werden (Potter 1985, Potter 1986, Potter 1987).

Wie schon vorher unter erwähnt wurde, wurde Di-APAP auch im menschlichen Metabolismus gebildet und in Urin- und Plasmaproben nachgewiesen (Trettin 2014a). Vermutlich können sich somit radikalische Spezies auch im Organismus bilden, und ihre kurzzeitige Persistenz reicht dafür aus, dass sie sich durch Dimerisierung deaktivieren und danach vom Organismus ausgeschieden werden können.

Allerdings ist zunächst als wenig wahrscheinlich zu beurteilen, dass sich Mehrfacheinheiten ($n > 2$) aus APAP *in vivo* bilden könnten, zumal in den Leberzellen mehrere endogene Redoxsysteme, wie z.B. GSH/GSSG, CYS/CY-S-S-CY, NADPH/NADP etc. aktiv an der Umwandlung von diversen Substanzen beteiligt sind und zwischenzeitlich entstehende Radikale deaktivieren können. Es ist zudem anzunehmen, dass entstehende radikalische Spezies teilweise ebenso wie NAPQI mit in der Leber vorhandenen Biomolekülen reagieren und damit zu Toxizitätsvorgängen in der der Leber beitragen könnten. Die Detektion des Di-APAPs in menschlichen

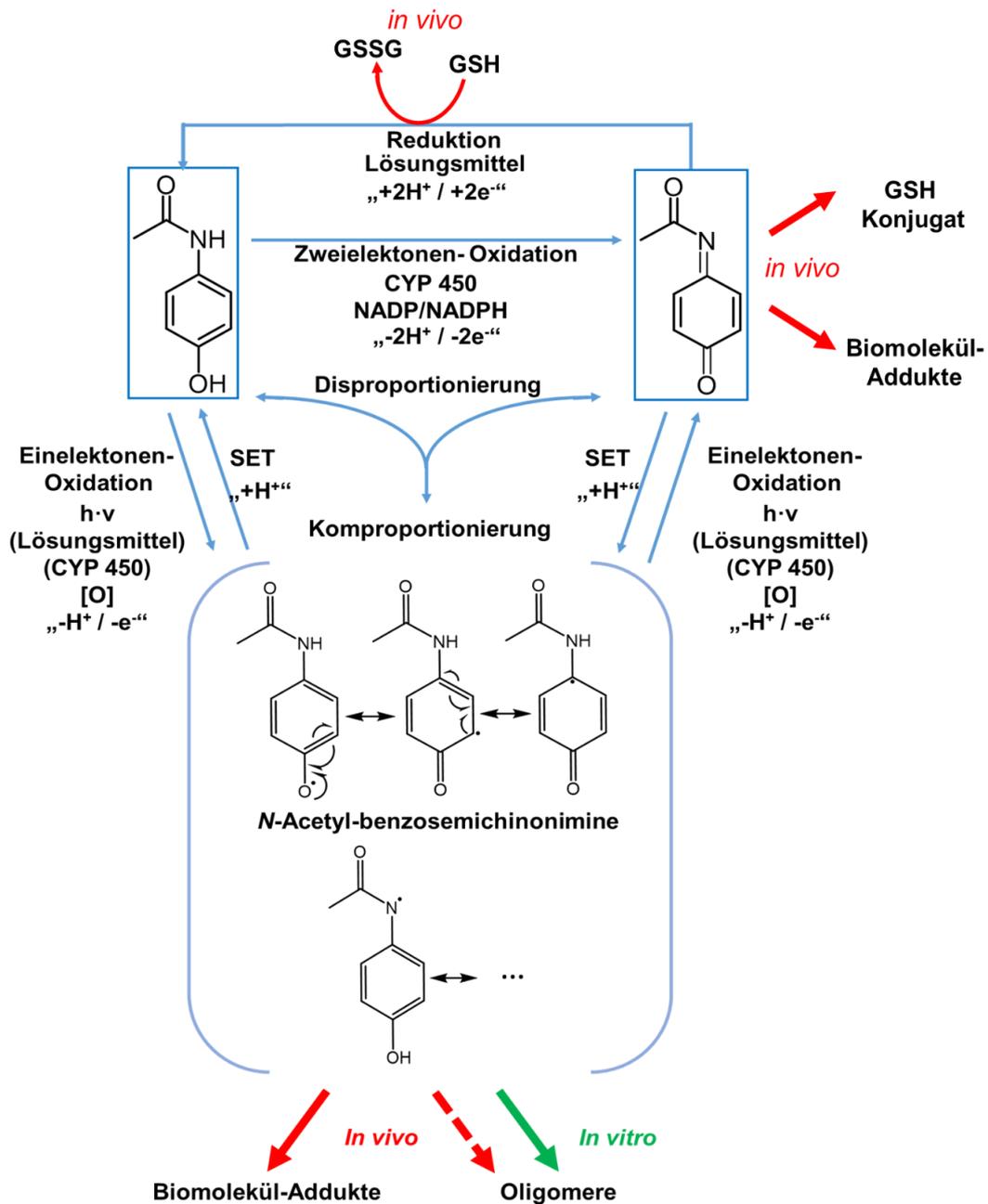


Abbildung 7: Mögliche Übergänge zwischen APAP und NAPQI

Urin- und Plasmaproben wie auch in den Leberextrakt von Mäusen gaben den Anlass diese Analyten auch in den Leberschnitten von Mäusen via MALDI-MSI zu screenen.

Die zusammengetragenen Informationen lassen vermuten, dass sich aus dem in PBS und Methanol gelöstem NAPQI Referenzstandard Oligomere des APAPs gebildet haben könnten. Daher wurden die unbekannt Peaks anhand ihres Massenspektrums näher untersucht.

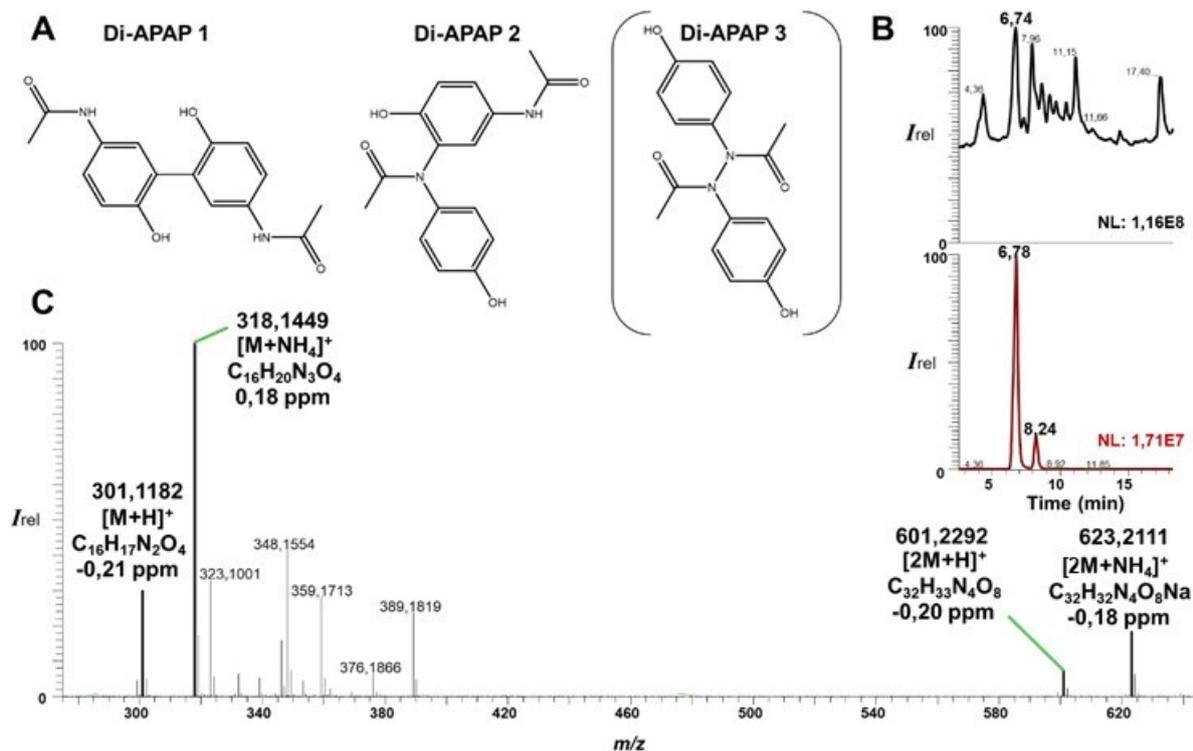


Abbildung 8: Di-APAP aus NAPQI

8A: Mögliche Strukturen des Di-APAPs. 8B: TIC-Chromatogramm von NAPQI in methanolischer Lösung und XIC für das $[M+H]^+$ des Di-APAPs mit m/z 301,1182. 8C: Spektrum der Peaks bei den R_t 6,78 und 8,24.

Für das korrespondierende m/z von Di-APAP werden zwei Signale bei den R_t 6,78 und 8,24 detektiert. (Bezüglich abweichender Retentionszeiten für APAP und seine Transformationsprodukte in den Chromatogrammen von HPLC-MS Messungen in Kapitel 2 ist im experimentellen Teil unter Kapitel 5.1.3 ein Statement zu finden). In Abbildung 8 sind mögliche Strukturen für das Di-APAP angegeben, worin die APAP Einheiten vorwiegend über die 3' und 5'-Positionen verknüpft sind, wenn die Radikalstabilität berücksichtigt wird.

Ferner wurden korrespondierende Massen zu möglichen Tri-, Tetra-, Penta- und Hexameren, die zwischen den Retentionszeiten ab ca. 8 – 10 min auftauchten, gefunden. Häufig wurden Ammoniumaddukt-Ionen als abundanteste Ionen beobachtet, was auf den Einsatz von 10 mM Ammoniumacetat in der wässrigen mobilen Phase

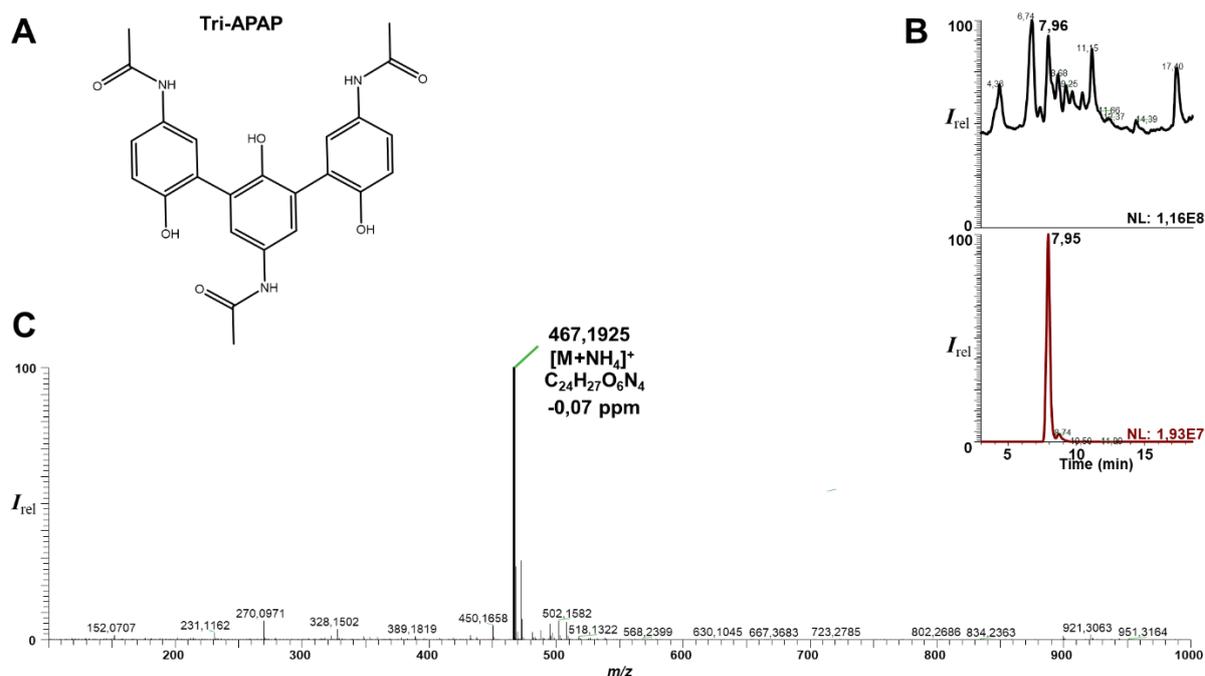


Abbildung 9: Tri-APAP aus NAPQI

9A: Eine mögliche Struktur für Tri-APAP. 9B: TIC-Chromatogramm von NAPQI in methanolischer Lösung und XIC für das $[M+NH_4]^+$ Ion des Tri-APAPs mit m/z 467,1925. 9C: Spektrum des Peaks bei der R_t 7,95.

zurückgeführt werden kann. Mögliche Strukturen mit den dazugehörigen Chromatogrammen und Spektren sind in den Abbildungen 9 – 12 verdeutlicht.

Bei den ab 10 bis 15 min folgenden Peaks konnten trotz Erweiterung des Messbereichs auf bis m/z 2000 keine Molekülionenpeaks für aus $n > 6$ Monomereinheiten aufgebaute APAP-Oligomere detektiert werden. Allerdings konnten mögliche In-Source Fragmente aus diesen Strukturen (vorläufig) identifiziert werden. Zwei dieser möglichen Oligomere sind in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt. Offenbar sind Molekülionenpeaks höherverketteter Oligomere unter den gegebenen ESI-MS Messbedingungen nicht mehr stabil detektierbar. Allgemein ist zu erkennen, dass vor allem ab dem Hexa-APAP die Abundanzen der In-Source Fragmente relativ zu den Molekülionenpeaks zunehmen.

Zu unterstreichen ist, dass es sich bei den behandelten Reduktionsprodukten um *in vitro* entstehende Produkte aus NAPQI handelt. Auf weitere Methoden zur näheren

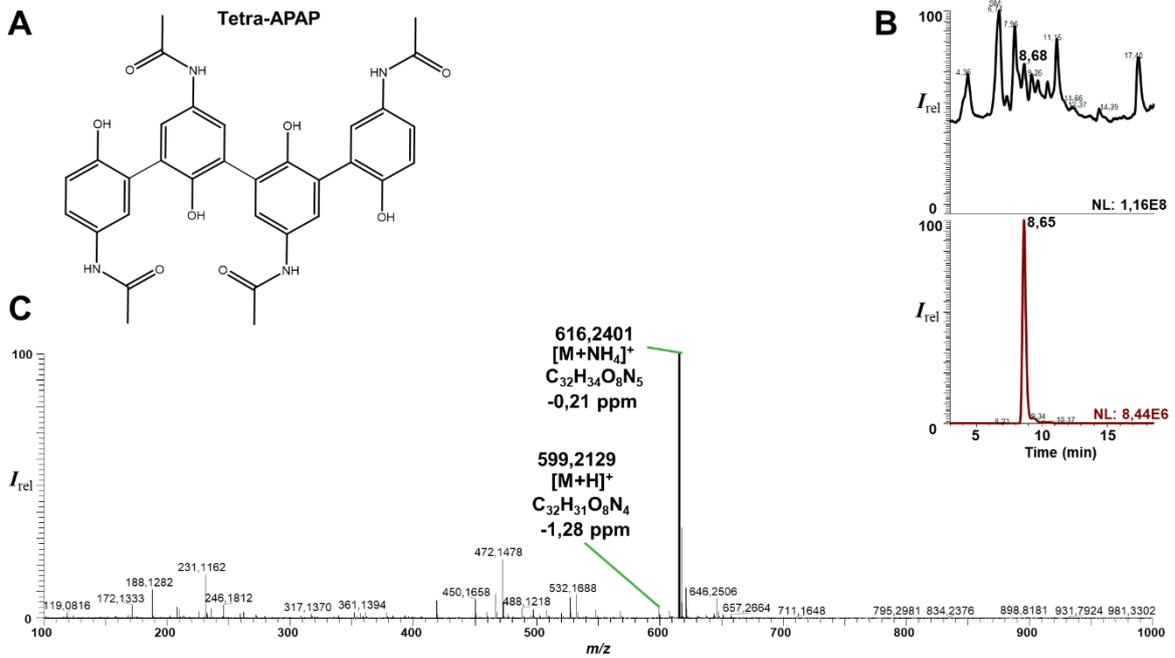


Abbildung 10: Tetra-APAP aus NAPQI

10A: Eine mögliche Struktur für Tetra-APAP. 10B: TIC-Chromatogramm von NAPQI in methanolischer Lösung und XIC für das [M+NH₄]⁺ Ion des Tetra-APAPs mit *m/z* 616,2401. 10C: Spektrum des Peaks bei der *R_t* 8,65.

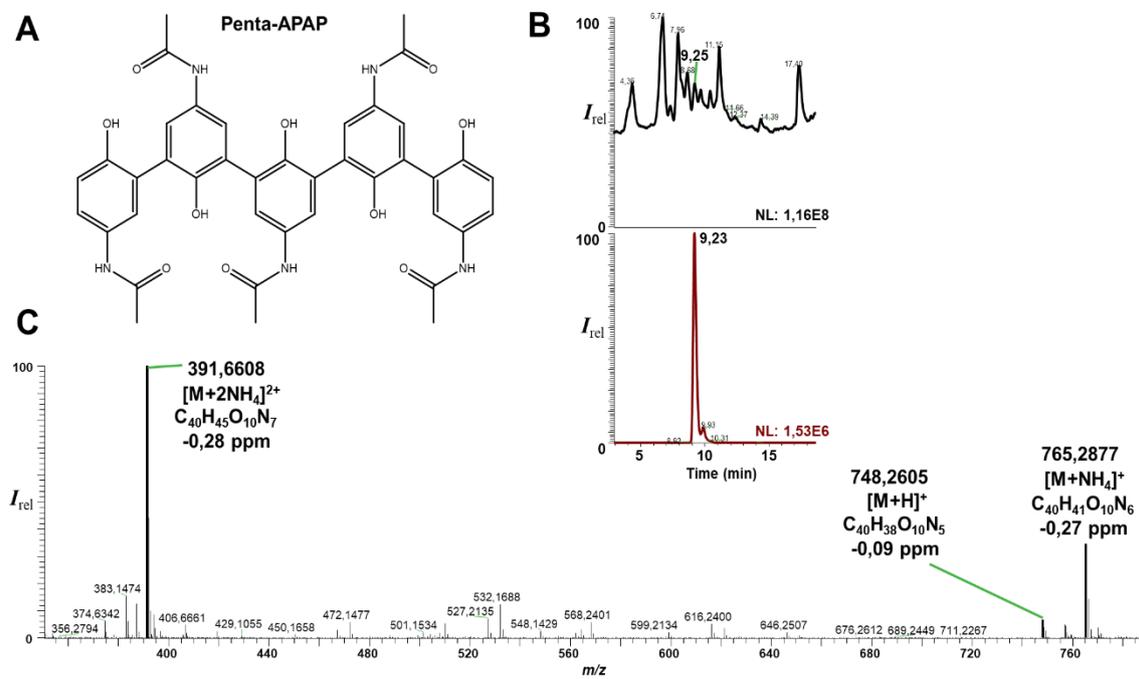


Abbildung 11: Penta-APAP aus NAPQI

11A: Eine mögliche Struktur für Penta-APAP. 11B: TIC-Chromatogramm von NAPQI in methanolischer Lösung und XIC das $[M+H]^+$ Ion des Penta-APAPs mit m/z 748.2605. 11C: Spektrum des Peaks bei der R_t 9,23.

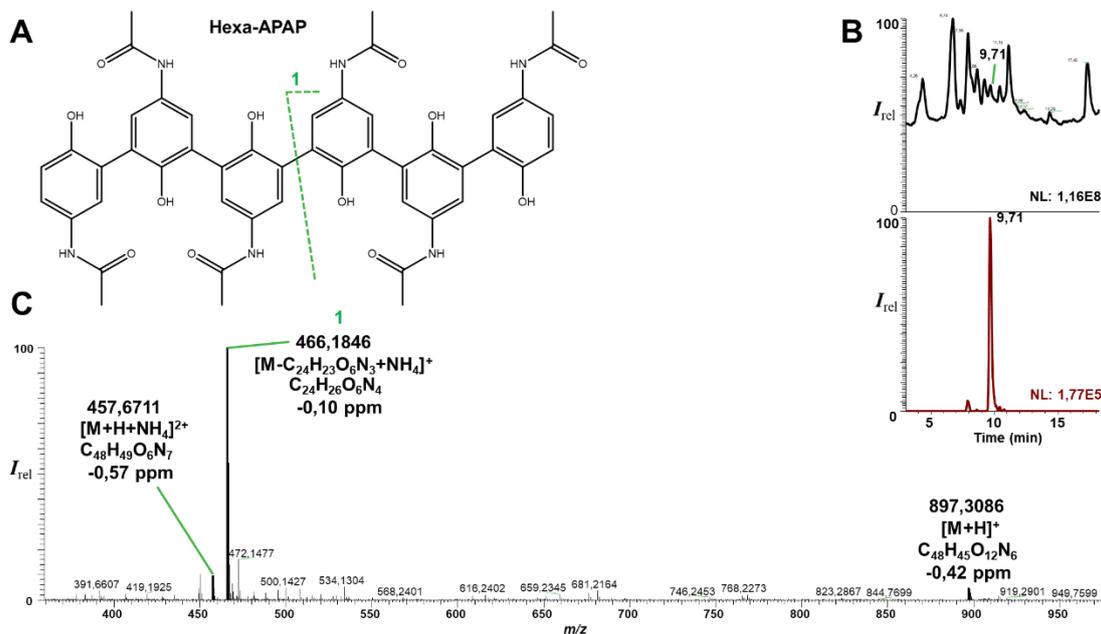


Abbildung 12: Hexa-APAP aus NAPQI

12A: Eine mögliche Struktur für Hexa-APAP. 12B: TIC-Chromatogramm von NAPQI in methanolischer Lösung und XIC das $[M+H]^+$ Ion des Hexa-APAPs mit m/z 897.3086. 12C: Spektrum des Peaks bei der R_t 9,71.

Strukturaufklärung dieser Stoffe etwa über MSn-Messungen und/oder durch Isolation und Aufreinigung der Stoffe und anschließender NMR-Spektroskopie wurde verzichtet, da das Hauptaugenmerk der Arbeit auf bildgebenden MALDI-MSI Messungen bezüglich der *in vivo* gebildeten Metaboliten lag. Außerdem ist es fraglich, inwieweit höhere Einheiten aus NAPQI im Organismus entstehen können. Dennoch werden diese vorläufig zugeordneten m/z Werte in die Liste der in den MALDI Imaging Experimenten im Hauptteil zu den Ionen, die gescreent werden sollen, aufgenommen.

Es sollte außerdem darauf hingewiesen werden, dass in der Literatur bislang nur von APAP-Oligomeren, die aus bis zu fünf Monomer-APAP-Einheiten bestehen, berichtet wurde. Bei den vorläufig zugeordneten APAP-Oligomeren mit mehr als fünf

Monomereinheiten, könnte es sich damit um nach bisher noch nicht beschriebenen Verbindungen handeln.

Eine Tabelle möglicher Transformationsprodukte des NAPQIs findet sich im Kapitel 6.1.1.

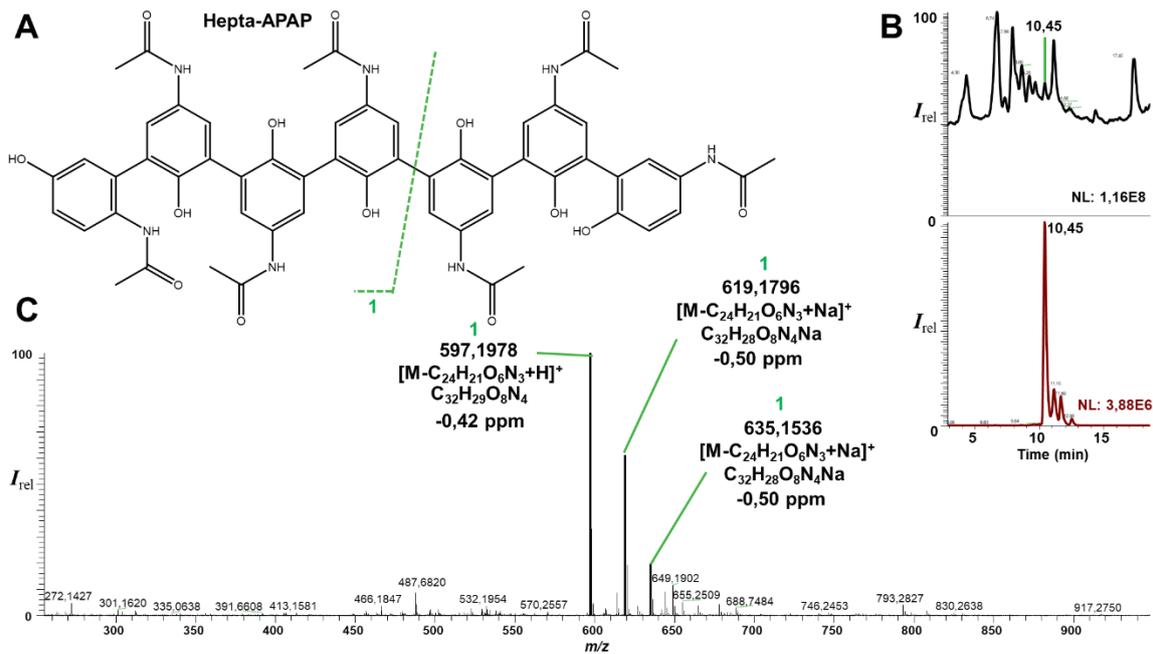


Abbildung 13: Hepta-APAP aus NAPQI

13A: Eine mögliche Struktur für Hepta-APAP. M: C₅₆H₅₁O₁₄N₇. 13B: TIC-Chromatogramm von NAPQI in methanolischer Lösung und XIC des möglichen intensivsten Fragmentions [M-C₂₄H₂₁O₆N₃+H]⁺ Ions des Hepta-APAPs mit m/z 597,1978. 13C: Spektrum des Peaks bei der R_t 10,45.

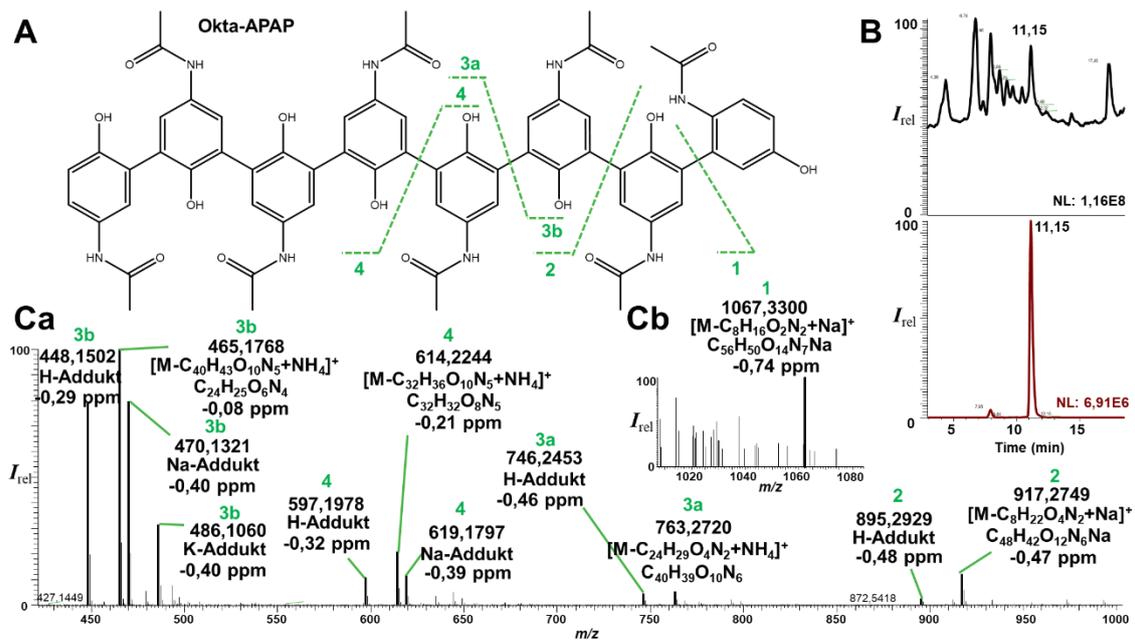


Abbildung 14: Okta-APAP aus NAPQI

14A: Eine mögliche Struktur für Okta-APAP. M: $C_{64}H_{58}O_{16}N_8$. 14B: TIC-Chromatogramm von NAPQI in methanolischer Lösung und XIC des möglichen intensivsten Fragmentions $[M-C_{40}H_{43}O_{10}N_5+NH_4]^+$ Ions des Okta-APAPs mit m/z 465,1768. 14Ca: Spektrum des Peaks bei der R_t 11,15 von m/z 420 – 1000. 14Cb: Spektrum des Peaks bei der R_t 11,15 von m/z 1000 – 1080.

2.2.2 Voruntersuchungen zum NAPQI via MALDI-MSI

Im vorherigen Abschnitt wurde erörtert, welche Transformationen für reines NAPQI in methanolischer oder wässriger Phosphat-Lösung möglich sind.

In diesem Abschnitt werden MALDI-MSI-Vorversuche bezüglich der NAPQI Analytik auf Mäuseleberschnitten beschrieben. Zur Verfügung standen eine negative Kontrollleber (keine APAP Injektion) und eine positive Leberkontrolle (APAP Injektion nach 30 min). Von den Leberproben wurden dünne Tieftemperaturschnitte (Dicke: 3 - 5 μ m) im Kryostaten angefertigt. Vorversuche der Kooperationspartner am IfaDo zur Pharmakokinetik von APAP und seinen Metaboliten ließen vermuten, dass NAPQI insbesondere nach 15 – 30 min nach der APAP Verabreichung vermehrt gebildet wurde. Von daher wurden Leberproben zum Zeitpunkt 30 min nach der APAP Injektion als positive Kontrollen verwendet.

APAP und NAPQI wurden jeweils mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ in PBS-Lösung gelöst. Es wurden ca. $1 \mu\text{L}$ Tropfen aus dieser Lösung unmittelbar nach dem Lösungsvorgang auf den Leberschnitt platziert und die Flüssigkeit unter stetigem Stickstoffgasfluss (2 bar), welcher durch einen Schlauch zugeleitet wurde, abgedampft. Danach folgte die Applikation der Matrix HCCA über die Sprühmethode.

Die MALDI-MSI Daten von negativem und positivem Kontrollgewebe wurden bezüglich der Entstehung und Verteilung von APAP, NAPQI und möglichen Transformationsprodukten von NAPQI ausgewertet und miteinander verglichen. Es wurde innerhalb eines Massenbereichs von m/z 100 – 1000 gearbeitet.

Die spatiale Auflösung für die Messungen wurde auf $60 \mu\text{m}$ eingestellt. Dass bei Laserspotdurchmessern, die zwischen $50 - 60 \mu\text{m}$ eingestellt werden, im Durchschnitt die höchsten Signalintensitäten für die Analyten erhalten werden, wurde zuvor bei Optimierungsarbeiten mit der AP-SMALDI Quelle imagine10™ ermittelt (Sezgin 2014). Ausschlaggebend für die Ionisation des Analyten von der Probenoberfläche ist unter anderem die Laserfluenz (auf die bestrahlte Fläche normierte Strahlungsenergie), welche auch schlicht Bestrahlung genannt wird, und die Einheit $[\text{J m}^{-2}]$ besitzt. In der Regel werden optimale Analytintensitäten bei Fluenzwerten, die knapp über der für die Ionisation der Analyten benötigten Werten für die Grenzfluenz liegen, erhalten. Dies gilt insbesondere für nicht stark fokussierte Laserspots, wie sie bei $50 - 60 \mu\text{m}$ der Fall sind. Zudem kommt es bei wenig fokussierten Laserspots zu deutlich niedriger Penetration (Eindringtiefe) der Oberfläche durch die Bestrahlung und damit zu weniger Materialablation. Dadurch wird der exzessiven Entstehung von Matrixionen und -clustern vorgebeugt, die zur Signalsuppression beim Analyten führen können (Gross 2013, Strupat 1991).

Die Auswertung der MALDI-Daten erfolgte zunächst mit der ImageQuest Software. Die zu erwartenden m/z für die bekannten und erwarteten Signale wurden als Ionendichtebilder aus dem TIC gefiltert und dargestellt. Außerdem wurde von der Mirion Imaging Software Gebrauch gemacht. Wie im Abschnitt 1.2 beschrieben worden ist, bietet diese eine Programmfunktion zur Extraktion von Listen mit unbekanntem m/z an, die der Nutzer anhand der angezeigten Distribution auf dem Scanareal nach der Relevanz für die eigene Fragestellung selektieren kann.

Zu diesem Versuch ist anzumerken, dass bezogen auf das Tropfenareal zwar eine relativ hohe Konzentration für die Standards aufgetragen wurde und damit die Vergleichbarkeit zur darauffolgenden Analyse des *in vivo* Systems geschmälert wurde. Allerdings sollte dieser Versuch vorrangig zur Abschätzung von Ionensuppressionseffekten auf die Analytsignale im Lebergewebe dienen. Um möglichst hohe Signalintensitäten zu erhalten wurden daher Konzentrationen zur Applikation auf dem Schnitt gewählt, die zu Intensitäten deutlich über den zu erwartenden LODs führten (für geschätzte On-Tissue LODs: s. Kapitel 6.1.2). Ferner sollte durch den Vergleich der MALDI-MSI Daten mit den zuvor erhaltenen HPLC-MS Ergebnissen ermittelt werden, ob es durch Einwirkungen der lebereigenen Substanzen zu einem anderen Produktbild für APAP und in erster Linie für NAPQI kam.

In Abbildung 15 werden die Ergebnisse des Tropfenversuchs auf negativem Kontrollgewebe angezeigt.

Für bekannte m/z , bei denen die Pixelanhäufungen den Konturen der Referenzstandardtropfen entsprachen, konnten zweifelsfrei das $[M+K]^+$ und $[2M+H]^+$ zu der Position des APAP Tropfens zugeordnet werden. Für kalkulierte und damit in Frage kommende Quasimolekülonen des NAPQIs (protoniert oder als Na- oder K-Addukt) konnten keine Signale detektiert werden, während in der HPLC-MS Untersuchung Spuren des NAPQIs detektiert wurden. Offensichtlich fallen Signale des NAPQIs aufgrund der Ionensuppression im Gewebe unter das Detektionslimit. Interessanterweise wird für APAP-*N*-hydroxamid das Gegenteil beobachtet. So konnte zuvor in den Untersuchungen der Leberextrakte via HPLC-MS kein APAP-*N*-hydroxamid detektiert werden. Beim MALDI-MSI Versuch wurden hingegen im Bereich des APAP Tropfens Signale, wenn auch von relativ geringer Intensität (im Bereich $5E2$), aufgenommen. Dieses Ergebnis könnte vielleicht ein Indiz für die zwischenzeitliche Entstehung dieses Intermediaten sein, wozu es unter den Wissenschaftlern unterschiedliche Ansichten gibt (s. Kapitel 1.4). Eine unmittelbare Transformation des NAPQIs zum APAP-GSH konnte auf der Leberoberfläche nicht observiert werden, obwohl bei einer Negativkontrolle (gesunde Maus) davon ausgegangen werden kann, dass genug GSH im Gewebe vorhanden sein sollte. Offensichtlich ging das NAPQI trotz unmittelbarer Platzierung auf dem Leberschnitt nach dem Lösungsvorgang andere Transformationen als die Konjugation mit GSH ein. Werden hingegen GSH und NAPQI zusammen in PBS Lösung gelöst, so wurde die

Produktbildung zum APAP-GSH Konjugat bevorzugt, während die Bildung der Oligomere gemindert wurde (s. Kapitel 6.1.3). Dass auf dem Gewebe kein APAP-GSH entstanden ist, beweist, dass das NAPQI bereits unmittelbar nach dem Lösen abreagiert zu anderen Produkten. Das wird durch die die Mirion Software erstellten Stacks an Ionendichtebildern, die von ihrer Verteilung her zweifelsfrei der Position des NAPQI Tropfens zugeordnet werden konnten, und hinsichtlich der m/z (im Toleranzbereich ≤ 5 ppm) den bereits unter Abschnitt 2.2.1 ermittelten APAP-Oligomeren entsprachen, bewiesen. Dadurch wurde noch einmal bestätigt, dass die Oligomerisation des NAPQIs ein sehr schnell ablaufender Prozess nach dem Lösen des Standards in Lösungsmitteln ist, zumal diese Reaktionen vermutlich über radikalische Spezies ablaufen. Denkbar wäre in diesem Fall der Einsatz von Oligomerisationsverzögerern, wie z.B. Hydrochinonen gewesen, um die Reaktion zu verlangsamen bzw. zu hemmen, damit tatsächlich die Wechselwirkungen des NAPQIs mit den lebereigenen Substanzen untersucht werden konnte (Becker 2006). Diese Überlegungen wurden aber in dieser Arbeit nicht empirisch überprüft.

Die Positivkontrollprobe (30 min nach APAP Injektion, Dosis: 300 mg kg⁻¹) wurde ebenso mit der räumlichen (Pixelauflösung) von 60 μm vermessen. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in der Abbildung 16 dargestellt.

Spuren von APAP-*N*-hydroxamid korrespondierenden Signalen und starke Signalcluster von APAP, APAP-GSH und APAP-NAC ließen sich insbesondere in größeren Blutgefäßen detektieren. Weiterhin wurde in dieser Abbildung auch das APAP-GLC dargestellt, obwohl es nicht über den NAPQI-Pfad entsteht. Dieser Primärmetabolit zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster wie das GSH-Konjugat.

Es wurde bei dieser Messung auch ein Areal außerhalb des biologischen Gewebes (reine HCCA-Matrix auf Glasträger) gescannt, wobei von diesem Bereich mit dem massenspektrometrischen Dimer-Ion von APAP $[2M+K]^+$ als auch mit der eigentlichen *in vivo* dimerisierten Form von APAP $[M+K]^+$ stark interferierende Signale aufgenommen wurden. Erwartungsgemäß konnten für NAPQI keine signifikanten Signale detektiert werden. Für die höheren APAP-Oligomere konnten Ionen für das APAP-Trimer und -Tetramer (jeweils als Kalium Addukte) detektiert werden und kommen damit als Analyten in MALDI-MSI Experimenten in Frage. Laut bisherigen

Recherchen existieren keine Studien, die über die *in vivo* Metabolisierung von APAP in das APAP-Trimer und -Tetramer in höheren Organismen berichten.

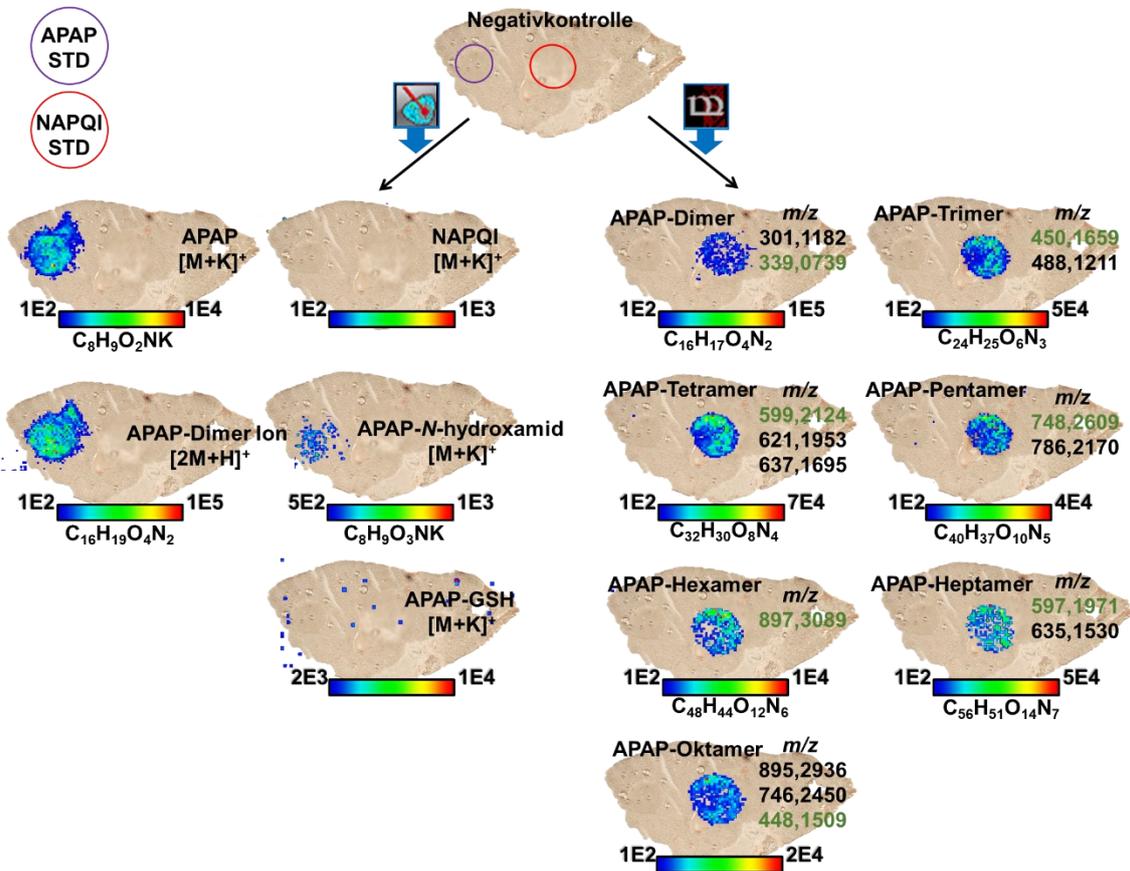


Abbildung 15: MALDI MSI Ergebnisse von der Tropfenauftragung auf Mauslebergewebe (Negativkontrolle)

Korrespondierende Ionendichtebilder zu den jeweiligen Substanzen wurden mit der Software Image Quest visualisiert (Massentoleranz: ≤ 5 ppm). Spatiale Auflösung: 20 μm .

Negativkontrolle: Keine APAP Injektion. Korrespondierende *m/z* für bekannte Substanzen wurden mit der Software Image Quest gefiltert (Massentoleranz: ≤ 5 ppm) und das Screening nach unbekanntem *m/z* mit der Software Mirion durchgeführt (bin width: 0,005).

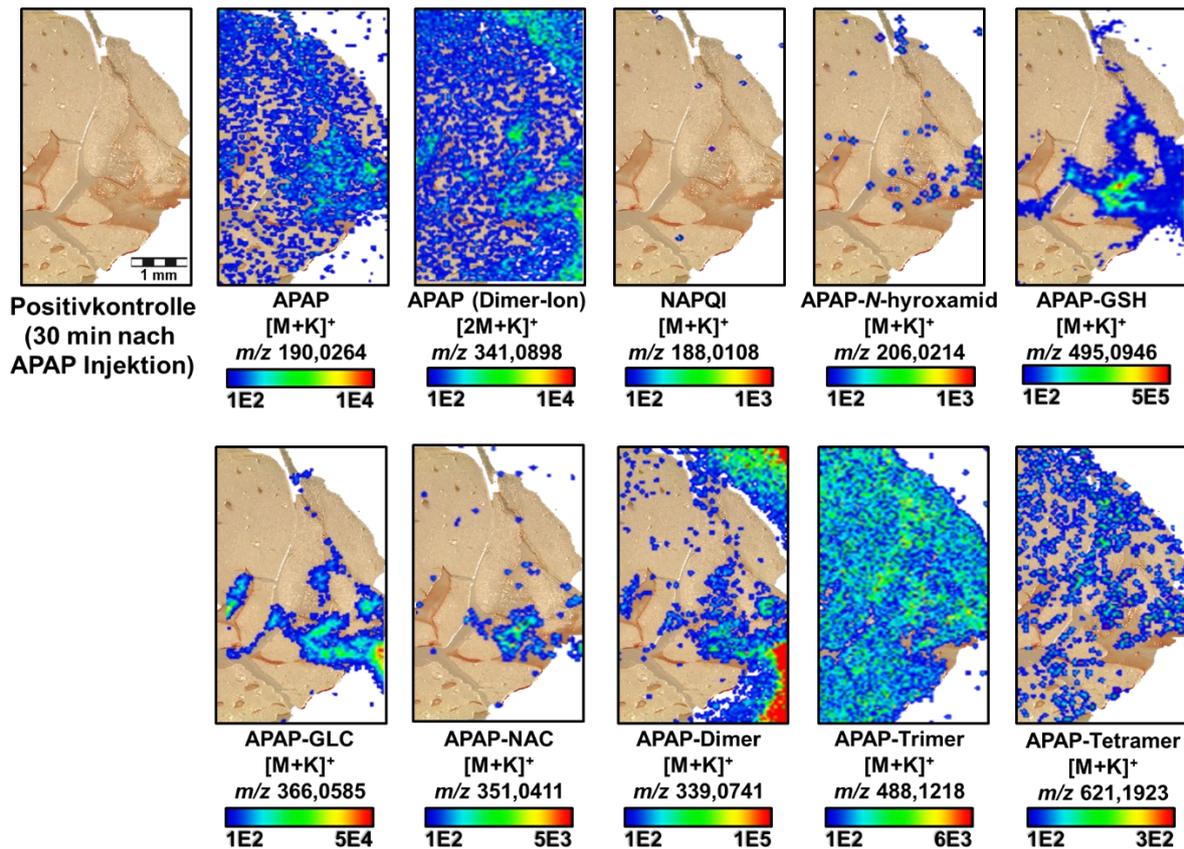


Abbildung 16: MALDI MSI Ergebnisse vom Mauslebergewebe (Positivkontrolle)

Positivkontrolle: 30 min nach APAP Injektion. Spatiale Auflösung: 20 μm . Korrespondierende Ionendichtebilder zu den jeweiligen Substanzen wurden mit der Software Image Quest visualisiert (Massentoleranz: ≤ 5 ppm).

2.2.3 Versuch zur photochemischen Stabilisierung von NAPQI

Wie bereits diskutiert wurde, wird das NAPQI vermutlich aufgrund radikalischer Intermediate in einer relativ schnell ablaufenden Reaktion zu verschiedenen Substanzen umgewandelt. Dies ist aus analytischer Sicht zunächst einmal kontraproduktiv. Aus einer Substanz (NAPQI) entstehen mehrere mit den Quasimolekülen der NAPQI-Produkte korrespondierenden Signale. Es kommt damit zu einer „Signalaufspaltung“ und damit möglicherweise zum Verlust an Intensitäten, was die Qualität der MALDI-MSI Ergebnisse erheblich mindern kann. Allerdings kann auch ein gegenteiliger Effekt entstehen, wenn NAPQI durch die chemische Transformation in eine Form übergeht, welche unter MALDI-MS Bedingungen deutlich besser ionisiert als das NAPQI selbst.

Es wurden Überlegungen angestellt, ob sich das NAPQI über eine photochemische Reaktion idealerweise zu einem oder zu einigen wenigen Produkten stabilisieren lassen würde.

Dazu wurde NAPQI unmittelbar nach der Lösungsmittelzugabe und kurzem Anrühren in einer Suntest® CPS+ Anlage von der Atlas-MTS GmbH (Linsengericht, Deutschland) bestrahlt. Die Anlage ist mit einer Xenonlampe bestückt und simuliert durch seine spektrale Bandbreite das Sonnenlichtspektrum.

Das Experiment wurde zum einen in MeOH und zum anderen in einer wässrigen PBS Lösung, die zudem 10% H₂O₂ enthielt, durchgeführt. H₂O₂ wird als Photoinitiator zu photochemischen Reaktionen hinzugegeben (Ghosh 1979). Die Lösungen befanden sich in einem Behältnis aus Quarzglas; NAPQI wurde mit einer Konzentration von 10 µg mL⁻¹ angesetzt. Die Lösung wurde für 0 (keine Bestrahlung), 40, 180 (nur MeOH) und 210 min mit einer Lichtintensität von 600 W m⁻² in der Suntest® CPS+ Anlage bestrahlt. Anschließend wurden 5 µL der Lösung injiziert und via HPLC-MS gemessen.

In der Abbildung 17 sind die jeweiligen TICs des oben beschriebenen Experiments dargestellt.

Auffällig ist, dass ein Großteil des NAPQIs erneut zum APAP reduziert (R_t: ~5,3 min) wurde. Wurde NAPQI in wässriger 10% H₂O₂ enthaltender PBS Lösung gelöst und unmittelbar danach ohne jegliche Bestrahlung gemessen, so entstand ein abundanter Peak bei der R_t 4,15 min. Allerdings verschwand dieser Peak, wenn die Lösung anschließend bestrahlt wurde.

Anhand des Massenspektrums, welches in der Abbildung 18 angezeigt ist, kann vermutet werden, dass es sich bei dieser Substanz um das APAP-Peroxid mit der Summenformel C₈H₉O₄N handeln könnte. Aus dem Peroxid bildete sich womöglich das APAP Radikalkation aus dem APAP Peroxid Mutterion als In-Source Fragment unter den H-ESI Bedingungen aus.

Mit zunehmender Bestrahlungsdauer zerfiel das vermutlich wenig stabile APAP-Peroxid in stabilere Folgeprodukte. Es ist vermutlich nicht davon auszugehen, dass APAP-Peroxid unter MALDI-MSI Bedingungen hinreichend stabil bleiben würde, um dieses Ion repräsentativ für die Verteilung des NAPQIs detektieren zu können.

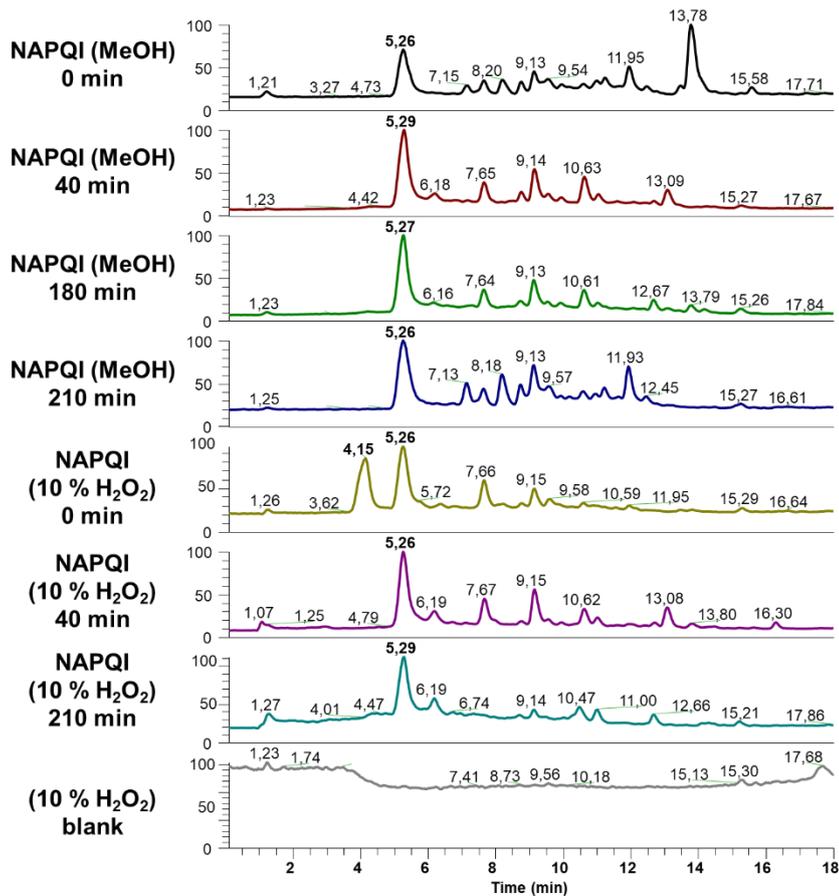


Abbildung 17: TIC-Chromatogramme zum photochemischen Derivatisierungsversuch

10 µg mL⁻¹ NAPQI in Methanol oder in wässriger 10 %iger H₂O₂-Lösung mit den Zeitpunkten 0, 40, 180 (nur MeOH) und 210 min nach der Bestrahlung. Das unterste Chromatogramm handelt von einer Blankmessung ohne NAPQI Zugabe.

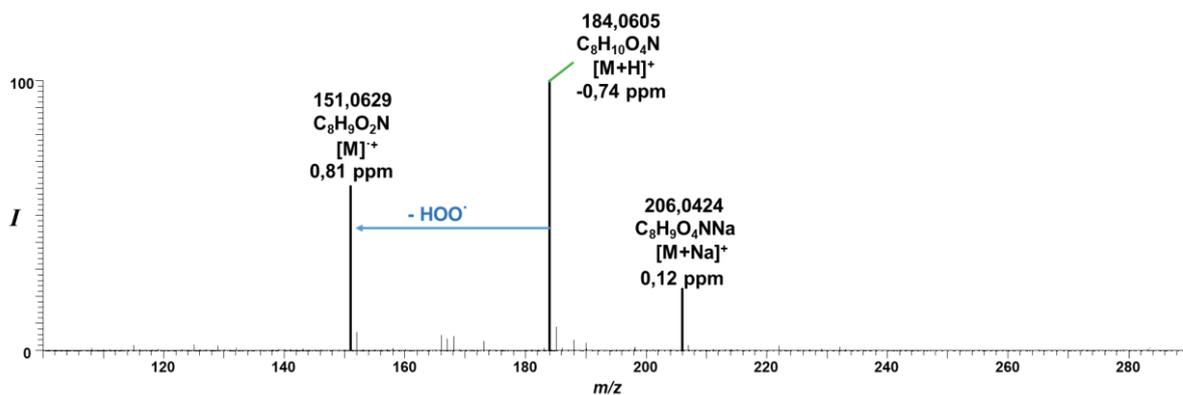


Abbildung 18: Massenspektrum des entstehenden Produkts aus dem NAPQI mit der R_t 4,15 min in wässriger H₂O₂-Lösung ohne Bestrahlung

Aufgrund der Vielzahl beobachteter abundanter Peaks in den TIC-Chromatogrammen ist davon auszugehen, dass eine photochemische Stabilisierung des NAPQIs zu einem oder zu einigen wenigen Umwandlungsprodukten misslungen ist.

2.2.4 Derivatisierung des NAPQIs mit Sulfid (S^{2-})

In einer wässrigen Lösung von Natriumsulfid (Na_2S), in der sich Sulfidionen (S^{2-}) durch die Dissoziation seines Salzes bilden, konnte das NAPQI zu einem Teil in das stabilere 3-Thioacetaminophen überführt werden. Dabei reagieren die Sulfidionen aufgrund ihrer hohen negativen Ladungsdichte mit dem Elektronenmangel aufweisenden NAPQI-Molekül durch elektrophile Addition. In dieser Lösung entsteht allerdings wiederum eine signifikante Menge an APAP aus NAPQI durch Reduktion. Zudem konnten die Autoren die Entstehung von weiteren Produkten beobachten, die sie allerdings nicht weiter charakterisiert haben. APAP und 3-Thioacetaminophen wurden anschließend mit Ethylacetat extrahiert, mit Pentafluorobenzylbromid derivatisiert und über GC-MS/MS im negativen Ionenmodus charakterisiert (Trettin 2014b).

Ausgehend von diesen Vorarbeiten wurden Überlegungen angestellt, ob die Stabilisierung des NAPQIs zu seinem Thiol (z.B. zum 3-Thioacetaminophen) die NAPQI Detektion verbessern und seine native Distribution auf dem Gewebe abbilden könnte. Die Derivatisierungsmethode für NAPQI, wie sie oben beschrieben wird (Trettin 2014b), wurde als kaum tauglich für die Probenpräparation für MALDI-MSI Experimente beurteilt. Der Grund dafür ist, dass die Derivatisierung in zwei Schritten und über Extraktionsverfahren abläuft, was die Anwendbarkeit auf einem Gewebestück deutlich erschwert. Zwar wäre es in diesem Zusammenhang denkbar gewesen mit On-Tissue Derivatisierungsverfahren, die auf Sprayverfahren beruhen, zu arbeiten (Franck 2009b, Wu 2016). Allerdings ist dabei zu bedenken, dass jeder Sprühgang auch eine gewisse Delokalisation des Zielanalyten durch Lösungsmitteltropfen, die nicht rechtzeitig von der Oberfläche des Gewebes verdampfen, mit sich bringen kann. Durch eine Zweischritt-Derivatisierung würden hohe Konzentrationen an Xenobiotika auf die Oberfläche gebracht, die zur Ionensuppression (Quenching) der Analytionen-Signale hätten führen können.

Stattdessen wurde eine alternative Methode entwickelt, bei der Schwefelwasserstoff (H_2S) als reaktives Gas verwendet wurde. Aufgrund der akuten Toxizität von H_2S wurde eine Anlage unter dem Laborabzug konzipiert, in der das Gas aus der Reaktionskammer (Drehhalskolben) in eine Unterdruckkammer geleitet wurde (s. Abb. 19). Der Unterdruck in der Begasungskammer wurde über eine Wasserstrahlpumpe (Wsp) erzeugt. Das Gas wurde aus der Reaktion von Natriumsulfid (Na_2S , 10 g/L in H_2O) mit konzentrierter Salzsäure (HCl , 33 % technisch) generiert:

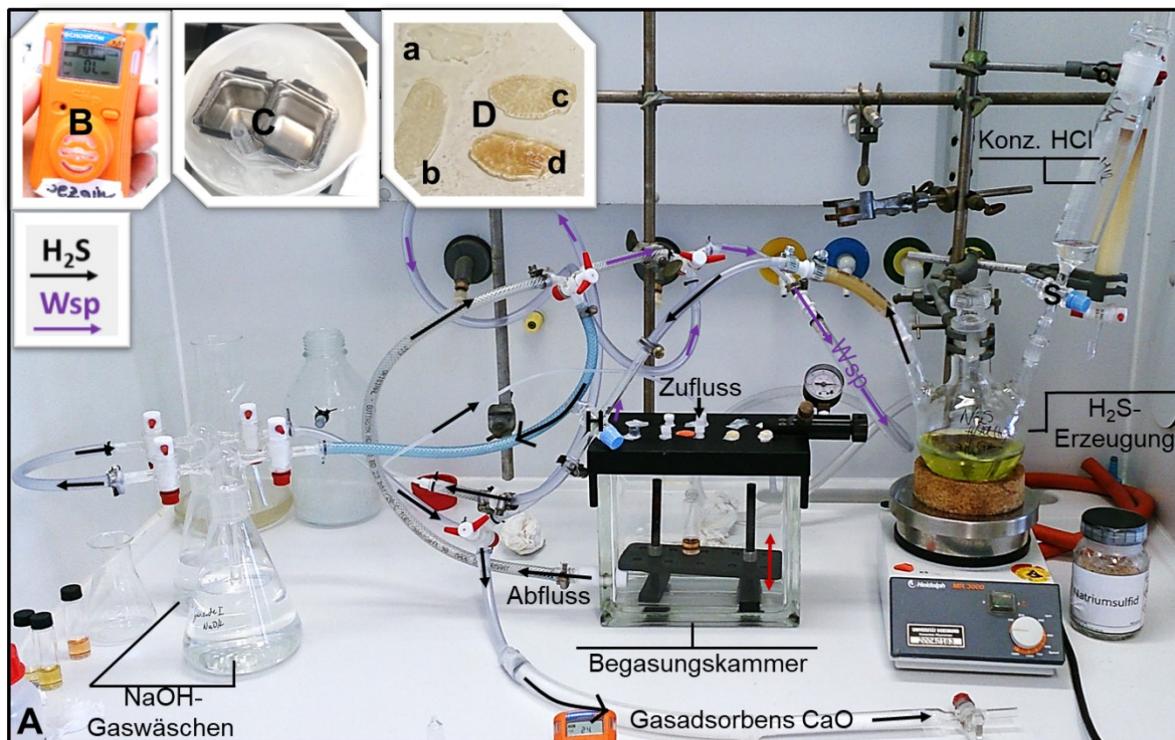
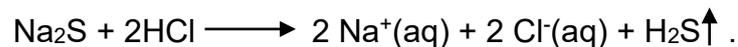


Abbildung 19: Anlage zur Derivatisierung mit H_2S in einer Begasungskammer

19A: Übersicht der Anlage im Laborabzug. 19B: H_2S Messgerät. 19C: Transport- und Begasungsvorrichtung für Leberschnitte. 19D: Begasung von Leberschnitten mit H_2S , Da: Keine H_2S -Begasung, Db: 15 min, Dc: 30 min; Dd: 45 min.

Dazu wurde konzentriertes HCl zur Gasbildung kontinuierlich zur Natriumsulfid-Lösung hinzugegeben (ca. 2 Tropfen/Sekunde). Die Bildung von H_2S konnte mit einem Gaswächter nachgewiesen werden. Überschüssiges Gas wurde nach der Reaktion

durch Pumpenunterdruck aus der Kammer geleitet. Dafür wurden die Schlauchventile entsprechend geschaltet. Zur sicheren Abführung von überschüssigem H₂S wurde das Gas durch alkalische Natriumhydroxid-Gaswäschen und optional noch über gasadsorbierendes Calciumoxid geleitet. Als Begasungskammer wurde eine abgewandelte Festphasen-Extraktionskammer verwendet. Der Grund der Kammer wurde auf einen Füllstand von ca. 1 cm mit H₂O befüllt. Die Gelbfärbung von H₂O war ein weiteres Indiz dafür, dass H₂S in der Kammer ankam. Zunächst wurde NAPQI mit einer Konzentration von 10 µg mL⁻¹ in wässriger Lösung vorgelegt und das H₂S über eine Schlauchführung in die Kammer eingeleitet. Nach der Reaktion (Begasungszeit: 30 min) wurde ein Aliquot der Lösung über HPLC-MS gemessen. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Identifikation von Hauptprodukten, die sich nicht in den Kontrollen von NAPQI (s. Kapitel 2.2.1) finden ließen. Das Experiment wurde final mit Mäuse-Gewebsschnitten (APAP-Injektion: 300 mg/kg, Zeit nach der APAP-Injektion: 30 min) wiederholt. Die bei -30 °C Kammertemperatur im Mikrotom-Kryostaten erzeugten 5 µm dicken Schnitte wurden in Metallbehältnissen, die auf Eiswasser gekühlt wurden, schnellstmöglich zur Anlage transportiert und mit H₂S begast (Begasungszeiten: 15, 30 und 45 min). Mit zunehmender Begasungsdauer nahmen die Leberproben eine gelbliche Färbung an.

Aus dem Vergleich der Chromatogramme von NAPQI-Kontrollen in H₂O und der Reaktion mit H₂S konnten fünf abundante Hauptprodukte detektiert werden, die ausschließlich in der Reaktionslösung von NAPQI mit H₂S entstanden sind und zwischen den R_t 8,5 und 11,8 min detektiert wurden (s. Abbildung 20). Es fiel zudem anhand der Chromatogramme auf, dass die Oligomerisation von NAPQI zu den vorher beschriebenen Produkten unterdrückt und dadurch auch im Allgemeinen die Anzahl der Produkte, die aus NAPQI entstanden, reduziert wurde. Offensichtlich gewannen die von S²⁻ Ionen dirigierte Reaktionswege die Oberhand. Die wesentliche Voraussetzung dafür war, dass die Begasung der NAPQI Lösung sofort nach dem Ansetzen der Probe gestartet wurde.

Die Massenspektren zu den isolierten Peaks sind in der Abbildung 21 dargestellt. Beim Hauptprodukt bei der R_t 4,34 min handelt es sich wieder um das größtenteils entstehende APAP mit dem *m/z* 152,0707. Bei der R_t 8,54 min wurde ein Quasimolekülion mit dem *m/z* 333,0906 und der Summenformel C₁₆H₁₇O₄N₂S, bei

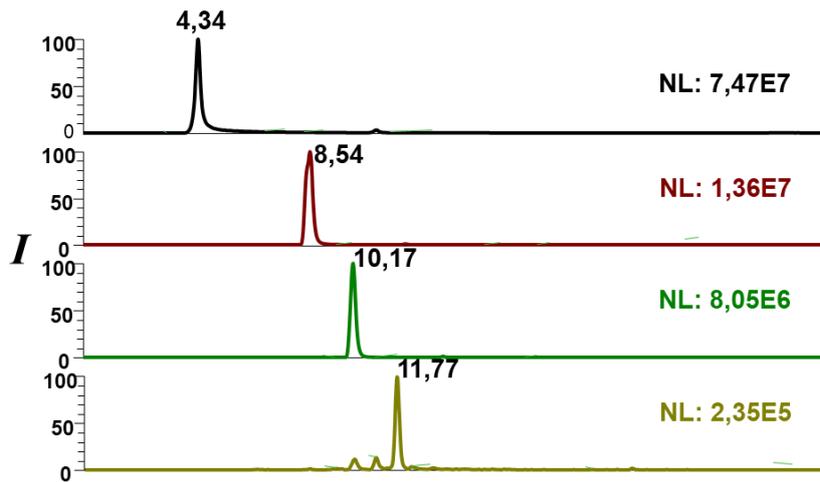


Abbildung 20: XIC-Chromatogramme zur Reaktion von NAPQI mit H₂S

der R_t 10,17 min mit dem m/z 365,0626 und der Summenformel C₁₆H₁₇O₄N₂S₂ und bei der R_t 11,77 min mit dem m/z 184,0427 und der Summenformel C₈H₁₀O₂NS detektiert. Die Quasimolekülonen wurden anschließend in der linearen Ionenfalle des Orbitrap Massenspektrometers von Thermo Scientific (Bremen, Deutschland) bei 35 eV über kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) fragmentiert. Eine Auflistung der vorläufig vorgeschlagenen Produkte und die Massenspektren für deren Fragmentierungen sind im Anhang unter Kapitel 6.1.4 dargestellt. Ausgehend von der Strukturaufklärung durch MS² und MS³ handelt es sich vermutlich bei der Substanz mit dem Peak bei der

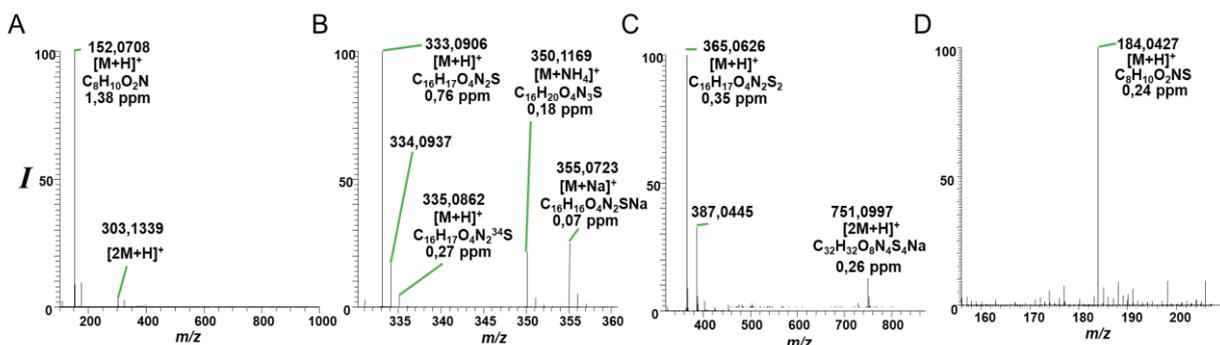


Abbildung 21: Massenspektren zu den Produkten aus der Reaktionslösung von NAPQI mit H₂S

R_t 8,54 min um durch ein Sulfid verbrücktes Di-APAP. Bei der R_t 10,17 min tritt hingegen vermutlich um durch eine Disulfidbrücke verbrücktes Di-APAP auf. Die Substanz bei der R_t 11,77 min ist vermutlich das in der Literatur beschriebene 3-Thioacetaminophen (Trettin 2014b). Für die zweifelsfreie Zuordnung der Stoffe wäre deren Isolation, Aufreinigung und abschließende Strukturaufklärung durch NMR-Messungen erforderlich gewesen. Allerdings lag der Fokus zunächst darauf zu ermitteln, welche wesentlichen Produkte aus der Reaktion von NAPQI in Lösung mit H_2S -Begasung hervorgehen und inwiefern diese anschließend auf das bildgebende MALDI-MS Verfahren mit realen Proben übertragbar sein würden.

Die MALDI Daten der Leberproben (Zeit nach der APAP-Injektion: 30 min, Dosis: 300 mg kg^{-1}), die mit 15, 30 und 45 min mit H_2S begast wurden, wurden mit Kontrollen (keine Begasung) verglichen. Zudem wurde ein Screening nach unbekanntem Massen (Substanzen) mit Hilfe der Mirion Imaging Software durchgeführt, wobei der Massenbereich m/z 100 – 1000 und eine Mindestpixeldichte von 0,1 % als Suchparameter gewählt worden sind.

Die Ergebnisse des Screenings waren wie folgt: Weder protonierte noch Alkalimetall-Addukte der Produkte aus der im wässrigen Medium stattgefundenen Reaktion von NAPQI mit Sulfid konnten im Full Scan MALDI Imaging Modus detektiert werden. Das Screening nach unbekanntem Substanzen mit der Mirion Software offenbarte nach dem Abgleich mit nicht-begasteten Kontrollproben Ionendichtebilder von mehreren m/z , die ausschließlich von den Oberflächen der H_2S begasteten Proben (15, 30 und 45 min Begasungszeit) erhalten wurden (s. Kapitel 6.1.5 für die Ergebnisse einer 30 min begasteten Probe). Eine Reaktionstätigkeit des H_2S auf der begasteten Leberoberfläche ließ sich damit feststellen. Allerdings konnten diese m/z nicht mit einer NAPQI Reaktion in Verbindung gebracht werden. Vermutlich handelt es sich bei den detektierten Verbindungen um solche, die aus der Reaktion des Sulfids mit lebereigenen Substanzen hervorgegangen sind.

Die intensive Gelbverfärbung der Oberfläche ist möglicherweise auch teilweise auf die Rückreaktion des H_2S zu anorganischen Sulfiden (z.B. in Verbindung mit auf dem Gewebe vorkommenden Alkalimetallionen) zurückzuführen. Anorganische Salze können bekanntlich zu Ionensuppressionseffekten bei der MALDI-MS führen, wodurch es zur Verschlechterung der Nachweisgrenzen kommen kann (Börnsen 2000).

Natriumsulfid, welches zur Derivatisierung über das Sprayverfahren appliziert wurde (s. Kapitel 5.1.4), führte ebenso nicht zur Bildung der oben beschriebenen Produkte (Ergebnisse nicht gezeigt).

2.2.5 Zusammenfassung zu den Voruntersuchungen zur Analytik vom NAPQI

Durch das Screening von Möglichkeiten zur Derivatisierung des NAPQIs wurden zwei wesentliche Ziele verfolgt: Im Lebergewebe noch nicht abreagiertes NAPQI sollte durch (eine) chemische Reaktion(en) in eine stabilere Form überführt („Trapping“) und wenn möglich auch dessen Ionisationsgüte verbessert werden.

Die Vorversuche mit dem NAPQI Standard sowohl in wässriger als auch organischer Lösung sowie auch aufgetragen als Tropfen auf einem negativen Kontrollgewebe haben gezeigt, dass ein großer Teil dieser Substanz durch Autoreduktion in das APAP überging und zudem eine Vielzahl weiterer Umwandlungsprodukte entstanden sind. Die Untersuchung der Massenspektren zeigte, dass es sich bei diesen vermutlich um Oligomere des NAPQIs handelte. Durch MALDI Imaging Versuche auf Gewebe von Mäusen mit APAP-Injektion konnte kein natives NAPQI detektiert werden. Der Nachweis der monisotopischen Massen für das APAP-Trimer und Tetramer und die Entstehung des APAP-GSH Konjugats waren allerdings Indizien für zwischenzeitlich entstandenes NAPQI im Gewebe, welches offensichtlich aufgrund seiner hohen Reaktivität *in situ* weiterreagierte.

Stabilisierungsansätze mit dem Versuch einer photochemischen Reaktion und mit der Methode der Gas-Derivatisierung führten nicht zu klar über Massenfilterung isolierbaren stabilen Folgeprodukte aus dem NAPQI, welche in Imaging Experimenten hätten detektiert werden können. Das Screening nach unbekanntem Massen nach der Gas-Reaktion offenbarte in dem gewählten Massenbereich eine Vielzahl von ausschließlich auf dem positivem Kontrollgewebe detektierbaren m/z . Diese konnten jedoch nicht in Beziehung zu den erwarteten Produkten gebracht werden.

Als dennoch positive Erkenntnis aus diesen Versuchen lässt sich festhalten, dass die Derivatisierungsmethode durch Begasung von biologischen Präparaten für das MALDI Imaging, welche bis dato laut Literaturrecherche noch nicht beschrieben worden ist,

als eine alternative Technik zu bereits etablierten „On-Tissue“-Derivatisierungstechniken in Frage kommen könnte. Der große Vorteil dieser Methode bestünde darin, dass im Vergleich zu anderen Derivatisierungsverfahren keine signifikante Migration von Analyten bei einer Begasung auf dem Gewebe zu erwarten wären.

Die Derivatisierungsversuche ließen verstehen, dass für die Reflektion der möglichen Distribution des toxischen NAPQIs im Gewebe, wenn überhaupt nur die auf nativer Weise entstehenden und detektierbaren Folgeprodukte aus dem NAPQI in Frage kommen könnten.

Inwieweit die letztere Annahme tatsächlich zutrifft, wird im Laufe der Arbeit und im Lichte der Erkenntnisse aus den Bildgebungsversuchen erörtert werden.

2.3 Optimierung der Probenvorbereitung für MALDI-MSI Experimente

2.3.1 Matrixscreening via MALDI-MS

Die MALDI-Matrix erfüllt bei der MALDI Massenspektrometrie mehrere Aufgaben, wobei von diesen die homogene Ko-Kristallisation mit dem Analyten, dessen Desorption und effiziente Ionisation an erster Stelle zu nennen sind (Leopold 2018). Für die gescheite Auswahl der richtigen Matrix existieren zwar Modelle (Shroff 2009), vielfach ist aber die Auswahl der gescheiten Matrix über die eigenen Erfahrungswerte und Literaturangaben und über „Trial and Error“ Gang und Gäbe. Häufig verwendete Matrices sind HCCA (α -Cyano-4-hydroxycimtsäure) und DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure), mit denen sich viele Stoffgruppen ionisieren lassen. Neben diesen Matrices wurden für das Matrixscreening auch zwei im negativen Modus ionisierende Matrices DMAN (*N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,8-naphthalindiamin) und AAC (9-Aminoacridin) und zudem das MBT (2-Mercaptobenzothiazol), welches vor allem mittelpolare Substanzen und Lipide gut ionisieren kann (Teuber 2010) für das Matrixscreening ausgewählt.

Es wurden frische Lösungen von HCCA [7 mg mL⁻¹ in AcN:H₂O (1:1, v/v) + 0,2 % TFS], DHB [30 mg mL⁻¹ in Aceton:H₂O (1:1, v/v) + 0,1 % AS], DMAN [10 mg mL⁻¹ in EtOH + 0,1 % AS], AAC [10 mg mL⁻¹ in EtOH + 0,1% AS] und MBT [5 mg mL⁻¹ in Aceton:H₂O (4:1) (v/v) + 0,1 % AS]. Die zu analysierenden Referenzstandards von APAP, APAP-

SUL, APAP-GLC, APAP-GSH und GSH wurden mit einer Konzentration von 100 µg mL⁻¹ in Methanol bzw. H₂O (GSH) angesetzt. Die Säuren wurden den Matrixlösungen nur dann zugesetzt, wenn im positiven Ionenmodus gemessen wurde. Die Auftragung der Substanzen erfolgte auf eine ordinäre Edelstahlplatte über die sogenannte „Premix-Methode“. Dazu wurden die Analytlösungen in einem volumetrischen Verhältnis von 1:3 (v/v) gemischt mit den Matrixlösungen gemischt, mit einem Vortexmischer gerührt und anschließend 1 µL Aliquote aufgetragen. Die Trocknung und Kristallisation erfolgte bei RT im Laborabzug (Sezgin 2018).

Tabelle 1: MALDI-MS-Matrixscreening für die Analyten via Premix-Verfahren auf Edelstahlplatte

(Sezgin 2018)

	APAP [%]		APAP-SUL [%]		APAP-GLC [%]		APAP-GSH [%]		GSH [%]	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
HCCA	100	1	0	13	20	21	100	11	39	100
DMAN	15	14	nd	1	1	2	nd	nd	2	35
AAC	nd	3	nd	0	nd	2	nd	2	nd	4
MBT	47	6	0	100	65	100	34	46	21	78
DHB	41	3	nd	1	6	2	7	2	1	48
BLANK [%]										
Polarität	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
HCCA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12	2	12	20
DMAN	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MBT	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DHB	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: nicht detektiert. Massenisolation: ± 10 ppm. *n* (Spots) = 3.

Das Ziel dieses MALDI-MS Versuchs war es die optimale Auswahl des Matrix-Lösungsmittelsystems, bei dem keine oder kaum Matrixinterferenzen für die gesuchten Analyten im Full Scan Modus auftraten und eine optimale Ionisation der Analyten gemessen am Ion Current beobachtet wurden, zu ermitteln (Sezgin 2018).

Zwei Messungen pro Spot (2 x 1 min) wurden über Full Scan MALDI-MS Messungen im Massenbereich *m/z* 100 – 800 mit einer Massenauflösung von 140.000 aufgenommen. Für jeden Spot wurde die durchschnittliche Signalintensität im gesamten Ionenchromatogramm bei der Datenprozessierung ermittelt und

anschließend wiederum der Durchschnittswert aus zwei Spots berechnet. Die Isolation der Massen erfolgte in einem Toleranzfenster von ± 10 ppm. Die in der Tabelle 1 dargestellten Werte sind auf den höchsten Intensitätswert (100 %) normierte Werte für den jeweiligen Analyten (Sezgin 2018).

Die Ergebnisse zeigten, dass für die Analyse von APAP die Messung im positiven Ionenmodus mit der Matrix HCCA zu bevorzugen ist. Für das APAP-GLC wurden mit MBT im negativen Ionenmodus die höchsten Intensitäten gemessen. MBT eignete sich zudem für die Detektion von APAP-GSH, APAP-SUL und GSH im negativen Modus, zumal sich keine Masseninterferenzen mit dieser Matrix zeigten (Sezgin 2018).

Die endogenen Gallensäuren (Taurocholsäure [TCS] und Taurochenodoxycholsäure [TCDS]) wurden mit dem für Messungen im negativen Modus ausgesuchten Matrix-Lösungsmittel System MBT [5 mg mL^{-1} in Aceton:H₂O (4:1) (v/v)] ionisiert.

2.3.2 Präparation der Leberschnitte für MALDI-MSI Experimente

Die Isolation der Leberproben von den Versuchstieren erfolgte am IfaDo unter der Leitung von Dr. Ahmed Ghallab und wird im Kapitel 5.2 beschrieben.

Die mit Trockeneis zum INFU transportierten gefrorenen Mausleberproben (jeweils vom linken Leberlappen) wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert. Bei Bedarf erfolgte die Überführung in den Mikrotomkryostaten HM550 von Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Germany), worin sie mit dem Fixiermittel Optimal Cutting Temperature (OCT) freezing medium bei -20 °C Objekt- und -30 °C Kammertemperatur auf Metallplatten fixiert wurden.

Es wurden von jeder Probe 5 – 7 Sets von nacheinander geschnittenen Gewebeschnitten präpariert, damit hinreichende Replikate für das MALDI Imaging und für histochemische Färbungen generiert wurden. Dabei wurde ein Schnitt für die CYP2E1-Färbung und der darauffolgende für MALDI MSI Versuche präpariert. Ein weiterer Schnitt im Set, der aber nicht zwingend seriell geschnitten sein musste, war für die H&E Färbung bestimmt. Die Absicht war optische Bilder von CYP2E1 gefärbten Leberschnitten, die histochemische bzw. morphologische Informationen enthielten, sinnvoll mit den Ionendichtebildern (Masseninformation enthaltende „Pixelbilder“) zu verknüpfen, indem die Ionendichtebilder möglichst deckungsgleich auf die

Mikroskopbilder von der CYP2E1 Färbung projiziert werden sollten. Vorversuche zeigten, dass diese Operation (deckungsgleiche Superposition) für Schnittdicken $\leq 5 \mu\text{m}$ gelang. Leberschnitte über $5 \mu\text{m}$ ließen sich zwar einfacher erzeugen, führten aber zu unterdurchschnittlichen Ergebnissen, was die Superposition anging. Offensichtlich war der Abstand der Schnitte zueinander zu hoch, sodass die strukturellen Unterschiede auf der Leberoberfläche zunahmen. Der Nachteil von dickeren Schnitten ist zudem eine längere Trocknungszeit und längere Sprühzeiten mit Matrixlösung bis die Oberfläche homogen bedeckt wird. Außerdem haben dickere Schnitte unebenere Oberflächenprofile, was zur unterschiedlichen Fokussierung des Laserspots auf der Probenfläche und dadurch zur Verzerrung der Imaging Messergebnisse führt. Denn eine Autofokussierfunktion ist beim verwendeten MALDI Instrument nicht erhalten. Dicken von $1 - 2 \mu\text{m}$ ließen sich zwar ebenso schneiden, jedoch gestaltete sich das serielle Schneiden als äußerst schwierig, sodass mehrere Anläufe gebraucht wurden, bis ein Set generiert werden konnte. Der Schnittdickenbereich zwischen $3 - 5 \mu\text{m}$ wurde daher anhand seines Oberflächenprofils (s. Kapitel 5.3) und der Geschwindigkeit der Herstellung von Sets für die experimentellen Belange als optimal angenommen.

Die erzeugten Leberschnitte wurden durch die „Thaw Mounting“ Methode auf gewöhnliche Objektträger aus Glas mit den Abmessungen $18 \times 18 \times 1 \text{ mm}$ aufgenommen. Die für die CYP2E1- und HE-Färbung generierten Schnitte wurden danach im Kryostaten wieder eingefroren und bis zur Färbung im $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ Tiefkühlschrank gelagert. Die MALDI Matrices HCCA und MBT wurden über ein pneumatisches Sprayverfahren mit Stickstoffgas mit dem Sprayer SMALDIprep von TransMIT (Giessen, Germany) aufgetragen. Die Sprayparameter waren wie folgt: HCCA [7 mg mL^{-1} in AcN:H₂O (1:1, v/v) + 0,2 % TFS] wurde für 20 min mit $22 \mu\text{L min}^{-1}$ Matrixfluss, 4 L min^{-1} Gasfluss and 300 rpm Drehgeschwindigkeit gesprayed, während das MBT [5 mg mL^{-1} in Aceton:H₂O (4:1) (v/v)] für 15 min und einem reduzierten Matrixfluss von $17 \mu\text{L min}^{-1}$ aufgetragen wurde (Sezgin 2018).

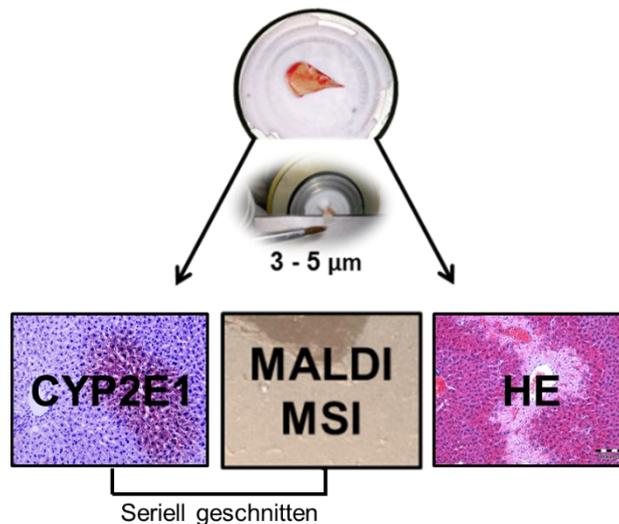


Abbildung 22: Erzeugung von Sets an Leberschnitten für die histochemischen Färbeverfahren und für das MALDI-MSI Experiment

2.3.3 Einstellung der Laserspotbreiten und der räumlichen (spatialen) Scanauflösung

Die zu auswählende räumliche (spatiale) Scanauflösung im bildgebenden MALDI Experiment hat erheblichen Einfluss auf die Ionenausbeuten der untersuchten Analyten, auf die Qualität der erzeugten Ionendichtebilder sowie auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Umfangreiche Untersuchungen in der Masterarbeit haben gezeigt, dass für die in dieser Arbeit verwendete Ionenquelle die höchsten Ionenausbeuten mit Laserspotbreiten von 40 – 60 μm erhalten wurden. Die geringsten Intensitäten wurden nahe des Fokussierpunkts (4 – 5 μm für diese Quelle) verzeichnet. Die Einstellung der Laserspotbreite erfolgt bei der verwendeten Ionenquelle dadurch, dass die Probenplatte relativ zur finalen Blende aus dem der Laserstrahl austritt und auf die Probenoberfläche trifft, zu- oder fortbewegt wird. Die Bewegung erfolgt damit in der z-Achse. Hingegen bewegt sich die Probenplattform während der Messung durch Abrasterung mit dem Laser in der x- und y-Achse. Die tatsächliche Scanauflösung bestimmt die Pixelbreite bzw. -höhe (x,y) und damit die Scanschrittweiten der Probenplattform. Diese Größen sind feste Werte, die über die Steuerungssoftware (Master Control Programm) für die Quelle eingestellt werden. Die Pixelformen wurden für diese Versuche quadratisch ($x = y$) eingestellt und es wurden zu Testzwecken die Auflösungen 5, 20 und 50 μm ausprobiert. Vor dem Beginn der

MALDI-MSI Messungen wurden die Laserspotbreiten bezüglich der gewählten Scanauflösungen angepasst. Zumal die auf die Probenoberfläche projizierten Laserspots eine leicht ovale Form besitzen, wurden die Laserspotbreiten so eingestellt, dass bei der Messung leichtes „Oversampling“ (Überlappen der Laserspots) auftrat. Der Grund war, dass beim Abrastern der Probenoberfläche möglichst wenige Gaps zwischen den Spots generiert werden sollten. Die Werte für die tatsächlich eingestellten Laserspotbreiten waren damit ein wenig höher als die in das Master Control Programm eingegebenen Scanauflösungen. Mikroskopische Untersuchungen ergaben für die horizontale Breite der Laserspots einen Durchmesser von ca. 21 – 23 μm . Die Angabe eines genauen Wertes wird allerdings durch die Oberflächenmorphologie (Leberschnitt + Matrix) erschwert, da die Grenzen der Ausdehnungen der Spots auch unter dem Mikroskop nicht eindeutig zu erkennen waren. Wird mit dem „Oversampling“ Modus gemessen, muss berücksichtigt werden, dass es dadurch logischerweise zur Streckung des Ionendichtebildes relativ zur tatsächlich vermessenen Leberoberfläche kommt. Dieser Sachverhalt muss bei der Superposition der Bilder beachtet werden; manuelle Anpassungen bei der Bildbearbeitung sind damit erforderlich (Sezgin 2014).

Es ist wichtig zu erwähnen, dass die Frage nach der optimalen Auswahl der lateralen Scanauflösung sich stets an der zu beantwortenden Fragestellung orientiert: Inwieweit sollen Strukturelemente auf dem biologischen Präparat aufgelöst werden und dabei noch hinreichende Signalintensitäten (hohes Signal/Rausch-Verhältnis, falls Signalrauschen existent) der Analyten erhalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit war das Ziel APAP und seine Metaboliten und Addukte, insbesondere das APAP-GSH Konjugat, zu detektieren und durch die Projektion auf die CYP2E1 gefärbten pericentralen oder periportalen Leberlappenzonen der Leberoberfläche zuzuweisen, um distinktive Verteilungen bzgl. der Metaboliten und Addukte vom APAP zu erforschen. Zusätzlich sollte das Imaging für unter MALDI-Bedingungen gut ionisierende Gallensäuren (TCS und TCDS) erfolgen.

Für das Experiment wurden wiederum Leberproben verwendet, die von Versuchstieren nach 30 min APAP Injektion (300 mg kg^{-1} Körpergewicht) erhalten wurden, zumal die höchsten Signalintensitäten für APAP Metaboliten in diesem Zeitpunkt vermutet wurden.

Erwartungsgemäß waren die Signalausbeuten (Ion Counts) für die betrachteten Analyten bei einer Scanauflösung von 5 μm signifikant niedriger als bei 50 μm . Beispielsweise lag die Durchschnittsintensität für APAP bei 5 μm um den Faktor von ca. 50 niedriger als bei der 50 μm Scanauflösung, während vieler der APAP Folgeprodukte (APAP-GLC, APAP-SUL, APAP-GSH) und das GSH unter das Detektionslimit (LOD, *engl.* limit of detection) fielen. Detektiert werden konnten bei der höchsten Auflösung folglich nur APAP, TCS und TCDS. Bei 50 μm Scanauflösung konnten keine distinktiven Verteilungen beobachtet werden, sodass die Entscheidung am Ende auf Scanauflösung von 20 μm fiel. Diese Einstellung war ein guter Kompromiss für hinreichende Signalintensitäten und der reproduzierbaren und verlässlichen Abbildung von Zonen mit signalfreien und signalenthaltenden Flächen innerhalb eines Leberlobuls (Sezgin 2018).

2.3.4 Untersuchung von Signalinterferenzen und Artefakten auf dem Lebergewebe

Die Voruntersuchungen in Kapitel 2.3.1 haben lediglich Signalinterferenzen für APAP-GSH und GSH aufgezeigt, wenn HCCA als Matrix verwendet wurde. Unter Berücksichtigung dieser Interferenzen und der Signalintensitäten (der Analyten) wurden adäquate Matrix-Lösungsmittelsysteme für die bildgebenden MALDI Versuche ausgewählt. Dieses Prescreening auf der Metallplatte liefert zwar wesentliche Informationen über die Ionisationseffizienz der untersuchten Analyten mit dem jeweiligen Matrix-Lösungsmittelsystem, ist aber nur bedingt geeignet, um das tatsächliche Ionisationsverhalten der Analyten auf realem Gewebe zu simulieren.

Von daher wurden im nächsten Schritt Leberschnitte von Mäusen ohne APAP Injektion (Negativkontrollen) und von Mäusen nach 30 min APAP Injektion (Positivkontrollen) geschnitten, mit den selektierten Matrices besprüht und durch MALDI-MSI Messungen miteinander verglichen.

Die räumliche (spatiale) Auflösung wurde wie unter Kapitel 2.3.3 beschrieben wurde, auf 20 μm eingestellt und die Laserspotbreiten manuell so fokussiert, dass sie bei der gewählten Scanauflösung leicht überlappten.

Zur Untersuchung von Masseninterferenzen wurde ein Isolationsfenster von ± 10 ppm für die Massenextraktion aus dem TIC verwendet. Bekanntlich erlaubt die Performance des Q-Exactive MS bei interner Kalibrierung Massengenauigkeiten von < 1 ppm (Quadratisches Mittel). Trotzdem wurde ein deutlich größerer Richtwert ausgewählt. Der Beweggrund dafür war, dass ein *intra*week und darüber hinaus stabiles MALDI-MSI Screening Verfahren für den Durchsatz möglichst vieler Leberproben entwickelt werden sollte, welches ständiges Nachkalibrieren des Massenspektrometers nicht erforderte. Ein System, das im Vorneherein so optimiert wurde, dass Masseninterferenzen bis ± 10 ppm ausgeschlossen werden konnten, würde damit eine längere Langzeitstabilität aufweisen. Zudem wurden im realen Experiment Massenabweichungen > 10 ppm selbst *intra*month nicht beobachtet.

Zur Generierung von nicht-normalisierten und von auf den TIC normalisierten Ionendichtebildern wurden die Rohdaten mit dem Programm ImageQuest (v. 1.1.0.54) von Thermo Fisher Scientific (Bremen, Deutschland) prozessiert. Diese Bilder dienten zum Screening der untersuchten Analyten. Mit dem Programm MSIReader (v. 0.09) (Robichaud 2013) erfolgte die Auswahl der ROIs und deren statistische Auswertung. Zuvor mussten dazu Q-Exactive MS Rohdaten mit dem *raw converter* Tool von Image Quest in *imzML* Formate umgewandelt und exportiert werden. Details zu den Einstellungen der MALDI-MSI Messparameter und zur Auswertung von MALDI-MSI Rohdaten sind in Kapitel 5.4 beschrieben (Sezgin 2018).

Im Prescreening-Verfahren wurden nennenswerte Signalinterferenzen für GSH und APAP-GSH mit HCCA beobachtet und damit HCCA als Matrix für die Detektion dieser Substanzen zunächst ausgeschlossen. Für die anderen Paarungen ergaben sich keine Masseninterferenzen, wenn Reinslösungen von Analyten verwendet, die Kristallisation auf einer Metalloberfläche durchgeführt und von dieser Oberfläche aus gemessen wurde.

Bei einem biologischen Präparat (reales biologisches System), wie sie von der Oberfläche einer Mausleberschnittprobe vorgegeben wird, könnten unter bestimmten Umständen Masseninterferenzen und Signalsuppressionen für Analyt/Matrix-Systeme auftreten, die vorher im artifiziellen Prescreening-Verfahren nicht beobachtet wurden. Denkbar sind dabei folgende Szenarien, die zu den oben genannten Effekten führen könnten:

- Masseninterferenzen durch endogene Biomoleküle und anorganische Salze (Ionen)
- Masseninterferenzen durch Bildung von Matrix-Biomolekül-Fragmenten und – Addukten und Matrixionen/-Addukten
- Einfluss der Probenoberfläche und des Sprayverfahrens auf die Kristallisation der Matrix; Bildung von masseninterferierenden Matrixaddukten und – fragmenten, die im Prescreening Experiment (Premixverfahren) nicht auftraten
- Ionensuppressionseffekte (Signalquenching) durch endogene Biomoleküle und anorganische Salze (Ionen), primär durch konkurrierende Besetzung (Adsorption) an freie Matrixkristalloberflächen bzw. Inkorporation in freie Kristallgitterplätze
- Längere Messungen beim MALDI-MSI Verfahren verglichen zu zufällig und in kurzen Zeitintervallen penetrierten Proben beim MALDI-MS Prescreening Verfahren machen das Auftreten von Masseninterferenzen beim bildgebenden Experiment wahrscheinlicher.

In den Abbildungen 23A werden die Vergleiche der Negativ- und Positivkontrollen für die Analyt/Matrix-Systeme und Ionisationsmodi APAP/HCCA (+), APAP-GLC/HCCA (+), APAP-GLC/MBT (-), APAP-SUL/MBT (-) und APAP-GSH/MBT (-) demonstriert: Für die Negativkontrollen konnten dabei keine nennenswerten Signalinterferenzen (Rauschen [Noise]) beobachtet werden.

GSH und für die Gallensäuren wurden von diesem Vergleich ausgeschlossen, zumal diese Substanzen bereits native in der Säugetierleber vorkommen und erwartungsgemäß vom Negativkontrollgewebe detektiert werden sollten. Für diese Substanzen lässt sich daher nicht mit Gewissheit die Höhe des Signalrauschens determinieren.

Die Robustheit der optimierten Systeme wurde jeweils für die Negativ- und Positivkontrollen mit vier Gewebsschnitten aus vier unterschiedlichen Mäusen getestet und konnte bestätigt werden.

Im danach folgenden Experiment wurden APAP, APAP-SUL, APAP-GLC, APAP-GSH, APAP-NAC und GSH enthaltende Tropfen aus Lösungen mit einer Konzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ in Methanol bzw. H_2O (nur GSH) auf Negativkontrollgewebe platziert und die Proben nach der Matrixapplikation gemessen. Ziel war es zu untersuchen, ob

Artefakte bzw. Ionenübergänge bezogen auf die Analyten beispielsweise durch In-Source-Fragmentierung bei der MALDI-Ionisation entstehen. Die Betrachtung der Artefaktbildung ist deshalb vonnöten, weil in MALDI-MS(I) Experimenten die chromatographische Dimension, wie bei GC oder (HP)LC Versuchen, fehlt. Somit kann im selben Scanereignis eine Signalüberlappung vom Analyten und von Artefakten nicht aufgetrennt werden kann.

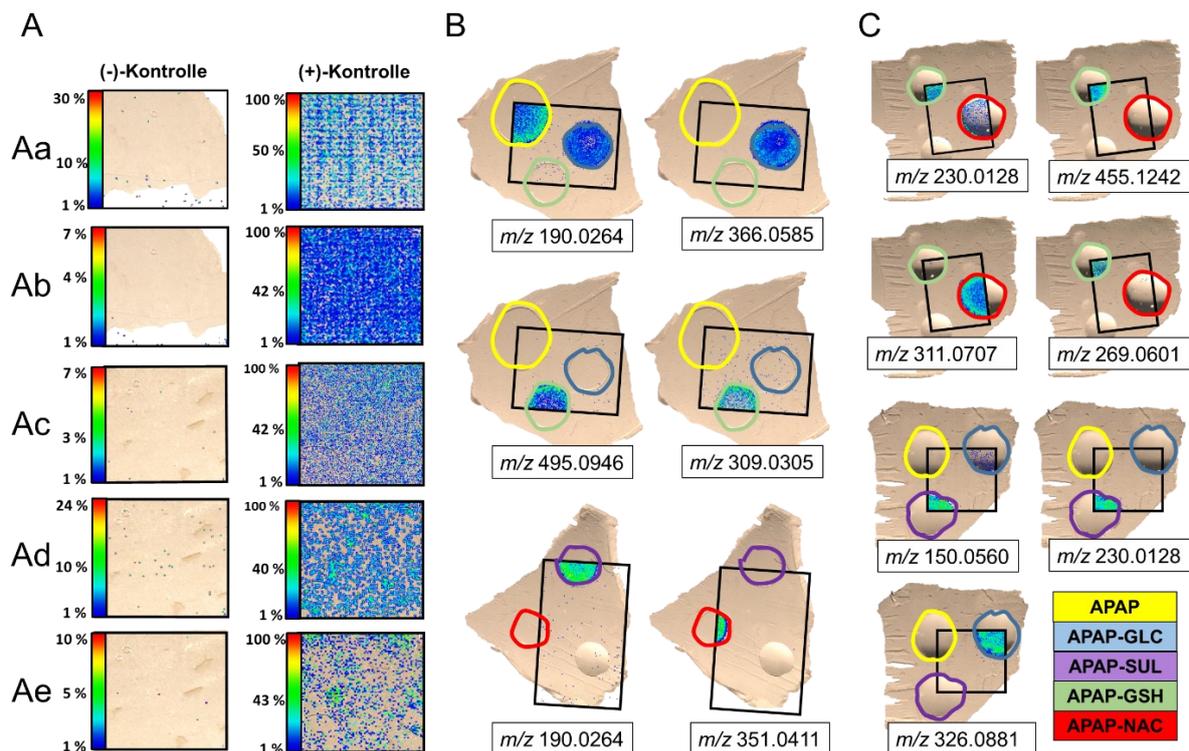


Abbildung 23: Untersuchung von Masseninterferenzen und Artefaktbildung

23A: Vergleich der Negativ- mit Positivkontrollen zur Untersuchung des Signalrauschens bzw. von Masseninterferenzen für Aa: APAP/HCCA (+), Ab: APAP-GLC/HCCA (+), Ac: APAP-GLC/MBT (-), Ad: APAP-SUL/MBT (-) und Ae: APAP-GSH/MBT (-). $n = 4$ Schnitte (von unterschiedlichen Negativ- oder Positivkontrollmäusen). 23B: MALDI-MSI Abbildungen der Analyt-enthaltenden Tropfen auf Negativkontroll-Gewebe zur Untersuchung von Artefakten für Messungen im (+)-Modus mit HCCA als Matrix. Dargestellt sind die zu den monoisotopischen Massen korrespondierenden Ionendichtebilder für APAP $[M+K]^+$: m/z 190,0264, APAP-GLC $[M+K]^+$: m/z 366,0585, APAP-GSH $[M+K]^+$: m/z 495,0946, 3-CYS-APAP $[M+K]^+$: m/z 309,0305. 23C: MALDI-MSI Abbildungen der Analyt-enthaltenden Tropfen auf Negativkontroll-Gewebe zur Untersuchung von Artefakten für Messungen im (-)-Modus mit MBT als Matrix. Dargestellt sind die zu den monoisotopischen Massen korrespondierenden Ionendichtebilder für APAP $[M-H]^-$: m/z 150,0560, APAP-GLC $[M-H]^-$: m/z 326,0881, APAP-SUL $[M-H]^-$: m/z 230,0128, APAP-GSH $[M-H]^-$: m/z 455,1242, APAP-NAC $[M-H]^-$: m/z 311,0707. Die in den Abbildungen markierten Tropfenflächen wurden als „regions of interest“ (ROI) ausgewählt und die Massenisolierung erfolgte mit ± 10 ppm (Sezgin 2018).

Die Untersuchung wurde sowohl für die Applikation von HCCA(+) (s. Abb. 23B) als auch MBT(-) (s. Abb. 23C) durchgeführt.

Die gemittelten Signalintensitäten wurden auf die höchste Signalintensität (100 %) normiert und sind in der Tabelle 2 zusammengefasst dargestellt.

Anhand des Experiments ist erkennbar, dass von APAP ausgehend keine Signalinterferenzen für APAP-Konjugate und Metabolite entstanden waren. Aus APAP-GLC konnte durch Fragmentierung in der Ionisationskammer ein geringer Anteil an APAP-Signalen (ca. 15 % verglichen zum Hauptsignal im positiven Modus) erzeugt werden. Die Entstehung von APAP aus APAP-GLC im negativen Modus war vernachlässigbar, während ca. 13 % APAP verglichen zum APAP-SUL Signal aus APAP-SUL gebildet wurden. Erwähnenswert ist zudem die Entstehung von APAP-CYS Signalen aus APAP-GSH (ca. 21 % im positiven Modus). Mit APAP-CYS korrespondierende Signale sind aber insoweit unproblematisch, zumal APAP-CYS (und ebenso APAP-NAC) in den nachfolgenden MALDI-MSI Experimenten nicht untersucht wurden. Vorversuche hatten hier gezeigt, dass zu diesen Substanzen korrespondierende Signale häufig unter dem Detektionslimit lagen bzw. kein eindeutiger Trend für deren Verteilungen in den kinetischen wie auch dosisabhängigen Experimenten beobachtet werden konnten. Schließlich konnte noch ein geringer Teil des ionisierten APAP-GSHs durch Ion-Source Fragmentierung in das APAP-SUL (ca. 10 %) bzw. APAP-NAC (ca. 7 %) übergehen. Zusammenfassend kann aus der Kreuztabelle gefolgert werden, dass die Artefaktbildung relativ gering ausfiel (relevante Artefakte: < 15 % verglichen zum Hauptsignal).

Um Ionenübergänge bzw. Artefaktbildung zu erkennen wurde in diesem Experiment eine relativ hohe Konzentration der Analyten auf dem Gewebe angebracht, um erheblich über dem Detektionslimit zu arbeiten und Artefakte deutlich erkennen zu können. Die On-Target Stoffmenge betrug z.B. für das APAP ca. 600 pmol/Tropfenfläche. Nimmt man für den Tropfen eine annähernd kreisförmige Form und einen durchschnittlichen Radius von ca. 1000 μm an, so ist die On-Target-Stoffmengenkonzentration bezogen auf die Tropfenfläche bei ca. 800 fmol/ mm^2 . Die Sensitivitäten in einem MALDI Experiment liegen aber für die meisten Analyten in der Regel im niedrigen fmol-, bei Molekülen mit hoher Ionisationsgüte sogar im amol-Bereich (s. Kapitel 6.1.2). Das Experiment ist daher als semi-artifiziell anzusehen; es

ist zu erwarten, dass das Auftreten von In-Source Fragmenten im realen MALDI-MSI Experiment deutlich geringer ausfallen wird und damit die Wahrscheinlichkeit die in geringen Prozentwerten auftretenden Ionenübergänge zu beobachten.

Tabelle 2: Gemittelte relative Signalintensitäten aus den TIC-normalisierten Durchschnittssignalintensitäten der Tropfenflächen (n = 3) geordnet nach Artefakten aus den jeweiligen Analyten

Ionendichtebilder wurden mit ROI selektiert. Es wurde in den jeweiligen Zeilen auf das Signal in den grau unterlegten Feldern normiert (= 100 %). Massenisolation: ± 10 ppm (Sezgin 2018)

Matrix/ Polarität	Analyt	APAP [%]	APAP – GLC [%]	APAP – SUL [%]	APAP – GSH [%]	APAP – CYS [%]	APAP – NAC [%]
HCCA(+)	APAP	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
HCCA(+)	APAP-GLC	14.7	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
HCCA(+)	APAP-SUL	*	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
HCCA(+)	APAP-GSH	0.8	0.0	0.0	100.0	21.1	0.0
HCCA(+)	APAP-NAC	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	100.0
MBT(-)	APAP	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MBT(-)	APAP-GLC	0.8	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MBT(-)	APAP-SUL	12.6	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
MBT(-)	APAP-GSH	0.1	0.0	9.9	100.0	3.7	0.0
MBT(-)	APAP-NAC	0.1	0.0	6.6	0.0	0.1	100.0

* APAP-SUL konnte im positiven Ionenmodus nicht detektiert werden. Die durchschnittliche Signalintensität lag für das APAP Artefakt bei 7E3 ion counts.

Um Verzerrungen in den Ionendichtebildern, die durch Artefakt Bildung aus den anderen Metaboliten hervorgerufen werden könnten, methodisch ausschließen zu können, können die spatialen Verteilungen der Stoffe untersucht und untereinander verglichen werden. Werden beispielsweise lokale Hot-Spots (höchste Signalintensitäten) von APAP-GSH registriert, so können im nächsten Schritt APAP-SUL Signale (ca. 10 % Übergang im negativen Modus von APAP-GSH → APAP-SUL) genau in diesem Bereich angeschaut werden. Weisen die Signalmuster (Pixel) und Intensitätsverteilungen von APAP-SUL keine ähnlichen Muster wie das vermeintliche Parent Ion (APAP-GSH) auf, so kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon

ausgegangen werden, dass auch im übrigen Areal des Ionendichtebildes keine Verzerrungen durch Artefaktbildung auftreten werden.

2.3.5 Zusammenfassung der Optimierungsversuche für die MALDI-MSI Experimente

Es konnte eine robuste MALDI-MSI Methode entwickelt und anhand von vier Gewebsschnitten von jeweils vier Negativ- (Mäuse ohne APAP-Injektion) und vier Positivkontrollen (Mäuse mit APAP-Injektion, Gewebeentnahme nach 30 min) erfolgreich getestet werden. Für die gewählten Matrix-Lösungsmittelsysteme und Präparationsmethoden wurden bzgl. APAP und seiner Biotransformationsprodukte keine signifikanten Hintergrundsignale gemessen. Damit entfällt ein Signal-Denoising und die minimale Skalierung der Analytintensitäten können auf sehr niedrige Niveaus eingestellt werden. Dies hat den Vorteil, dass positiv richtige Signale mit niedriger Intensität nicht aus den Ionendichtebildern eliminiert werden müssen, das nahezu gesamte Intensitätsspektrum der Analytsignale wird damit erfasst. Leberproben konnten mit Schnittdicken zwischen 3 – 5 μm reproduzierbar geschnitten werden. Im Experiment wurden Leberschnittproben für das MALDI-MSI Experiment und die histochemischen Färbungen CYP2E1 und H&E generiert. Die Leberschnitte für das MALDI-MSI Experiment und für die CYP2E1 Färbung wurden dabei seriell, d.h. nacheinander geschnitten, um eine Superposition von Ionendichte- und histochemischen Bildern zu ermöglichen. Die ausgewählte Pixelauflösung lag bei 20 μm und es wurde mit leichtem Overlapping gemessen. Die Messzeiten pro Gewebsschnitt lagen zwischen 1.5 – 3 h. Zur Messung und semi-Quantifizierung der Signale in den darauffolgenden MALDI-MSI Experimenten wurden die Gewebeproben entweder mit HCCA [7 mg mL^{-1} in AcN:H₂O (1:1, v/v) + 0,2 % TFS] besprüht, um die Analyten APAP und APAP-GLC zu untersuchen. Für die Gallensäuren wie z.B. TCA, für APAP-SUL, APAP-GSH und GSH wurde hingegen mit MBT [5 mg mL^{-1} in Aceton:H₂O (4:1) (v/v)] besprüht. Die Sprayparameter wurden wie folgt optimiert: HCCA wurde für 20 min mit 22 $\mu\text{L min}^{-1}$ Matrixfluss, 4 L min^{-1} Gasfluss and 300 rpm Drehgeschwindigkeit gesprayt. Das Besprühen mit MBT erfolgte für für 15 min und einem reduzierten Matrixfluss von 17 $\mu\text{L min}^{-1}$. Eine intensive Artefaktbildung konnte für die untersuchten Analyten nicht beobachtet werden.

2.4 Entwicklung einer quantitativen HPLC-Messmethode zur Quantifizierung von APAP und seinen Transformationsprodukten sowie der Gallensäuren

Zur Quantifizierung von APAP, APAP-GLC, APAP-SUL, APAP-OME, APAP-GSH, APAP-CYS, APAP-NAC und TCS wurde eine HPLC-ESI-MS Methode auf einem hochaufgelösten Orbitrap XL™ Massenspektrometer von Thermo Scientific (Bremen, Deutschland) entwickelt, um diese Substanzen in Plasmaproben von Mäusen zu quantifizieren.

Eine HPLC-ESI-MS/MS Methode aus der Literatur, bei der APAP, APAP-GLC, APAP-SUL, APAP-GSH, APAP-CYS und APAP-NAC aus humanen Plasma- und Urinproben quantifiziert wurden, existierte bereits. In dieser Arbeit wurde APAP-D4 als Interner Standard zur Quantifizierung von APAP und APAP-SUL-D3 zur Quantifizierung der übrigen Metabolite verwendet: Die Chromatographie beruhte auf einer RP-Phasen Chromatographie mit einer Agilent Poroshell 120 EC-C18 Säule (Cook 2015).

Ausgehend von den Informationen aus der Literatur wurden daher verschiedene im eigenen Labor verfügbare C18 Phasen zur Retention der oben genannten Analyten wie auch APAP-OME und der Gallensäuren TCS und TCDS getestet. Es kamen dabei Hartkern-Silica-Phasen wie die Nucleoshell® RP 18 und RP18Plus (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und Kinetix Coreshell® RP 18 (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) ebenso wie komplett poröse Standard C18-Phasen wie die Nucleodur® C18 Gravity (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und die LUNA® C18 (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Allerdings konnte mit keiner der oben genannten Phasen zufriedenstellende Ergebnisse für die Peakformen und Retentionszeiten der untersuchten Analyten erhalten werden (Ergebnisse nicht gezeigt), zumal eine breite Palette von Substanzen in einer Multimethode analysiert wurde, die unterschiedliche Polaritäten aufwiesen. Die Wahl für die Methodenoptimierung fiel auf die Nucleodur® HILIC Säule (3 µm, 110 Å, 150×2 mm, 3 µm) von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Mit dieser Chromatographieart und –phase konnten optimale und robuste Chromatographiebedingungen zur Quantifizierung der Substanzen erhalten werden.

Als interne Standards wurden für APAP das APAP-D4, für APAP-GLC, APAP-SUL, APAP-CYS und APAP-OME das APAP-SUL-D3, für APAP-GSH das APAP-GSH-D3 und für TCS und TCDS, die TCS-D5 verwendet.

Stocklösungen der Referenzstandards APAP und seiner Metaboliten und von TCS und TCDS wurden mit Ausnahme von APAP-GSH mit einer Konzentration von $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ in Methanol angesetzt. APAP-GSH wurde mit $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ in Methanol und einem 17 %-igem bidestilliertem Wasseranteil angesetzt. Stocklösungen für Interne Standards wurden wie folgt angesetzt: APAP-D4 und TCS-D5 wurden analog wie die Referenzstandards APAP und TCS angesetzt, APAP-SUL-D3 mit $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ in einer Mischung aus Methanol und bidestilliertem Wasser (Wasseranteil: 5,8 Vol.-%) und APAP-GSH-D3 mit einer Konzentration von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ in Methanol und bidestilliertem Wasser (Wasseranteil: 17,0 %). Die Lagerung der Stocklösungen erfolgte in 12 mL Braunglasflaschen bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Lösungen wurden in einem Zeitraum von 3 Monaten verwendet.

Kalibrierlösungen wurden aus den Stocklösungen bzw. aus Verdünnungen von Stocklösungen in 1,5 mL Braunglas-HPLC Behältnissen angesetzt. Der angesetzte Konzentrationsbereich umfasste 0,02 bis $15 \mu\text{g mL}^{-1}$. Diese Lösungen wurden anschließend mit einer Mixtlösung aus den Stocklösungen von den internen Standards mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ versetzt.

Der Wasseranteil in jeder Kalibrierlösung wurde so eingestellt, dass sie 6 Vol.-% betrug. Das Hinzufügen dieses Wasseranteils verhinderte zum einen das Entstehen von Doppelpeaks für APAP und APAP-OME für die gewählte chromatographische Methode und zum anderen konnten die Signalintensitäten für APAP-GSH gesteigert werden. Ein noch höherer Wasseranteil wirkte sich allerdings wiederum kontraproduktiv auf die Peakformen von APAP und APAP-OME aus.

Die Plasmaproben wurden hingegen nach ihrer Prozessierung mit 12 Vol.-% Wasser enthaltendem AcN aufgenommen, um optimale Chromatographiebedingungen zu gewährleisten (s. Kapitel 5.5.1).

Die HILIC vereint sowohl Charakteristika einer Normal- als auch einer Umkehrphasenchromatographie und kommt vor allem bei der Trennung von polaren Substanzen zum Einsatz. Es werden stationäre hydrophil funktionalisierte Silicaphasen eingesetzt. Durch die zu einem gewissen Prozentsatz Wasser enthaltende mobile Phase wird eine Wasserschicht auf der stationären Phase erzeugt. Zwischen dieser Wasserschicht und der mobilen wasserärmeren Phase verteilen sich die zurückgehaltenen Substanzen. Das System ist damit vergleichbar mit einer

Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie, wobei auch geringfügig Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen eine Rolle spielen können. Im Gegensatz zur normalen RP wird der chromatographische Gradient mit einem höheren Organikanteil (zumeist Acetonitril) gestartet, welcher über die Zeit abnimmt. Daraus resultiert, dass polare Substanzen später eluieren als weniger polare (Hemström 2006).

Die in diesem Fall eingesetzte Phase basiert auf Silicagel (Grundgerüst). Die Oberfläche wurde aber für polare Wechselwirkungen mit Ammonium-Sulfonsäure Gruppen modifiziert.

Der optimierte chromatographische Gradient für die analytischen Messungen, der Gradient für nach 10 analytischen Messungen erfolgten Waschschriffs und weitere methodische HPLC-MS Parameter sind in Kapitel 5.5.2 dargestellt.

Das verglichen zu den über HPLC-MS quantifizierten Substanzen deutlich polarere und nur in hohen Wasseranteilen lösliche GSH ließ sich mit den optimierten chromatographischen Bedingungen nicht zufriedenstellend aus dem Blutplasma messen (Schmierer über die Säule, starkes Peaktailing) und wurde daher von der Quantifizierung ausgeschlossen.

Für die quantitative LC-MS/MS Analyse von GSH aus Homogenatlösungen von Lebergewebsproben wurde auf eine Methode aus der Literatur zurückgegriffen (New 2008). Der Messauftrag wurde im Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) ausgeführt. Die Ergebnisse wurden von der IfaDo Dortmund (Dr. Ahmed Ghallab) für die Publikation und die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Es wurde für die Messungen der positive Ionenmodus ausgewählt, zumal beobachtet wurde, dass APAP um ca. den Faktor 100 schlechter im negativen Ionenmodus ionisiert, obwohl der negative Ionenmodus aufgrund besserer Ladungsstabilisierung zu einem Gain in den Intensitäten der Gallensäuren, von APAP-SUL und APAP-GSH führte. Das sich aber alle Substanzen bei der HPLC-MS hinreichend gut im positiven Modus ionisieren ließen, der Intensitätsabfall beim APAP aber enorm ist, wurde der positive Ionenmodus ausgewählt, um alle Substanzen simultan in einem Probenlauf messen zu können.

Nachfolgend sind die HPLC-MS Chromatogramme der analysierten Substanzen aus dem Blutplasma der Mäuse dargestellt. Die Peaks aus den Analyseproben wurden mit den Referenzstandards der Substanzen über die R_t und über die korrespondierenden HR-Massen mit ± 2 ppm zugeordnet (Abb. 24 – 26).

In einer Tabelle sind die im HPLC-MS quantifizierten Substanzen ist im Kapitel 5.5.2 aufgelistet.

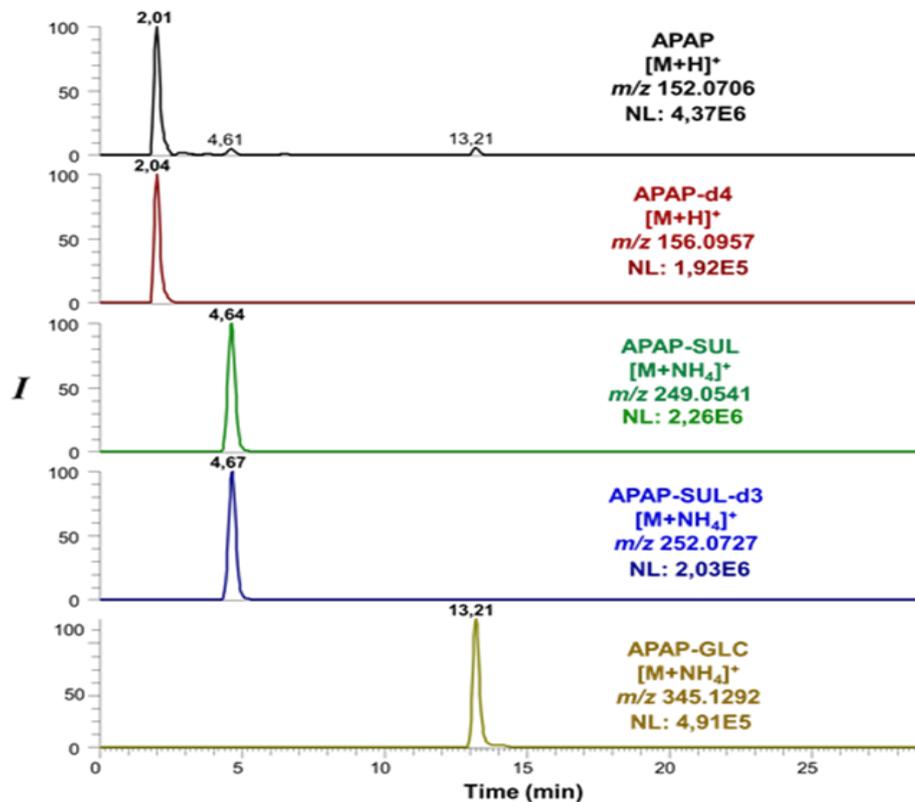


Abbildung 24: XICs der Substanzen APAP, APAP-D4, APAP-SUL, APAP-SUL-D3, APAP-GLC gemessen aus einer Blutplasmaprobe von der Portalvene einer Maus

Positivkontrolle: 30 min nach APAP-Injektion (Sezgin 2018).

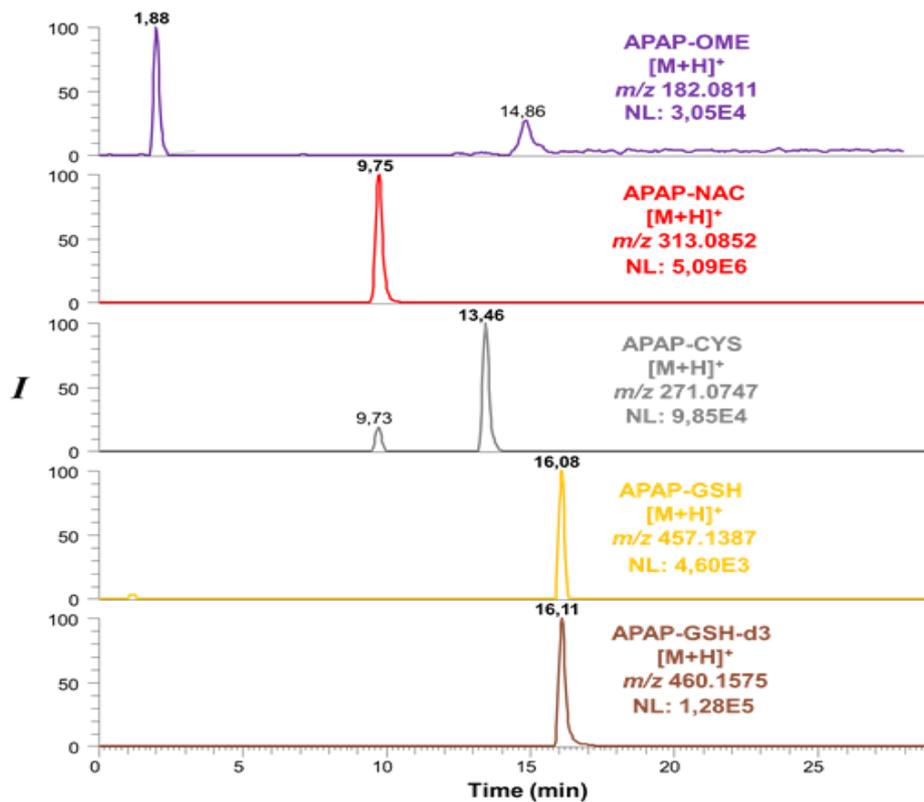


Abbildung 25: XICs der Substanzen APAP-OME, APAP-NAC, APAP-CYS, APAP-GSH, APAP-GSH-D3 gemessen aus einer Blutplasmaprobe von der Portalvene einer Maus

Positivkontrolle: 30 min nach APAP-Injektion (Sezgin 2018).

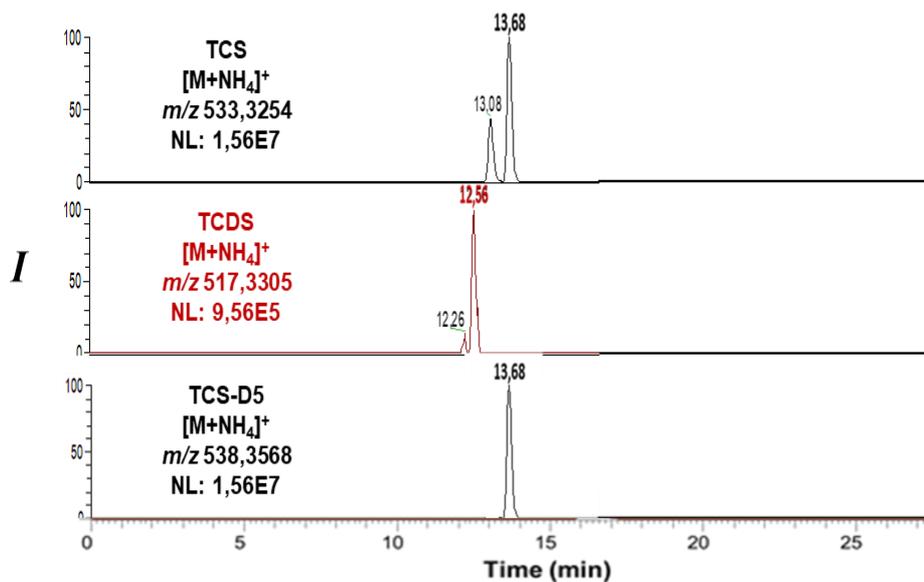


Abbildung 26: XICs der Substanzen TCS, TCDS und TCS-D5 gemessen aus einer Blutplasmaprobe von der Portalvene einer Maus

Positivkontrolle: 30 min nach APAP-Injektion

2.5 Konzeption des kinetischen und dosisabhängigen Experiments

Die im folgenden beschriebenen Versuche, worauf sich diese Arbeit im Kern bezieht, beleuchten die Metabolisierung und Hepatotoxizität von APAP in der frühen Phase (bis 8 h) nach der APAP Injektion in Mäuselebern mithilfe histochemischer und auf Massenspektrometrie basierenden Techniken.

Im Tiermodellversuch wurden dabei Inzuchtstämme von C57BL/6 (black) Labormäusen verwendet.

Primär stehen die bildgebenden MALDI-MS Arbeiten im Vordergrund. Wie schon im Kapitel 1.6 beschrieben wurde, wurden bis zur Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit, keine abstrakten analytischen Daten erhoben, die APAP und seine Biotransformationsprodukte bezüglich ihrer räumlich-zeitlichen Verteilung im Mäuselebergewebe direkt tracken ließen.

Semiquantitative Ergebnisse aus den MALDI Imaging Versuchen werden mit den Ergebnissen der histochemischen Färbungen (CYP2E1 und H & E) und den quantitativen Messungen von APAP, seinen Metaboliten und Addukten und von den Gallensäuren TCS und TCDS aus dem Blutplasma, welches den Mäusen von der Herzerarterie, der hepatischen Portalvene und der Portalvene entnommen worden ist, verglichen.

Das Experiment kann dabei in zwei Teile gegliedert werden:

Das **kinetische Experiment** befasste sich mit der räumlich-zeitlichen Verteilung von APAP, seinen Biotransformationsprodukten und dem Einfluss der APAP Intoxikation auf den Gallensäuretransport in der Mäuseleber von Mäusen denen eine Dosis von 300 mg kg^{-1} Körpergewicht intraperitoneal verabreicht wurde. Leber- und Blutproben wurden anschließend nach 0*, 5, 15, 30, 60, 120, 240 und 480 min nach der APAP-Injektion entnommen. Die 0* min Probe bedeutet hierbei, dass die Beprobung des Versuchstiers direkt nach der APAP-Injektion durchgeführt wurde.

Um zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der Pathologie durch APAP Intoxikation und Metabolisierung zu gewinnen, wurden begleitende Versuche und Untersuchungen bezüglich des kinetischen Experiments durchgeführt. Diese beinhalten die Bestimmung der Glutathion-Konzentrationen aus Leberhomogenaten und der Transaminase-Werte und makropathologische Aufnahmen von seziierten

Versuchstieren. Mit den Daten aus dem quantitativen HPLC-MS Experiment wurden zudem pharmakokinetische Berechnungen durchgeführt.

Im **dosisabhängigen Experiment** wurden die Versuchstiere ausschließlich bei 30 min nach der APAP-Zugabe beprobt, allerdings mit unterschiedlichen APAP-Dosagen: einer relativ niedrigen Dosis bei 54 mg kg^{-1} Körpergewicht, bei der keine Leberschäden zu erwarten sind, bei 167 mg kg^{-1} Körpergewicht, bei der geringwertig Vergiftungserscheinungen auftreten können und einer sehr hohen, deutlich über der LD50 (oral) liegenden Dosis von 500 mg kg^{-1} Körpergewicht.

Für jeden Datenpunkt wurden 3 – 5 Versuchstiere beprobt.

In der Abbildung 27 sind die Experimente schematisch dargestellt worden.

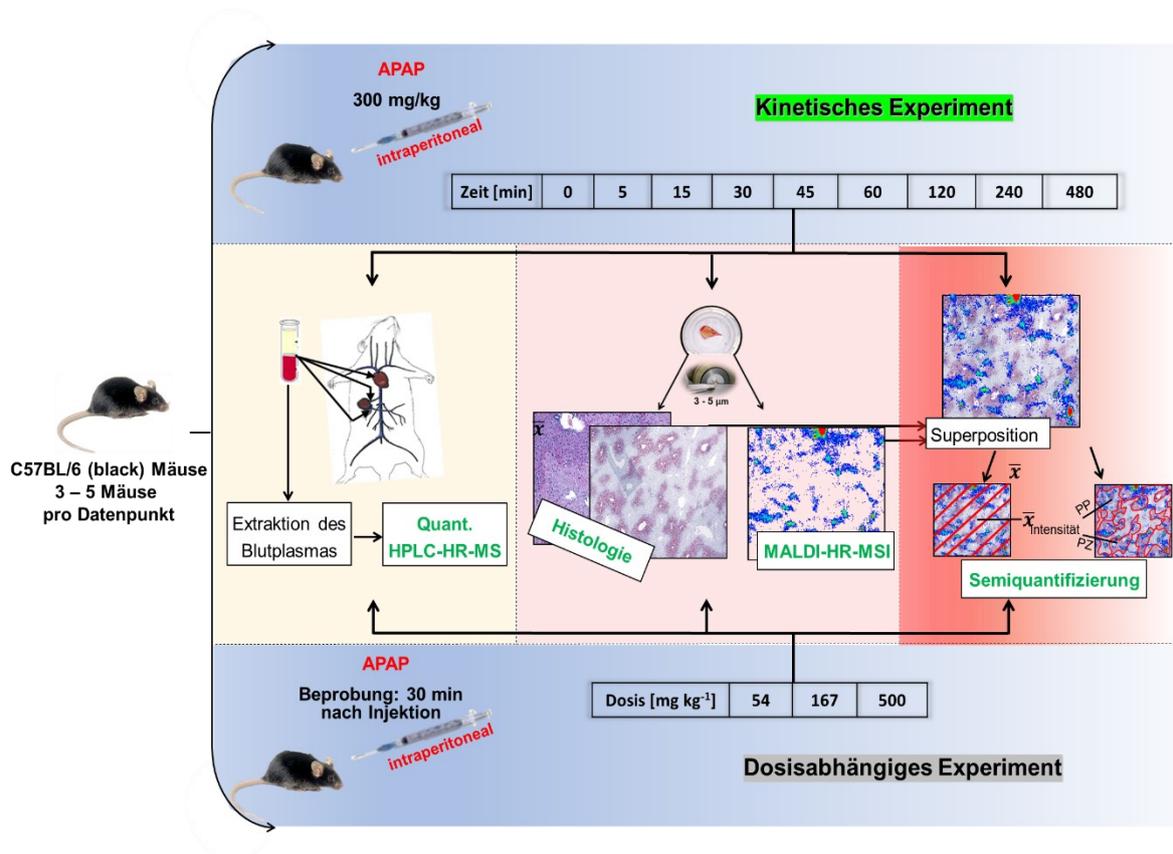


Abbildung 27: Darstellung des kinetischen und dosisabhängigen Experiments

3. Kinetisches und dosisabhängiges Experiment

3.1 Kinetisches Experiment

3.1.1 Makropathologie

Um einen Eindruck von der Leberschädigung zu bekommen, wurden von den Lebern der seziierten Versuchstiere, denen APAP mit einer sehr hohen Dosis (450 mg kg^{-1} /Körpergewicht) deutlich über der LD50 (oral) in den Bauchfellraum injiziert wurde, frontale Bilder per Kamera in den Zeitpunkten 0, 1, 6 und 12 h nach der APAP-Injektion aufgenommen (s. Abb. 28).

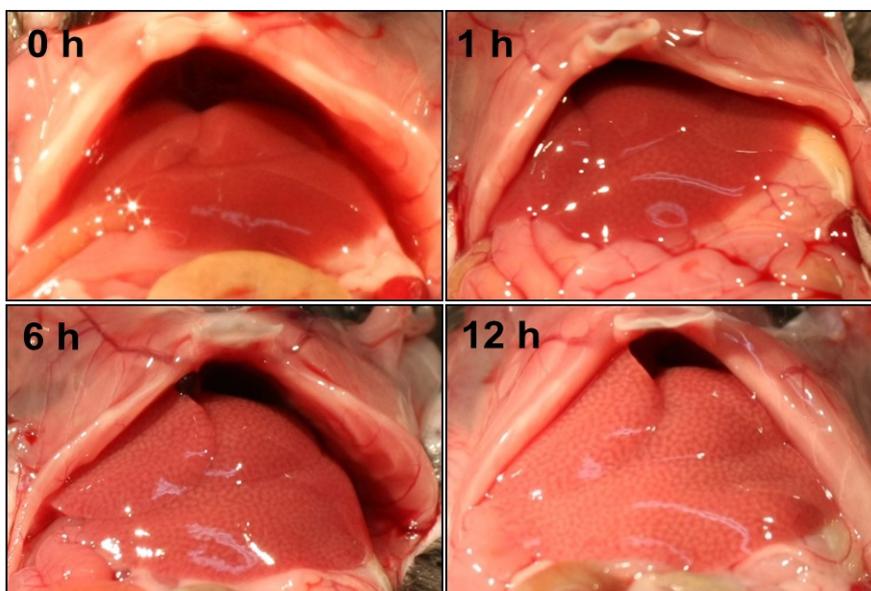


Abbildung 28: Makropathologie von Versuchstieren mit einer verabreichten APAP-Dosis von 450 mg kg^{-1}

Erfassungszeitraum zwischen 0* - 12 h (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Ahmed Ghallab [ehem. IfaDo])

Die durch die APAP Intoxikation verursachten Veränderungen an der Leber sind insbesondere in den Zeitpunkten 6 und 12 h gut zu erkennen. Im Vergleich zur intakten Leber (0 h) bildeten sich helle wabenartige Strukturen (Punktierungen) aus; die zuvor intensiv dunkelrote Kolorierung der Leber nahm durch die Vielzahl der Punktierungen ab und wirkte so insgesamt vor allem nach 12 h deutlich blasser. Die ersten Veränderungen (Schäden) an der Leber traten bei genauer Beobachtung bereits nach 1 h nach der APAP Injektion auf.

3.1.2 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Mit histochemischen Färbungen wie der H&E-Färbung ließen sich Schäden an den Leberzellen bedingt durch die Hepatotoxizität von Acetaminophen histologisch darstellen. In Abbildung 29A sind gefärbte Leberschnitte für das kinetische Experiment (0 – 480 min), bei dem eine Dosis von 300 mg kg^{-1} APAP eingesetzt wurde, dargestellt. In der Mitte der gewählten Ausschnitte befindet sich jeweils eine Zentralvene, um die pericentrale Schädigung festzuhalten. Erste Schäden in den betrachteten Zeitpunkten wurden für 60 min nach APAP Applikation beobachtet. Pericentrale Schäden weiteten sich in den nachfolgenden Zeitpunkten weiter peripher aus und manifestierten sich durch Zellkernfragmentierung und Abnahme der Eosin Intensität in den betroffenen Bereichen. Intakte Hepatozyten um pericentrale Zonen waren zum Zeitpunkt 480 min kaum noch auffindbar (Sezgin 2018).

3.1.3 CYP2E1 immunhistochemische Färbung

Da einer der hauptsächlich an der Oxidation des APAPs beteiligten Enzyme, nämlich das CYP2E1 Enzym, vorwiegend in den pericentralen Zonen des Lebergewebes lokalisiert ist, ließen sich mit der entsprechenden Antikörperimmunfärbung pericentrale Bereiche des Lebergewebes gut zuordnen (s. Abb. 29B). In den dargestellten Abbildungen ist zudem gut zu erkennen, dass sich die bräunlich-rötliche Färbung (CYP2E1 positiv) im kinetischen Experiment von 0 min – 480 min abgeschwächt hat. Zellschäden waren mit dieser Färbemethode erst ab 120 min erkennbar und tauchten ausschließlich innerhalb pericentraler Zonen auf. 480 min nach der APAP Applikation kam es bei dem überwiegenden Teil der Hepatozyten in pericentralen Zonen zum Zelltod. Tote Zellen waren ausschließlich in den pericentralen Zonen erkennbar (Sezgin 2018).

3.1.4 GSH Konzentration in den Leberhomogenatlösungen

Bereits nach 30 min konnte eine starke Abnahme der GSH Reserven um mehr als zwei Drittel der ursprünglichen Menge verglichen zu den 0* min Proben beobachtet werden. Vermutlich wurden demnach nach kurzer Zeit nach der APAP-Injektion NAPQI bzw. weitere eine Affinität zur Reaktion mit Glutathion besitzenden Derivate

des APAPs gebildet. Die GSH Konzentrationsdaten bilden damit eine signifikante Entgiftungsreaktion des Lebers ab.

Danach verringerten sich die GSH Reserven auf niedrige Niveaus bis 240 min und erreichten Werte unter 500 μM . Zumal Schäden an den Hepatozyten ab 60 bzw. 120 min beobachtet wurden (H&E und CYP2E1 Färbungen), sind diese Niveaus offensichtlich als kritisch anzusehen. An dieser Stelle ist die Leber nicht mehr in der Lage sich flächendeckend zu entgiften.

Ab 480 min zeigte die Untersuchung bei den Survivor Mäusen, dass durch die körpereigene Biosynthese die Vorräte an Glutathion wieder anstiegen.

3.1.5 Transaminaseaktivität (ALT, AST)

Die Aktivitäten der Transaminaseenzyme im systemischen Blutkreislauf stiegen signifikant ab 240 min an und erreichten mit 480 min die höchsten Werte im betrachteten Zeitfenster. Der Anstieg erfolgte damit zu den Zeitpunkten, bei denen die Zersetzung der Leberzellen im betrachteten Zeitrahmen am deutlichsten auftrat. Die experimentelle Vorgehensweise ist im Kapitel 5.7 beschrieben.

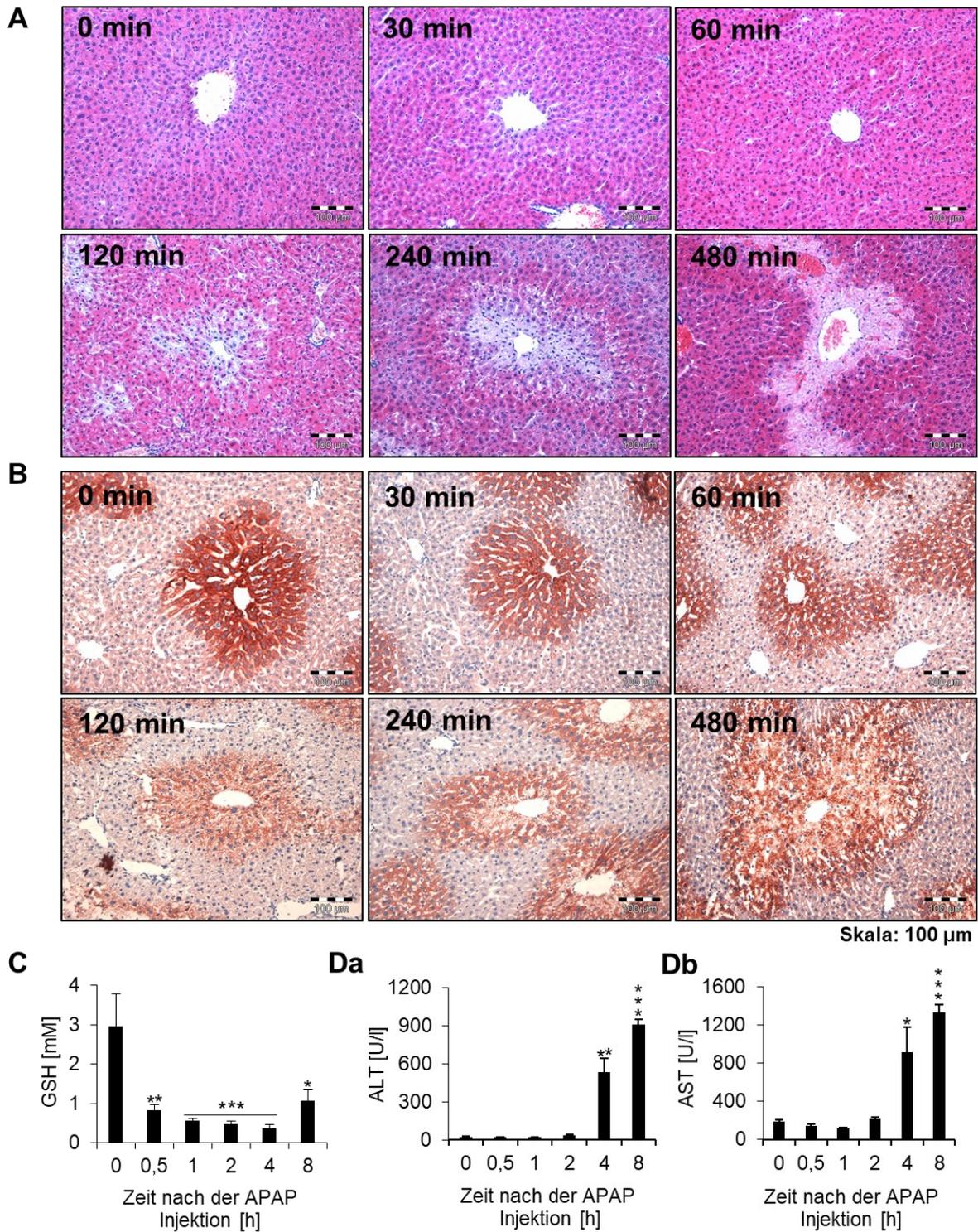


Abbildung 29: Toxizität von APAP in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP-Injektion

Dosis: 300 mg kg⁻¹; Zeitpunkte 0*, 30, 60, 120, 240 und 480 min. 29A: Ergebnisse der H & E Färbung. 29B: Ergebnisse der CYP2E1 Immunfärbung. 29C: Konzentration von GSH in Homogenatlösungen vom Lebergewebe (*n* = 3 Versuchstiere). Werte wurden auf 1 g Lebergewebe normalisiert. 29D: Aktivitäten der Aminotransferasen im Blutplasma von der rechten Herzkammer (*n* = 3 Versuchstiere). Die Signifikanzen sind **t* < 0.05, ***t* < 0.01, ****t* < 0.001 verglichen zu den Kontrollen. Fehlerbalken: Standardfehler (Sezgin 2018).

3.1.6 Quantitative HPLC-Ergebnisse

3.1.6.1 APAP, Metaboliten und Addukte

Die Ergebnisse aus den Quantifizierungen von APAP, seinen Metaboliten und Addukten sind in der Abbildung 30 dargestellt. Wie schon bereits erwähnt wurde, wurden Blutproben von drei verschiedenen Stellen von den Versuchstieren entnommen: Zum einen von den beiden Lebervenen (Leberportalvene bzw. Leberpfortader und von der hepatischen Vene), die für den Zu- und Abfluss von venösem Blut zum und von der Leber verantwortlich sind. Außerdem wurde von der rechten Herzkammer Blut angezapft, um die systemische Zirkulation der Stoffe aufzeigen zu können.

Ausgehend von den erhaltenen Konzentrationswerten konnten die Halbwertszeiten für APAP, APAP-SUL, APAP-GLC und APAP-NAC berechnet werden (s. Kapitel 6.2.1).

HPLC-MS und MALDI-MSI Daten zum in sehr geringen Mengen gebildeten Metaboliten APAP-OME kann im Kapitel 6.2.2 eingesehen werden.

Für den Zeitpunkt 0* min konnten weder für APAP noch für seine Metaboliten Signale detektiert bzw. quantifiziert (< LOQ) werden. Die APAP Konzentration in allen Blutplasmaproben erreichte nach 15 min die maximal beobachtete Konzentration von über 3 mM, allerdings konnten auch bereits nach 5 min hohe Mengen (> 2 mM) im Blutplasma bestimmt werden. Danach erfolgte ein Abfall der Konzentration. Ab 240 min konnte APAP in den Blutbahnen kaum noch aufgefunden werden. Die Halbwertszeit betrug ca. 91 min. Die Hauptmetaboliten APAP-GLC und APAP-SUL entstanden bereits nach 5 min; die maximalen Konzentrationen wurden nach 30 min nach der APAP Injektion erreicht. APAP-GLC und APAP-SUL konnten mit vergleichbaren Konzentrationen im Blut aufgefunden werden. Die berechneten Halbwertszeiten lagen etwas höher als beim APAP (ca. 94 bzw. 96 min). Für APAP und seine Hauptmetaboliten konnte keine Differenzierung zwischen den Konzentrationswerten bezüglich der Venen und des Herzens aufgezeichnet werden.

Dass keine Unterschiede für die Hauptmetaboliten resultierten kann möglicherweise folgendermaßen interpretiert werden: In der Zeit, in der die Metabolisierung erfolgt, gelangen Metaboliten kontinuierlich in den systemischen Kreislauf und werden nach Reabsorption wieder in die Leber zurücktransportiert. Die Rate der Metabolisierung

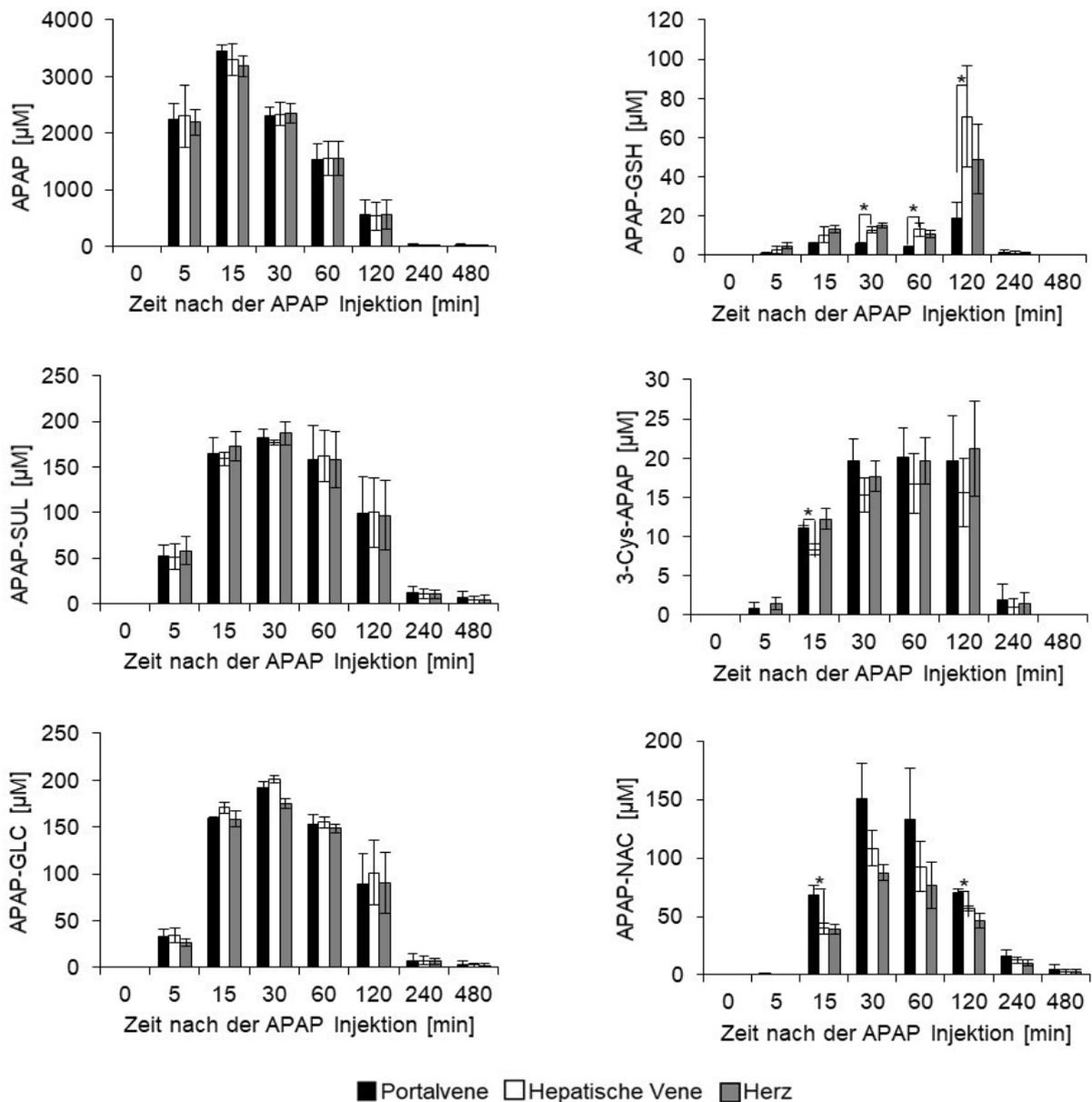


Abbildung 30: Quantitative HPLC-MS Analyse von APAP, seinen Metaboliten und Addukten im Blutplasma in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP Injektion

Die Entnahme von Blut erfolgte von der Portal- und hepatischen Vene, sowie von der rechten Herzkammer (Mittelwerte und Standardabweichungen von $n = 3$ Versuchstieren pro Datenpunkt). * $t < 0,05$ verglichen zu den entsprechenden Ergebnissen der Portalvenen. Fehlerbalken: Standardfehler (Sezgin 2018).

von APAP ist offensichtlich nicht hinreichend hoch genug, um Differenzen zwischen dem venösen Leberzu- und Leberabfluss mit der Art und Weise der Beprobung und der analytischen Messmethode abzubilden. Hier müsste demnach eine andere Vorgehensweise überlegt werden.

Sehr geringe Konzentrationen im einstelligen μM - Bereich konnten für APAP-GSH, APAP-CYS und APAP-NAC, die aus der Entgiftung von NAPQI resultieren, bereits nach 5 min detektiert werden. Die APAP-GSH Level zeigten einen starken Anstieg zwischen 60 – 120 min. Vor allem war in diesem Zeitpunkt gut erkennbar, dass höhere Konzentrationen von APAP-GSH von der hepatischen Lebervene detektiert werden konnten. Die Metabolisierung von APAP zum APAP-GSH in der Leber und seine Freisetzung ins Blut konnte damit abgebildet werden. Nach 240 min wurde der größte Teil des APAP-GSHs vom Blut ausgeschieden bzw. abgebaut. Die APAP-CYS Konzentration stieg stark an bis 30 min nach der APAP Injektion. Zwischen 30 – 120 hielt sich das Niveau an APAP-CYS im Blut stabil. Nach 240 min war der größte Teil des Konjugats bereits ausgeschieden oder abgebaut worden. Es konnte eine leichte Tendenz bezüglich der Portalvene erfasst werden. Möglicherweise findet die Hydrolyse des APAP-GSHs zum APAP-CYS in anderen Organen statt. APAP-NAC, welches primär aus der Acetylierung von APAP-CYS gebildet wird, zeigte hingegen ein anderes Bild bzgl. der Pharmakokinetik verglichen zum APAP-GSH und APAP-CYS. Die maximale Konzentration wurde nach 30 min erreicht und nahm von da an fortan ab. Eine Halbwertszeit von ca. 120 min konnte aus den Daten kalkuliert werden. In nahezu allen Zeitpunkten waren die gemessenen Konzentrationen in der Portalvene höher als in der hepatischen. Vermutlich findet die Acetylierung des APAP-NACs im Darm statt, von wo der Transport zur Leber stattfindet (Sezgin 2018).

Dass die Bildung der beiden APAP-GSH Folgeprodukte APAP-CYS und APAP-NAC möglicherweise nicht (ausschließlich) in der Leber erfolgen, könnte womöglich erklären, warum für diese beiden Substanzen keine reproduzierbaren Signale in den MALDI-MSI Versuchen erhalten wurden.

3.1.6.2 TCS und TCDS

Die Gallensäuren TCS und TCDS wurden analog zu APAP und seinen Biotransformationsprodukten quantifiziert (s. Abb. 31).

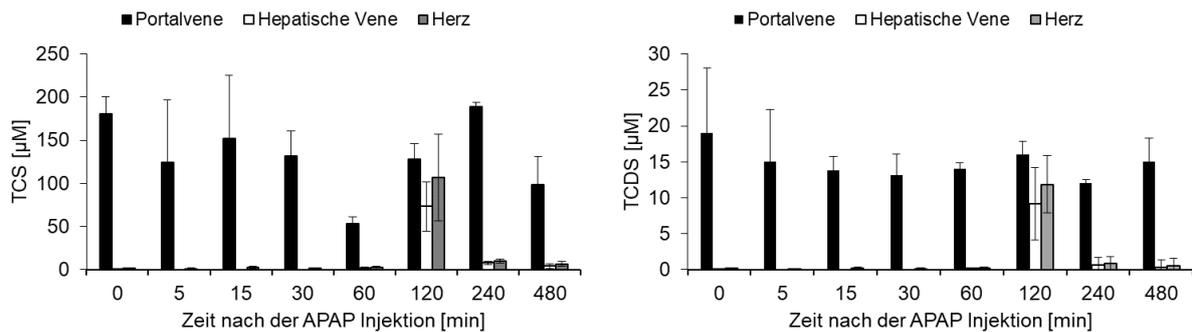


Abbildung 31: Quantitative HPLC-MS Analyse von TCS und TCDS im Blutplasma in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP Injektion

Die Entnahme von Blut erfolgte von der Portal- und hepatischen Vene, sowie von der rechten Herzkammer (Mittelwerte und Standardabweichungen von $n = 3$ Versuchstieren pro Datenpunkt). Fehlerbalken: Standardfehler.

In fast allen Zeitpunkten mit Ausnahme von 120 min wurden die untersuchten Gallensäuren im Blut von der Portalvene detektiert. TCDS kommt dabei im Schnitt 10-fach niedriger konzentriert im Blutplasma vor. Für diese Zeitpunkte kann daher davon ausgegangen werden, dass die gewöhnlichen Transportvorgänge von Gallensäuren im enterohepatischen System der Leber von den Effekten der Überdosierung von APAP noch nicht betroffen waren. Das änderte sich allerdings im Zeitpunkt 120 min nach der APAP-Injektion. Die Konzentrationswerte von der hepatischen Leber und vom systemischen Kreislauf stiegen rapide an. Möglicherweise kam in diesem Zeitpunkt eine Leckage der Gallensäuren in den systemischen Blutkreislauf vor. Der ursprüngliche Zustand schien sich aber ab 240 min wieder zu stabilisieren. Es befanden sich danach nur noch geringe Mengen an Gallensäuren im Blutkreislauf.

3.1.7 MALDI-MSI Ergebnisse

3.1.7.1 Allgemeines

Eine Beschreibung zur Auswertung der MALDI-MSI Rohdaten, Erstellung der Ionendichtebilder bzw. der superpositionierten Abbildungen, befindet sich unter Kapitel 5.4. Für jeden Datenpunkt wurden, wie schon oben angegeben worden ist, Gewebeproben von 3 – 4 Versuchstieren eingesetzt. Zur Darstellung der Imaging Ergebnisse wurde jeweils ein repräsentatives Bild (Superposition aus Ionendichtebild und CYP2E1 Bild) pro Datenpunkt ausgewählt. Die Intensitätsskalen der

Ionendichtebilder wurden nach ihrer Generierung manipuliert; d.h. dass die Intensitätswerte manuell nachjustiert wurden. Die Kolorierung der Intensitätsskala reflektiert den Intensitätsbereich zwischen der gewählten niedrigsten Signalintensität (blau) und der höchsten gewählten Intensität (Signal Cut-Off) (rot). Die untere Signalgrenze wurde für alle Datenpunkte und Analyten auf $1E2$ gesetzt, während die obere Signalgrenze (Cut-Off) für jeden Analyten individuell ausgewählt wurde.

Der Grund dafür ist, dass für jede Substanz unterschiedliche Intensitätsbereiche und Maximalintensitäten (z.B. von Signal Hot Spots) aufgezeichnet werden. Die Manipulation der oberen Signalgrenze ist von essenzieller Bedeutung, um zum Beispiel störende Effekte von Signal Hot Spots auszugleichen. Betragen die aufgezeichneten Signalintensitäten von Hot Spots um das Vielfache der durchschnittlichen Intensitäten bezogen auf das gesamte Messareal, so werden geringintensive Signale im Ionendichtebild unterdrückt. Wird der Cut-Off verringert, so werden Signale mit geringen Ion Counts verstärkt.

Die relativen Signalintensitäten wurden von Durchschnittssignalintensitäten bezogen auf Gewebemessungen aus $n = 3 - 4$ Versuchstieren ermittelt und als Boxplots aufgetragen. Außerdem wurden die relativen Intensitäten der ROIs (PP und PC) gemittelt und zueinander in Beziehung gesetzt, um zu analysieren ob die untersuchten Substanzen eine zonale Differenzierung hinsichtlich des Lebergewebes aufzeigten.

MALDI-MSI Ergebnisse für das APAP-OME sind im Kapitel 6.2.2 zu finden.

3.1.7.2 APAP

Die Distribution des APAPs über die Zeit und die Semiquantifizierung der relativen gemittelten Signalintensitäten im gesamten Messareal sind in der Abbildung 32 A und B dargestellt. Anhand der Pixelbedeckung und den Intensitäten lässt sich ableiten, dass die höchsten Konzentrationen von APAP im Lebergewebe zwischen 15 – 30 min aufgenommen wurden. Wie bei der Quantifizierung der Blutproben wurde ein Anstieg der APAP Konzentration bereits nach 5 min beobachtet. Ab 120 min befanden sich im Lebergewebe nur noch marginale Mengen an APAP. Werden die gemittelten Signalintensitäten, die durch manuelle Selektion der PC und PP Flächen anhand der CYP2E1 gefärbten Leberschnittaufnahmen erhalten wurden, zueinander in Beziehung

gesetzt, so wird keine zonale Differenzierung des APAP Signals beobachtet. Die Verteilung offenbart damit, dass sich das über die Sinusoide verteilte APAP von allen Hepatozyten unabhängig von der zonalen Zugehörigkeit gleichermaßen absorbiert werden (Sezgin 2018).

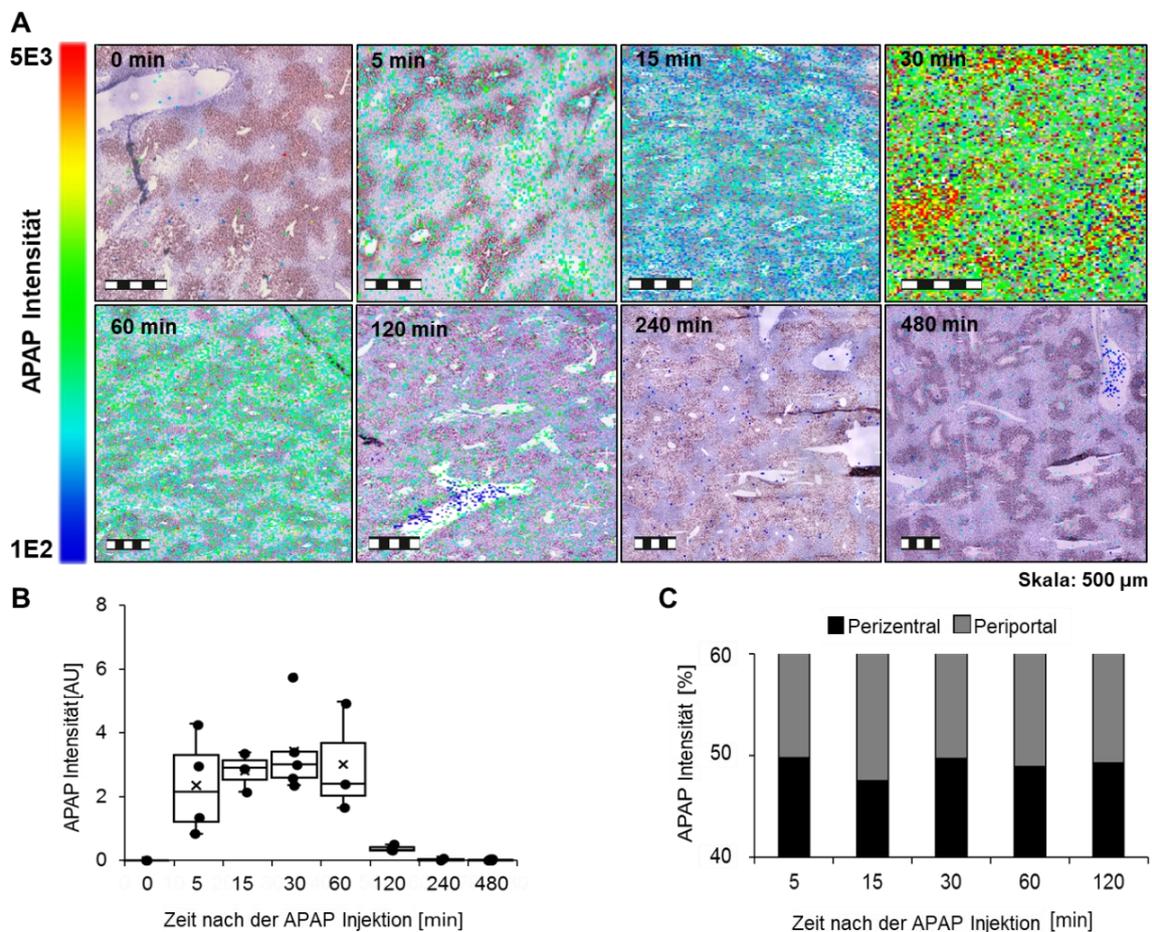


Abbildung 32: MALDI-MSI Analyse zur Verteilung von APAP im kinetischen Experiment

Untersuchung der Gewebe von $n = 3 - 4$ Versuchstieren nach der Applikation einer APAP Dosis von 300 mg kg^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP Injektion (m/z 190,0264, $[M + K]^+$, $\pm 10 \text{ ppm}$). 32A: Repräsentative superpositionierte Ionendichtebilder mit Abbildungen von CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten. Skala: $500 \mu\text{m}$. 32B: Semiquantifizierung der APAP Signale über einen Vergleich der gemittelten relativen Signalintensitäten über das gesamte Messareal der einzelnen Gewebmessungen. Die Boxplots umranden das 25 – 75 % Quartil getrennt durch den Median (-). Zusätzlich ist die Position des Mittelwerts (x) aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebsschnitte gekennzeichnet. 32C: Relativer Vergleich des Mittelwerts aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebmessungen bezogen auf die ROI selektierten PP und PC Bereiche (Sezgin 2018).

3.1.7.3 APAP-GLC und APAP-SUL

Die MALDI-MSI Ergebnisse für APAP-GLC und APAP-SUL werden in den Abbildungen 33 bzw. 34 präsentiert.

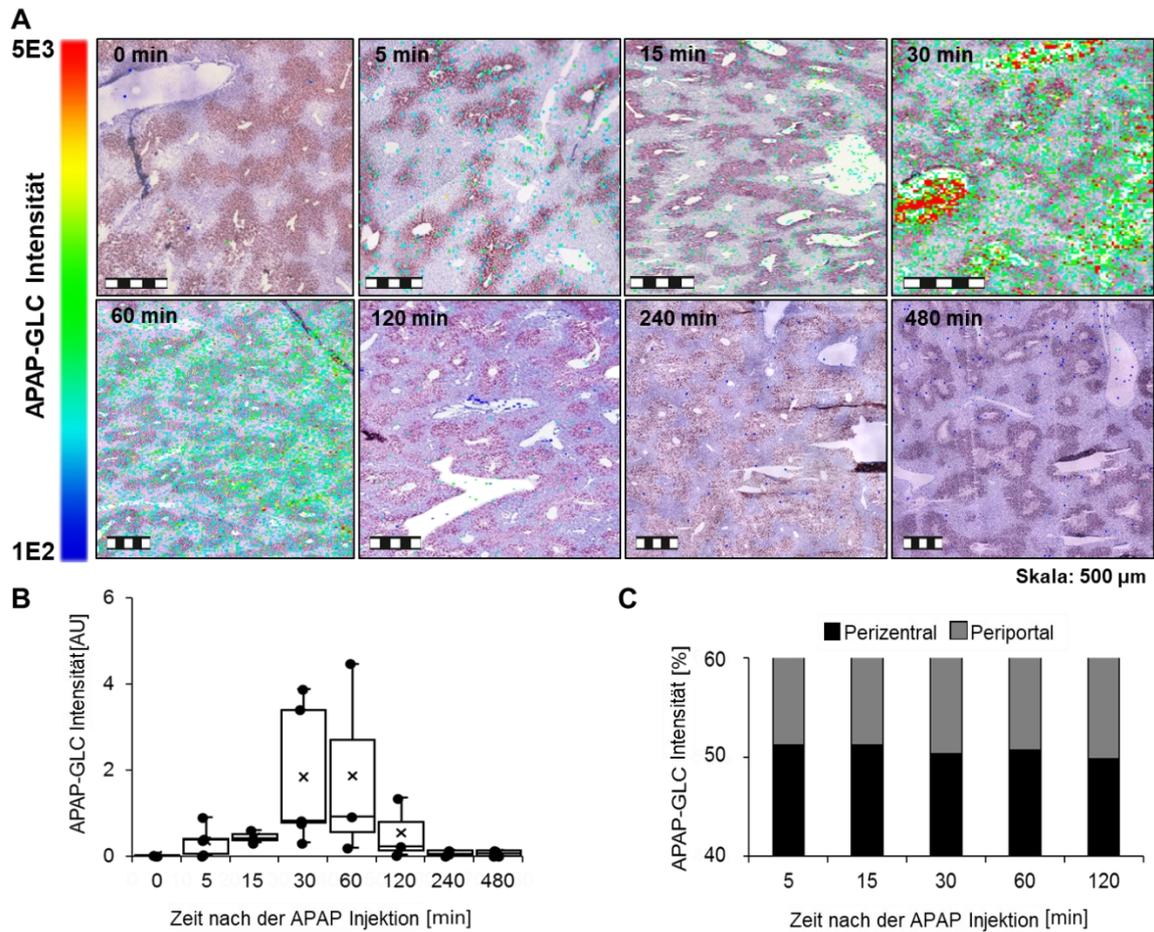


Abbildung 33: MALDI-MSI Analyse zur Verteilung von APAP-GLC im kinetischen Experiment

Untersuchung der Gewebe von $n = 3 - 4$ Versuchstieren nach der Applikation einer APAP Dosis von 300 mg kg^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP Injektion ($m/z 366,0585$, $[M + K]^+$, $\pm 10 \text{ ppm}$). 33A: Repräsentative superpositionierte Ionendichtebilder mit Abbildungen von CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten. Skala: $500 \mu\text{m}$.

33B: Semiquantifizierung der APAP-GLC Signale über einen Vergleich der gemittelten relativen Signalintensitäten über das gesamte Messareal der einzelnen Gewebmessungen. Die Boxplots umranden das 25 – 75 % Quartil getrennt durch den Median (-). Zusätzlich ist die Position des Mittelwerts (x) aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebsschnitte gekennzeichnet. 33C: Relativer Vergleich des Mittelwerts aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebmessungen bezogen auf die ROI selektierten PP und PC Bereiche (Sezgin 2018).

Bereits nach 5 min konnten die ersten Signale von APAP-GLC und APAP-SUL im Lebergewebe detektiert werden; die Signal Coverage (Pixelbesetzung) des Messareals war allerdings noch sehr gering. Diese stiegen nach 15 min rapide an und

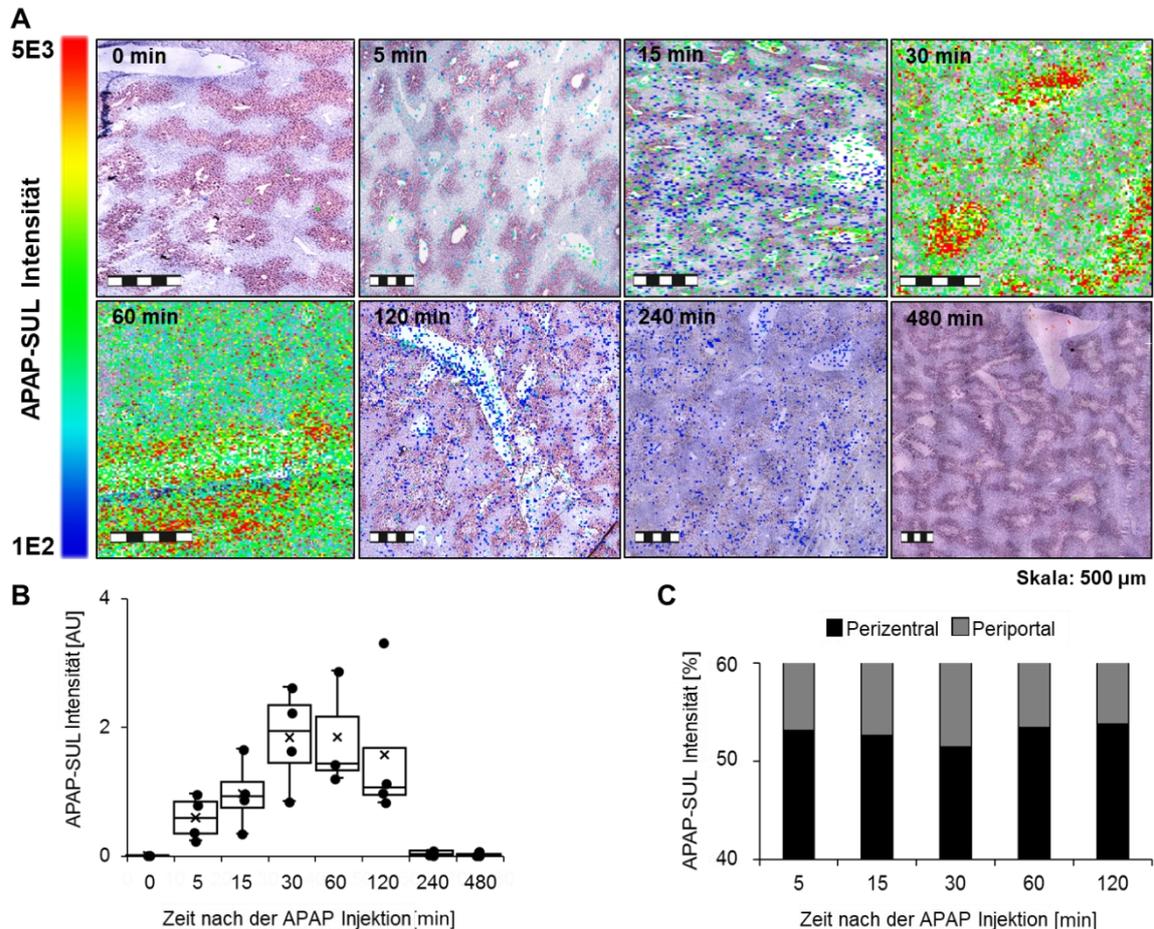


Abbildung 34: MALDI-MSI Analyse zur Verteilung von APAP-SUL im kinetischen Experiment

Untersuchung der Gewebe von $n = 3 - 4$ Versuchstieren nach der Applikation einer APAP Dosis von 300 mg kg^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP Injektion (m/z 230,0128, $[M - H]^{-}$, $\pm 10 \text{ ppm}$). 34A: Repräsentative superpositionierte Ionendichtebilder mit Abbildungen von CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten. Skala: $500 \mu\text{m}$. 34B: Semiquantifizierung der APAP-SUL Signale über einen Vergleich der gemittelten relativen Signalintensitäten über das gesamte Messareal der einzelnen Gewebmessungen. Die Boxplots umranden das 25 – 75 % Quartil getrennt durch den Median (-). Zusätzlich ist die Position des Mittelwerts (x) aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebsschnitte gekennzeichnet. 34C: Relativer Vergleich des Mittelwerts aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebmessungen bezogen auf die ROI selektierten PP und PC Bereiche (Sezgin 2018).

erreichten zwischen 30 – 60 min die höchsten Werte. Verglichen mit APAP erfolgte damit eine leicht zeitversetzte Erhöhung der Intensitäten für die betrachteten Hauptmetaboliten. Eine signifikante Signaldifferenzierung bezüglich der Zonen konnten für beide Metabolite nicht beobachtet werden (Sezgin 2018).

In der Literatur wird beschrieben, dass UDP-GT und SULT, die für die Metabolisierung von APAP in APAP-GLC bzw. APAP-SUL verantwortlich sind, eine zonale Expression aufzeigen; UDP-GT kommen dabei vorwiegend in der pericentralen und SULT in den periportalen Bereichen vor (Godoy 2013).

Dass dennoch keine Zonierung festgestellt werden konnte, liegt möglicherweise daran, dass der Transport und die Redistribution der Hauptmetaboliten von und zu anderen Hepatozyten mit einer so hohen Geschwindigkeit erfolgt, dass durch die gewählten Untersuchungsspannen im kinetischen Experiment, mögliche zonale Unterschiede nicht mehr erfasst werden konnten. Denkbar wäre allerdings auch, dass eine geringwertig existente Differenzierung bezüglich der Zonen aufgrund der zu geringen Konzentrationsunterschiede durch die angewandte analytische Methode nicht detektiert werden konnte (Sezgin 2018).

3.1.7.4 APAP-GSH und APAP

Die MALDI-MSI Ergebnisse für APAP-GSH und GSH werden in den Abbildungen 35 und 36 dargestellt.

Ähnlich wie in den quantitativen HPLC-MS Daten ist das Auftreten des APAP-GSHs nach 5 min der APAP Injektion noch relativ überschaubar. Danach folgt ein steiler Anstieg bis 30 min und schließlich ein rapider Abfall der durchschnittlichen Signalintensitäten und der Pixelbesetzung bis 240 min. Zwischen 120 und 240 min wurde das APAP-GSH nahezu komplett vom Lebergewebe eliminiert (Sezgin 2018).

Im Blut konnten für das APAP-GSH vor allem ab 60 min und noch deutlicher ab 120 min nach der APAP-Injektion höhere Konzentrationswerte in der hepatischen Ausgangsvene des Lebers verzeichnet werden, was als ein deutlicher Hinweis für die Metabolisierung dieses Analyten in der Leber bewertet werden kann (s. Kapitel 3.1.6.1).

Eine Alteration in der Distribution der APAP-GSH Signale auf dem Lebergewebe ab 60 min und noch deutlicher ab 120 min ließ sich anhand des superpositionierten Bildes und der PC – PP – Differenzierung auch in den MALDI-MSI Ergebnissen wiederfinden. Höhere APAP-GSH Signale wurden in der pericentralen Zone vorgefunden; dies verdeutlichte auch die Verteilung im superpositionierten Bild.

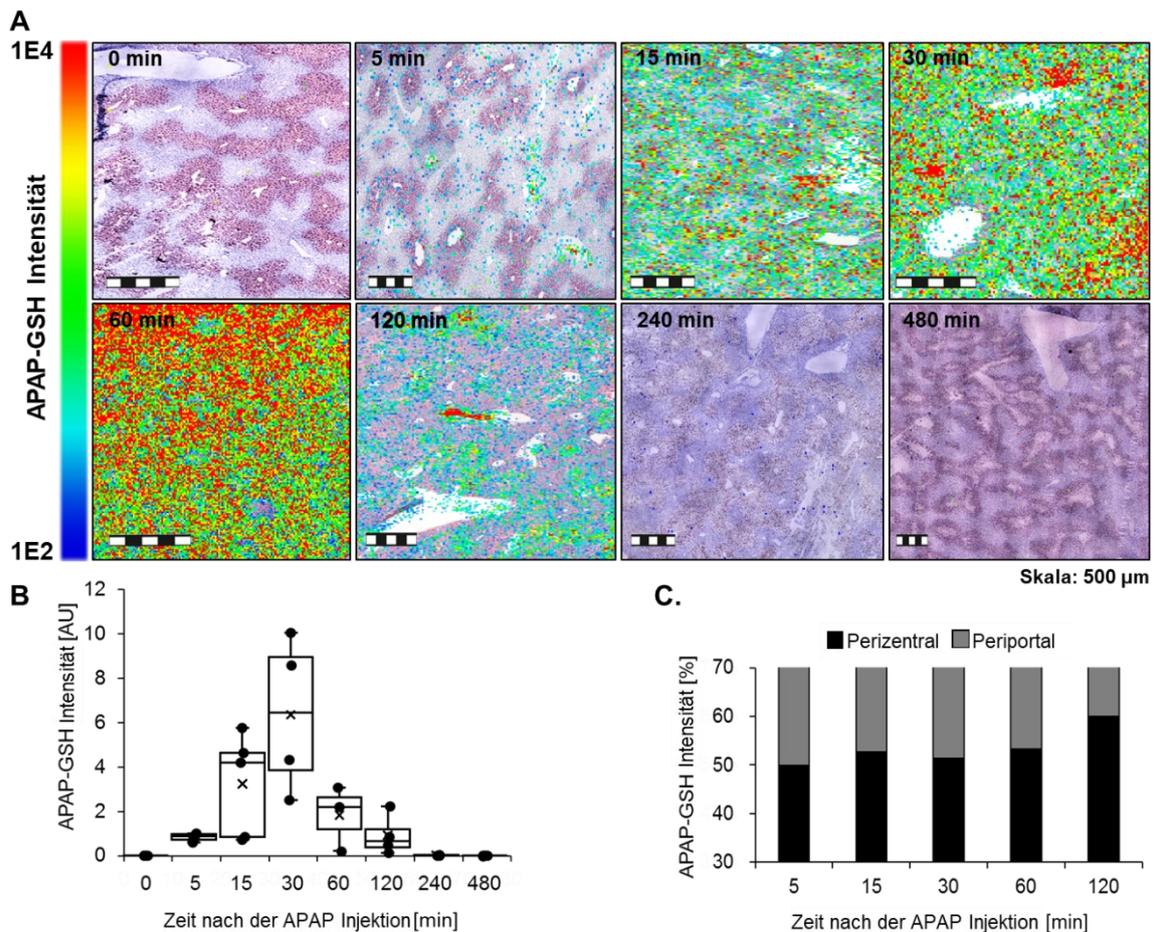


Abbildung 35: MALDI-MSI Analyse zur Verteilung von APAP-GSH im kinetischen Experiment

Untersuchung der Gewebe von $n = 3 - 4$ Versuchstieren nach der Applikation einer APAP Dosis von 300 mg kg^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP Injektion (m/z 455,1242, [M - H]⁻; $\pm 10 \text{ ppm}$). 35A: Repräsentative superpositionierte Ionendichtebilder mit Abbildungen von CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten. Skala: $500 \mu\text{m}$.

35B: Semiquantifizierung der APAP-GSH Signale über einen Vergleich der gemittelten relativen Signalintensitäten über das gesamte Messareal der einzelnen Gewebmessungen. Die Boxplots umranden das 25 – 75 % Quartil getrennt durch den Median (-). Zusätzlich ist die Position des Mittelwerts (x) aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebsschnitte gekennzeichnet. 35C: Relativer Vergleich des Mittelwerts aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebmessungen bezogen auf die ROI selektierten PP und PC Bereiche (Sezgin 2018).

Bei den Zeitpunkten vor 60 min konnte eine Differenzierung von APAP-GSH nur ausgemacht werden, sobald passende Signalfilter bei der Bildmanipulation umgesetzt wurden. Von daher bleibt es unklar, warum keine starke Differenzierung des APAP-

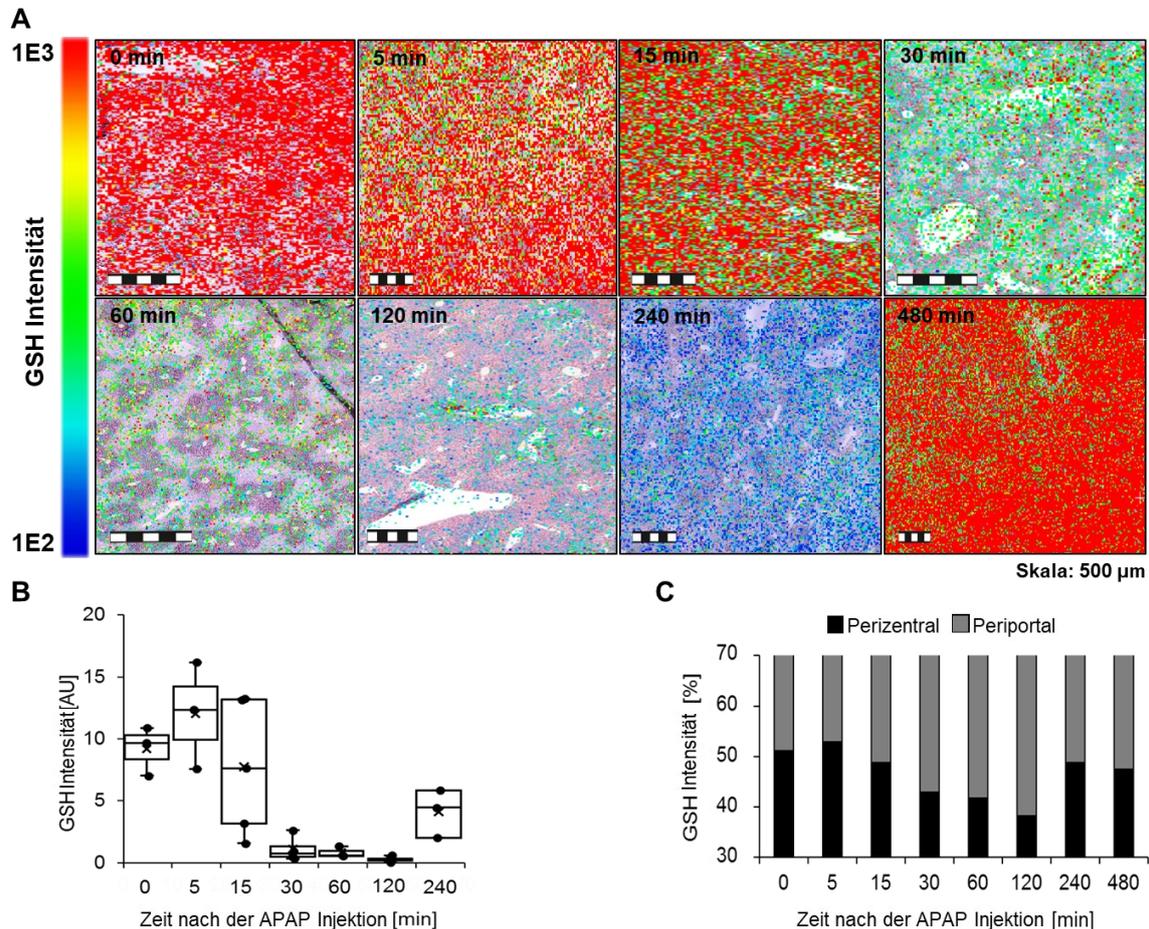


Abbildung 36: MALDI-MSI Analyse zur Verteilung von GSH im kinetischen Experiment

Untersuchung der Gewebe von $n = 3 - 4$ Versuchstieren nach der Applikation einer APAP Dosis von 300 mg kg^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP Injektion (m/z 306,0765, $[M - H]^-$, $\pm 10 \text{ ppm}$). 36A: Repräsentative superpositionierte Ionendichtebilder mit Abbildungen von CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten. Skala: $500 \mu\text{m}$.

36B: Semiquantifizierung der APAP-GSH Signale über einen Vergleich der gemittelten relativen Signalintensitäten über das gesamte Messareal der einzelnen Gewebmessungen. Die Boxplots umranden das 25 – 75 % Quartil getrennt durch den Median (-). Zusätzlich ist die Position des Mittelwerts (x) aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebsschnitte gekennzeichnet. 36C: Relativer Vergleich des Mittelwerts aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebmessungen bezogen auf die ROI selektierten PP und PC Bereiche (Sezgin 2018).

GSHs zugunsten der pericentralen Zone nicht schon in den früheren Zeitpunkten, sondern erst ab 60 min und besonders ab 120 min deutlicher zum Vorschein tritt. Hier müssten gegebenenfalls alternative (bio)analytische Verfahren angewendet werden, um die Transportvorgänge des APAP-GSHs besser nachverfolgen und verstehen zu können.

Einige Hypothesen zu dem beobachteten Verhalten von APAP-GSH werden im Kapitel 3.1.7.7 diskutiert.

Werden die Mittelwerte der MALDI-MSI Signalintensitäten (relativ wie absolut) von APAP-GSH (s. Abb. 36B) mit den Intensitäten von APAP und den anderen Transformationsprodukten im Zeitpunkt 30 min verglichen, so liegt der Mittelwert der APAP-GSH Signale um 2 – 3 mal höher als die Mittelwerte der anderen Verbindungen, obwohl weniger APAP-GSH verglichen zu APAP und den Hauptmetaboliten durch HPLC-MS aus dem Blut quantifiziert wurde (s. Abb. 31). Dies könnte dadurch resultieren, dass es zur Signalakkumulation von APAP-GSH durch die Differenzierung in den pericentralen Zone kommt. Vermutlich wird aber auch die höhere Ionisierungsgüte des polaren und aus deutlich mehr Heteroatomen konstituierten APAP-GSH eine Rolle spielen, die aus einer effizienteren Extraktion des Stoffes durch die polare Matrix und zu energetisch günstiger stabilisierten Quasimolekülen führt. Dank der höheren Signalintensitäten konnte ein MALDI-MSI/MS Experiment zur Strukturaufklärung durchgeführt werden (s. Kapitel 6.2.3).

Zumal für das APAP-GSH eine gewisse Differenzierung zugunsten der pericentralen Zone ermittelt wurde, ergibt sich die Frage, wie sich die Verteilung des GSH, welches als Reaktionspartner von NAPQI fungiert, manifestieren würde. Analog zu den Messungen aus den Leberhomogenatlösungen (s. Kapitel 3.1.4) fiel die GSH Konzentration nach 30 min rapide ab und behielt ein kritisches Niveau bis 120 min, während sie sich von 0* bis 15 min auf noch relativ ähnlichem Niveau befand, was sich auch in den MALDI Imaging Bildern widerspiegelte. Die kritischen Niveaus zwischen 30 und 120 min führten offensichtlich dazu, dass entstandenes NAPQI nicht hinreichend entgiftet werden konnte; aufgetretene Schäden vorwiegend an den Hepatozyten waren ab ca. 60 min die Folge (s. Abb. 29A). Ab 240 min war eine deutliche Regeneration der GSH Reserven zu verkennzeichnen. Mit dem deutlichen Abfall der GSH Konzentration im Lebergewebe ab 30 min, war auch eine beginnende

Differenzierung der GSH Signale zugunsten der periportalen Zone festzustellen, die besonders im Zeitpunkt 120 min am deutlichsten sichtbar wurde. Mit dem Beginn der Regeneration der GSH Reserven ab 240 min hob sich die Differenzierung wieder auf. Unterm Strich ist für das APAP-GSH und GSH-Paar ein komplementäres Verhalten erkennbar, welches mit der Gegenüberstellung in Abbildung 37 noch einmal verdeutlicht wird. Die Signal Cut-Offs wurden so gewählt, dass die höchsten Signalintensitäten akzentuiert und niedrig intensive Signale eliminiert wurden. Nach 120 min der APAP Injektion fand der Abbau der GSH Vorräte vorwiegend in der periportalen Zone statt, während APAP-GSH vorwiegend in der pericentralen Zone gebildet wurde. Diese Ergebnisse suggerieren, dass GSH vornehmlich in der pericentralen Zone durch die Konjugation mit NAPQI abgebaut wird. Die Ergebnisse betonen allerdings auch, dass beide Verbindungen auch in pericentralen und periportalen Bereichen auftreten; eine ausschließlich auf eine metabolische Zone beschränkte Distribution ist nicht erkennbar.

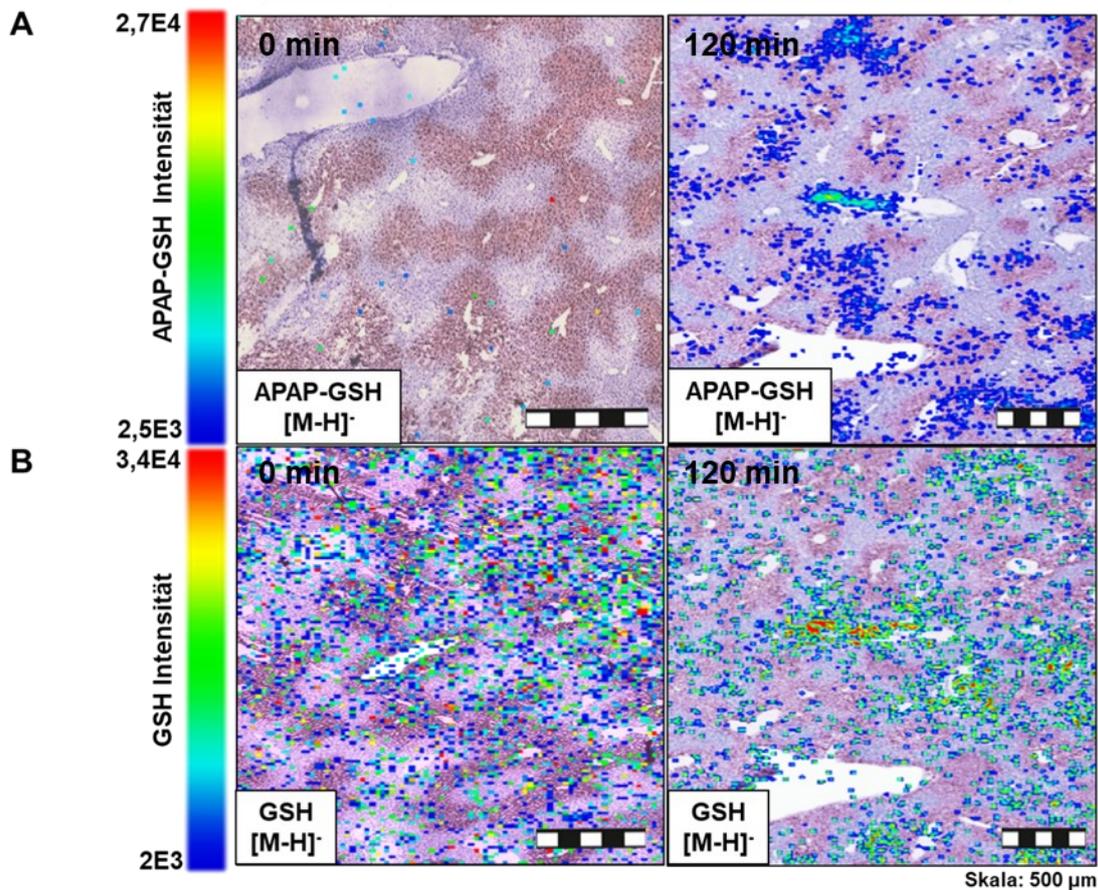


Abbildung 37: Gegenüberstellung der MALDI-MSI Ergebnisse für GSH und APAP-GSH Für Gewebe von 0* und 120 min nach der APAP-Injektion (Dosis: 300 mg kg⁻¹)
37A: APAP-GSH, 37B: GSH. Skala: 500 µm (Sezgin 2018).

3.1.7.5 TCS, TCDS und mögliche Isomere

In Kapitel 3.1.7.4 wurde die durch die Überdosis von APAP induzierten Alterierungen hinsichtlich der Konzentration und Verteilung des endogen in der Leber produzierten oder über die Nahrung aufgenommenen GSH untersucht.

Als nächstes wurde daher der Frage auf den Grund gegangen wie die Verteilung und Konzentration von Gallensäuren im Lebergewebe, die für die Fettverdauung in der Leber unabdingbar sind, durch die APAP Vergiftung beeinflusst wurden. Da im Gegensatz zum erwachsenen Menschen der größte Teil der Gallensäuren in der Maus mit Taurin konjugiert sind (Chiang 2017), wurde der Fokus der Analysen auf TCS und TCDS gelegt.

In Kapitel 3.1.6.2 wurde dabei im Zeitpunkt 120 min nach der APAP Injektion ein einschneidendes Ereignis beobachtet: Es erfolgte ein hoher Eintrag der Gallensäuren in den systemischen Blutkreislauf. Es wurde daher mittels MALDI-MSI erörtert inwiefern sich die Beobachtung vom HPLC-MS Experiment in der Bildgebung widerspiegeln würde.

Im quantitativen HPLC-MS Experiment wurden TCS und TCDS durch Determination ihrer hochaufgelösten monoisotopischen m/z und über den R_t Abgleich mit Referenzstandards zugeordnet. Allerdings konnten ebenso benachbarte Peaks mit denselben korrespondierenden m/z mit geringeren Intensitäten detektiert werden, für die allerdings keine Zuordnungen gemacht wurden (s. Abbildung 26). Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Isomere der TCS und TCDS. In der Literatur wurden signifikante Mengen z.B. an Tauroursodeoxycholsäure (Stereoisomer von TCDS) und Taurodeoxycholsäure (Konstitutionsisomer von TCDS) im Blutserum von Versuchsmäusen quantifiziert (Ghaffarzadegan 2019). Aufgrund der Natur des MALDI-MSI Experiments (fehlende chromatographische Dimension), konnten die Isomere anhand der Datenlage nicht voneinander getrennt werden. Fragmentierungsexperimente über MS/MS konnten in diesem Fall ebenso keine nicht weiterhelfen, weil abundante Fragmente von Taurin gebundenen Gallensäuren zumeist an der Taurin Einheit bzw. an der Verknüpfungsstelle zwischen Taurin und dem Cholsäuregerüst entstehen (Kaya 2018, s. außerdem Kapitel 6.2.3 für die Fragmentierung von TCS im bildgebenden Experiment).

Die Ergebnisse für TCS und TCDS bzw. deren Isomere sind in den Abbildungen 38 bzw. 39 dargestellt.

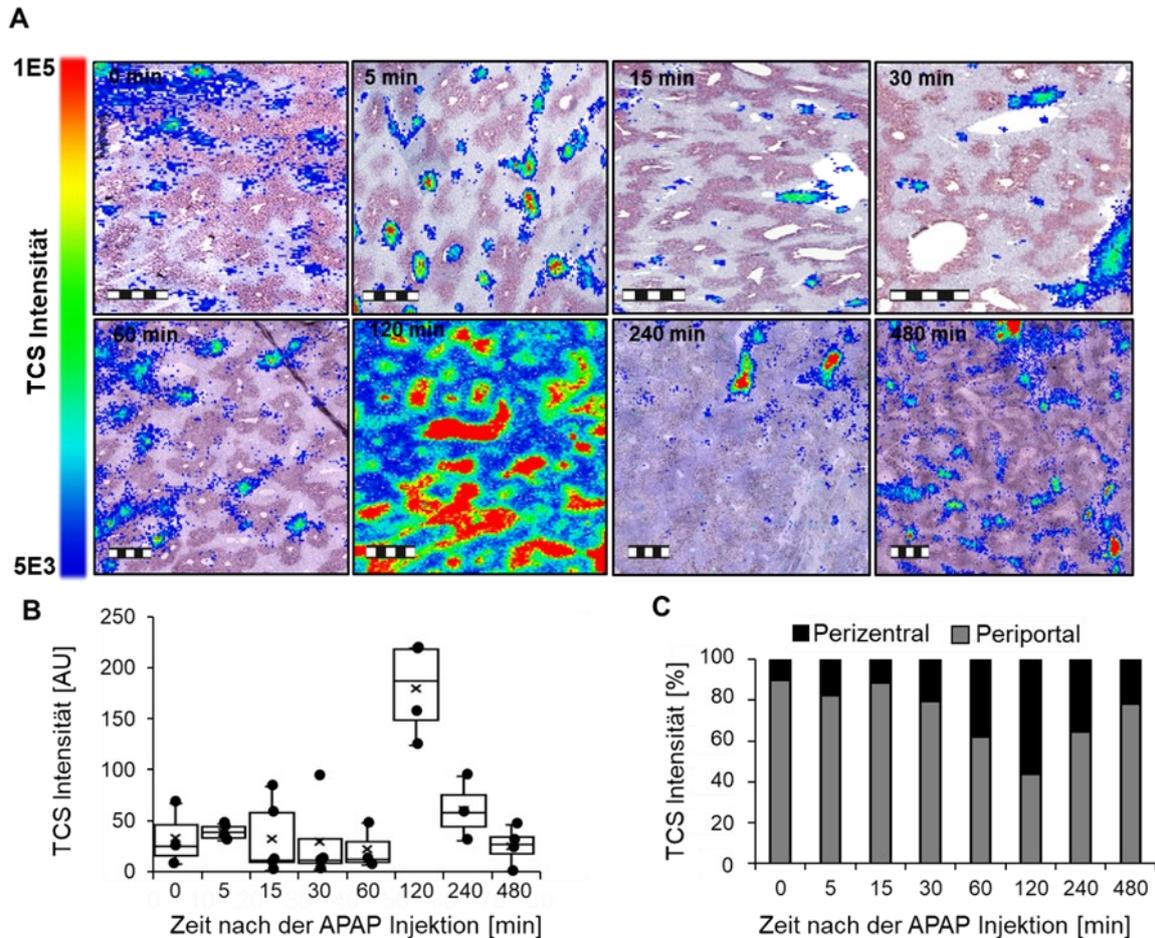


Abbildung 38: MALDI-MSI Analyse zur Verteilung von TCS und seinen möglichen Isomeren im kinetischen Experiment

Untersuchung der Gewebe von $n = 3 - 4$ Versuchstieren nach der Applikation einer APAP Dosis von 300 mg kg^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP Injektion (m/z 514,2843, [M - H]⁻, $\pm 10 \text{ ppm}$). 38A: Repräsentative superpositionierte Ionendichtebilder mit Abbildungen von CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten. Skala: $500 \mu\text{m}$. 38B: Semiquantifizierung der TCS Signale über einen Vergleich der gemittelten relativen Signalintensitäten über das gesamte Messareal der einzelnen Gewebmessungen. Die Boxplots umranden das 25 – 75 % Quartil getrennt durch den Median (-). Zusätzlich ist die Position des Mittelwerts (x) aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebsschnitte gekennzeichnet. 38C: Relativer Vergleich des Mittelwerts aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebmessungen bezogen auf die ROI selektierten PP und PC Bereiche.

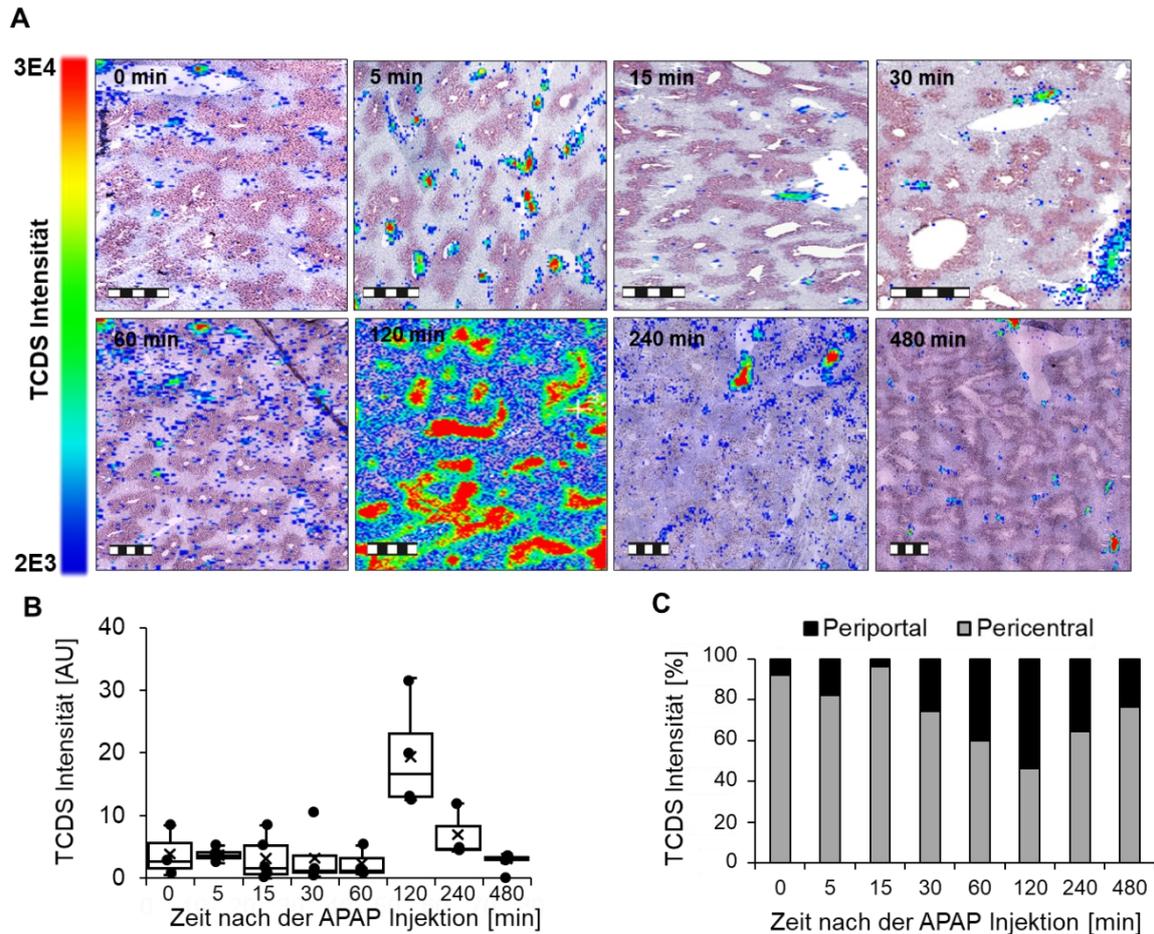


Abbildung 39: MALDI-MSI Analyse der Verteilung von TCDS und seinen möglichen Isomeren im kinetischen Experiment

Untersuchung der Gewebe von $n = 3 - 4$ Versuchstieren nach der Applikation einer APAP Dosis von 300 mg kg^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP Injektion (m/z 498,2894, $[M - H]^-$, $\pm 10 \text{ ppm}$). 39A: Repräsentative superpositionierte Ionendichtebilder mit Abbildungen von CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten. Skala: $500 \mu\text{m}$. 39B: Semiquantifizierung der TCDS Signale über einen Vergleich der gemittelten relativen Signalintensitäten über das gesamte Messareal der einzelnen Gewebmessungen. Die Boxplots umranden das 25 – 75 % Quartil getrennt durch den Median (-). Zusätzlich ist die Position des Mittelwerts (x) aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebsschnitte gekennzeichnet. 39C: Relativer Vergleich des Mittelwerts aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebmessungen bezogen auf die ROI selektierten PP und PC Bereiche.

Die untere Signalgrenze wurde für TCS auf $5E3$ und für TCDS auf $2E3$ und die oberen Signalgrenzen für TCS auf $1E5$ und für TCDS auf $3E4$ Ion Counts gesetzt, um für die jeweilige Verbindung eine gute Vergleichbarkeit in Bezug auf die MALDI Bilder aller Zeitpunkte zu gewährleisten und graduelle Unterschiede zur zonalen Distribution dieser Stoffe aufzeigen zu können.

Wird der Verlauf der Verteilung von TCS und TCDS und deren möglichen Isomeren über die Zeit betrachtet, so fällt auf, dass Signalcluster für die Gallensäuren mit Ausnahme der Zeitpunkte 60 - 240 min nahezu ausschließlich in den bläulich gefärbten periportalen Zonen auftreten (s. Abb. 38A und 39A). Dies ist insofern nicht verwunderlich, weil die Gallengänge in der Nähe der Portalvenen lokalisiert sind (s. Abb. 2). Die Durchschnittssignalintensitäten der Gallensäuren sind für die Zeitpunkte 0* - 60 min und 480 min vergleichbar. Zum Zeitpunkt 120 min wurde ein deutlicher Anstieg der Intensität verzeichnet, die danach wieder rapide abfiel (s. Abb. 38B und 39B). Das wird auch aus den Ionendichtebildern, die für diesen Zeitpunkt generiert wurden, deutlich. Interessanterweise tritt zwischen 60 – 240 min, insbesondere aber zum Zeitpunkt 120 min nach der APAP Injektion eine deutliche Veränderung bzgl. der Partition der zonalen Intensitäten auf. Die Verteilung der Signale zeigte ein leichtes Gewicht zugunsten der pericentralen Zone. Es fand damit ein „Intensitätsswitch“ von der periportal zur pericentralen Zone statt (s. Abb. 38C und 39C). Damit wird auch verständlich, warum eine hohe Konzentration von TCS und TCDS im systemischen Blutkreislauf quantifiziert werden konnte. (s. Abb. 31).

480 min nach der APAP Injektion stabilisierten sich Gallensäurelevel in der Leber und die zugunsten der pericentralen Zone entwickelte sich wieder zurück.

Dieses beobachtete Phänomen ist - gemessen am Ausmaß der zonalen Differenzierung - die bisher deutlichste Auswirkung der APAP Intoxikation auf die Verteilung der analysierten und über die Leber gebildeten und transportierten Verbindungen (APAP-Derivate, GSH und Gallensäuren).

Die Effekte der APAP Intoxikation sind in Abbildung 40 durch eine alternative Einstellung der Signalintensitätsbereiche (Minimal- und Maximalintensitäten) für TCS-Signale verdeutlicht. Durch die Akzentuierung von Pixeln mit geringen Signalintensitäten, was durch die Auswahl eines niedrigen Werts für die Maximalintensität (Cut Off) erfolgt, steigt die Pixelbedeckung des Ionendichtebildes. Dadurch kann herausgefunden werden, wo überall im Gewebe TCS (und mögliche Isomere) über der instrumentellen LOD detektiert werden konnte. Der Nachteil dieser Darstellungsweise aber ist, dass Unterschiede in der zonalen Distribution visuell schwieriger zu erfassen sind. Mit dieser Skalierung wurde der deutliche Anstieg der

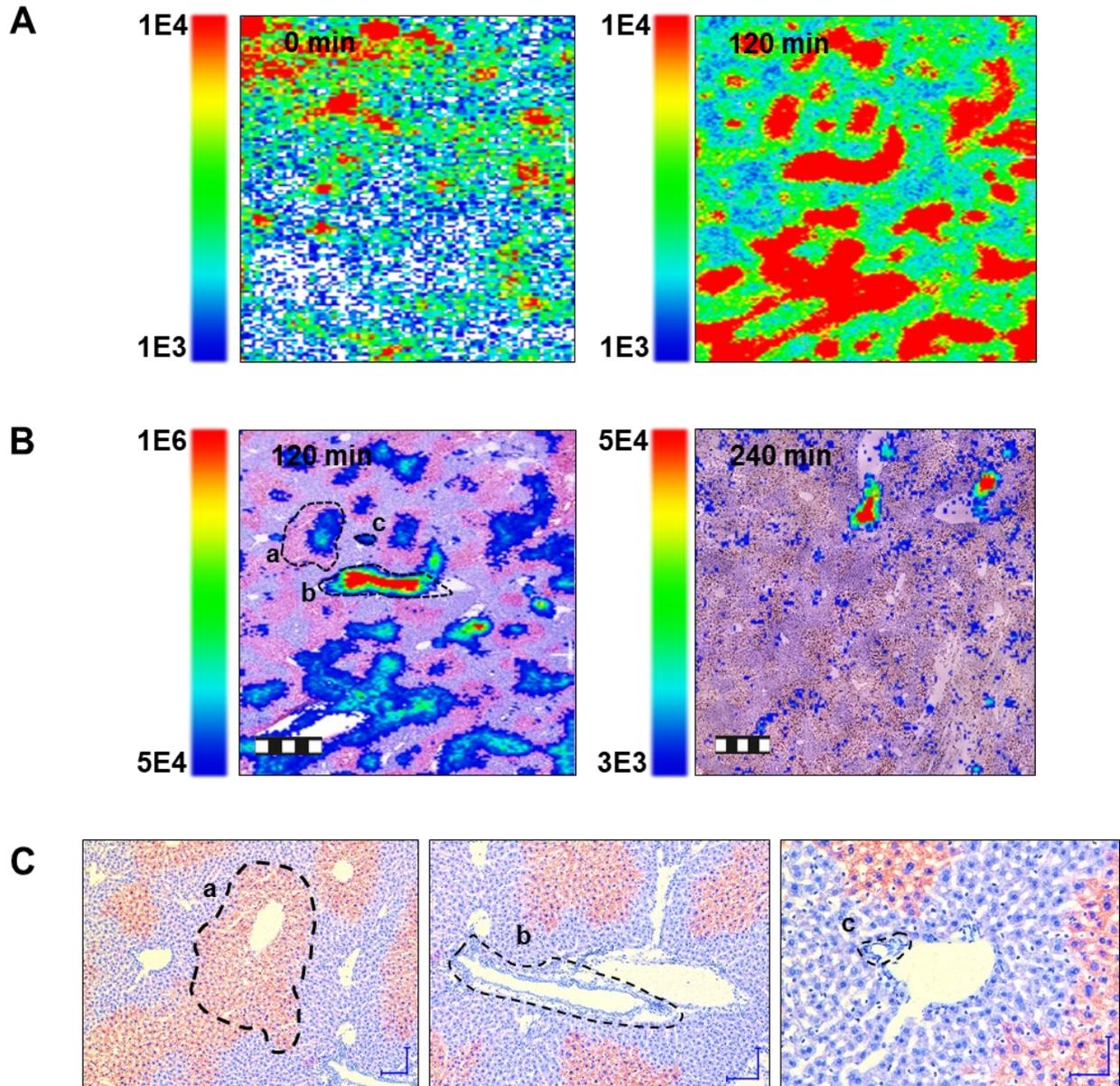


Abbildung 40: MALDI-MSI Analyse der Verteilung von TCS und seinen möglichen Isomeren mit unterschiedlichen Intensitätsfiltern

Repräsentative Abbildungen von Gewebe nach der Applikation einer APAP Dosis von 300 mg kg^{-1} (m/z 514,2843, [M - H]⁻, $\pm 10 \text{ ppm}$). 40A: Repräsentative Ionendichtebilder von Leberschnitten für die Zeitpunkte 0* und 240 min. Für die Signalskalierung wurde der Bereich 1E3 – 1E4 gewählt. 40B: Repräsentative superpositionierte Ionendichtebilder mit Abbildungen von CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten für die Zeitpunkte 120 und 240 min. Die Skalierungen wurden so gewählt, dass die zonale Differenzierung möglichst deutlich zu erkennen war. Skala: 500 μm . 40C: Mikroskopbilder (CYP2E1 Färbung) einer ausgewählten Zentralvene (a) und eines größeren (b) und eines kleineren Gallenweges im Bereich der Portaltriade (c) vom Zeitpunkt 120 min nach der APAP Injektion. Skala: 100 μm (linkes und mittleres Bild), 50 μm (rechtes Bild).

TCS Konzentration im Lebergewebe zum Zeitpunkt 120 min verglichen zum Zeitpunkt 0* min anhand großer zusammenhängender rot gefärbter Bereiche von Signalclustern klar demonstriert (s. Abb. 41A).

Mit der adäquaten Anpassung der Signalintensitätsbereiche konnten viele abundante Signalcluster für TCS (und mögliche Isomere) zum Zeitpunkt 120 und 240 min in pericentralen Zonen registriert werden. Häufig sind die Peakintensitäten dieser Signalcluster direkt auf den Zentralvenen (a) lokalisiert, weniger intensive Signale dieser Cluster reichen allerdings darüber hinaus in die übrigen Areale der pericentralen Zone hinein. Im superpositionierten Bild vom Zeitpunkt 120 min ist zudem ein sehr abundantes Signalband (b) auszumachen. Anhand des hochaufgelösten Mikroskopbildes ist erkennbar, dass dieser Transportkanal mit plättchenartigen Zellen umkleidet ist. Aufgrund der großen Ausmaße handelt es sich hier womöglich um einen Ast des Hauptgallenwegs vom linken Leberlappen und bei den ummantelnden Zellen um Cholangiozyten. Von daher sind die hohen Abundanzen von TCS in diesem Bereich verständlich. Ein kleinerer Gallenweg, in der ebenso hohe Intensitäten von TCS gemessen wurden, ist ebenso dargestellt (c) (s. Abb. 40B und 40C).

Die Ergebnisse verdeutlichen einen erheblichen Einfluss der APAP Überdosis auf die Verteilung der Gallensäuren im Zeitfenster von 60 – 240 min im Lebergewebe. Die Veränderungen traten damit parallel zu beginnenden Leberschäden (s. Abb. 29A und B) und zur zonalen Differenzierung von APAP-GSH und GSH auf (s. Abb. 35C und 36C). Hier lässt sich annehmen, dass der massenhafte Austritt der Gallensäuren vom hepatobiliären System und damit von der enterohepatischen Zirkulation in die systemische Blutzirkulation insbesondere zum Zeitpunkt 120 min durch Schäden an den Hepatozyten bedingt wird.

Der Mechanismus des APAP-induzierten Gallensäureaustritts in die Hepatozyten wurde in der Literatur mit der intravitalen Live-Imaging Methode verfolgt. Den Versuchstieren wurden verschiedene fluorophore bzw. durch metabolische Vorgänge in den Hepatozyten zu Fluorophoren aktivierte Tracer intravenös verabreicht und *in vivo* über Multiphotonenmikroskopie beobachtet, um die strukturelle Integrität der basalen (sinusoidalen) und apikalen (canaliculären) Membranen nachzuverfolgen. Die Überdosis an APAP führte zunächst zur Disruption der basalen Membran. Kommt es zu einem Verlust des mitochondrialen Potenzials der Hepatozytzelle, wurde in der

Arbeit gemutmaßt, dass sich ein pathophysiologischer Druckgradient zwischen der beschädigten Hepatozytelle und der Gallencanaliculi aufbaut. Daraufhin kommt es zu einem Riss der apikalen Membran und zur Überflutung der Zelle mit Gallenflüssigkeit. Der Eintritt der Ruptur der apikalen Membran nachdem Verlust des mitochondrialen Potentials war dabei temporär unterschiedlich verteilt: Apikale Membrane einiger Zellen gaben sofort nach und bei einigen Zellen trat die Ruptur der apikalen Membran zeitversetzt auf (Li 2011).

Bekanntlich entfalten Gallensäuren in hohen Konzentrationen eine Toxizität innerhalb der Hepatozyten. Aufgrund ihres tensidischen Charakters stören sie das Membranpotenzial, können oxidative Esterifizierungen mit unterschiedlichen Biomolekülen eingehen und Rezeptoren, die die Apoptose bzw. Nekrose der Zellen induzieren, aktivieren (Perez 2009).

Während einige Zellen, die Rupturen an ihrer basalen Membran ausbildeten, nach einiger Zeit wieder regenerieren konnten, wurde von den Forschern postuliert, dass der Influx von Gallensäuren in die Hepatozyten, einen „Point of no return“ für deren Lebensfähigkeit darstellte. Die Schäden an den Hepatozyten seien aufgrund dieses Vorgangs irreversibel (Li 2011).

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse bezüglich des Zustroms an Gallensäuren in die Hepatozyten stehen damit im Einklang zu den bisherigen Erkenntnissen aus der Literatur, die die Gallensäuren über indirekte Verfahren zu tracken versuchten. Die HR-MALDI-MSI Methodik ermöglichte die direkte massenspektrometrische Zuordnung der Gallensäuren im Lebergewebe und erlaubte so die aus der Überdosis von APAP resultierenden Alterationen hinsichtlich der Distribution dieser Verbindungen im Gewebe nachzuverfolgen.

3.1.7.6 Metaboliten und Konjugate von APAP im enterohepatischen Kreislauf

Wie stark eine Verbindung in den systemischen Blutkreislauf oder in die enterohepatische Zirkulation übergeht, wird maßgeblich über seine physikochemischen Eigenschaften und über das Vorhandensein spezifischer Transmembranproteine, die für den Transport der Verbindungen eine Rolle spielen,

bestimmt. Beispielsweise ist es bei den Gallensäuren im menschlichen Organismus so, dass sie in normal funktionierenden nicht pathologisch betroffenen Systemen zu ca. 95 % im enterohepatischen System zwischen Duodenum, Leber und Gallenblase zirkulieren (Mok 1977). Für APAP und seine Metaboliten wie APAP-GSH, APAP-SUL, APAP-GLC, APAP-CYS und APAP-NAC wird ebenso berichtet, dass diese teilweise in das enterohepatische System übergehen (Siegers 1983).

Es wird ferner beschrieben, dass APAP-GLC und APAP-SUL größtenteils über den Urin ausgeschieden werden, während beim APAP-GSH der bevorzugte Ausscheidungspfad über die Galle in den Darm und von dort über den Stuhl erfolgt (Gregus 1988).

Beim Vergleich der Ionendichtebilder u.a. von APAP-GSH und von den Gallensäuren fiel auf, dass distinkte Signal-Hotspots z.B. von APAP-GSH im periportalen Bereich lokalisiert wurden (s. Abb. 41). Die Skalierung der Signale wurde dabei so gewählt, dass Pixel mit geringen Signal Abundanzen aus dem Ionendichtebild eliminiert wurden, damit Hotspots besonders gut zu erkennen waren.

Bei genauerem Hinsehen wurde erkannt, dass die Signal-Hotspots für APAP-GSH und APAP-SUL von Gallengängen detektiert wurden, auf denen sehr hohe TCS-Intensitäten dargestellt sind. Für APAP-GLC konnten keine signifikanten Signalcluster von diesen Bereichen weder im negativen noch im positiven Ionenmodus identifiziert werden. Möglicherweise ist der Übergang von APAP-GLC in die enterohepatische Zirkulation deutlich weniger ausgeprägt verglichen zu den anderen Metaboliten.

Da APAP-GSH, APAP-SUL (wie über MALDI-MSI nachgewiesen) und APAP-CYS und APAP-NAC (postuliert anhand der quantitativen HPLC-Ergebnisse) und den Literaturdaten, teilweise in das heterohepatische System übergehen, wird deren Verweildauer im Organismus erhöht. Dies könnte die etwas höheren Halbwertszeiten für APAP-SUL und APAP-NAC verglichen zu APAP und APAP-GLC erklären (s. Kapitel 6.2.1), zumal durch die mehrfache Zirkulation von und zur Leber, ein Teil der Substanzen wieder über die Sinusoide in den Blutkreislauf übergehen könnte.

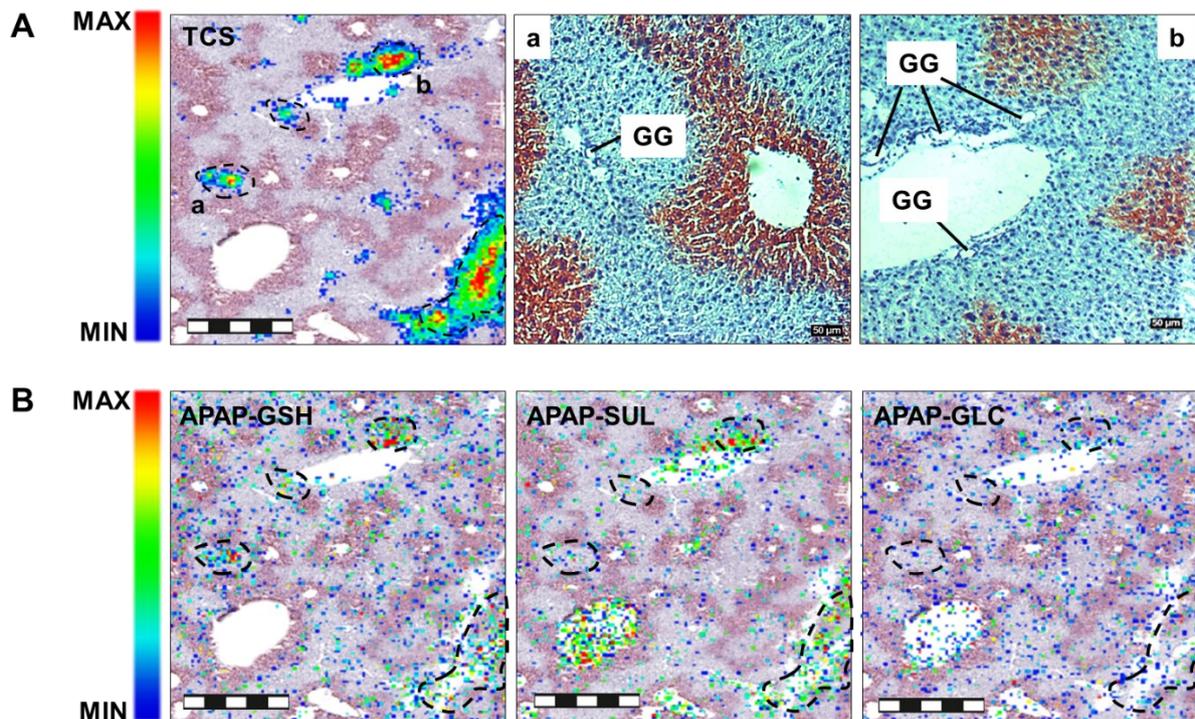


Abbildung 41: MALDI-MSI Analyse zum Vergleich der Verteilung von TCS (und möglichen Isomeren) und von APAP-GSH, APAP-SUL und APAP-GLC

Repräsentative superpositionierte Ionendichtebilder mit Abbildungen von CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten für den Zeitpunkt 30 min nach der APAP Injektion (Dosis: 300 mg kg^{-1}) (TCS: m/z 514,2843, $[\text{M} - \text{H}]^-$, APAP-GSH: 455,1242, $[\text{M} - \text{H}]^-$, APAP-SUL: m/z 230,0128, $[\text{M} - \text{H}]^-$, APAP-GLC: 326,0881, $[\text{M} - \text{H}]^-$, $\pm 10 \text{ ppm}$). 41A: TCS Signale und mikroskopisch vergrößerte Bereiche a und b. GG: Gallengänge. 41B: APAP-GSH, APAP-SUL und APAP-GLC Signale. Skalen betragen für die superpositionierten Abbildungen $500 \mu\text{m}$ und für die vergrößerten optischen Mikroskopbilder $50 \mu\text{m}$.

3.1.7.7 Hypothesen zu den APAP-GSH Resultaten

Werden die Erkenntnisse aus den Kapiteln 3.1.6.1, 3.1.6.2, 3.1.7.4, 3.1.7.5 und 3.1.7.6 hinsichtlich der Daten, die zum einen für APAP-GSH und zum anderen für die Gallensäuren und für GSH gesammelt und unter die Lupe genommen, können möglicherweise folgende plausible Hypothesen zu den Beobachtungen bezüglich der Verteilung vom APAP-GSH im Organismus der Versuchstiere formuliert werden:

APAP-GSH wird bereits nach 5 min nach der APAP Injektion durch die metabolische Aktivierung des APAPs über den CYP Metabolismus und seiner anschließenden Entgiftung durch GSH gebildet. Die APAP-GSH Konzentration erreichte im

Lebergewebe seinen Maximalwert nach 30 min. Interessanterweise war der Konzentrationslevel von APAP-GSH im Blut zwischen 5 – 60 min auf relativ gleichem niedrigem Niveau, bevor ein vor allem durch den Release des über die hepatische Vene ins Blut gelangten APAP-GSH deutlicher Konzentrationsanstieg im Zeitpunkt 120 verzeichnet wurde. Die immunhistochemische Antikörperfärbung gegen CYP2E1 und die Tatsache das GSH in den pericentralen Zonen stärker abgebaut wurde, ließen den Schluss zu, dass APAP-GSH vornehmlich in der pericentralen Zone gebildet wird. Eine kalkulierte zonale Distribution von APAP-GSH trat zwar beginnend ab 60 min auf, war allerdings erst ab 120 min als signifikant einzuordnen. Eine pericentrale Verteilung von APAP-GSH vor dem Zeitpunkt 120 min ließ sich in den Ionendichtebildern nur durch Einstellung passender Signalfilter verdeutlichen (s. Kapitel 6.2.3). Demnach ist zu vermuten, dass es beim APAP-GSH wie auch bei den beiden Hauptmetaboliten zu einer zügigen Aufnahme durch die Hepatozyten und Redistribution durch aktive transmembrane Transportvorgänge kommt. Desweiteren geht ein nicht unwesentlicher Anteil von APAP-GSH in die Gallencanaliculi und damit in den enterohepatischen Kreislauf über und wird weniger über die Sinusoide abtransportiert (niedrige und gleichbleibende Blutkonzentrationslevel zwischen 5 – 60 min).

Die zonale Distribution zum Zeitpunkt 120 min lässt sich möglicherweise auf die erlahmenden Transportvorgänge durch die Zunahme der Anzahl an beschädigten Hepatozyten zurückführen, die die zügige Verteilung von APAP-GSH im Lebergewebe verlangsamten.

Eine andere mögliche und aus der eigenen Beurteilung heraus stichhaltigere Hypothese ist die Flutung des Gewebes durch APAP-GSH analog der Gallensäuren. APAP-GSH findet dabei aus der enterohepatischen Zirkulation heraus denselben Weg zurück zum Lebergewebe wie die Gallensäuren. Diese Annahme deckt sich mit denselben Verteilungsmustern von APAP-GSH und den Gallensäuren zum Zeitpunkt 120 min und dem signifikanten Anstieg des APAP-GSH Niveaus vor allem im Blut der hepatischen Vene als Folge des sinusoidalen Abtransports des von der Galle zugeströmten APAP-GSH in Richtung der Zentralvenen.

Resultierend aus diesen Annahmen, muss konstatiert werden, dass APAP-GSH zwar vornehmlich zur pericentralen Zone attribuieren lässt, als Vertreter zur Reflektion der

Verteilung des entstehenden und zügig *in situ* weiterreagierenden NAPQI kann es jedoch nicht fungieren.

3.2 Dosisabhängiges Experiment

3.2.1 CYP2E1 immunhistochemische Färbung

Repräsentative Bilder von CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten von Versuchstieren, denen APAP in variablen Dosen (56, 167 und 500 mg kg⁻¹ Körpergewicht) verabreicht und die Leber nach 30 min der APAP Injektion beprobt wurde, finden sich in Abbildung 42.

Während bei der niedrigen und mittleren Dosis (56 und 167 mg kg⁻¹) keine pathologischen Veränderungen auf dem Lebergewebe erwartet wurden, zumal

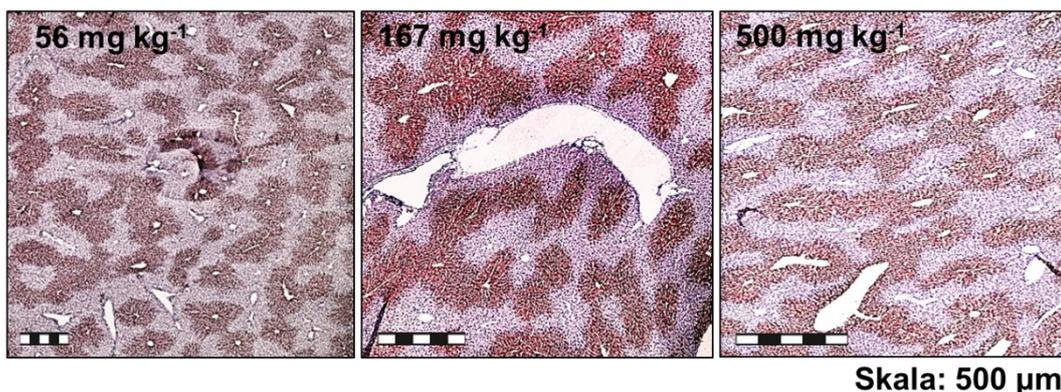


Abbildung 42: CYP2E1 immunhistochemische Färbung im dosisabhängigen Experiment
Repräsentative Mikroskopbilder von Versuchstieren (APAP-Dosen: 56, 167 und 500 mg kg⁻¹ Körpergewicht). Skala: 500 µm.

signifikante Schäden an den Leberzellen bei der höheren Dosis von 300 mg kg⁻¹ APAP nicht festgestellt werden konnten. Interessant war daher die Betrachtung der gefärbten Leberschnitte von Tieren, denen eine deutlich über der lethalen Dosis liegende Konzentration injiziert wurde. Auch bei diesen Proben konnten noch keine Veränderungen in den Intensitäten der CYP2E1 positiv gefärbten Bereiche oder Leberschäden beobachtet werden. Offensichtlich ist der zeitliche Verlauf für das Auftreten merklicher Schäden in der Leber zunächst dosisunabhängig.

Bei der Betrachtung der H&E-Färbungen konnten ebenso keine auffälligen Veränderungen im Lebergewebe lokalisiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.2.2 Quantitative HPLC-Ergebnisse

3.2.2.1 APAP, Metabolite und Addukte

Die Auswertung der Ergebnisse für die Quantifizierung von APAP, Metaboliten und Addukten erfolgte analog wie im kinetischen Experiment. Diese sind in der Abbildung 43 dargestellt.

Aufgrund der Vorversuche fiel die Wahl zur Durchführung des dosisabhängigen Experiments auf Proben, die von Mäusen nach 30 min der APAP Injektion entnommen worden sind. In diesem Zeitpunkt konnten die höchsten Signalintensitäten der untersuchten Analyten detektiert werden.

Zwischen der Injektion geringer unbedenklicher Dosen und sehr hoher letaler Dosen an APAP ergaben sich markante Unterschiede in den quantifizierten APAP Niveaus im Blut: Bei der Injektion der niedrigen Dosen 56 und 167 mg kg⁻¹ Körpergewicht lagen die Konzentrationen deutlich unter 1 mM (56 mg kg⁻¹) bzw. um die 1 mM (167 mg kg⁻¹), während es bei der Applikation der sehr hohen Dosis zu einem deutlichen Anstieg der Konzentration im Blut auf fast 4 mM kommt. Dieser rapide Anstieg der APAP Konzentration wird, wenn die Biotransformationen zu den Metaboliten und Addukten berücksichtigt wird, nicht zur Genüge vom metabolischen System (Leber und Darm) „aufgefangen“. Während das Verhältnis von APAP zu Biotransformationsprodukten für die Dosis 167 mg kg⁻¹ ca. 1:0,5 betrug, sank sie für die hohe Dosis auf ein Verhältnis von ca. 1:0,2. Es kann daher auf eine deutliche Übersättigung des Organismus mit APAP geschlossen werden. Weder für APAP noch für die Hauptmetaboliten APAP-SUL und APAP-GLC konnte eine Differenzierung bezüglich der Blutbahnen beobachtet werden, was sich mit den Ergebnissen vom kinetischen Experiment deckt. Befanden sich die Level von APAP-GLC und APAP-SUL für die niedrigen Dosagen noch auf vergleichbarem Niveau, so wurde bei der hohen Dosis kaum mehr

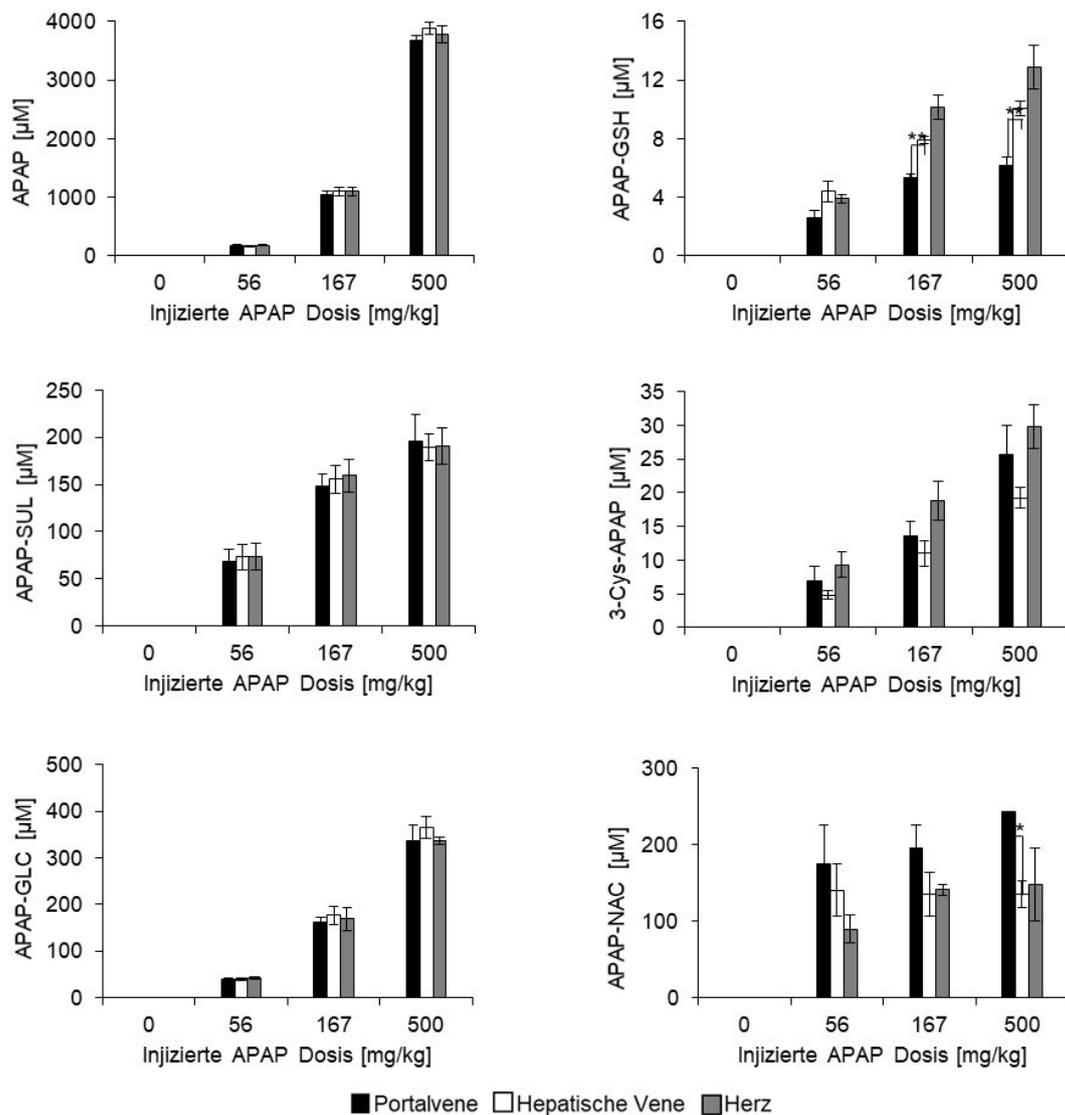


Abbildung 43: Quantitative HPLC-MS Analyse von APAP, seinen Metaboliten und Addukten im Blutplasma im dosisabhängigen Experiment

Die applizierten Dosen waren 56, 167 und 500 mg kg^{-1} Körpergewicht. Die Entnahme von Blut erfolgte von der Portal- und hepatischen Vene, sowie von der rechten Herzkammer (Mittelwerte und Standardabweichungen von $n = 3$ Versuchstieren pro Datenpunkt). Leberproben von Versuchstieren nach 30 min APAP Injektion. $^{**} < 0,01$ verglichen zu den entsprechenden Ergebnissen der Portalvenen (Sezgin 2018). Fehlerbalken: Standardfehler.

APAP-SUL verglichen zur Dosis von 167 mg kg^{-1} Körpergewicht metabolisiert, während die APAP-GLC Produktion die APAP-SUL deutlich überstieg. Damit konnte festgestellt werden, dass das Verhältnis zwischen den gebildeten Hauptmetaboliten dosisabhängig ist. Es wurden kaum mehr APAP-GSH bei der hohen Dosis verglichen zu den niedrigen Dosen im Blut aufgefunden, was ein eindeutiger Hinweis auf die erschöpften GSH Vorräte in der Leber ist. Ähnlich verhielt es sich mit dem APAP-GSH

Folgeprodukt, dem APAP-NAC. APAP-GSH Konzentrationen zeigten wiederum eine Differenzierung bezüglich der hepatischen Austrittsvene, während APAP-NAC deutlich mehr im Blut von der Portalvene quantifiziert wurde. Die Differenzierung für die letztere Substanz nahm zudem mit steigender Dosis zu, was womöglich auf eine Anreicherung von APAP-NAC in der enterohepatischen Zirkulation zurückgeführt werden kann. Beim APAP-CYS konnte dieses Verhalten ebenso beobachtet werden, wenn auch nicht so markant wie beim APAP-NAC (Sezgin 2018).

3.2.2.2 TCS und TCDS

Die Ergebnisse für TCS und TCDS aus dem dosisabhängigen Experiment sind in der Abbildung 45 angezeigt.

Im kinetischen Experiment (s. Abb. 31), bei dem den Mäusen eine Dosis von 300 mg kg⁻¹ Körpergewicht appliziert wurde, wurde zum Zeitpunkt 30 min noch keine

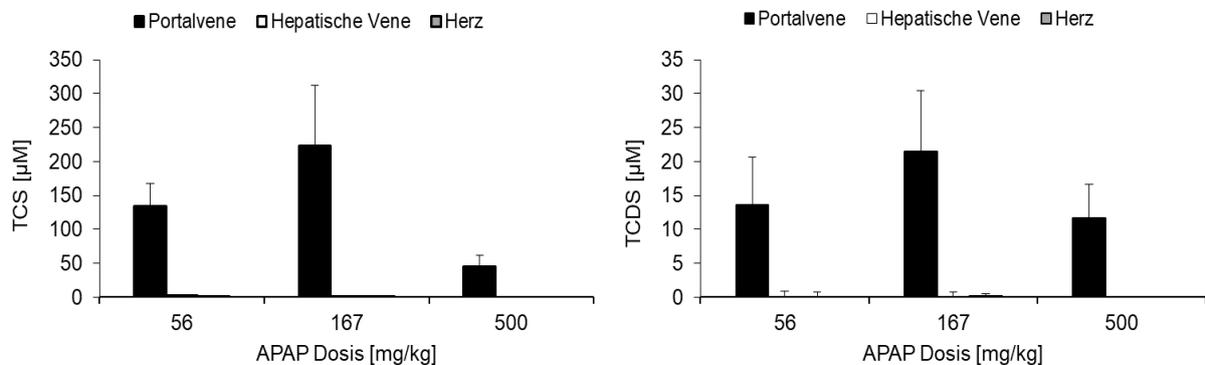


Abbildung 44: Quantitative HPLC-MS Analyse von TCS und TCDS im Blutplasma im dosisabhängigen Experiment

Die Entnahme von Blut erfolgte von der Portal- und hepatischen Vene, sowie von der rechten Herzkammer (Mittelwerte und Standardabweichungen von $n = 3$ Versuchstieren pro Datenpunkt). Leberproben von Versuchstieren nach 30 min APAP Injektion. Fehlerbalken: Standardfehler.

Differenzierung für die Gallensäuresignale beobachtet. Dieses Verhalten wurde auch für niedrigere und höhere Dosagen im dosisabhängigen Experiment bestätigt; die Gallensäuren wurden deutlich im periportalen Blut detektiert.

3.2.3 MALDI-MSI Ergebnisse

3.2.3.1 APAP, Metaboliten und Addukte

Die Ausführung des MALDI-MSI Experiment für das dosisabhängige Experiment war analog zum kinetischen Experiment, mit der Ausnahme, dass die lediglich für den Zeitpunkt 30 min nach der APAP Injektion beprobt und dabei die APAP Dosis variiert wurde (56, 167 und 500 mg kg⁻¹ Körpergewicht).

Die Ergebnisse für APAP, seine Hauptmetaboliten und Konjugate werden in der Abbildung 45 zusammengefasst präsentiert.

Das Resultat betreffend die Distribution der Analyten und die für die auf dem Lebergewebe gemessenen Bereiche berechneten Durchschnittssignalintensitäten stimmten mit den Beobachtungen des quantitativen HPLC-MS Experiments überein. Mit der Zugabe der hohen Dosis wurde das Gewebe nach 30 min mit APAP „geflutet“, was sich auch am rapiden Anstieg des APAP Signals bemerkbar macht.

APAP-GLC wurde bei der hohen Dosis mehr als APAP-SUL gebildet, wie auch schon im Blutscreening beobachtet wurde. Erwartungsgemäß zeigten die dosisabhängigen Verläufe von APAP-GSH und GSH ein entgegengesetztes Verhalten. Bei der niedrigen Dosis wurde kaum APAP-GSH gebildet, mit der Applikation der nächsthöheren Dosis nahm die Menge rapide zu. Die Zunahme zwischen der mittleren und hohen Dosis war dann allerdings nicht so stark. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die GSH Reserven im Lebergewebe nahezu ausgeschöpft waren.

Auf eine zonale Semiquantifizierung der Analyten zur Ermittlung der PP-PC-Partition im dosisabhängigen Experiment wurde aus dem folgenden Grund verzichtet: Beginnende Differenzierungen im kinetischen Experiment konnten für die meisten Analyten erst ab 60 min beobachtet werden. Außerdem ist die Durchführung der zonalen Semiquantifizierung mit der zur Verfügung stehenden Software nur unter großem zeitlichem Aufwand möglich, da die Zonen manuell ausgewählt werden

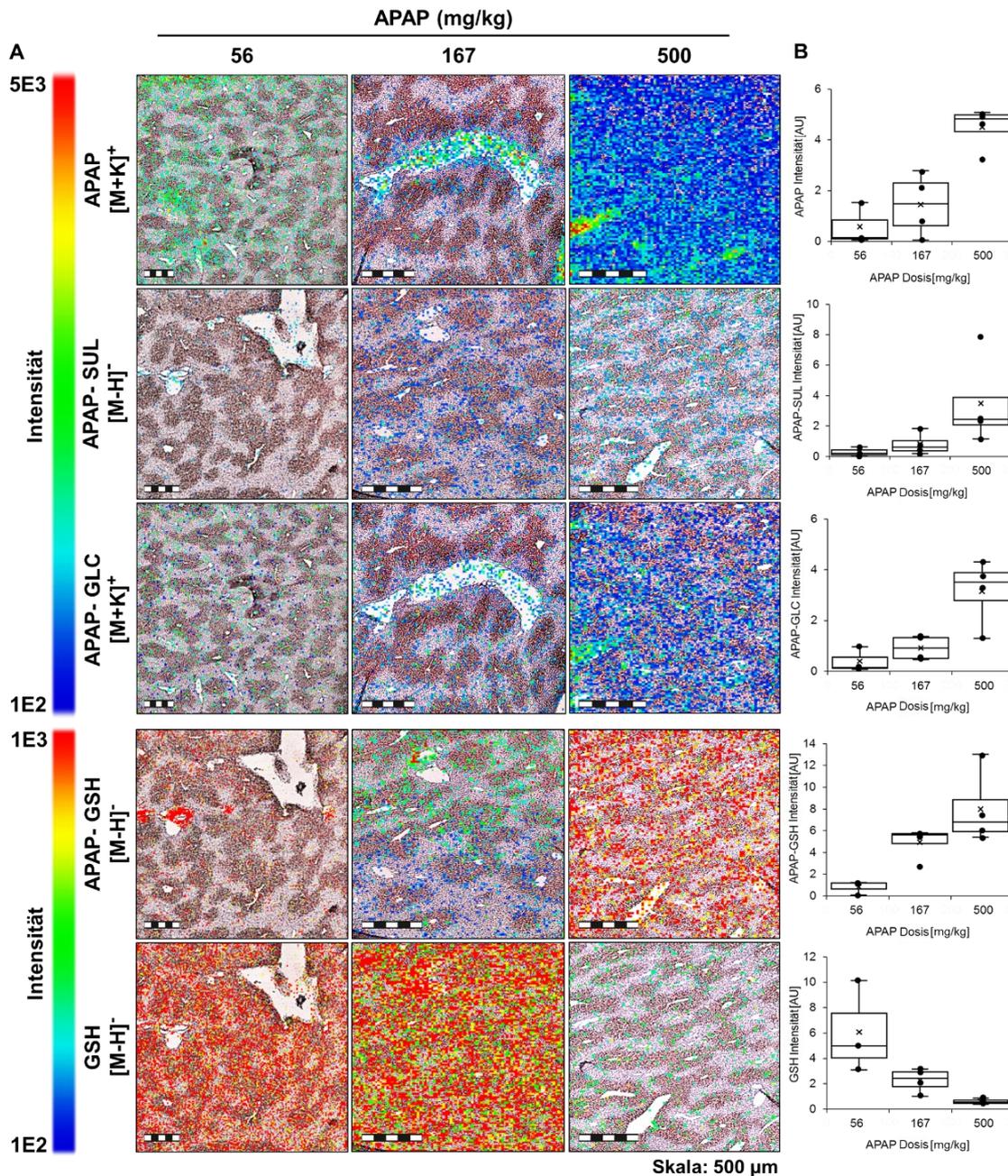


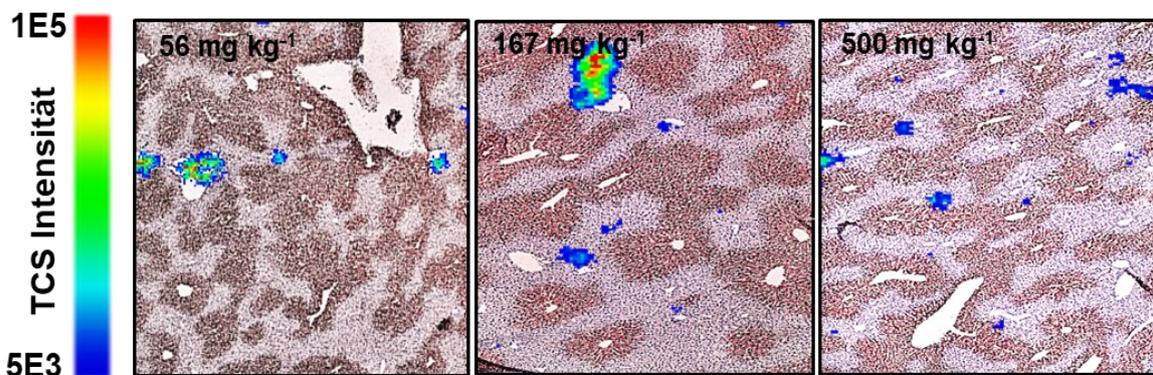
Abbildung 45: MALDI-MSI Analyse von APAP und seinen Transformationsprodukten im dosisabhängigen Experiment

Untersuchung der Gewebe von $n = 3 - 4$ Versuchstieren nach der Applikation von variablen APAP Dosen von 56, 167 und 500 mg kg⁻¹ Körpergewicht zum Zeitpunkt 30 min nach der APAP Injektion. 45A: Repräsentative superpositionierte Ionendichtebilder mit Abbildungen von CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten (APAP: m/z 190,0264, [M + K]⁺; APAP-SUL: m/z 230,01286, [M - H]⁻; APAP-GLC: m/z 366,0585, [M + K]⁺; APAP-GSH: m/z 455,1242, [M - H]⁻; GSH: m/z 306,0765, [M - H]⁻, ± 10 ppm). 45B: Semiquantifizierung der Analyt Signale über einen Vergleich der gemittelten relativen Signalintensitäten über das gesamte Messareal der einzelnen Gewebmessungen. Die Boxplots umranden das 25 – 75 % Quartil getrennt durch den Median (-). Zusätzlich ist die Position des Mittelwerts (x) aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebsschnitte gekennzeichnet (Sezgin 2018).

mussten. Da keine großen Unterschiede erwartet wurde, wurde auf eine Semiquantifizierung verzichtet. In diesem Fall wäre es interessant gewesen zu wissen, ob die zonale Differenzierung der untersuchten Analyten im Zeitpunkt 120 min von der Dosis beeinflusst wird.

3.2.3.2 TCS

A



B

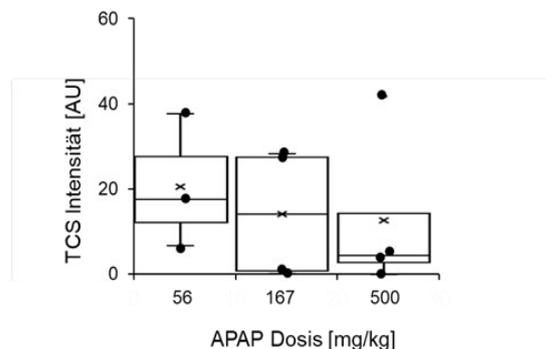


Abbildung 46: MALDI-MSI Analyse von TCS und möglichen Isomeren im dosisabhängigen Experiment

Untersuchung der Gewebe von $n = 3 - 4$ Versuchstieren nach der Applikation von variablen APAP Dosen von 56, 167 und 500 mg kg⁻¹ Körpergewicht zum Zeitpunkt 30 min nach der APAP Injektion. 46A: Repräsentative superpositionierte Ionendichtebilder mit Abbildungen von CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten (TCS: m/z 514,2843, [M - H]⁻; \pm 10 ppm). 46B: Semiquantifizierung der Analyt Signale über einen Vergleich der gemittelten relativen Signalintensitäten über das gesamte Messareal der einzelnen Gewebsmessungen. Die Boxplots umranden das 25 – 75 % Quartil getrennt durch den Median (-). Zusätzlich ist die Position des Mittelwerts (x) aus den gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Gewebsschnitte gekennzeichnet.

Abundante Signalcluster für TCS wurden lediglich von den Gallengängen in der periportalen Zone detektiert. Die Unterschiede in den Signalintensitäten resultierten wahrscheinlich von der biologischen Variation (Streuung) der Proben (s. Abb. 46).

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse vom kinetischen und dosisabhängigen Experiment

Anhand histochemischer und massenspektrometrischer Daten bezüglich der pathologischen Auswirkungen durch toxische APAP Dosen, können folgende Erkenntnisse aus den beiden Experimenten (kinetisch und dosisabhängig) gezogen werden:

Erste sichtbare pathologische Veränderungen (Schäden) durch eine APAP Dosis von 300 mg kg^{-1} Körpergewicht am gesamten Leberorgan sowie im Gewebe selbst traten ab 60 min auf, und waren besonders prägnant ab 240 min. Dieses Phänomen wurde außerdem durch den signifikanten Anstieg der Transaminasewerte ab diesem Zeitpunkt untermauert. Eine im betrachteten Zeitrahmen auftretende weitflächige Regeneration der beschädigten apoptotischen bzw. nekrotischen Bereiche entlang des Lebergewebes konnte nicht beobachtet werden.

Die maximale Konzentration an verabreichtem APAP konnte sowohl im Blut als auch im Lebergewebe zwischen 15 und 30 min registriert werden und wies eine berechnete Halbwertszeit von ca. 91 min in der Blutzirkulation vor.

Die beiden Hauptmetaboliten APAP-GLC und APAP-SUL zeigten Halbwertszeiten von ca. 94 bzw. 97 min und erreichten die maximalen Konzentrationen im Blut wie auch im Gewebe zum Zeitpunkt von ca. 30 min. Obwohl beide Verbindungen hauptsächlich aus enzymatischen Transformationsreaktionen in der Leber hervorgehen, wurde wider Erwarten, keine Konzentrationsunterschiede in den Blutbahnen beobachtet. Die Annahme war, dass die Betrachtung einer einzelnen Leberpassage nicht ausreichend war, um geringfügige Änderungen der APAP-GLC und APAP-SUL Konzentrationen in den Zu- und Abflussblutgefäßen der Leber zu registrieren. Ebenso fehlte eine zonale Differenzierung im Lebergewebe trotz der in der Literatur berichteten präferentiellen Verteilungen der für die Transformation verantwortlichen Enzyme. Hier wurde die

Annahme verlaublich, dass es zu einer zügigen Redistribution der Stoffe zwischen den Hepatozyten nach ihrer Bildung kommt.

Die Untersuchung der metabolischen Bildung und Verteilung des APAP-GSHs sowie das Screening nach dem GSH sollten indirekte Rückschlüsse auf das Vorkommen und Verhalten des toxischen und nicht durch die in dieser Arbeit angewandten Techniken adressierbaren NAPQI ermöglichen. APAP-GSH und GSH demonstrierten ein komplementäres Verhalten betreffend der schwerpunktmäßigen Distribution entlang der Zonen. Während APAP-GSH beginnend ab 60 min mehr pericentral auftrat, wurden die Reservoirs von GSH stärker im pericentralen Bereich beansprucht und es ergab sich dadurch eine Partition zugunsten der periportalen Zonen. Die GSH Konzentration im Lebergewebe war bereits nach 30 min auf kritische Niveaus gesunken und erreichte das Minimum im Zeitpunkt 120 min nach der APAP Injektion. Es ist daher nicht verwunderlich, dass ab diesem Zeitpunkt Schäden in den Leberzellen deutlich sichtbar wurden.

APAP-GSH wies für die Zeitpunkte vor 120 min keine scharfe zonale Verteilung auf, wie vor der Ausführung des Experiments prognostiziert wurde. Es wurde daher gemutmaßt, dass es zu einer rapiden Verteilung von APAP-GSH im gesamten Gewebe durch aktive Transportvorgänge kommt. Ferner wurde festgestellt, dass ein nicht unwesentlicher Anteil des APAP-GSHs in die Galle übergeht. Für das Auftreten der signifikanten Verteilung zugunsten des pericentralen Areals wurde die Behauptung aufgestellt, dass die Transportvorgänge für APAP-GSH aufgrund der fortgeschrittenen pathologischen Auswirkungen erlahmen, sodass APAP-GSH vorwiegend an dem Ort, an dem seine Biosynthese auftritt, lokalisiert ist. Zudem ist ein möglicher Influx von APAP-GSH zum Zeitpunkt 120 min auf dem gleichen Wege wie es durch die Gallensäuren geschieht, möglich. Aufgrund dieser Beobachtungen ist das Tracking des APAP-GSHs zur Reflektion einer möglichen Verteilung des Vorläufers NAPQI als ungeeignet zu beurteilen.

Der Breakdown von APAP-GSH fand vermutlich größtenteils im Darm statt, wie die Ergebnisse aus den HPLC-MS Daten für APAP-CYS und APAP-NAC nahelegen. Für APAP-NAC wurde eine Halbwertszeit von ca. 102 min im Blut berechnet.

Zwischen 60 – 240 min, insbesondere zum Zeitpunkt 120 min, konnte ein deutlicher Eintrag der Gallensäuren von den Transportkanälen der Galle in die pericentralen

Zonen im Gewebe demonstriert und somit - im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen - ein Vorgang aufgezeigt werden, der verdeutlicht, dass die pathologischen Auswirkungen der APAP Dosierung nicht ausschließlich auf die Reaktion von NAPQI mit lebereigenen Proteinen beschränkt ist: Vielmehr wird eine Ereigniskette in Gang gesetzt, der die Giftigkeit einer APAP Dosierung durch konzentrierten Influx von Galleninhaltsstoffen verstärkt.

Alle xenobiotischen Substanzen (APAP und Derivate) wurden bereits nach 240 min nach der APAP Injektion nahezu vollständig vom Lebergewebe eliminiert worden.

Höhere Dosen an APAP führten bei APAP und allen seinen Derivaten zu einer Erhöhung von deren Konzentrationen im Blut und im Lebergewebe. Durch den zügigeren Abbau der GSH Vorräte bei der sehr hohen APAP Dosis, wurde vermutlich die metabolische Kapazität der Leber zur Entgiftung von NAPQI bereits stark beansprucht, sodass die Zunahme der Konzentrationsniveaus der Metaboliten und Konjugate insbesondere des APAP-GSHs und seines Folgeprodukts APAP-NAC von der Dosis 167 auf 500mg kg⁻¹ Körpergewicht gering ausfielen. Zum Zeitpunkt 30 min traten trotz der hohen letalen Dosis noch keine visuell beobachtbaren Leberschäden auf. Die Vorgänge, die die Apoptose bzw. Nekrose der Leberzellen hervorrufen, sind daher möglicherweise von dem zeitlichen Auftreten her dosisunabhängig.

4. Diskussion

4.1 Voruntersuchungen, Optimierungen und Konzeption des kinetischen und dosisabhängigen Experiments

HPLC-MS Analysen von Leberextrakten gaben erste Hinweise auf zu erwartende Signalbereiche für APAP und seine Derivate und für endogene Stoffe, die im Leberstoffwechsel eine tragende Rolle spielen und ihre Verteilung von den Auswirkungen der APAP Intoxikation möglicherweise ebenso affiziert werden könnten. Dazu gehörten beispielsweise die Taurocholate.

Vom NAPQI konnten unter HPLC-MS Bedingungen keine klar unterscheidbaren Signale vom Untergrundrauschen detektiert werden. Dies bewog uns dazu NAPQI aus analytisch-massenspektrometrischen Gesichtspunkten her näher unter die Lupe zu nehmen. Antrieb dieser Arbeiten war, dass zum Zeitpunkt der Beprobungen noch eine gewisse noch nicht abreagierte Menge NAPQI im Lebergewebe vermutet wurde, welches durch chemische Derivatisierungsverfahren der MALDI-MS Analytik zugänglich gemacht werden sollte. Ein direktes Tracking von „On-Tissue“ derivatisierten NAPQI hätte insofern ein Erfolg dargestellt, weil dadurch die direkten Entstehungs- und Wirkstätten des NAPQIs im Lebergewebe hätten besser nachverfolgt werden können.

Die Resultate offenbarten die hohe Reaktionsfreudigkeit dieser Elektronenmangelverbindung, sobald sie in wässriger Puffer- oder in methanolischem Lösungsmittel angesetzt wurde. Vorwiegend reduzierte sich das NAPQI dabei wieder zurück zum APAP und es entstanden bereits aus der Literatur bekannte sowie auch tentative in dieser Arbeit suggerierte Oligomere von NAPQI aus bis zu acht Monomereinheiten, vermutlich entstanden über eine radikalisch ablaufende Verkettung. Auch wenn die Chancen für eine Entstehung dieser höherverketteten Einheiten *in vivo* im realen Organismus als gering einzustufen sind, so konnte dies nicht kategorisch ausgeschlossen werden, zumal auch APAP-Dimere in von APAP behandelten Mäusen aber auch im Plasma von Menschen nachgewiesen wurden (Chen 2008, Trettin 2014a). Der sinnvolle Einsatz der Imaging Software Mirion ermöglichte das Auffinden von zu den vorher vorgeschlagenen Oligomeren korrespondierenden Massen in einem semiartifiziellen MALDI-MSI Experiment von Referenzstandard enthaltenden Tropfen, die auf Negativkontrollgewebe platziert wurden. Der Abgleich von Negativ- und Positivkontrollgeweben zeigten auch

tatsächlich korrespondierende Signale von immerhin den Dimeren, Trimeren und Tetrameren auf dem Lebergewebe. Weiter wurde die Analytik dieser Stoffe in den nachfolgenden Experimenten nicht verfolgt, zumal das Hauptaugenmerk auf den Nachweis von APAP und seinen prominenten Metaboliten und Addukten gerichtet wurde.

Großer Aufwand wurde darin investiert das NAPQI zu „trappen“ um darauf basierend eine Methode entwickeln zu können, die es hätte ermöglichen sollen - falls vorhanden - noch nicht abreagierte Rückstände dieses Phase-I-Metaboliten über die Erzeugung eines abundanten Derivats im Lebergewebe tracken zu können. In einem artifiziellen, aber innovativen Ansatz gelang es das Pendant der in der Literatur beschriebenen Reaktion von NAPQI in einer wässrigen Lösung mit Natriumsulfid mit in eine NAPQI enthaltende Lösung eingeleitetem H₂S Gas nachzustellen. Die in der Literatur beschriebenen Produkte aus dieser Reaktion (Trettin 2014b), sowie ein weiteres mit einer Thiol-Einheit verbrücktes APAP-Dimer konnte durch HPLC-MS-MS-Messungen tentative zugeordnet werden. Vorteilhaft war auch, dass durch diese Reaktion die Anzahl der in einer Reinslösung von NAPQI entstehenden Produkte im Allgemeinen reduziert werden konnte. Der Transfer dieser Reaktion auf geschnittenes Lebergewebe ließ sich prinzipiell verwirklichen. Allerdings konnten keine zuvor bestimmten Derivatisierungsprodukte im Lebergewebe über MALDI-MSI detektiert werden. Schlussendlich wurden daher Bestrebungen NAPQI bzw. mögliche künstliche Derivate daraus zu analysieren, aufgegeben. Es wurde vielmehr angenommen, dass der Phase-I-Metabolit NAPQI offenkundig *in vivo* zügig nach seiner Bildung weiterreagiert. Es müsste zudem an dieser Stelle generell die Frage gestellt werden, ob mögliche Rückstände hochreaktiver Zwischenmetaboliten in einem MALDI-MSI Ansatz überhaupt sinnvoll detektiert und dargestellt werden können. Ausgehend von diesen Ergebnissen sind die Chancen dazu als sehr gering zu einzustufen. Sinnvoller sind Derivatisierungsverfahren im Rahmen von MALDI-MSI Experimenten nur dann, wenn sie an stabilen oder zumindest metastabilen Verbindungen ausprobiert werden, um die Ionisationsgüte dieser Verbindungen zu verbessern und/oder ihre Molekülmasse aus interferierenden Zonen in höhere Massenbereiche zu verschieben.

Derivatisierungsmethoden, die im Zusammenhang mit MALDI-MSI Experimenten auf den Einsatz eines reaktiven Gases zurückgreifen, um eine On-Tissue Derivatisierung von Verbindungen für ein MALDI-MSI Versuch durchzuführen, konnten in der Literatur

nicht gefunden werden. Der hier entwickelte Ansatz ist, obwohl er in diesem Fall nicht zum Erfolg geführt hat, möglicherweise interessant für solche Anwendungen. Durch den Einsatz von Gas im Gegensatz zu Reagenzien, welche einen Spray von gelösten Reaktanden verwenden, ist die Wahrscheinlichkeit für Analytmigrationen auf dem Gewebe gering. Sicherlich ließe sich die in dieser Arbeit für die eigenen Belange provisorisch konzipierte Anlage technisch und bezüglich Sicherheitsaspekten deutlich aufwerten und verbessern. Eine wesentliche Limitierung der Gasderivatisierung dürfte allerdings die Überschaubarkeit an vorhandenen reaktiven Gasen oder auch volatilen organischen Substanzen sein, die aus chemischen und technischen Gesichtspunkten für diesen Zweck eingesetzt werden könnten. Hier wäre die Anwendung einer alternativen Methode denkbar gewesen, die sich an der Matrixsublimations-/Rekristallisationsmethode orientiert (Yang 2011). Dabei könnten volatile Thiole zur durch Vakuumsublimation zur Reaktion auf das Gewebe transferiert und anschließend die Matrix über die Sublimation/Rekristallisation aufgetragen werden.

APAP und seine Derivate, sowie alle anderen untersuchten Analyten haben gemeinsam, dass ihre m/z in Bereiche < 500 Da fallen. Dadurch stellten sie den MALDI-MSI Analytiker bei der Konzeption eines robusten MALDI-MSI Experiments vor Herausforderungen trotz Einsatz ausgefeilter hochauflösender Analysesysteme mit hohen Massengenauigkeiten. Viele mögliche „Stellschrauben“ können über den Erfolg oder Misserfolg der Messungen entscheiden. Im Wesentlichen wurden in den Optimierungsversuchen geeignete Matrix-Lösungsmittelsysteme, Spraymethoden und Ionisationsmodi identifiziert, die bei der adäquaten Wahl des zu trackenden Quasimoleküls eine möglichst interferenzfreie Detektion für APAP und seine Derivate erlaubte. MALDI-MSI Vorversuche an negativem und positivem Kontrollgewebe ermöglichten die Auswahl der Analyten, die zur Betrachtung im eigentlichen kinetischen und dosisabhängigen Experiment in Frage kamen. Dies führte dazu, dass einige potenziell wichtige Analyten aussortiert wurden: APAP-CYS und APAP-NAC, sowie Glutamin. Wichtig war außerdem die Berücksichtigung von möglichen Artefaktbildungen der Substanzen vornehmlich durch In-Source Fragmentierungen untereinander, wobei die Analysen hierfür ergaben, dass keine signifikanten Verfälschungen durch Artefaktbildungen auf die MALDI-MSI Resultate zu erwarten waren. Eine wichtige Einstellung war zudem die geeignete Wahl der lateralen Auflösung. Diesbezüglich fiel die Entscheidung auf eine Auflösung von $20 \mu\text{m}$ um im

zur CYP2E1 Abbildung superpositionierten MALDI-MSI Ionendichtebild, Pixel mit Masseninformation möglichst deckungsgleich zu den morphologischen Merkmalen des immunhistochemisch gefärbten Lebergewebes zuordnen zu können und dabei ausreichende Detektion zu gewährleisten. Eine weitere wichtige Größe war in diesem Zusammenhang auch die optimale Auswahl der Schnittdicken des Lebergewebes, die auf ca. 3 – 5 µm fiel und die Zuordnung charakteristischer Mikrostrukturen von seriellen Leberschnitten zueinander und zu den massenspektrometrischen Signalen erlaubte.

Schließlich wurde noch eine auf dem HILIC Prinzip basierende chromatographische Methode zur quantitativen HPLC-MS Analyse von APAP und Derivaten und von Gallensäuren entwickelt, zumal die zuvor in den Vorversuchen eingesetzten Methodiken nicht ausgefeilt genug zur simultanen Analyse von APAP und seinen Biotransformationsprodukten und den beiden Gallensäuren TCS und TCDS waren.

4.2 Kinetisches und dosisabhängiges Experiment

Für APAP wurde keine zonale Distribution beobachtet, was dadurch erklärt werden kann, dass APAP während der Leberpassage von allen Hepatozyten entlang der Sinusoide absorbiert werden kann. Obwohl die für die Umwandlung von APAP in seine Hauptmetaboliten verantwortlichen Enzyme laut den Berichten aus der Literatur eine präferentielle Verteilung entlang der Leberzonen aufzeigten (Godoy 2013), konnte für APAP-GLC und APAP-SUL keine zonale Differenzierung weder visuell in den Ionendichtebildern noch semiquantitativ über die Durchschnittssignalintensitäten erfasst werden. Hierzu wurde vermutet, dass sobald die Metaboliten gebildet werden, sie die Membranen der Hepatozyten zügig passieren und anschließend zwischen den Hepatozyten distribuiert werden können. Möglich ist auch, dass eine geringfügige Differenzierung für APAP-GLC und APAP-SUL existiert, die angewandte analytische Methode aber nicht empfindlich genug ist, um zu geringe graduelle Konzentrationsunterschiede zu erfassen (Sezgin 2018).

In der Literatur existieren unterschiedliche Angaben zu den Verhältnissen der quantifizierten Hauptmetaboliten aus dem Blut von Nagetieren. Bei einer verabreichten APAP Dosis von 300 mg kg⁻¹ Körpergewicht, wurden höhere APAP-GLC Konzentrationen für den Mausstamm C57BL6/J beobachtet (Akakpo 2018), während

in dieser Arbeit mit dem Stamm C57BL6/N vergleichbare Niveaus für APAP-GLC und APAP-SUL festgestellt wurden. Bei der Applikation von niedrigeren Dosen $< 300 \text{ mg kg}^{-1}$ Körpergewicht APAP berichteten andere Arbeitsgruppen über höhere Level für APAP-SUL (Chen 2013, An 2012). In unseren Untersuchungen fiel hingegen auf, dass bei Dosen $< 500 \text{ mg kg}^{-1}$ vergleichbare Level an APAP-SUL und APAP-GLC gebildet wurden, während mit der sehr hohen Dosis die APAP-GLC Produktion die von APAP-SUL überschritt. Das Verhältnis der gebildeten Hauptmetaboliten scheint damit von der Dosis und möglicherweise auch vom verwendeten Mausstamm abhängig zu sein (Sezgin 2018).

Für APAP-GSH konnten zwar bei adäquater Auswahl der Minimal- und Maximalintensitäten abundante Signalcluster in den pericentralen Bereichen visualisiert werden. Die Semiquantifizierung offenbarte allerdings nur zum Zeitpunkt 120 min eine signifikante Differenzierung der APAP-GSH Signale entlang der Zone, worin die Bildung von NAPQI durch enzymatische Reaktion mit den CYP stattfindet. Die Verteilung von GSH zugunsten von periportalen Bereichen war hingegen beginnend ab 30 min nach der APAP Injektion deutlicher zu erkennen und konnte zudem semiquantitativ aufgezeigt werden. Die Verteilung von APAP-GSH lässt indirekte Schlüsse auf die tatsächliche Verteilung des intermediär entstehenden toxischen NAPQI zu, kann aber aufgrund möglicher Redistributionseffekte zwischen den Hepatozyten und seines Eintrags in die Galle (Sieggers 1983, Gregus 1988, Chen 2003) die Distribution des NAPQIs nicht spiegelbildlich wiedergeben.

Der Zeitpunkt 120 min markierte einen Moment, in der ein Phänomen mit entscheidender Relevanz für die Hepatotoxizität auftrat: Es konnte ein deutlicher Influx von Gallensäuren stellvertretend durch TCS und TCDS (und möglichen Isomeren) in die pericentrale Bereiche beobachtet werden. Dieses sekundäre Event resultierend aus anfänglichen Toxizitätseffekten von NAPQI an den basalen Membranen der Hepatozyten, den Veränderungen des Membranpotenzials und anschließender Ruptur der apikalen Membran, wurde als das eigentliche ausschlaggebende Ereignis für den Verlust der Lebens- und damit Regenerierfähigkeit der Zellen diskutiert (Perez 2009, Li 2011). Die leistungsfähige HR-MALDI-MSI bot hiermit eine Möglichkeit den Eintrag der Taurocholate in die pericentrale Zone direkt ohne den Einsatz von Markern zu tracken, wie sie zum Beispiel im Live Imaging Verfahren mit einem Multiphotonenmikroskop zum Einsatz kam (Li 2011).

Über die Galle folgte zum Zeitpunkt 120 min vermutlich auch ein deutlicher Influx von APAP-GSH in die pericentralen Bereiche. Die signifikante zonale Differenzierung dürfte vor allem auf dieses Ereignis zurückzuführen sein. Durch den Eintrag von APAP-GSH und sein Transport in die Zentralvenen konnte ein starker Anstieg der APAP-GSH Blut-Konzentration in der hepatischen Vene registriert werden.

Überhaupt zeigten die APAP-GSH Konzentrationen im Blut eine höhere Tendenz bezüglich der hepatischen Vene, was ein Hinweis darauf ist, dass APAP-GSH in der Leber synthetisiert und innerhalb der Leberlobule über die Sinusoide ins Blut übergeht. Eine weitere Beobachtung war, dass APAP-GSH bereits nach 5 min nach der APAP Injektion gebildet wird und seine Konzentration im Lebergewebe bis 30 min um das ca. 6-fache zunimmt, wenn die Durchschnittssignalintensitäten berücksichtigt werden. Damit einhergehend gibt es einen starken Einbruch der GSH Reserven zu diesem Zeitpunkt vor allem in den pericentralen Zonen.

APAP und seine Biotransformationsprodukte wurden zum Zeitpunkt 240 min nahezu vollständig von der Leber eliminiert.

Die ermittelten Ergebnisse für APAP-GSH und GSH stehen teilweise im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Konzepten der CYP Metabolisierung von APAP-GSH und seiner lokal erfolgenden Entgiftung mit GSH in denselben Zellen, worin es gebildet wurde und dass computermodellerte pericentral auftretende Schädigungsmuster auf die Einwirkung von aktiviertem APAP zurückgeführt werden können (Smith 2016, Ramachandran 2017). Allerdings sind die Beschreibungen und Prädiktionen für die Metabolisierung und Eliminierung von Xenobiotika in diesen Konzepten, die die pericentral induzierte Toxizität untersuchen, zu erweitern, da sie von streng auf die pericentralen Zonen begrenzten Effekten ausgehen. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die GSH Abnahme zwar schwerpunktmäßig, aber nicht ausschließlich in der pericentralen Zone erfolgte, sondern auch weiträumig in den periportal Zonen. In der Literatur wird dazu ein Vorgang beschrieben, der von einem kombinierten Ansatz aus Experimentaldaten und Computermodellierung aufzeigen konnte, dass die Hepatotoxizität von APAP sich nicht ausschließlich auf die pericentrale Zone auswirkt, sondern auch zu einer Kompromittierung der Stoffwechselaktivität in den Hepatozyten der periportal Zonen führt (Schenk 2017).

Für die metabolische Aktivität innerhalb eines Leberlobuls wird zudem noch eine mittlere Zone (MZ) aus Hepatozyten zwischen periportal und pericentraler Zone beschrieben, wobei sie häufig noch zur Peripherie der pericentralen Zone dazugezählt wird. Diese mittlere Zone soll Besonderheiten aufweisen. Unter anderem wurde für diese Zone ein höherer Abbau an Glutathion postuliert; der Glutathionabbau soll in Richtung der Zentralvene abnehmen, wie auch die Fähigkeit der Hepatozyten mitochondriale Schäden zu reparieren (Smith 2016). In den Resultaten dieser Arbeit konnte eine Differenzierung des Glutathionabbaus zwischen einer mittleren und der pericentralen Zone nicht festgestellt werden (Sezgin 2018).

Es wäre interessant zu erfahren, wie die Verläufe der in Kapitel 2 erwähnten zusätzlichen Targets (z.B. einige NAPQI-Derivate oder Glutamin), die auf den Positivkontrollen detektiert wurden, im kinetischen und dosisabhängigen Experiment aussehen würden.

4.3 Beurteilung der angewandten MALDI-MSI Methode

Die in dieser Arbeit entwickelte HR-MALDI-MSI Methode ermöglichte die Durchführung von robusten Messkampagnen (Screenings) von mehreren seriell geschnittenen Leberproben von mit APAP behandelten Versuchstieren in einem kinetischen und dosisabhängigen Experiment über mehrere Wochen unter Verwendung der relativ hohen Sensitivität und Spezifität bezüglich einer Vielzahl von Analyten. Durch adäquate Auswahl der Matrix-Lösungsmittelsysteme, mit denen die Leberproben besprüht wurden, konnten Signalinterferenzen für die betrachteten xenobiotischen Verbindungen ausgeschlossen werden. Dadurch konnten die unteren Signalgrenzen auf sehr geringe Werte eingestellt und somit so viele über dem LOD liegende Signale wie möglich erfasst und quantifiziert werden.

Durch das Fehlen der chromatographischen Dimension und von Informationen über Mikrostrukturen im gemessenen Gewebeschnitt ist der Informationsgehalt, der aus einem alleinstehenden MALDI-Experiment geschöpft werden kann, limitiert. Es war von daher ratsam MALDI-Daten mit Informationen aus anderen Analyseverfahren (orthogonalen Techniken) zu kombinieren. In dieser Arbeit lieferten die histochemischen H & E und CYP2E1 Färbeverfahren, Informationen über

Mikrostrukturen (Transportkanäle, metabolische Zonen, etc.) und über von der Hepatotoxizität affizierten apoptotisch-nekrotischen Bereiche im Lebergewebe.

Mikroskopische Aufnahmen der CYP2E1 gefärbten Schnitte dienten zudem als „Untergrund“ zur Zuordnung der Ionendichtebilder aus dem MALDI Experiment. Diese robuste immunhistochemische Technik identifizierte die Lokalisation des in der pericentralen Zone befindlichen Enzyms, der für die APAP Aktivierung eine Rolle spielt. Quantitative Daten zur Konzentration der Analyten aus den HPLC-MS Messungen vom Blut, welches von Portal- und hepatischen Vene und aus der rechten Herzkammer, halfen dabei die Metabolisierung und Zirkulation der Substanzen im Blut zu verstehen und mit den Daten, die von den Gewebeoberflächen gewonnen wurden, zu korrelieren.

Das verwendete MALDI-Interface imagine10™ von der TransMIT GmbH (Gießen, Deutschland) erlaubt die Fokussierung des Laserstrahls auf bis zu 5 µm auf der Probenoberfläche. Bei Messungen mit diesen hohen Pixelauflösungen müssen deutlich geringere Signalausbeuten in Kauf genommen werden. In der Praxis konnte diese hohe Auflösung in der Regel nur für native bereits in hohen Konzentrationen im Gewebe enthaltene und unter MALDI-Bedingungen gut ionisierende Substanzen realisiert werden (Sezgin 2014, Roempp 2013). Die Voruntersuchungen mit Leberproben von 30 min nach APAP Injektion bekräftigte diese vormals gemachten Beobachtungen: Während keines der xenobiotischen Substanzen detektiert werden konnte, konnte die Taurocholsäure relativ gut lokalisiert werden. Die Wahl fiel schließlich auf eine Pixelauflösung von ca. 20 µm. Theoretisch lassen sich mit dieser Auflösung ca. 15 Pixel in der Durchmesserachse von einem Leberlobul platzieren, da der Durchmesser eines Leberlobuls mit ca. 300 µm angegeben wird (Hoehme 2010). Mit der gewählten Auflösung sollte die Zuordnung der Analyten bezüglich der metabolischen Zonen (PP gegenüber der MZ und PC) ohne Probleme möglich sein.

Dies gilt im Prinzip auch für die Differenzierung der MZ, in der ein höherer GSH Abbau postuliert wurde (Smith 2016), von der PC, wenn der Durchmesser dieser Zone mind. einen Hepatozytendurchmesser, also ≥ 20 µm beträgt. Die Detektion kleinerer Mikrostrukturen (z.B. Gallencanaliculi) ist mit der gewählten Auflösung hingegen problematisch (Sezgin 2018).

Durch die Verwendung von seriellen Schnitten in Abständen zwischen 3 – 5 µm und der manuellen Superposition des Ionendichtebildes mit dem optischen CYP2E1 Bild kann es zu geringfügigen Ungenauigkeiten und inadäquaten Versetzungen der Pixel kommen.

Bei der Festlegung der „Regions of interest“ wurden die Zonen rein visuell und per Hand anhand der negativ oder positiv gefärbten Bereiche im CYP2E1 Bild ausgewählt. Daher können hier ebenso geringfügige Verfälschungen in die Berechnungen der Durchschnittssignalintensitäten zur zonengebundenen Differenzierung der Signale mit eingegangen sein.

Obwohl bei den gewählten niedrigen Schnittdicken und bei der Betrachtung des Oberflächenprofils eines Leberschnitts nur sehr geringe topographische Unterschiede (< 5 µm) festgestellt werden konnten, so können geringwertig topographiebedingte Einflüsse auf die Signalintensitäten nicht ausgeschlossen werden, insbesondere wenn absolute und nicht auf den TIC korrigierte Intensitäten betrachtet werden. Bei den Semiquantifizierungen zur Ermittlung der zonalen Differenzierungen wurde auf TIC normierte Intensitäten zurückgegriffen. Mittlerweile existiert ein leistungsfähigerer Nachfolger der in dieser Arbeit verwendeten MALDI- Quelle, der über ein Triangulationsverfahren mit einem zweiten Laser im niedrigen Mikrometerbereich imstande ist den Laserspot vom Laserstrahlengang, der zur Desorption führen soll, durch Autofokussierung an die dreidimensionale Topographie der Probenoberfläche anzupassen und damit das Erscheinen topographiebedingter Artefakte im Ionendichtebild signifikant zu verringern (Kompauer 2017).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die verwendete MALDI-MS Ionenquelle als auch die entwickelte Methodik zur (a) Visualisierung der Verteilungen auf dem Gewebe und (b) Semiquantifizierung der zonalen Distribution als eine eher forschungslastige sowie zeitaufwändige Methode zu beurteilen ist, um routinemäßig in der klinischen Diagnostik für z.B. bioptische humane Leberproben bzw. intraoperative Diagnosen eingesetzt werden zu können. Dabei wäre so ein routinemäßiger Einsatz in der Klinik nicht uninteressant, um mit hoher Richtigkeit und Genauigkeit über die Masseninformation der relevanten Verbindungen und ihre Distribution einordnen zu können, inwieweit Toxizitätsphänomene in der Leber fortgeschritten sind, mögliche Gegenmaßnahmen gewirkt haben und/oder die Regeneration der Leber erfolgt ist. Das

wäre sowohl zur Aufklärung akuter pathologischer Phänomene wie auch für über einen Zeitraum auftretende krankhafte Veränderungen der Leber interessant; zu nennen sind da etwa cholestatische Phänomene. Beispielsweise kam die HR-MALDI-MSI Methode auch in einer Arbeit, die die Mechanismen einer akuten Cholestase untersuchte, als unterstützende Technik zum Einsatz. Wobei die Methodik auch in diesem Fall auf Forschungszwecke ausgerichtet war (Ghallab 2018).

Dabei gäbe es verschiedene Optionen und Ansätze zur Aufwertung der Methodik zu einem Medium- bzw. High-Throughput-Verfahren. Im Wesentlichen müssten dazu die Geschwindigkeiten der Mess-, Prozessier- und Auswerteschritte signifikant erhöht werden.

Zur Erhöhung der Messgeschwindigkeiten werden mittlerweile MALDI-Quellen mit höher gepulsten Lasern um die 10 kHz verwendet. Die rapifleX™ MALDI Tissue typer™ von der Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland) ist hier als prominentes Beispiel zu nennen. Im Vergleich zu früheren TOF-Plattformen konnten die Messgeschwindigkeiten um den Faktor 10 – 20 erhöht werden, was die Etablierung von sehr schnellen MALDI-Workflows inklusive der Probenpräparation, Messung und Datenanalyse unter 5 min ermöglichte und damit interessant für intraoperative Diagnosen sein könnte (Basu 2019).

Bei dem Einsatz von TOF Systemen ist allerdings zu berücksichtigen, dass Massenauflösungen im Bereich $< m/z$ 500 Da und i. d. R. auch Massengenauigkeiten verglichen zu Systemen, die auf den FT-ICR- oder Orbitrap-Technologien beruhen, benachteiligt sind und damit die Methodenentwicklung durch schwer filterbare Interferenzen erschwert werden könnte.

Der wesentliche geschwindigkeitsbestimmende Schritt der in dieser Arbeit etablierten Methode waren die Datenprozessierung und -auswertung resultierend aus den Prozessierungen der Computer und den manuellen Operationen, die sich über mehrere Monate hinzogen und als sehr aufwändig wahrgenommen wurden. Darunter fallen die Extraktion der Pixel mit Masseninformationen der Analyten aus dem TIC in der ImageQuest Software, die manuelle Superposition der Ionendichtebilder mit den optischen CYP2E1 Bildern, die Konvertierung der Orbitrap Q-Exactive MALDI-Daten zum *imzML* Dateiformat und ihr Import in die MSIReader Software, und insbesondere

die manuelle Auswahl der periportalen und pericentralen Zonen auf jedem der gemessenen Schnitte und die finalen basisstatischen Analysen.

Der langsamen Prozessierleistung des Computers wurde durch Aufrüstung seines Arbeits- und Graphikspeichers entgegengewirkt. Es ist selbsterklärend, dass für größere Medium- oder High-Throughput-Kampagnen mit mehreren Proben und großen Scanarealen auf den Probenoberflächen Hochleistungsrechner mit hoher Prozessorleistung und großem Arbeits- und Graphikspeicher zum Einsatz kommen sollten.

Progressive Imaging Software können bei der Vereinfachung und Beschleunigung der Verfahrensschritte behilflich sein. So kann die Superpositionierung der histochemischen Bilder und der MALDI-Daten direkt in der MALDIVision Software erfolgen statt des Umwegs über Bildbearbeitungsprogramme wie Powerpoint. Zumal ImageQuest kein zufriedenstellendes Tool zur Auswahl von ROI anbot, musste zusätzlich mit der MSIReader Software gearbeitet werden, die eine Freihand-Selektion der ROI ermöglichte. Das SCILS Lab Imaging Programm befähigt den Nutzer zur Zuordnung von Segmenten auf dem gemessenen Gewebe basierend auf ermittelten Signalclustern von verschiedenen m/z , die gruppiert werden können. Ausgehend von dieser Operation ist die Software in der Lage, weitere m/z ausfindig zu machen, die gleiche oder ähnliche Verteilungspattern aufweisen. Denkbar in diesem Zusammenhang ist zudem, dass in Zukunft die Integration fortschrittlicher Algorithmen, Imaging Programme in die Lage versetzen könnten die ROI Auswahl anhand der mikrostrukturellen Unterschiede oder wie in diesem Fall über unterschiedlich gefärbte Bereiche automatisch durchführen zu können. Dieser Vorgang könnte den Workflow immens beschleunigen. Während Image Quest und MSIReader zum Zeitpunkt der Versuche die Auswertung mit nur einer Probe in einem Messfenster erlaubte, können bei SCILS Lab mehrere Proben gleichzeitig visualisiert und insbesondere auch simultan und gleichmäßig bezüglich der Signalintensitätsbereiche skaliert werden, was den Vergleich deutlich erleichtert und ebenso zu einer deutlichen Zeitersparnis in den Auswertungen führt. Die SCILS Lab Software wurde zunächst ausschließlich zur Auswertung von mit Bruker Software kompatiblen MALDI-Dateiformaten konzipiert. Die Erweiterung für open imzML Formate folgte erst später mit der Version SCiLS Lab MVS Ende April 2018. Eine Demoversion stand danach zur Verfügung; derweil waren allerdings die Analysen zu den MALDI-Daten mit ImageQuest/MSIReader größtenteils

abgeschlossen. MALDI Imaging Software werden stetig weiterentwickelt und es ist in diesem Feld mit weiteren Verbesserungen und Erweiterungen mit hilfreichen Auswertetools zu rechnen. Zur Vereinfachung der Arbeiten ist der Erwerb und die Nutzung leistungsfähiger Imaging Software bei komplizierten Fragestellungen im Feld der bildgebenden MALDI-Massenspektrometrie vorteilhaft.

Der wesentliche Grund, dass in dieser Arbeit auf vollquantitative Verfahren zur Ermittlung (absoluter) Konzentrationen der Analyten vom Gewebe verzichtet worden ist, lag an der relativ großen Probenmenge für die Messkampagnen (kinetisches und dosisabhängiges Experiment). Quantitative Verfahren hätten das Screening deutlich in die Länge gezogen. Trotz *interweek* Kalibrierungen des Massenspektrometers und Übernahme und Beibehaltung der anfänglich eingestellten Messparameter kann es elektronisch bedingt und aufgrund ständig manuell neu justierter Laserspotbreiten zu Änderungen bezüglich der Responsefaktoren der Analyten kommen. Neue Kalibrierreihen auf Negativkontrollgeweben müssten deshalb fortlaufend zum Abgleich (Referenz) gemessen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die eigenen Fragestellungen auf ein einfaches relatives Semi-Quantifizierkonzept für komparative Analysen zwischen den Proben und Segmenten innerhalb der Proben zurückgegriffen (Sezgin 2018).

5. Experimentelles

5.1 Vorversuche und Optimierungen

5.1.1 Extraktion der Leberproben für die Vorversuche

Drei linke Leberlappenstücke von drei Mäusen (jeweils Kontrolle und nach 30 min APAP Injektion) wurden zu insgesamt 100 mg in gefrorenem Zustand in 15 mL Plastik Falcon™ Behältern eingewogen. Die Leberstücke waren zuvor zwei Wochen lang im -80 °C Kühlschrank gelagert worden. Nach der Einwaage wurden die Glasbehälter in ein Eisbad überführt und 500 mL eiskalte 0.2 M Saccharose-Lösung (in bidestilliertem Wasser hergestellt) zu den Leberstücken hinzugegeben. Anschließend wurden die Leberstücke mit einem feinen Pistill zerrieben. Das Pistill wurde mit 2 x 250 µL der Saccharose Lösung gewaschen und das Waschwasser in den Behältern mit dem Leberhomogenat aufgefangen. Zusätzlich wurde das Pistill mit 1 mL Methanol gewaschen und das Waschmethanol aufgefangen. Die Glasbehälter wurden für 10 min im Ultraschallbad gehalten, wobei das Badwasser im Ultraschallbad mit Eis nahe 0 °C gehalten wurde. Nach der Zentrifugation in einer Zentrifuge Avanti J-26X von Beckmann Coulter (Brea, CA, USA) mit 35000 rpm für 10 min bei 1 °C Kühlung wurde der Überstand abgenommen und in 12 mL Glasbehälter überführt. Anschließend wurde das Lösungsmittel in einem Vakuumkonzentrator Savant SPD1010 von Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland), eingeengt. Die Aufnahme erfolgte in 500 µL Methanol (HPLC grade), wobei der Behälter anschließend wieder im Ultraschallbad mit den oben gegebenen Bedingungen für 5 min gehalten wurde. Die Lösung wurde in eine HPLC Kurzgewindeflasche überführt und anschließend erfolgte ein finaler Zentrifugationsschritt mit der Minizentrifuge MCF-2360 von LMS (Tokyo, Japan) für 15 min. Ein Aliquot vom Überstand (50 µL) wurde in eine andere Kurzgewindeflasche mit einem Insert überführt. Schließlich konnte die Analyse des Extrakts mit der HPLC-MS erfolgen.

5.1.2 Ansetzen der PBS-Lösung

Die PBS-Lösung wurde angesetzt, indem 1 L bidestilliertem Wasser in einem Glaskolben, 8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat, 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat zugesetzt wurden.

Der Kolben wurde verschlossen und geschüttelt, um die darin enthaltenen Salze lösen. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert (Sambrook 2001).

5.1.3 Erklärung zu den Abweichungen in den Retentionszeiten der untersuchten Analyten in Kapitel 2

Die chromatographische Methodenentwicklung wurde erst für das kinetische und dosisabhängige Experiment auf der Basis einer HILIC Methode abgeschlossen. In Voruntersuchungen in Kapitel 2 wurde (a) an unterschiedlichen HPLC Instrumenten gemessen, wurden (b) die chromatographischen Gradienten fortlaufend optimiert und (c) standen die qualitativen Analysen zunächst noch im Vordergrund, in der die Verbindungen durch ihre m/z mit Massengenauigkeiten von ± 2 ppm und optional noch über die Retentionszeiten von kommerziellen Referenzstandards – sofern diese verfügbar waren - zugeordnet wurden. In den HPLC-MS Vorversuchen wurde als chromatographische Phase die Luna® 3 μm C18(2) 100 Å, 50 x 4.6 mm Chromatographiesäule von Phenomenex (Torrance, CA, USA) verwendet. Als Eluenten wurden bidestilliertes Wasser mit 10 mM Ammoniumacetatzusatz (A) und HPLC grade Methanol (B) eingesetzt.

5.1.4 On-Tissue Derivatisierungsversuch durch Applikation von Natriumsulfid via Sprayverfahren

Unmittelbar nachdem die Schnitte für Leberproben von APAP negativen und positiven Mäusen erzeugt wurden, wurden sie im Stickstoffgasstrom in der SMALDIPrep Anlage von der TransMIT GmbH (Gießen, Deutschland) besprüht (Sprayparameter: 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ Probenfluss, 4 L min^{-1} Gasfluss, 300 rpm Drehgeschwindigkeit der Probenplattform bei 20 min Spraydauer). Eine gelbliche Verfärbung der Gewebe konnte nach diesem Sprühgang beobachtet werden. Anschließend erfolgte die Matrix Applikation von HCCA [7 mg mL^{-1} in $\text{AcN:H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) + 0,2 % TFS] für 20 min mit 22 $\mu\text{L min}^{-1}$ Matrixfluss, 4 L min^{-1} Gasfluss und 300 rpm Drehgeschwindigkeit der Probenplattform.

5.2 Präparation der Versuchstiere und Verabreichung von APAP

Die APAP Zugabe an Labormäuse und Kollektion der Leberproben wurden von unseren Kooperationspartnern am Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund durchgeführt. Für den Versuch wurden 8 – 10 Wochen alte C57BL6/N Mäuse von der Fa. Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) beordert. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser und Mäusefutter von Ssniff R/M-H (10 mm Std diet) von der Firma Ssniff (Soest, Deutschland). Die Genehmigung für die Versuche wurde von der lokalen zuständigen Behörde für Tierschutz erteilt. Vor der APAP Injektion wurden die Tiere über Nacht nüchtern gehalten. Danach folgten anhand dem Versuchsschema Spritzeninjektionen von APAP (mit den Dosen 56, 167, 300 und 500 mg kg⁻¹) in die Bauchhöhle der Tiere. Das applizierte Volumen belief sich auf 20 mL kg⁻¹. APAP wurde in Phosphat-gepufferter Salzlösung gelöst. Wie in der Ergebnissektion angegeben wird, wurden Leber von 3 – 4 Mäusen pro Zeitpunkt bzw. Dosis beprobt. Blut- und Leberproben wurden von anästhetisierten Tieren entnommen. Das Blut wurde von 3 Positionen beprobt: von der Pfortader (Blutstrom zur Leber), von der hepatischen Vene (Blutabgang von der Leber Richtung Herz) und von der rechten Herzkammer (systemische Zirkulation des Blutes). Weitere Informationen zur Methode über die Blutentnahme lassen sich in der Literatur finden (Ghallab 2016). Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Blutproben bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Bei den Leberproben wurden die linken Leberlappen von den übrigen Lappen isoliert und in zwei in etwa gleich große Stücke von 1 – 1,5 cm aufgeteilt. Die einen Stücke wurden in 4% PFA für 2 Tage fixiert, in Paraffin eingebettet und mit 5 µm Dicken geschnitten. Diese Schnitte wurden zur Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) verwendet. Das zweite Stück für das MALDI Imaging und für die CYP2E1 immunhistochemische Färbung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Bearbeitung ebenso bei -80 °C gelagert (Sezgin 2018) (s. auch Abbildung 47).

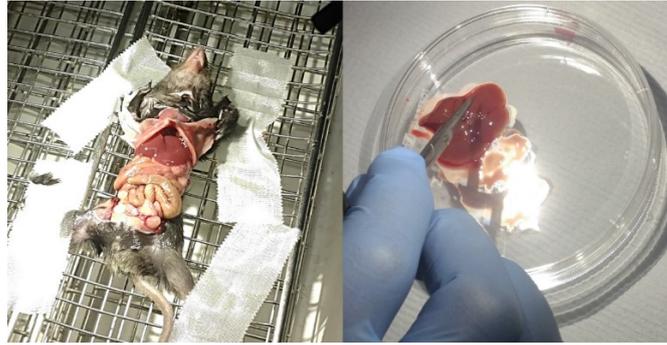


Abbildung 47: Sezierung der Versuchsmäuse und Isolation der Leberproben

5.3 Mikroskopie

Die Mikroskopierung erfolgte für die histochemisch gefärbten Proben, für die ungefärbten und unbesprühten Leberschnittproben, die für MALDI-MSI Versuche präpariert wurden, für Matrix besprühte Proben und für Matrix besprühte und bereits über MALDI-MSI gemessene Proben. Die CYP2E1 Aufnahmen wurden zur Superpositionierung mit den Ionendichtebildern und zur Erkennung von morphologischen und mikrostrukturellen Merkmalen auf dem Gewebe verwendet. Die Aufnahmen des unbesprühten sowie auch des danach Matrix beprühten Schnitts diente zur Qualitätskontrolle, wobei darauf geachtet wurde, dass sich auf dem Gewebe keine Makrotröpfchen beim Trocknen gebildet hatten, eine homogene Matrixschicht beprüht und keine Brüche oder ein Aufrollen der Probe beobachtet wurde. Die nach der Messung aufgenommenen Aufnahmen dienten ebenso der Qualitätskontrolle, um sicherzustellen, dass es im elektrischen Feld nicht zum Aufrichtung oder zur Versetzung der Probe gekommen ist, dass die eingestellten Laserspotbreiten stimmten und der gewünschte Messbereich auch tatsächlich gemessen wurde. Bei Schwierigkeiten mit der Superpositionierung des CYP2E1 Bilds mit dem Ionendichtebild konnte diese Aufnahme als zusätzliche Hilfe herangezogen, indem zunächst das gemessene Bild mit dem CYP2E1 Bild korreliert und danach das Ionendichtebild superpositioniert wurde. Der abgerasterte Messbereich konnte bei Laserspotbreiten um die 20 μm im Mikroskopbild relativ gut erkannt werden (s. Abbildung 48, rechts).

Zum Beginn des APAP Projekts wurde ein älteres Lichtmikroskop Leica S8AP0 von Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland) mit geringer lateraler Schärfe und

niedriger Tiefenschärfe verwendet. Bei der Aufnahme mit höheren Zoomfaktoren (ab 4x) von einem typischen Messbereich der Leberschnittoberfläche im MALDI-MSI Experiment, mussten die Einzelaufnahmen mit großem Aufwand manuell in einem Bildbearbeitungsprogramm gestitcht werden.

Das Upgrade zum VHX-5000 Digitalmikroskop von Keyence (Osaka, Deutschland) übernahm das automatische Stitching der Einzelaufnahmen. Die Einzelaufnahmen mit hohen Zoomfaktoren (500x – 1000x) erfolgten zudem durch automatische Abrasterung eines vorgegebenen Bereichs auf der Probenoberfläche. Jede Aufnahme wurde über die automatisierte Tiefenschärfteeinstellung des Mikroskops geschärft (3D-Raster-Scan). Das Mikroskop war zudem in der Lage, das topographische Profil der Probe zu bestimmen. So konnte für die mit Schnittdicken von 3 – 5 µm geschnittenen Leberproben ein relativ gleichmäßiges Oberflächenprofil $\pm 2\text{-}3\ \mu\text{m}$ festgestellt werden (s. Abbildung 48, Mitte).

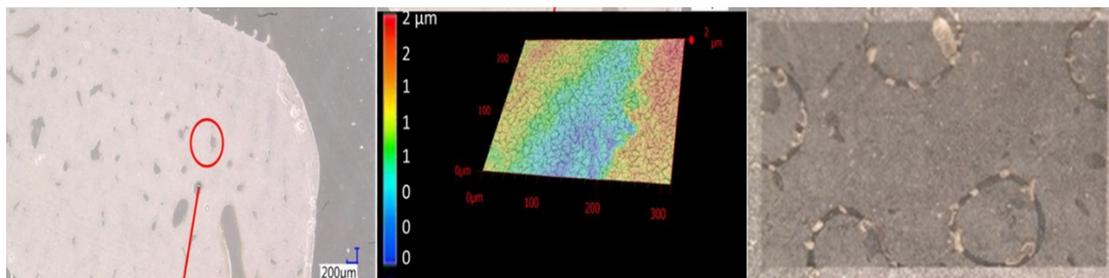


Abbildung 48: Unbearbeitete Leberschnittoberfläche, topographisches Profil des rot markierten Bereiches und ein repräsentatives Bild einer matrixgesprühten und mit 20 µm spatialer Scanauflösung gemessenen Leberschnittprobe

5.4 MALDI-MSI

5.4.1 Einstellungen der quellenspezifischen und massenspektrometrischen Parameter für MALDI-MSI Versuche

Bildgebende MALDI-MS und -MS/MS Messungen wurden mit der MALDI-Quelle imagine10TM von der TransMIT GmbH (Gießen, Deutschland) realisiert. Das Interface ist eine unter ambienten Bedingungen und atmosphärischem Druck arbeitende Ionenquelle; die MS-Kopplung besteht dabei zu einem hybriden Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer Q ExactiveTM von Thermo Fisher Scientific (Bremen,

Deutschland). Zur Desorption von Matrixclustern wird ein Stickstofflaser (Laserwellenlänge: 337,1 nm) verwendet. Der Laser arbeitet während der Messung hochgepulst (2-5 ns) mit einer Pulsfrequenz von 60 Hz und einer Pulsdauer von 500 ms. Folgende optimierte quellenspezifische wie massenspektrometrische Parameter wurden zur Ausführung der bildgebenden Versuche gewählt: Der optische Dämpfer in der MALDI-Quelle wurde auf 20° gesetzt. Im Full Scan Modus wurde in einem Massenbereich von m/z 100 – 800 gemessen und dabei die Massenauflösung auf 140,000 gesetzt @ m/z 200 eingestellt. Die Scanrate entsprach damit einem Wert von ca. 1 Hz. Die Beschleunigungsspannung wurde im positiven Modus auf 2 und im negativen Modus auf 3 kV gesetzt, während die Ionen-Transferkapillare auf 250 °C geheizt wurde. Der S-Lens Level des Massenspektrometers wurde auf 65 optimiert. Die maximale Ioninjektionszeit wurde auf 300 ms gesetzt. APAP-GSH und TCA wurden im bildgebenden Experiment im MS/MS Modus mit der Higher-Energy Collisional Dissociation (HCD) Technik fragmentiert. Dabei wurde für APAP-GSH der Massenbereich auf m/z 100 – 500 und eine Kollisionsenergie von 30 eV und für TCA m/z 50 – 550 und 70 eV eingestellt. Die Kalibrierung des Massenspektrometers wurde wöchentlich überprüft und bei Bedarf die spektrale Kalibrierung mit dem MSCAL4-Peptidmix ausgeführt. Während der bildgebenden Experimente wurde zudem eine interne Kalibrierung eingeschaltet: Im positiven Modus wurde das $[M+K]^+$ Ion von HCCA (m/z 228.00575) und im negativen Modus das deprotonierte $[M-H]^-$ Ion von MBT (m/z 165.97906) verwendet (Sezgin 2018).

5.4.2 Auswertung der MALDI-MSI Daten

Ionendichtebilder, die mit der ImageQuest Software von Thermo Scientific (v. 1.1.0.54) (Bremen, Deutschland) generiert worden sind, wurden mit den Mikroskopbildern der CYP2E1 immunhistochemisch gefärbten seriell geschnittenen Leberschnittproben superpositioniert und dargestellt. Die Superpositionierung erfolgte mithilfe der Power Point 2016 Software von Microsoft Corporation (Redmont, WA, USA). Zuvor wurde der Signalintensitätsbereich (Signalskalierung) in der ImageQuest Software den Anforderungen entsprechend manipuliert. Die Begrifflichkeit „Semiquantifizierung“ wurde fortlaufend in der Arbeit für basisstatistische Analysen der MALDI-Signale verwendet, zumal das Resultat der Analysen keine absoluten Konzentrationen der

Analyten geliefert haben, sondern willkürliche Signalintensitätseinheiten [AU], die für Vergleiche zwischen den Messpunkten und periportalen und pericentralen Zonen innerhalb des Lebergewebes ausreichend waren. Um die basisstatischen Analysen ausführen zu können, wurden die im raw. Format (Thermo Scientific) befindlichen MALDI-MSI Rohdaten mit dem raw converter der ImageQuest Software zum imzML Dateiformat konvertiert. Für den Konvertierungsvorgang wurden folgende Parameter eingestellt: Die m/z Präzision und Intensitätspräzision wurden auf 32 bit eingestellt. Es wurde Centroid Data konvertiert. ImzML Formate wurden weiter mit der MSIReader Software (v. 0.09) (Robichaud 2013) geöffnet und prozessiert. Um topographiebedingte Fehler zu verringern wurden die Ionendichtebilder auf den TIC normiert. Die Signalextraktion erfolgte in einem Toleranzfenster von ± 10 ppm. Das CYP2E1 Bild ließ sich direkt als Hintergrund (.jpeg Format) importieren und manuell an das Ionendichtebild anpassen. Die Transparenzeinstellungen für Ionendichtebild bzw. CYP2E1 Bild konnten frei gewählt werden. Zunächst wurden die Durchschnittssignalintensitäten im gesamten Messareal bestimmt. Zumal auf den TIC normiert wurde, ergaben sich Werte deutlich unter 0. Daher wurden alle Durchschnittsintensitäten mit einem willkürlichen Faktor $1E5$ multipliziert. Die Darstellung der Intensitätswerte erfolgte für jeden Datenpunkt über Boxplots.

Danach erfolgte die aufwändige manuelle Selektion der ROI bezüglich der pericentralen und periportal Zonen anhand CYP2E1 positiv und negativ gefärbter Bereiche, für die ebenso separat Durchschnittssignalintensitäten berechnet wurden. Diese Intensitäten von $n = 3-4$ Messungen wurden schlussendlich noch einmal für jeden Zeitpunkt (0, 5, 15, 30, 60, 120, 240 und 480 min) gemittelt. Die Werte wurden danach prozentual zueinander in Bezug gesetzt, wobei die Summe der Durchschnittssignalintensitäten beider Zonen für jeden einzelnen Zeitpunkt als 100 % gesetzt wurde. Die anteilige Partitionierung des Signals bezüglich PP und PC wurde in Balkendiagrammen dargestellt.

5.5 HPLC-MS Experimente

5.5.1 Präparation der Blutplasmaextrakte

Die Plasmaproben, die wie im Kapitel 5.2 beschrieben aus den Blutproben isoliert wurden, wurden nach dem in der Abbildung 49 angegebenen Workflow extrahiert.

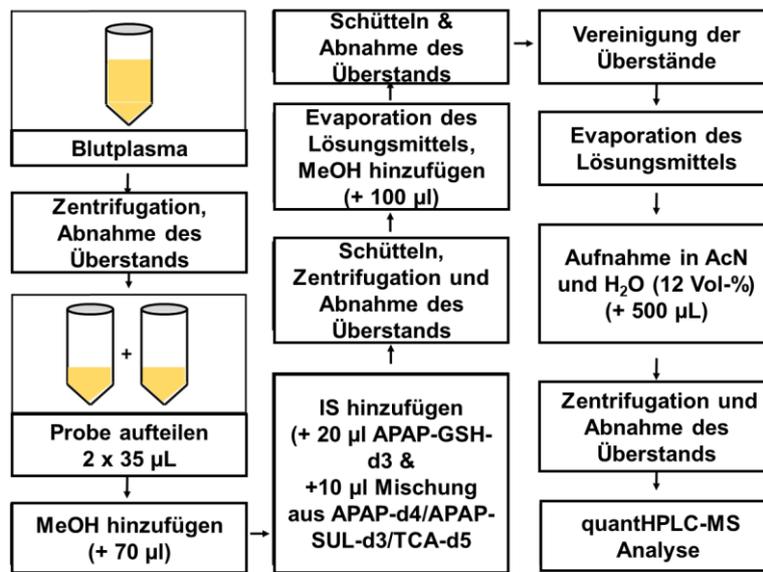


Abbildung 49: Experimentelle Anleitung zur Extraktion der Plasma-Proben (Sezgin 2018)

Die Plasmaproben wurden für 15 min bei 10000 rpm in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben hinsichtlich entstandener Niederschläge begutachtet. Von den Proben, bei denen sich ein Niederschlag gebildet hat, wurde der Überstand abgenommen; die anderen Plasmaproben so belassen. Aus den Plasmaproben wurden zwei Aliquote à 35 µL in neue 1,5 mL Eppendorf Plastik Safe-Lock Gefäße überführt (Quantifizierung von Duplikaten). Danach wurden alle Plasmaproben mit 70 µL MeOH, 20 µL aus der APAP-GSH-d3 und 10 µL aus der APAP-d4/APAP-SUL-d3 Arbeitslösung behandelt. Es folgten anschließend das Durchmischen der Proben mit einem Vortexmischer für 1 min und die Zentrifugation mit den oben angegebenen Bedingungen. Der Überstand wurde daraufhin abgenommen und es wurde zu dem verbleibenden Niederschlag 100 µL MeOH zur Waschung der Probe hinzugefügt und nach der 1-minütigen Behandlung im Vortexmischer der Überstand wieder abgenommen. Die isolierten Überstände einer

jeden Probe wurden miteinander in 1,5 mL Glas-Schraubdeckelgefäßen vereinigt. Die Gefäße wurden in einen Vakuumkonzentrator mit einem RH40-12 Rotor bestückten Savant SPD1010 von Thermo Fisher Scientific in Waltham, MA, USA überführt, und das Lösungsmittel aus den Proben nach 1 h bei 5.1 mbar eingestelltem Unterdruck und Raumtemperatur entfernt. Die Rückstände wurden in einer Mischung aus AcN:H₂O (88:12, v/v) aufgenommen. Es folgte die finale Zentrifugation der Proben in einer Minizentrifuge MCF-2360 von LMS (Tokyo, Japan) für 15 min. Der letzte Schritt war der Transfer der resultierenden Überstände in neue 1,5 mL Glasgefäße. Die Konzentration der Analyten konnte sodann in den Plasmaextrakten via HPLC-MS analysiert werden (Sezgin 2018).

5.5.2 Einstellung der spezifischen Parameter für die HPLC-MS Versuche

Die Messausrüstung bestand aus einem Agilent 1200 Series HPLC System von Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Diese setzte sich aus einer binären Pumpe (Agilent-G1312), einem Entgaser (Agilent-G1379), Autosampler (G1367-HIP-ALS) und einem Säulenofen (Agilent-G1316 TCC) zusammen. Der Autosampler wurde auf 4 °C heruntergekühlt, während der Säulenofen auf 30 °C beheizt wurde (Sezgin 2018).

Für die analytische Methode wurde ein Laufmittelgradient aus zwei Lösungsmitteln A (Bidestilliertes Wasser + 10mM Ammoniumacetat + 0,1 % AS) und B (Acetonitril + 0,1 % AS) optimiert (s. Tabelle 3). Die chromatographische Trennung wurde auf einer Nucleodur® HILIC Säule (150×2 mm, 3 µm Partikelgröße, 110 Å Porenweite) von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) realisiert. Die Flussrate wurde auf 0,3 mL min⁻¹ eingestellt. Die Messdauer für eine Probe betrug 31 min. Das Injektionsvolumen für die Proben und Kalibrierlösungen war 4 µL (Sezgin 2018).

Die massenspektrometrische Quantifizierung der Substanzen wurde über ein LTQ Orbitrap XLTM Massenspektrometer von Thermo Fisher Scientific (Bremen, Deutschland) ausgeführt. Als Ionisationsinterface wurde eine Heated-ESI (H-ESI) Quelle verwendet, die bei 5 kV operiert wurde. Die Spannung der Transferkapillare wurde auf 20 und die der Tubuslinse auf 100 V gesetzt. Die Transferkapillare wurde auf 200 °C und der Heater auf 250 °C aufgeheizt. Im Sprühnebel wurde ein

Tabelle 3: Chromatographischer Gradient für die analytische HPLC Methode

Zur Quantifizierung von APAP, APAP Metaboliten und Konjugaten und von TCS (A: H₂O + 10 mM NH₄Oac + 0,1 % fa; B: AcN + 0,1 % fa) (Sezgin 2018).

Time [minutes]	A [%]	B [%]
0	5	95
3	5	95
23	60	40
26	60	40
27	5	95
31	5	95

Nach 10 analytischen Probenmessungen und einer Blankmessung wurde zudem ein Waschschrift gefahren, um die Probenmatrix von der Säule zu spülen. Die Waschmethode ist in der Tabelle 4 angezeigt.

Tabelle 4: Chromatographischer Gradient für die HPLC Waschmethode

(A: H₂O + 10 mM NH₄Oac + 0,1 % fa; B: AcN + 0,1 % fa) (Sezgin 2018).

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	5	95
2	5	95
3	70	30
6	70	30
7	5	95
10	5	95
11	70	30
14	70	30
15	5	95
20	5	95

Hüllengas (sheath gas) Fluss von 50 und ein Hilfsgas (aux gas) Fluss von 8 willkürlichen Einheiten eingestellt. Das Spülgas (sweep gas) Level wurde auf 0 belassen. Messungen wurden im positiven Ionenmodus in einem Massenbereich von m/z 100 – 600 bei einer Massenauflösung von 60000 @ m/z 200 ausgeführt (Sezgin 2018).

Die Analyse der LC-MS Rohdaten erfolgte mit dem Software Programm Xcalibur (v. 2.2 SP1.48) von Thermo Fisher Scientific (Bremen, Deutschland). Die Analyten wurden den Abgleich der Retentionszeiten mit Referenzstandards und über ihre

exakten monoisotopischen Massen innerhalb eines Toleranzfensters von ± 2 ppm bestimmt. Das Quantifizierungslimit wurde bei $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ – der niedrigsten Kalibrierkonzentration – gesetzt. Die instrumentelle Detektionsgrenze lag bei $0,008 \mu\text{g mL}^{-1}$, weil bei dieser Konzentration die Signal-Rausch-Verhältnisse für eine Reihe von Analyten schlechtere Werte als 3:1 annahmen. Quantifiziert wurde über die Methode des Internen Standards über den Abgleich der Analyt/Internen Standard Flächenverhältnisse von analytischen Proben mit den Verhältnissen aus denen sich die Kalibrierkurven für die jeweiligen Substanzen zusammensetzten. Welche Internen Standards zur Korrektur der Matrixeffekte für welche jeweiligen Analyten verwendet wurden, wurde unter Kapitel 2.4 beschrieben. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) für die berechneten Kalibrierkurven lag zwischen 0.9925 – 0.9996 für die unterschiedlichen Analyten. Der Quantifizierbereich bezog sowohl lineare als auch nicht-lineare Partien der Kalibrierkurve ein. Bei der Zusammensetzung der Kalibrierkurven aus den einzelnen Kalibrierpunkten errechneten sich für die einzelnen Kalibrierpunkte prozentuale Abweichungen von der berechneten Kalibrierkurve. Kalibrierpunkte, die Abweichungen über 11 % manifestierten, wurden bei der darauffolgenden Iteration (Fitting) der Kalibrierkurve ausgeschlossen (Sezgin 2018).

Die untersuchten Analyten sind in der nachfolgenden Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Summenformeln, Quasimolekülionen, monoisotopische Massen, und Retentionszeiten der über HPLC-MS quantifizierten Substanzen

Analyt	Summenformel	Ionen	Monoisotopische Massen	R _t
APAP	C ₈ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	152,0706	2,0
APAP-D4	C ₈ H ₅ D ₄ NO ₂	[M+H] ⁺	156,0957	2,0
APAP-SUL	C ₈ H ₉ NO ₅ S	[M+NH ₄] ⁺	249,0541	4,6
APAP-SUL-D3	C ₈ H ₆ D ₃ NO ₅ S	[M+NH ₄] ⁺	252,0727	4,6
APAP-GLC	C ₁₄ H ₁₇ NO ₈	[M+NH ₄] ⁺	345,1292	13,2
APAP-OME	C ₉ H ₁₁ NO ₃	[M+H] ⁺	182,0811	1,9
APAP-GSH	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	[M+H] ⁺	457,1387	16,1
APAP-GSH-D3	C ₁₀ H ₁₄ D ₃ N ₃ O ₆ S	[M+H] ⁺	460,1575	16,1
APAP-CYS	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	[M+H] ⁺	271,0747	13,5
APAP-NAC	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₅ S	[M+H] ⁺	313,0852	9,8
TCS	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	[M+NH ₄] ⁺	533,3254	13,7
TCS-D5	C ₂₆ H ₄₀ D ₅ NO ₇ S	[M+NH ₄] ⁺	538,3568	13,7
TCDS	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	[M+NH ₄] ⁺	517,3305	12,6

Zur Validierung der analytischen Methode wurde die relative Standardabweichung (RSTD) aus sechs Injektionen für die jeweiligen zu quantifizierenden Analyten bestimmt. Es ergaben sich Werte von $\leq 9\%$ (Sezgin 2018).

Bei den errechneten Konzentrationswerten handelt es sich um Mittelwerte aus $n = 3$ Versuchsmäusen für die jeweiligen Beprobungsstellen. Die Konzentrationsangaben wurden zunächst in ng mL^{-1} aus $500\ \mu\text{L}$ Plasmaextrakt berechnet und anschließend auf die molare Konzentration μM bezogen auf $1\ \text{L}$ Blutplasma umgerechnet (Sezgin 2018).

5.6 Histochemische Färbungen

5.6.1 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Die H & E Färbung wurde anhand eines in der Literatur beschriebenen Protokolls (Ghallab 2016) mit leichten Modifikationen durchgeführt.

Leberschnitte wurden zunächst dreimal je $5\ \text{min}$ in Xylen getaucht. Die Rehydratation der Schnitte erfolgte in einem Isopropanol Gradient für jeweils $5\ \text{min}$ (Gradient: 98% , 96% , 90% , 80% und 70% Isopropanol mit Wasser). Danach wurden die Schnitte für $5\ \text{min}$ mit destilliertem Wasser gewaschen und für $5\ \text{min}$ in Mayers Hämatoxylin Lösung (1:5) von Merck (Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Überschüssiges Hämatoxylin wurde in Leitungswasser für $15\ \text{min}$ gewaschen. Die Inkubation mit Eosin Y (1%) erfolgte für $3\ \text{min}$. Anschließend wurde kurz in destilliertem Wasser für $10\ \text{s}$ gewaschen. Die Dehydrierung der Schnitte wurde in einem ansteigenden Isopropanol Gradienten (70% , 80% und 90% Isopropanol mit Wasser) für jeweils $5\ \text{s}$ mit Wasser durchgeführt. Final erfolgte die Inkubation der Schnitte für $3\ \text{min}$ in Xylen und die Präservierung mit Entellan® von Merck (Darmstadt, Germany).

5.6.2 CYP2E1 immunhistochemische Färbung

Die für die CYP2E1 immunhistochemische Färbung reservierten Schnitte wurden zunächst in 3% iger Paraformaldehydlösung für $5\ \text{min}$ fixiert. Danach wurden die Proben mit PBS Lösung gewaschen. Endogene Peroxidasen wurden durch Immersion in $0,3\%$ -iger Wasserstoffperoxidlösung in Methanol für $15\ \text{min}$ deaktiviert. Zudem

erfolgte die Inkubation in einem Serum für 2 h, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Die Inkubation mit dem polyklonalen Hasen anti-Cytochrome P450 2E1 Antikörper (1:1000 in PBS), welcher von Stressgen (Victoria, BC, Canada) erhalten wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach einer Reihe von Waschschritten wurden die Schnitte für 2 h in einer Lösung (1:20 in PBS) mit polyklonalem Schwein anti-rabbit Immunoglobulin/HRP Antikörper von DakoCytomation Denmark A/S (Glostrup, Dänemark). Die Färbung wurde schließlich durch Inkubation für 10 min mit einer 3-Amino-9-Ethylcarbazol Lösung in PBS (1 mg mL⁻¹) erhalten (Sezgin 2018).

5.7 Aktivität der Transaminasen und Glutathion Assay

Die Aktivität der Transaminasen AST und ALT (Transaminasen) wurde kolorimetrisch im Blutplasma, welches von der rechten Herzkammer der Mäuse entnommen ist, bestimmt. Für das kolorimetrische Assay standen ein Microplate Reader und kommerziell erhältliche Kits von Sigma-Aldrich Life Sciences in St. Louis, MO, USA zur Verfügung (Kits: MAK055-1KT für AST und MAK052-1KT für ALT). Die Bestimmung erfolgte anhand der Instruktionen des Kit-Herstellers.

Die GSH Konzentration wurde im Homogenat der Leber über LC-MS/MS anhand einer in der Literatur beschriebenen Methode bestimmt (New 2008). Für die GSH Quantifizierung wurde das Helmholtz Institut für Umweltforschung [UFZ] beauftragt. Die Ergebnisse wurden anschließend vom IfaDo zur Verfügung gestellt. Alle angegebenen Konzentrationswerte beziehen sich auf Frischeinwaagen der Leberproben (Sezgin 2018).

5.8 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen der Datenwerte (Berechnung von Mittelwerten, Standardfehlern und Grubbs Tests zur Eliminierung von Ausreißer Werten) und Erstellung der Diagramme erfolgte weitgehend mit Excel 2016 von der Microsoft Corporation (Redmont, WA, USA).

Statistische Analysen wurden zum Vergleich der Mittelwerte der Stichproben durchgeführt. Dazu wurde die SPSS Software (v. 25) von IBM (Armonk, NY, USA)

verwendet. Der Mittelwertvergleich erfolgte über einen ungepaarten T-Test. t-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet (Sezgin 2018).

5.9 Verzeichnisse

5.9.1 Chemikalienverzeichnis

Tabelle 6: Chemikalienverzeichnis

Chemikalie/Bezeichnung	Art/Verwendung	Hersteller/Lieferant
Methanol (HPLC grade $\geq 99.8\%$)	Lösungsmittel	J. T. Baker Avantor (Arnhem, Niederlande)
Acetonitril (HPLC grade $\geq 99.8\%$)	Lösungsmittel und Eluent	J. T. Baker Avantor (Arnhem, Niederlande)
VE-Wasser (bi-destilliert)	Lösungsmittel und Eluent	Laborintern (INFU, TU Dortmund)
α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (ultrapure)	MALDI Matrix	Sigma-Aldrich Life Sciences (St. Louis, MO, USA)
Acetaminophen (BioXtra, $\geq 99.0\%$)	Referenzstandard	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Acetaminophen-D4	Interner Standard	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Salzsäure (technisch, 37 %)	Chemische Reaktion mit Na ₂ S	PanreacAppliChem (Castellar del Valles, Spanien)
Natriumsulfid ($\geq 60\%$)	Chemische Reaktion mit HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
2-Mercaptobenzothiazol (97 %)	MALDI Matrix	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
9-Aminoacridin ($\geq 99.5\%$, für MALDI-MS)	MALDI Matrix	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-1,8-naphthalindiamin ($\geq 99.0\%$, purum)	MALDI Matrix	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
2,5-Dihydroxybenzoesäure (>99.0% (HPLC), für MALDI-MS)	MALDI Matrix	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethanol (für die Molekularbiologie)	Lösungsmittel	PanreacAppliChem (Castellar del Valles, Spanien)
Trifluoressigsäure (ReagentPlus® 99 %)	Zusatz (Matrixlösung)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ameisensäure (99%)	Zusatz (Matrixlösung)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Aceton (Reag. Ph. Eur.)	Lösungsmittel	PanreacAppliChem (Castellar del Valles, Spanien)
ProteoMass™ MSCAL4 Kit	Kalibrierkit für den MS (positiver Modus)	Sigma-Aldrich Life Sciences (St. Louis, MO, USA)
<i>L</i> -Glutamin (ReagentPlus®, $\geq 99\%$ (HPLC))	Referenzstandard	Sigma-Aldrich Life Sciences (St. Louis, MO, USA)
Taurin ($\geq 99\%$)	Referenzstandard	Sigma-Aldrich Life Sciences (St. Louis, MO, USA)
3-Methoxyacetaminophen	Referenzstandard	Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada)
Acetaminophen Glutathion Konjugat (Dinatriumsalz)	Referenzstandard	Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada)
Acetaminophen Glutathion-D3 Konjugat (Dinatriumsalz)	Interner Standard	Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada)
3-Cysteinyl Acetaminophen	Referenzstandard	Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada)
<i>N</i> -Acetyl-cysteinyl Acetaminophen	Referenzstandard	Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada)
Acetaminophen- β -D-glucuronid	Referenzstandard	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Acetaminophen Sulfat (Kaliumsalz)	Referenzstandard	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Acetaminophen Sulfat-D3 (Kaliumsalz)	Interner Standard	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Taurocholsäure ($\geq 95\%$, Natriumsalz-Hydrat)	Referenzstandard	Sigma-Aldrich Life Sciences (St. Louis, MO, USA)
Taurocholsäure (Natriumsalz)	Interner Standard	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Taurochenodeoxycholsäure (Natriumsalz)	Referenzstandard	Sigma-Aldrich Life Sciences (St. Louis, MO, USA)
	Histochemische Färbung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Eosin Y Lösung (1%, alkoholisch)	Histochemische Färbung	Sigma-Aldrich Life Sciences (St. Louis, MO, USA)
Wasserstoffperoxidlösung (30 %)	In der Färbung und im photochemischen Experiment	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hasen anti-Cytochrome P450 2E1 Antikörper	Immunhistochemische CYP2E1 Färbung	Stressgen (Victoria, BC, Canada)
Schwein anti-rabbit Immunglobulin/HRP	Immunhistochemische CYP2E1 Färbung	DakoCytomation Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
3-Amino-9-ethylcarbazol ($\geq 95\%$, HPLC)	Immunhistochemische CYP2E1 Färbung	Sigma-Aldrich Life Sciences (St. Louis, MO, USA)
Formaldehydlösung (36,5-38 %, für die	Fixiermedium	Sigma-Aldrich Life Sciences (St. Louis, MO, USA)

Molekularbiologie)		USA)
MAK055-1KT	Kit für kolorimetrisches AST Assay	Sigma-Aldrich Life Sciences (St. Louis, MO, USA)
MAK052-1KT	Kit für kolorimetrisches ALT Assay	Sigma-Aldrich Life Sciences (St. Louis, MO, USA)
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Fixiermedium für Kryotomproben	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Natriumchlorid (≥99.0%, ACS reagent)	Salz für den PBS Puffer	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kaliumchlorid (≥99.0%, für die Mikrobiologie)	Salz für den PBS Puffer	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat (≥99.5%, trace metal analysis)	Salz für den PBS Puffer	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (NIST® SRM® 200b)	Salz für den PBS Puffer	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Xylen (Mix aus Isomeren)	H & E Färbung	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

5.9.2 Materialverzeichnis

Tabelle 7: Materialverzeichnis

Material/Artikel	Art/Verwendung	Hersteller/Lieferant
Luna® 3 µm C18(2) 100 Å, 100 x 4.6 mm	HPLC-Chromatographiesäule	Phenomenex (Torrance, CA, USA)
Nucleodur® HILIC 3 µm, 110 Å, 150x2 mm	HPLC-Chromatographiesäule	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Glasobjektträger 18x18x1 mm	Probenträger für MALDI Versuche	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
SuperFrost™ Plus Objektträger	Probenträger für CYP2E1 Leberschnitte	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Falcon™ Tube (15 mL)	Plastikgefäß zur Extraktion	Corning Life Sciences (Corning, NY, USA)
C57BL6/N Mäuse	Versuchstiere	Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich)
Ssniff R/M-H Diät	Mäusefutter	Ssniff (Soest, Deutschland)

5.9.3 Geräteverzeichnis

Tabelle 8: Geräteverzeichnis

Bezeichnung	Instrument/Verwendung	Hersteller/Lieferant
SMALDIprep	Applikation von Matrixlösungen auf biologische Präparate	TransMIT GmbH (Gießen, Deutschland)
Imagine10™	AP-SMALDI Ionenquelle	TransMIT GmbH (Gießen, Deutschland)
LTQ Orbitrap™	HR-Massenspektrometer	Thermo Scientific (Bremen, Deutschland)
LTQ Orbitrap XL™	HR-Massenspektrometer	Thermo Scientific (Bremen, Deutschland)
Q-Exactive™	HR-Massenspektrometer	Thermo Scientific (Bremen, Deutschland)
Avanti J-26X	Zentrifuge	Beckmann Coulter (Brea, CA, USA)
MCF-2360	Minizentrifuge	LMS (Tokyo, Japan)
HM550	Mikrotomkryostat	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Germany)
Agilent 1200 Series	HPLC Instrumente Säulenofen Autosampler Binäre Pumpe Entgaser	Agilent Technologies (Walbronn, Deutschland)
----	Microplate Reader für kolorimetrische Transaminaseassays	---
Leica S8AP0	Optisches Lichtmikroskop	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
VHX-5000	Digitales Lichtmikroskop	Keyence (Osaka, Japan)
Savant™ SPD1010	Vakuumentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Germany)

6. Anhang

6.1 Vorversuche

6.1.1 Tabelle: NAPQI Transformationsprodukte in PBS bzw. methanolischer Lösung

Tabelle 9: NAPQI Transformationsprodukte in PBS bzw. Methanol

Substanz	Summenformel	Ion 1 <i>m/z</i>	Ion 2 <i>m/z</i>	Ion 3 <i>m/z</i>	Rt
APAP	C ₈ H ₉ O ₂ N	152,0707 [M+H] ⁺	190,0264 [M+K] ⁺	303,1338 (Dimer-Ion) [2M+H] ⁺	4,32
APAP Dimer	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄	301,1182 [M+H] ⁺	318,1449 [M+NH ₄] ⁺	339,0741 [M+K] ⁺	6,78 8,24
APAP Trimer	C ₂₄ H ₂₃ O ₆ N ₃	450,1659 [M+H] ⁺	467,1925 [M+NH ₄] ⁺	488,1218 [M+K] ⁺	7,95
APAP Tetramer	C ₃₂ H ₃₀ O ₈ N ₄	599,2129 [M+H] ⁺	616,2401 [M+NH ₄] ⁺	637,1695 [M+K] ⁺	8,65
APAP Pentamer	C ₄₀ H ₃₇ O ₁₀ N ₅	391,6608 [M+2NH ₄] ²⁺	748,2605 [M+H] ⁺	765,2877 [M+NH ₄] ⁺	9,23
APAP Hexamer	C ₄₈ H ₄₄ O ₁₂ N ₆	457,6711 [M+H+NH ₄] ²⁺	466,1846 [M-F+NH ₄] ⁺	897,3086 [M+H] ⁺	9,71
APAP Heptamer	C ₅₆ H ₅₁ O ₁₄ N ₇	597,1978 [M-F+H] ⁺	619,1796 [M-F+Na] ⁺	635,1536 [M-F+K] ⁺	10,45
APAP Oktamer	C ₆₄ H ₅₈ O ₁₆ N ₈	448,1498 [M-F+H] ⁺	465,1763 [M-F+NH ₄] ⁺	470,1321 [M-F+Na] ⁺	11,15

F: Fragment.

Dargestellt sind die zu der jeweiligen (vorläufig) zugeordneten Substanz detektierten drei abundantesten Ionen (experimentelle *m/z*). Basispeaks im MALDI Imaging sind grün und in HPLC-MS Messungen rötlich unterlegt. Die entsprechenden Fragmente sind in den Abbildungen im Kapitel 2.2.1 dargestellt.

6.1.2 Geschätzte On-Tissue Detektionslimits der untersuchten Analyten

1 µL Tropfen aus den Lösungen der Analyten in Methanol (APAP, APAP-GLC, APAP-SUL, TCS) bzw. Wasser (APAP-GSH) mit einer variablen Konzentration (0,1, 1, 10, 50 und 100 µg mL⁻¹) wurden auf Negativkontrollgewebe platziert und via MALDI-MSI mit einer spatialen Auflösung von 20 µm (wie im kinetischen und dosisabhängigen Experiment) gemessen. GSH wurde außen vorgelesen, zumal natives GSH im

gesamten im gesamten Gewebe gleichmäßig lokalisiert ist. Zwar befindet sich auch TCS im Lebergewebe; native TCS bildet jedoch distinktive Signalcluster auf den Gallengängen aus, die von Analytsignalen in der Tropfenkontur unterschieden werden konnten. Das Gewebe wurde nach dem Platzieren der Tropfen mit dem Mikroskop aufgenommen und anschließend unter Stickstoff Gasstrom getrocknet, bis das Lösungsmittel verdampft war. Indem die Durchmesser der aufgetragenen Tropfen mithilfe der Mikroskop Software für den Digitalmikroskop VHX-5000 von Keyence (Osaka, Japan) bestimmt wurden, konnten die Tropfenflächen anhand der Flächenformeln für Kreise bzw. Ellipsen annähernd berechnet werden. Die aufgetragene Stoffmenge wurde auf die Fläche pro mm² normiert. Da die händische Auftragung zu unterschiedlichen Tropfengrößen führte, sollten die angegebenen LOD nicht als genaue exakte Werte angenommen werden, sondern vielmehr als Abschätzungen betrachtet werden. Die Genauigkeit könnte hier durch einen automatischen Gewebespotter erhöht werden, was allerdings zum Zeitpunkt der Versuche nicht zur Verfügung stand.

Der LOD-Wert wurde auf den Tropfen bezogen, von dem noch Signale – auch wenn mit Lücken und nicht durchgehend – des jeweiligen Analyten detektiert werden konnten. Eine Alternative wäre der Bezug auf Tropfen, von deren Tropfenflächen durchgängig Pixel ohne Signalgaps generiert werden konnten.

Tabelle 10: Auf die Tropfenfläche normierte geschätzte On-Tissue LOD für die Analyten

Spatiale Scanauflösung: 20 µm

Analyt	Stoffmenge „LOD-Tropfen“ [pmol]	Nachweisgrenze x [pmol mm ⁻²]*
APAP [HCCA(+)]	6,7	0,22 < x < 1,9
APAP-GLC [HCCA(+)]	30,6	0,73 < x < 6,8
APAP-GSH [MBT(-)]	21,9	0,48 < x < 4,0
APAP-SUL [MBT(-)]	4,3	0,11 < x < 0,7
TCS [MBT(-)]	1,9	0,03 < x < 0,3

*Für die Nachweisgrenze wurde eine Ungleichung zwischen zwei Tropfenkonzentrationen („LOD-Tropfen“ und „leerer Tropfen“) angegeben, da die tatsächliche untere Konzentrationsgrenze, bei der noch Signale detektiert werden konnten, unbekannt ist.

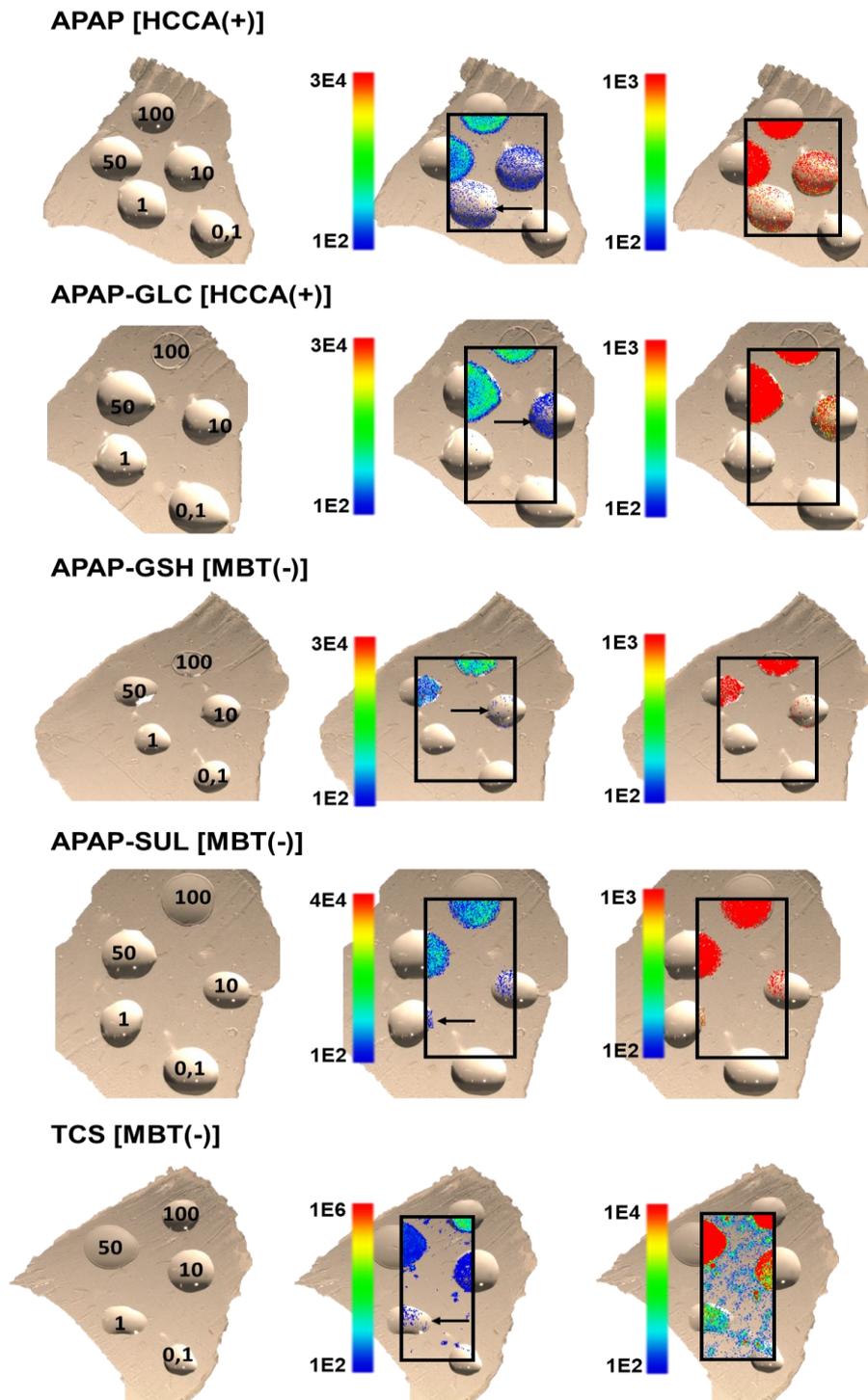


Abbildung 50: Abschätzung der On-Tissue LODs auf dem Lebergewebe von Mäusen für APAP, APAP-GLC, APAP-GSH, APAP-SUL und TCS.

Platziertes Tropfenvolumen: 1 μ L. Spatiale Auflösung: 20 μ m. Linkes Bild: Konzentration der aufgetragenen Tropfen. Mittiges Bild: Darstellung mit nicht manipulierter oberer Signalgrenze. Der schwarze Pfeil verdeutlicht, an welcher Stelle die LOD gesetzt wurde. Rechtes Bild: Signalverstärkung durch Herabsetzung der Maximalintensitäten.

6.1.3 Transformationsprodukte des NAPQIs in PBS Lösung mit GSH

NAPQI und GSH wurden im selben Glasgefäß abgewogen und anschließend in PBS Lösung auf $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ verdünnt. Unmittelbar danach folgten Injektionen ($2 \mu\text{L}$) von Aliquoten dieser Lösung über das HPLC-MS System in den LTQ Orbitrap™ MS. Die Dauer der HPLC Läufe wurde dabei kurzgehalten, indem auf eine chromatographische Trennung (Säule) verzichtet wurde. Dadurch konnten zu den in Abbildung 51 angegebenen Zeitpunkten Aliquoten der Lösung injiziert und gemessen werden.

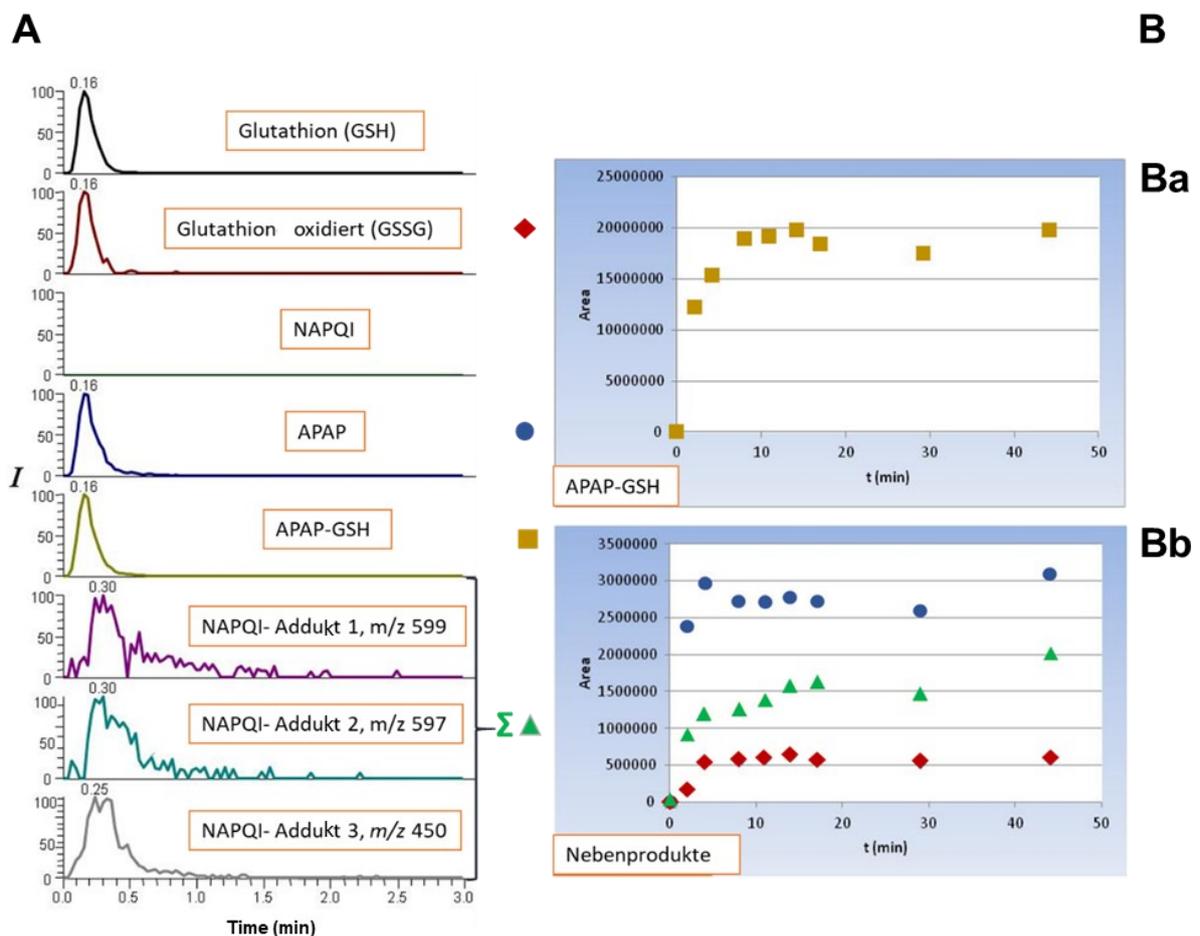


Abbildung 51: Produkte aus dem NAPQI in einer PBS Lösung mit GSH

0 min: Blank PBS Lösung. Injektionsvolumen: $2 \mu\text{L}$.

Verglichen zu den Vorversuchen für die Analytik von NAPQI-Referenzstandardlösungen ohne GSH Zugabe, wurde durch die Präparation einer NAPQI Lösung, in der bereits GSH zum Zeitpunkt des Lösevorgangs enthalten war,

ein hoher Umsatz des NAPQIs zum APAP-GSH Konjugat beobachtet. Auch wenn die Responsefaktoren am Detektor für APAP-GSH verglichen zu den aus dem NAPQI entstehenden APAP-Oligomeren unterschiedlich sein dürften und absolute Konzentrationen in diesem Versuch nicht quantifiziert wurden, so kann trotzdem festgehalten werden, dass die Affinität des NAPQIs zur Reaktion mit GSH höher erscheint als zur Produktbildung zu den Oligomeren. Die Entstehung der Oligomere wurde durch die Präsenz des GSHs deutlich gemindert. Die Entstehung des APAPs konnte zwar nicht komplett unterdrückt werden, aber anhand eines qualitativen Intensitätsvergleichs zu den Chromatogrammen in Kapitel 2.2.1 lässt sich konstatieren, dass eine Verminderung der APAP Bildung auftrat. Dass die APAP-Bildung mit GSH nicht blockiert wird, ist dadurch zu erklären, zumal GSH auch als Reduktionsmittel zur Reduktion von NAPQI zum APAP beitragen kann (Potter 1986), was auch an der Entstehung des GSSGs verzeichnet wurde.

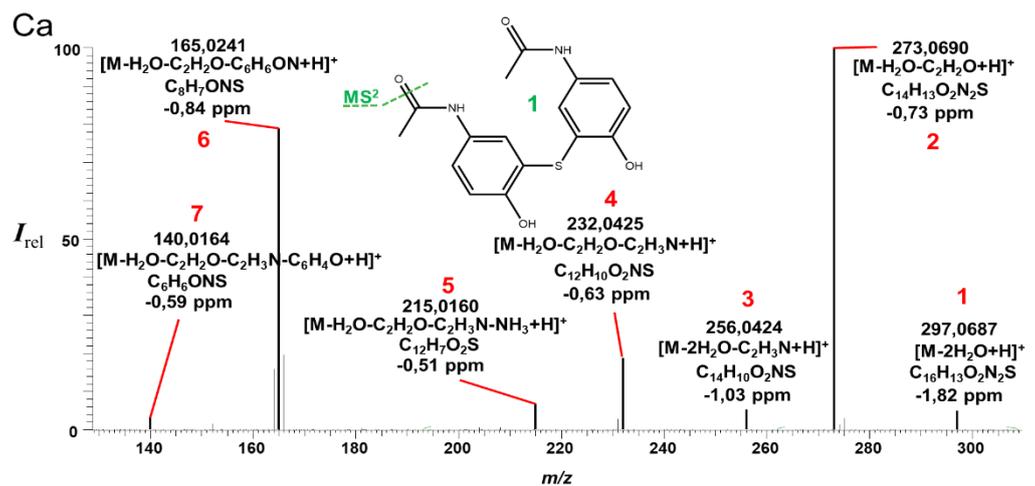
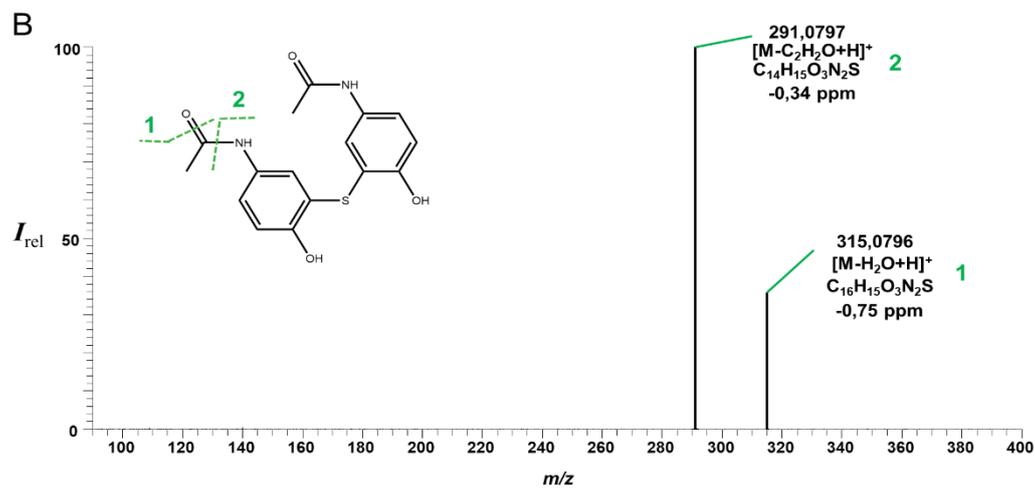
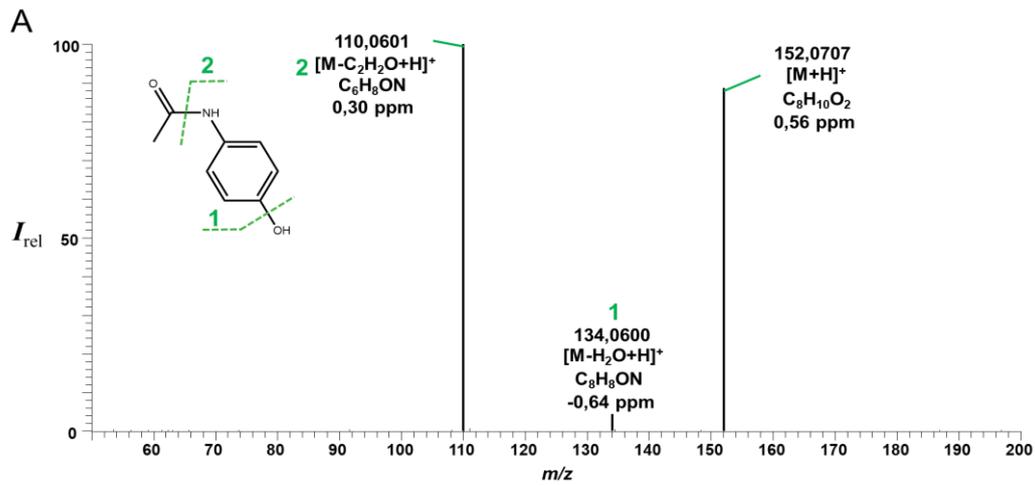
6.1.4 Transformationsprodukte von NAPQI aus seiner Reaktion mit H₂S

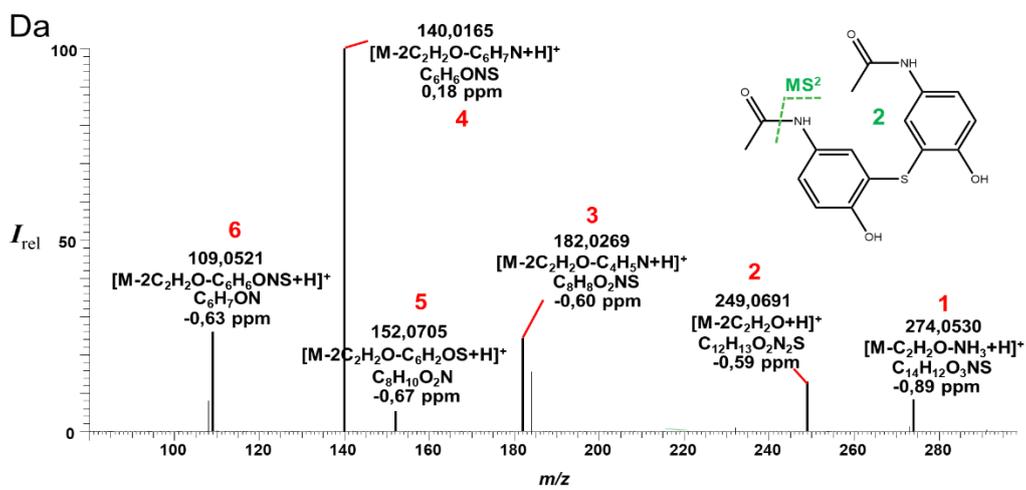
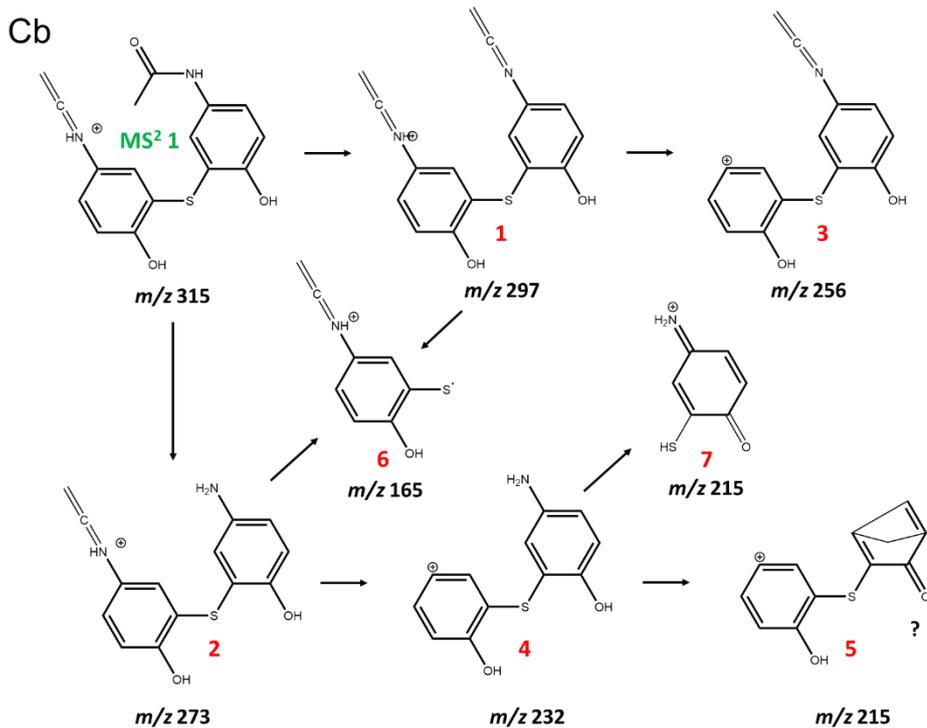
In der Tabelle 11 sind die aus der Reaktion von NAPQI mit H₂S Gas (bzw. dem S²⁻) entstehenden Produkte angegeben.

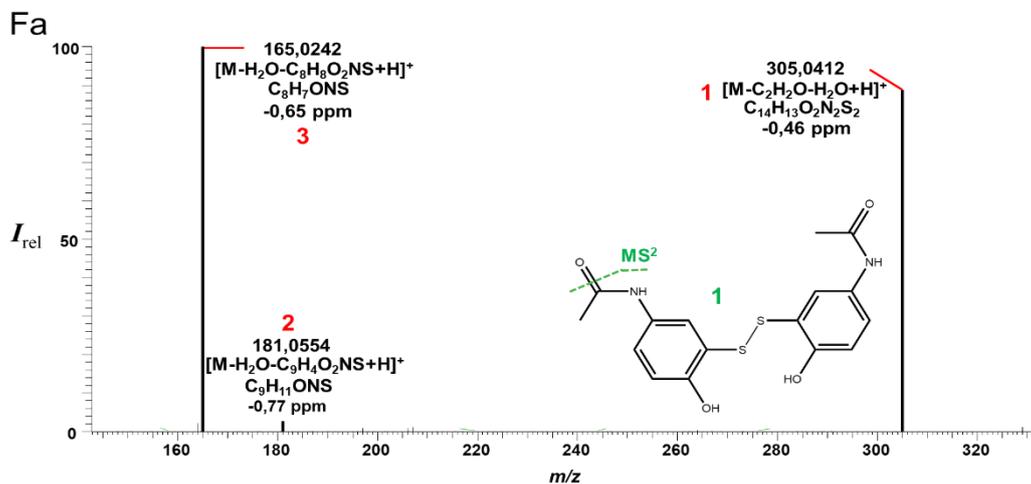
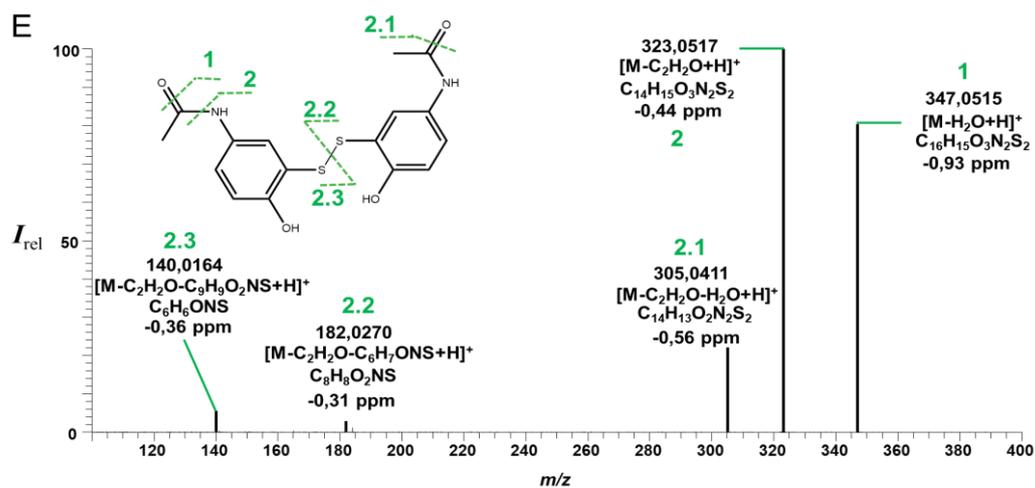
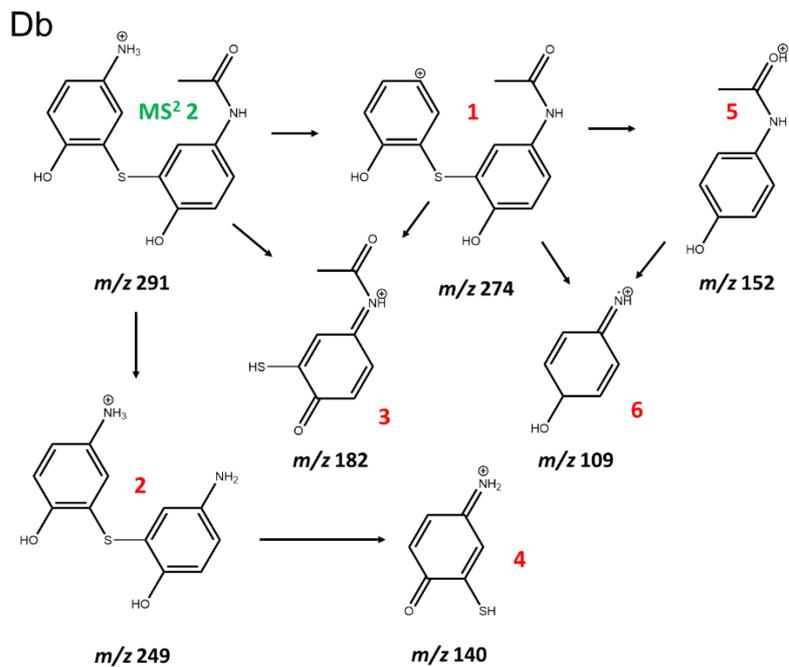
Tabelle 11: Vorläufig zugeordnete Transformationsprodukte des NAPQIs in Lösung aus der Reaktion mit H₂S

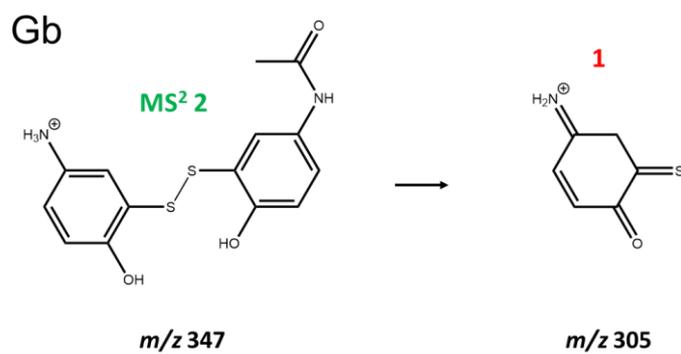
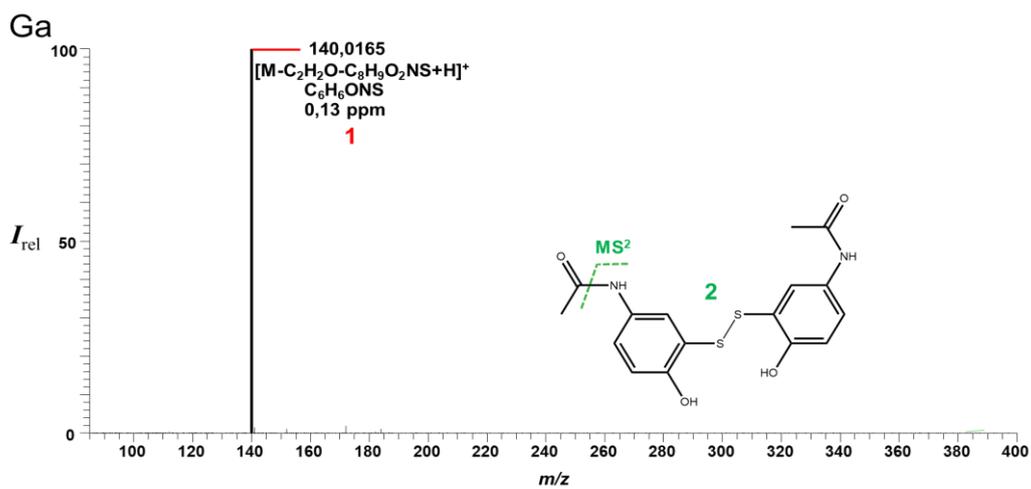
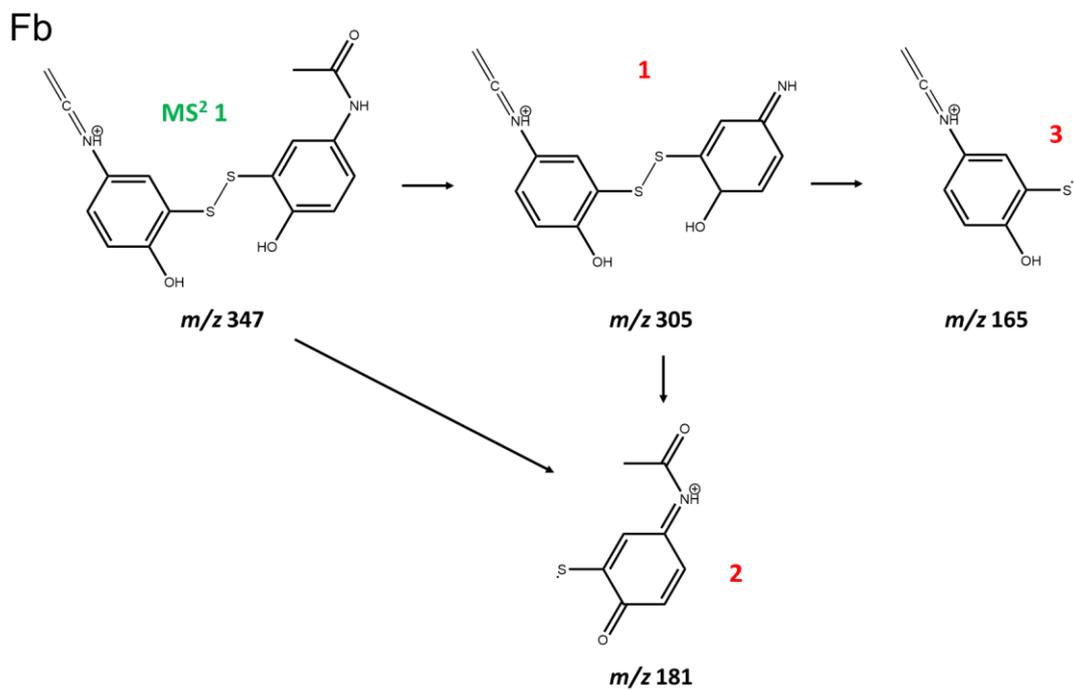
Substanz	Summenformel	Ion <i>m/z</i>	Rt
APAP	C ₈ H ₉ O ₂ N	152,0707 [M+H] ⁺	4,34
Sulfid verbrücktes Di-APAP	C ₁₆ H ₁₆ O ₄ N ₂ S	333,0906 [M+H] ⁺	8,54
Disulfid verbrücktes Di-APAP	C ₁₆ H ₁₆ O ₄ N ₂ S ₂	365,0626 [M+H] ⁺	10,17
3- Thioacetaminophen	C ₈ H ₉ O ₂ NS	184,0427 [M+H] ⁺	11,77

Nachfolgend die Ergebnisse aus den MS² bzw. MS³ Experimenten zur Strukturaufklärung der oben genannten Produkte dargestellt. Die Abkürzung „M“ bezieht sich dabei in allen Spektren stets auf das nicht-fragmentierte Quasimolekülion der analysierten Verbindungen.









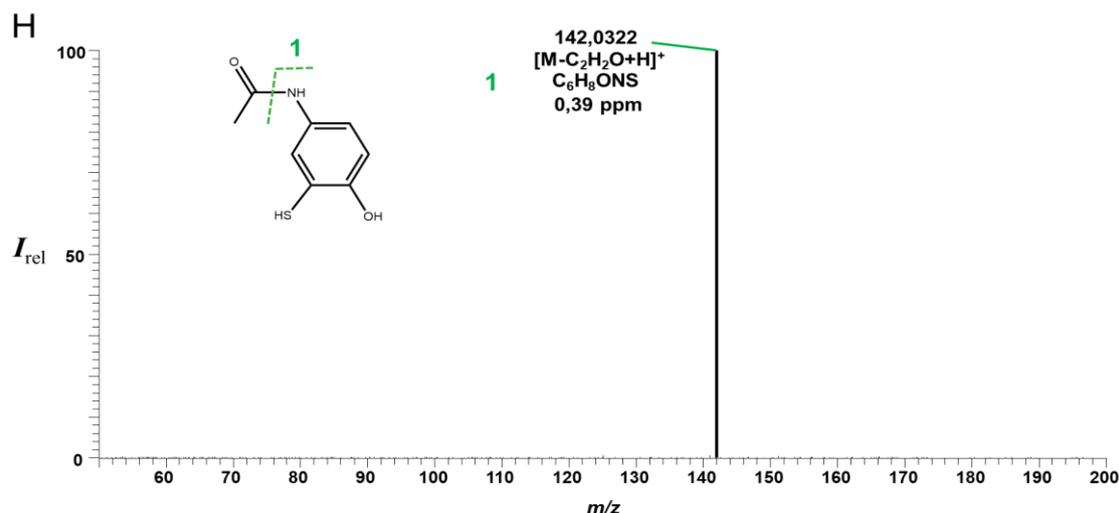


Abbildung 52: MS² und MS³ Fragmentionenspektren und vorgeschlagene Fragmentierungspfade für die Produkte aus der Reaktion von NAPQI mit H₂S (S²⁻)

Fragmentierungsenergie: 35 eV. A: MS² Spektrum von m/z 152,0707 (APAP). B: MS² Spektrum von m/z 333,0906 (Sulfid verbrücktes Di-APAP). Ca: MS³ Spektrum von m/z 315,0796 (Sulfid verbrücktes Di-APAP). Cb: Vorgeschlagene Fragmentierungspfade für die MS³ Fragmentierung von m/z 315,0796 (Sulfid verbrücktes Di-APAP). Da: MS³ Spektrum von m/z 291,0797 (Sulfid verbrücktes Di-APAP). Db: Vorgeschlagene Fragmentierungspfade für die MS³ Fragmentierung von m/z 291,0797 (Sulfid verbrücktes Di-APAP). E: MS² Spektrum von m/z 365,0626 (Disulfid verbrücktes APAP). Fa: MS³ Spektrum von m/z 347,0515 (Disulfid verbrücktes APAP). Fb: Vorgeschlagene Fragmentierungspfade für die MS³ Fragmentierung von m/z 347,0515 (Disulfid verbrücktes Di-APAP). Ga: MS³ Spektrum von m/z 323,0517 (Disulfid verbrücktes APAP). Gb: Vorgeschlagener Fragmentierungspfad für die MS³ Fragmentierung von m/z 347,0515 (Disulfid verbrücktes Di-APAP). F: MS² Spektrum von m/z 184,0427 (3-Thioacetaminophen).

6.1.5 Analyse des H₂S begasten Positivkontrollgewebes mit der Mirion Software

In der Abbildung 53 sind eine Reihe von Ionendichtebildern mit korrespondierenden m/z abgebildet. Diese m/z wurden ausschließlich von den Probenoberflächen gemessen werden, die mit H₂S begast wurden. Die m/z konnten nicht mit den Umwandlungsprodukten von NAPQI attribuiert werden.

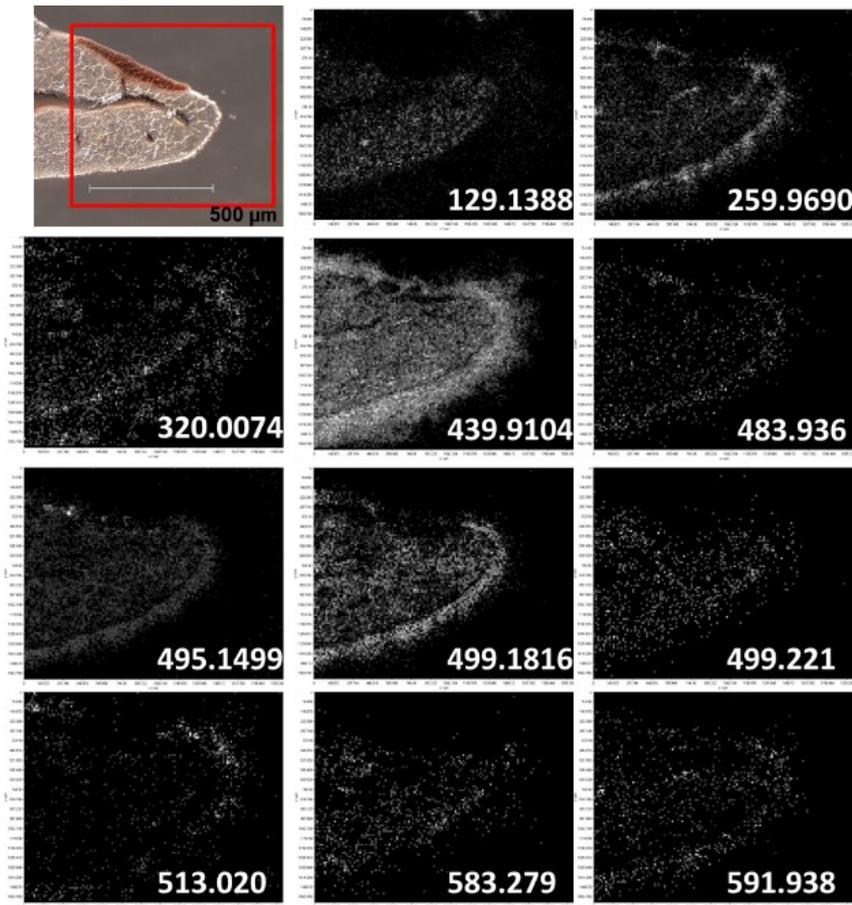


Abbildung 53: Ionendichtebilder mit ausschließlich von H₂S begasten Probenoberflächen gemessenen m/z

Leberproben von Mäusen 30 min nach APAP Injektion (Dosis: 300 mg kg⁻¹). Die hier dargestellte Probe wurde für 30 min mit H₂S begast.

6.2 Kinetisches und dosisabhängiges Experiment

6.2.1 Pharmakokinetische Daten

Pharmakokinetische Berechnungen erfolgten durch Dr. Lars Kuepfer (Bayer AG, Leverkusen) basierend auf den quantitativ ermittelten Konzentrationswerten von den HPLC-Messungen von APAP, APAP-SUL, APAP-GLC, APAP-GSH, APAP-CYS und APAP-NAC. Als Software diente die Mobi® Toolbox für MATLAB (Open Systems Pharmacology Suite, Version 7.2.1, <http://www.open-systems-pharmacology.com>). Folgende pharmakokinetische Parameter wurden berechnet: t_{\max} (Zeitpunkt für die maximale Konzentration), C_{\max} (Maximale beobachtete Konzentration), AUC (Fläche unter der Kurve für 0 – 8 h) und $t_{1/2}$ (Halbwertszeit für das Ausscheiden). Die optimale

Halbwertszeit für das Ausscheiden der Stoffe wurde durch visuelle Inspektion bestimmt. Für die Stoffe APAP-CYS und APAP-GSH konnten aufgrund einer nicht ausreichenden Anzahl passender Konzentrationswerte nach t_{\max} keine Halbwertszeiten berechnet werden (Sezgin 2018).

Die berechneten pharmakokinetischen Parameter sind in der Tabelle 12 abgebildet.

Tabelle 12: Pharmakokinetische Parameter für die Analyten in Mäusen

APAP Dosis: 300 mg kg⁻¹ APAP (Sezgin 2018)

Kinetische Parameter	Portalvene	Hepatische Vene	Herz
APAP			
c-max [μM]	3444.4	3296.4	3183.3
t-max [min]	15	15	15
AUC [$\mu\text{M}\cdot\text{min}$]	232720	229900	230420
$t_{1/2}$	91.20	90.74	90.79
APAP-SUL			
c-max [μM]	182.71	176.67	186.96
t-max [min]	30	30	30
AUC [$\mu\text{M}\cdot\text{min}$]	23375	23275	23243
$t_{1/2}$	97.11	96.18	96.32
APAP-GLC			
c-max [μM]	191.39	201.36	175
t-max [min]	30	30	30
AUC [$\mu\text{M}\cdot\text{min}$]	21903	23442	21291
$t_{1/2}$	94.30	94.33	93.90
APAP-GSH			
c-max [μM]	19.107	70.672	48.846
t-max [min]	120	120	120
AUC [$\mu\text{M}\cdot\text{min}$]	2185.2	7452.2	5462.4
$t_{1/2}$	-	-	-
APAP-CYS			
c-max [μM]	20.134	16.726	21.162
t-max [min]	60	60	120
AUC [$\mu\text{M}\cdot\text{min}$]	3388.1	2683.2	3435
$t_{1/2}$	-	-	-
APAP-NAC			
c-max [μM]	150.51	108.26	87.356
t-max [min]	30	30	30
AUC [$\mu\text{M}\cdot\text{min}$]	17527	12958	10703
$t_{1/2}$	102.47	104.11	103.83

c-max: Maximale beobachtete Konzentration, t-max: Zeitpunkt mit der höchsten Konzentration, AUC: Fläche unter Kurve, $t_{1/2}$: Halbwertszeit

6.2.2 APAP-OME

In Abbildung 54 sind die Ergebnisse für APAP-OME dargestellt. Der Nebenmetabolit wurde in relativ geringen Mengen gebildet. In den MALDI-MSI Abbildungen war keine differenzierte Verteilung bezüglich der PP oder PC Zonen erkennbar. Die APAP-OME Konzentrationen erreichten im Blut die maximalen Konzentrationen zum Zeitpunkt 60 min im kinetischen Experiment. Bei der Applikation niedriger APAP-Dosen (56 und 167 mg kg⁻¹) fielen die für APAP-OME detektierten Signale unter das LOQ.

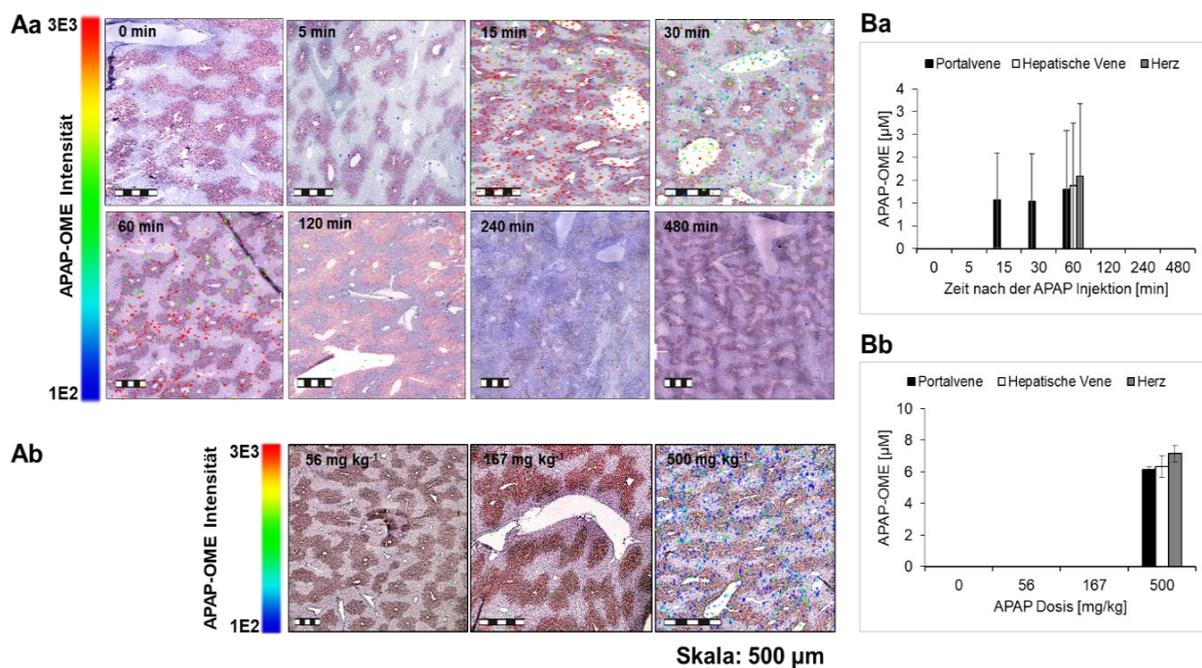


Abbildung 54: MALDI-MSI und quant-HPLC-MS Daten zum Nebenmetaboliten APAP-OME

Aa: MALDI-MSI Ergebnisse zum kinetischen Experiment. Ab: MALDI-MSI Ergebnisse zum dosisabhängigen Experiment. Ba: quant-HPLC-Ergebnisse. Skala: 500 µm

6.2.3 MALDI-MSI/MS für APAP-GSH und TCS

In den Abbildungen 55-57 sind die MALDI-MSI/MS Resultate dargestellt. Zunächst wurden die Messungen von Referenzstandards von auf Negativkontrollgewebe platzierten Tropfen durchgeführt. Anschließend wurden APAP-GSH (15 min nach APAP Injektion, Dosis: 300 mg kg⁻¹) und TCS (120 min nach APAP Injektion, Dosis: 300 mg kg⁻¹) mit 30 eV bzw. 35 eV Energie auf Positivkontrollgewebe fragmentiert.

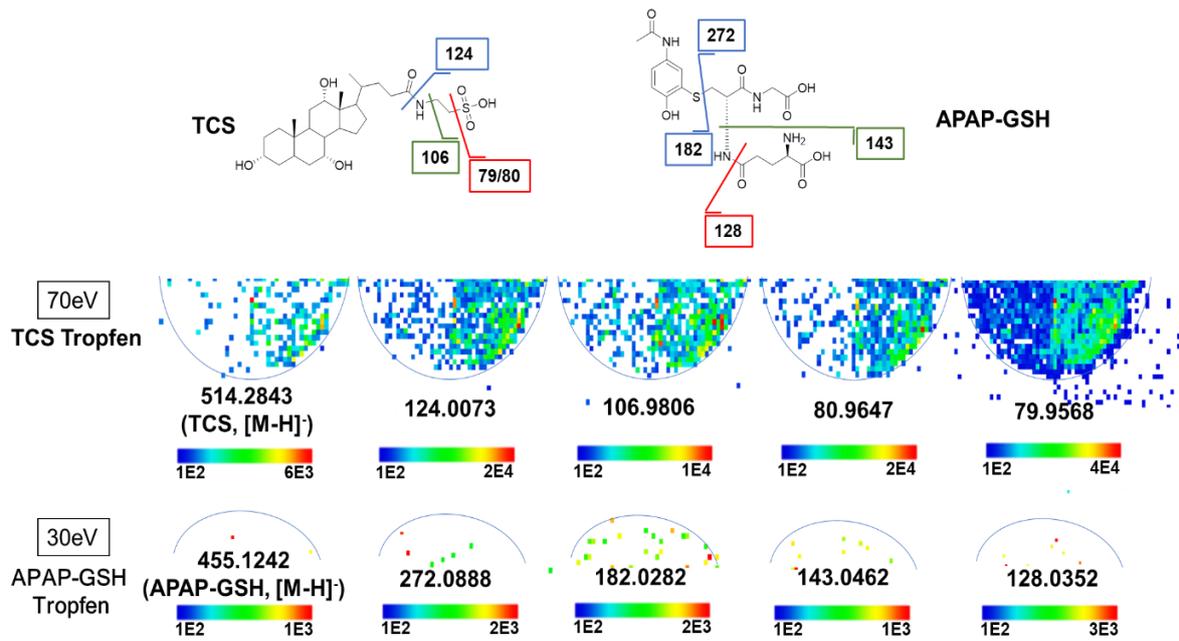


Abbildung 55: und TCS von Referenzstandardtropfen auf Negativkontrollgewebe
 Spatiale Auflösung: 20 µm. Die Konturen des Tropfens wurden schematisch dargestellt.

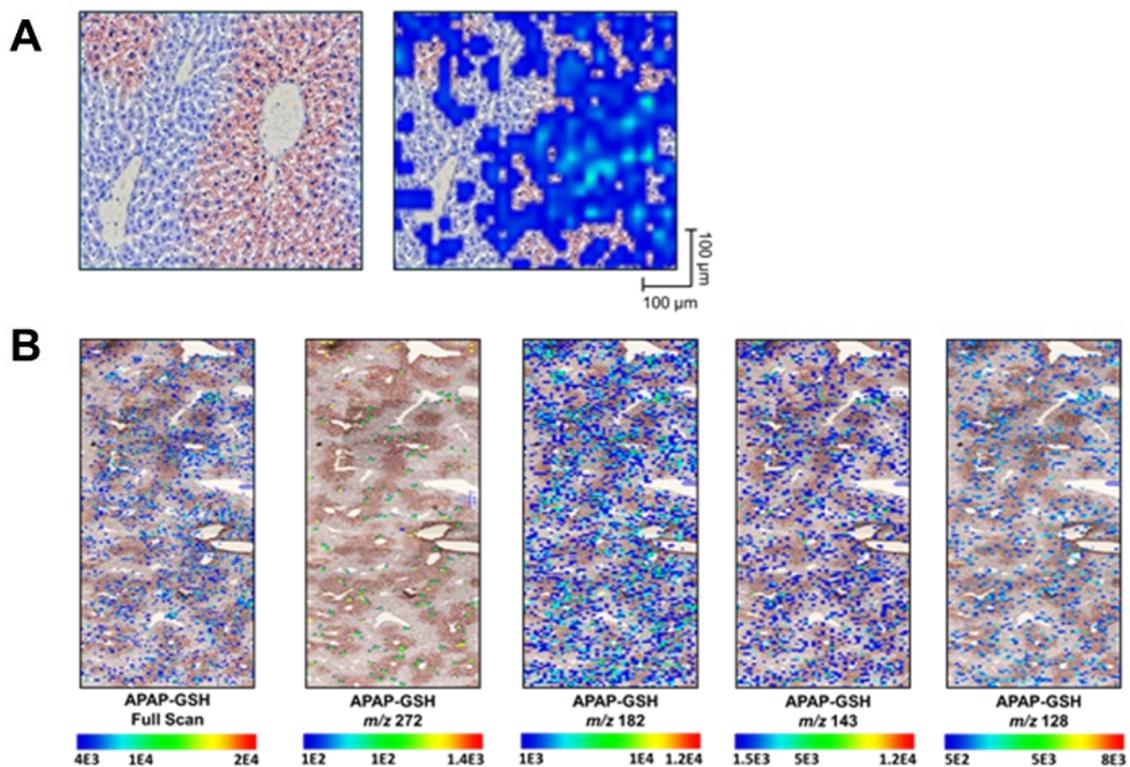


Abbildung 56: MALDI-MSI/MS Ergebnisse für APAP-GSH vom Positivkontrollgewebe
 Spatiale Auflösung: 20 µm. 15 min nach APAP Injektion (Dosis: 300 mg kg⁻¹). 56A: Mikroskopisches Bild der APAP-GSH Verteilung. Skala: 100 µm. 56B: MALDI-MSI/MS Fragmente (Sezgin 2018)

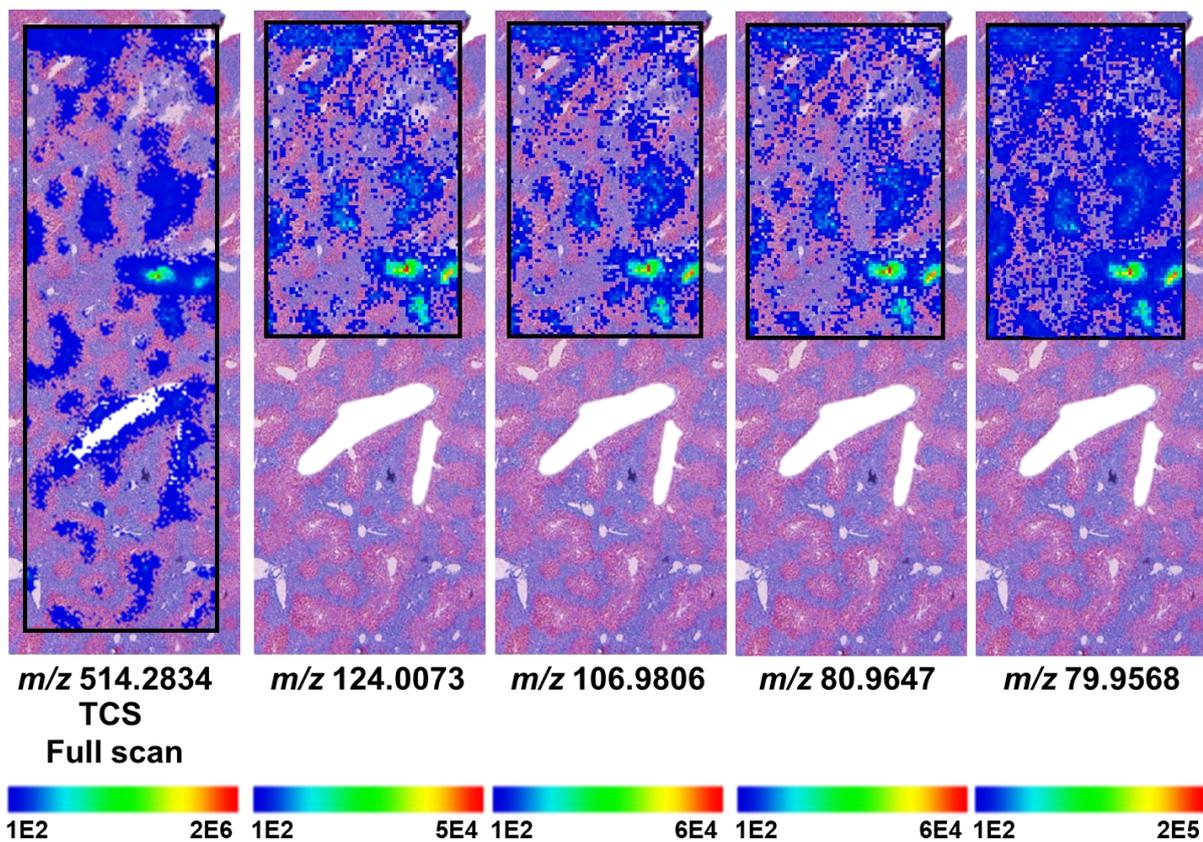


Abbildung 57: MALDI-MSI/MS Ergebnisse für APAP-GSH vom Positivkontrollgewebe
 Spatiale Auflösung: 20 µm. 120 min nach APAP Injektion (Dosis: 300 mg kg⁻¹)

6.2.3 Zonale Partition für APAP-GSH und GSH

Tabelle 13: Semiquantifizierung von APAP-GSH Signalen in der PP und PC Zone der Leberlobule via MALDI MSI

Kinetisches Experiment (Dosis: 300 mg kg⁻¹) (Sezgin 2018).

Zeit nach der APAP Injektion [min]	Maus Nr.	APAP-GSH Intensität – PP [AU]*	APAP-GSH Intensität – PC [AU]*	Periportal/Pericentral [%]**
5	1	0.61	1.00	38 / 62
	2	1.04	0.85	55 / 45
	3	0.68	0.56	55 / 45
	4	1.05	0.96	52 / 48
Mittelwert		0.84	0.84	50 / 50
15	1	5.19	6.11	46 / 54
	2	3.28	3.50	48 / 52
	3	4.22	4.44	49 / 51
	4	0.84	1.01	45 / 55

Mittelwert		3.38	3.76	47 / 53
30	1	9.18	8.35	52 / 48
	2	9.35	10.54	47 / 53
	3	3.86	4.75	45 / 55
	4	2.42	2.55	49 / 51
Mittelwert		4.96	5.24	48 / 51
60	1	2.20	2.54	46 / 54
	2	2.87	3.19	47 / 53
	3	2.83	3.30	46 / 54
Mittelwert		2.64	3.01	47 / 53
120	1	1.62	2.79	42 / 58
	2	0.41	0.58	38 / 62
	3	0.11	0.18	48 / 52
	4	0.80	0.87	46 / 54
Mittelwert		0.74	1.10	41 / 59

*Berechnete durchschnittliche auf den TIC normierte Signalintensität multipliziert mit einem willkürlichen Faktor von 1E5. Werte gerundet.

**Werte gerundet.

Tabelle 14: Semiquantifizierung von GSH Signalen in der PP und PC Zone der Leberlobule via MALDI MSI

Kinetisches Experiment (Dosis: 300 mg kg⁻¹) (Sezgin 2018).

Zeit nach der APAP Injektion [min]	Maus Nr.	GSH Intensität – PP [AU]*	GSH Intensität – PC [AU]*	Periportal/Pericentral [%]**
0	1	6.59	7.47	47 / 53
	2	11.04	10.74	51 / 49
	3	9.33	10.04	48 / 52
Mittelwert		8.99	9.42	49 / 51
5	1	12.58	17.00	48 / 52
	2	12.29	13.20	49 / 51
	3	7.34	7.53	52 / 47
	4	7.80	7.07	52 / 48
Mittelwert		10.00	11.20	48 / 52
15	1	9.92	9.32	50 / 50
	2	7.68	7.57	52 / 48
	3	13.57	12.75	49 / 51
	4	1.54	1.60	59 / 41
Mittelwert		8.18	7.81	51 / 49
30	1	3.09	2.17	58 / 42
	2	1.10	0.81	54 / 46
	3	0.39	0.33	49 / 51
	4	0.53	0.54	67 / 33
Mittelwert		1.02	0.77	55 / 45

60	1	0.84	0.41	52 / 48
	2	1.38	1.27	63 / 37
	3	0.69	0.40	66 / 34
Mittelwert		0.97	0.69	61 / 39
120	1	0.90	0.47	62 / 38
	2	0.26	0.25	60 / 40
	3	0.25	0.15	54 / 46
	4	0.03	0.02	50 / 50
Mittelwert		0.31	0.22	60 / 40
240	1	5.08	4.34	51 / 49
	2	5.77	5.95	55 / 45
	3	1.95	1.88	53 / 47
Mittelwert		4.27	4.06	51 / 49
480	1	19.70	16.28	53 / 47
	2	20.00	18.02	47 / 53
	3	21.15	21.00	51 / 49
	4	15.91	14.10	48 / 52
Mittelwert		19.19	17.35	53 / 47

*Berechnete durchschnittliche auf den TIC normierte Signalintensität multipliziert mit einem willkürlichen Faktor von 1E5. Werte gerundet.

**Werte gerundet

6.3 Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit

Teile von dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht: Sezgin, S., Hassan, R., Zühlke, S., Kuepfer, L., Hengstler, J. G., Spiteller, M., Ghallab A., Spatio-temporal visualization of the distribution of acetaminophen as well as its metabolites and adducts in mouse livers by MALDI MSI, *Arch. Toxicol.* 2018; 92(9), 2963–2977. Sofern sinnngemäße Abschnitte und modifizierte Abbildungen übernommen wurden, wurden diese durch die Angabe der Literaturstelle kenntlich gemacht.

6.4 Abkürzungsverzeichnis

Es wurden in dieser Doktorarbeit eine Reihe von Abkürzungen und Symbolen für bestimmte Begrifflichkeiten sowie Maßeinheiten verwendet. Einige von diesen Begrifflichkeiten wurden im englischen Original belassen. Deutschsprachige Abkürzungen, die im Kasus Genitiv verwendet wurden, wurden mit dem Suffix „-s“ erweitert.

<: kleiner als

>: größer als

~: ungefähr

@: *engl.* „at“ (bei)

Å: Ångström [Längeneinheit]

AAC: 9-Aminoacridin

Abb.: Abbildung(en)

AcN: Acetonitril

ALT: Alanin-Aminotransferase

amol: Attomol

APAP: Acetaminophen

APAP-CYS: 3-Cysteinyl Acetaminophen

APAP-GLC: Acetaminophen Glucuronid

APAP-GSH: Acetaminophen Glutathion Konjugat

APAP-NAC: *N*-acetyl-3-cysteinyl Acetaminophen

APAP-OME: 3-Methoxy acetaminophen

APAP-SUL: Acetaminophen Sulfat

aq: *lat.* aqua (zu deutsch etwa: in wässriger Lösung)

AS: Ameisensäure

AST: Aspartat-Aminotransferase

AUC: *engl.* Area under the Curve (Fläche unter der Kurve)

bzgl.: bezüglich

ca.: Circa

CID: *engl.* Collision induced dissociation (Kollisionsinduzierte Dissoziation)

CYP: Cytochrom(e) P450

Da: Dalton [Masseneinheit]

DHB: 2,5-Dihydroxizimtsäure

Di-APAP: Di-Acetaminophen

DMAN: *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,8-naphthalindiamin) und AAC (9-Aminoacridin)

E_{1-N}: Dekadischer Wert

engl.: Englisch

ESI: Elektrosprayionisation

fmol: Femtomol [Stoffmengen-/Konzentrationsangabe]
GC: Gaschromatographie
GLN: Glutamin
GSH: Glutathion (reduziert)
GSSG: Glutathion (oxidiert)
h: *lat.* hora (Stunde)
H₂O₂: Wasserstoffperoxid
H₂S: "Dihydrogensulfid"/Schwefelwasserstoff
HCCA: α-Cyano-4-hydroxizimtsäure
HCD: *engl.* Higher-Energy Collisional Dissociation
HCl: "Hydrogenchlorid"/Salzsäure
HE: Hämatoxylin-Eosin
HILIC: *engl.* Hydrophilic Interaction Chromatography (zu deutsch etwa: Hydrophile Wechselwirkungs-Chromatographie)
HPLC-MS: *engl.* High performance liquid chromatography mass spectrometry, Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
HR: *engl.* High resolution (Hochauflösung, hoch aufgelöst)
IfaDO: Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der Technischen Universität Dortmund
imzML: *engl.* Imaging mass spectrometry data format
INFU: Institut für Umweltforschung (an der TU Dortmund)
i.p.: intraperitoneal
IS: Interner Standard
kV: Kilovolt
LOD: *engl.* limit of detection (Detektionslimit)
LOQ: *engl.* limit of quantitation (Quantifizierungslimit)
(μ/m)L: (Micro/Milli)liter [Volumeneinheit]
μm: Mikrometer [Längeneinheit]
m/z: Masse zu Ladungsverhältnis
M: Molar(e) (Konzentration) (mol/L) oder Molekülonenpeak (s. Zusammenhang)
MALDI-MSI: *engl.* Matrix assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging (Bildgebende Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie)
MBT: 2-Mercaptobenzothiazol

MeOH: Methanol
min: Minuten [Zeiteinheit]
Mio.: Millionen
mmol: Millimol [Stoffmengen-/Konzentrationsangabe]
MRT: Magnetresonanztomographie
MS/MS: Tandem Massenspektrometrie (Modus: einfach)
MZ: *engl.* Midzonal (Mittlere Zone)
mzML: *engl.* Mass spectrometry data format
nmol: Nanomol [Stoffmengen-/Konzentrationsangabe]
ns: Nanosekunden [Zeiteinheit]
NMR: *engl.* nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
p: Para(position)
PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC: *engl.* Pericentral zone (Pericentrale Zone)
PP: *engl.* Periportal zone (Periportale Zone)
ppm: parts per million
quant: Quantitativ(e)
RNS: *engl.* Reactive Nitrogen Species (Reaktive Stickstoffspezies)
ROI: *engl.* Region of Interest (Ausgewähltes Segment)
ROS: *engl.* Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
RP: *engl.* Reversed phase (Umkehrphase)
RT: Raumtemperatur
R_t: Retentionszeit
s.: siehe
SET: *engl.* Single-Electron Transfer (Einelektronentransfer)
SULT: Sulfotransferase
Std.: Standard (Referenz, intern oder extern)
TAU: Taurin
TCS: Taurocholsäure
TCDS: Taurochenodeoxycholsäure
TEC: *engl.* Tissue extinction coefficient („Gewebeextinktionskoeffizient“)
TFS: Trifluoressigsäure

TIC: *engl.* Total Ion Current (Totalionenstrom)

TM: Trademark

u.a.: unter Anderem

UDP-GT: Uridin-5'-diphosphoglucuronosyltransferase

U/l: Aktivitätseinheit pro Volumeneinheit Blutserum (Messwert für ALT bzw. AST)

Vol.-%: Volumenprozent [Stoffmengen-/Konzentrationsangabe]

XIC: *engl.* Extracted Ion Chromatogram (zu deutsch etwa "Extrahiertes" Ionenchromatogramm)

6.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Metabolismus des Acetaminophens in Säugetieren	21
Abbildung 2: Aufbau eines Leberläppchens und des Lebergewebes mit schematisch dargestellter metabolischer Zonierung.....	24
Abbildung 3: APAP und Addukte vom Aktivierungspfad über die Bildung des NAPQIs.	31
Abbildung 4: APAP und Metaboliten vom Phase-II Metabolismus.....	32
Abbildung 5: Bedeutende Verbindungen für Stoffwechselfvorgänge in der Leber... ..	33
Abbildung 6: NAPQI in PBS- und methanolischer Lösung verglichen mit APAP in MeOH	34
Abbildung 7: Mögliche Übergänge zwischen APAP und NAPQI.....	37
Abbildung 8: Di-APAP aus NAPQI.....	38
Abbildung 9: Tri-APAP aus NAPQI	39
Abbildung 10: Tetra-APAP aus NAPQI	40
Abbildung 11: Penta-APAP aus NAPQI.....	40
Abbildung 12: Hexa-APAP aus NAPQI.....	41
Abbildung 13: Hepta-APAP aus NAPQI.....	42
Abbildung 14: Okta-APAP aus NAPQI.....	43
Abbildung 15: MALDI MSI Ergebnisse von der Tropfenauftragung auf Mauslebergewebe (Negativkontrolle)	47
Abbildung 16: MALDI MSI Ergebnisse vom Mauslebergewebe (Positivkontrolle) ..	48
Abbildung 17: TIC-Chromatogramme zum photochemischen Derivatisierungsversuch	50

Abbildung 18: Massenspektrum des entstehenden Produkts aus dem NAPQI mit der R_t 4,15 min in wässriger H_2O_2 -Lösung ohne Bestrahlung.....	50
Abbildung 19: Anlage zur Derivatisierung mit H_2S in einer Begasungskammer	52
Abbildung 20: XIC-Chromatogramme zur Reaktion von NAPQI mit H_2S	54
Abbildung 21: Massenspektren zu den Produkten aus der Reaktionslösung von NAPQI mit H_2S	54
Abbildung 22: Erzeugung von Sets an Leberschnitten für die histochemischen Färbeverfahren und für das MALDI-MSI Experiment.....	61
Abbildung 23: Untersuchung von Masseninterferenzen und Artefaktbildung.....	66
Abbildung 24: XICs der Substanzen APAP, APAP-D4, APAP-SUL, APAP-SUL-D3, APAP-GLC gemessen aus einer Blutplasmaprobe von der Portalvene einer Maus.	73
Abbildung 25: XICs der Substanzen APAP-OME, APAP-NAC, APAP-CYS, APAP-GSH, APAP-GSH-D3 gemessen aus einer Blutplasmaprobe von der Portalvene einer Maus.....	74
Abbildung 26: XICs der Substanzen TCS, TCDS und TCS-D5 gemessen aus einer Blutplasmaprobe von der Portalvene einer Maus	74
Abbildung 27: Darstellung des kinetischen und dosisabhängigen Experiments	76
Abbildung 28: Makropathologie von Versuchstieren mit einer verabreichten APAP-Dosis von 450 mg kg^{-1}	78
Abbildung 29: Toxizität von APAP in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP-Injektion	81
Abbildung 30: Quantitative HPLC-MS Analyse von APAP, seinen Metaboliten und Addukten im Blutplasma in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP Injektion	83
Abbildung 31: Quantitative HPLC-MS Analyse von TCS und TCDS im Blutplasma in Abhängigkeit von der Zeit nach der APAP Injektion	85
Abbildung 32: MALDI-MSI Analyse zur Verteilung von APAP im kinetischen Experiment	87
Abbildung 33: MALDI-MSI Analyse zur Verteilung von APAP-GLC im kinetischen Experiment	88
Abbildung 34: MALDI-MSI Analyse zur Verteilung von APAP-SUL im kinetischen Experiment	89
Abbildung 35: MALDI-MSI Analyse zur Verteilung von APAP-GSH im kinetischen Experiment	91

Abbildung 36: MALDI-MSI Analyse zur Verteilung von GSH im kinetischen Experiment	92
Abbildung 37: Gegenüberstellung der MALDI-MSI Ergebnisse für GSH und APAP-GSH.....	95
Abbildung 38: MALDI-MSI Analyse zur Verteilung von TCS und seinen möglichen Isomeren im kinetischen Experiment.....	97
Abbildung 39: MALDI-MSI Analyse der Verteilung von TCDS und seinen möglichen Isomeren im kinetischen Experiment.....	98
Abbildung 40: MALDI-MSI Analyse der Verteilung von TCS und seinen möglichen Isomeren mit unterschiedlichen Intensitätsfiltern	100
Abbildung 41: MALDI-MSI Analyse zum Vergleich der Verteilung von TCS (und möglichen Isomeren) und von APAP-GSH, APAP-SUL und APAP-GLC	104
Abbildung 42: CYP2E1 immunhistochemische Färbung im dosisabhängigen Experiment	106
Abbildung 43: Quantitative HPLC-MS Analyse von APAP, seinen Metaboliten und Addukten im Blutplasma im dosisabhängigen Experiment	108
Abbildung 44: Quantitative HPLC-MS Analyse von TCS und TCDS im Blutplasma im dosisabhängigen Experiment	109
Abbildung 45: MALDI-MSI Analyse von APAP und seinen Transformationsprodukten im dosisabhängigen Experiment.....	111
Abbildung 46: MALDI-MSI Analyse von TCS und möglichen Isomeren im dosisabhängigen Experiment	112
Abbildung 47: Sezierung der Versuchsmäuse und Isolation der Leberproben	133
Abbildung 48: Unbearbeitete Leberschnittoberfläche, topographisches Profil des rot markierten Bereiches und ein repräsentatives Bild einer matrixgesprühten und mit 20 µm spatialer Scanauflösung gemessenen Leberschnittprobe	134
Abbildung 49: Experimentelle Anleitung zur Extraktion der Plasma-Proben.....	137
Abbildung 50: Abschätzung der On-Tissue LODs auf dem Lebergewebe von Mäusen für APAP, APAP-GLC, APAP-GSH, APAP-SUL und TCS.....	148
Abbildung 51: Produkte aus dem NAPQI in einer PBS Lösung mit GSH.....	149
Abbildung 52: MS ² und MS ³ Fragmentationenspektren und vorgeschlagene Fragmentierungspfade für die Produkte aus der Reaktion von NAPQI mit H ₂ S (S ²⁻)	155

Abbildung 53: Ionendichtebilder mit ausschließlich von H ₂ S begasten Probenoberflächen gemessenen m/z	156
Abbildung 54: MALDI-MSI und quant-HPLC-MS Daten zum Nebenmetaboliten APAP-OME.....	158
Abbildung 55: und TCS von Referenzstandardtropfen auf Negativkontrollgewebe	159
Abbildung 56: MALDI-MSI/MS Ergebnisse für APAP-GSH vom Positivkontrollgewebe	159
Abbildung 57: MALDI-MSI/MS Ergebnisse für APAP-GSH vom Positivkontrollgewebe	160

6.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: MALDI-MS-Matrixscreening für die Analyten via Premix-Verfahren auf Edelstahlplatte	58
Tabelle 2: Gemittelte relative Signalintensitäten aus den TIC-normalisierten Durchschnittssignalintensitäten der Tropfenflächen (n = 3) geordnet nach Artefakten aus den jeweiligen Analyten	68
Tabelle 3: Chromatographischer Gradient für die analytische HPLC Methode.....	139
Tabelle 4: Chromatographischer Gradient für die HPLC Waschmethode.....	139
Tabelle 5: Summenformeln, Quasimolekülonen, monoisotopische Massen, und Retentionszeiten der über HPLC-MS quantifizierten Substanzen	140
Tabelle 6: Chemikalienverzeichnis.....	143
Tabelle 7: Materialverzeichnis	144
Tabelle 8: Geräteverzeichnis	144
Tabelle 9: NAPQI Transformationsprodukte in PBS bzw. Methanol	146
Tabelle 10: Auf die Tropfenfläche normierte geschätzte On-Tissue LOD für die Analyten.....	147
Tabelle 11: Vorläufig zugeordnete Transformationsprodukte des NAPQIs in Lösung aus der Reaktion mit H ₂ S	150
Tabelle 12: Pharmakokinetische Parameter für die Analyten in Mäusen	157
Tabelle 13: Semiquantifizierung von APAP-GSH Signalen in der PP und PC Zone der Leberlobule via MALDI MSI	160
Tabelle 14: Semiquantifizierung von GSH Signalen in der PP und PC Zone der Leberlobule via MALDI MSI	161

7. Bibliografie

Aichler, M., Walch, A., MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice, *Lab Invest.* 2015; 95(4):422-31. doi: 10.1038/labinvest.2014.156.

Akakpo, J. Y., Ramachandran, A., Kandel, S. E., Ni, H. M., Kumer, S. C., Rumack, B. H., Jaeschke, H., 4-Methylpyrazole protects against acetaminophen hepatotoxicity in mice and in primary human hepatocytes, *Hum Exp Toxicol.* 2018; 37(12):1310-1322. doi: 10.1177/0960327118774902.

Alexandrov, T., MALDI imaging mass spectrometry: statistical data analysis and current computational challenges, *BMC Bioinformatics.* 2012; 13(Suppl 16): S11.

Allen, J. W., Bhatia, S. N., Formation of steady-state oxygen gradients in vitro: application to liver zonation, *Biotechnol Bioeng.* 2003; 82:253–262.

An, J. H., Lee, H. J., Jung, B. H., Quantitative analysis of acetaminophen and its six metabolites in rat plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry *Biomed Chromatogr.* 2012; 26(12):1596–1604. <https://doi.org/10.1002/bmc.2737>.

Anderson, B. J., Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action, *Paediatr Anaesth.* 2008 18(10), 915–921, doi:10.1111/j.1460-9592.2008.02764.x

Bales, J. R., Sadler, P. J., Nicholson, J. K., Timbrell, J. A., Urinary excretion of acetaminophen and its metabolites as studied by proton NMR spectroscopy, *Clin Chem.* 1984; 30(10):1631-6.

Basu, S. S., Regan, M. S., Randall, E. C., Abdelmoula, W. M., Clark, A. R., Gimenez-Cassina Lopez, B., Cornett, D. S., Haase, A., Santagata, S., Agar, N. Y. R., Rapid MALDI mass spectrometry imaging for surgical pathology, *NPJ Precis Oncol.* 2019; 3:17. doi: 10.1038/s41698-019-0089-y.

Bauscher M., Maentele, W., Electrochemical and infrared-spectroscopic characterization of redox reactions of p-quinones, *J. Phys. Chem.* 1992; 96 (26), 11101–11108.

Bechstein, W. O., Schnitzbauer, A. A., Expertise Allgemein- und Viszeralchirurgie – Leber und Gallenwege, Thieme Verlag Bechstein/Schnitzbauer, Leber und Gallenwege, 2018, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, Deutschland.

Becker H., Vogel H., The Role of Hydroquinone Monomethyl Ether in the Stabilization of Acrylic Acid, *Chem Eng Technol.* 2006; 29(10):1227-1231.

Bemis, K. D., Harry, A., Eberlin, L. S., Ferreira, C., van de Ven, S. M., Mallick, P., Stolowitz, M., Vitek, O., Cardinal: an R package for statistical analysis of mass spectrometry-based imaging experiments, *Bioinformatics.* 2015; 31(14):2418-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btv146.

Berry, K. A., Hankin, J. A., Barkley, R. M., Spraggins, J. M., Caprioli, R. M., Murphy, R. C., MALDI imaging of lipid biochemistry in tissues by mass spectrometry, *Chem Rev.* 2011;111(10):6491-512. doi: 10.1021/cr200280p.

Bonnel, D., Legouffe, R., Willand, N., Baulard, A., Hamm, G., Deprez, B., Stauber, J., MALDI imaging techniques dedicated to drug-distribution studies, *Bioanalysis.* 2011, 3(12):1399-406. doi: 10.4155/bio.11.88.

Börnßen, K. O., Influence of salts, buffers, detergents, solvents, and matrices on MALDI-MS protein analysis in complex mixtures, *Methods Mol Biol.* 2000; 146: 387-404.

Bouschen, W., Schulz, O., Eikel, D., Spengler, B., Matrix vapor deposition/recrystallization and dedicated spray preparation for high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (SMALDI-MS) of tissue and single cells, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010; 24(3):355-64. doi: 10.1002/rcm.4401.

Boyer, J. L., Bile Formation and Secretion, *Compr Physiol.* 2013; 3(3):1035-78. doi: 10.1002/cphy.c120027.

Brovedan, M. A., Molinas, S. M., Pisani, G. B., Monasterolo, L. A., Trumper, L., Glutamine protection in an experimental model of acetaminophen nephrotoxicity, *Can J Physiol Pharmacol.* 2018; 96(4):366-371. doi: 10.1139/cjpp-2017-0423.

Chen, C., Krausz, K. W., Idle, J. R., Gonzalez, F. J., Identification of novel toxicity-associated metabolites by metabolomics and mass isotopomer analysis of acetaminophen metabolism in wild-type and Cyp2e1-null mice, *J Biol Chem.* 2008; 283(8):4543-59.

Chen, C., Hennig, G. E., Manautou, J. E., Hepatobiliary excretion of acetaminophen glutathione conjugate and its derivatives in transport-deficient (TR-) hyperbilirubinemic rats, *Drug Metab Dispos* 2003; 31(6):798–804.

Chiang, J. Y. L., Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy, *Liver Research* 2017; 1: 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2017.05.001>.

Chumbley, C. W., Reyzer, M. L., Allen, J. L., Marriner, G. A., Via, L. E., Barry, C. E., Caprioli, R. M., Absolute Quantitative MALDI Imaging Mass Spectrometry: A Case of Rifampicin in Liver Tissues, *Anal Chem.* 2016; 88(4):2392-8. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04409.

Cook, S. F., King, A. D., van den Anker, J. N., Wilkins, D. G., Simultaneous quantification of acetaminophen and five acetaminophen metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: Method validation and application to a neonatal pharmacokinetic study, *J Chromatogr B* 2015, 1007:30-42. doi:10.1016/j.jchromb.2015.10.013.

Dahlin, D. C., Mechanisms of Oxidation of acetaminophen, Dissertation, 1984; University of Washington, USA.

Duenas, M. E., Essner, J. J., Lee, Y. J. 3D MALDI mass spectrometry imaging of a single cell: spatial mapping of lipids in the embryonic development of zebrafish. *Sci. Rep.* 2017, 14946. 22.

Ellis, S. R., Bruinen, A. L., Heeren, R. M., A critical evaluation of the current state-of-the-art in quantitative imaging mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.* 2014; 406(5):1275-89. doi: 10.1007/s00216-013-7478-9.

Fischer V., Mason, R. P., Stable Free Radical and Benzoquinone Imine Metabolites of an Acetaminophen Analogue, *J Biol Chem.* 1984; 259(16):10284-8.

Fisher, V., West, P. R., Harman, L. S., Mason, R. P., Free-Radical Metabolites of Acetaminophen and a Demethylated Derivative, *Environ Health Pers.* 1985; 64,127-137.

Flower, R. J., Vane, J. R., Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol), *Nature.* 1972; 240(5381), 410–411.

*Franck, J., Arafah, K., Elayed, M., Bonnel, D., Vergara, D., Jacquet, A., Vinatier, D., Wisztorski, M., Day, R., Fournier, I., Salzet, M., MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics, *Mol Cell Proteomics* 2009; 8(9):2023-33. doi: 10.1074/mcp.R800016-MCP200.

** Franck, J., Ayed M. E., Wisztorski, M., Salzet, M., Fournier, I., On-Tissue N-Terminal Peptide Derivatizations for Enhancing Protein Identification in MALDI Mass Spectrometric Imaging Strategies, *Anal. Chem.* 2009; 81 (20): 8305–8317.

Ghaffarzadegan, T., Essén, S., Verbrugghe, P., Marungruang, N., Hållenius, F. F., Nyman, M., Sandahl, M., Determination of free and conjugated bile acids in serum of Apoe(-/-) mice fed different lingonberry fractions by UHPLC-MS, *Scient. Rep.* 2019; 9(3800): 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40272-8>.

Ghallab, A., Cellière, G., Henkel, S. G., et. al., Model-guided identification of a therapeutic strategy to reduce hyperammonemia in liver diseases, *J Hepatol.* 2016; 64(4):860-71. doi: 10.1016/j.jhep.2015.11.018.

Ghallab, A., Hofmann, U., Sezgin, S., Vartak, N., Hassan, R., Zaza, A., Godoy, P., Schneider, K., Guenther, G., Ahmed, Y., Abbas, A., Keitel, V., Kuepfer, L., Dooley, S., Lammert, F., Trautwein, C., Spiteller, M., Drasdo, D., Hofmann, A., Jansen, P., Hengstler, J., Reif, R., Bile micro-infarcts in cholestasis are initiated by rupture of the apical hepatocyte membrane and cause shunting of bile to sinusoidal blood, *Hepatology* 2019; 69(2), 666-683. doi: 10.1002/hep.30213.

Godoy, P., Hewitt, N.J., Albrecht, U., Anderson, M.E., Ansari, N., Bhattacharya, S., et. al., Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME, *Arch Toxicol.* 2013; 87(8):1315-530. doi: 10.1007/s00204-013-1078-5.

Goodwin, R. J., Pennington, S. R., Pitt, A. R., Protein and peptides in pictures: imaging with MALDI mass spectrometry, *Proteomics* 2008; 8(18):3785-800. doi: 10.1002/pmic.200800320.

Goodwin, R. J., Nilsson, A., Mackay, C. L., Swales, J. G., Johansson, M. K., Billger M5, Andrén, P. E., Iverson, S. L., Exemplifying the Screening Power of Mass Spectrometry Imaging over Label-Based Technologies for Simultaneous Monitoring of

Drug and Metabolite Distributions in Tissue Sections, *J Biomol Screen*. 2016; 21(2):187-93. doi: 10.1177/1087057115623740.

Ghosh, P., Sengupta, P. K., Mukherjee, N., Photopolymerization of methyl methacrylate using hydrogen peroxide as the Photoinitiator, *Polymer Chemistry* 1979, 17(7), 2119-2127.

Gregus, Z., Madhu, C., and Klaassen, C.D., Species variation in toxification and detoxification of acetaminophen in vivo: a comparative study of biliary and urinary excretion of acetaminophen metabolites, *J Pharmacol Exp Ther*, 1988, 244:91–99.

Groseclose, M.R., Massion, P. P., Chaurand, P., Caprioli, R. M., High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry, *Proteomics* 2008; 8(18):3715-24. doi: 10.1002/pmic.200800495.

Gross, J. H., MALDI, *Massenspektrometrie – Ein Lehrbuch*, 2013; 546-599, Zweite Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Guengerich, F. P., Yun, C. H., Macdonald, T. L., Evidence for a 1-electron oxidation mechanism in N-dealkylation of *N,N*-dialkylanilines by cytochrome P450 2B1. Kinetic hydrogen isotope effects, linear free energy relationships, comparisons with horseradish peroxidase, and studies with oxygen surrogates, *J Biol Chem*. 1996; 271(44):27321-9.

Guengerich, F. P., Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview, *J Biochem Mol Toxicol*. 2007; 21(4):163-8.

Gülmez, S. E., Larrey, D., Pageaux, G. P., Bernuau, J., Bissoli, F., Horsmans, Y., Thorburn, D., McCormick, P. A., Stricker, B., Toussi, M., Lignot-Maleyran, S., Micon, S., Hamoud, F., Lassalle, R., Jové, J., Blin, P., Moore, N., Liver transplant associated with paracetamol overdose: results from the seven-country SALT study, *Br J Clin Pharmacol*. 2015; 80(3):599-606. doi: 10.1111/bcp.12635.

Hadi, M., Dragovic, S., van Swelm, R., Herpers, B., van de Water, B., Russel F. G., Commandeur, J. N., Groothuis, G. M., AMAP, the alleged non-toxic isomer of acetaminophen, is toxic in rat and human liver, *Arch Toxicol*. 2013; 87(1):155-65. doi: 10.1007/s00204-012-0924-1.

- Hamm, G., Bonnel, D., Legouffe, R., Pamelard, F., Delbos, J-M., Bouzom, F., Stauber, J., Quantitative mass spectrometry imaging of propranolol and olanzapine using tissue extinction calculation as normalization factor. *J Proteom* 2012. 75(16):4952–4961. doi:10.1016/j.jprot.2012.07.035.
- Heard, K. J., Acetylcysteine for Acetaminophen Poisoning, *N Engl J Med*. 2008; 359(3): 285–292. doi: 10.1056/NEJMct0708278.
- Hemström, P., Irgum K., Review: Hydrophilic Interaction Chromatography, *J. Sep. Sci.* 2006; 29(12):1784–1821. doi:10.1002/jssc.200600199. PMID 16970185.
- Hinson, J. A., Pohl, L. R., Monks, T. J., Gillette, J. R., Minireview: acetaminophen-induced hepatotoxicity., *Life Sci.* 1981; 29: 107-116.
- Hinson, J. A., Pike, S. L., Pumford, N. R., Mayeux, P. R., Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 1998, 11:604–607.
- Hinson, J. A., Reid, A. B., McCullough, S. S., James, L. P., Reid A. B., McCullough, S. S, James LP., *Drug Metab Rev.* 2004; 36(3-4):805-22.
- Hinz, B., Cheremina, O., Brune, K., Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man, *FASEB J.* 2008; 22(2):383-90.
- Hodgman, M. J., Garrard, A. R., A review of acetaminophen poisoning. *Crit Care Clin.* 2012; 28:499–516.
- Hoehme, S., Hengstler, J. G., Brulport, M., Schäfer, M., Bauer, A, Gebhardt, R., Drasdo, D., Mathematical modelling of liver regeneration after intoxication with CCl₄, *Chem Biol Interact.* 2007; 168(1):74-93.
- Hoehme, S., Brulport, M., Bauer, A., Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci.* 2010, 107(23):10371–10376. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909374107>.
- Hong, R. W., Rounds, J. D., Helton, W. S., Robinson, M. K., Wilmore, D. W., Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury, *Ann Surg.* 1992; 215(2):114-9.

Hu, J., Ramshesh, V. K., McGill, M. R., Jaeschke, H., Lemasters, J. J. Low dose acetaminophen induces reversible mitochondrial dysfunction associated with transient c-Jun N-terminal kinase activation in mouse liver, *Toxicol Sci.* 2016; 150(1):204–215. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv319>.

Hui, Y., Erin G., Lingjun L., A Vision for Better Health: Mass Spectrometry Imaging for Clinical Diagnostics, *Clin Chim Acta.* 2013; 420: 11–22.

Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D., Lemasters, J. J., Mechanisms of hepatotoxicity, *Toxicol Sci.* 2002; 65(2):166-76.

Jan, Y. H., Heck, D. E., Dragomir, A. C., Gardner, C. R., Laskin, D. L., Laskin, J. D., Acetaminophen reactive intermediates target hepatic thioredoxin reductase, *Chem Res Toxicol.* 2014; 27(5):882-94. doi: 10.1021/tx5000443.

Kadatz, R., Ueberberg, H., Pharmacological and toxicological studies of a new analgesic and antiphlogistic agent, 2-(2-methoxy-ethoxy)-5-acetaminoacetophenone. *Arzneimittelforschung.* 1965; 15(5):520-4.

Källback, P., Nilsson, A., Shariatgorji, M., Andrén, P. E., msiQuant--Quantitation Software for Mass Spectrometry Imaging Enabling Fast Access, Visualization, and Analysis of Large Data Sets, *Anal Chem.* 2016; 88(8):4346-53. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04603.

Kaya, I., Jennische, E., Lange, S., Malmberg P., Dual polarity MALDI imaging mass spectrometry on the same pixel points reveals spatial lipid localizations at high-spatial resolutions in rat small intestine, *Anal. Methods* 2018; 10: 2428-2435.

Knight, T. R., Kurtz, A., Bajt, M. L., Hinson, J. A., Jaeschke, H., Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: role of mitochondrial oxidant stress, *Toxicol Sci.*, 2001; 62(2):212-20.

Kompauer, M., Heiles, S., Spengler, B., Autofocusing MALDI mass spectrometry imaging of tissue sections and 3D chemical topography of nonflat surfaces, *Nat Methods* 2017; 14(12):1156-1158. doi: 10.1038/nmeth.4433.

Lagarrigue, M., Lavigne, R., Tabet, E., Genet, V., Thomé, J. P., Rondel, K., Guével, B., Multigner, L., Samson, M., Pineau, C., Localization and in situ absolute

quantification of chlordecone in the mouse liver by MALDI imaging, *Anal Chem.* 2014; 86(12):5775-83. doi: 10.1021/ac500313s.

Leopold J., Popkova Y., Engel K. M., Schiller, J., Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Lipids, *Biomolecules*, 2018; 8(4): 173.

Li, F. C., Huang, G. T., Lin, C. J., Wang, S. S., Sun, T. L., Lo, S. Y., Lo, W., Chiou, L. L., Dong, C. Y., Lee, H. S., Apical membrane rupture and backward bile flooding in acetaminophen-induced hepatocyte necrosis, *Cell Death Dis.* 2. 2011; e183. doi: 10.1038/cddis.2011.68.

Martin, N.C., McCullough, C. T., Bush, P. G., Sharp, L., Hall, A. C., Harrison, D. J.; Functional analysis of mouse hepatocytes differing in DNA content: volume, receptor expression, and effect of IFN γ , *J Cell Physiol.* 2002;191(2):138-44.

Martinez, M. N., Amidon, G. L., A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals, *J Clin Pharmacol.* 2002, 42(6):620-43.

Mazaleuskaya, L. L., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., FitzGerald, G. A., Altman, R. B., Klein, T. E., PharmGKB summary: pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses, *Pharmacogenet Genomics.* 2015; 25(8):416-26. doi: 10.1097/FPC.0000000000000150.

McDonnell, L A., van Remoortere, A., van Zeijl, R. J. M., Dalebout, H., Bladergroen, M. R., Deelder, A. M., Automated imaging MS: Toward high throughput imaging mass spectrometry, *J Proteomics.* 2010; 73(6):1279-82. doi: 10.1016/j.jprot.2009.10.011.

McGill, M. R., Williams, C. D., Xie. Y., Ramachandran, A., Jaeschke, H. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 264(3):387–394. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.08.015>.

Mello, T., Zanieri, F., Ceni, E., Galli, A., Oxidative Stress in the Healthy and Wounded Hepatocyte: A Cellular Organelles Perspective, *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 8327410. doi: 10.1155/2016/8327410.

Mok, H. Y., Von Bergmann, K., Grundy, S. M., Regulation of pool size of bile acids in man, *Gastroenterology* 1977; 73(4): 684-690.

Mutlib, A. E., Goosen, T. C., Bauman, J. N., Williams, J. A., Kulkarni, S., Kostrubsky, S., Kinetics of acetaminophen glucuronidation by UDP-glucuronosyltransferases 1A1, 1A6, 1A9 and 2B15. Potential implications in acetaminophen-induced hepatotoxicity, *Chem Res Toxicol.* 2006; 19(5):701-9.

New, L. S., Chan, E. C., Evaluation of BEH C18, BEH HILIC, and HSS T3 (C18) column chemistries for the UPLC-MS-MS analysis of glutathione, glutathione disulfide, and Ophthalmic Acid in Mouse Liver and Human Plasma and ophthalmic acid in mouse liver and human plasma, *J Chromatogr Sci.*, 2008; 46(3):209–214.

Palmer, A., Trede, D., Alexandrov, T., Where imaging mass spectrometry stands: here are the numbers, *Metabolomics.* 2016, 12:107.

Parkinson, A., Ogilvie B. W., Buckley D. B., Kazmi, F., Czerwinski, M., Parkinson O. Chapter 6; Biotransformation of Xenobiotics, in: *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 2013; Eighth Edition, McGraw-Hill Education, New York City, USA.

Parry, R. M., Galhena, A. S., Gamage, C. M., Bennett, R. V., Wang, M. D., Fernández, F. M., omniSpect: an open MATLAB-based tool for visualization and analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization and desorption electrospray ionization mass spectrometry images, *J Am Soc Mass Spectrom.* 2013; 24(4):646-9. doi: 10.1007/s13361-012-0572-y.

Paschke, C., Leisner, A., Hester, A., Maass, K., Guenther, S., Bouschen, W., Spengler, B., Mirion - a software package for automatic processing of mass spectrometric images, *J Am Soc Mass Spectrom.* 2013; 24(8):1296-306. doi: 10.1007/s13361-013-0667-0.

Perez, M. J., Briz, O., Bile-acid-induced cell injury and protection, *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1677–1689.

Pickering, G., Estève, V., Loriot, M. A., Eschalier, A., Dubray, C., Acetaminophen reinforces descending inhibitory pain pathways, *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008; 84(1), 47–51.

Potter, D. W., Miller, D. W., Hinson J. A., Identification of acetaminophen polymerization products catalyzed by horseradish peroxidase, *J Biol Chem.* 1985; 260(22):12174-80.

Potter, D. W., Hinson J. A., Reactions of N-acetyl-p-benzoquinone imine with reduced glutathione, acetaminophen, and NADPH, *Mol Pharmacol.* 1986; 30(1):33-41.

Potter, D. W., Hinson J. A., Mechanisms of acetaminophen oxidation to N-acetyl-P-benzoquinone imine by horseradish peroxidase and cytochrome P-450, *J Biol Chem.* 1987; 262(3):966-73.

Ramachandran, A., Jaeschke, H., Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology, *J Clin Transl Res.* 2017; 3(1):157–169. <https://doi.org/10.18053/jctres.03.2017S.1.002>.

Roberts, R. A., Ganey, P. E., Ju, C., Kamendulis, L. M., Rusyn, I., Klaunig, J. E., Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis, *Toxicol Sci.* 2007; 96(1):2-15.

Robichaud, G., Garrard, K. P., Barry, J. A., Muddiman, D. C., MSiReader: an open-source interface to view and analyze high resolving power MS imaging files on Matlab platform, *J Am Soc Mass Spectrom.* 2013; 24(5):718-21. doi: 10.1007/s13361-013-0607-z.

Römpp, A., Spengler, B., Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space, *Histochem Cell Biol.* 2013; 139(6):759-83. doi: 10.1007/s00418-013-1097-6.

*Römpp, A., Both, J. P., Brunelle, A., Heeren, R. M., Laprévotte, O., Prideaux, B., Seyer, A., Spengler, B., Stoeckli, M., Smith, D. F., Mass spectrometry imaging of biological tissue: an approach for multicenter studies, *Anal Bioanal Chem.* 2015; 407(8):2329-35. doi: 10.1007/s00216-014-8410-7.

**Römpp, A., Wang, R., Albar, J. P., Urbani A., Hermjakob, H., Spengler, B., Vizcaíno, J. A., A public repository for mass spectrometry imaging data, *Anal Bioanal Chem.* 2015; 407(8): 2027–2033.

Roskams, T. A., Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: Canals, ductules, and ductular reactions in human livers, *Hepatology,* 2004; 39, 1739–1745.

Runge-Morris, M., Kocarek, T. A., Regulation of Sulfotransferase and UDP-Glucuronosyltransferase Gene Expression by the PPARs, *PPAR Research*, 2009; Article ID 728941, <http://dx.doi.org/10.1155/2009/728941>.

Sambrook, J., Maniatis, T., Russel, D.W., Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Verlag*. 2001; 3. Edition, ISBN 0-87969-577-3.

Schenk, A., Ghallab, A., Hofmann, U., Hassan, R., Schwarz, M., Schuppert, A., Schwen, L. O., Braeuning, A., Teutonico, D., Hengstler, J. G., Kuepfer, L., Physiologically based modelling in mice suggests an aggravated loss of clearance capacity after toxic liver damage, *Sci Rep* 2017; 7(1):6224. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04574-z>.

Schliess, F., Hoehme, S., Henkel, S. G., Ghallab, A., Driesch, D., Bottger, J., Integrated metabolic spatial-temporal model for the prediction of ammonia detoxification during liver damage and regeneration. *Hepatology*. 2014; 60:2040–2051.

Schober, Y., Guenther, S., Spengler, B., Römpf, A., Single cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging, *Anal Chem*. 2012; 84(15):6293-7. doi: 10.1021/ac301337h.

Schramm, T., Hester, A., Klinkert, I., Both, J. P., Heeren, R. M., Brunelle A, Laprévotte O, Desbenoit, N., Robbe, M. F., Stoeckli, M., Spengler, B., Römpf, A., imzML- a common data format for the flexible exchange and processing of mass spectrometry imaging data, *J Proteomics*. 2012; 75(16):5106-10. doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.026.

Schwartz, M., Meyer, B., Wirnitzer, B., Hopf, C., Standardized processing of MALDI imaging raw data for enhancement of weak analyte signals in mouse models of gastric cancer and Alzheimer's disease, *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407(8):2255-64. doi: 10.1007/s00216-014-8356-9.

Sezgin, S., Hochoaufgelöste bildgebende Massenspektrometrie: Optimierungen und Anwendungen, *Masterarbeit*, 2014; 1-131, Technische Universität Dortmund.

Sezgin, S., Hassan, R., Zühlke, S., Kuepfer, L., Hengstler, J. G., Spitteller, M., Ghallab A., Spatio-temporal visualization of the distribution of acetaminophen as well as its metabolites and adducts in mouse livers by MALDI MSI, *Arch. Toxicol*. 2018; 92(9), 2963–2977.

Shroff R., Rulíšek L., Doubský J., Svatoš A., Acid–base-driven matrix-assisted mass spectrometry for targeted metabolomics, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(25): 10092–10096.

Siegers, C. P., Rozman, K., Klaassen, C.D., Biliary excretion and enterohepatic circulation of paracetamol in the rat, *Xenobiotica* 1983; 13(10):591-596.

Smith, A. K., Petersen, B. K., Ropella, G. E., Competing mechanistic, hypotheses of acetaminophen-induced hepatotoxicity challenged by virtual experiments, *PLoS Comput Biol* 2016, 12(12):e1005253. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005253>.

Strupat, K., Karas, M., Hillenkamp, F., 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry, *Int Jour Mass Spectrom Ion Proc.*, 1991; 111, 89-102.

Teuber, K., Schiller, J., Fuchs, B., Karas, M., Jaskolla, T. W., Significant sensitivity improvements by matrix optimization: a MALDI-TOF mass spectrometric study of lipids from hen egg yolk, *Chem Phys Lipids*. 2010; 163(6):552-60. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2010.04.005.

Thiele, H., Heldmann, S., Trede, D., Strehlow, J., Wirtz, S., Dreher, W., Berger, J., Oetjen, J., Kobarg, J. H., Fischer, B., Maass, P., 2D and 3D MALDI-imaging: conceptual strategies for visualization and data mining, *Biochim Biophys Acta*. 2014;1844(1 Pt A):117-37. doi: 10.1016/j.bbapap.2013.01.040.

Trede, D., Kobarg, J. H., Oetjen, J., Thiele, H., Maass, P., Alexandrov, T., On the importance of mathematical methods for analysis of MALDI-imaging mass spectrometry data. *J Integr Bioinform*. 2012; 9(1):189. doi: 10.2390/biecoll-jib-2012-189.

Trettin, A. (2014a), Modun, D., Madunic, S., Vukovic, J., Radman, M., Batkai, S., Thum, T., Jordan, J., Tsikas, D., LC-MS/MS and GC-MS/MS measurement of plasma and urine di-paracetamol and 3-nitro-paracetamol: proof-of-concept studies on a novel human model of oxidative stress based on oral paracetamol administration, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014; 959:71-81. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.03.031.

Trettin, A. (2014b), Batkai, S., Thum T., Jordana J., Tsikas D., Trapping of NAPQI, the intermediate toxic paracetamol metabolite, by aqueous sulfide (S^{2-}) and analysis by GC–MS/MS, *Journal of Chromatography B* 2014; 963: 99–105.

Ucal, Y., Durer, Z. A., Atak, H., Kadioglu, E., Sahin, B., Coskun, A., Baykal, A. T., Ozpinar, A, Clinical applications of MALDI imaging technologies in cancer and neurodegenerative diseases, *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2017; 1865(7):795-816. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.01.005.

Van de Vondede, J., Sulpizi, M, Sprik, M., From Solvent Fluctuations to Quantitative Redox Properties of Quinones in Methanol and Acetonitrile, *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006; 45(12):1936-8.

Wilson, J. M., Slattery, J. T., Forte, A. J., Nelson, S. D., Analysis of acetaminophen metabolites in urine by high-performance liquid chromatography with UV and amperometric detection, *J Chromatogr.* 1982; 227(2):453-62.

Wu, Q., Comi, T. J., Li, B., Rubakhin, S. S., Sweedler, J. V., On-Tissue Derivatization via Electrospray Deposition for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging of Endogenous Fatty Acids in Rat Brain Tissues, *Anal. Chem.*, 2016, 88 (11): 5988–5995.

Yang, J., Caprioli, R. M., Matrix sublimation/recrystallization for imaging proteins by mass spectrometry at high spatial resolution, *Anal Chem.* 2011;83(14):5728-34. doi: 10.1021/ac200998a.

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Sezin, Selahaddin
Name, Vorname
(Surname, first name)

102618
Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Dortmund, 01.09.20
Ort, Datum
(Place, date)

[Signature]
Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Anwendung der hochaufgelösten bildgebenden MALDI-MS zur Aufklärung der räumlichen Verteilung des Acetaminophens und seiner Biotransformationsprodukte sowie von Tauocholaten in der Leber von Mäusen in Folge einer Acetaminophen Intoxikation

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.

Dortmund, 01.09.20
Ort, Datum
(Place, date)

[Signature]
Unterschrift
(Signature)