

**STUDIUM NEUER PHASE II-REAKTIONEN VON
AUSGEWÄHLTEN ARZNEISTOFFEN
MITHILFE VON HEPATOZYTENKULTUREN UND
UDP-GLUCURONYLTRANSFERASEN**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Anja Kristina Fröhlich

Kiel 2004

Referent:

Prof. Dr. B. Clement

Korreferent:

Prof. Dr. W. Blaschek

Tag der mündlichen Prüfungen:

3., 7. und 14. Dezember 2004

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 15. Dezember 2004

Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer
(Dekan)

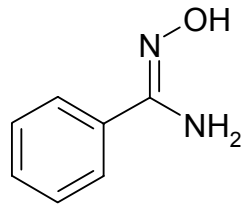
Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

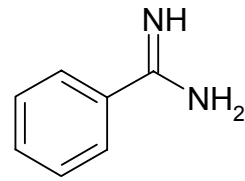
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
CYP	Cytochrom P450
DC	Dünnschichtchromatographie
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Electrospray ionisation
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FKS	Fötale Kälberserum
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HPLC (LC)	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
LDH	<i>L</i> -Lactat-Dehydrogenase
MS	Massenspektrometrie
Na ₂ -EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraessigsäure
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NAT	<i>N</i> -Acetyltransferase
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OPD	<i>ortho</i> -Phenylendiamin
OAT	<i>O</i> -Acetyltransferase

P450	Cytochrom P450
PAP	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBS	Phosphate buffered saline
r^2	Relativer Korrelationskoeffizient
SD	Standardabweichung
SULT	Sulfotransferase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen/Minute
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDPGA	Uridin-5'-diphosphatglucuronsäure
UGT	UDP-Glucuronyltransferase
UTP	Uridin-5'-triphosphat

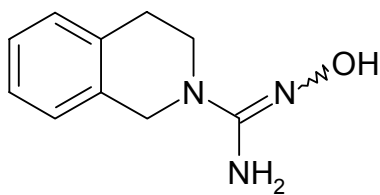
Strukturformeln häufig zitierter Verbindungen



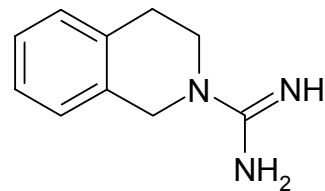
Benzamidoxim



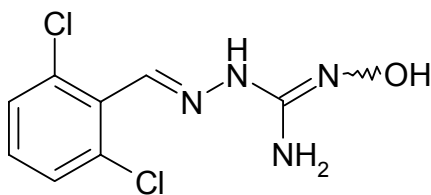
Benzamidin



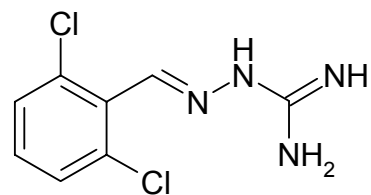
N-Hydroxydebrisoquin



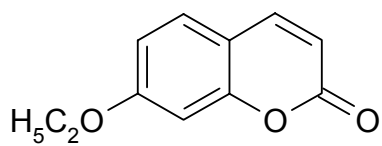
Debrisoquin



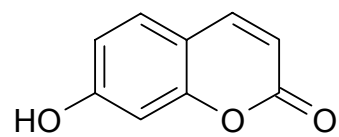
Guanoxabenz



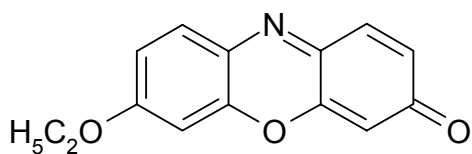
Guanabenz



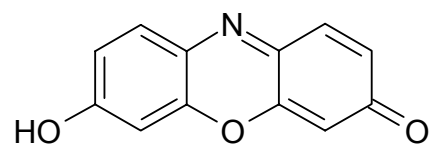
7-Ethoxycumarin



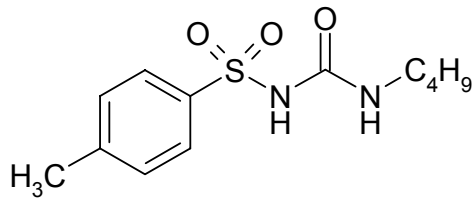
7-Hydroxycumarin



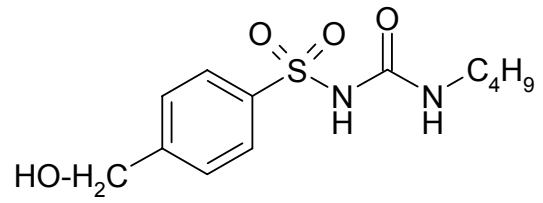
7-Ethoxyresorufin



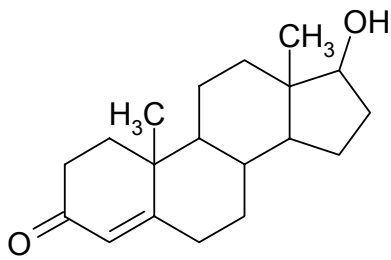
Resorufin



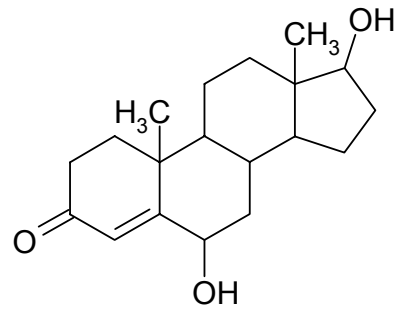
Tolbutamid



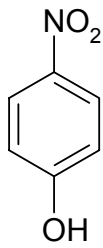
Hydroxytolbutamid



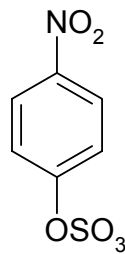
Testosteron



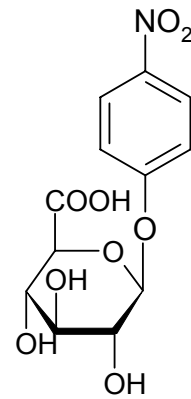
6 β -Hydroxytestosteron



4-Nitrophenol



4-Nitrophenylsulfat



4-Nitrophenylglucuronid

1	Einführung	1
1.1	Biotransformation	1
1.1.1	Definition und Bedeutung	1
1.1.2	Phase I-Reaktionen	3
1.1.2.1	Allgemeine Übersicht	3
1.1.2.2	Das Cytochrom P450-Enzymsystem	3
1.1.3	Phase II-Reaktionen	8
1.1.3.1	Allgemeine Übersicht	8
1.1.3.2	UDP-Glucuronyltransferasen	9
1.1.3.3	Sulfotransferasen	13
1.1.3.4	Acetyltransferasen	15
1.1.4	Biologische Systeme als Ersatz für den Tierversuch	16
1.1.5	Einsatz von Hepatozytenkulturen in Forschung und Therapie	18
1.1.6	Biotransformation stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen	20
1.1.7	Enzyminduktion	22
1.2	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	28
2	Isolierung und Kultivierung von Hepatozyten	30
2.1	Einleitung	30
2.1.1	Allgemeine Betrachtungen	30
2.1.2	Zielsetzung	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Isolierung von Schweinehepatozyten	34
2.2.1.1	Versuchsdurchführung	34
2.2.1.2	Bestimmung der Ausbeute und Vitalität	35
2.2.2	Kultivierung von Schweinehepatozyten	35
2.2.3	Aufarbeitung von kryokonservierten humanen Hepatozyten	36
2.2.4	Kultivierung von kryokonservierten humanen Hepatozyten	36
2.3	Ergebnisse	37
2.3.1	Isolierung von Schweinehepatozyten	37

2.3.2	Kultivierung von Schweine- und Humanhepatozyten	37
2.4	Diskussion	38
2.5	Zusammenfassung und Ausblick	40
3	Charakterisierung von Hepatozyten	41
3.1	Einleitung	41
3.1.1	Allgemeine Betrachtungen	41
3.1.2	Zielsetzung	44
3.2	Methoden	45
3.2.1	Bestimmung der Vitalität	46
3.2.1.1	Lactatdehydrogenasefreisetzung	46
3.2.1.2	Albuminsynthese	46
3.2.2	Bestimmung der metabolischen Kompetenz	47
3.2.2.1	Ethoxycumarin-O-deethylierung	47
3.2.2.2	Ethoxyresorufin-O-deethylierung	48
3.2.2.3	Testosteron-6 β -hydroxylierung	48
3.2.2.4	Glucuronidierung und Sulfatierung von 4-Nitrophenol	50
3.3	Ergebnisse	50
3.3.1	Bestimmung der Vitalität	50
3.3.1.2	Albuminsynthese	51
3.3.2	Bestimmung der metabolischen Kompetenz	52
3.3.2.1	Ethoxycumarin-O-deethylierung	52
3.3.2.2	Ethoxyresorufin-O-deethylierung	54
3.3.2.3	Testosteron-6 β -hydroxylierung	55
3.3.2.4	Glucuronidierung und Sulfatierung von 4-Nitrophenol	56
3.4	Diskussion	58
3.5	Zusammenfassung und Ausblick	60

4	Einsatz von primären Hepatozytenkulturen für Metabolismusstudien	61
4.1	Biotransformationsstudien von Benzamidoxim und Benzamidin	61
4.1.1	Einleitung	61
4.1.1.1	Bedeutung von Amidoximen und Amidinen in der Therapie	61
4.1.1.2	Bisherige Untersuchungen	62
4.1.1.3	Zielsetzung	64
4.1.2	Methoden	64
4.1.2.1	Inkubationsbedingungen für humane Hepatozyten	64
4.1.2.2	LC/MS-Analytik	65
4.1.3	Ergebnisse	67
4.1.3.1	Metabolismus von Benzamidoxim in humanen Hepatozyten	67
4.1.3.1.1	Phase I-Metabolismus	67
4.1.3.1.1.1	Reduktion	67
4.1.3.1.2	Phase II-Metabolismus	68
4.1.3.1.2.1	Glucuronidierung	68
4.1.3.1.2.2	Weitere Reaktionen	69
4.1.3.2	Metabolismus von Benzamidin in humanen Hepatozyten	70
4.1.3.2.1	Phase I-Metabolismus	70
4.1.3.2.1.1	<i>N</i> -Oxidation des Benzamidins zum Benzamidoxim	70
4.1.3.2.2	Phase II-Metabolismus des Benzamidins	70
4.1.4	Diskussion	71
4.1.5	Zusammenfassung und Ausblick	73
4.2	Biotransformation von <i>N</i> -Hydroxydebrisoquin und Debrisoquin	75
4.2.1	Einleitung	75
4.2.1.1	Bisherige Untersuchungen	75
4.2.1.2	Zielsetzung	77
4.2.2	Methoden	78
4.2.2.1	Synthese verwendeter Standardverbindungen	78
4.2.2.1.1	Synthese von <i>N</i> -Hydroxydebrisoquin	78
4.2.2.1.2	Synthese von <i>N</i> -Hydroxydebrisoquin- <i>O</i> -glucuronid	79
4.2.2.2	Inkubationsbedingungen für porcine und humane Hepatozyten	80
4.2.2.3	Inkubationsbedingungen für die Hydrolyse mit β -Glucuronidase	80

4.2.2.4	LC/MS-Analytik	80
4.2.2.4.1	Untersuchung des Metabolismus von <i>N</i> -Hydroxydebrisoquin und des Phase II-Metabolismus von Debrisoquin	80
4.2.2.4.2	Untersuchung des oxidativen Metabolismus von Debrisoquin	81
4.2.3	Ergebnisse	83
4.2.3.1	Metabolismus von <i>N</i> -Hydroxydebrisoquin in Schweinehepatozyten	83
4.2.3.1.1	Phase I-Metabolismus	83
4.2.3.1.1.1	Reduktionen	83
4.2.3.1.1.2	Oxidationen	84
4.2.3.1.2	Phase II-Metabolismus	84
4.2.3.1.2.1	Glucuronidierung	84
4.2.3.1.2.2	Weitere Reaktionen	86
4.2.3.2	Metabolismus von Debrisoquin in Schweinehepatozyten	87
4.2.3.2.1	Phase I-Metabolismus	87
4.2.3.2.1.1	<i>N</i> -Oxidation des Debrisoquins zum <i>N</i> -Hydroxydebrisoquin	87
4.2.3.2.1.2	Weitere Oxidationen	88
4.2.3.2.2	Phase II-Metabolismus	88
4.2.3.2.2.1	Glucuronidierung	88
4.2.3.2.2.2	Weitere Reaktionen	89
4.2.3.3.	Metabolismus von <i>N</i> -Hydroxydebrisoquin in humanen Hepatozyten	90
4.2.3.3.1	Phase I-Metabolismus	90
4.2.3.3.1.1	Reduktionen	90
4.2.3.1.1.2	Oxidationen	90
4.2.3.3.2	Phase II-Metabolismus	91
4.2.3.3.2.1	Glucuronidierung	91
4.2.3.3.2.2	Weitere Reaktionen	92
4.2.3.4	Metabolismus von Debrisoquin in humanen Hepatozyten	92
4.2.3.4.1	Phase I-Metabolismus	92
4.2.3.4.1.1	<i>N</i> -Oxidation des Debrisoquins zum <i>N</i> -Hydroxydebrisoquin	92
4.2.3.4.1.2	Weitere Oxidationen	92
4.2.3.4.2	Phase II-Metabolismus	93
4.2.3.4.2.1	Glucuronidierung	93

4.2.3.4.2.2	Weitere Reaktionen	93
4.2.4	Diskussion	93
4.2.5	Zusammenfassung und Ausblick	97
4.3	Biotransformationsstudien von Guanoxabenz und Guanabenz	100
4.3.1	Einleitung	100
4.3.1.1	Bisherige Untersuchungen	100
4.3.1.2	Zielsetzung	102
4.3.2	Methoden	103
4.3.2.1	Stabilitätstest von Guanoxabenz und Guanabenz	103
4.3.2.2	Inkubationsbedingungen für porcine Hepatozyten	104
4.3.2.3	Inkubationsbedingungen für die Hydrolyse mit β -Glucuronidase	104
4.3.2.4	LC/MS-Analytik	104
4.3.3	Ergebnisse	105
4.3.3.1	Stabilität von Guanoxabenz und Guanabenz	105
4.3.3.2	Metabolismus von Guanoxabenz in Schweinehepatozyten	106
4.3.3.2.1	Phase I-Metabolismus	106
4.3.3.2.1.1	Reduktionen	106
4.3.3.2.1.2	Oxidationen	108
4.3.3.2.2	Isomerisierungen	108
4.3.3.2.3	Phase II-Metabolismus	109
4.3.3.2.3.1	Glucuronidierung	109
4.3.3.2.3.2	Weitere Reaktionen	111
4.3.3.3	Metabolismus von Guanabenz in Schweinehepatozyten	112
4.3.3.3.1	Phase I-Metabolismus	112
4.3.3.3.1.1	<i>N</i> -Oxidation vom Guanabenz zum Guanoxabenz	112
4.3.3.3.1.2	Weitere Reaktionen	113
4.3.3.3.2	Isomerisierungen	113
4.3.3.3.3	Phase II-Metabolismus	114
4.3.3.3.3.1	Glucuronidierung	114
4.3.3.3.3.2	Weitere Reaktionen	115
4.3.4	Diskussion	116
4.3.5	Zusammenfassung und Ausblick	120

5	Einsatz von rekombinanten UGT-Isoenzymen zur Untersuchung der Glucuronidierung	122
5.1	Einleitung	122
5.1.1	Allgemeine Betrachtungen	122
5.1.2	Zielsetzung	125
5.2	Methoden	127
5.2.1	Charakterisierung der UGT-Isoenzyme	127
5.2.1.1	17 β -Estradiol-3-glucuronidierung	127
5.2.1.1.1	Inkubationsbedingungen	127
5.2.1.1.2	HPLC-Analytik	127
5.2.1.2	Trifluoperazin- <i>N</i> -glucuronidierung	129
5.2.1.2.1	Inkubationsbedingungen	129
5.2.1.2.2	HPLC-Analytik	129
5.2.1.3	4-Trifluormethyl-7-hydroxycumaringlucuronidierung	130
5.2.1.3.1	Inkubationsbedingungen	130
5.2.1.3.2	HPLC-Analytik	131
5.2.2	Glucuronidierung von Benzamidoxim	132
5.2.2.1	Inkubationsbedingungen	132
5.2.2.2	LC/MS-Analytik	133
5.2.3	Glucuronidierung von <i>N</i> -Hydroxydebrisoquin	133
5.2.3.1	Inkubationsbedingungen	133
5.2.3.2	LC/MS-Analytik	133
5.2.4	Glucuronidierung von Guanoxabenz bzw. Guanabenz	134
5.2.4.1	Inkubationsbedingungen	134
5.2.4.2	LC/MS-Analytik	134
5.3	Ergebnisse	134
5.3.1	Charakterisierung der UGT-Isoenzyme	134
5.3.1.1	17 β -Estradiol-3-glucuronidierung	134
5.3.1.2	Trifluoperazin- <i>N</i> -glucuronidierung	135
5.3.1.3	4-Trifluormethyl-7-hydroxycumaringlucuronidierung	136
5.3.2	Glucuronidierung von Benzamidoxim	138
5.3.3	Glucuronidierung von <i>N</i> -Hydroxydebrisoquin	139

5.3.4	Glucuronidierung von Guanoxabenz	140
5.3.5	Glucuronidierung von Guanabenz	142
5.4	Diskussion	143
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	146
6	Einsatz von porcinen Hepatozytenkulturen für Induktionsstudien	147
6.1	Einleitung	147
6.1.1	Bisherige Untersuchungen	147
6.1.2	Zielsetzung	149
6.2	Methoden	151
6.2.1	Herstellung der Induktions- und Inkubationsmedien	151
6.2.2	Durchführung der Induktion	153
6.2.3	Inkubation von Markersubstraten	153
6.2.4	HPLC-Analytik zur Bestimmung der 6 β -Hydroxylierung von Testosteron	154
6.2.5	HPLC-Analytik zur Bestimmung der Methylhydroxylierung von Tolbutamid	154
6.2.6	Fluorimetrische Bestimmung der Deethylierung von 7-Ethoxyresorufin	155
6.3	Ergebnisse	156
6.3.1	Induktion des porcinen CYP3A29-Isoenzym	156
6.3.2	Induktion eines porcinen CYP2C-Isoenzym	157
6.3.3	Induktion des porcinen CYP1A2	160
6.4	Diskussion	161
6.5	Zusammenfassung und Ausblick	164
7	Zusammenfassung	166

8	Materialien und Geräte	172
8.1	Materialien	172
8.2	Geräte	176
9	Literaturverzeichnis	177

1 Einführung

1.1 Biotransformation

1.1.1 Definition und Bedeutung

Der Mensch nimmt täglich neben der Nahrung eine Vielzahl von Fremdstoffen (Xenobiotika) auf, die nicht zur Bereitstellung von Energie oder anderen physiologischen Funktionen dienen. Diese Xenobiotika stellen Arzneistoffe, Chemikalien, Nahrungszusätze, Umweltgifte und verschiedene andere Schadstoffe dar (Testa 1995a). Ihre Umwandlung durch den Organismus wird Biotransformation genannt. Das Ziel dieser Reaktionen ist die Bildung hydrophiler, leichter eliminierbarer Produkte, so dass eine Akkumulation der eher lipophilen Ausgangsverbindungen im Körper, die mit einer möglichen Schädigung des Organismus einhergehen kann, vermieden wird (Forth *et al.* 2001).

Biotransformationsreaktionen laufen bevorzugt in der gut durchbluteten Leber, aber auch in anderen Organen wie Darm, Niere, Lunge, Blut, Haut, Milz und Muskulatur ab (Testa und Jenner 1976, Mutschler *et al.* 2001). Die daran beteiligten Enzyme liegen entweder strukturgebunden an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien oder gelöst im Zytosol vor. Aufgrund einer breiten Substratspezifität setzen sie neben Xenobiotika auch z. T. körpereigene Stoffe aus Stoffwechselfvorgängen um (Mutschler *et al.* 2001).

Neben der Bioinaktivierung von Xenobiotika (Entgiftung) können Metabolisierungsreaktionen auch zu Bioaktivierungen oder Biotoxifizierungen führen. Durch Bioaktivierung mittels fremdstoffmetabolisierender Enzyme werden Verbindungen, die *per se* keine pharmakologische Wirkung aufweisen (Prodrugs), in aktive Substanzen mit therapeutisch erwünschten Effekten überführt (Testa 1995a). Der gezielte Einsatz von Prodrugs in der Arzneimitteltherapie trägt zur Verbesserung pharmakokinetischer bzw. -dynamischer, physikochemischer, galenischer oder toxikologischer Eigenschaften des Wirkstoffs bei (Ettmayer *et al.* 2004). Hingegen findet bei der Biotoxifizierung eine Bildung giftiger, mutagener oder karzinogener Substanzen statt, die Schädigungen im biologischen Material hervorrufen können.

Das Ausmaß des Xenobiotika-Metabolismus wird zum einen durch individuelle Faktoren wie Alter, Ernährung, Biorhythmus, Stress, Krankheiten, Schwangerschaft

sowie enzyminhibierende und enzyminduzierende Substanzen beeinflusst, aber auch genetische Faktoren, Rasse und Geschlecht (inter-individuelle Parameter) führen zu unterschiedlichen Enzymaktivitäten (Testa 1995a).

Biotransformationsprozesse sind in zwei Phasen zu unterteilen, der Phase I und der Phase II (Abb. 1.1). Strukturverändernde Phase I-Reaktionen, die auch als Funktionalisierungsreaktionen bezeichnet werden, führen funktionelle Gruppen in das unpolare Molekül ein oder legen entsprechende Gruppen frei. Hierzu zählen Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen. Zur Phase II zählen die aufbauenden Reaktionen wie die durch Transferasen katalysierten Konjugationen an Glucuronsäure, Schwefelsäure, Glutathion und Aminosäuren. Häufig dient die Einführung von funktionellen Gruppen zur Vorbereitung von Substraten, die im Anschluss im Sinne einer Phase II-Reaktion (s. 1.1.3) umgesetzt werden. Diese Vorschaltung der Phase I-Reaktionen ist jedoch keine zwingende Voraussetzung für Konjugationen (Forth *et al.* 2001).

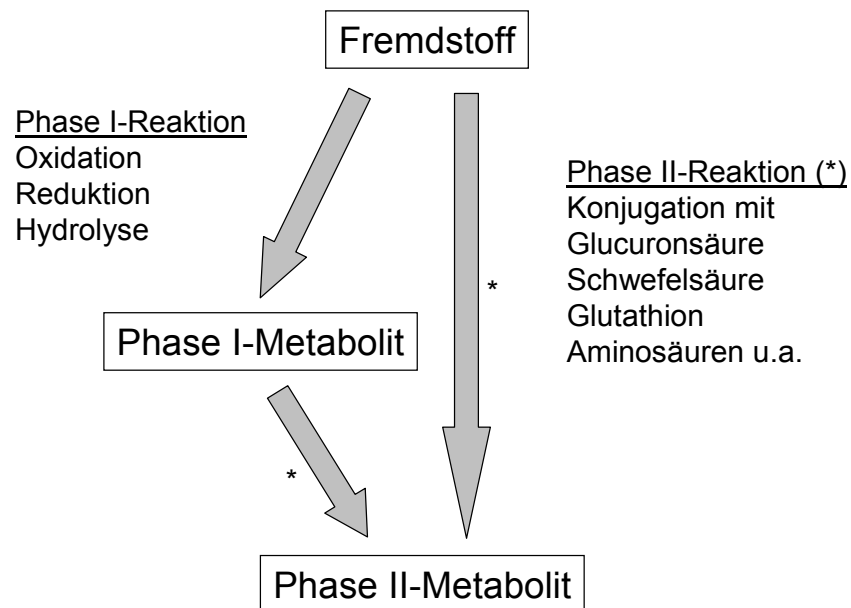


Abbildung 1.1

Einteilung von Biotransformationsprozessen (nach Mutschler *et al.* 2001)

1.1.2 Phase I-Reaktionen

1.1.2.1 Allgemeine Übersicht

Während spontan ablaufende nicht-enzymatische Reaktionen, wie z. B. Esterhydrolysen im sauren Milieu des Magens, eine untergeordnete Rolle in der Biotransformation von Xenobiotika spielen, überwiegen die enzymatisch katalysierten Umsetzungen der Fremdstoffe deutlich (Mutschler *et al.* 2001).

Oral eingenommene Arzneistoffe werden im Gastrointestinaltrakt resorbiert und gelangen mit dem Pfortaderblut direkt in die Leber, dem Hauptmetabolisierungsort. In den Leberparenchymzellen (Hepatozyten) sind die wichtigsten Enzyme, die an den Phase I-Reaktionen beteiligt sind, im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Hierzu zählen die Cytochrom P450-Monooxygenasen (EC 1.14.14.1) (Guengerich 1987), die flavinhaltige Monooxygenase (EC 1.14.13.8) (Ziegler 1988), die Epoxidhydrolase (EC 3.3.2.3) (Fretland und Omiecinski 2000) und die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (EC 1.6.2.4) (Nebert und Gonzalez 1987). Im Zytosol der Hepatozyten befinden sich die löslichen Enzyme Alkoholdehydrogenase (EC 1.1.1.1.), Aldehyddehydrogenase (EC 1.2.1.3), Xanthinoxidase (EC 1.2.3.2) sowie verschiedene Esterasen (Testa 1995b, c, e). Die Mitochondrien enthalten Esterasen, Monoaminoxidasen (EC 1.4.3.4) (Benedetti 2001) und einige Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (Cali und Russell 1991, Nelson *et al.* 1996).

1.1.2.2 Das Cytochrom P450-Enzymsystem

Die weitaus größte Bedeutung im Rahmen oxidativer Biotransformationsprozesse von Xenobiotika besitzt das Cytochrom P450-Enzymsystem (Mutschler *et al.* 2001), das an über 90% des Arzneimittel-Metabolismus im Menschen beteiligt ist (Lewis 2003). Die Cytochrom P450-Enzyme (CYPs) sind hämhaltige Proteine, die aus einem Apoprotein und einer Häm-Domäne, einem Eisen-Protoporphyrin IX Gerüst, als prosthetische Gruppe bestehen (Testa 1995d). Dieses Porphyrin-Ringsystem bildet mit dem Eisen-Zentralatom vier koordinative Bindungen aus, während es sich bei dem fünften Ligand um die Thiolatgruppe der Cysteinseitenkette des Apoproteins handelt, einer hoch konservierten Region innerhalb der P450-Sequenz (Guengerich 2001). Wasser oder Hydroxylgruppen besetzen die sechste Koordinationsstelle des

Zentralatoms (Goeptar *et al.* 1995). Nach Bindung von Kohlenmonoxid als sechstem Liganden an das Enzym im reduzierten Zustand resultiert ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 450 nm, das nicht nur zur Gehaltsbestimmung von CYP-haltigen Präparationen, sondern auch zur Namensgebung des Enzymsystems herangezogen wurde (Forth *et al.* 2001).

In den unterschiedlichsten pro- und eukaryotischen Lebewesen sind über 2000 Cytochrom P450-Enzyme bekannt, die einer Supergenfamilie angehören (Lewis 2003). Ihre Klassifikation erfolgt anhand der Aminosäuresequenzen. Einer CYP-Familie werden Enzyme mit einer Sequenzhomologie von > 40% zugeordnet, wohingegen die Zugehörigkeit zu einer Subfamilie mindestens eine 59%ige Übereinstimmung der Primärstrukturen erfordert (Ruckpaul 1993). Arabische Ziffern bezeichnen Familien, Großbuchstaben Subfamilien und die einzelnen Isoenzyme werden durch nachstehende arabische Ziffern charakterisiert (Nelson *et al.* 1996).

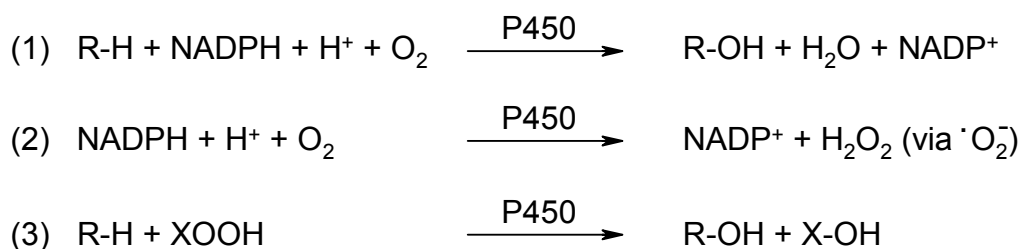


Abbildung 1.2 **Cytochrom P450-katalysierte Reaktionen (Guengerich 1991),**
(1) Monooxygenase-, (2) Oxidase-, (3) Peroxidase-Funktion

Neben Oxidase- und Peroxidaseaktivitäten (Abb. 1.2) besitzt Cytochrom P450 hauptsächlich Monooxygenase-Eigenschaften (Guengerich 1991). Hierbei wird ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen, während das andere unter Wasserbildung reduziert wird. Da Cytochrom P450 nur ein Ein-Elektronenakzeptor ist, das Reduktionsäquivalent NADPH aber simultan zwei Elektronen zur Verfügung stellt, bedarf es zur Elektronenübertragung auf das Substrat der Hilfe der ebenfalls in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankerten NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, die als prosthetische Gruppen je Proteinseitenkette ein FAD- und ein FMN-Molekül besitzt (Abb. 1.3).

Entstammen die zwei zu übertragenden Elektronen aus dem Cofaktor NADH, vermitteln die Enzyme NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase und Cytochrom b_5 den Transfer (Ingelman-Sundberg und Johansson 1984, Yamazaki *et al.* 1996).

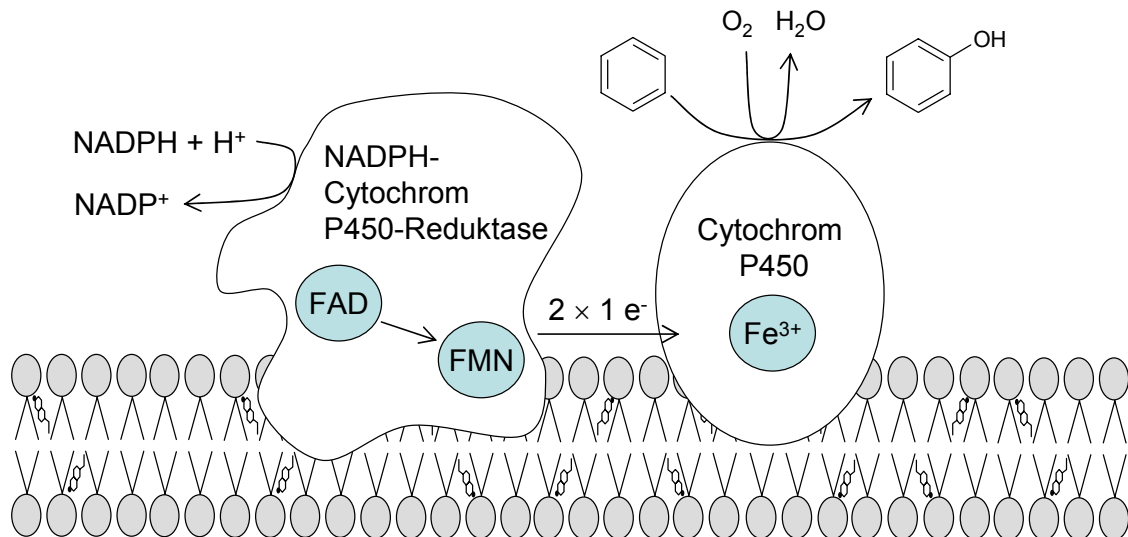


Abbildung 1.3 Schematischer Ablauf der mikrosomalen Monooxygenasereaktion (Forth *et al.* 2001)

Am Fremdstoffmetabolismus sind hauptsächlich die Cytochrom P450-Isoenzyme CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 und CYP1A2 beteiligt (Rendic und Di Carlo 1997) (Abb. 1.4), während für Isoenzyme aus weiteren CYP-Familien, die größere Substratspezifitäten aufweisen, die Biosynthese und Metabolisierung endogener Verbindungen wie Gallensäuren, Steroidhormone, Thromboxan, Vitamin D₃ und Cholesterin nachgewiesen wurde (Ortiz de Montellano 1986, Rendic und Di Carlo 1997).

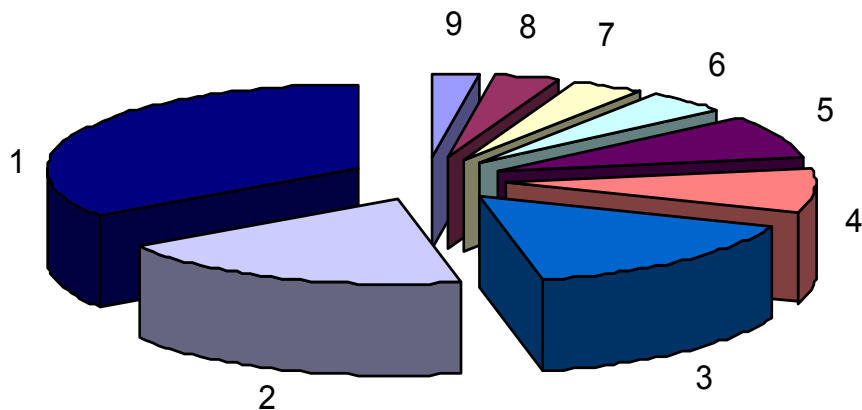


Abbildung 1.4 **Hauptsächlich am Fremdstoffwechsel beteiligte humane Cytochrom P450-Isoenzyme (Rendic und Di Carlo 1997)**

1 CYP3A4/5 (34,1%), 2 CYP2D6 (18,8%), 3 CYP2C8/9 (15,8%), 4 CYP2C18/19 (8,3%), 5 CYP1A2 (8,2%), 6 CYP2E1 (4,1%), 7 andere CYPs (3,8%), 8 CYP2B6 (3,4%), 9 CYP2A6 (2,5%)

Genetische Polymorphismen wie der Debrisoquin/Sparteïn-Polymorphismus (CYP2D6) und der Mephenytoin-Polymorphismus (CYP2C19) beeinflussen die Funktionalität und Expression des Cytochrom P450 und somit den Arzneimittelstoffwechsel ebenso wie die Einwirkung exogener Enzyminduktoren (s. 1.1.7) oder -inhibitoren (Forth *et al.* 2001).

Der Mechanismus der Cytochrom P450-katalysierten oxidativen Metabolisierung eines Substrates ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Zunächst lagert sich das Substrat (RH) an eine Bindungsstelle in der Nähe des aktiven Zentrums an, was zur Verdrängung des Liganden (Wasser) aus der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Eisens führt (1). Demzufolge wechselt das Zentralatom Eisen (Fe^{III}) aus dem „low spin“- in den „high spin“-Zustand. Die dadurch bewirkte Veränderung des Redoxpotenzials begünstigt den zweiten Reaktionsschritt (2), in dem mithilfe der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase ein Elektron auf das Eisen übertragen wird, welches somit reduziert in der Oxidationsstufe +II vorliegt (Ruckpaul 1993). Nach Bindung von molekularem Sauerstoff (3) ist dieser in der Lage, ein Elektron des Zentralatoms zu übernehmen, so dass als mesomere Form ein ($\text{Fe}^{\text{III}} \cdot \text{O}_2^-$)-Komplex formuliert werden kann (4). Im Folgenden nimmt dieser Komplex ein zweites von der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase zur Verfügung gestelltes Elektron auf (5), wodurch es nach Zuführen zweier Protonen des oxidierten Flavoproteins zur

Abspaltung von Wasser und zur Bildung eines reaktiven Oxokomplexes kommt (6). Dieser Elektronenmangel versetzt die Verbindung in die Lage, das Substrat zu hydroxylieren. Nach Abdissoziation des Produktes kehrt das Enzym in seinen Ausgangszustand zurück und steht für einen weiteren Zyklus zur Verfügung (7). Das Fehlen eines geeigneten Substrats oder die Instabilität des Enzym-O₂-Komplexes kann zur Entkopplung des Reaktionszyklus führen. Hierbei kann nach Übertragung des ersten Elektrons ein freies Superoxidradikalanion und nach Schritt 5 direkt Wasserstoffperoxid entstehen (8) (Coon *et al.* 1992).

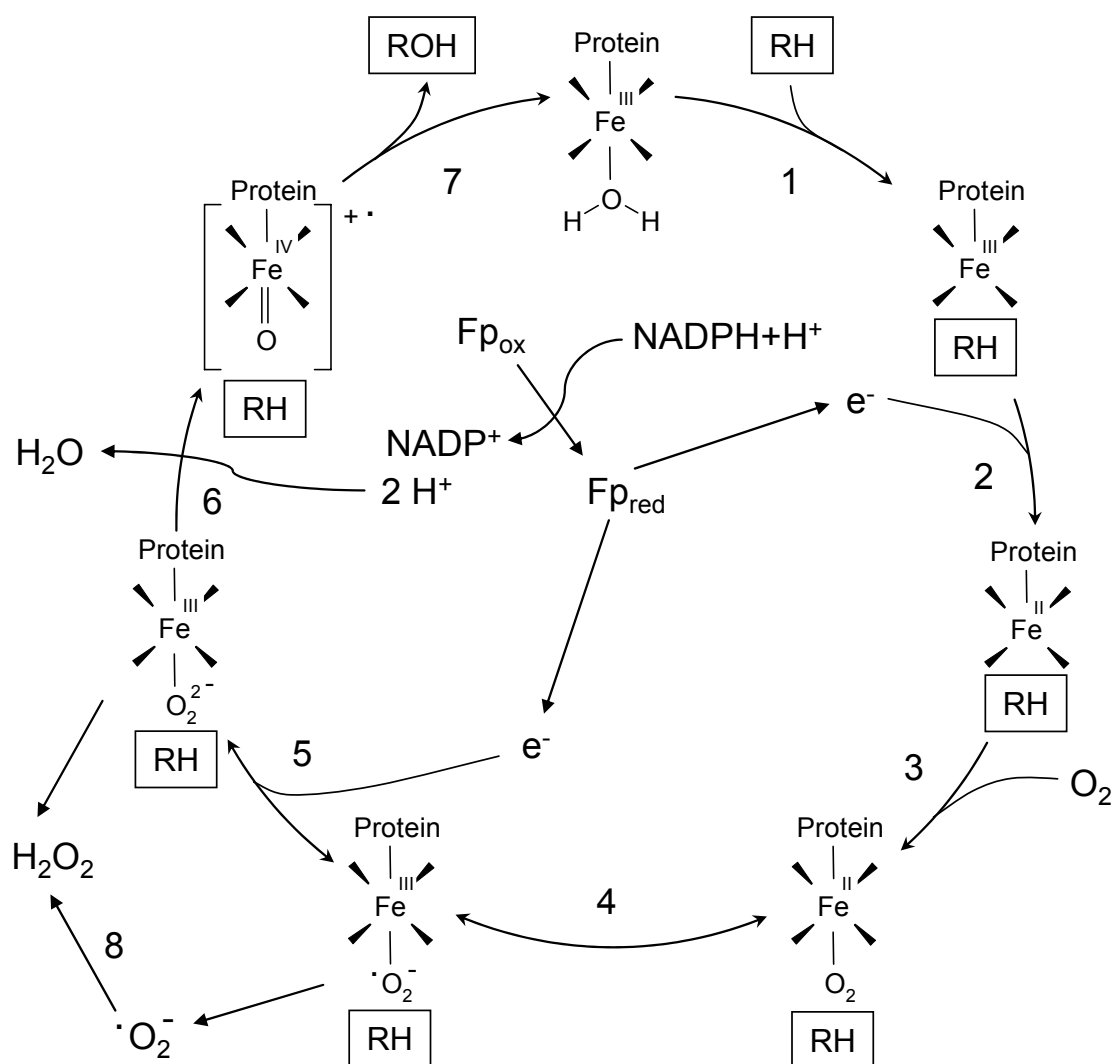


Abbildung 1.5 **Katalytischer Zyklus der oxidativen Substratumsetzung durch Cytochrom P450 (modifiziert nach Coon *et al.* 1992)**

Fe = Häm-Eisen im katalytischen Zentrum, Fp = Flavoprotein (NADPH-Cytochrom P450-Reduktase), RH = Substrat, ROH = monooxygeniertes Produkt

Obwohl die genaue Struktur des reaktiven Komplexes umstritten ist, wird heute meist eine Oxo-ferryl-porphyrin^{IV}-Kationenradikalstruktur als die Form postuliert, die an der Hydroxylierung des Substrates beteiligt ist (Ruckpaul 1993).

1.1.3 Phase II-Reaktionen

1.1.3.1 Allgemeine Übersicht

Phase II-Reaktionen, auch Konjugationen genannt, laufen unter Beteiligung verschiedener Transferasen ab. Hierbei werden zunächst endogene, energiereiche Verbindungen hergestellt, deren Reste dann auf das Substrat übertragen werden (Abb. 1.6). Eine Ausnahme stellt die Konjugation von körperfremden Carbonsäuren mit den Aminosäuren Glycin und Glutamin dar, bei der das Substrat selbst und nicht der endogene Cofaktor aktiviert wird.

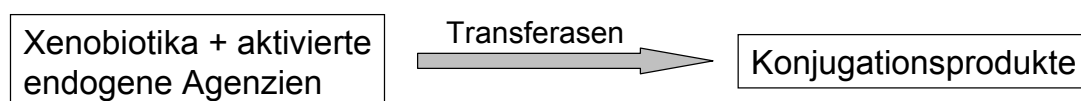


Abbildung 1.6 **Allgemeiner Ablauf von Xenobiotika-Konjugationen**

Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über mögliche Phase II-Reaktionen, die katalysierenden Enzyme und deren Lokalisation. Während im Menschen Sulfatierungen, Acetylierungen bzw. Methylierungen nur von sauerstoff-, stickstoff- oder schwefelhaltigen Gruppen ablaufen, werden unter Katalyse von UDP-Glucuronyltransferasen neben der O-, N- und S-Glucuronidierung auch C-Glucuronide wie die des Febrazon, Phenylbutazon und Sulfinpyrazon gebildet (Miners und Mackenzie 1991, Ethell *et al.* 2003).

Tabelle 1.1 Phase II-Reaktionen von Xenobiotika (Weber et al. 1990, Miners und Mackenzie 1991, Mutschler et al. 2001)

Enzyme	Lokalisation	Reaktionen
UDP-Glucuronyltransferasen (EC 2.4.1.17)	Endoplasmatisches Retikulum	O-Glucuronidierung N-Glucuronidierung S-Glucuronidierung C-Glucuronidierung
Sulfotransferasen (EC 2.8.2.X)	Zytosol	O-Sulfatierung N-Sulfatierung
Methyltransferasen (EC 2.1.1.X)	Zytosol, Endoplasmatisches Retikulum	O-Methylierung N-Methylierung S-Methylierung
Acetyltransferasen (EC 2.3.1.X)	Zytosol	O-Acetylierung N-Acetylierung
Glutathion-S-transferasen (EC 2.5.1.18)	Zytosol	Glutathionkonjugation an organische Halogenide, Epoxide u. a.

1.1.3.2 UDP-Glucuronyltransferasen

Obwohl die Glucuronidierung einen wichtigen Bestandteil des Metabolismus darstellt, ist das Wissen über Regulierung, Substratspezifität und Gewebe-Organ-Verteilung (vgl. 5.1.1) bis jetzt im Vergleich zu dem gut erforschten Cytochrom P450-System gering. Erst seit kürzerer Zeit findet der Phase II-Metabolismus auch größere Beachtung bei der Entwicklung von Arzneistoffen (Wildt *et al.* 1999).

Die UDP-Glucuronyltransferasen (UGTs) gehören wie die CYPs zu einer Supergenfamilie (Mackenzie *et al.* 1997). Sie sind ubiquitär verbreitet und kommen nicht nur im Menschen, sondern außerdem in Tieren, Bakterien und weiteren Pflanzen vor. Die Reaktion der UGTs beruht auf dem Angriff eines nukleophilen Agens am C₁-Atom des Pyranoseringes des Cofaktors Uridin-5'-diphosphat-glucuronsäure (UDPGA), der ausschließlich in α -glycosidischer Form vorliegt. Bei der Glucuronidierung, die formal im Sinne einer S_N2-Reaktion abläuft, entstehen UDP (Uridin-5'-diphosphat) und ein β -Glucuronid als Konjugat (Abb. 1.7).

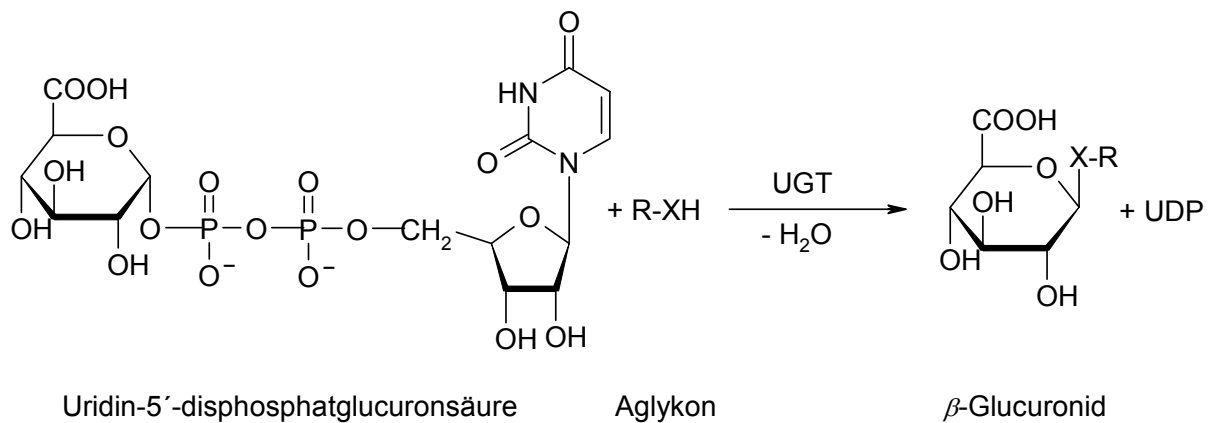


Abbildung 1.7 Konjugation von Aglykonen mit Uridin-5'-diphosphatglucuronsäure (Miners und Mackenzie 1991)

Der Cofaktor UDPGA wird zuvor im Zytosol aus Glucose-1-phosphat und Uridin-5'-triphosphat (UTP) gebildet. Die zwischenzeitlich entstandene UDP-Glucose wird unter Katalyse von der UDP-Glucose-Dehydrogenase zu UDPGA oxidiert (Abb. 1.8).

Die Nomenklatur der Glucuronyltransferasen beruht auf der Homologie der Primärstruktur der Isoenzyme untereinander. Alle UGTs weisen in ihrem C-terminalen Bereich, der für die Bindung des Cofaktors verantwortlich ist, eine große Übereinstimmung in der Sequenz auf. Im Gegensatz dazu ist das N-terminale Ende, an dem die Bindung der nukleophilen Substrate (vgl. 5.1.1) stattfindet, variabler (Fisher *et al.* 2001).

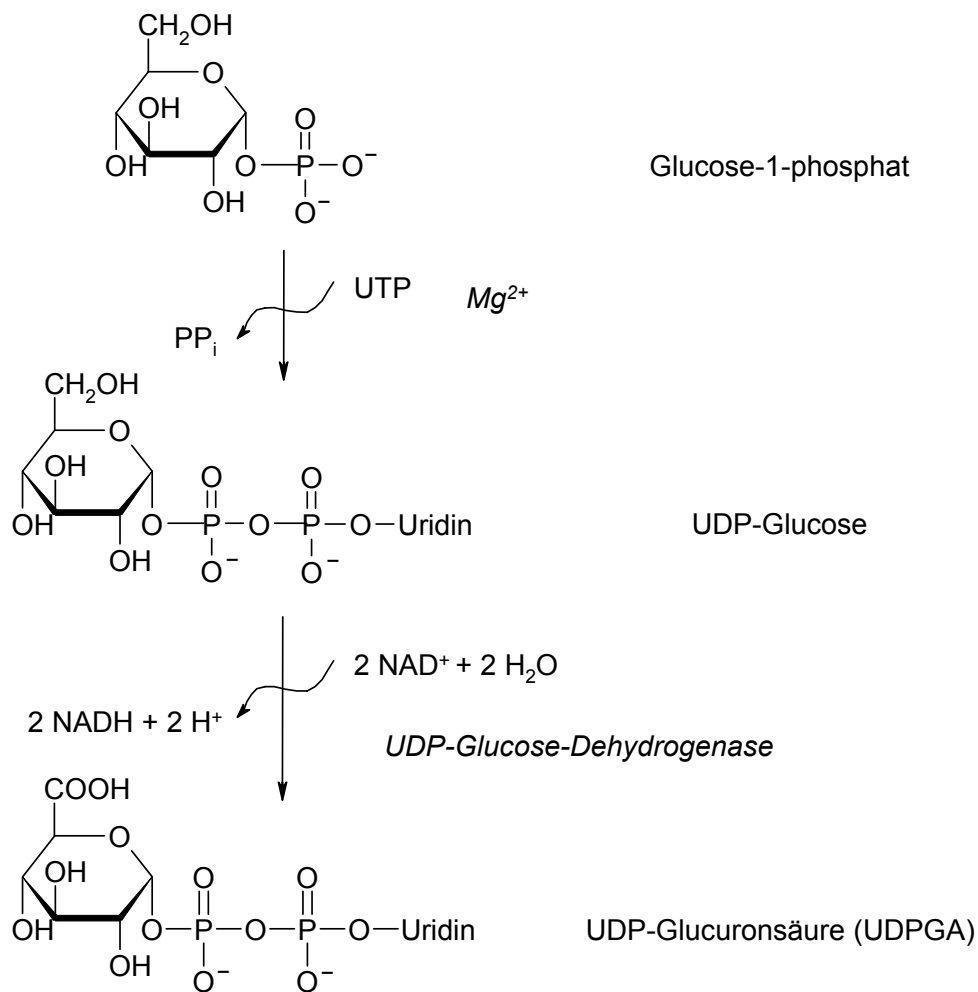


Abbildung 1.8 *Bildung des Cofaktors UDPGA aus Glucose-1-phosphat im Zytosol (Löffler und Petrides 2003)*

Die UGTs sind an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums gebundene Enzyme, deren aktives Zentrum auf der luminalen Seite angeordnet ist (Abb. 1.9). Mittels verschiedener Transporter überwinden Cofaktor, Substrat und Metabolit die Diffusionsbarriere (Miners *et al.* 2004). Das Glucuronid kann durch die hauptsächlich in den Lysosomen lokalisierte β -Glucuronidase enzymatisch gespalten werden und so einem metabolischen Zyklus zwischen Konjugation und Hydrolyse unterliegen (Brunelle und Verbeeck 1997).

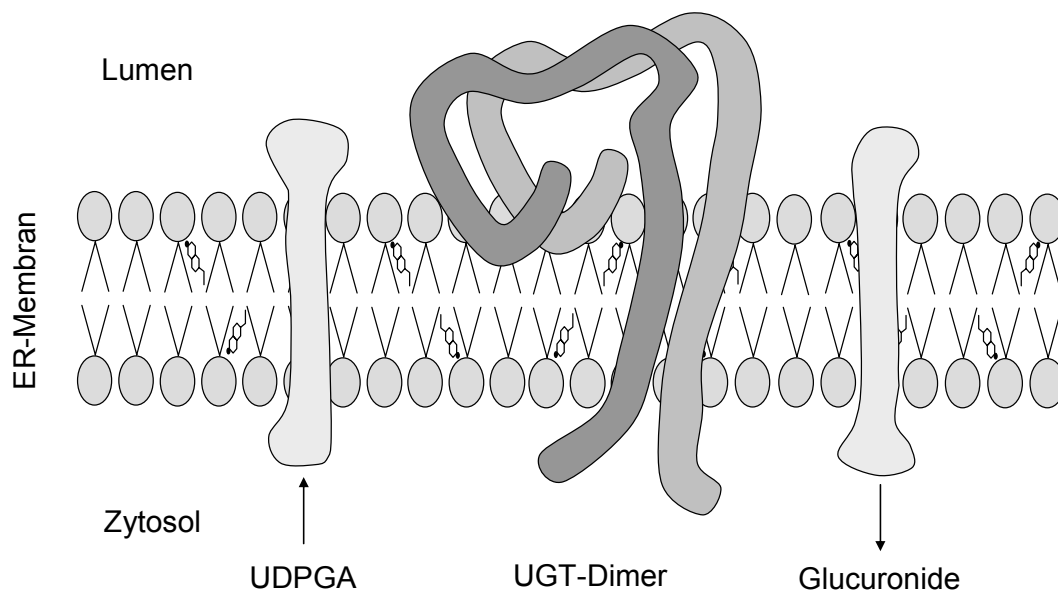


Abbildung 1.9 *Hypothetisches Modell zur Anordnung der UDP-Glucuronyltransferase (UGT) im Endoplasmatischen Retikulum (nach Miners et al. 2004)*

Genetische Polymorphismen sind für sieben Isoenzyme, insbesondere das UGT1A1, aber auch die UGTs 1A6, 1A7, 1A9, 2B4, 2B7 und 2B15 beschrieben worden (Miners *et al.* 2002, Girard *et al.* 2004). Die unterschiedlich starke Expression dieser Enzyme in bestimmten Populationen hat große Bedeutung in Hinblick auf die physiologischen Reaktionen, aber auch auf die Toxikologie und Pharmakologie einiger Substanzen. Nicht nur die Glucuronidierung von Bilirubin durch das UGT1A1, sondern auch die Elimination und Entgiftung von potenziell toxischen oder kanzerogenen Verbindungen (Tukey und Strassburg 2000) oder die Bioaktivierung von Morphin durch das UGT2B7 wären beeinflusst (Bock *et al.* 1999, Wildt *et al.* 1999, Ritter 2000).

Beruhend auf Mutationen in den UGT1A1-Genabschnitten sind mehrere Syndrome bekannt. Das autosomal-rezessiv vererbte Crigler-Najjar-Syndrom, das eine Hyperbilirubinämie nach sich zieht, wird in zwei Typen unterteilt, die auf gänzlichem Fehlen des Enzyms bzw. nur eine verringerte Aktivität zurückzuführen sind. Während ein kompletter UGT1A1-Mangel therapierefraktär ist und einen Kernikterus mit letalem Ausgang bewirkt, können durch Enzyminduktion aufgrund einer Phenobarbital-Behandlung partielle Störungen im Glucuronidierungsapparat ausgeglichen werden. Mutationen in der Promotorregion verursachen die

Meulengracht-Krankheit, auch Gilbert-Syndrom genannt, die sich zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr manifestiert. Der Patient leidet an einem intermittierenden Ikterus sowie uncharakteristischen Oberbauchschmerzen (Löffler und Petrides 2003, Fisher *et al.* 2001). Erhöhte Bilirubinspiegel sind auch beim Dubin-Johnson-Syndrom zu verzeichnen, das durch einen Defekt im Transportsystem hervorgerufen wird. Das MRP2-Protein, eine ATP-abhängige Pumpe, die die Glucuronide in die Galle befördern soll, wird hierbei nicht mehr exprimiert (Burchell 1998).

1.1.3.3 Sulfotransferasen

Die im Zytosol lokalisierten Sulfotransferasen (SULT) katalysieren unter Verbrauch des Cofaktors 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) die Sulfatierung (Abb. 1.10) von zahlreichen Xenobiotika und endogenen Verbindungen, während Makromoleküle durch membrangebundene Sulfotransferasen metabolisiert werden (Coughtrie *et al.* 1998a).

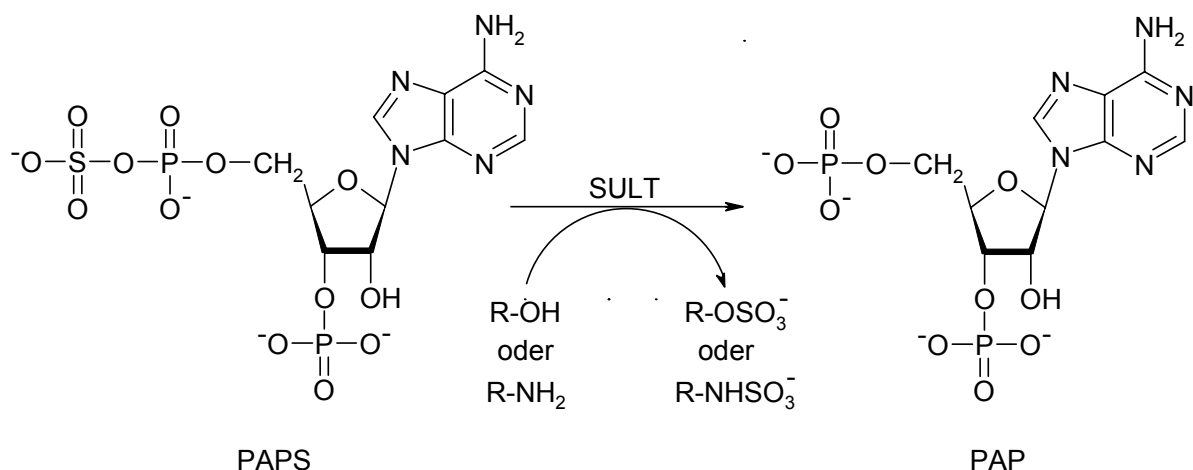


Abbildung 1.10 Sulfatierung von Aminen und Alkoholen durch Sulfotransferasen (SULT) unter Verbrauch des Cofaktors 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) (nach Mutschler *et al.* 2001)

Der Cofaktor wird in einer Zweistufenreaktion aus anorganischem Sulfat und Adenosintriphosphat (ATP) in Anwesenheit der Enzyme ATP-Sulfurylase und APS-Kinase (Adenosin-5'-phosphosulfat-Kinase) gebildet (Abb. 1.11).

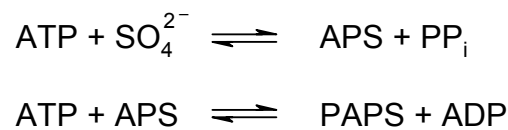


Abbildung 1.11 **Bildung des Cofaktors 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) (Coughtrie et al. 1998a)**

Die Sulfotransferasen gehören einer Supergenfamilie an (Weinshilboum *et al.* 1997) und werden anhand ihrer Aminosäuresequenz und Substratspezifität in drei Subfamilien eingeteilt. Die sieben Isoenzyme der SULT1-Unterfamilie sulfatieren bevorzugt primäre Phenole und Katechole, während die drei SULT2-Isoenzyme eher an Konjugationen von primären Steroiden und Alkoholen beteiligt sind (Coughtrie und Johnston 2001). Die Funktion des kürzlich neu identifizierten SULT4A1 im menschlichen Gehirn ist noch unbekannt (Liyou *et al.* 2003). Interindividuelle Unterschiede in der Expression und Enzymaktivität sind in genetischen Polymorphismen insbesondere der Isoenzyme SULT1A1 und 1A2 (Coughtrie und Johnston 2001) sowie in durch exogene Verbindungen wie Phenobarbital und Rifampicin vermittelter Induktion begründet (Kern *et al.* 1997, Li *et al.* 1999).

Die Sulfatierung stellt *in vivo* eine Konkurrenzreaktion zur Glucuronidierung dar, die meist aufgrund des begrenzten Sulfat-Pools benachteiligt ist. Das anorganische Sulfat muss im Körper aus schwefelhaltigen Aminosäuren gewonnen werden und wird kaum mit der Nahrung direkt aufgenommen (Mulder und Jakoby 1990, Coughtrie *et al.* 1998b). Durch Bildung polarer, wasserlöslicher Produkte mit meist geringer Aktivität nimmt sie eine bedeutende Rolle bei der Elimination, Detoxifizierung und Homöostase von Steroidhormonen und Katecholaminen ein. Für bestimmte Umweltgifte und Arzneistoffe wie Tamoxifen ist allerdings auch eine Bioaktivierung durch Sulfatierung beschrieben worden (Glatt 1997). Durch Sulfatierung von *N*-Acetylaminofluoren können z. B. instabile Konjugate entstehen, die in reaktive elektrophile Kationen zerfallen und dann irreversibel an körpereigene Stoffe bzw. die DNA binden und so karzinogene Effekte hervorrufen.

Endogen gebildete Sulfate können durch Sulfatasen, die an die zytosolische Seite des Endoplasmatischen Retikulums gebunden sind oder in Lysosomen sowie im Golgi-Apparat vorkommen, gespalten werden (Parenti *et al.* 1997).

1.1.3.4 Acetyltransferasen

Acetylierungsreaktionen stellen für viele Arzneistoffe und andere Xenobiotika, die aromatische Amin- bzw. Hydrazin-Gruppen enthalten, einen wichtigen Metabolisierungsschritt dar (Grant *et al.* 2000). Die zytosolischen *N*-Acetyltransferasen (NAT), die in der Leber, aber auch in verschiedenen anderen Organen lokalisiert sind, katalysieren diese Konjugation unter Mitwirkung des Cofaktors Acetyl-Coenzym A (Abb. 1.12).

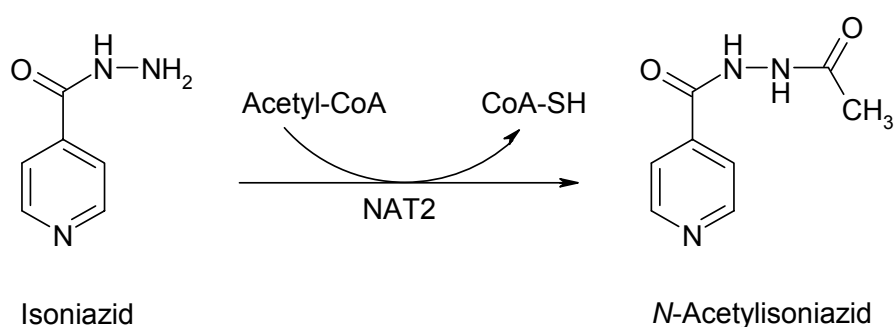


Abbildung 1.12 Acetyl-CoA-abhängige *N*-Acetylierung von Isoniazid durch die *N*-Acetyltransferase 2 (NAT2) (Forth *et al.* 2001)

Zwei Isoenzyme, NAT1 und NAT2, sind für den Menschen bekannt, wobei vielfältige genetische Variationen des zuletzt genannten Enzyms für die Einteilung in „langsame und schnelle Acetylierer“ verantwortlich sind. Selektive Substrate der *N*-Acetyltransferase 1 sind *p*-Aminobenzoesäure und *p*-Aminosalicylsäure, während das Tuberkulostatikum Isoniazid bevorzugt durch die NAT2 umgesetzt wird, das als acetyliertes Produkt keine pharmakologische Wirkung mehr aufweist (Estrada-Rodgers *et al.* 1998, Ilett *et al.* 1999). Hingegen können durch Acetylierung Karzinogene aus erhitzter Nahrung oder Zigarettenrauch in aktivierte Verbindungen umgewandelt werden. Da im Allgemeinen die Hydrophilie und somit auch die renale Elimination von Substanzen durch die Acetylierung verringert werden, nimmt diese Konjugation eine Mittelstellung zwischen Phase I- und Phase II-Reaktionen ein (Mutschler *et al.* 2001).

Neben den *N*-Acetyltransferasen sind auch *O*-Acetyltransferasen (OATs) beschrieben worden, die Substrate über ihre Sauerstoffatome acetylieren (Weber *et al.* 1990).

1.1.4 Biologische Systeme als Ersatz für den Tierversuch

Weitreichende bis heute anerkannte Empfehlungen zum Umgang mit Tieren in wissenschaftlichen Experimenten veröffentlichten Russell und Burch bereits im Jahre 1959 (Russell und Burch 1959). Ihr Konzept der drei „R“ („reduction, refinement, replacement“) zielt auf die Reduktion der Tierversuche sowie auf eine Methodenverbesserung bzw. Änderung des Versuchsdesigns, um die Leiden und Qualen der Tiere zu reduzieren oder zu umgehen. Außerdem forderten sie den Ersatz von Tierversuchen in der Forschung durch Alternativmethoden.

Der Schutz der Gesundheit des Menschen und die Linderung von Krankheiten einerseits und der Tierschutz andererseits bedürfen jedoch sorgfältiger Abwägung. Nachdem dieses Thema eine verstärkte Aufmerksamkeit in den 70er und 80er Jahren erlangte, wurde in der Richtlinie 86/609/EWG vom 24. November 1986 die Verwendung geeigneter *in vitro*-Testsysteme zur Vermeidung von Tierversuchen sowie der Schutz von zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzten Tieren als ein Ziel der Europäischen Gemeinschaft festgeschrieben (Rusche 2003).

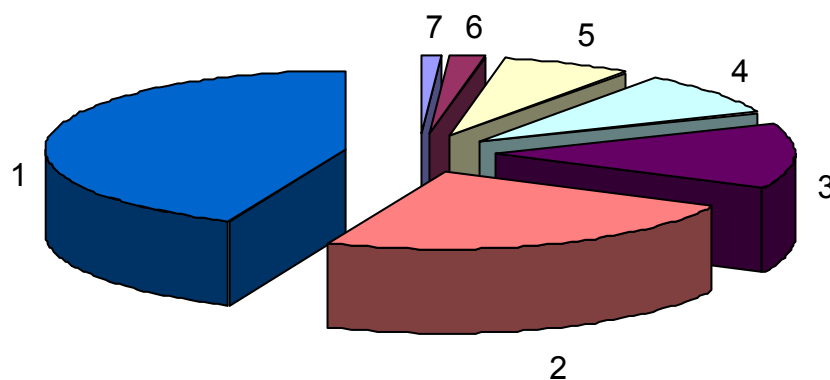


Abbildung 1.13 Einteilung der Tierversuche im Jahr 2001 nach Einsatzzwecken (Tierschutzbericht 2003, Deutscher Bundestag)

1 Biologische Grundlagenforschung (43,6%), 2 Erforschung und Entwicklung von Produkten und Geräten für medizinische Zwecke (23,9%), 3 Herstellung von oder Qualitätskontrolle bei Produkten oder Geräten für medizinische Zwecke (13,6%), 4 Toxikologische Untersuchungen und Sicherheitsprüfungen (8,9%), 5 Sonstige Zwecke (6,9%), 6 Ausbildung und Weiterbildung (1,9%), 7 Diagnose von Krankheiten (1,3%)

In Deutschland wurden im Jahre 2001 dennoch insgesamt ca. 2,13 Mio. Tierversuche (Abb. 1.13) zur biologischen Grundlagenforschung, Entwicklung und Testung der Unbedenklichkeit von pharmazeutischen und medizinischen Produkten sowie zu Toxizitätsuntersuchungen von in der Landwirtschaft, Bedarfsgegenständen und Lebensmitteln verwendeten Stoffen durchgeführt (Tierschutzbericht 2003, Deutscher Bundestag).

Das ECVAM („European Centre for the Validation of Alternative Methods“), das dem „Institute for Health and Consumer Protection“ in Ispra/Italien angehört und somit Teil des „Joint Research Centre“ der Europäischen Union ist, koordiniert seit 1992 die Forschung im Bereich der Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen. Neben der Zusammenführung von Daten aus verschiedenen Laboratorien und der unabhängigen Informationsübermittlung über den Stand der wissenschaftlichen Ergebnisse nimmt das ECVAM eine bedeutende Stellung in der Validierung von in der Forschung entwickelten *in vitro*-Testmethoden ein, die nach Anerkennung durch den Gesetzgeber rechtlichen Charakter bekommen können (ECVAM 2004).

Als Ersatz für Tierversuche in Biotransformationsstudien finden verschiedene *in vitro*-Systeme wie isolierte perfundierte Organe, Leberdünnschnitte („liver slices“), primäre Zellkulturen, Zelllinien, subzelluläre Fraktionen wie Mitochondrien und Mikrosomen oder gereinigte und rekombinant gewonnene Enzyme Anwendung (Abb. 1.14). Neben der ethischen Vertretbarkeit weist der Einsatz von *in vitro*-Systemen mehrere Vorteile wie eine einfache Kontrolle von Testbedingungen, größere Flexibilität in der experimentellen Durchführung, keine Interaktionen mit anderen Organen und dadurch leichtere Interpretation der Ergebnisse, große Probenkapazität und Einsatz geringerer Mengen an Testsubstanzen auf. Nachteilig sind jedoch die Entfernung von der *in vivo*-Situation und der damit verbundene Verlust von pharmakokinetischen Interaktionen sowie die schwierigere Extrapolation der *in vitro*-Daten (Lindl und Bauer 1994, Brandon *et al.* 2003).

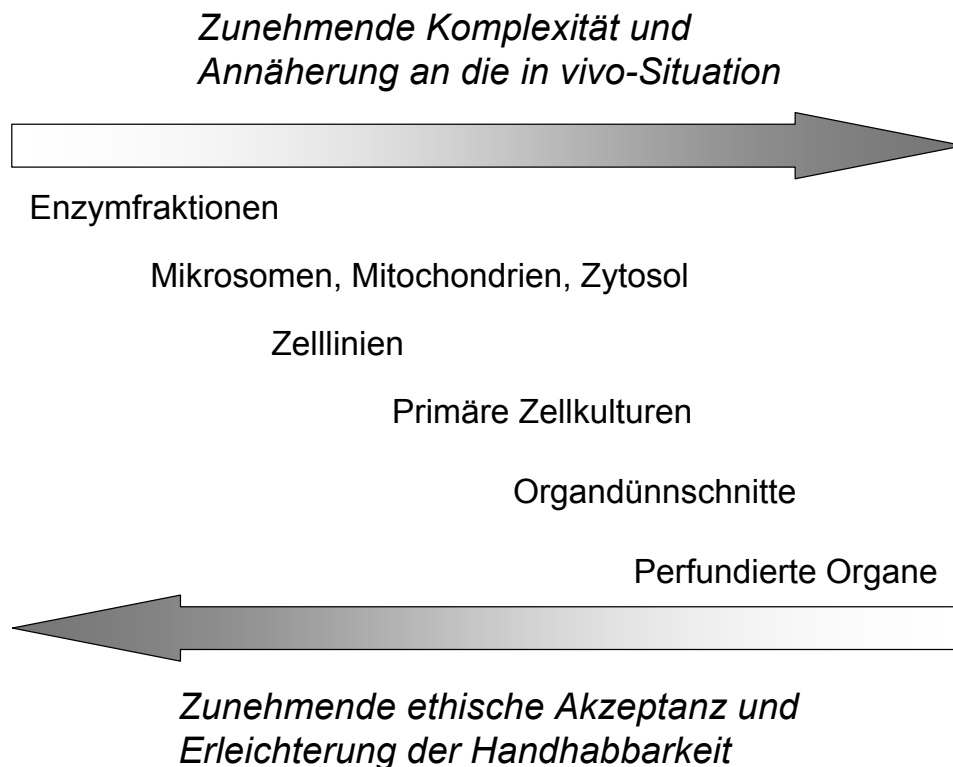


Abbildung 1.14 *In vitro-Modelle für Biotransformationsstudien (nach Brandon et al. 2003)*

1.1.5 Einsatz von Hepatozytenkulturen in Forschung und Therapie

Aufgrund mehrerer Vorteile (Tab. 1.2) gegenüber anderen unter 1.1.4 beschriebenen *in vitro*-Modellen sind die Einsatzmöglichkeiten von primären Hepatozytenkulturen in der Forschung vielfältig. Während mit isolierten Enzymen, Zytosol und subzellulären Fraktionen, die nur bestimmte Enzyme enthalten, lediglich ausgewählte Reaktionen untersucht werden können, ist der Einsatz der komplexeren Leberdünnschnitte und der isolierten Lebern aufgrund von rasch einsetzenden degenerativen Prozessen sowie langsamer Diffusion von Substanzen durch das Gewebe limitiert (Brandon et al. 2003). Neben Untersuchungen zum Metabolismus neu synthetisierter Verbindungen in der Forschung (Guillouzo et al. 1993) finden Hepatozytenkulturen auch in aufwendigeren Interaktions- und Induktionsstudien (Blaauboer et al. 1994) sowie zur Bestimmung von zytotoxischen und hepatotoxischen Eigenschaften potenzieller Wirkstoffe (Gómez-Lechón et al. 2001) Anwendung. Sie stellen außerdem ein geeignetes *in vitro*-Modell zur Beurteilung von Transportprozessen,

Clearancevorgängen und zur Quantifizierung von Biotransformationsreaktionen dar (MacGregor *et al.* 2001, Bachmann *et al.* 2003).

Trotz der aufwendigen und zeitintensiven Hepatozytenisolierung werden heute in Zeiten der kombinatorischen Chemie und des „high throughput screenings“ die beschriebenen *in vitro*-Tests mit Hepatozytenkulturen zur Selektion von Arzneistoffkandidaten in einem frühen Stadium der Arzneistoffentwicklung eingesetzt, damit nur auserwählte Verbindungen mit akzeptabler Nutzen-Risiko-Abschätzung weitere kostspielige Testphasen durchlaufen (Hamilton *et al.* 2002, Kern *et al.* 2002).

Für Metabolismus-, Clearance- und Induktionsstudien sind gute *in vitro-in vivo*-Korrelationen nachgewiesen worden (Andersson *et al.* 2001, LeCluyse 2001, Lau *et al.* 2002).

Tabelle 1.2 Vor- und Nachteile von primären Hepatozyten gegenüber anderen *in vitro*-Modellen (Berry *et al.* 1991, LeCluyse 2001, Brandon *et al.* 2003)

Vorteile	Nachteile
Etabliertes und charakterisiertes System	Zeitintensive und arbeitsaufwendige Gewinnung
Lebensdauer mehrere Tage bis Wochen	Zellschäden während Isolierung
Physiologisches Milieu (pH, Cofaktoren) des Zellsystems	Studien nur mit vorselektierten Zellen möglich
Untersuchung von Konkurrenz- und Folgereaktionen möglich	Kostenintensiv
Enzyminduktionsstudien möglich	
Kryokonservierung möglich	
Gute <i>in vitro-in vivo</i> -Korrelation	
Intakte Transportsysteme	

Bedingt durch wachsenden Humanorganmangel und damit verbundene lange Wartezeiten für allogene Organtransplantationen wuchs im letzten Jahrzehnt die Hoffnung auf Erfolg versprechende Transplantationen von Tierorganen auf den Menschen (Hammer 2000).

Große Übereinstimmungen in der Anatomie und Physiologie porciner Lebern mit denen der Menschen und ausreichende Verfügbarkeit an Schweinelebern steigerten das Interesse an der Erforschung des Metabolismus im Schwein (Skaanild und Friis 1997, Donato *et al.* 1999, Jurima-Romet *et al.* 2000, Soucek *et al.* 2001, Sheil 2002). Erkenntnisse, inwieweit Enzyme des Schweins Fremd- und Arzneistoffe in gleicher Weise metabolisieren wie die Enzyme des Menschen, sind hierbei von großer Bedeutung. Trotz der Beherrschung der Übertragung von porcinen endogenen Viren auf den Menschen und der möglichen genetischen Modulation der Tiere, um immunologisch bedingte Organabstoßungsreaktionen beim Menschen zu verhindern, stellt die Xenotransplantation weiterhin eine sehr große Herausforderung an Naturwissenschaftler und Mediziner dar (Hammer 2000, Sheil 2002).

Gute Fortschritte werden auch bei der Erforschung extrakorporaler Leberhilfssysteme gemacht. Hierbei kommen in unterschiedlich aufgebauten Bioreaktoren kultivierte und somit immobilisierte humane bzw. porcine Hepatozyten oder ganze Organe des Schweins zum Einsatz (Dixit und Gitnick 1996, Horslen *et al.* 2000, De Bartolo und Bader 2001). Im Fall von akutem Leberversagen können diese künstlichen Lebern bzw. diese extrakorporale Leberperfusion die Funktion der Patientenleber für einige Stunden bis zu mehreren Tagen übernehmen und so die Zeit bis zur Transplantation überbrücken.

1.1.6 Biotransformation stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen

In fast allen Arzneistoffen kommt Stickstoff als Bestandteil verschiedener funktioneller Gruppen vor, die sowohl Phase I-Reaktionen wie Oxidation, Reduktion und Hydrolyse als auch Konjugationen unterliegen können.

N-Oxygenierungen zu *N*-Oxiden und *N*-hydroxylierten Verbindungen werden hauptsächlich durch Cytochrom P450 und die flavinhaltige Monooxygenase (FMO) katalysiert (Ziegler 1988, Testa 1995d). Beide in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisierten Enzymsysteme bevorzugen NADPH als Cosubstrat und führen trotz unterschiedlicher Mechanismen zu gleichen Reaktionsprodukten. Nachdem *N*-Oxygenierungen von aromatischen (Kiese 1959) und aliphatischen Aminen (Coutts und Beckett 1977) ebenso beschrieben wurden wie die

Bildung von *N*-Oxiden aus tertiären Aminen (Rose und Castagnoli 1983), konnte Clement erstmals den oxidativen Metabolismus stark basischer stickstoffhaltiger Gruppen zeigen (Clement 1983, Clement und Zimmermann 1988). Weitere Arbeiten beschäftigten sich mit der *N*-Oxygenierung von Isothioharnstoffen (Clement und Wissel 1991), von *N*-substituierten und *N*-unsubstituierten Guanidinen (Clement und Kunze 1993, Clement *et al.* 1993c) sowie Amidinohydrazonen (Clement *et al.* 1996). Imine und Azoverbindungen werden durch Cytochrom P450 zu Oximen bzw. Azoxy-Derivaten umgesetzt (Prough *et al.* 1984, Übersicht Clement 1998).

Im Gegensatz zu den oxidativen Metabolisierungen gibt es im Allgemeinen wenige Erkenntnisse zu Reduktionen stickstoffhaltiger Xenobiotika. Eine Vielzahl an unterschiedlichen Enzymen ist an den reduktiven Biotransformationsreaktionen, die meist nur unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen wurden, beteiligt (Testa 1995f). Da der menschliche Organismus einer guten Sauerstoffversorgung unterliegt, ist ihre *in vivo*-Relevanz jedoch fraglich. Mittlerweile wurden durch Cytochrom P450-katalysierte *N*-Reduktionen verschiedener *N*-hydroxylierter Verbindungen wie Amidoximen, *N*-Hydroxyguanidinen, *N*-Hydroxyamidinohydrazonen und *N*-Methylhydroxylamin unter aeroben Bedingungen nachgewiesen (Clement 1998).

An Phase I-Reaktionen der stickstoffhaltigen Verbindungen können sich, wie unter 1.1.3 beschrieben, Phase II-Umsetzungen anschließen. Glucuronidierungen, Sulfatierungen und Acetylierungen des Stickstoffs sind hierbei ebenso möglich wie Konjugationen an Sauerstoffatomen (Tab. 1.1). Eine bedeutende Rolle in Hinblick auf die Eliminierung nimmt die *O*-Glucuronidierung von *N*-oxidierten Verbindungen bzw. die *N*-Glucuronidierung von tertiären Aminen ein (Jansen *et al.* 1992, Sakamoto *et al.* 1993, Ismail *et al.* 2002, Santi *et al.* 2002). Im Fall von hydroxylierten heterozyklischen Aminen (Hydroxylaminen) wie den so genannten Food-Mutagenen bewirkt eine *N*-Konjugation der *N*-Hydroxyfunktion (Glucuronidierung, Sulfatierung oder Acetylierung) jedoch eine Toxifizierung, die auf der Instabilität dieser Phase II-Metaboliten beruht. Durch Zerfall dieser Verbindungen entstehen sehr reaktive, mutagen und karzinogen wirkende Arylnitrenium-Ionen (Gooderham *et al.* 2001, Malfatti und Felton 2001). Allerdings weisen *N*-*O*-Glucuronide des *N*-Hydroxy-

2-acetylaminofluorens eine deutlich geringere Aktivität auf als die entsprechenden O-Sulfate (Ritter 2000).

Nachdem bereits *in vivo*-Studien mit Ratten und Kaninchen Hinweise auf die O-Glucuronidierung und O-Sulfatierung eines Amidoxims gaben (Clement *et al.* 1993b), gelang Clement *et al.* (2001) erstmals der direkte Nachweis der Bildung von Benzamidoxim-O-glucuronid und -O-sulfat in Schweinehepatozytenkulturen. Die im Ames-Test mutagene Eigenschaften aufweisende O-Acetylverbindung des Benzamidoxims konnte jedoch nicht detektiert werden. Entsprechende Phase II-Studien von *N*-hydroxylierten Guanidinen bzw. *N*-hydroxylierten Amidinohydrazonen wurden bisher noch nicht durchgeführt.

1.1.7 Enzyminduktion

Eine Vielzahl von Xenobiotika mit unterschiedlichen Strukturen, aber auch endogene Verbindungen können eine vermehrte Bildung von Enzymen induzieren (Morgan *et al.* 1998). Die Induktion ist durch einen schnellen Wirkeintritt, eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit und eine begrenzte Effektstärke sowie durch ihre Reversibilität gekennzeichnet. Nach Absetzen der induzierenden Substanz sinkt die Enzymkapazität innerhalb von einigen Tagen bis Wochen wieder auf das ursprüngliche Niveau (Forth *et al.* 2001). Es können sowohl Phase I-Enzyme wie die Cytochrom P450-Isoenzyme als auch Phase II-Enzyme wie UDP-Glucuronyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen oder Sulfotransferasen durch Induktoren in ihrer Expression beeinflusst werden (Morgan *et al.* 1998, Desille *et al.* 1999, Langsch und Bader 2001). Die Einteilung der exogenen Induktoren des Cytochrom P450-Enzymsystems erfolgt anhand von Prototypen in drei verschiedene Gruppen (Tab. 1.3).

Tabelle 1.3 Einteilung der Induktion der Cytochrom P450-Enzyme (Zelko und Negishi 2000, Mutschler et al. 2001)

Induktortyp	Induktoren (Bsp.)	Zytosolischer Rezeptor	Ausbildung von Dimeren	Hauptsächlich beeinflusste CYP-Gene
Methylcholanthren-Typ	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	AhR	AhR/ARNT	CYP1A
Phenobarbital-Typ	Phenobarbital, Steroidhormone	CAR	CAR/RXR	CYP2
Rifampicin-Typ	Rifampicin, Dexamethason, Pregnenolon-16 α -carbonitril	PXR	PXR/RXR	CYP3A

Ah = aryl hydrocarbon, AhR = aryl hydrocarbon receptor, ARNT = Ah receptor nuclear translocator, CAR = constitutive androstane receptor, PXR = pregnane X receptor, RXR = retinoid X receptor

Induktoren vom Methylcholanthren-Typ beeinflussen die Bildung von CYP1A-Enzymen, während Phenobarbital sowie Steroidhormone hauptsächlich die Expression der Enzyme der CYP2-Unterfamilie verändern. Substanzen des Rifampicin-Typs zeichnen sich durch den Einfluss auf die CYP3A-Gene aus. Der Mechanismus der Induktion ist exemplarisch am Beispiel des Methylcholanthren-Typs in Abbildung 1.15 dargestellt. Die Induktoren binden zunächst an den im Zytosol vorliegenden Ah-Rezeptor. Nach Tyrosinkinase-vermittelter Abspaltung eines ebenfalls an den Ah-Rezeptor gebundenen Hitze-Schock-Proteins (HSP90) gelangt der Induktor-Rezeptor-Komplex mittels aktiver Transportprozesse in den Zellkern (Morgan *et al.* 1998). Dort bildet er mit dem ARNT-Protein („Ah receptor nuclear translocator“) ein Heterodimer aus, das nun an XRE-Strukturen („xenobiotic responsive element“) auf der DNA binden kann. Dies führt über weitere, vermutlich Proteinkinase C gesteuerte, Regulierungsschritte zur Aktivierung eines bestimmten Genabschnitts und somit zu einer gesteigerten Transkription und Translation (Morgan *et al.* 1998).

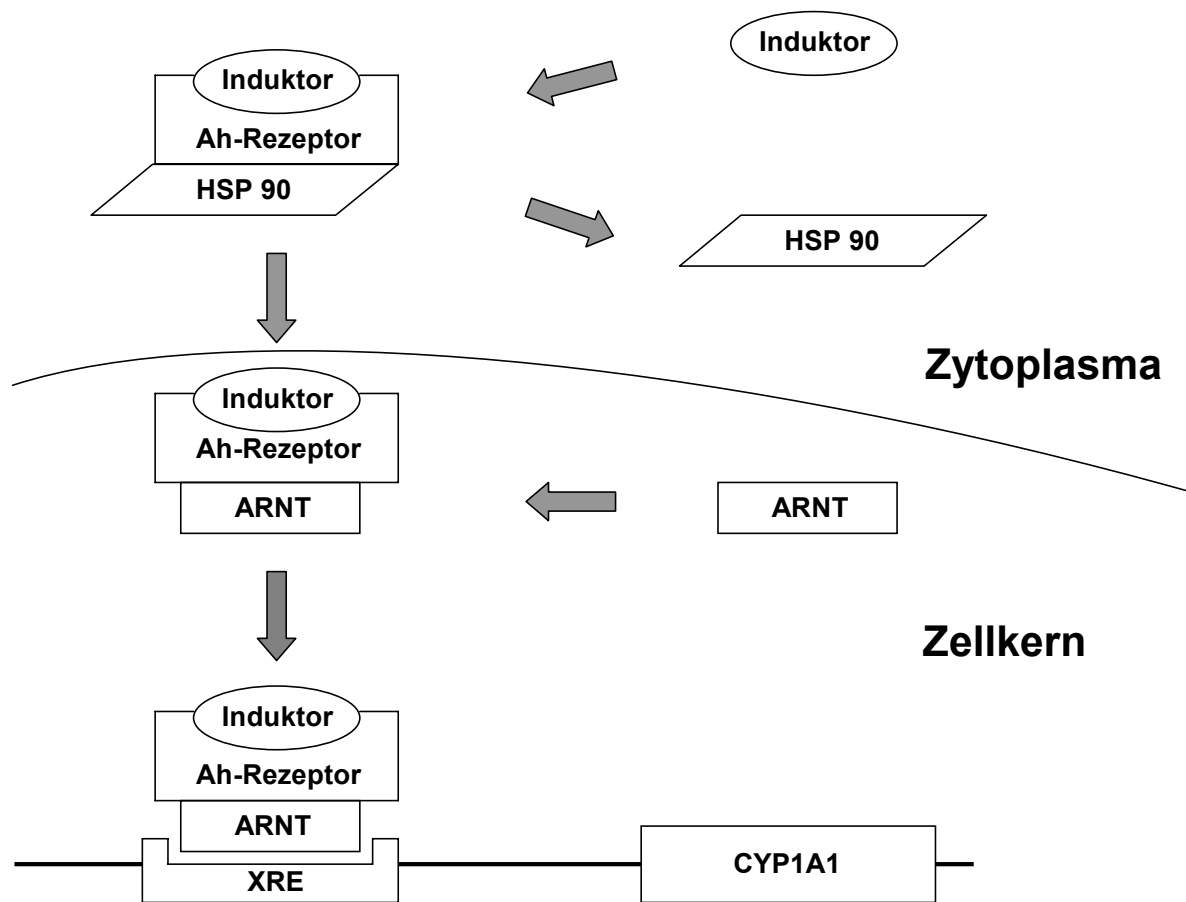


Abbildung 1.15 *Molekularer Mechanismus der Induktion vom Methylcholanthren-Typ (nach Mutschler et al. 2001)*

Ah = aryl hydrocarbon, ARNT = Ah receptor nuclear translocator, HSP = heat shock protein, XRE = xenobiotic responsive element

Der zytosolische PPAR α („peroxisome proliferator activated receptor alpha“), der mit dem Retinoid-Rezeptor (RXR) im Zellkern heterodimere Strukturen bildet, spielt eine entscheidende Rolle in der Induktion von CYP4A-Isoenzymen. Diese Induktoren weisen ebenso wie die des Rifampicin-Typs ein großes unterschiedliches Strukturspektrum auf (Savas et al. 1999).

Eine länger andauernde medikamentöse Therapie mit Enzyminduktoren führt aufgrund gesteigerter Abbaukapazität des vermehrt gebildeten Proteins zu einer Erniedrigung der Plasmakonzentrationsspiegel von Arzneistoffen und körpereigenen Wirkstoffen und somit zu Schwankungen in der Pharmakokinetik. Sind die Abbauprodukte pharmakologisch weniger aktiv, resultiert daraus eine verminderte Wirksamkeit, was ein Therapieversagen nach sich ziehen kann (Smith 2000). Im

Fälle von gleichzeitig verabreichten anderen Medikamenten können folglich schwerwiegende Arzneimittelwechselwirkungen, wie z. B. verringerte immunsuppressive Effekte von Ciclosporin A bei gleichzeitiger Rifampicin-Gabe oder eine verstärkte Blutgerinnung bei Comedikation von Warfarin und Phenobarbital, eintreten (Plant und Gibson 2003, Roymans *et al.* 2004).

Tabelle 1.4 gibt einen Überblick über einige humane Cytochrom P450-Induktoren und CYP-Isoenzym typische Reaktionen.

Tabelle 1.4 *Übersicht einiger humaner CYP-Isoenzyme, deren Induktoren und Substratreaktionen (Rendic und Di Carlo 1997, Kostrubsky et al. 1999, Donato et al. 2000, Madan et al. 2003, Raucy 2003)*

Humane CYP-Isoenzyme	Induktoren	Substratreaktionen
1A2	Dihydralazin, Omeprazol, Lansoprazol, 3-Methylcholanthren, β -Naphthoflavon, PAHs, PCBs, TCDD	Coffeindemethylierung 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung Phenacetin-O-deethylierung
2A6	Phenobarbital, Pyrazol (geringe Effekte)	Cumarin-7-hydroxylierung
2B6	Clofibrinsäure, Phenobarbital, Rifampicin	7-Benzoyloxyresorufin-O-debenzylierung 7-Pentoxyresorufin-O-depentylierung S-Mephenytoin-N-demethylierung
2C8	Rifampicin, Phenobarbital, Phenytoin	Tolbutamidmethylhydroxylierung
2C9	Phenobarbital, Rifampicin	Diclofenac-4'-hydroxylierung Phenytoin-4'-hydroxylierung Tolbutamidmethylhydroxylierung
2C18	Rifampicin	S-Mephenytoin-4'-hydroxylierung
2C19	Phenobarbital, Phenytoin, Rifampicin	S-Mephenytoin-4'-hydroxylierung Omeprazol-5-hydroxylierung
2D6	Unbekannt	Bufuralol-1-hydroxylierung Debrisoquin-4-hydroxylierung Dextromethorphan-O-demethylierung Sparteine-C-oxidationen
2E1	Ethanol, Isoniazid, Phenobarbital, Rifampicin	Anilin-4-hydroxylierung Chlorzoxazon-6-hydroxylierung <i>p</i> -Nitrophenolhydroxylierung
3A4	Carbamazepin, Dexamethason, Metyrapon, Omeprazol, Phenobarbital, Phenylbutazon, Phenytoin, Prednison, Quercetin, Rifampicin, Sulfadimidin, Taxol	Dapson-N-hydroxylierung Erythromycin-N-demethylierung Lidocain-N-deethylierung Midazolam-1-hydroxylierung Nifedipinoxidation Testosteron-6 β -hydroxylierung

PAHs = Polyzyklische Kohlenwasserstoffe, PCBs = Polychlorierte Biphenyle, TCDD = 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin

Die beschriebenen Folgen der Enzyminduktionen verdeutlichen die Notwendigkeit der Aufdeckung dieser Phänomene für die Entwicklung von sicheren Arzneimitteln. Die Testung auf induktive Eigenschaften der Arzneistoffkandidaten sollte bereits im Forschungsstadium oder spätestens in der präklinischen Phase erfolgen, damit gegebenenfalls größere finanzielle Verluste verhindert werden können (Roymans *et al.* 2004). Für diese Untersuchungen sind allgemein zwei Methoden bekannt, zum einen die *in vivo*-Studien mit anschließender Mikrosomengewinnung und zum anderen die Induktion von Enzymen *in vitro* in Hepatozytenkulturen. Während diese Studien früher hauptsächlich in Ratten durchgeführt wurden (Silva *et al.* 1998), wird heute aufgrund von Speziesunterschieden die *in vitro*-Testung mit humanen Hepatozytenkulturen als die Methode der Wahl angesehen (LeCluyse 2001). Eine nicht ausreichende Verfügbarkeit gesunder humaner Lebergewebe sowie ethische, rechtliche und nicht zuletzt ökonomische Gründe begrenzen den Einsatz dieser menschlichen Zellen (Skett *et al.* 1995, Monshouwer *et al.* 1998), so dass alternative Möglichkeiten, wie z. B. der Einsatz von porcinen Hepatozytenkulturen, verstärkt erforscht werden (vgl. 6.1.1).

1.2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Hepatozytenkulturen, die die *in vivo*-Bedingungen in einem großen Ausmaß nachahmen, gelten als geeignetes *in vitro*-Modell für Studien zur Aufklärung des Metabolismus und von potenziellen Interaktionen (LeCluyse 2001). Zellen sowohl der Spezies Ratte als auch des Menschen stellen aufgrund großer Speziesunterschiede bzw. mangelnder Verfügbarkeit hierfür allerdings keine geeigneten Enzymquellen dar (Li *et al.* 1997). Vorangegangene Studien beschäftigten sich folglich mit der Suche nach Alternativen und zeigten Hinweise auf die Eignung von porcinen Leberparenchymzellen für den benannten Einsatz (Zuber *et al.* 2002). Folglich war das Ziel der vorliegenden Arbeit zunächst, anhand einer im Arbeitskreis bekannten Methode Schweinehepatozyten zu isolieren und zu kultivieren, um diese für weitere Testungen einsetzen zu können. Durch die Optimierung bestimmter Prozessparameter sollten Zellausbeute, Vitalität und metabolische Kompetenz, die in Hinblick auf die Aktivität der Phase I- und Phase II-Enzyme mittels mehrerer Markerreaktionen zu bestimmen war, gesteigert werden.

Da bisher nur wenige oder keine Erkenntnisse über Phase II-Reaktionen von Guanidinen und Amidinohydrazonen vorlagen, wurden die Modellverbindungen Debrisoquin (Guanidin) und Guanabenz (Amidinohydrazon) sowie deren entsprechende *N*-hydroxylierte Verbindungen bezüglich ihres Metabolismus anhand porciner Hepatozytenkulturen untersucht. Aufgrund der guten *in vitro*-*in vivo*-Korrelation dieses Testsystems waren Studien bezüglich des mit Mikrosomen gezeigten metabolischen Zyklus zwischen Reduktion und Oxidation in Hinblick auf die Detoxifizierung des im Ames-Test mutagenen Guanoxabenz von besonderem Interesse (Clement *et al.* 1996). Hierzu war es zunächst erforderlich, geeignete chromatographische und massenspektrometrische Methoden zu entwickeln.

Im Weiteren sollten humane Hepatozyten kultiviert werden, um mit diesen den Phase I- und Phase II-Metabolismus von Amidoximen und Amidinen anhand der Modellverbindungen Benzamidoxim und Benzamidin, über die bereits Ergebnisse aus Untersuchungen mit Schweinehepatozytenkulturen vorlagen (Clement *et al.* 2001), zu bestimmen. Da Amidoxime ein bekanntes Prodrug-Prinzip mehrerer zugelassener Arzneistoffe darstellen (Clement 2002), sind die Erkenntnisse dieser Studien in diesem *in vitro*-System sehr bedeutend. Ferner sollte anhand eines

Vergleichs der in beiden Spezies (Schwein, Mensch) gebildeten Biotransformationsprodukte der Substrate Benzamidoxim, Benzamidin, *N*-Hydroxydebrisoquin und Debrisoquin die Eignung des Einsatzes von porcinen Hepatozytenkulturen für Metabolismusstudien überprüft und gegebenenfalls bestätigt werden.

Über die Beteiligung einzelner Isoenzyme der UDP-Glucuronyltransferasen an der *O*- bzw. *N*-Glucuronidierung von *N*-hydroxylierten Amidinen, Guanidinen und Amidinohydrasonen ist bisher wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb dieser Sachverhalt aufgeklärt werden. Hierfür mussten zur Bestimmung der Enzymaktivität der einzelnen UGTs HPLC-Methoden in Anlehnung an Literaturvorschriften neu etabliert werden. Im menschlichen Organismus dient die Glucuronidierung überwiegend der Hydrophilieerhöhung und somit der Elimination und Entgiftung von Xenobiotika. Da aufgrund genetischer Polymorphismen große interindividuelle Unterschiede bezüglich dieser Konjugation auftreten können (Fisher *et al.* 2001), ist es wichtig, die Beteiligung bestimmter UGT-Isoenzyme an der Glucuronidierung von diesen bekannten, in verschiedenen Wirkstoffen enthaltenen funktionellen Gruppen zu kennen. Außerdem wurde erhofft, anhand der Substratspezifität der UGTs Erkenntnisse zur Aufklärung des Glucuronidierungsortes im Molekül zu erhalten.

Unter ethischen und Tierschutz-Aspekten ist es von großer Wichtigkeit nicht nur für Metabolismus-, sondern auch für Interaktionsstudien ein geeignetes *in vitro*-Modell mit tierischen Zellen zu entwickeln, das in der Lage ist, Arzneistoffkandidaten in einem großen Umfang auf potenzielle induzierende Eigenschaften in einem frühen Stadium der pharmazeutischen Entwicklung zu testen, um so Vorhersagen zu möglichen Wechselwirkungen mit anderen Arzneistoffen treffen zu können. Deshalb sollte mit dieser Arbeit hierzu ein Beitrag geleistet werden. Es galt zunächst, die literaturbekannte Methode anhand von im Schwein nachgewiesenen Induktoren bestimmter Isoenzyme, die für die Umsetzung zahlreicher Arzneistoffe verantwortlich sind, im Arbeitskreis zu etablieren. Im Folgenden sollte die Induktion des CYP1A2 durch Omeprazol erstmals in Hepatozytenkulturen des Deutschen Hausschweins untersucht und so mögliche Parallelen zur Induktion in menschlichen Zellen aufgedeckt werden.

2 Isolierung und Kultivierung von Hepatozyten

2.1 Einleitung

2.1.1 Allgemeine Betrachtungen

Ab 1950 gab es erste Versuche, Hepatozyten zu isolieren (Berry *et al.* 1997). Eine Behandlung des Gewebematerials mit calciumfreiem Medium bewirkte ein Auflösen der Zellverbände und führte zur Separation der Zellen. Durch diese Isolierungsmethode wurden allerdings die Zellwände der Hepatozyten größtenteils beschädigt und Enzyme des Zytoplasmas gingen verloren.

1967 beschrieben Howard *et al.* den erfolgreichen Einsatz von Kollagenase im Isolierungsprozess. Intakte Rattenhepatozyten konnten aus Leberdünnschnitten („liver slices“) gewonnen werden. Die Ein-Stufen-Kollagenase-Perfusion der gesamten Rattenleber *in situ* führte im Gegensatz zur Verwendung von Leberdünnschnitten zur deutlichen Verbesserung der Zellausbeute (Berry und Friend 1969).

Seglen (1976) optimierte die Methode, indem er das Lebermaterial einer Zwei-Stufen-Perfusion unterzog. Im ersten Schritt wurde mit calciumfreiem Puffer perfundiert, um die zelluläre Adhäsion zu verringern, während die Aktivität der calciumabhängigen Kollagenase durch Zusatz von Calcium-Ionen im folgenden Medium erhöht wurde. Reese und Byard (1981) übertrugen dieses Zwei-Stufen-Modell auf weitere Spezies wie Kaninchen, Meerschweinchen, Hund und Mensch. Schweinehepatozyten werden heutzutage nach diesem weit verbreiteten Modell gewonnen (Behnia *et al.* 2000, Skaanild und Friis 2000, Clement *et al.* 2001, Liu *et al.* 2004).

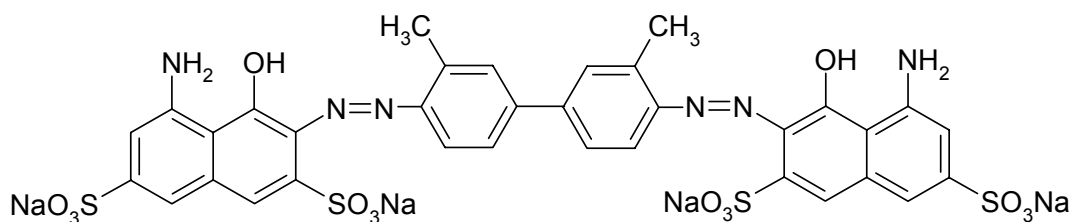


Abbildung 2.1 Trypanblau zur Bestimmung der Vitalität in Zellsuspensionen

Der Erfolg der Separation wird über die Parameter Ausbeute und Vitalität beurteilt (Abb. 2.1). Der Farbstoff Trypanblau färbt Zellen mit zerstörter Zellwand an, während intakte Zellen ihn nicht aufnehmen (Lindl und Bauer 1994).

Isolierte Hepatozyten finden für Metabolismusstudien sowohl als Zellsuspensionen als auch in Form von Zellkulturen Anwendung. Suspendierte Hepatozyten sind nur ca. vier Stunden lebensfähig (Berry *et al.* 1991). Eine rapide Abnahme der Enzymaktivität von Cytochrom P450 begrenzt deshalb den Einsatz dieser Zellen auf Kurzzeituntersuchungen (Gebhardt *et al.* 2003).

Bereits 1973 nutzten Bissell *et al.* die adhärenenten Eigenschaften der Hepatozyten aus und beschrieben als Erste die Kultivierung von Leberzellen in einem Monolayer-Modell. Die Hepatozyten bilden hierbei einen aus einer Zellschicht bestehenden Zellrasen auf Zellkulturoberflächen. Die Anordnung von Zellen zwischen zwei Kollagengelschichten wird als Sandwich-Kultur bezeichnet, welche in einem noch größeren Umfang die *in vivo*-Bedingungen nachahmt als die Monolayer-Kultur (Dunn *et al.* 1989, Kern *et al.* 1997). Metabolische Aktivitäten und lebertypische Eigenschaften bleiben deshalb über einen längeren Zeitraum erhalten (Nussler *et al.* 2001). Weitere Zellkulturmodelle wie 3D-Bioreaktoren, in denen mittels drei unabhängiger Kapillarsysteme kontinuierlich ein Austausch von Gas, Medium und Zellprodukten stattfindet (Nussler *et al.* 2001), und Kokulturen mit nicht-parenchymatischen Sinusoidal- oder Kupfferzellen (Davis 1994, Gebhardt *et al.* 2003) haben sich bis heute für den Einsatz in Metabolismusstudien nicht durchgesetzt (Abb. 2.2).

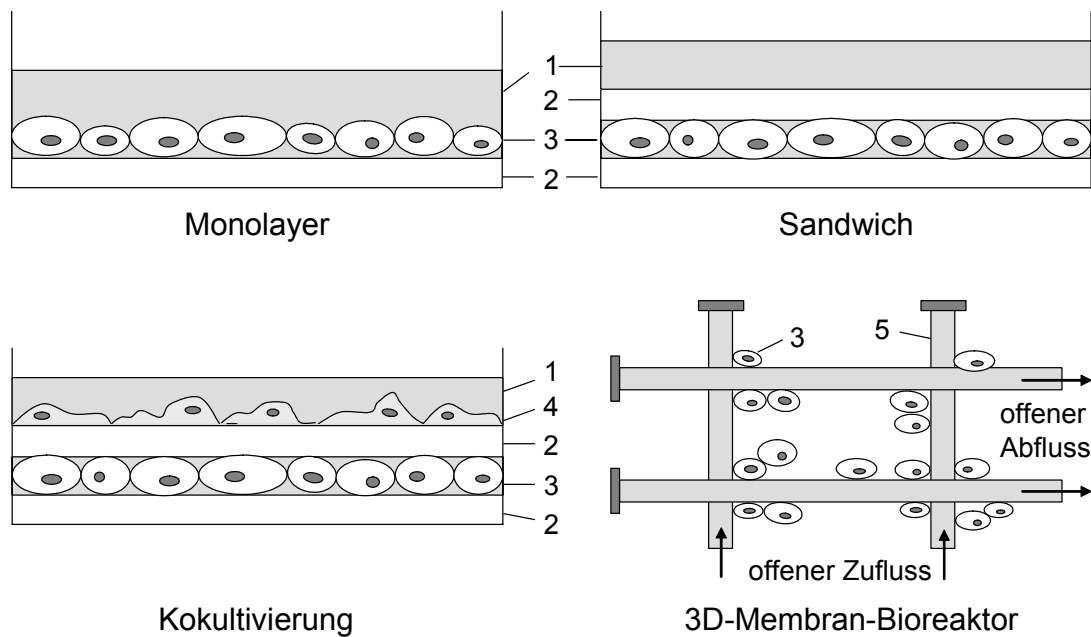


Abbildung 2.2 **Übersicht verschiedener Kultivierungsmodelle (nach Bader et al. 1996, Nussler et al. 2001): 1 Medium, 2 Kollagengel, 3 Hepatozyten, 4 Nicht-Parenchymzellen, 5 Kapillarsystem**

Neben dem Kultivierungsmodell ist auch die Auswahl des verwendeten Kulturmediums entscheidend. Skett (1994) beschrieb, dass bei Verwendung von unterschiedlichen Kulturmedien um den Faktor zehn abweichende Enzymaktivitäten auftraten. Neben einer Verlängerung der Kultivierungsdauer können weitere Medienzusätze wie Hormone und Wachstumsfaktoren eine Entfernung des *in vitro*-Modells von den *in vivo*-Bedingungen bewirken. Folglich wäre eine Harmonisierung der Kultivierungsmethoden zur besseren Vergleichbarkeit von Studien verschiedener Laboratorien wünschenswert. Erste Empfehlungen zur Kultivierung von Hepatozyten publizierte das ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) im Jahre 1994, weitere Validierungsstudien sollten folgen (Blaauboer et al. 1994).

Neben Studien mit frisch isolierten Hepatozyten wächst das Interesse an der Forschung zur Kryokonservierung von Leberzellen, das durch den möglichen Einsatz von kryokonservierten Zellen im künstlichen Lebermodell (Chen et al. 2001) und die begrenzte Verfügbarkeit von humanen Leberproben hervorgerufen wurde (Li et al. 1999). Während Metabolismus-, Zytotoxizitäts- und Inhibitionsstudien mit kryokon-

servierten Zellen bereits seit einigen Jahren durchgeführt wurden (Li *et al.* 1999), sind kryokonservierte Hepatozyten als Modell für Induktionsstudien, also Langzeituntersuchungen, erst im Jahre 2004 beschrieben worden (Roymans *et al.* 2004).

2.1.2 Zielsetzung

Vorangegangene Studien im Arbeitskreis beschäftigten sich mit der Isolierung von Ratten-, Schweine- und humanen Hepatozyten (Wohlens 1994, Christiansen 2000). Zellen der drei Spezies konnten von Christiansen (2000) kultiviert und charakterisiert werden. Aufgrund bestehender Speziesunterschiede zwischen dem Nager Ratte und dem Menschen wurden in der vorliegenden Arbeit Metabolismus- und Interaktionsstudien nur mit porcinen und humanen Hepatozyten durchgeführt (Li *et al.* 1997, Olsen *et al.* 1997). Die von Christiansen (2000) beschriebene Methode zur Gewinnung von Schweinehepatozyten sollte fortgeführt und bezüglich einiger Prozessparameter weiterentwickelt werden. Eine ausreichende Ausbeute und Vitalität der porcinen Zellen sollten eine anschließende Kultivierung ermöglichen, um einen raschen Enzymverlust von suspendierten Hepatozyten zu vermeiden. Eine begrenzte Verfügbarkeit von humanem Lebergewebe und eine eingeschränkte Vitalität dieser von Tumorkranken gewonnenen Zellen (Christiansen 2000) veranlasste uns, auf eine Isolierung von frischen humanen Hepatozyten zu verzichten. Um die *in vitro*-Biotransformation mit kultivierten Hepatozyten der zwei Spezies Schwein und Mensch im Weiteren vergleichen zu können, sollte erstmals im Arbeitskreis die Kultivierung von gekauften kryokonservierten humanen Hepatozyten durchgeführt werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Schweinehepatozyten

2.2.1.1 Versuchsdurchführung

Schlachtfrisches Lebergewebe von deutschen Kreuzungsschweinen wurde von einem lokalen Schlachthof bezogen und in eisgekühltem calciumfreien Krebs-Ringer-Puffer pH 7,4 transportiert. Die Zeit zwischen der Schlachtung und dem Beginn der Perfusion betrug weniger als 50 min. Die Perfusion erfolgte nach der von Christiansen (2000) modifizierten Vorschrift, die in Anlehnung an die Methoden von Reese und Byard (1981) und Bader *et al.* (1992) entwickelt wurde. Im Folgenden sollen deshalb nur ein Überblick über den Ablauf der Isolierung gegeben und abweichende Prozessparameter detaillierter beschrieben werden.

Nur unversehrte Leberendstücke mit glatter Schnittkante, die deutlich sichtbare Gefäßöffnungen aufwiesen, wurden zur Zwei-Stufen-Perfusion herangezogen. Die zur Perfusion verwendeten Präperfusions- und Perfusionspuffer wurden frisch hergestellt und nicht autoklaviert. Einer möglichst vollständigen Entblutung der Leberprobe und der damit verbundenen Entfernung von Calciumionen mittels Präperfusionspuffer (calcium- und magnesiumfreier Krebs-Ringer-Puffer mit EDTA) im ersten Perfusionsschritt schloss sich eine 10 min andauernde Spülung mit dem calciumhaltigen Krebs-Ringer-Puffer (Perfusionspuffer) an. Im rezirkulierenden System wurde weitere 8 min mit einem Kollagenase II enthaltenden Perfusionspuffer (190 mg pro 120 ml) perfundiert. Nach Herauslösen der Zellen aus der Leberkapsel und Filtration der groben Zellsuspension folgten drei Zentrifugationsgänge zur Abtrennung von toten Hepatozyten (50g, 4 min, 15°C). Nach jedem Waschschritt wurde das Zellpellet in warmem Perfusionspuffer resuspendiert. Nach Abschluss dieses Vorgangs wurden die Zellen in 37°C warmem Williams' E Medium aufgenommen.

2.2.1.2 Bestimmung der Ausbeute und Vitalität

Die Bestimmung der Ausbeute und Vitalität wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstest in einer Neubauerkammer durchgeführt (Christiansen 2000).

2.2.2 Kultivierung von Schweinehepatozyten

Die Einstellung der Hepatozytensuspension auf eine Zellzahl von 1×10^6 pro ml wurde mit Williams' E Medium (+ Zusätze) vorgenommen, dessen Zusammensetzung in Tabelle 2.1 angegeben ist.

Im Anschluss wurden jeweils 3 ml dieser Hepatozytensuspension (ca. 3×10^6 Zellen) auf Gewebekulturschalen pipettiert, die Schalen leicht geschwenkt und die Kulturen 90 min lang im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Feuchte inkubiert. Nach Ablauf dieses Zeitraums wurden tote, nicht adhärente Zellen durch Wechsel des Mediums (3 ml pro Schale) entfernt. Die Kultivierung erfolgte unter den angegebenen Bedingungen im Brutschrank, wobei das Medium im Abstand von jeweils 24 h erneuert wurde.

Tabelle 2.1 *Medienzusammensetzung für die Kultivierung von Schweinehepatozyten (Williams' E Medium + Zusätze)*

Bestandteil	Konzentration im Medium
Glucagon	0,014 µg/ml
Prednisolon	9,6 µg/ml
Insulin	0,16 U/ml
Glutamin	2 mM
Penicillin	150 U/ml
Streptomycin	150 µg/ml
Fötales Kälberserum	10%

2.2.3 Aufarbeitung von kryokonservierten humanen Hepatozyten

Die kryokonservierten humanen Hepatozyten wurden entsprechend der Vorschrift der Firma In Vitro Technologies aufgetaut.

Das Zellvial wurde aus dem mit flüssigem Stickstoff befüllten Behälter entnommen, geöffnet und auf Eis gestellt, um eingedrungenen Stickstoff 5 min lang entweichen zu lassen. Nach Verschluss des Vialdeckels wurde die Hepatozytensuspension rasch im 37°C-warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in 50 ml „Hepatocyte Thawing Medium“ (37°C) suspendiert. Nach Zentrifugation (50g, 5 min, 20°C) wurde das entstandene Zellpellet in 5 ml „Hepatocyte Plating Medium“ (37°C) resuspendiert.

2.2.4 Kultivierung von kryokonservierten humanen Hepatozyten

Unter aseptischen Bedingungen wurden 2 ml der Zellsuspension (ca. 2×10^6 Zellen) auf jeweils eine Gewebekulturplatte pipettiert. Die Zellen wurden durch Schwenken gleichmäßig verteilt und im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte kultiviert. Nach 4 h wurde das „Hepatocyte Plating Medium“ durch „Hepatocyte Incubation Medium“ ausgetauscht. Alle 24 h erfolgte dann eine weitere Erneuerung des Mediums.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Isolierung von Schweinehepatozyten

Tabelle 2.2 gibt die Größe des zur Isolierung herangezogenen Leberstücks sowie die Ausbeute und Vitalität der Hepatozyten wieder.

Tabelle 2.2 Ausbeute und Vitalität von Schweinehepatozyten

Schwein	Gewicht des Leberstücks (g)	Ausbeute ($\times 10^8$ Zellen)	Ausbeute ($\times 10^6$ Zellen/g Leber)	Vitalität nach Trypanblaufärbung (%)
1	84	2,28	2,7	86,2
2	90	2,79	3,1	78,5
3	86	4,20	4,9	85,7
4	84	2,48	3,0	89,0
5	88	4,85	5,5	85,7
6	87	4,06	4,7	83,5

2.3.2 Kultivierung von Schweine- und Humanhepatozyten

Die Hepatozyten beider Spezies ließen sich über einen Zeitraum von sieben Tagen in Kultur halten. Nach dem Ausplattieren adhärten lebende Hepatozyten innerhalb von 90 bzw. 240 Minuten an der Oberfläche der Gewebekulturgefäße. Tote oder nicht-parenchymatische Zellen waren im Medium frei beweglich und wurden beim Mediumswechsel entfernt. Zunächst wiesen die adhären Hepatozyten eine runde Form auf. Bereits innerhalb der nächsten 24 Stunden veränderten sie ihre Gestalt und nahmen durch Spreiten Kontakt zu Nachbarzellen auf. Ein konfluenter Zellrasen mit durchscheinenden Zellen breitete sich aus.

2.4 Diskussion

Die Zwei-Stufen-Perfusion ist ein häufig angewandtes Verfahren zur Isolierung porciner Hepatozyten. In der Literatur werden die durch den Trypan-Ausschlusstest bestimmten Vitalitäten der Zellen zwischen 70-98% angegeben (Olsen *et al.* 1997, Hosagrahara *et al.* 1999, Christiansen 2000, Hansen *et al.* 2000, Skaanild und Friis 2000, Liu *et al.* 2004). Die in dieser Arbeit erzielten Vitalitätswerte liegen im Bereich von 78-89% und sind mit den publizierten Daten vergleichbar. Im Gegensatz dazu sind Werte für die Ausbeute in der Literatur nur selten aufgeführt. Hansen *et al.* (2000) erhielten aus einem nicht näher definierten Leberfragment 3×10^9 Zellen. Aus Leberstücken mit einem Gewicht von 80-100 g isolierte Christiansen (2000) durchschnittlich $2,1 \times 10^8$ Zellen. Dieser Wert entsprach $2,3 \times 10^6$ Zellen pro Gramm perfundiertes Gewebe. Eine etwas höhere Ausbeute von 1×10^7 Hepatozyten pro Gramm Lebermaterial konnte die Arbeitsgruppe um Koebe erhalten (Koebe *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden Ausbeuten von $2,7-5,5 \times 10^6$ Zellen pro Gramm Leber erzielt. Somit konnte der Zellgewinn gegenüber der bisher im Arbeitskreis verwendeten Isolierungsmethode (Christiansen 2000) nochmals leicht gesteigert werden.

Eine menschliche Leber wiegt ca. 1,5 kg und enthält $1,2 \times 10^8$ Hepatozyten pro Gramm Gewebe (Iwatsubo *et al.* 1997). Entsprechend dazu betrug das Gesamtgewicht der verwendeten Schweinelebern vor der Präparation ebenfalls durchschnittlich 1,5 kg. Setzt man eine vergleichbare Hepatozytendichte in porciner und humaner Leber voraus, dann konnten nur 3% der insgesamt vorhandenen Hepatozyten per Zwei-Stufen-Isolierung gewonnen werden.

Kultivierte Hepatozyten weisen im Vergleich zu Hepatozyten in Suspension eine deutlich längere Lebensdauer auf (Berry *et al.* 1991). Somit war es ein weiteres Ziel, die Schweinehepatozyten, die ausreichend hohe Werte bezüglich Vitalität und Ausbeute aufwiesen, zu kultivieren, um so einem schnell ablaufenden Enzymverlust vorzubeugen.

Durch verschiedene Medienzusätze kann die Kultivierungsdauer verlängert und das Enzymmuster der Hepatozyten verändert werden (Skett 1994). Deshalb wurde in Anlehnung an die Methoden von Skett (1994), Bader *et al.* (1996) und Dabos *et al.* (2004) in der durchgeführten Studie mit Williams' E Medium gearbeitet, zu dem die

beschriebenen Bestandteile hinzugefügt wurden. Diese Vorgehensweise stellt einen Kompromiss zwischen langer Kultivierungsdauer und einer optimalen Annäherung an die *in vivo*-Bedingungen dar. Da im Gegensatz zu den Studien von Christiansen (2000) die Kultivierungsdauer der Hepatozyten auf eine Woche begrenzt werden sollte, wurde die Antibiotika-Konzentration im Medium durch Reduzierung an die üblichen Endkonzentrationen (Morgan und Darling 1994) angeglichen und so ein potenzielles zytotoxisches Potenzial verringert.

Nussler *et al.* (2001) zeigten, dass innerhalb der ersten Kultivierungstage sowohl im Monolayer- als auch im Sandwich-Modell gute metabolische Umsetzungen gemessen werden konnten. Allerdings blieben nur im Sandwich-Modell die Enzymaktivitäten über einen Zeitraum von 14 Tagen auf einem annähernd konstanten Level. Da sich das Auffinden von Metaboliten in komplexeren Matrices schwieriger gestaltet, wurden porcine und humane Hepatozyten als Monolayer kultiviert und Biotransformationsuntersuchungen folglich nur innerhalb der ersten vier Tage durchgeführt.

Primäre humane Hepatozytenkulturen stellen den Goldstandard in der *in vitro*-Testung von Arzneistoffkandidaten und Umweltgiften dar (LeCluyse 2001). Da der humane Hepatozytenpool aber begrenzt ist und das Interesse am Einsatz von porcinen Hepatozyten in der künstlichen Leber und für Xenotransplantationen stetig wächst (Sheil 2002), wurden in den letzten Jahren die Studien zu der Etablierung von kultivierten Schweinehepatozyten als alternatives *in vitro*-Modell forciert (Skaanild and Friis 1997, Skaanild and Friis 1999, Skaanild and Friis 2000, Jurima-Romet *et al.* 2000, Soucek *et al.* 2001). In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb Studien mit humanen und porcinen Hepatozyten durchgeführt werden, um Gemeinsamkeiten und potenzielle Unterschiede im Metabolismus stickstoffhaltiger Modellsubstanzen aufzudecken.

2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Schweinehepatozyten wurden erfolgreich nach der beschriebenen Methode aus frischem Lebergewebe isoliert. Im Vergleich zu früheren Studien konnte die Ausbeute noch leicht gesteigert werden. Die anschließend durchgeführte Kultivierung nach dem von Christiansen beschriebenen Verfahren verhinderte einen raschen Enzymverlust. Im Arbeitskreis konnten erstmals käuflich erworbene kryokonservierte humane Hepatozyten erfolgreich kultiviert werden. Die Kultivierungsmethoden ermöglichten eine mehrtägige Überlebensdauer der Zellen beider Spezies, so dass die Hepatozyten somit einige Tage für Biotransformationsuntersuchungen einsetzbar waren.

In weiterführenden Studien sollte versucht werden, die Temperaturschwankungen von Perfusionsbeginn bis zum Ausplattieren auf einem noch geringeren Niveau zu halten, um so die Ausbeute bei der Isolierung weiter steigern zu können. Die Kulturbedingungen sollten durch Variation der Mediumszusammensetzung optimiert werden, so dass die *in vivo*-Bedingungen, die bei der Kultivierung nachgeahmt werden sollen (Lindl und Bauer 1994), verstärkt berücksichtigt werden.

3 Charakterisierung von Hepatozyten

3.1 Einleitung

3.1.1 Allgemeine Betrachtungen

Der Nachweis der Qualität von kultivierten Hepatozyten ist eine entscheidende Voraussetzung für den Einsatz der Zellen in Biotransformations- oder Toxizitätsstudien. Vor jedem Experiment muss sichergestellt sein, dass sich die Hepatozyten *in vitro* bezüglich bestimmter Parameter wie in natürlicher Umgebung verhalten, damit eine Übertragung von *in vitro*-Ergebnissen auf die *in vivo*-Situation zulässig ist. Die Charakterisierung der Hepatozyten gewährleistet außerdem die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Zellpräparationen und die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien in verschiedenen Laboratorien. Hierfür stehen diverse Tests auf Vitalität, leberspezifische Funktionen und Aktivität metabolisierender Enzyme zur Verfügung (Blaaubouer *et al.* 1994).

Der Trypanblau-Ausschlusstest, der auf Membrandefekten beruht, differenziert lebende und tote Hepatozyten in Suspensionen (s. 2.1.1), er sagt aber nichts über den Zustand der Zellen in Kultur aus. Die Bestimmung des zytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) zeigt hingegen das Ausmaß einer Zellschädigung an. Je stärker die Hepatozytenmembran beeinträchtigt ist, desto mehr LDH befindet sich im Medium (Berry *et al.* 1991). LDH kann enzymatisch über die Bildung eines Formazan-Farbstoffs nachgewiesen werden (z. B. Cytotoxicity Detection Kit). Hierbei setzt LDH unter Verbrauch von NAD^+ Lactat zu Pyruvat um. Der Katalysator Diaphorase überträgt das gebildete $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf ein gelbes Tetrazoliumsalz, das durch diese Reduktion in eine rote formazanhaltige Verbindung umgewandelt wird (Abb. 3.1).

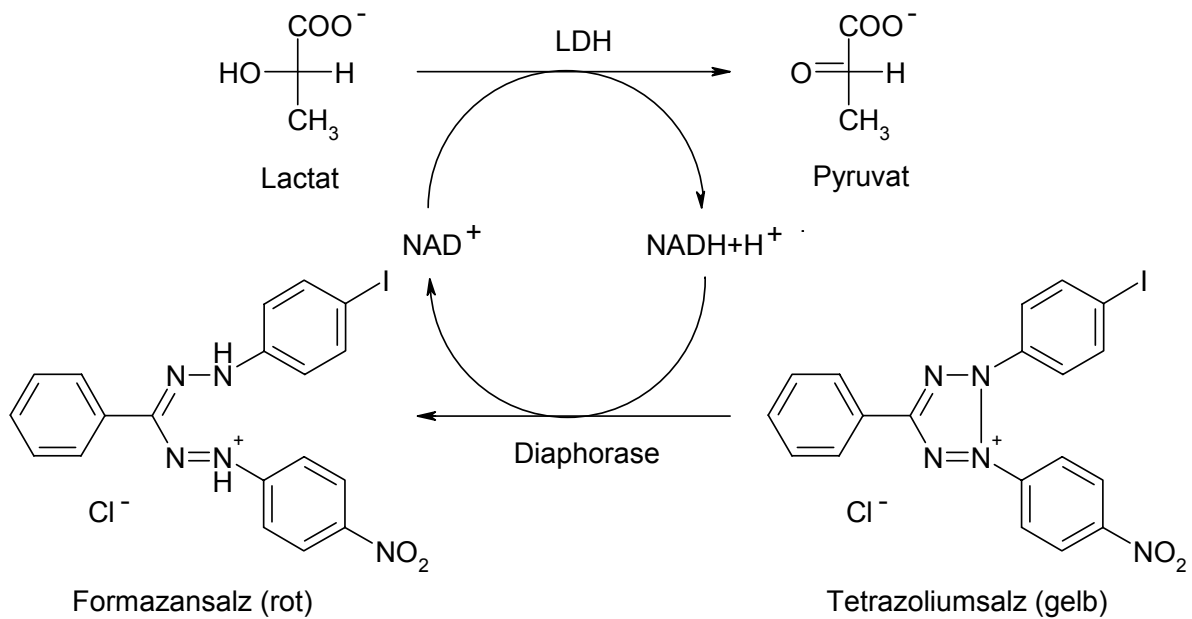


Abbildung 3.1 Photometrische Bestimmung der LDH-Freisetzung über die Bildung eines roten Formazansalzes

Ein Maß für den Erhalt leberspezifischer Funktionen ist die Bildung von bestimmten Stoffwechselprodukten wie Harnstoff und Plasmaproteinen (Dabos *et al.* 2004). Kultivierte Hepatozyten synthetisieren Albumin in Abhängigkeit von ihrem Zustand und den Kulturbedingungen. Je besser die Konstitution der Zellen ist, desto mehr Albumin produzieren sie (Guillouzo und Guguen-Guillouzo 1986). Die Bestimmung terminaler Differenzierung kann über die Albuminsynthese, einem repräsentativen Marker in vollentwickelten Phänotypen, erfolgen (Freshney 1990).

Weiterhin charakterisiert das metabolische Profil, also die Aktivität verschiedener fremdstoffmetabolisierender Enzyme, den Zustand der Zellen. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität von Cytochrom P450 wird meist die Umsetzung von 7-Ethoxycumarin zu 7-Hydroxycumarin herangezogen (Abb. 3.2), da an dieser Reaktion viele CYP-Enzyme beteiligt sind (Bayliss *et al.* 1994).

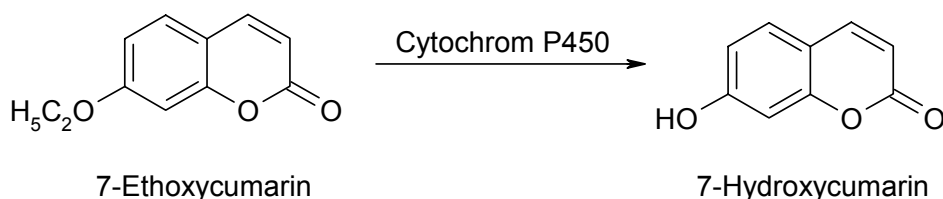


Abbildung 3.2 7-Ethoxycumarin-O-deethylierung

Markerreaktionen, bei denen Enzyme spezifisch Substrate umsetzen, geben die Aktivität von einzelnen Isoenzymen an. Ausschließlich CYP1A1 und CYP1A2 katalysieren die O-Deethylierung von 7-Ethoxyresorufin (Abb. 3.3) in verschiedenen Spezies (Weaver *et al.* 1994, Lu und Li 2001).

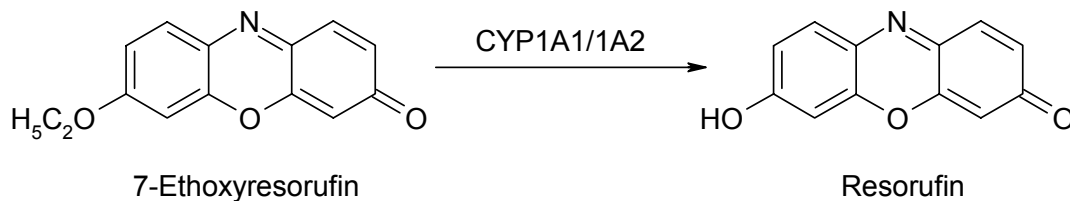


Abbildung 3.3 7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung

Die P450-Unterfamilie 3A ist an zahlreichen fremdstoffmetabolisierenden Reaktionen beteiligt und nimmt den größten Anteil der Cytochrom P450 Enzyme im humanen Organismus ein. Für das humane CYP3A4 ist die Testosteron-6 β -hydroxylierung eine Markerreaktion (Rendic und Di Carlo 1997). Mittels dieser Reaktion (Abb. 3.4) wird auch auf die Aktivität eines ähnlichen Isoenzym im Schwein getestet (Witkamp *et al.* 1995, Monshouwer *et al.* 1998).

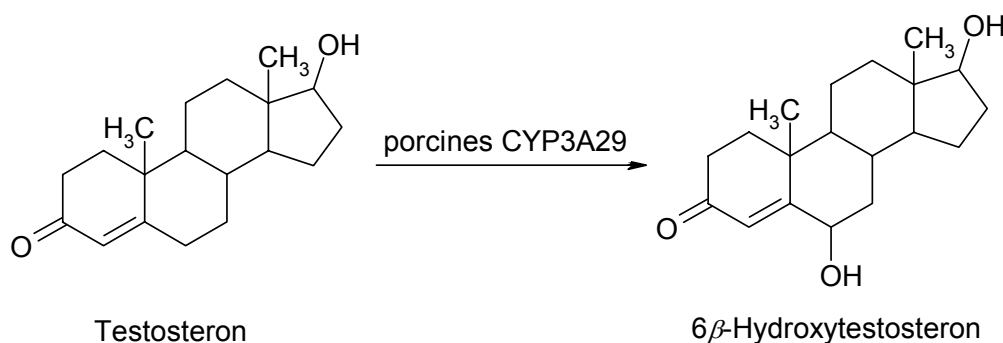


Abbildung 3.4 Testosteron-6 β -hydroxylierung durch das porcine CYP3A29 (Monshouwer *et al.* 1998, Soucek *et al.* 2001)

Phase II-Konjugationen wie die Glucuronidierung und die Sulfatierung stellen wichtige Biotransformationsreaktionen dar, die meist zu hydrophilen Produkten führen und somit einen Beitrag zur Detoxifizierung leisten (Coughtrie *et al.* 1998b, Wells *et al.* 2004). Die Gesamtaktivität der UDP-Glucuronyltransferasen und Sulfotransferasen kann indirekt mittels der oben beschriebenen Deethylierungstests

des 7-Ethoxycumarins bzw. 7-Ethoxyresorufins nachgewiesen werden, da in einem Zellsystem sich der O-Dealkylierung Konjugationen an der dann freien phenolischen Hydroxylgruppe anschließen können. Ein weiteres häufig eingesetztes Modell zur Bestimmung der Aktivität der Phase II-Enzyme beruht auf der Glucuronidierung bzw. Sulfatierung von 4-Nitrophenol (Crocchi and Williams 1985, Ubeaud *et al.* 2001, Diaz and Squires 2003, Szotakova *et al.* 2004) (Abb. 3.5). Hierbei werden die Konjugate mittels im Handel erhältlicher Referenzsubstanzen quantifiziert.

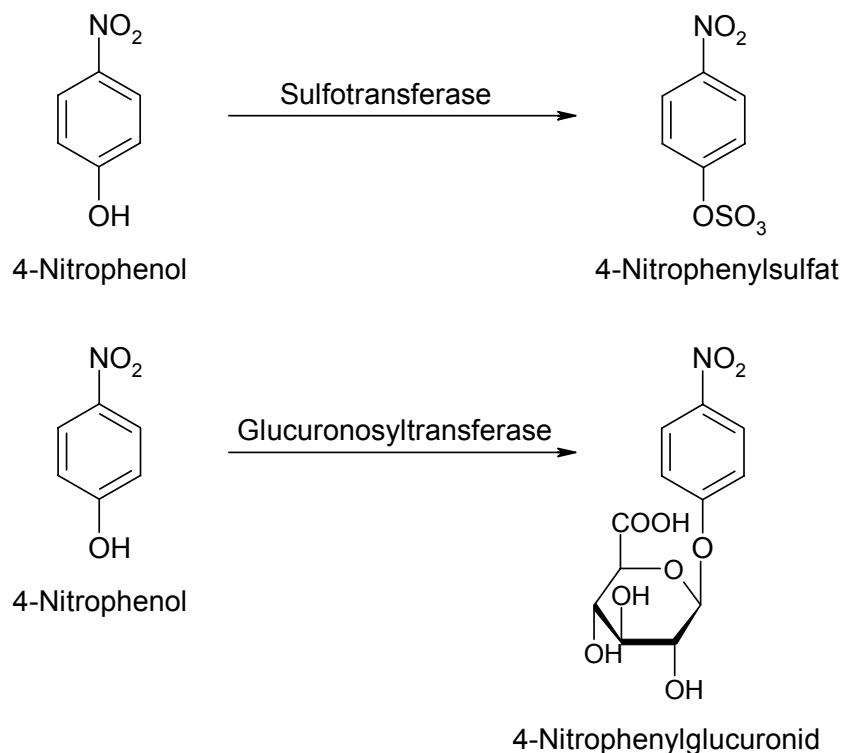


Abbildung 3.5 **Glucuronidierung und Sulfatierung von 4-Nitrophenol**

3.1.2 Zielsetzung

Im Anschluss an die Kultivierung sollten die porcinen Hepatozyten näher charakterisiert werden, um ihre Eignung zum Einsatz in weiterführenden Metabolismus- und Induktionsstudien feststellen zu können. Die Qualität sollte anhand der Vitalität und der metabolischen Kompetenz der Zellen nachgewiesen werden. Zu zeigen war die Vitalität anhand zweier Parameter, der Lactatdehydrogenasefreisetzung und der leberspezifischen Albuminsynthese. Zur Untersuchung

der Aktivität metabolisierender Leberenzyme sollten verschiedene Tests auf Phase I- und Phase II-Reaktionen, die detailliert von Christiansen (2000) beschrieben wurden, durchgeführt werden. Die O-Deethylierung von 7-Ethoxycumarin dient zur Bestimmung der P450-Gesamtaktivität, hingegen kann mittels der Markersubstrate 7-Ethoxyresorufin und Testosteron spezifisch auf die porcinen CYP-Isoenzyme 1A1 und 3A29 getestet werden. Da in den folgenden Metabolismusstudien die Phase II-Reaktionen besondere Beachtung finden sollten, war die Fähigkeit zur Glucuronidierung und Sulfatierung in separaten Testansätzen mit dem Substrat 4-Nitrophenol zu überprüfen. Unter Einbeziehung der Gesamtheit der beschriebenen Parameter und deren Verlauf sollte eine Aussage über die Eignung der kultivierten Hepatozyten für folgende *in vitro*-Biotransformationsstudien gemacht werden.

3.2 Methoden

Die Firma In Vitro Technologies charakterisierte die kryokonservierten humanen Hepatozyten bereits mittels verschiedener Markerreaktionen (Tab 3.1). Die folgenden Methoden dienten deshalb nur zur Charakterisierung der kultivierten Schweinehepatozyten.

Tabelle 3.1 Charakterisierung der humanen kryokonservierten Hepatozyten
Die einzelnen Aktivitäten sind in pmol/(min × 10⁶ Zellen) angegeben.

Charge	Vitalität	CUM	DEX	ECOD	7-HCG	7-HCS	MEPH	TEST	TOLB	PHEN
1	82%	68	15	41	193	36	74	127	46	14
2	84%	81	31	70	260	24	n.q.	68	20	12

CUM = Cumarin-7-hydroxylierung, DEX = Dextromethorphan-O-demethylierung, ECOD = 7-Ethoxycumarin-O-deethylierung, 7-HCG = 7-Hydroxycumarin-O-glucuronidierung, 7-HCS = 7-Hydroxycumarin-O-sulfatierung, MEPH = Mephenytoin-4'-hydroxylierung, TEST = Testosteron-6β-hydroxylierung, TOLB = Tolbutamid-4-hydroxylierung, PHEN = Phenacetin-O-deethylierung, n.q. nicht quantifizierbar

3.2.1 Bestimmung der Vitalität

3.2.1.1 Lactatdehydrogenasefreisetzung

Die Bestimmung der Lactatdehydrogenasefreisetzung erfolgte photometrisch im Medium mithilfe des „Cytotoxicity Testkit LDH“ (Christiansen 2000).

Als Testmatrix wurden die Zellüberstände von drei unterschiedlichen Zellschalen, die aus 24 h inkubiertem Medium bestanden, herangezogen. Zunächst wurden diese Zellüberstände mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und im Anschluss zu gleichen Teilen mit der Testkitlösung, bestehend aus Diaphorase als Katalysator, NAD^+ und einem gelben Tetrazoliumsalz, versetzt. Nach Inkubation unter Lichtausschluss wurde die Bildung eines Formazan-Farbstoffs im Mikrotiterphotometer bestimmt. Es wurden keine absoluten Werte für die Lactatdehydrogenasefreisetzung gemessen, sondern die Absorptionen der Proben der einzelnen Kultivierungstage miteinander verglichen. Als Leerwert diente das auf Zellkulturschalen ohne Hepatozyten 24 h lang inkubierte Medium.

3.2.1.2 Albuminsynthese

Die 24-Stunden-Albuminsyntheseleistung der Hepatozyten wurde per ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ermittelt (Dunn *et al.* 1991). Da die Arbeitsschritte ausführlich in der Dissertation von Christiansen (2000) beschrieben worden sind, soll im Weiteren nur ein Überblick über die Durchführung gegeben werden.

Zur Auswertung wurde das überstehende Medium von drei verschiedenen Zellkulturschalen herangezogen. Verdünnte Mediumsproben wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen Schweinealbumin versetzt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Parallel zu jeder Bestimmung sollte eine Kalibrierung erfolgen. Deshalb wurden unterschiedlich konzentrierte Albumin-Standardlösungen analog zu den Mediumsproben behandelt. Am nächsten Tag wurden die Proben und Standards in zuvor mit Albumin gecoatete Mikrotiterplatten pipettiert und erneut über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Nach 24 h wurden die Platten entleert, gewaschen und mit einer *o*-Phenylendiamin-Substratlösung versetzt. Das an den Antikörper gekoppelte Enzym bildete während der unter Lichtausschluss erfolgten Inkubation einen

Farbstoff, der in einem Mikrotiterplattenphotometer vermessen wurde. Als Hintergrundabsorption diente das Medium von hepatozytenfreien Kulturgefäßen, das nicht mit Antikörpern behandelt wurde.

3.2.2 Bestimmung der metabolischen Kompetenz

Die Inkubationen und analytischen Methoden wurden analog zu Christiansen (2000) durchgeführt.

3.2.2.1 Ethoxycumarin-O-deethylierung

Die Hepatozytenkulturen wurden 1 h mit einer 100 µM Ethoxycumarin-Lösung bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und ein Teil der Probe in Anlehnung an die Methode von Ullrich und Weber (1972) direkt fluorimetrisch vermessen. Ein weiteres Probenaliquot wurde mit β-Glucuronidase und Sulfatase 2 h dekonjugiert und im Anschluss fluorimetrisch bestimmt. Als Leerwert dienten Kulturschalen ohne Hepatozyten, die wie die Inkubationen behandelt wurden.

Die Quantifizierung von 7-Hydroxycumarin erfolgte über eine 5-Punkt-Kalibrierung. Da pufferbedingte unterschiedliche pH-Werte vor und nach der Dekonjugation die Fluoreszenzintensitäten beeinflussen können, wurden für die Messung vor und nach der Dekonjugation zwei getrennte Kalibrierungen und Wiederfindungen erstellt. Für die Kalibrierung bzw. Wiederfindung vor der Dekonjugation wurden definierte Konzentrationen von 0,04 µM bis 0,3 µM analysiert. Der Konzentrationsbereich nach der Dekonjugation umfasste 1 µM bis 12 µM 7-Hydroxycumarin. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde zu den beschriebenen 7-Hydroxycumarin-Konzentrationen das Substrat 7-Ethoxycumarin dem Medium hinzugesetzt und dann wie die Inkubationsansätze behandelt.

3.2.2.2 Ethoxyresorufin-O-deethylierung

Die Hepatozytenkulturen wurden 1 h mit einer 5 μM Ethoxyresorufin-Lösung bei 37°C, 5% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchte inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und ein Teil der Probe in Anlehnung an die Methoden von Burke und Mayer (1974) und Burke *et al.* (1994) direkt fluorimetrisch vermessen. Ein weiteres Probenaliquot wurde mit β -Glucuronidase und Sulfatase 2 h dekonjugiert und im Anschluss fluorimetrisch bestimmt. Als Leerwert dienten Kulturschalen ohne Hepatozyten, die wie die Inkubationen behandelt wurden.

Die Quantifizierung von Resorufin erfolgte über eine 6-Punkt-Kalibrierung. Da pufferbedingte unterschiedliche pH-Werte vor und nach der Dekonjugation die Fluoreszenzintensitäten beeinflussen können, wurden für die Messung vor und nach der Dekonjugation zwei getrennte Kalibrierungen und Wiederfindungen erstellt. Für die Kalibrierung bzw. Wiederfindung vor der Dekonjugation wurden definierte Konzentrationen von 0,01 μM bis 0,12 μM analysiert. Der Konzentrationsbereich nach der Dekonjugation umfasste 0,04 μM bis 0,24 μM Resorufin. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde zu den beschriebenen Resorufin-Konzentrationen das Substrat 7-Ethoxyresorufin dem Medium hinzugesetzt und dann wie die Inkubationsansätze behandelt.

3.2.2.3 Testosteron-6 β -hydroxylierung

Die Hepatozytenkulturen wurden mit einer 250 μM Testosteron-Lösung versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C, 5% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchte wurden die Überstände abgenommen, eingefroren und gefriergetrocknet. Vor Vermessung per HPLC wurden die Proben in Fließmittel gelöst, zentrifugiert und der klare Überstand analysiert. Als Leerwert dienten Kulturschalen ohne Hepatozyten, die wie die Inkubationen behandelt wurden.

Die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte über eine 6-Punkt-Kalibrierung. Es wurden Konzentrationen von 2 bis 50 μM 6 β -Hydroxytestosteron im Fließmittel gelöst. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die oben angegebenen Konzentrationen des Metaboliten in 250 μM substrathaltigem Medium hergestellt, auf Zellkulturschalen ohne Hepatozyten inkubiert und dann wie die Inkubationsansätze behandelt.

Für die chromatischen Bestimmungen wurde die folgende Anlage verwendet:

HPLC-Pumpe	Gradientenpumpe W510 mit Systemkontroller (Waters, Milford, CT, USA)		
Detektor	W486 Tunable Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)		
Autosampler	W710 WISP (Waters, Milford, CT, USA)		
Integrator	Maxima [®] -Software 820, Version 3.30 (Waters, Milford, CT, USA)		
Stationäre Phase	LiChrospher [®] RP Select-B, 250 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm, in einer LiChroCART [®] -Kartusche mit Vorsäule RP Select-B, 4 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm (Merck, Darmstadt)		
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)		
Mobile Phase	Fließmittel A: Methanol/Aqua bidest. 50:50 (V/V) Fließmittel B: Methanol		
Gradientenprofil	Laufzeit (min)	A (%)	B (%)
	0 – 20	100	0
	20 – 30	0	100
	30 – 40	0	100
	40 – 50	100	0
	50 – 60	100	0
Flussrate	0,8 ml/min		
Detektion	UV, 254 nm		
Injektionsvolumen	10 µl		
Retentionszeiten	6β-Hydroxytestosteron: 15,7 ± 0,3 min Testosteron: 33,4 ± 0,2 min		

3.2.2.4 Glucuronidierung und Sulfatierung von 4-Nitrophenol

Die Hepatozytenkulturen wurden mit einer 100 μM 4-Nitrophenol-Lösung versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C, 5% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchte wurden die Überstände abgenommen und halbiert. Der erste Teil wurde sofort eingefroren und gefriergetrocknet, während zum zweiten β -Glucuronidase bzw. Arylsulfatase hinzugefügt wurde. An eine 2 h-Inkubation im 37°C-Wasserbad schloss sich die Gefrierdrying an. Vor Vermessung per HPLC wurden die Proben in Fließmittel gelöst, zentrifugiert und der klare Überstand analysiert. Als Leerwert dienten Kulturschalen ohne Hepatozyten, die wie die Inkubationen behandelt wurden.

Die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte jeweils über 6-Punkt-Kalibrierungen. Es wurden Konzentrationen von 0,5 bis 20 μM 4-Nitrophenylsulfat bzw. 5 bis 450 μM 4-Nitrophenylglucuronid im Fließmittel gelöst. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die oben angegebenen Konzentrationen der Metaboliten in 100 μM substrathaltigem Medium hergestellt, auf Zellkulturschalen ohne Hepatozyten inkubiert und dann wie die Inkubationsansätze behandelt.

Die chromatischen Bestimmungen wurden mit der in 3.2.2.3 beschriebenen HPLC-Anlage durchgeführt.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Bestimmung der Vitalität

3.3.1.1 Lactatdehydrogenasefreisetzung

Abbildung 3.6 zeigt die Freisetzung des zytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase an vier aufeinander folgenden Kulturtagen. Geringe Absorptionswerte korrelieren mit einer kleinen LDH-Menge im Medium und somit mit der äußeren Unversehrtheit der Zellen. Direkt nach der Isolierung sind hohe Absorptionswerte zu verzeichnen, die bis zum vierten Kulturtag auf ca. 20% des Ausgangswertes abnehmen. Die Zellschädigung wird geringer und die Hepatozyten regenerieren sich während dieses Zeitraums.

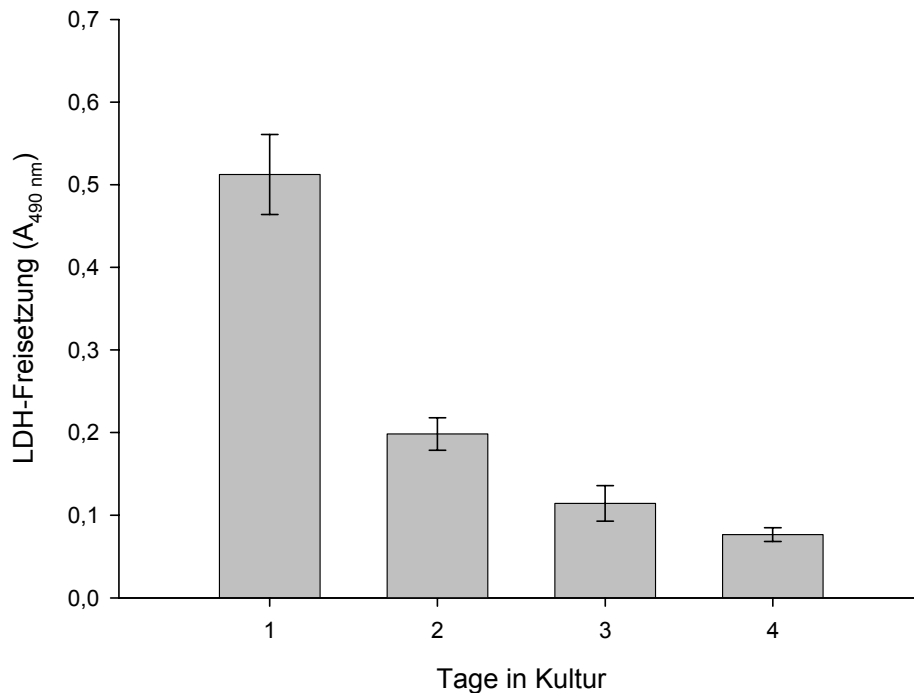


Abbildung 3.6 *LDH-Freisetzung aus einer Schweinehepatozytenkultur.*
Die Absorptionen sind als Mittelwerte \pm SD aus drei verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

3.3.1.2 Albuminsynthese

Die Albuminsynthese läuft in intakten Hepatozyten ab und lässt deshalb Rückschlüsse auf den Zustand von zellulären Funktionen zu. Einen repräsentativen Marker für die terminale Differenzierung stellt Albumin ebenfalls dar (Freshney 1990). Die Bestimmung der Albuminsynthese in kultivierten Schweinehepatozyten über einen Zeitraum von vier Tagen ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Es zeigte sich, dass es innerhalb der ersten drei Tage zu einer leichten Steigerung der Albuminsynthese kam und diese am vierten Tag auf dem gleich bleibend hohen Niveau blieb.

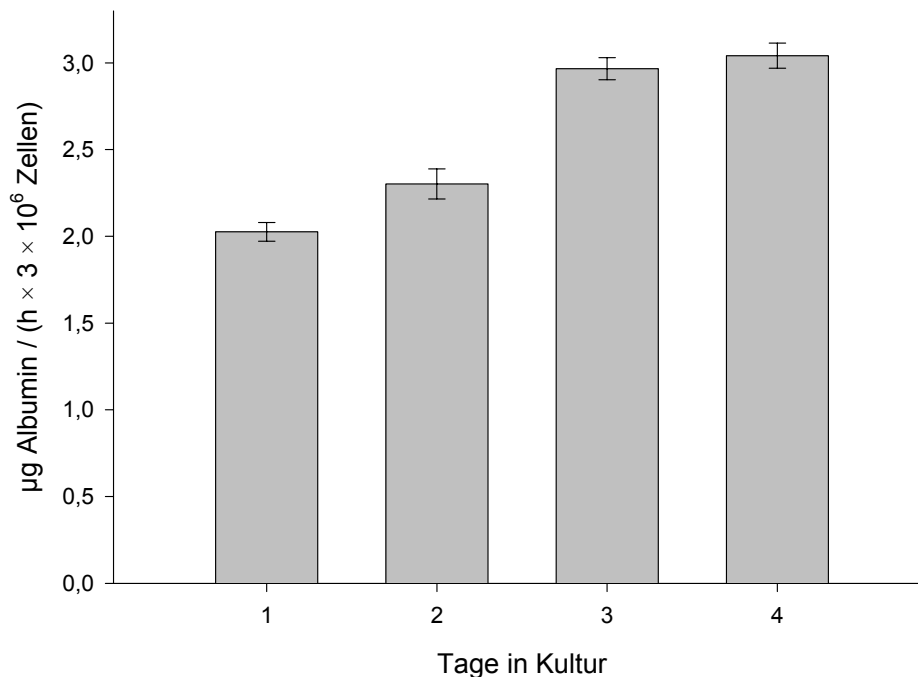


Abbildung 3.7 *Albuminsynthese einer Schweinehepatozytenkultur.*
Die Umsetzungen sind als Mittelwerte ± SD aus drei verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

3.3.2 Bestimmung der metabolischen Kompetenz

3.3.2.1 Ethoxycumarin-O-deethylierung

Um das Ausmaß der Deethylierung zu bestimmen, wurden Kalibrierungen und Wiederfindungen durchgeführt (vergl. 3.2.2.1). Mithilfe der Fluoreszenzintensität des Metaboliten konnte die Umsetzung quantifiziert werden.

Die Kalibrierung ($r^2 > 0,9997$ und $n = 3$, je dreimal vermessen) und die Wiederfindung ($r^2 > 0,9966$ und $n = 3$, je dreimal vermessen) vor der Dekonjugation verliefen über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die daraus abgeleiteten Wiederfindungsraten betragen 64,1 bis 77,3%, wobei die Abweichungen auf Adhäsionseffekte an der Zellkulturschale schließen ließen.

Die Kalibrierung ($r^2 > 0,9979$ und $n = 3$, je dreimal vermessen) und die Wiederfindung ($r^2 > 0,9957$ und $n = 3$, je dreimal vermessen) nach der Dekonjugation verliefen über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die daraus abgeleiteten

Wiederfindungsraten betragen 69,2 bis 72,2%, wobei die Abweichungen auf Adhäsionseffekte an die Zellkulturschale schließen ließen.

Eine Vielzahl von P450-Isoenzymen katalysiert die Umsetzung von 7-Ethoxycumarin zu 7-Hydroxycumarin (Bayliss *et al.* 1994). Neben der Deethylierung laufen in Hepatozyten auch Phase II-Reaktionen ab, so dass bei der direkten Vermessung zunächst nur das frei vorliegende 7-Hydroxycumarin gemessen wurde. Konjugierte Metaboliten entziehen sich der fluorimetrischen Bestimmung. Durch enzymatische Dekonjugation mittels β -Glucuronidase und Sulfatase konnte die Aktivität sowohl der Phase II-Enzyme als auch der beteiligten Cytochrom P450-Enzyme ermittelt werden. Die Ergebnisse der Deethylierung vor und nach der Dekonjugation sind in Abbildung 3.8 dargestellt. An allen vier Kulturtagen lag der größte Anteil des 7-Hydroxycumarins gekoppelt an Glucuronsäure bzw. Schwefelsäure vor. Vom ersten zum zweiten Tag in Kultur reduzierte sich der gebildete Gesamtanteil um ca. 30% und blieb dann bis zum Ende der Messreihe nahezu konstant. Die Fähigkeit zur Glucuronidierung und Sulfatierung blieb über den gesamten Kultivierungszeitraum erhalten.

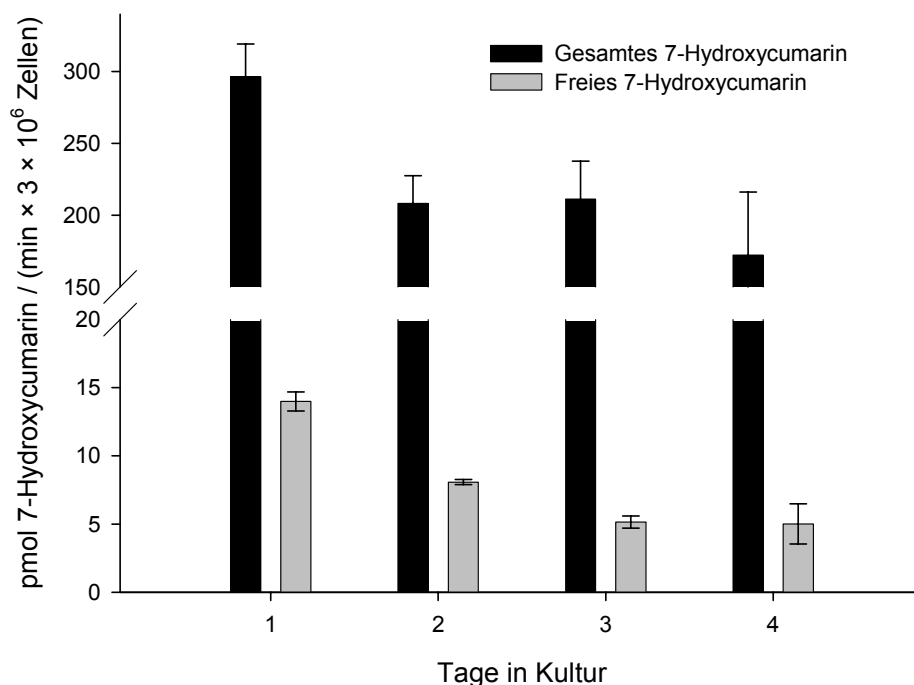


Abbildung 3.8 **Ethoxycumarin-O-deethylierung einer Schweinehepatozytenkultur.** Die Umsetzungen sind als Mittelwerte \pm SD aus drei verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

3.3.2.2 Ethoxyresorufin-O-deethylierung

Zur Quantifizierung des Metaboliten wurden Kalibrierungen und Wiederfindungen mit der unter 3.2.2.2 aufgeführten Analytik durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte über die resultierenden Fluoreszenzintensitäten des Resorufins.

Die Kalibrierung ($r^2 > 0,9980$ und $n = 3$, je dreimal vermessen) und Wiederfindung ($r^2 > 0,9930$ und $n = 3$, je dreimal vermessen) vor der Dekonjugation verliefen über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die daraus abgeleiteten Wiederfindungsraten betragen 101,2 bis 106,4%. Die Werte über 100% lassen auf chemische Zersetzung unter den Inkubationsbedingungen schließen.

Die Kalibrierung ($r^2 > 0,9998$ und $n = 3$, je dreimal vermessen) und Wiederfindung ($r^2 > 0,9924$ und $n = 3$, je dreimal vermessen) nach der Dekonjugation verliefen über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die daraus abgeleiteten Wiederfindungsraten betragen 103,9 bis 111,6%, wobei die Abweichungen auf möglicherweise rein chemisch ablaufende Reaktionen schließen lassen.

Die Cytochrom P450 Isoenzyme 1A1 und 1A2 katalysieren die Bildung von 7-Ethoxyresorufin aus Resorufin. Diese Umsetzung stellt eine spezifische Markerreaktion dar (Weaver *et al.* 1994).

In Hepatozyten laufen parallel Phase I- und Phase II-Reaktionen ab, so dass sich an Glucuronsäure bzw. Schwefelsäure gekoppeltes Resorufin der direkten Vermessung entzieht. Diese Metaboliten werden deshalb durch Zusatz von β -Glucuronidase und Sulfatase aus ihren Konjugaten freigesetzt. In einer anschließenden fluorimetrischen Vermessung können dann die Aktivitäten des CYP1A1 und 1A2 und der Phase II-Enzyme bestimmt werden.

Die Ergebnisse der Deethylierung von Resorufin sind in Abbildung 3.9 wiedergegeben. Ebenso wie das 7-Hydroxycumarin lag auch das Resorufin zum größten Teil in gebundener Form als Glucuronid oder Sulfat vor. Innerhalb der vier Kulturtage sank die CYP1A1-Aktivität um etwa 20% des am Tag 1 gemessenen Ausgangswertes (bezogen auf gesamtes Resorufin). Die Phase II-Aktivität blieb über den gesamten Zeitraum der Kultivierung erhalten.

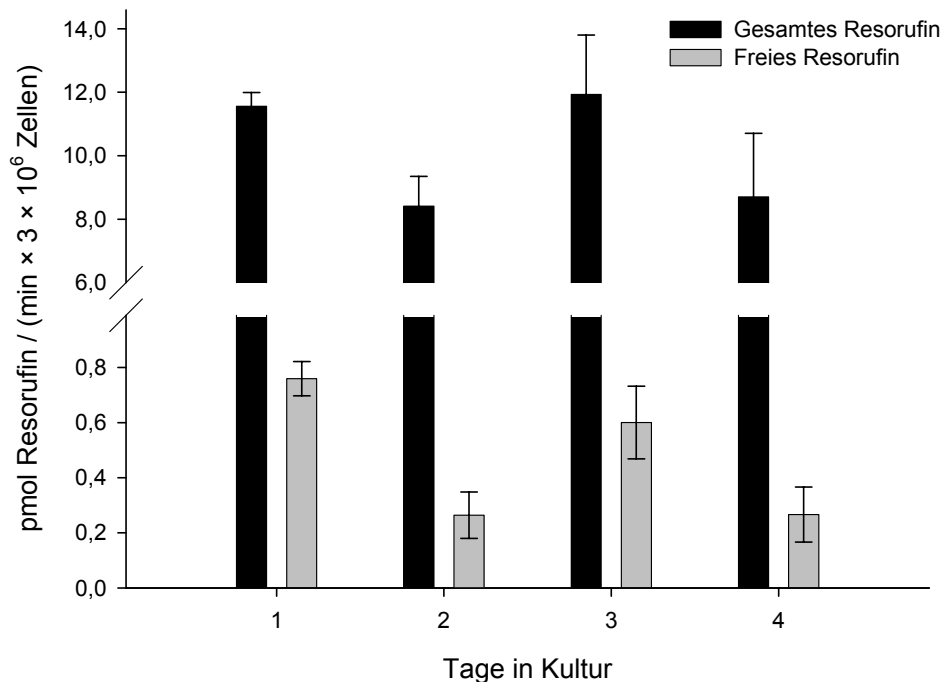


Abbildung 3.9 *Ethoxyresorufin-O-deethylierung einer Schweinehepatozytenkultur.* Die Umsetzungen sind als Mittelwerte \pm SD aus drei verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

3.3.2.3 Testosteron-6 β -hydroxylierung

Um das Ausmaß der 6 β -Hydroxylierung zu bestimmen, wurden Kalibrierungen und Wiederfindungen durchgeführt (vergl. 3.2.2.3), wobei die erhaltenen Signalflächen des 6 β -Hydroxytestosterons zur Quantifizierung desselben dienen.

Die Kalibrierung ($r^2 > 0,9992$ und $n = 2$, je zweimal vermessen) und Wiederfindung ($r^2 > 0,9767$ und $n = 2$, je zweimal vermessen) verliefen über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die daraus abgeleiteten Wiederfindungsraten betragen $73,4 \pm 4,7\%$, wobei die Abweichungen auf Adhäsionseffekte an die Zellkulturschale und auf Verluste bei der Gefriertrocknung schließen ließen.

Die 6 β -Hydroxylierung des Testosterons ist eine typische Umsetzung durch das Cytochrom P450 Isoenzym 3A4 im Menschen (Rendic und Di Carlo 1997). Das CYP3A4 weist zum porcinen CYP3A29 große Ähnlichkeiten in Bezug auf die Aminosäuresequenz und die Substratspezifität auf (Soucek *et al.* 2001, Zuber *et al.* 2002).

In Abbildung 3.10 sind die Testosteron-Umsetzungsraten von kultivierten Schweinehepatozyten über einen Kultivierungszeitraum von vier Tagen dargestellt. Innerhalb der ersten zwei Tage waren konstante Aktivitäten des CYP3A29 zu verzeichnen. Die Umsetzungsraten stiegen im Folgenden drastisch an, so dass die Werte an den Tagen 3 und 4 200% der Anfangsumsetzungen betragen.

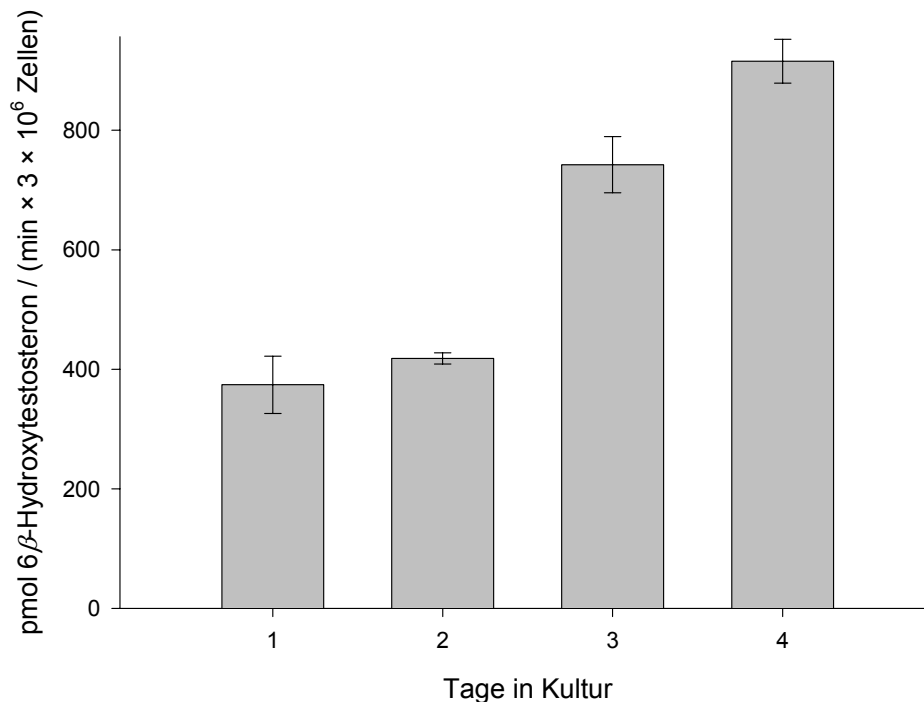


Abbildung 3.10 *Testosteron-6β-hydroxylierung einer Schweinehepatozytenkultur.* Die Umsetzungen sind als Mittelwerte ± SD aus drei verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

3.3.2.4 Glucuronidierung und Sulfatierung von 4-Nitrophenol

Zur Quantifizierung der Metaboliten wurden eine Kalibrierung und Wiederfindung mit der unter 3.2.2.4 beschriebenen Analytik durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte über die resultierenden Peakflächen des 4-Nitrophenylglucuronids und des 4-Nitrophenylsulfats.

Die Kalibrierung ($r^2 > 0,9998$ und $n = 2$, je zweimal vermessen) und Wiederfindung ($r^2 > 0,9896$ und $n = 2$, je zweimal vermessen) von 4-Nitrophenylglucuronid verliefen über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die daraus abgeleiteten Wiederfindungsraten betragen $81,9 \pm 7,2\%$.

Die Kalibrierung ($r^2 > 0,9998$ und $n = 2$, je zweimal vermessen) und Wiederfindung ($r^2 > 0,9995$ und $n = 2$, je zweimal vermessen) von 4-Nitrophenylsulfat verliefen über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die daraus abgeleiteten Wiederfindungsraten betragen $89,3 \pm 5,9\%$.

Die unter 100% liegenden Werte für die Wiederfindungsraten lassen auf Abweichungen durch Adhäsionseffekte an der Zellkulturschale und auf Verluste bei der Gefriertrocknung schließen.

In späteren Biotransformationsstudien sollte ein besonderes Augenmerk auf die Phase II-Reaktionen gerichtet werden. Deshalb wurden neben der indirekten Bestimmung der Phase II-Aktivitäten (s. 3.3.2.1 und 3.3.2.2) auch die direkte Glucuronidierung und Sulfatierung von 4-Nitrophenol untersucht (Abb. 3.11).

Über den gesamten Kultivierungszeitraum konnten beide Phase II-Aktivitäten nachgewiesen und quantifiziert werden. Schweinehepatozyten produzierten aus 4-Nitrophenol bevorzugt das Glucuronid, während die gefundene Sulfatmenge nur 2% des gebildeten Glucuronids betrug (bezogen auf Tag 3). Die Glucuronidierungsraten stiegen von Tag 1 bis Tag 4 kontinuierlich an und erreichten einen Maximalwert von 2390 ± 310 pmol Metabolit/(min $\times 3 \times 10^6$ Zellen), der 70% über dem Ausgangswert lag. Die höchsten Umsetzungen zum 4-Nitrophenylsulfat wurden am dritten Tag der Kultivierung erzielt. Dieser Wert war bezogen auf die Umsetzungen von Tag 1 um 120% angestiegen.

Der Zusatz von β -Glucuronidase bzw. Arylsulfatase bewirkte ein Verschwinden der entsprechenden Konjugatpeaks bei gleichzeitigem Anstieg der Menge an 4-Nitrophenol.

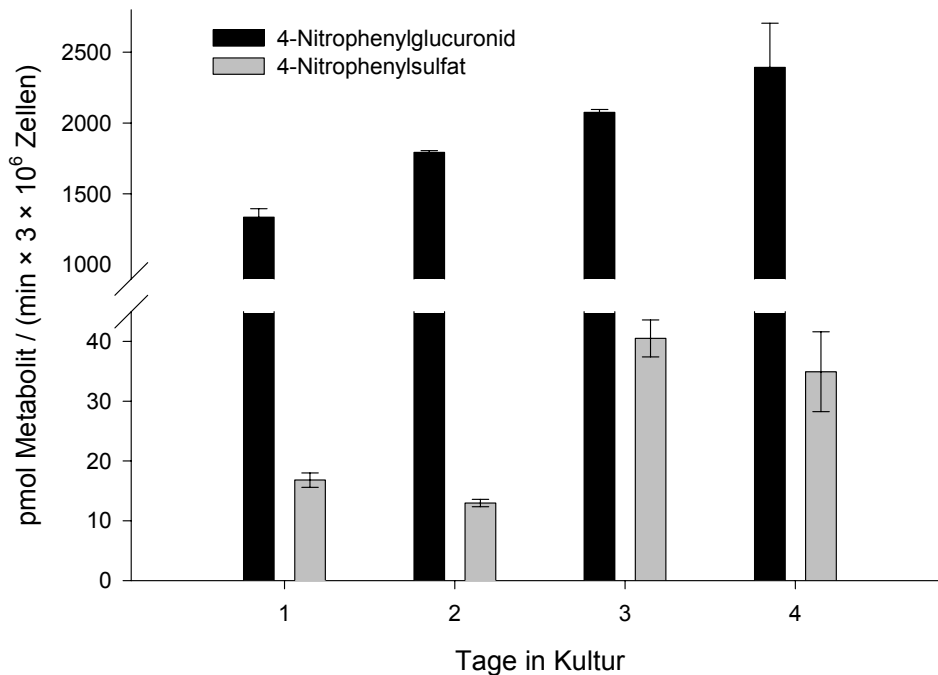


Abbildung 3.11 *Glucuronidierung und Sulfatierung von 4-Nitrophenol einer Schweinehepatozytenkultur. Die Umsetzungen sind Mittelwerte \pm SD aus drei verschiedenen Inkubationsansätzen.*

3.4 Diskussion

Die kultivierten Schweinehepatozyten konnten in Bezug auf Vitalität und metabolische Fähigkeiten mittels sechs verschiedener Assays charakterisiert werden.

Im Verlauf der Kultivierung sank die LDH-Freisetzung auf 20% des Anfangswertes ab. Diese besseren Vitalitätswerte können mit einer Gewöhnung an die *in vitro*-Bedingungen und mit ablaufenden Reparaturprozessen erklärt werden. Die Hepatozyten erholten sich folglich von dem Stress des Isolierungsverfahrens (Koebe *et al.* 1994), so dass die Vitalität innerhalb der ersten vier Kulturtage stetig anstieg. Die Phase des Absterbens, für die erhöhte LDH-Werte im Medium zu erwarten wären, wurde noch nicht erreicht. Diese Tatsache steht in Einklang mit anderen Publikationen, in denen Kultivierungszeiträume für porcine Hepatozyten von mindestens fünf Tagen angegeben werden (Behnia *et al.* 2000, Clement *et al.* 2001). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse für die Albuminsynthese zeigen eine

ähnliche Tendenz. Entsprechende Werte sind für die Syntheseleistung und den Anstieg der Vitalität bis zum vierten Kulturtag in der Literatur zu finden (Hansen *et al.* 2000, Nussler *et al.* 2001). Die Ergebnisse der Lactatdehydrogenasefreisetzung und der Albuminsynthese zeigten, dass sich die Zellen in den ersten Tagen nach der Kultivierung erholen und die Vitalität der Hepatozyten zunimmt.

Im Unterschied zu Hepatozytensuspensionen verhindert die Kultivierung einen dramatischen Enzymverlust der P450-Enzyme (Zurlo und Arterburn 1996). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die Gesamt-P450-Aktivität, gemessen im 7-Ethoxycumarin-Assay, verringerte sich innerhalb der ersten vier Tage um nur 30%, während die Aktivität des CYP3A29 sich in diesem Zeitraum sogar verdoppelte. Behnia *et al.* (2000) verzeichneten einen Rückgang der Enzymaktivität des porcinen CYP1A1 um 50% innerhalb von vier Tagen. Im Gegensatz dazu wiesen die Umsetzungsgeschwindigkeiten in der vorliegenden Studie noch 80% der Ausgangswerte auf. Die Deethylierungsraten von 7-Ethoxyresorufin in Schweinehepatozyten sind mit den Literaturangaben von Hansen *et al.* (2000) vergleichbar.

Der Verlauf der Phase II-Aktivitäten in den Inkubationsansätzen konnte in dieser Studie erfolgreich demonstriert werden. Sowohl die indirekte Überprüfung der Glucuronyl- bzw. Sulfotransferase mittels O-Dealkylierungstest als auch die direkte Quantifizierung von 4-Nitrophenylglucuronid und 4-Nitrophenylsulfat zeigten, dass die Zellen über den gesamten Messzeitraum gleich bleibend gute Fähigkeiten zur Glucuronidierung und Sulfatierung aufwiesen. Vergleichbar mit früheren Studien (Christiansen 2000) lief die Sulfatierung von 4-Nitrophenol in einem wesentlich geringeren Umfang ab als die Glucuronidierung.

Die Ergebnisse aller Charakterisierungstests zeigen deutlich, dass der Enzymverlust innerhalb der ersten vier Tage durch die Kultivierung verzögert werden konnte. Im Gegenteil stiegen die Aktivitäten einiger Enzyme und die Vitalität der Zellen während der Studiendauer sogar an.

3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Neben der Bestimmung der Vitalität wurden die Aktivitäten einzelner CYP-Isoenzyme und Phase II-Enzyme sowie die Gesamtaktivität von Cytochrom P450 überprüft.

Die Zellen gewöhnten sich an die *in vitro*-Umgebung und wiesen folglich gute Vitalitäten innerhalb der ersten vier Kulturtage auf. Für eine geeignete Auswahl der Kulturbedingungen sprechen auch die Charakterisierungsergebnisse zur Enzymaktivität. Da ein Enzymverlust durch die Kultivierung gering gehalten werden konnte, verliefen die Phase I- und Phase II-Umsetzungen innerhalb der ersten vier Tage auf einem hohen Niveau. In Bezug auf einzelne Enzyme wie CYP3A29, den Glucuronyl- und den Sulfotransferasen konnte eine Aktivitätssteigerung während des Kultivierungszeitraums gezeigt werden.

Der erfolgreiche Verlauf der Hepatozytenkultivierung und der anschließenden Charakterisierung ermöglicht den Einsatz dieser Schweinehepatozytenkulturen als *in vitro*-Modell für weiterführende Biotransformationsstudien.

4 Einsatz von primären Hepatozytenkulturen für Metabolismusstudien

4.1 Biotransformationsstudien von Benzamidoxim und Benzamidin

4.1.1 Einleitung

4.1.1.1 Bedeutung von Amidoximen und Amidinen in der Therapie

Amidinstrukturen sind Bestandteil von zahlreichen Arzneistoffen und potenziell wirksamen Verbindungen aus der pharmazeutischen Entwicklung. Sie können *N*-substituiert, wie z. B. das Anthelminthikum Pyrantel, im Ringsystem integriert, wie Clotrimazol oder Cimetidin, oder *N*-unsubstituiert vorliegen. Stark basische Amidinstrukturen lassen sich im Pentamidin, dessen Anwendung bei *Pneumocystis carinii*-Infektionen von AIDS-Patienten besondere Bedeutung erlangt hat (Masur 1992), in Diminazen und in verschiedenen Substanzen mit gerinnungshemmender Wirkung finden (Clement 2002).

Amidine bilden aufgrund ihrer starken Basizität (pK_a ca. 11-12) bei pH 7,4 protonierte, mesomeriestabilisierte Amidinium-Ionen aus. Die daraus bedingte Hydrophilie führt zu einer schlechten Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt und einer geringen oralen Bioverfügbarkeit. Durch Hydroxylierung der Amidinstruktur erhält man Amidoxime (*N*-Hydroxyamidine), die deutlich schwächer basische Verbindungen ($pK_a = 4-5$) (Albert *et al.* 1948, Gustafsson *et al.* 2001) darstellen. Amidoxime liegen bei physiologischem pH-Wert größtenteils ungeladen vor und können so nach oraler Gabe leichter vom Körper aufgenommen werden. Unter *in vivo*-Bedingungen werden Amidoxime schnell zu den pharmakologisch aktiven Amidinen reduziert, so dass sie folglich als Prodrug für die entsprechenden Amidine einsetzbar sind (Abb. 4.1).

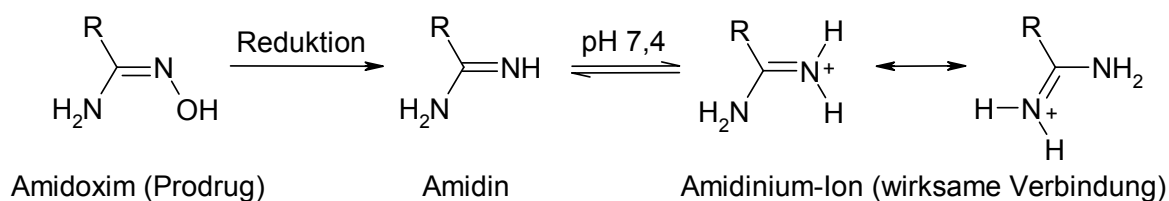


Abbildung 4.1 Prodrug-Prinzip des Amidoxims

Dieses Prodrug-Prinzip, das erstmals für das Pentamidin von Clement *et al.* (1992) entwickelt wurde, beruht auf der dominierenden Reduktionsreaktion im metabolischen Zyklus von *N*-Hydroxylierung und *N*-Reduktion (Clement 2002). Viele Arbeitskreise haben dieses Prinzip bereits auf die Entwicklung ihrer Arzneistoffe übertragen (Weller *et al.* 1996, Hall *et al.* 1998, Kitamura *et al.* 2001, Song *et al.* 2003). Marktreife hat der orale Thrombininhibitor Ximelagatran als Doppelprodrug, erlangt, der *in vitro* und *in vivo* durch *N*-Reduktion des Amidoxims und Esterspaltung in den wirksamen Metaboliten Melagatran umgewandelt wird (Gustafsson *et al.* 1999, Clement und Lopian 2003).

4.1.1.2 Bisherige Untersuchungen

Als Modellsubstanzen für Amidine und deren *N*-hydroxylierte Derivate werden häufig die Verbindungen Benzamidin und Benzamidoxim verwendet. Im Jahre 1983 konnte Clement erstmals zeigen, dass Benzamidin *in vitro* durch ein Cytochrom P450-Enzymsystem *N*-oxygeniert wird (Clement 1983). Eine Beteiligung des CYP2C3 aus dem Kaninchen ist außer für diese Reaktion (Clement *et al.* 1993a) auch für weitere *N*-Oxygenierungen der Substrate Pentamidin (Clement und Jung 1994) und *N*-methylierte Benzamidine (Clement und Jung 1995) beschrieben worden.

Die Rückreaktion der *N*-hydroxylierten Metaboliten zu ihren Ausgangsverbindungen lief unter *in vivo*-Bedingungen wesentlich schneller ab als die Oxidation (Clement und Zimmermann 1988, Hauptmann *et al.* 1988). Die Reduktion des Benzamidoxims wurde mittlerweile für verschiedene Enzymquellen aus den Spezies Ratte, Kaninchen, Schwein und Mensch beschrieben (Übersicht Clement 1998). Das an dieser Reaktion beteiligte Enzymsystem (Abb. 4.2) besteht aus der NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase, Cytochrom b_5 und einem P450-Isoenzym, das im Menschen der CYP2A-Familie und im Schwein der CYP2D-Familie angehört (Clement *et al.* 1997, Karhan 2002). Bei hohen Konzentrationen an Cytochrom b_5 können Cytochrom b_5 und die dazugehörige Reduktase die Reduktion auch allein katalysieren (Clement *et al.* 1997, Kurian *et al.* 2004).

In Phase II-Studien gelang nach Zusatz von hydrolytisch wirkenden Enzymen ein indirekter Nachweis der Glucuronidierung und Sulfatierung von Benzamidoxim in Kaninchen- und Rattenplasma (Clement *et al.* 1993b). Mit Schweinehepatozytenkulturen konnte erstmals direkt die Bildung von Benzamidoxim-O-glucuronid und Benzamidoxim-O-sulfat gezeigt werden (Abb. 4.2). Beide Metaboliten besitzen weder im Ames-Test mutagene noch toxische Eigenschaften (Clement *et al.* 2001). Als Phase II-Metabolit von Benzamidin wurde in porcinen Hepatozyten nur das Benzamidin-N-sulfat gefunden (Fröhlich *et al.* 2001).

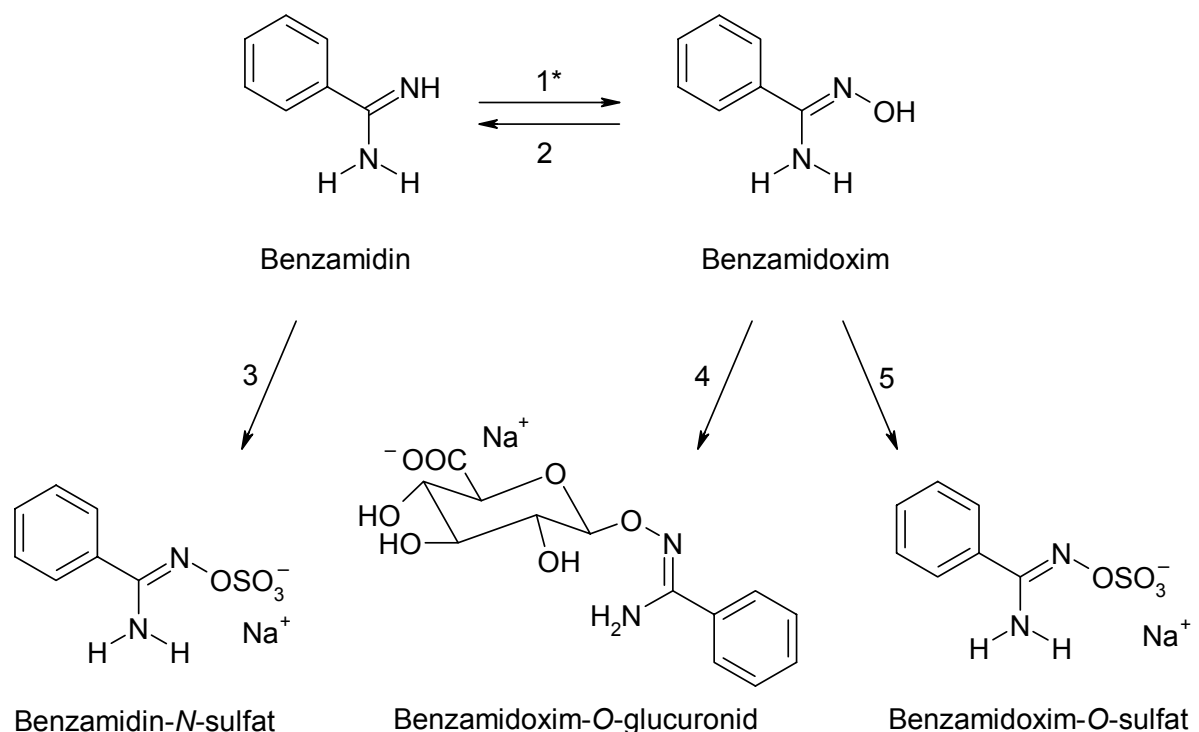


Abbildung 4.2

Metabolismus von Benzamidin und Benzamidoxim im Schwein

1 N-Oxygenierung * (in anderen Spezies durch NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, NADPH und Cytochrom P450 (Kaninchen CYP2C3) (Clement *et al.* 1993a)); 2 N-Reduktion durch Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase, NADH und Cytochrom P450 (CYP2D) (Clement *et al.* 1997); 3 Sulfatierung von Benzamidin (Fröhlich *et al.* 2001); 4 Glucuronidierung von Benzamidoxim (Christiansen 2000); 5 Sulfatierung von Benzamidoxim (Christiansen 2000)

4.1.1.3 Zielsetzung

Vorangegangene Arbeiten konnten die Phase II-Metaboliten der Modellsubstanzen Benzamidoxim und Benzamidin in porcinen Hepatozytenkulturen identifizieren (Clement *et al.* 2001, Fröhlich *et al.* 2001). Bisher lagen aber noch keine Daten zur Biotransformation dieser Substrate mit Kulturen humaner Hepatozyten vor. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit Untersuchungen bezüglich des Metabolismus von Benzamidoxim und Benzamidin in diesem humanen *in vitro*-System. Ein Vergleich der Ergebnisse aus den Biotransformationsstudien mit Schweine- und Humanhepatozytenkulturen könnte weitere wertvolle Hinweise in Bezug auf die Ähnlichkeit des Metabolismus dieser beiden Spezies geben und die Einsetzbarkeit von porcinen Hepatozytenkulturen als Alternative für humane Zellen in der Testung von Arzneistoffkandidaten unterstreichen. In Hinblick auf das oben beschriebene Prodrug-Prinzip von Amidoximen sollten Studien bezüglich des metabolischen Zyklus von *N*-Reduktion und *N*-Hydroxylierung der zwei genannten Substrate in einem *in vitro*-System, das in einem großen Umfang die *in vivo*-Bedingungen nachahmt, durchgeführt werden. Die Aufklärung der Phase II-Reaktionen, die erstmals für die Spezies Mensch erforscht werden sollten, ist von großer toxikologischer Relevanz, da neben unbedenklichen hydrophilen Produkten wie Glucuroniden und Sulfaten auch eine Bildung von toxischen acetylierten Verbindungen (Clement *et al.* 2001) denkbar wäre.

4.1.2 Methoden

4.1.2.1 Inkubationsbedingungen für humane Hepatozyten

Die Inkubationen wurden nach der von Christiansen (2000) beschriebenen Methode an den Kulturtagen 1 - 4 durchgeführt. Hierzu wurden die Zellkulturschalen zunächst zweimal mit warmer physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml einer 200 µM Substrat-Lösung (Benzamidoxim bzw. Benzamidin) pro Zellschale wurde 1 bzw. 6 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Überstände abgenommen, eingefroren und gefriergetrocknet. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C. Vor Vermessung

wurden sie in 90 µl Fließmittel A gelöst und 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in die Probenschleife injiziert. Als Leerwerte dienten sowohl hepatozytenfreie Zellschalen, die mit einer substrathaltigen Lösung inkubiert wurden, als auch Zellschalen mit Hepatozyten, die mit PBS-Puffer ohne Substrat versetzt wurden. So sollten sowohl rein chemische Reaktionen als auch Ausscheidungsprodukte der Zellen erfasst werden. Beide Leerwerte wurden den Proben entsprechend aufgearbeitet.

4.1.2.2 LC/MS-Analytik

Die im Anschluss beschriebenen LC/MS-analytischen Bedingungen für die Bestimmung von Benzamidin- und Benzamidoxim-Metaboliten wurden in den Grundzügen der Arbeit von Christiansen (2000) entnommen.

HPLC-Pumpe	HP 1090 Series II LC Hochdruckgradientenpumpe (Hewlett Packard, Waldbronn)
Injektor	Rheodyne 20 µl-Probenschleife
Detektor	HP 1050 VWD UV/VIS Detektor (Hewlett Packard, Waldbronn)
Massenspektrometer	Esquire LC (Bruker, Bremen)
Interface	ESI, positiver Ionenmodus
Sprühdruck	40 psi
Trockengas	7,5 l/min
Trockentemperatur	360°C
Scanbereich	50 - 800 m/z
Integrator	Data Analysis™, Version 3.0, Bruker Daltonics (Bruker, Bremen)
Stationäre Phase	LiChrospher® RP Select-B, 250 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm, in einer LiChroCART®-Kartusche mit Vorsäule RP Select-B, 4 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm (Merck, Darmstadt)
Mobile Phasen	Fließmittel A: 25 mM Ammoniumacetat, pH 4,85 eingestellt mit Essigsäure Fließmittel B: Acetonitril

Gradientenprofil	Laufzeit (min)	A (%)	B (%)
	0 – 15	100	0
	15 – 20	95	5
	20 – 35	95	5
	35 – 40	70	30
	40 – 50	70	30
	50 – 60	100	0
Flussrate	0,5 ml/min (HPLC), Split 1:6 (MS)		
Detektion	UV, 240 nm		
Retentionszeiten	Benzamidin- <i>N</i> -sulfat: 13,3 ± 0,5 min		
	Benzamidoxim- <i>O</i> -sulfat: 18,4 ± 0,5 min		
	Benzamidoxim- <i>O</i> -glucuronid: 26,6 ± 0,5 min		
	Benzamidin- <i>N</i> -acetat: 28,2 ± 0,6 min		
	Benzamidin: 28,6 ± 0,3 min		
	Benzamidoxim: 35,0 ± 0,3 min		
	Benzamidoxim- <i>O</i> -acetat: 49,8 ± 0,3 min		

Der verwendete Eluent A wurde nach der Herstellung durch einen Sartorius-Membranfilter (Porendurchmesser 0,45 µm) filtriert und ebenso wie Eluent B im Ultraschallbad 15 min entgast. Das Benzamidin-*N*-acetat wurde nach der Vorschrift von Barker *et al.* (1981) und Benzamidin-*N*-sulfat nach der modifizierten Methode von Schänzer *et al.* (1992) und Walsh *et al.* (1995) hergestellt. Sie standen ebenso wie Benzamidoxim und dessen Phase II-Metaboliten, die im Arbeitskreis synthetisiert wurden (Christiansen 2000), als Referenzsubstanz zur Verfügung. Die Standardverbindungen wurden jeweils parallel zu den Proben vermessen.

4.1.3 Ergebnisse

4.1.3.1 Metabolismus von Benzamidoxim in humanen Hepatozyten

4.1.3.1.1 Phase I-Metabolismus

4.1.3.1.1.1 Reduktion

Einen eindeutigen Beweis für eine rasch ablaufende *N*-Reduktion des Benzamidoxims zum Benzamidin zeigt das Ionenchromatogramm (Abb. 4.3), in dem die Ionenspuren 137 Th und 121 Th abgebildet sind. Für Benzamidoxim wurden Ionen mit m/z 137 $[M+H]^+$ und 119 $[M+H-H_2O]^+$ gefunden. Charakteristische Ionen zeigte das Benzamidin bei 121 Th $[M+H]^+$ und 104 Th $[M+H-NH_3]^+$.

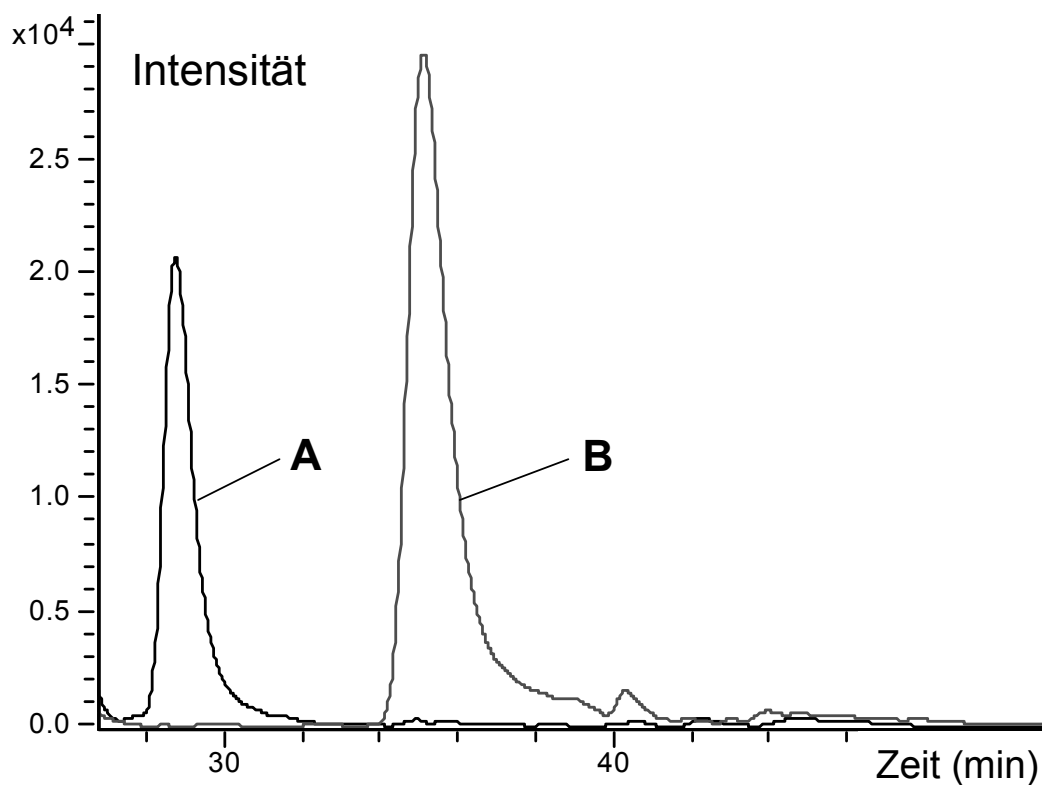


Abbildung 4.3 Ionenchromatogramm der Massen 121 und 137: (A) Ionenspur 121 Th, (B) Ionenspur 137 Th

4.1.3.1.2 Phase II-Metabolismus

4.1.3.1.2.1 Glucuronidierung

Durch die schonende Electrospray-Ionisation wird hauptsächlich das Quasimolekülion (m/z 313) des Standards Benzamidoxim-O-glucuronid gebildet. In Abbildung 4.4 sind die Ionenspuren der Signale bei 313 Th von der synthetischen Referenzverbindung und von einer Benzamidoxim-Inkubation mit humanen Hepatozyten gegenübergestellt. Im Leerwert traten im gleichen Zeitraum keine Signale auf.

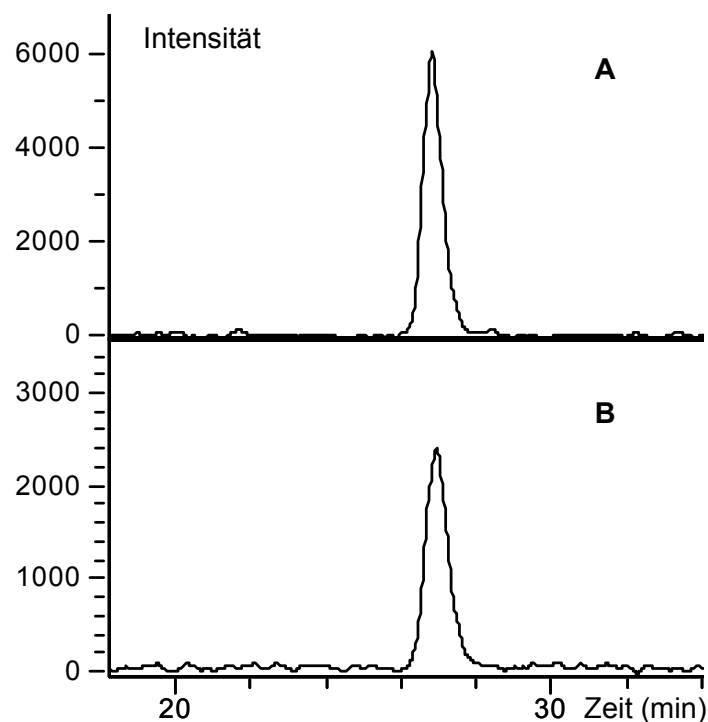


Abbildung 4.4 *Repräsentatives Ionenchromatogramm für die Signale bei 313 Th als charakteristisches Ion für Benzamidoxim-O-glucuronid mit der Retentionszeit von $26,3 \pm 0,3$ min: (A) Standardverbindung, (B) Inkubation mit humanen Hepatozyten*

Sowohl der Metabolit als auch der Standard Benzamidoxim-O-glucuronid weisen außerdem typische Cluster mit Natrium- und Kaliumionen bei 335 Th $[M+Na]^+$, 357 Th $[M-H+2Na]^+$ und 373 Th $[M-H+Na+K]^+$ auf (Abb. 4.5). Das Ion bei 137 Th entspricht der Massenzahl des Benzamidoxims und zeigt somit die Abspaltung der Glucuronsäure aus dem Muttermolekül an. Durch zusätzliche Abspaltung von einem

Wassermolekül aus diesem Benzamidoxim wird ein Fragment bei 119 Th gebildet. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Benzamidoxim hauptsächlich zu Benzamidin reduziert wird und die Glucuronidierung nur in einem deutlich geringeren Ausmaß stattfand. Die Umsetzungsraten betragen 0,016 pmol Benzamidoxim-O-glucuronid/(min \times 10^6 Zellen), wenn die Peakflächen der Ionenchromatogramme mit der Summe der Ionen mit m/z 119, 137, 313, 335, 357 und 373 zur Bewertung herangezogen wurden (Kalibrierung s. Kapitel 5.2.2.2).

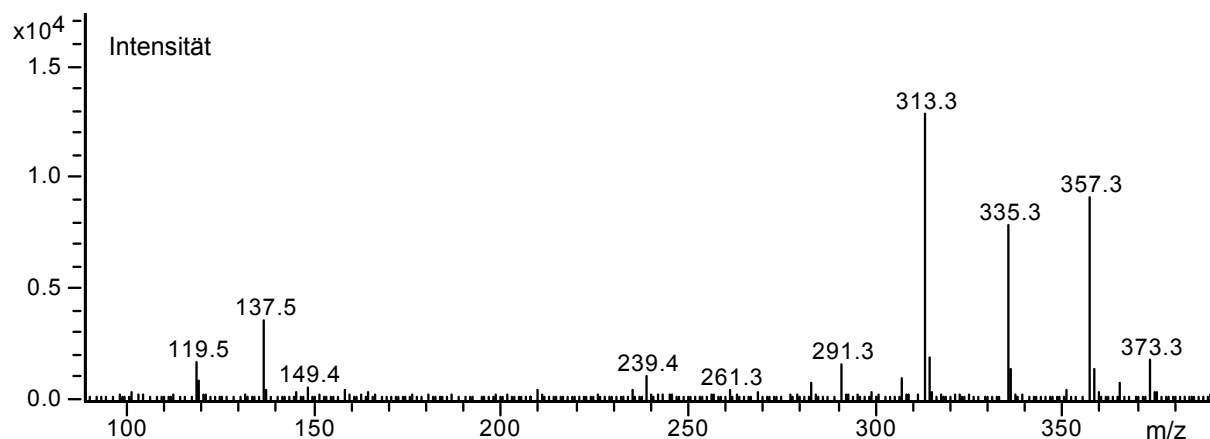


Abbildung 4.5 *Repräsentatives Massenspektrum von in humanen Hepatozyten gebildetem Benzamidoxim-O-glucuronid mit einer Retentionszeit von $26,3 \pm 0,3$ min*

4.1.3.1.2.2 Weitere Reaktionen

Die Suche nach weiteren Phase II-Metaboliten wie Benzamidoxim-O-sulfat oder Benzamidoxim-O-acetat in Inkubationen mit kultivierten Humanhepatozyten verlief ergebnislos. Es konnten keine Metaboliten mit den beiden Standards entsprechenden Retentionszeiten detektiert werden. Auch die für das Benzamidoxim-O-sulfat typische Fragmentierung und Clusterbildung (137 Th $[M+H]^+$ (Hauptfragment), 217 Th $[M+H]^+$, 239 Th $[M+Na]^+$ und 255 Th $[M+K]^+$) waren nicht nachzuweisen. Das Hauptsignal des Standards Benzamidoxim-O-acetat mit m/z 179 wurde ebenso nicht gefunden.

4.1.3.2 Metabolismus von Benzamidin in humanen Hepatozyten

4.1.3.2.1 Phase I-Metabolismus

4.1.3.2.1.1 *N*-Oxidation des Benzamidins zum Benzamidoxim

In den für *in vitro*-Studien verwendeten Humanhepatozytenkulturen traten keine dem Benzamidoxim und dessen *O*-Glucuronid entsprechenden Signale im HPLC-Chromatogramm und keine charakteristischen Fragmente (s. 4.1.3.1.1) dieser zwei Verbindungen im Massenspektrum auf. Die *N*-Oxidation des Benzamidins konnte folglich unter den Bedingungen dieses *in vitro*-Modells weder direkt noch indirekt über die Bildung von möglichen Phase II-Metaboliten des Benzamidoxims detektiert werden.

4.1.3.2.2 Phase II-Metabolismus des Benzamidins

In Inkubationen mit humanen Zellkulturen gab es keine Hinweise auf die Bildung von Benzamidin-*N*-glucuronid, Benzamidin-*N*-sulfat und Benzamidin-*N*-acetat. Im Gegensatz zu Benzamidin-*N*-glucuronid standen die Acetyl- und Sulfat-Verbindung als Referenz zur Verfügung. In keiner Probe konnten Peaks mit den Retentionszeiten der Standardverbindungen nachgewiesen werden. Charakteristische Ionen (Tab. 4.1) der potenziellen Phase II-Metaboliten wurden unter den ESI-Bedingungen ebenfalls nicht gefunden.

Tabelle 4.1 Experimentell bestimmte Massensignale der Standards Benzamidin-*N*-sulfat und Benzamidin-*N*-acetat und erwartete, aber nicht beobachtete Massensignale für den potenziellen Phase II-Metaboliten Benzamidin-*N*-glucuronid, s = starkes Signal

Substanz	Massenzahl	Fragmentionen
Benzamidin- <i>N</i> -glucuronid (erwartete Massenzahlen)	121	[Benzamidin+H] ⁺
	297	[M+H] ⁺
	319	[M+Na] ⁺
Benzamidin- <i>N</i> -sulfat	121	[Benzamidin+H] ⁺
	143	[Benzamidin+Na] ⁺
	201+203 s	[M+H] ⁺
	223	[M+Na] ⁺
	239	[M+K] ⁺
	245	[M-H+2Na] ⁺
Benzamidin- <i>N</i> -acetat	104	[Benzamidin+2H-NH ₃] ⁺
	121	[M+2H-COCH ₃] ⁺
	163 s	[M+H] ⁺
	185	[M+Na] ⁺

4.1.4 Diskussion

Vorangegangene Untersuchungen im Arbeitskreis befassten sich ausführlich mit Phase I-Reaktionen von Amidoximen bzw. Amidinen in verschiedenen Spezies, Organen und mit den daraus gewonnenen unterschiedlichen Enzymquellen (Clement 2002). Nachdem Christiansen (2000) die Umsetzung des Benzamidoxims zum Benzamidin in kultivierten Schweinehepatozyten gezeigt hatte, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals diese *N*-Reduktion als dominierende Reaktion in humanen Hepatozytenkulturen (Abb. 4.6), die die *in vivo*-Bedingungen in einem großem Ausmaß nachahmen, beschrieben. Im Gegensatz zu früheren Studien mit Kaninchenhomogenisat (Clement 1983) konnte die umgekehrte Reaktion, die *N*-Oxidation vom Benzamidin zum Amidoxim, unter den Bedingungen dieses *in vitro*-Modells nicht detektiert werden. Diese Tatsache könnte man mit einer deutlich größeren Reaktionsgeschwindigkeit der *N*-Reduktion erklären, so dass gegebenenfalls intermediär gebildetes Benzamidoxim schnell rückreduziert wird und deshalb auch nicht an Glucuronsäure gekoppelt werden kann. In Analogie zu früheren Studien mit Schweinehepatozytenkulturen unterstreicht die Dominanz der

N-Reduktion in diesem menschlichen Zellsystem die Eignung des Prodrug-Prinzips, das darauf beruht, die besser verfügbaren Amidoxime anstelle der schlecht resorbierbaren Amidine einzusetzen.

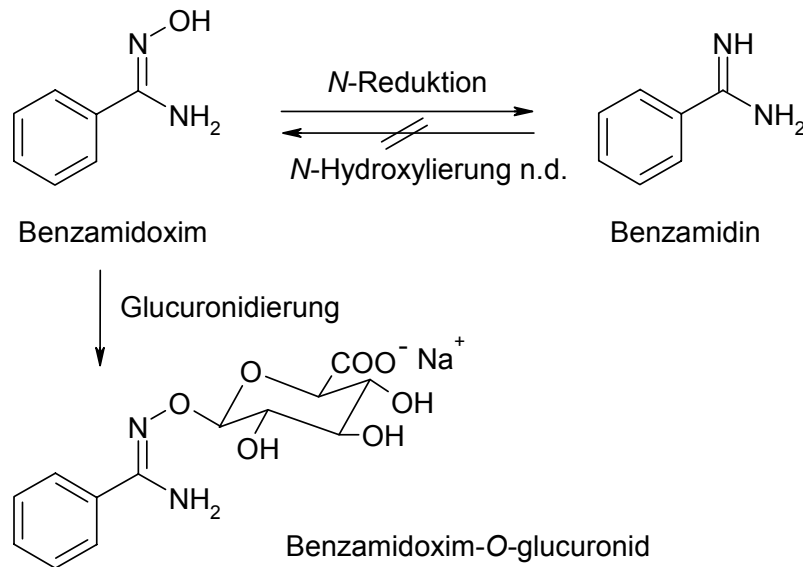


Abbildung 4.6 Phase I- und Phase II-Metabolismus des Benzamidoxims in humanen Hepatozytenkulturen, n.d. = nicht detektierbar

Neben den Phase I-Reaktionen läuft die Glucuronidierung des Benzamidoxims (Abb. 4.6), die zu einem untoxischen Produkt führt (Clement *et al.* 2001), in einem deutlich geringeren Umfang ab. Das im Ames-Test mutagene Benzamidoxim-O-acetat wurde in humanen Hepatozyten ebenso wenig gefunden wie in vorangegangenen Studien mit porcinen Leberzellkulturen. Abweichend vom Metabolismus im Schwein konnten in menschlichen Zellen keine Sulfate des Benzamidoxims und des Benzamidins nachgewiesen werden. Dieses Fehlen könnte als Speziesunterschied in Bezug auf die Sulfatierung gedeutet werden. Allerdings waren die Umsetzungsraten in porcinen Zellen auch eher gering, so dass die Abwesenheit dieser Metaboliten möglicherweise auch in einer nicht ausreichenden Nachweisgrenze oder in einer ungenügenden Sulfatierungsfähigkeit der humanen Zellchargen begründet liegt. In Übereinstimmung mit früheren Studien mit Schweinehepatozyten gab es keine Hinweise auf die Bildung sämtlicher denkbarer Benzamidin-Metaboliten wie Benzamidoxim und dessen Phase II-Produkte, Benzamidin-*N*-glucuronid und Benzamidin-*N*-acetat in humanen Hepatozytenkulturen. Folglich ist, mit Ausnahme der Sulfatierung, der

Metabolismus der Modellsubstrate Benzamidin und Benzamidoxim in den Leberzellkulturen der Spezies Schwein und Mensch identisch und bestätigt damit die Einsatzmöglichkeit von porcinen Hepatozytenkulturen als alternatives *in vitro*-Modell gegenüber humanen Zellsystemen (Zuber *et al.* 2002). Demzufolge eignen sich kultivierte Schweinehepatozyten nicht zuletzt aufgrund der leichten Zugänglichkeit zur Testung des Metabolismus von neuen Arzneistoffen in der pharmazeutischen Entwicklung.

4.1.5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Studie wurden der Benzamidoxim- und der Benzamidin-Metabolismus in humanen Leberzellkulturen untersucht. Es konnte erstmals die Umsetzung des Benzamidoxims zum Benzamidin als Hauptreaktion des metabolischen Zyklus in humanen Hepatozyten gezeigt werden. Diese Beobachtung bestätigte das Prinzip des Einsatzes des Amidoxims als Prodrug auch in zellulärer Umgebung *in vitro*. Die Glucuronidierung des Benzamidoxims lief hingegen deutlich langsamer ab. Weder Phase I- noch Phase II-Metaboliten des Substrates Benzamidin waren in Inkubationen mit humanen Hepatozyten nachzuweisen. Aus früheren Arbeiten mit Schweinehepatozyten (Clement *et al.* 2001, Fröhlich *et al.* 2001) waren sowohl ein ähnliches Verhältnis zwischen den Reaktionsgeschwindigkeiten der *N*-Reduktion und *O*-Glucuronidierung von Benzamidoxim als auch das Fehlen von Benzamidin-Metaboliten bekannt, so dass diese Beobachtungen große Ähnlichkeiten zwischen den Spezies Schwein und Mensch demonstrierten. Eine Ausnahme stellten Benzamidin-*N*-sulfat und Benzamidoxim-*O*-sulfat dar, die in porcinen, nicht aber in humanen Hepatozyten gefunden wurden.

Obwohl das eingesetzte *in vitro*-Modell die Bedingungen der *in vivo*-Situation zu einem bedeutenden Teil simuliert, sollte in zukünftigen Arbeiten der Metabolismus von Benzamidoxim bzw. Benzamidin im lebenden Organismus mit Schweinen untersucht werden. Vorteilhaft ist, dass im Gegensatz zu früheren Untersuchungen mit Ratten- und Kaninchenplasma (Clement *et al.* 1993b) nun eine analytische Methode zum direkten Nachweis der Metaboliten zur Verfügung steht. Mit diesen *in vivo*-Studien im Schwein könnte die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus

Inkubationen mit porcinen Hepatozytenkulturen auf die *in vivo*-Bedingungen bezüglich dieser Substrate nachgeprüft werden. Aufgrund der gezeigten Speziesähnlichkeit zwischen Mensch und Schwein würde die Vorhersagbarkeit der Biotransformation im Menschen anhand von *in vitro*-Daten aus porcinen oder humanen Hepatozytenkulturen untermauert werden.

4.2 Biotransformation von *N*-Hydroxydebrisoquin und Debrisoquin

4.2.1 Einleitung

4.2.1.1 Bisherige Untersuchungen

In zahlreichen Arzneistoffen der unterschiedlichsten Anwendungsgebiete (z. B. antihypertensive, antimikrobielle, antihistaminerge und antidiabetische Therapie) sind Guanidine als funktionelle Gruppen enthalten (Clement 1986, Mutschler *et al.* 2001). Debrisoquin und sein Metabolit *N*-Hydroxydebrisoquin zeigen z. B. blutdrucksenkende Eigenschaften (Bailey und DeGrazia 1973). Die enthaltene Guanidin-Funktion besitzt einen pK_a -Wert von 12,5 (Allen *et al.* 1975) und weist somit eine noch stärkere Basizität als die Amidine auf (Clement 1998). Gegenüber dem Amidinium-Ion wirken größere mesomere Effekte stabilisierend auf das durch Protonierung am doppelt gebundenen Stickstoff gebildete Guanidinium-Ion (Abb. 4.7).

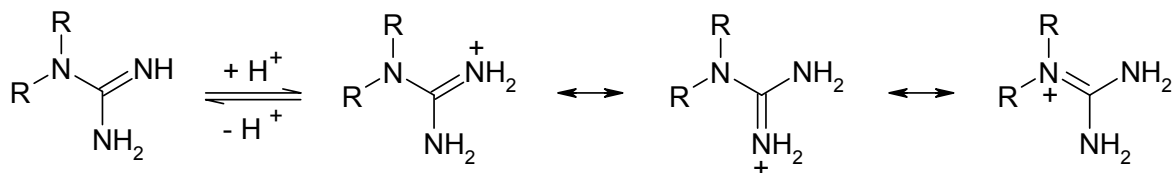


Abbildung 4.7 Mesomere Grenzformen von protonierten Guanidinen (nach Clement 1998)

Frühere Studien zum Metabolismus von Debrisoquin zeigten Polymorphismen-Erscheinungen des damals noch nicht als P450-Enzym identifizierten CYP2D6 in Hinblick auf die Verstoffwechslung zum 4-Hydroxydebrisoquin (Mahgoub *et al.* 1977). Nachdem Idle *et al.* (1979) bereits die Beteiligung eines P450-Enzyms an der genannten Reaktion angenommen hatten, konnte dies durch Distlerath *et al.* (1985) anhand von gereinigtem P450_{DB}, dem CYP2D6 vor der Nomenklaturnovellierung (Nebert *et al.* 1987), erstmals bestätigt werden. Hydroxylierungen des Debrisoquins in 5-, 6-, 7- und 8-Position sowie ringoffene Carbonsäuren (Abb. 4.8) infolge von 1- oder 3-Hydroxylierungen wurden im Menschen und in der Ratte nachgewiesen (Allen *et al.* 1975, Idle *et al.* 1979). Erst später stellte sich heraus, dass an allen

Hydroxylierungen das humane CYP2D6 beteiligt ist (Eiermann *et al.* 1998, Lightfoot *et al.* 2000).

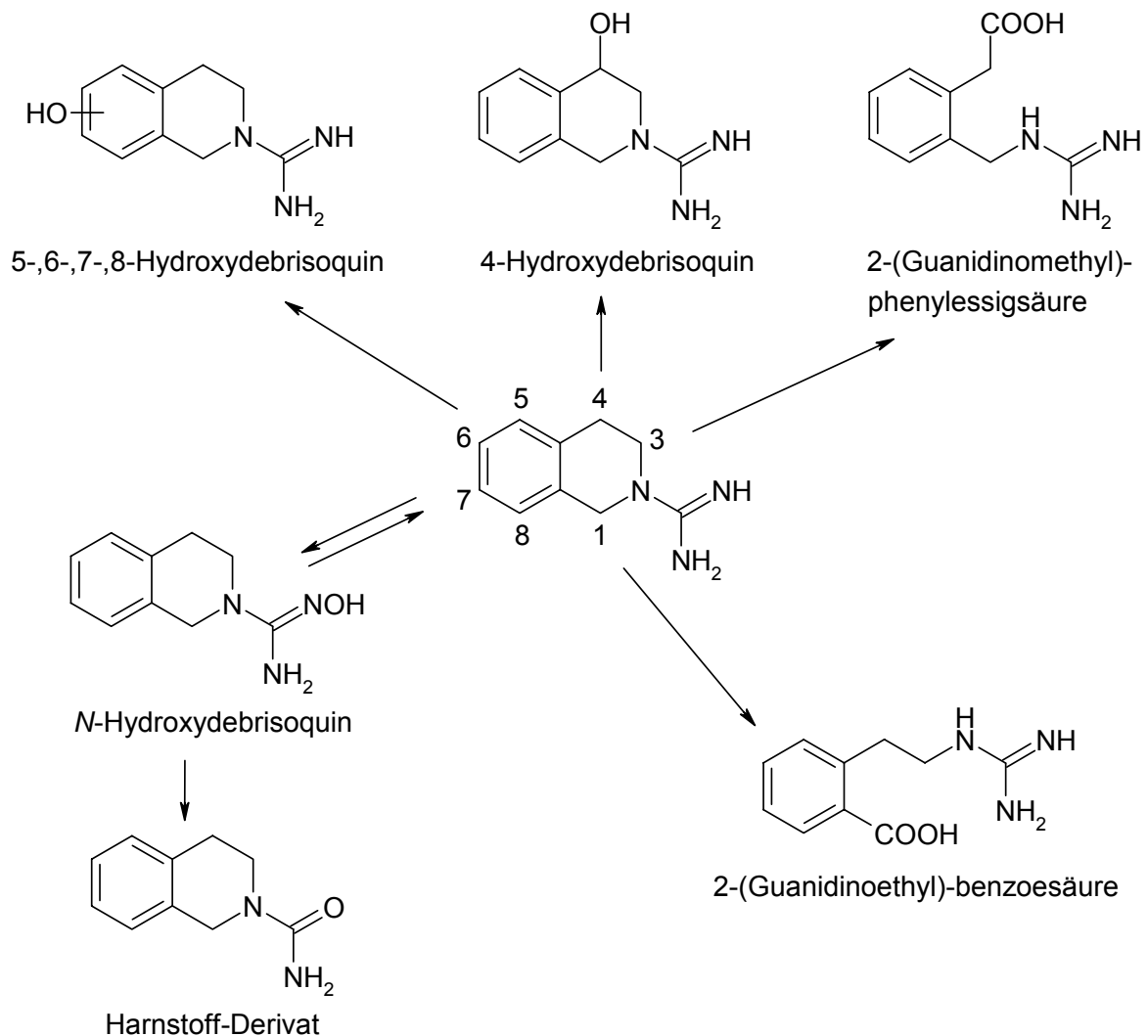


Abbildung 4.8 *Debrisoquin-Metabolismus (modifizierte Übersicht aus Lightfoot et al. 2000)*

Eine *N*-Hydroxylierung von Guanidin-Gruppen wurde für verschiedene nicht-physiologische Substrate wie Debrisoquin (Clement *et al.* 1993c), *N,N'*-Diphenylguanidin (Clement und Kunze 1993) und Guanfacin, einem Phenylacetylguanidinium-Derivat (Clement und Demesmaeker 1997b), nachgewiesen. Clement *et al.* (1993c) identifizierten das CYP2C3 aus dem Kaninchen als bei der *N*-Oxygenierung des Debrisoquins zum *N*-Hydroxydebrisoquin involviertes Enzym. Diese Reaktion konnte vermutlich aufgrund der leichten Rückreduktion hingegen nicht in Rattenhepatozytensuspensionen gezeigt werden (Wohlers 1994).

N-Hydroxyguanidine, *N*-Hydroxyamidinohydrazone und Hydroxylamine werden wie Amidoxime durch das gleiche Enzymsystem, bestehend aus der NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase, Cytochrom b_5 und einem P450-Enzym, reduziert. Lomb (1995) reinigte das entsprechende P450-Enzym aus Schweineleber und charakterisierte es als zur Familie CYP2D gehörend.

4.2.1.2 Zielsetzung

In vorangegangenen Studien mit Rattenhepatozytensuspensionen sowie mit Lebermikrosomen der Spezies Kaninchen und Ratte wurde die leicht ablaufende Reduktion vom *N*-Hydroxydebrisoquin zum Debrisoquin gezeigt, wohingegen die umgekehrte *N*-Oxygenierung nur mit den mikrosomalen Fraktionen, nicht aber mit der Zellsuspension nachgewiesen werden konnte (Clement *et al.* 1993c). Aufbauend auf diese Untersuchungen war nun die Erforschung dieses metabolischen Zyklus bestehend aus Oxidation und Reduktion in Hepatozytenkulturen von Interesse. Dieses *in vitro*-Modell imitiert die *in vivo*-Bedingungen der Leber, so dass Voraussagen zum Metabolismus in Lebewesen gemacht werden können (Guillouzo *et al.* 1993, LeCluyse 2001, MacGregor *et al.* 2001).

Weiterhin sollte der Phase II-Metabolismus des Debrisoquins näher betrachtet werden. Nachdem Idle *et al.* (1979) auf indirektem Weg durch Zusatz von β -Glucuronidase und Arylsulfatase keine Konjugationen feststellen konnten, sollte nun eine HPLC-Methode entwickelt werden, die sämtliche Metaboliten des Debrisoquins auftrennt. Die Biotransformationsprodukte sollten dann massenspektrometrisch analysiert werden. Da bisher wenige Daten zum Phase I- und keine Erkenntnisse bezüglich des Phase II-Metabolismus des *N*-Hydroxydebrisoquins vorlagen, sollten in dieser Arbeit Untersuchungen zur Biotransformation dieses Substrates mit Hepatozytenkulturen durchgeführt werden, die im Gegensatz zu Zellfragmenten eine Aufdeckung sämtlicher Reaktionen ermöglichen (Brandon *et al.* 2003). Neben der Aufklärung des Metabolitenmusters sollte vor allem die Glucuronidierung, Sulfatierung und Acetylierung der *N*-Hydroxyguanidin-Funktion näher betrachtet und charakterisiert werden. Daher erschien es sinnvoll, zusätzlich zu der Entwicklung einer LC/MS-Methode den potenziellen Metaboliten *N*-Hydroxy-

debrisoquin-O-glucuronid zu synthetisieren, um einen direkten Nachweis der Stoffwechselprodukte zu ermöglichen.

Um Analogien und Unterschiede des Metabolismus in Menschen und Schweinen ermitteln zu können, galt es, die Biotransformationsstudien der guanidinhaltigen Substrate sowohl in porcinen als auch in humanen Hepatozytenkulturen durchzuführen. Die aus den Inkubationsansätzen mit den humanen Zellen erhaltenen *in vitro*-Daten könnten im Weiteren mit Informationen aus *in vivo*-Studien am Menschen korreliert werden, um den Einsatz sowohl von humanen als auch porcinen Hepatozytenkulturen als geeignetes *in vitro*-Modell zur Untersuchung von Xenobiotika zu unterstreichen (LeCluyse 2001, Zuber *et al.* 2002).

4.2.2 Methoden

4.2.2.1 Synthese verwendeter Standardverbindungen

4.2.2.1.1 Synthese von *N*-Hydroxydebrisoquin

Die von Bailey und DeGrazis (1973) beschriebene Methode wurde anhand von analogen Synthesevorschriften (Clement 1986, Schnörwangen 1994) modifiziert:

Die Herstellung des Zwischenproduktes Cyanamid erfolgte zunächst 2,5 h unter Rühren bei 5°C im eisgekühlten Wasserbad. Im Anschluss wurde die Reaktion für 16-20 h bei Raumtemperatur fortgesetzt.

Zur Synthese des *N*-Hydroxydebrisoquins wurden zunächst 2,3 g (14,3 mmol) des hergestellten Cyanamids in 7 ml wasserfreiem Dioxan gelöst, dann 1,77 g (53,6 mmol) Hydroxylamin-Base (hergestellt nach Steudel und Schenk 1975) und 1,0 g (9,4 mmol) Na₂CO₃ hinzugegeben und die Lösung 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Dioxans wurde direkt aus Isopropanol umkristallisiert. Die Identifizierung erfolgte zunächst per FeCl₃-Anfärbung nach dünnschicht-chromatographischer Trennung. Hierfür wurde die Kieselgelplatte zunächst in einer DC-Kammer mit Triethylamin gesättigt. Das Fließmittel bestand aus Dichlormethan/Methanol/Triethylamin 85:15:1 (V/V/V). Zur Charakterisierung des Produkts dienten die üblichen analytischen Methoden. Alle Daten stimmten mit Literaturangaben überein.

4.2.2.1.2 Synthese von *N*-Hydroxydebrisoquin-*O*-glucuronid

Die Synthese des *N*-Hydroxydebrisoquin-*O*-glucuronid wurde analog zur Vorschrift für die Kopplung von Benzamidoxim mit geschützter Glucuronsäure durchgeführt (Clement *et al.* 2001).

Zu einer Lösung aus 0,96 mg (5,0 mmol) *N*-Hydroxydebrisoquin und 1,72 g (10,0 mmol) Cadmiumcarbonat in 75 ml getrocknetem Toluol wurden 3,97 g (10,0 mmol) Methyl-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-bromo-1-desoxy- α -D-glucopyranosyl)-uronat in 50 ml Toluol in einer Stickstoffatmosphäre zugetropft, während gleichzeitig die zugeführte Toluol-Menge abdestilliert wurde. Der Reaktionsansatz wurde im Anschluss 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Nach Zugabe von Methanol zum Rückstand bildete sich eine Suspension, deren ungelöster Anteil abzentrifugiert wurde. Die Aufreinigung des Überstandes erfolgte zunächst über eine RP-Säule mit einer Methanol/Wasser-Mischung 1:1 (V/V) und anschließend mittels Flash-Chromatographie ebenfalls über eine RP-Säule mit einem Methanol-Wasser-Gradienten. Das in einer Ausbeute von ca. 3-4 mg (ca. 8 μ mol; 0,2%) entstandene Produkt (Methyl{2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-*O*-[3,4-dihydro-2(1*H*)-isochinolincarboxamidoxim]- β -D-glucopyranosyl}-uronat) wurde mithilfe von $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) und MS (ESI) charakterisiert: $^1\text{H-NMR}$ δ 1,94/2,03/2,05 (3 \times s, 3 \times 3 H, CH_3); 2,88 (t, 2 H, $J = 5,6$ Hz, $\text{H}_{\text{aliph.}}$); 3,43 (t, 2 H, $J = 5,8$ Hz, $\text{H}_{\text{aliph.}}$); 3,74 (s, 3 H, OCH_3); 4,13 (d, 1 H, $J = 9,33$ Hz, H-5); 4,33 (s, 2 H, $\text{H}_{\text{aliph.}}$); 5,01 (d, 1 H, $J = 8,2$ Hz, H-1); 5,24 (m, 3 H, H-2/H-3/H-4); 7,13 (m, 4 H, $\text{H}_{\text{arom.}}\text{-}5'/6'/7'/8'$); $^{13}\text{C-NMR}$ δ 21,2/21,3/21,5 (Me); 29,5 ($\text{C}_{\text{aliph.}}$); 44,4 ($\text{C}_{\text{aliph.}}$); 48,4 ($\text{C}_{\text{aliph.}}$); 53,5 (OMe); 70,4 (C-5); 70,8 (C-4); 72,9 (C-3); 73,4 (C-2); 102,8 (C-1); 126,8/127,1/134,2/135,0 ($\text{C}_{\text{arom.}}\text{-}5'/6'/7'/8'$); 158,8 (C=N); 168,0/170,1/170,4/170,7 (C=O); MS m/z 508 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Eine methanolische Lösung dieser Verbindung wurde mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung versetzt und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die freigesetzte Substanz wurde dann per LC/MS (4.2.2.4.1) analysiert. Die Retentionszeit betrug $22,5 \pm 0,3$ min und das Massenspektrum zeigte folgende charakteristische Ionen: m/z 368 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 390 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 406 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 412 $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$, 428 $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{K}]^+$ und 350 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (s. auch 4.2.3.2.2.1).

4.2.2.2 Inkubationsbedingungen für porcine und humane Hepatozyten

Die verwendeten Inkubationsbedingungen entsprachen dabei der in 4.1.2.1 beschriebenen Methode. Die Inkubationslösung enthielt die Substrate *N*-Hydroxydebrisoquin bzw. Debrisoquin in einer Konzentration von 200 μ M.

4.2.2.3 Inkubationsbedingungen für die Hydrolyse mit β -Glucuronidase

Der Überstand der nach 4.2.2.2 durchgeführten Inkubationen wurde zu gleichen Teilen in zwei Reagiergefäße pipettiert, die Ansätze dann mit 8 μ l β -Glucuronidase bzw. 8 μ l Aqua bidest. versetzt und 16 h im 37°C-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei -20°C eingefroren, gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert. Vor Vermessung wurden sie in 40 μ l Fließmittel A gelöst, 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand in die Probenschleife injiziert. Parallel zu den Inkubationen mit β -Glucuronidase wurden jeweils die entsprechenden Ansätze ohne Enzym per LC/MS vermessen.

4.2.2.4 LC/MS-Analytik

Das von Lomb (1995) entwickelte Verfahren wurde für die Bestimmung von *N*-Hydroxydebrisoquin- bzw. Debrisoquin-Metaboliten per LC/MS modifiziert.

4.2.2.4.1 Untersuchung des Metabolismus von *N*-Hydroxydebrisoquin und des Phase II-Metabolismus von Debrisoquin

HPLC-Pumpe	HP 1090 Series II LC Hochdruckgradientenpumpe (Hewlett Packard, Waldbronn)
Injektor	Rheodyne 20 μ l-Probenschleife
Detektor	HP 1050 VWD UV/VIS Detektor (Hewlett Packard, Waldbronn)
Massenspektrometer	Esquire LC (Bruker, Bremen)
Interface	ESI, positiver Ionenmodus
Sprühdruck	40 psi
Trockengas	6,0 l/min
Trockentemperatur	350°C

Scanbereich	50 - 800 m/z		
Integrator	Data Analysis™, Version 3.0, Bruker Daltonics (Bruker, Bremen)		
Stationäre Phase	LiChrospher® RP Select-B, 250 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm, in einer LiChroCART®-Kartusche mit Vorsäule RP Select-B, 4 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm (Merck, Darmstadt)		
Mobile Phasen	Fließmittel A: 25 mM Ammoniumformiat, pH 4,0 eingestellt mit Ameisensäure und Acetonitril 95:5 (V/V) Fließmittel B: Acetonitril		
Gradientenprofil	Laufzeit (min)	A (%)	B (%)
	0 – 30	Von 100 auf 80	Von 0 auf 20
	30 – 35	80	20
	35 – 40	100	0
	40 – 50	100	0
Flussrate	0,5 ml/min (HPLC), Split 1:6 (MS)		
Detektion	UV, 208 nm		
Retentionszeiten	<i>N</i> -Hydroxydebrisoquin- <i>O</i> -glucuronid: 22,5 ± 0,3 min 4-Hydroxydebrisoquin: 18,3 ± 0,3 min <i>N</i> -Hydroxydebrisoquin: 29,4 ± 0,8 min Debrisoquin: 31,6 ± 0,5 min		

4.2.2.4.2 Untersuchung des oxidativen Metabolismus von Debrisoquin

HPLC-Pumpe	HP 1090 Series II LC Hochdruckgradientenpumpe (Hewlett Packard, Waldbronn)
Injektor	Rheodyne 20 µl-Probenschleife
Detektor	HP 1050 VWD UV/VIS Detektor (Hewlett Packard, Waldbronn)
Massenspektrometer	Esquire LC (Bruker, Bremen)
Interface	ESI, positiver Ionenmodus
Sprühdruck	40 psi
Trockengas	6,0 l/min
Trockentemperatur	350°C

Scanbereich	50 - 800 m/z		
Integrator	Data Analysis™, Version 3.0, Bruker Daltonics (Bruker, Bremen)		
Stationäre Phase	LiChrospher® RP Select-B, 250 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm, in einer LiChroCART®-Kartusche mit Vorsäule RP Select-B, 4 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm (Merck, Darmstadt)		
Mobile Phasen	Fließmittel A: 25 mM Ammoniumformiat, pH 4,0 eingestellt mit Ameisensäure und Acetonitril 93:7 (V/V) Fließmittel B: Acetonitril		
Gradientenprofil	Laufzeit (min)	A (%)	B (%)
	0 – 60	100	0
	60 – 65	80	20
	65 – 70	80	20
	70 – 80	100	0
	80 – 90	100	0
Flussrate	0,5 ml/min (HPLC), Split 1:6 (MS)		
Detektion	UV, 208 nm		
Retentionszeiten	4-Hydroxydebrisoquin: 21,1 ± 0,3 min N-Hydroxydebrisoquin: 53,0 ± 0,5 min Debrisoquin: 70,4 ± 1,3 min		

Die Ammoniumformiatlösung wurde durch einen Sartorius-Membranfilter (Porendurchmesser 0,45 µm) filtriert. Nach Acetonitril-Zugabe wurde im Ultraschallbad 15 min entgast. Die drei Standardverbindungen wurden jeweils parallel zu den Proben vermessen.

4.2.3 Ergebnisse

4.2.3.1 Metabolismus von *N*-Hydroxydebrisoquin in Schweinehepatozyten

4.2.3.1.1 Phase I-Metabolismus

4.2.3.1.1.1 Reduktionen

Es konnte gezeigt werden, dass Schweinehepatozyten *N*-Hydroxydebrisoquin rasch zum *N*-reduzierten Metaboliten Debrisoquin, der ebenso wie der Standard bei $31,6 \pm 0,5$ min eluiert wurde, umsetzen. Durch LC/MS-Kopplung gewonnene Massenspektren des Metaboliten und der Referenzsubstanz stimmten bezüglich der charakteristischen Ionen mit m/z 176 $[M+H]^+$, m/z 159 $[M+H-NH_3]^+$ und m/z 134 $[M+2H-CN H_2NH]^+$ überein. Die Quasimolekülionen des *N*-Hydroxydebrisoquins und Debrisoquins betragen 192 Th bzw. 176 Th. In Abbildung 4.9 sind diese Ionenspuren dargestellt.

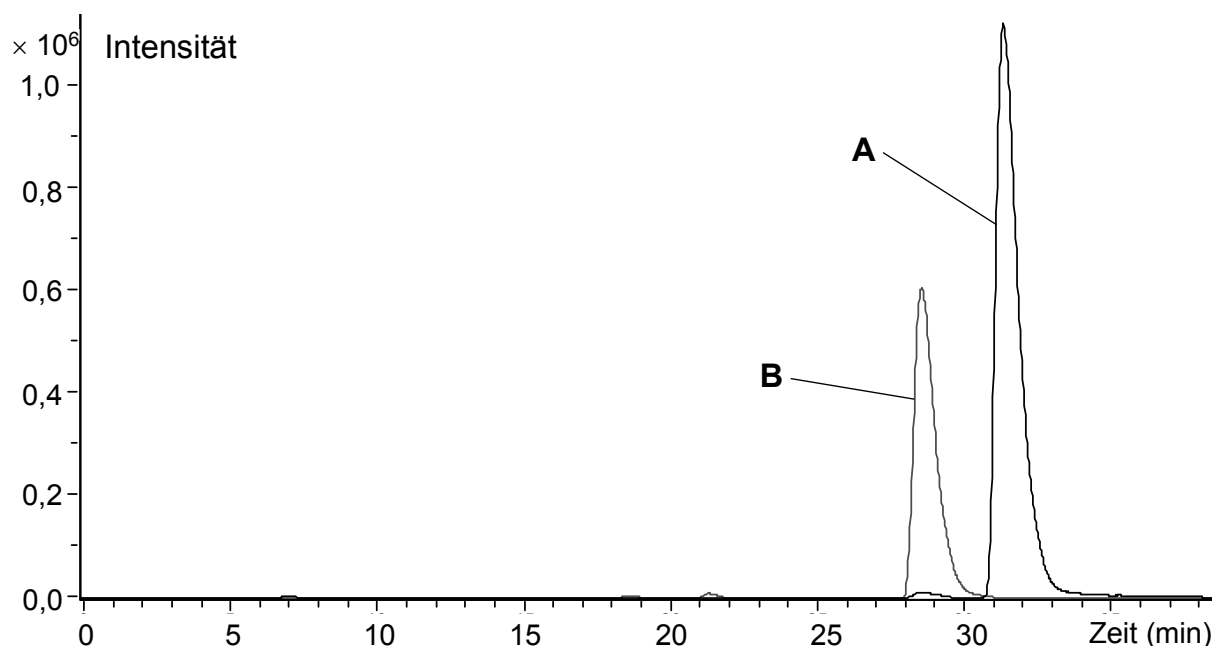


Abbildung 4.9 Repräsentatives Ionenchromatogramm einer *N*-Hydroxydebrisoquin-Inkubation mit Schweinehepatozyten: (A) Ionenspur 176 Th des Debrisoquins, (B) Ionenspur 192 Th des *N*-Hydroxydebrisoquins

4.2.3.1.1.2 Oxidationen

In den Inkubationsansätzen waren außerdem zwei Metaboliten mit den Retentionszeiten $17,1 \pm 0,2$ min und $21,7 \pm 0,3$ min zu detektieren, die im Massenspektrum als Hauptsignal das Ion mit m/z 208 aufwiesen. Die Erhöhung der relativen Molekülmasse des Substrats um 16 auf m/z 208 deutet auf einfache Hydroxylierungen des *N*-Hydroxydebrisoquins hin. In den Leerwerten traten die zwei beschriebenen Substanzen nicht auf.

MS-Signale mit m/z 224, die durch eine doppelte Hydroxylierung des Substrats erklärt werden könnten, waren nicht zu finden.

4.2.3.1.2 Phase II-Metabolismus

4.2.3.1.2.1 Glucuronidierung

Anhand von massenspektrometrischen Untersuchungen wurde der Phase II-Metabolismus von *N*-Hydroxydebrisoquin in Schweinehepatozyten analysiert. Die Suche nach möglichen Signalen von glucuronidiertem *N*-Hydroxydebrisoquin ergab Hinweise auf zwei Metaboliten, die bei $18,0 \pm 0,2$ min und $22,5 \pm 0,3$ min eluiert wurden. Die Molekülionen mit m/z 368 $[M+H]^+$ dominierten bei beiden potenziellen Glucuroniden. Die MS-Signale mit m/z 390 $[M+Na]^+$, 406 $[M+K]^+$, 412 $[M-H+2Na]^+$ und 428 $[M-H+Na+K]^+$ repräsentieren Cluster der Glucuronide mit Natrium- und Kaliumionen. Das entstandene Ion 192 demonstriert eine Abspaltung der Glucuronsäure von der Ausgangsverbindung. Das Fragment 174 Th lässt sich durch eine daran anschließende Abspaltung von Wasser erklären (Abb. 4.10).

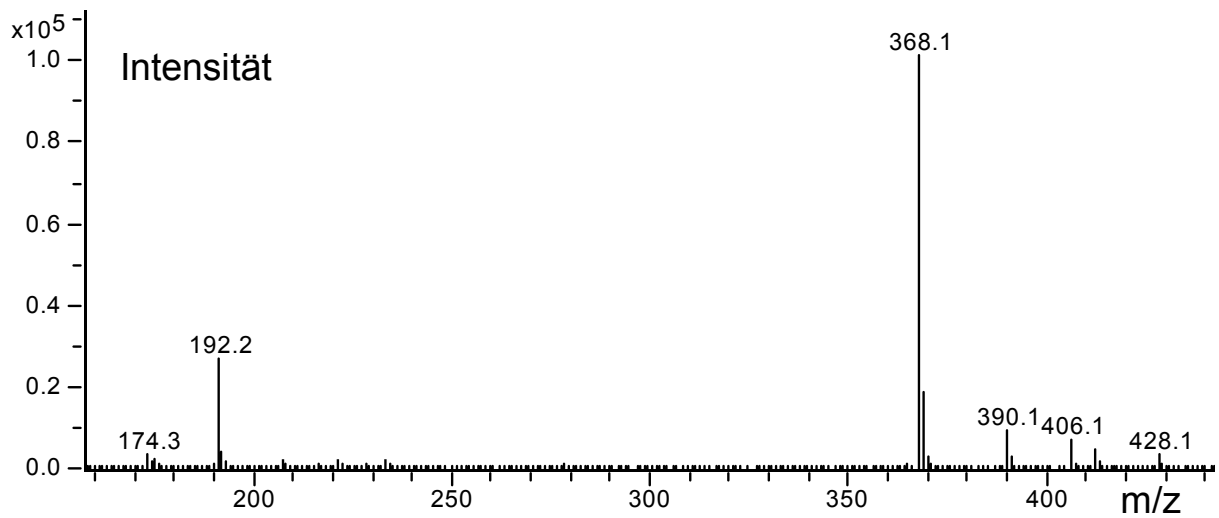


Abbildung 4.10 *Repräsentatives Massenspektrum eines N-Hydroxydebrisoquin-Metaboliten mit der Retentionszeit $22,5 \pm 0,3$ min in einer Schweinehepatozyten-Inkubation*

Zum Vergleich ist hier das Massenspektrum der synthetischen Referenzsubstanz abgebildet (Abb. 4.11).

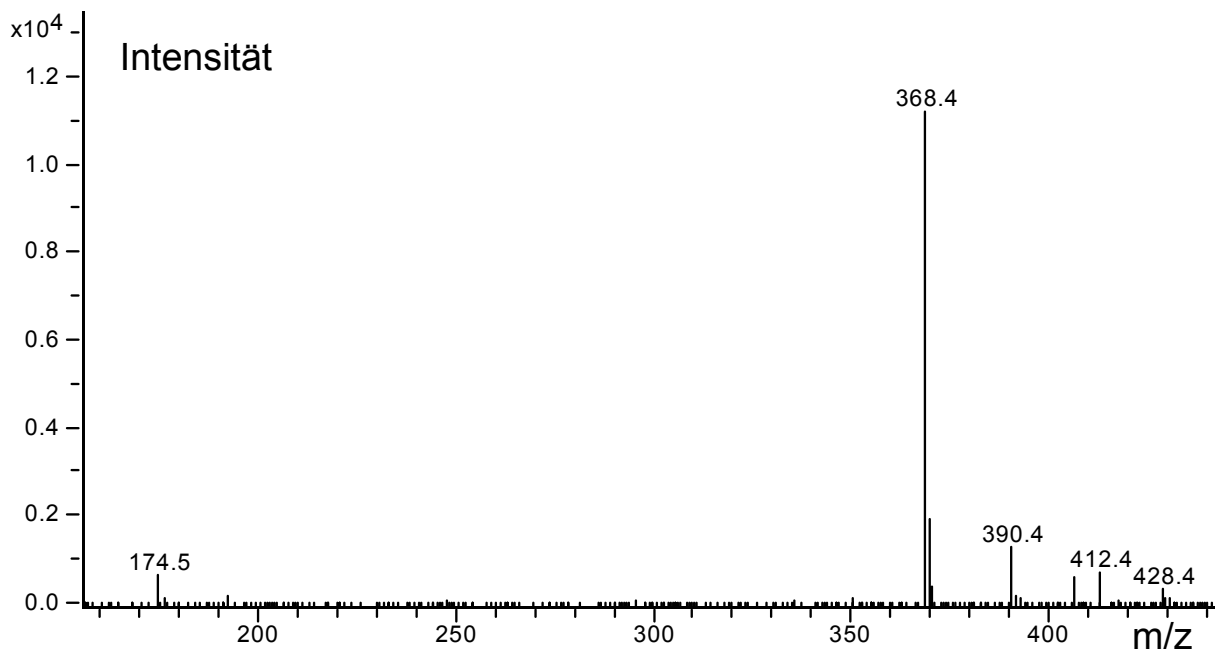


Abbildung 4.11 *Massenspektrum des synthetischen N-Hydroxydebrisoquin-O-glucuronids mit der Retentionszeit $22,5 \pm 0,3$ min*

Durch Behandlung der Proben mit β -Glucuronidase konnte das Aglykon nur aus dem Metaboliten mit der Retentionszeit $22,5 \pm 0,3$ min freigesetzt werden. Die bei $18,0 \pm 0,2$ min eluierte Verbindung ließ sich nicht enzymatisch hydrolysieren. In Abbildung 4.12 sind Ionenspuren des Ions 368 aus *N*-Hydroxydebrisoquin-Inkubationen der Spezies Schwein und Mensch gegenübergestellt (vgl. auch 4.2.3.3.2.1). Das Verhältnis der gebildeten Menge der zwei Metaboliten ist zwischen den Spezies unterschiedlich.

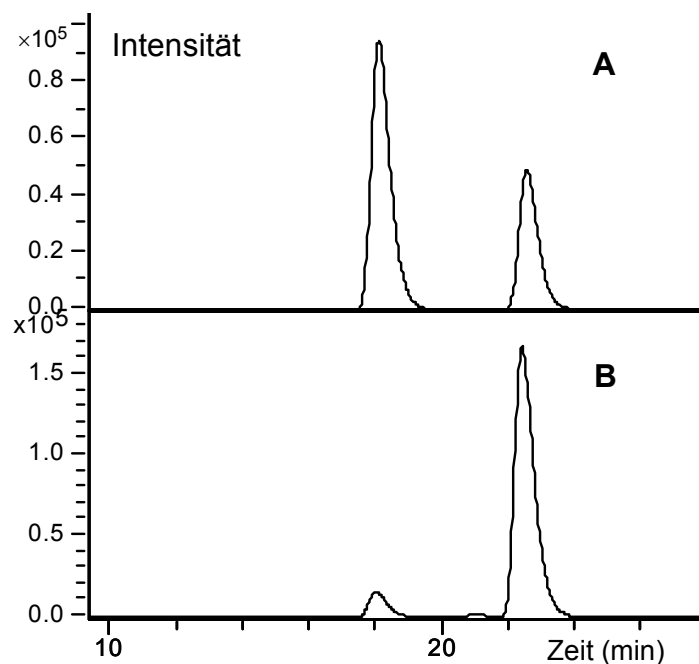


Abbildung 4.12 Repräsentative Ionenchromatogramme des Ion 368 aus *N*-Hydroxydebrisoquin-Inkubationen: (A) mit kultivierten Schweinehepatozyten, (B) mit kultivierten humanen Hepatozyten

4.2.3.1.2.2 Weitere Reaktionen

Für die Untersuchung weiterer Phase II-Metaboliten standen keine synthetischen Referenzsubstanzen zur Verfügung. Es konnten keine Produkte detektiert werden, die mögliche charakteristische Ionen (Tab. 4.2) des *N*-Hydroxydebrisoquin-*O*-sulfats und des *N*-Hydroxydebrisoquin-*O*-acetats aufwiesen.

Tabelle 4.2 Erwartete, aber nicht beobachtete Massensignale für die potenziellen Phase II-Metaboliten *N*-Hydroxydebrisoquin-O-sulfat und *N*-Hydroxydebrisoquin-O-acetat

Substanz	Massenzahl	Fragmentionen
<i>N</i> -Hydroxydebrisoquin-O-sulfat	272	[M+H] ⁺
	294	[M+Na] ⁺
	310	[M+K] ⁺
	192	[M+H-SO ₃] ⁺
<i>N</i> -Hydroxydebrisoquin-O-acetat	234	[M+H] ⁺
	256	[M+Na] ⁺
	256	[M+K] ⁺
	192	[M+H-CH ₃ CO] ⁺

4.2.3.2 Metabolismus von Debrisoquin in Schweinehepatozyten

Sämtliche Debrisoquin-Metaboliten waren auch in den *N*-Hydroxydebrisoquin-Inkubationen nachzuweisen. Sie wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit aber nur in diesem Kapitel aufgeführt.

4.2.3.2.1 Phase I-Metabolismus

4.2.3.2.1.1 *N*-Oxidation des Debrisoquins zum *N*-Hydroxydebrisoquin

Das synthetische *N*-Hydroxydebrisoquin wurde bei $53,0 \pm 0,5$ min eluiert und zeichnete sich durch die Ionen 192 [M+H]⁺, 175 [M+H-NH₃]⁺ und 132 [M+H-HCNH₂NOH]⁺ im Massenspektrum aus. Zur Untersuchung der *N*-Oxidation von Debrisoquin zum *N*-Hydroxydebrisoquin wurden zunächst gefriergetrocknete Proben direkt per LC/MS vermessen, aber weder das HPLC- noch das Ionenchromatogramm lieferten bei der Retentionszeit des Standards entsprechende Signale. Um eine Kopplung des *N*-Hydroxydebrisoquins an Glucuronsäure auszuschließen, wurden mit β -Glucuronidase inkubierte Proben mittels dergleichen analytischen Methode vermessen. Auch in diesen Ansätzen verlief die Suche nach Hinweisen auf die *N*-Oxidation des Debrisoquins ergebnislos.

4.2.3.2.1.2 Weitere Oxidationen

Einfache C-Hydroxylierungen des Debrisoquins führen zu Molekülen mit der relativen Masse von 192 Th nach der Ionisation. Drei Metaboliten mit dieser Massenzahl waren nach den Retentionszeiten von $18,3 \pm 0,3$ min, $21,1 \pm 0,2$ min bzw. $23,1 \pm 0,2$ min in den Debrisoquin-Inkubationen mit Schweinehepatozyten zu finden. Das synthetische 4-Hydroxydebrisoquin verhielt sich in dem analytischen System entsprechend dem bei $18,3 \pm 0,3$ min eluierten Metaboliten. Eine Veränderung des Fließmittels (s. Methode 4.2.2.4.2) bewirkte wieder eine Elution von Standard und Metabolit nach einer identischen Chromatographiedauer von nun $21,1 \pm 0,3$ min. Ionen mit m/z 208 zeigen eine doppelte Hydroxylierung des Grundgerüsts an. Entsprechend den *N*-Hydroxydebrisoquin-Inkubationen wurden in den Debrisoquin-Ansätzen zwei Verbindungen mit m/z 208 bei den Retentionszeiten $17,1 \pm 0,2$ min und $21,7 \pm 0,3$ min detektiert.

4.2.3.2.2 Phase II-Metabolismus

4.2.3.2.2.1 Glucuronidierung

Neben der Aufklärung des Metabolitenmusters in den Inkubationen mit Hepatozytenkulturen sollten besonders Phase II-Reaktionen der Guanidin-Funktion betrachtet werden. Folglich wurden die Massenspektren nach typischen Ionen (m/z 352 $[M+H]^+$, 374 $[M+Na]^+$, 390 $[M+K]^+$ und 176 $[Benzamidin+H]^+$) des potenziellen Metaboliten Debrisoquin-*N*-glucuronid durchsucht. Es konnten keine entsprechenden Signale in den Proben detektiert werden, die auf eine metabolische Bildung dieses Konjugates hinwiesen.

In den Schweinehepatozyten wurden aus dem Substrat Debrisoquin aber drei Verbindungen gebildet, die sich durch das Hauption mit m/z 368 auszeichneten und nach $7,0 \pm 0,2$ min, $10,5 \pm 0,4$ min und $15,8 \pm 0,4$ min eluiert wurden. Inkubationen dieser Proben mit β -Glucuronidase zeigten, dass die drei Metaboliten unter diesen Bedingungen hydrolysiert wurden (Abb. 4.13). Die Massenzahl 368 entspräche Glucuroniden von hydroxylierten Debrisoquin-Derivaten.

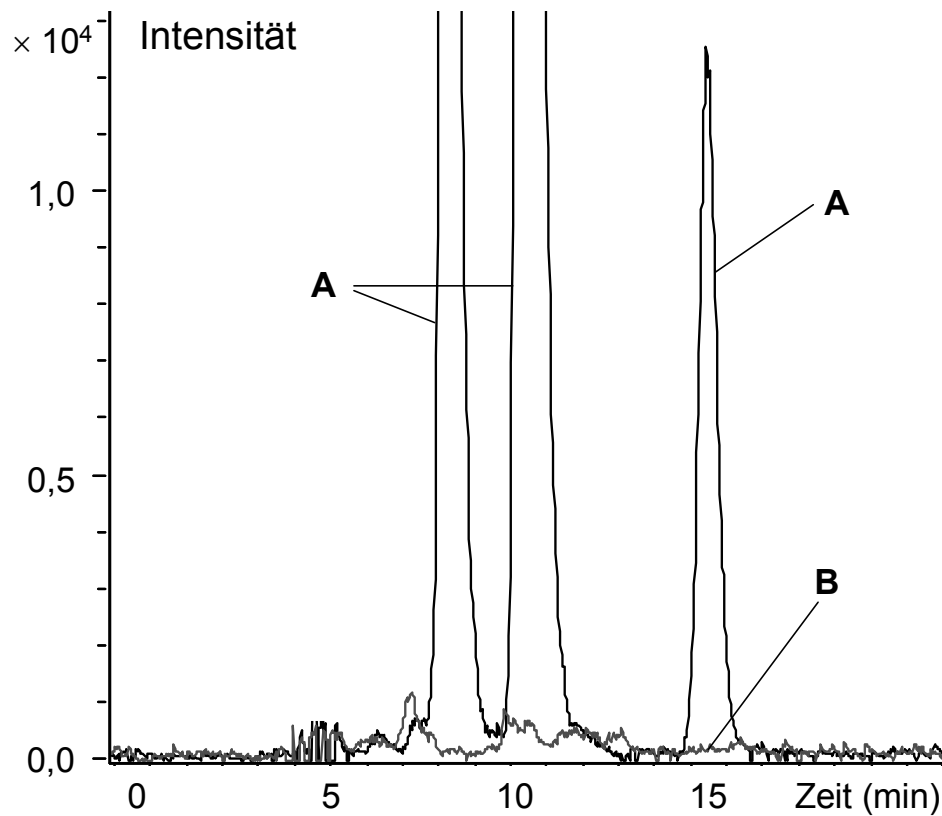


Abbildung 4.13 Ionenchromatogramme des Ions 368: (A) Debrisoquin-Inkubation mit kultivierten Schweinehepatozyten, (B) Debrisoquin-Inkubation mit kultivierten Schweinehepatozyten nach β -Glucuronidase-Behandlung

4.2.3.2.2 Weitere Reaktionen

In Inkubationen mit porcinen Zellkulturen konnten mittels Massenspektrometrie keine charakteristischen Ionen (Tab. 4.3) von Debrisoquin-*N*-sulfat und Debrisoquin-*N*-acetat ermittelt werden. Es gab folglich keine Hinweise auf die Bildung dieser zwei potenziellen Phase II-Metaboliten.

Tabelle 4.3 Erwartete, aber nicht beobachtete Massensignale für die potenziellen Phase II-Metaboliten Debrisoquin-N-sulfat und Debrisoquin-N-acetat

Substanz	Massenzahl	Fragmentionen
Debrisoquin- <i>N</i> -sulfat	255	[M+H] ⁺
	277	[M+Na] ⁺
	293	[M+K] ⁺
	176	[M+H-SO ₃] ⁺
Debrisoquin- <i>N</i> -acetat	218	[M+H] ⁺
	240	[M+Na] ⁺
	256	[M+K] ⁺
	176	[M+H-CH ₃ CO] ⁺

4.2.3.3. Metabolismus von *N*-Hydroxydebrisoquin in humanen Hepatozyten

4.2.3.3.1 Phase I-Metabolismus

4.2.3.3.1.1 Reduktionen

N-Hydroxydebrisoquin wurde in den humanen Hepatozyten ebenso rasch zu Debrisoquin *N*-reduziert wie in den porcinen Kulturen. Retentionszeit und Massensignale des Metaboliten stimmten mit denen des Standards (s. 4.2.3.1.1.1) überein.

4.2.3.1.1.2 Oxidationen

In den *N*-Hydroxydebrisoquin-Inkubationen mit humanen Hepatozyten konnten zwei Metaboliten (Abb. 4.14) mit dem Haupt-MS-Signal bei 208 Th und den Retentionszeiten 17,1 ± 0,2 min und 21,7 ± 0,3 min detektiert werden (vgl. 4.2.3.1.1.1 Schweinehepatozyteninkubation).

Zweifache Hydroxylierungen des Substrats, die im Massenspektrometer zu einer relativen Masse von 224 führen würden, konnten nicht nachgewiesen werden.

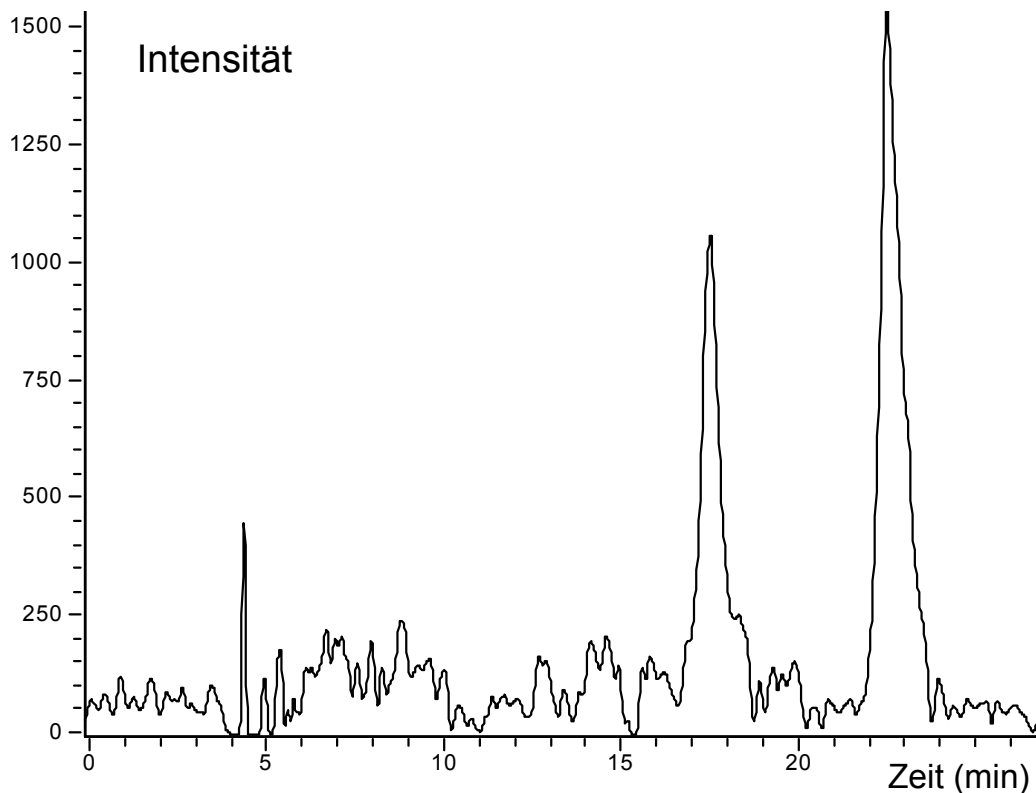


Abbildung 4.14 *Repräsentatives Ionenchromatogramm des Ions 208 aus einer N-Hydroxydebrisoquin-Inkubation mit kultivierten humanen Hepatozyten*

4.2.3.3.2 Phase II-Metabolismus

4.2.3.3.2.1 Glucuronidierung

Entsprechend den Inkubationen mit porcinen Hepatozyten konnte auch in humanen Hepatozyten die Bildung von zwei Metaboliten mit 368 Th-Signalen im Massenspektrum nach $18,0 \pm 0,2$ min und nach $22,5 \pm 0,3$ min nachgewiesen werden (Abb. 4.11). Die Retentionszeiten und weitere MS-Fragmente stimmten ebenfalls mit denen aus der Schweinehepatozyten-Inkubation (vgl. 4.2.3.1.2.1) überein. Auch in diesen Ansätzen konnte nur der nach $22,5 \pm 0,3$ min eluierte Metabolit enzymatisch hydrolysiert werden.

4.2.3.3.2 Weitere Reaktionen

In den Inkubationen mit Humanhepatozyten lagen keine massenspektrometrischen Hinweise (s. 4.2.3.1.2.2) auf eine Sulfatierung und Acetylierung des Substrates *N*-Hydroxydebrisoquin vor.

4.2.3.4 Metabolismus von Debrisoquin in humanen Hepatozyten

Sämtliche Debrisoquin-Metaboliten waren auch in den *N*-Hydroxydebrisoquin-Inkubationen nachzuweisen. Sie wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit aber nur in diesem Kapitel aufgeführt.

4.2.3.4.1 Phase I-Metabolismus

4.2.3.4.1.1 *N*-Oxidation des Debrisoquins zum *N*-Hydroxydebrisoquin

Die Umsetzung von Debrisoquin zum *N*-Hydroxydebrisoquin wurde in den humanen Hepatozyten nicht detektiert (vgl. 4.2.3.2.1.1). Weder die direkt nach der Gefriertrocknung vermessenen Proben noch diejenigen, denen β -Glucuronidase zugesetzt wurde, enthielten den *N*-oxidierten Metaboliten.

4.2.3.4.1.2 Weitere Oxidationen

In den Debrisoquin-Inkubationen mit humanen Zellen wurde die Bildung eines Metaboliten demonstriert, der die gleiche Retentionszeit und äquivalente Massenfragmente wie der 4-Hydroxydebrisoquin-Standard aufwies (s. 4.2.3.2.1.2). In Analogie zu den Messungen mit porcinen Hepatozyten wurden ein weiterer einfach hydroxylierter Metabolit des Debrisoquins (m/z 192, Retentionszeit $21,1 \pm 0,2$ min) und zwei doppelt hydroxylierte Debrisoquin-Derivate (m/z 208, Retentionszeiten $17,1 \pm 0,2$ min und $21,7 \pm 0,3$ min) nachgewiesen. Der in Schweinehepatozyten gebildete Metabolit mit m/z 192, der unter den chromatographischen Bedingungen nach $23,1 \pm 0,2$ min eluiert wurde, konnte per LC/MS in den humanen Hepatozytenkulturen nicht analysiert werden.

4.2.3.4.2 Phase II-Metabolismus

4.2.3.4.2.1 Glucuronidierung

Hinweise auf eine *N*-Glucuronidierung von Debrisoquin wurden bei der Auswertung der Inkubationsansätze mit humanen Hepatozyten nicht erhalten. Charakteristische Ionen (vgl. 4.2.3.1.2.2) für den potenziellen Metaboliten Debrisoquin-*N*-glucuronid fehlten im Massenspektrum.

Im Ionenchromatogramm traten entsprechend der Schweinehepatozyten-Inkubation drei Signale für glucuronidiertes Hydroxydebrisoquin mit *m/z* 368 bei den Retentionszeiten $7,0 \pm 0,2$ min, $10,5 \pm 0,4$ min und $15,8 \pm 0,4$ min auf. Die Behandlung dieser Proben mit β -Glucuronidase zeigte, dass die drei Metaboliten enzymatisch hydrolysiert wurden (vgl. 4.2.3.1.2.2).

4.2.3.4.2.2 Weitere Reaktionen

Die massenspektrometrische Untersuchung der Debrisoquin-Inkubationen mit humanen Zellkulturen erbrachte keine Hinweise (s. Tab. 4.3) auf Umsetzungen des Debrisoquins zum Debrisoquin-*N*-sulfat bzw. Debrisoquin-*N*-acetat.

4.2.4 Diskussion

Während vorangegangene Studien den metabolischen Zyklus der Modellsubstanzen *N*-Hydroxydebrisoquin und Debrisoquin hauptsächlich mit Mikrosomen, 9000g-Überständen und isolierten Enzymen untersuchten (Clement *et al.* 1993c), konnte in dieser Studie erstmals die dominante *N*-Reduktion des *N*-hydroxylierten Guanidins in einem komplexeren *in vitro*-System nachgewiesen werden. Da die in die andere Richtung ablaufende *N*-Hydroxylierung des Debrisoquins weder direkt noch nach Behandlung mit β -Glucuronidase in den Hepatozytenkulturen der Spezies Schwein und Mensch detektiert werden konnte (Abb. 4.15), wird angenommen, dass die *N*-Reduktion auch *in vivo* die überragende Reaktion ist. Das Fehlen des *N*-Hydroxydebrisoquins könnte mit deutlich höheren Umsetzungsraten der Reduktion gegenüber der Oxidation erklärt werden (Clement *et al.* 1993c).

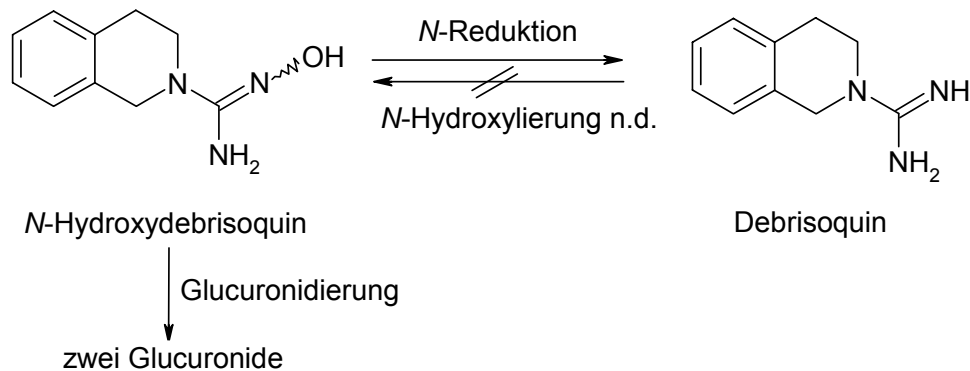


Abbildung 4.15 *N*-Hydroxydebrisoquin-Metabolismus in kultivierten Schweine- und Humanhepatozyten, n.d. = nicht detektierbar

Signale mit m/z 208 im Massenspektrum geben Hinweise entweder auf eine einfache Hydroxylierung des *N*-Hydroxydebrisoquins (m/z 192 + 16) oder auf eine zweifache Hydroxylierung des Debrisoquins (m/z 176 + 2 × 16), wobei die Position der Reaktion im Molekül nicht näher benannt werden kann. Da sowohl in *N*-Hydroxydebrisoquin- als auch in Debrisoquin-Inkubationen jeweils diese zwei 208 Th-Signale detektiert wurden und gleichzeitig eine messbare *N*-Oxidation von Debrisoquin zum *N*-Hydroxydebrisoquin (s. o.) ausgeschlossen werden konnte, wird angenommen, dass die beschriebene Reaktion vom Debrisoquin ausgeht. Das *N*-Hydroxydebrisoquin wird vermutlich zunächst reduziert und das dann entstandene Debrisoquin zweifach hydroxyliert (vgl. Tab. 4.4 und Tab. 4.5).

Mit der hier beschriebenen Methode ließen sich sämtliche Phase II-Metaboliten des *N*-Hydroxydebrisoquins und Debrisoquins sowie einige Phase I-Metaboliten trennen und in einem LC/MS-Lauf untersuchen. Erstmals konnten so zwei Glucuronide des *N*-Hydroxydebrisoquins in humanen und porcinen Hepatozyten detektiert werden (Abb. 4.15). Zusätzlich zu den massenspektrometrischen Untersuchungen (s. 4.2.3.1.2.1 und 4.2.3.3.2.1) konnte die Bildung dieser Metaboliten durch enzymatische Synthese mittels humaner rekombinanter UGT-Isoenzyme (s. 5.3.3) bestätigt werden. Die Synthese des *N*-Hydroxydebrisoquin-*O*-glucuronids analog zu der Literaturvorschrift für die *O*-Glucuronidierung von Benzamidoxim gelang nur in sehr kleinen Ausbeuten. Deshalb wurde nur die geschützte Vorstufe und nicht das durch Natronlauge freigesetzte Glucuronid per ¹H-NMR und ¹³C-NMR charakterisiert. Die Identifizierung des Kopplungsprodukts als ein *O*-Glucuronid erfolgte über das

Fehlen eines Signals für die NOH-Gruppe im $^1\text{H-NMR}$ und die chemische Verschiebung (δ 102,8) des an den Kopplungssauerstoff gebundenen C1-Atoms der Glucuronsäure im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum. In der Literatur sind für O-Glucuronide δ -Werte dieses C-Atoms im $^{13}\text{C-NMR}$ im Bereich von 100 bis 105 ppm zu finden (Clement *et al.* 2001, Schämnn und Schäfer 2003), während über Stickstoff gekoppelte Glucuronate und Glykosylate chemische Verschiebungen von 80 bis 92 ppm aufweisen (Hoos *et al.* 1996, Murphy *et al.* 2003, Schämnn und Schäfer 2003). Außerdem kann das unterschiedliche hydrolytische Verhalten beider Konjugate aus den Inkubationsansätzen nach Zusatz von β -Glucuronidase Hinweise auf die Position der Glucuronidierung geben. Aus *E. coli* gewonnene β -Glucuronidase hydrolysiert bevorzugt O-Glucuronide im Vergleich zu N-Glucuroniden (Zenser *et al.* 1999). Die Arbeitsgruppe um Yuan (2002), die die Verstoffwechslung von Valdecoxib erforschten, unterstrich diese Beobachtung. Da aus dem N-Hydroxydebrisoquinglucuronid mit der Retentionszeit $22,5 \pm 0,3$ min das Aglykon nach β -Glucuronidase-Behandlung freigesetzt werden konnte, handelt es sich demnach hierbei, wie auch anhand der synthetischen Referenz gezeigt, um ein O-Glucuronid. Die enzymatische Hydrolysestabilität des zweiten glucuronidierten Metaboliten (Retentionszeit $18,0 \pm 0,2$ min) spricht für die Bildung eines N-Glucuronids.

In Übereinstimmung mit den Studien der Amidine und Amidoxime in humanen Zellen sowie der Amidinohydrone und dessen N-hydroxylierten Derivaten in porcinen Hepatozyten waren für das untersuchte Guanidin bzw. N-Hydroxyguanidin keine massenspektrometrischen Hinweise auf Sulfatierungen oder Acetylierungen zu detektieren. Eine N-Glucuronidierung der Guanidin-Gruppe lief ebenso wenig ab. Diese Ergebnisse unterstreichen die Beobachtungen von Idle *et al.* (1979), die mittels indirekter Methodik ebenfalls keine Konjugate von Debrisoquin bzw. C-hydroxyliertem Debrisoquin im menschlichen Urin nachweisen konnten.

Einfache Hydroxylierungen des Debrisoquins in den humanen und porcinen Hepatozyten konnten anhand der Ionen mit m/z 192 und den dazugehörigen Clustern belegt werden. Aufgrund des chromatographischen und massenspektrometrischen Verhaltens der Referenzsubstanz in unterschiedlichen Fließmittel-

systemen wurde die Bildung von 4-Hydroxydebrisoquin in beiden Spezies abgeleitet. Während die 4-Hydroxylierung des Debrisoquins eine typische Reaktion des CYP2D6 im Menschen ist (Rendic und Di Carlo 1997), widerspricht das Auffinden dieses Metaboliten im Schwein früheren Studien mit Mikrosomen des Göttinger Minipigs (Skaanild und Friis 1997) und mit gereinigtem CYP2D aus dem Deutschen Hausschwein (Friedrich 2003), die das Fehlen der 4-Hydroxylierung mit Speziesunterschieden begründet haben. Welche weiteren Kohlenstoffatome des Grundgerüsts hydroxyliert wurden, konnte in dieser Studie nicht näher bestimmt werden. Lightfoot *et al.* (2000) zeigten, dass neben dem Hauptprodukt 4-Hydroxydebrisoquin phenolische Hydroxylierungen mit folgender Präferenz an den Positionen $7 > 6 > 8 > 5$ in humanen Lebermikrosomen ablaufen. Im Gegensatz zu den Schweinehepatozyten wurden in den Inkubationen mit humanen Hepatozyten nur insgesamt zwei Hydroxylierungen an verschiedenen Positionen im Molekül detektiert. Diese Beobachtung ist in zweierlei Weise überraschend, zum einen sind für den Menschen bereits Hydroxylierungen an allen C-Atomen des Debrisoquins beschrieben worden (Eiermann *et al.* 1998, Lightfoot *et al.* 2000) und zum anderen wäre bei einem gleichzeitigen Nachweis von zwei verschiedenen doppelt hydroxylierten Debrisoquin-Derivaten (m/z 208) die Detektion von mindestens drei einfachen Hydroxylierungen zu erwarten. Dieser Umstand könnte entweder mit einer unzureichenden enzymatischen Aktivität der humanen Hepatozyten bezüglich dieser Reaktionen oder vor dem Hintergrund des Nachweises drei verschiedener Hydroxydebrisoquinglucuronide (m/z 368, s. u.) mit einer gegenüber der Hydroxylierung schneller ablaufenden Glucuronidierung begründet werden.

Im Gegensatz zu früheren Studien zum Debrisoquin-Metabolismus im Menschen (Idle *et al.* 1979) konnten in dieser Arbeit erstmals drei Glucuronide von C-hydroxyliertem Debrisoquin (m/z 368) eindeutig für die Spezies Schwein und Mensch nachgewiesen werden (Abb. 4.16). Sowohl die enzymatische Hydrolyse dieser Verbindungen mittels β -Glucuronidase als auch die erklärbaren Massenfragmente (s. 4.2.3.2.2.1 und 4.2.3.4.2.1) weisen auf diese Glucuronidierungen hin.

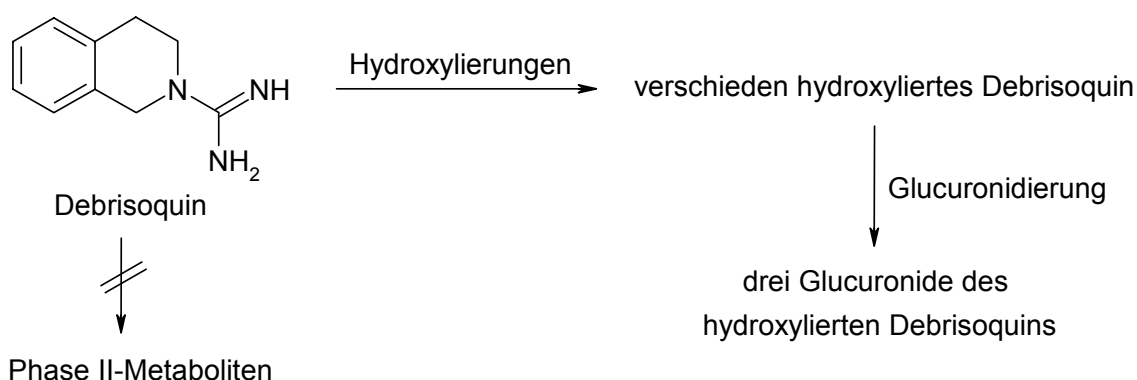


Abbildung 4.16 *Debrisoquin-Metabolismus in kultivierten Schweine- und Humanhepatozyten*

4.2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Sämtliche in dieser Arbeit mit humanen und porcinen Hepatozyten untersuchten Reaktionen sind in Tabelle 4.4 und 4.5 aufgeführt. An dieser Stelle sei noch einmal darauf hingewiesen, dass aufgrund der raschen *N*-Reduktion der *N*-Hydroxyguanidin-Gruppe alle für das Debrisoquin beschriebenen Reaktionen auch in den Inkubationen des *N*-Hydroxydebrisoquins ablaufen.

Tabelle 4.4 *Übersicht über untersuchte Reaktionen des N-Hydroxydebrisoquins in porcinen und humanen Hepatozytenkulturen*

Untersuchte Reaktionen (Anzahl unterschiedlicher Metaboliten)	Porcine Hepatozyten	Humane Hepatozyten
<i>N</i> -Reduktion zum Debrisoquin	+	+
Einfache Hydroxylierungen (2)*	+	+
Zweifache Hydroxylierungen	-	-
O-Glucuronidierung	+	+
<i>N</i> -Glucuronidierung	+	+
O-Sulfatierung	-	-
O-Acetylierung	-	-

* ggf. keine einfachen Hydroxylierungen des *N*-Hydroxydebrisoquins, sondern doppelte Hydroxylierungen des Debrisoquins

Tabelle 4.5 Übersicht über untersuchte Reaktionen des Debrisoquins in porcinen und humanen Hepatozytenkulturen, t_R = Retentionszeit

Untersuchte Reaktionen (Anzahl unterschiedlicher Metaboliten)	Porcine Hepatozyten	Humane Hepatozyten
<i>N</i> -Oxidation zum <i>N</i> -Hydroxydebrisoquin	-	-
Hinweis auf 4-Hydroxylierung	+	+
Einfache Hydroxylierung mit $t_R = 21,1 \pm 0,2$ min	+	+
Einfache Hydroxylierung mit $t_R = 23,1 \pm 0,2$ min	+	-
Zweifache Hydroxylierungen (2)	+	+
Glucuronidierung des hydroxylierten Debrisoquins (3)	+	+
<i>N</i> -Sulfatierung	-	-
<i>N</i> -Acetylierung	-	-

Mit Ausnahme der bereits diskutierten fehlenden C-Hydroxylierung des Debrisoquins sind alle gezeigten Biotransformationsreaktionen der Substrate *N*-Hydroxydebrisoquin und Debrisoquin in Hepatozytenkulturen der Spezies Mensch und Schwein identisch. Nur qualitative Unterschiede in den Umsetzungsraten waren zu detektieren. Während in porcinen Zellen z. B. bevorzugt das vermeintliche O-Glucuronid des *N*-Hydroxydebrisoquins gebildet wurde, setzten humane Enzyme das *N*-Hydroxydebrisoquin in einem größeren Umfang zum vermuteten *N*-Glucuronid um (s. 4.2.3.1.2.1). Zusammenfassend bringt der Vergleich der zwei Spezies in diesen *in vitro*-Studien große Übereinstimmungen bezüglich des Metabolismus von Guanidinen und *N*-Hydroxyguanidinen. Am Beispiel der Debrisoquin-Derivate konnte abermals die Eignung des Einsatzes von porcinen Hepatozyten in der *in vitro*-Testung von Arzneistoffkandidaten als Alternative zu humanen Zellen gezeigt werden. Die Gegenüberstellung der durchgeführten *in vitro*-Studien mit humanen Hepatozytenkulturen und älteren *in vivo*-Untersuchungen am Menschen zeigt in Hinblick auf die Phase I-Reaktionen sowohl Analogien aber auch Unterschiede. Die Glucuronidierung des hydroxylierten Debrisoquins z. B. konnte bis jetzt nur *in vitro* festgestellt werden. Folglich wären vergleichende *in vivo*-Studien, die mit einer der hier beschriebenen entsprechenden analytischen Methode durchzuführen wären, für die Zukunft wünschenswert. Da eine große Übereinstimmung der Spezies Schwein

und Mensch gezeigt worden ist, könnten für diese Studien Blut oder Urin von Schweinen als Untersuchungsmatrix herangezogen werden.

4.3 Biotransformationsstudien von Guanoxabenz und Guanabenz

4.3.1 Einleitung

4.3.1.1 Bisherige Untersuchungen

Guanoxabenz (1-(2,6-Dichlorbenzylidenamino)-3-hydroxyguanidin) und Guanabenz (1-(2,6-Dichlorbenzylidenamino)-guanidin) gehören zu der Klasse der Amidinohydrazone (Guanylhydrazone, Aminoguanidine). Sie sind bekannt für ihre zentrale agonistische Wirkung an α_2 -Adrenozeptoren. Im Unterschied zu Guanoxabenz (ehemals Benzérial[®], Frankreich) wird Guanabenz heute noch als Antihypertensivum unter den Namen Lisapres[®] (Brasilien), Tenelid[®] (Brasilien) und Wytensin[®] (USA) eingesetzt.

Veröffentlichte Studien aus den frühen 80er Jahren befassten sich bevorzugt mit der Biotransformation von Guanabenz in Ratten (Miyamoto *et al.* 1982), Rhesus-Affen (Meacham *et al.* 1981) und im Menschen (Meacham *et al.* 1980). Als inaktiven Hauptmetaboliten konnte im menschlichen Urin das (*E*)-4-Hydroxyguanabenz, ein C-hydroxyliertes Derivat des Substrats, sowohl als Glucuronid als auch ungebunden identifiziert werden (Abb. 4.17). Des Weiteren fanden Meacham *et al.* (1981) das (*Z*)-Guanabenz und dessen *p*-hydroxyliertes Derivat sowie 2,6-Dichlorbenzylalkohol und zu einem geringen Prozentsatz weitere Metaboliten, die nicht näher charakterisiert wurden. Neben der bisher beschriebenen aromatischen Hydroxylierung und anschließenden O-Glucuronidierung traten in einem geringen Umfang auch N-Glucuronide auf (Holmes *et al.* 1983). Sämtliche Glucuronide wurden bisher allerdings nur auf indirektem Weg über die Freisetzung durch β -Glucuronidase bestimmt.

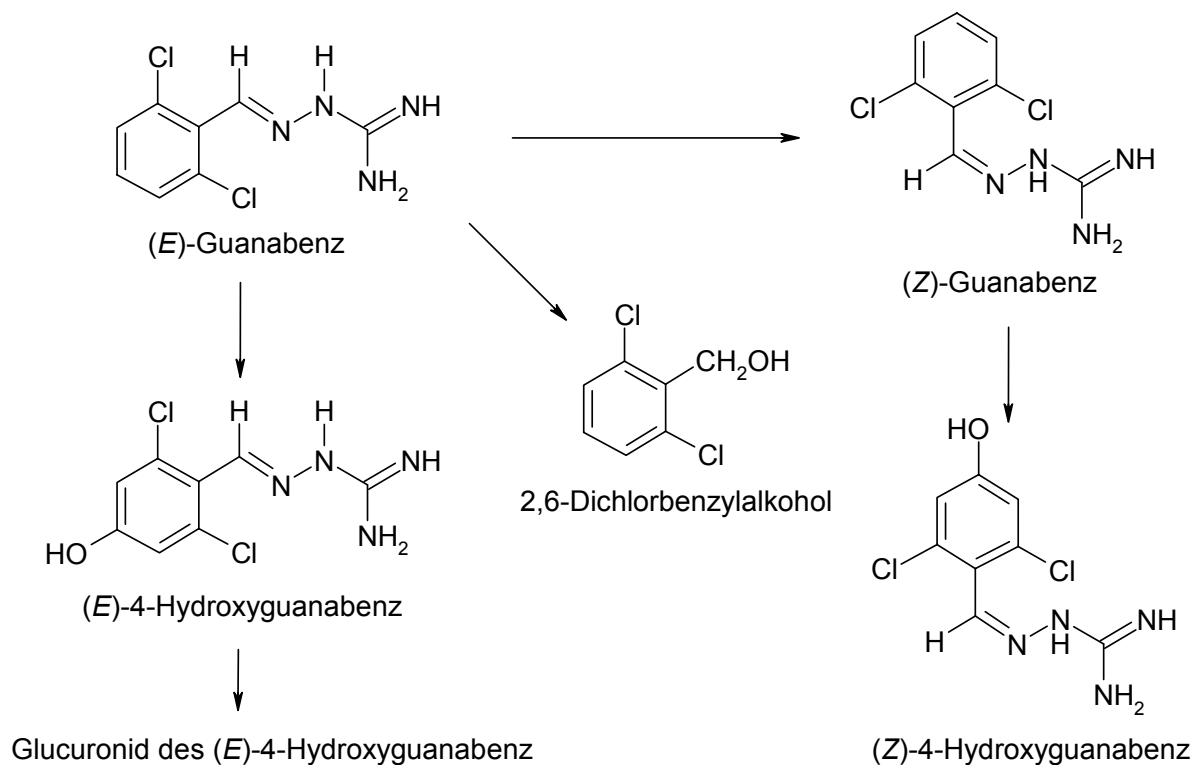


Abbildung 4.17 *In vivo*-Metabolismus von Guanabenz im Menschen (Meacham et al. 1980)

Obwohl Guanoxabenz bis 1992 in Frankreich unter dem Namen Benzérial® als Arzneistoff gegen Bluthochdruck im Handel war, sind Literaturdaten zu dessen Biotransformation bis zu diesem Zeitpunkt nicht publiziert worden. Nachdem die *N*-Hydroxylierung sowie die umgekehrte *N*-Reduktion für das Amidinohydraton G256 bzw. NOH-G256 beobachtet und näher charakterisiert wurden (Clement et al. 1994), folgten Untersuchungen zum metabolischen Zyklus (bioreversible Reaktionen) des Guanoxabenz mit mikrosomalen Fraktionen von Kaninchen, Schwein und Mensch (Clement et al. 1996). Es zeigte sich, dass die *N*-Reduktion wesentlich schneller abläuft als die umgekehrte *N*-Oxidation und somit vermutlich auch *in vivo* die vorherrschende Reaktion ist (Abb. 4.18). Guanoxabenz wurde im rekonstituierten System durch das humane Cytochrom P450-Isoenzym 2A6 (Karhan 2002) bzw. durch ein porcines CYP2D-Enzym (Lomb 1995) im Zusammenspiel mit Cytochrom b₅, der NADH-Cytochrom b₅-Reduktase und NADH *N*-reduziert. Für die *N*-Oxygenierung von Guanabenz zum Guanoxabenz im Menschen ist ausschließlich CYP1A2 verantwortlich (Clement und Demesmaeker 1997a), so dass diese Umsetzung als Markerreaktion für dieses CYP-Isoenzym angesehen werden kann.

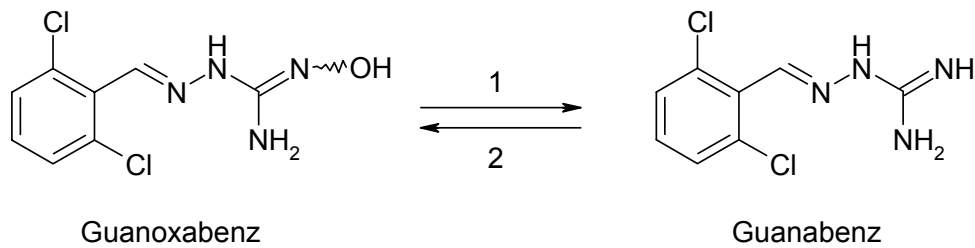


Abbildung 4.18 *Metabolismus von Guanoxabenz und Guanabenz im Schwein und Menschen*

1 *N*-Reduktion durch mikrosomale Präparationen sowie durch Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase, NADH und einem porcinen CYP2D-Enzym bzw. dem humanen CYP2A6 (Lomb 1995, Clement *et al.* 1996, Karhan 2002), 2 *N*-Oxygenierung durch mikrosomale Präparationen (Clement *et al.* 1996) bzw. durch NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, NADPH und dem humanen CYP1A2 (Clement und Demesmaeker 1997a)

Neben Cytochrom b_5 , b_5 -Reduktase und P450 können auch weitere Enzyme diese *N*-Reduktion von Guanoxabenz zum Guanabenz katalysieren. Studien mit Rattenmilz (Uhlen *et al.* 1998, Dambrova *et al.* 1998a) zeigten die Beteiligung von Xanthinoxidase, während Untersuchungen mit Rattenhirn wiederum auf einen dritten Mechanismus hinwiesen, bei dem die DT-Diaphorase eine bedeutende Rolle spielen könnte (Dambrova *et al.* 1998b).

4.3.1.2 Zielsetzung

Vorangegangene *in vivo*-Studien beschäftigten sich ausschließlich mit der Biotransformation von Guanabenz in den Spezies Mensch, Ratte und Rhesusaffen und lieferten nur indirekte Hinweise auf die Bildung von Glucuroniden (Meacham *et al.* 1980, Meacham *et al.* 1981, Miyamoto *et al.* 1982). Daher galt es, den Phase II-Metabolismus in porcinen Hepatozytenkulturen, einem hierfür geeigneten *in vitro*-System (Brandon *et al.* 2003), zu untersuchen. Besondere Beachtung sollte die Glucuronidierung, Sulfatierung und Acetylierung der Amidinohydrazon-Gruppe finden.

Da über Phase II-Reaktionen des Guanoxabenz bisher keine Studien bekannt waren, sollte deshalb im Folgenden dieses Substrat mit Schweinehepatozyten inkubiert und das Metabolitenmuster aufgeklärt werden. Sämtliche Phase II-, aber auch Phase I-Metaboliten sollten mittels LC/MS-Analytik aufgetrennt und charakterisiert werden.

Im Gegensatz zum Guanabenz erwies sich Guanoxabenz im Ames-Test in den Stämmen TA 98 und TA als mutagen (Clement *et al.* 1996). In Hinblick auf die toxikologische Relevanz war es deshalb von großer Bedeutung, die bioreversible *N*-Reduktion und *N*-Oxygenierung in einem *in vitro*-System zu untersuchen, das in einem großen Umfang die *in vivo*-Situation nachahmt. Denn nur so können die bisher mit mikrosomalen und enzymatischen Fraktionen gewonnen Erkenntnisse bezüglich der Detoxifizierung unterstrichen und Vorhersagen dieser Reaktionen im lebenden Organismus ermöglicht werden.

4.3.2 Methoden

Es wurden jeweils die (*E*)-Isomere der Substrate Guanabenz und Guanoxabenz für die Inkubationen und den Stabilitätstest eingesetzt, die im Folgenden nur als Guanabenz bzw. Guanoxabenz bezeichnet wurden.

4.3.2.1 Stabilitätstest von Guanoxabenz und Guanabenz

Das von Shearer und DeAngelis (1979) entwickelte Verfahren zur Bestimmung der Photostabilität wurde leicht modifiziert.

Nach Herstellung von 1%igen Guanoxabenz- bzw. Guanabenz-Lösungen in Ethanol wurden diese Flüssigkeiten in verschlossenen Quarzküvetten fünf Tage lang mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Im Anschluss wurden die Proben mit der unter 4.3.2.4 beschriebenen LC/MS-Methode analysiert. Als Kontrollwert diente frisch in Ethanol gelöstes Guanoxabenz bzw. Guanabenz.

4.3.2.2 Inkubationsbedingungen für porcine Hepatozyten

Die porcinen Hepatozyten wurden entsprechend der Vorschrift (4.1.2.1) mit Substratlösungen, die Guanoxabenz bzw. Guanabenz in einer Konzentration von 200 µM enthielten, inkubiert. Die Lagerung der Proben bis zur Vermessung erfolgte bei -80°C.

4.3.2.3 Inkubationsbedingungen für die Hydrolyse mit β -Glucuronidase

Die Biotransformationsansätze wurden analog zu 4.2.2.2 mit β -Glucuronidase inkubiert. Nach Gefriertrocknung wurden sie bei -80°C gelagert. Die entsprechenden Ansätze ohne β -Glucuronidase wurden jeweils parallel per LC/MS vermessen.

4.3.2.4 LC/MS-Analytik

Die im Folgenden beschriebene LC/MS-Methode zur Bestimmung von Guanoxabenz- und Guanabenz-Metaboliten wurde an die von Clement *et al.* (1996) entwickelte Methode angelehnt.

HPLC-Pumpe	HP 1090 Series II LC Hochdruckgradientenpumpe (Hewlett Packard, Waldbronn)
Injektor	Rheodyne 20 µl-Probenschleife
Detektor	HP 1050 VWD UV/VIS Detektor (Hewlett Packard, Waldbronn)
Massenspektrometer	Esquire LC (Bruker, Bremen)
Interface	ESI, positiver Ionenmodus
Sprühdruck	40 psi
Trockengas	6,0 l/min
Trockentemperatur	360°C
Scanbereich	50 - 800 m/z
Integrator	Data Analysis™, Version 3.0, Bruker Daltonics (Bruker, Bremen)

Stationäre Phase	LiChrospher® RP Select-B, 125 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm, in einer LiChroCART®-Kartusche mit Vorsäule RP Select-B, 4 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm (Merck, Darmstadt)
Mobile Phase	Aqua bidest./Methanol/Eisessig 79,5:20:0,5 (V/V/V) pH 4,0 eingestellt mit konz. Ammoniak
Laufzeit	45 min
Flussrate	1,5 ml/min (HPLC), Split 1:6 (MS)
Detektion	UV, 272 nm
Retentionszeiten	(<i>E</i>)-Guanoxabenz: 23,7 ± 0,5 min (<i>E</i>)-Guanabenz: 34,5 ± 0,9 min

Der verwendete Eluent wurde nach der Herstellung durch einen Sartorius-Membranfilter (Porendurchmesser 0,45 µm) filtriert und im Ultraschallbad 15 min entgast. Die zwei Standardverbindungen wurden jeweils parallel zu den Proben vermessen.

4.3.3 Ergebnisse

4.3.3.1 Stabilität von Guanoxabenz und Guanabenz

Das in der Kontrolllösung enthaltene Guanoxabenz zeigte bei einer Retentionszeit von 23,7 ± 0,5 min folgendes charakteristisches Ionenmuster: 247 Th [M+H, mit ³⁵Cl]⁺, 249 Th [M+H, mit ³⁷Cl]⁺, 269 Th [M+Na]⁺ und 214 Th [M+H-NH₂OH]⁺. Typische Fragmente des Guanabenz, das bei 34,5 ± 0,9 min eluiert wurde, waren die Ionen mit den m/z 231 [M+H, mit ³⁵Cl]⁺, m/z 233 [M+H, mit ³⁷Cl]⁺, m/z 253 [M+Na]⁺ und m/z 214 [M+H-NH₂]⁺.

Nach UV-Bestrahlung der Guanabenz-Probe wurde im HPLC-Chromatogramm zusätzlich zur Ausgangssubstanz eine weitere Hauptverbindung detektiert. Die Konzentration des Standards hatte sich halbiert, während sich die zweite Substanz in gleichem Maße gebildet hatte. Diese neue Verbindung wurde bei 15,3 ± 0,5 min eluiert und wies die in Tabelle 4.6 aufgelisteten Fragmentationen auf, die mit denen der Ausgangssubstanz zum großen Teil übereinstimmten. Da der Stabilitätstest analog

zu der literaturbekannten Vorschrift durchgeführt wurde, handelt es sich bei dieser zweiten neu gebildeten Substanz um das (Z)-Isomer des Guanabenz.

In der bestrahlten Guanoxabenz-Probe traten ebenfalls zwei Verbindungen auf, die große Intensitäten für die Ionen mit m/z 247 und m/z 249 aufwiesen. Außerdem waren weitere Massenzahlen der zwei Verbindungen identisch (Tab. 4.6), was auch hier auf eine Isomerisierung des Standards zur (Z)-Form hinweist. Das Photodegradationsprodukt wurde nach $10,0 \pm 0,3$ min eluiert.

Tabelle 4.6 Massensignale der Photodegradationsprodukte von Guanoxabenz (Retentionszeit $10,0 \pm 0,3$ min) und von Guanabenz (Retentionszeit $15,3 \pm 0,5$ min), s = starkes Signal

Substanz	Massenzahl	Fragmentionen
Photodegradationsprodukt von Guanoxabenz	247 s	[M+H, mit ^{35}Cl] ⁺
	249 s	[M+H, mit ^{37}Cl] ⁺
	269	[M+Na] ⁺
	214	[M+H-NH ₂ OH] ⁺
	172	[M+H-HNH ₂ CNH ₂ NOH] ⁺
Photodegradationsprodukt von Guanabenz	231 s	[M+H, mit ^{35}Cl] ⁺
	233 s	[M+H, mit ^{37}Cl] ⁺
	253	[M+Na] ⁺
	214	[M+H-NH ₂] ⁺
	172	[M+H-HNH ₂ CNH ₂ NH] ⁺

4.3.3.2 Metabolismus von Guanoxabenz in Schweinehepatozyten

4.3.3.2.1 Phase I-Metabolismus

4.3.3.2.1.1 Reduktionen

Guanoxabenz wurde in Schweinehepatozytenkulturen rasch zu Guanabenz *N*-reduziert. Der *N*-reduzierte Metabolit wurde bei einer Retentionszeit von $34,5 \pm 0,9$ min eluiert. Durch LC/MS-Kopplung wurden Massenspektren von Metabolit und synthetischem Standard gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass die Retentionszeiten und die Massenspektren des in den Inkubationen gebildeten Guanabenz mit denen des Standards übereinstimmten (Abb. 4.19).

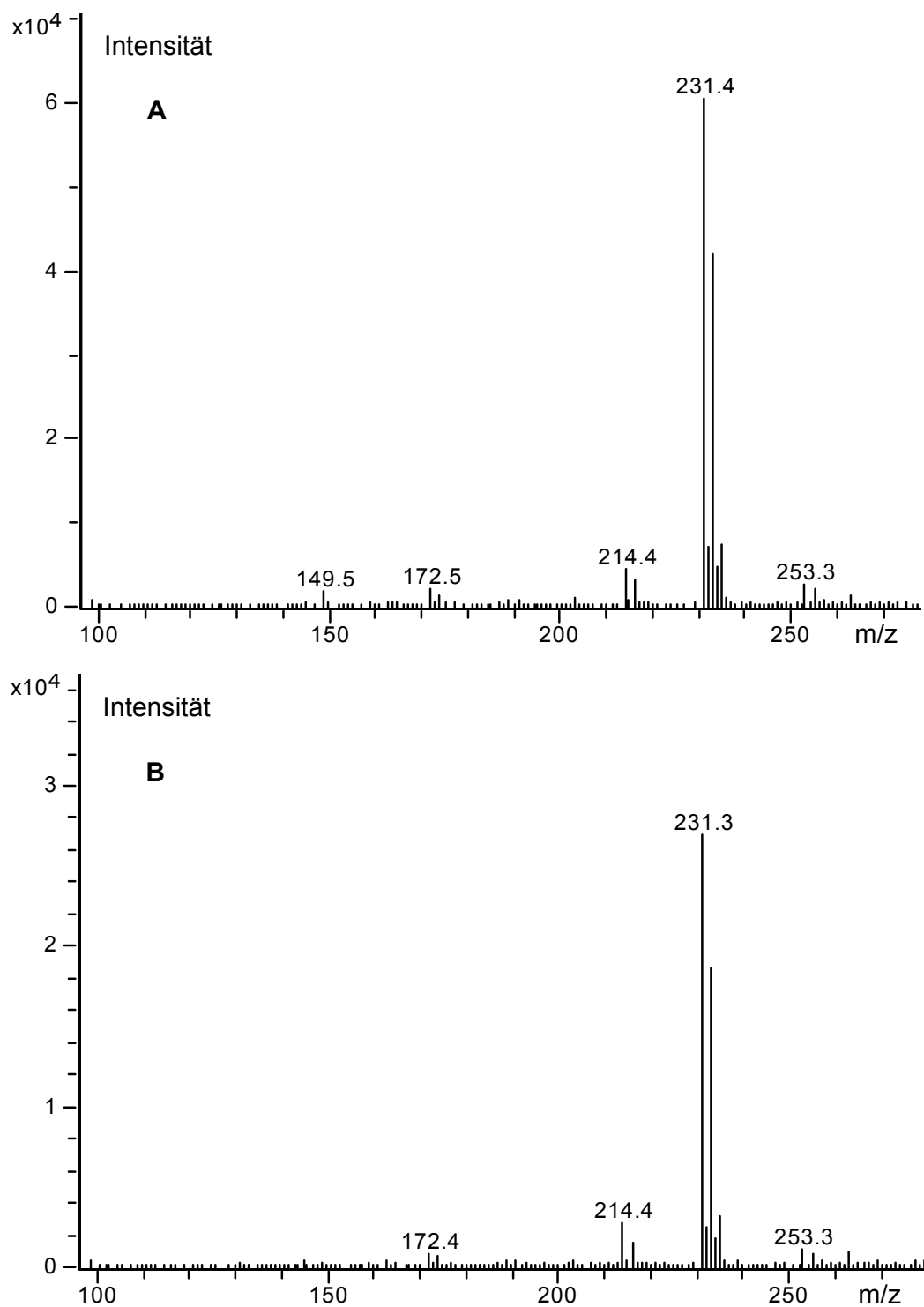


Abbildung 4.19 *Repräsentative Massenspektren von Guanabenz mit der Retentionszeit $34,5 \pm 0,9$ min: (A) N-Reduktion von Guanoxabenz in einer Inkubation mit kultivierten Schweinehepatozyten, (B) Standardverbindung*

4.3.3.2.1.2 Oxidationen

Ein einfach hydroxyliertes Guanoxabenz würde im Ionenchromatogramm als Signal mit m/z 263 $[M+H, \text{ mit } ^{35}\text{Cl}]^+$, m/z 265 $[M+H, \text{ mit } ^{37}\text{Cl}]^+$ und m/z 285 $[M+\text{Na}]^+$ erscheinen. Die Ionen bei 279 Th $[M+H, \text{ mit } ^{35}\text{Cl}]^+$, 281 Th $[M+H, \text{ mit } ^{37}\text{Cl}]^+$ und 301 Th $[M+\text{Na}]^+$ wären für ein doppelt hydroxyliertes Guanoxabenz zu erwarten. Guanoxabenz-Inkubationen, die durch LC/MS mittels ESI analysiert wurden, erbrachten keine der genannten typischen Massensignale.

4.3.3.2.2 Isomerisierungen

Neben dem unter 4.3.3.2.1 beschriebenen *N*-reduzierten Metaboliten Guanabenz wurde ein weiteres Biotransformationsprodukt mit ähnlicher Fragmentierung und ähnlichen Hauptfragmenten detektiert. Dieser Metabolit wird wie das Photodegradationsprodukt von Guanabenz (s. 4.3.3.1) bei $15,3 \pm 0,5$ min eluiert. Das Massenspektrum dieses Metaboliten ist in Abbildung 4.20 dargestellt. Die Ionen mit den m/z 231, 233, 214 und 172 stimmen mit denen des Photodegradationsprodukts von Guanabenz überein.

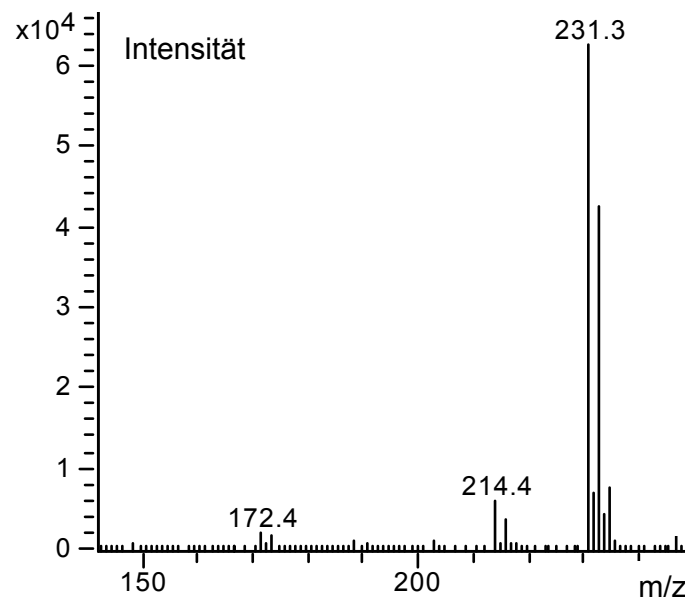


Abbildung 4.20 Repräsentatives Massenspektrum eines Metaboliten mit der Retentionszeit $15,3 \pm 0,5$ min aus einer Guanoxabenz-Inkubation mit kultivierten Schweinehepatozyten

In Abbildung 4.21 sind Ionenchromatogramme der Summe der Ionen 247+249 einer Guanoxabenz-Inkubation mit Schweinehepatozyten (A) und des Photodegradationsproduktes von Guanoxabenz (B) dargestellt. Man sieht, dass die Retentionszeiten der zwei Verbindungen ($10,0 \pm 0,3$ min) übereinstimmen. Außerdem stehen die Ionen im Massenspektrum im gleichen Verhältnis zueinander.

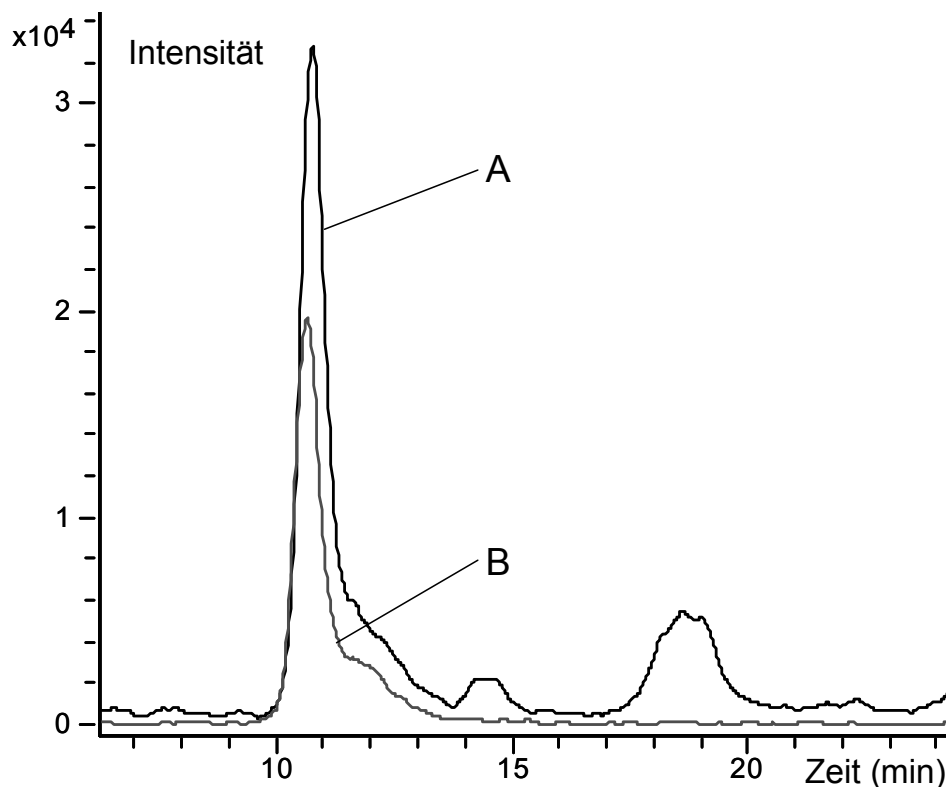


Abbildung 4.21 *Repräsentative Ionenchromatogramme der Summe der Ionen 247+249: (A) Guanoxabenz-Inkubation mit kultivierten Schweinehepatozyten, (B) Photodegradationsprodukt von Guanoxabenz*

4.3.3.2.3 Phase II-Metabolismus

4.3.3.2.3.1 Glucuronidierung

Während frühere Arbeiten nur Phase I-Reaktionen des Guanoxabenz thematisierten, sollte nun anhand von massenspektrometrischen Untersuchungen die Glucuronidierung näher betrachtet werden. Obwohl keine synthetischen Standards zur Verfügung standen, ergab die Suche nach denkbaren Signalen von Guanoxabenzglucuroniden in den Inkubationsansätzen Hinweise auf die Bildung von

fünf verschiedenen glucuronierten Guanoxabenz-Metaboliten. Das Quasimolekülion mit 423 Th $[M+H, \text{ mit } ^{35}\text{Cl}]^+$ und das entsprechende Signal mit 425 Th $[M+H, \text{ mit } ^{37}\text{Cl}]^+$ waren jeweils die vorherrschenden Kationen. Es folgten Signale für Cluster mit Natrium- und Kaliumionen mit m/z 445 $[M+\text{Na}]^+$ und m/z 461 $[M+\text{K}]^+$ sowie mit m/z 247 für das Guanoxabenz-Kation. Diese fünf Metaboliten wurden nach $2,2 \pm 0,2$ min, $4,7 \pm 0,2$ min, $7,4 \pm 0,3$ min, $13,2 \pm 0,3$ min und nach $16,8 \pm 0,5$ min eluiert. Im gleichen Zeitraum traten keine entsprechenden Signale in den Leerwerten ohne Hepatozyten bzw. in den Leerwerten mit Zellen ohne Substrat auf. In Abbildung 4.22 ist ein repräsentatives Ionenchromatogramm der Summe der Ionen 423+425 von einer Guanoxabenz-Inkubation mit Schweinehepatozytenkulturen dem Ionenchromatogramm des Leerwertes ohne Hepatozyten gegenübergestellt.

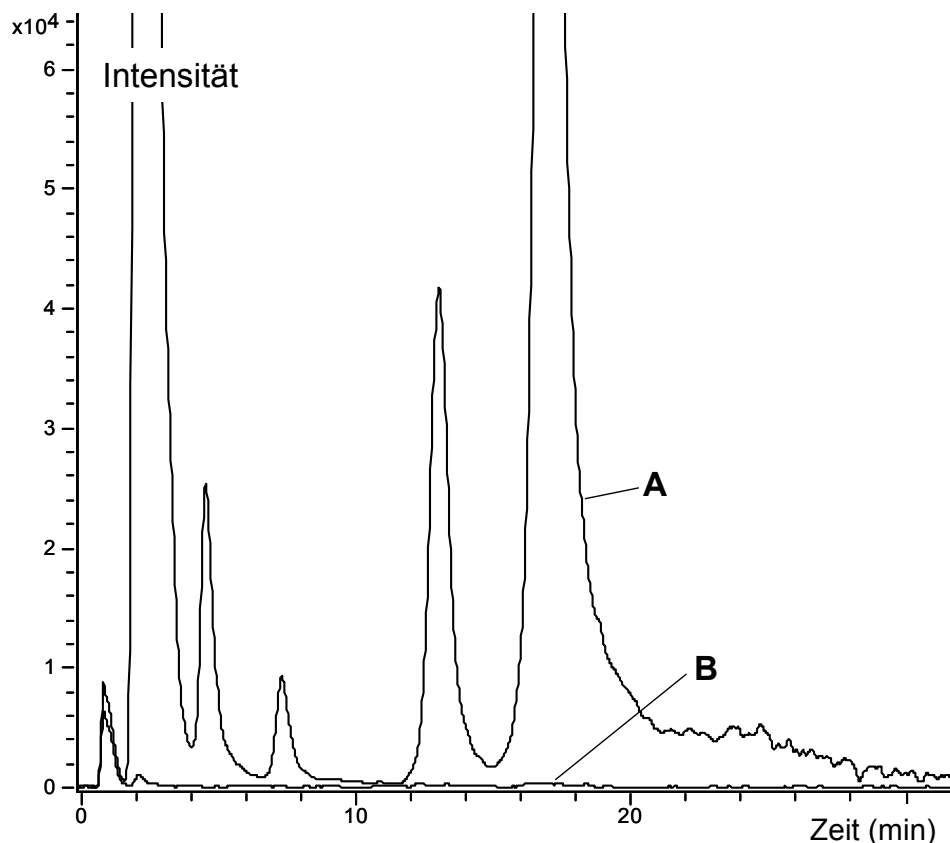


Abbildung 4.22 *Repräsentative Ionenchromatogramme der Summe der Ionen 423+425: (A) Guanoxabenz-Inkubation mit kultivierten Schweinehepatozyten, (B) Leerwert ohne Hepatozyten*

Der Zusatz von β -Glucuronidase bewirkte einen unterschiedlich stark ausgeprägten hydrolytischen Abbau der fünf potenziellen Guanoxabenzglucuronide (Abb. 4.23), der nicht in den Parallelansätzen ohne Enzym zu verzeichnen war.

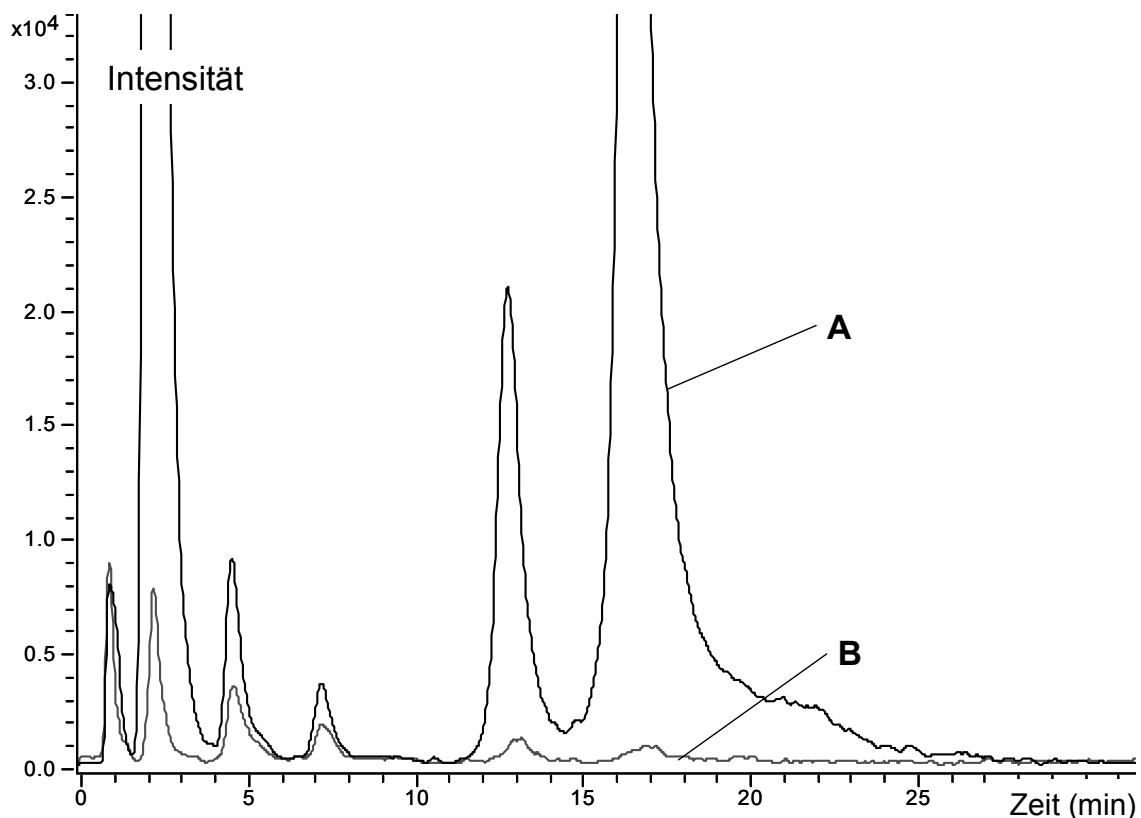


Abbildung 4.23 *Repräsentative Ionenchromatogramme der Summe der Ionen 423+425: (A) Guanoxabenz-Inkubation mit kultivierten Schweinehepatozyten, (B) Guanoxabenz-Inkubation mit kultivierten Schweinehepatozyten nach β -Glucuronidase-Behandlung*

4.3.3.2.3.2 Weitere Reaktionen

Es standen ebenso wie für den Nachweis der Glucuronidierung von Guanoxabenz auch für die Untersuchung weiterer Phase II-Metaboliten keine Referenzsubstanzen zur Verfügung. Die Suche nach möglichem Guanoxabenz-O-sulfat oder Guanoxabenz-O-acetat verlief ergebnislos. Es wurden keine Produkte detektiert, die charakteristische Ionen (Tab. 4.7) dieser potenziellen Phase II-Metaboliten aufwiesen.

Tabelle 4.7 Erwartete, aber nicht beobachtete Massensignale für die potenziellen Phase II-Metaboliten Guanoxabenz-O-sulfat und Guanoxabenz-O-acetat

Substanz	Massenzahl	Fragmentionen
Guanoxabenz-O-sulfat	327	[M+H, mit ³⁵ Cl] ⁺
	329	[M+H, mit ³⁷ Cl] ⁺
	349	[M+Na] ⁺
	365	[M+K] ⁺
	247	[M+H-SO ₃] ⁺
Guanoxabenz-O-acetat	290	[M+H, mit ³⁵ Cl] ⁺
	292	[M+H, mit ³⁷ Cl] ⁺
	312	[M+Na] ⁺
	328	[M+K] ⁺
	247	[M+H-CH ₃ CO] ⁺

4.3.3.3 Metabolismus von Guanabenz in Schweinehepatozyten

Die Bildung sämtlicher Guanabenz-Metaboliten war auch in den Guanoxabenz-Inkubationen nachzuweisen. Sie wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit aber nur in diesem Kapitel aufgeführt.

4.3.3.3.1 Phase I-Metabolismus

4.3.3.3.1.1 N-Oxidation vom Guanabenz zum Guanoxabenz

Zur Untersuchung der N-Oxidation von Guanabenz zum Guanoxabenz wurden zunächst gefriergetrocknete Proben direkt per LC/MS vermessen, aber weder das HPLC-Chromatogramm noch das Ionenchromatogramm lieferte bei der Retentionszeit von Guanoxabenz entsprechende Signale (s. 4.3.3.2.1.1) in den Guanabenz-Inkubationen. Es sollte im Weiteren überprüft werden, ob das N-hydroxylierte Guanabenz (Guanoxabenz) gegebenenfalls an Glucuronsäure konjugiert vorliegt. Nach Zusatz von β -Glucuronidase bildete sich kein Metabolit, der bezüglich Retentionszeit und Fragmentierung dem Guanoxabenz entsprach. Die Abbildung 4.24 zeigt die Ionenchromatogramme der Summe der Ionen 247+249 einer Schweinehepatozyten-Inkubation nach β -Glucuronidase-Zusatz im Vergleich zum entsprechenden Ionenchromatogramm des Guanoxabenz-Standards.

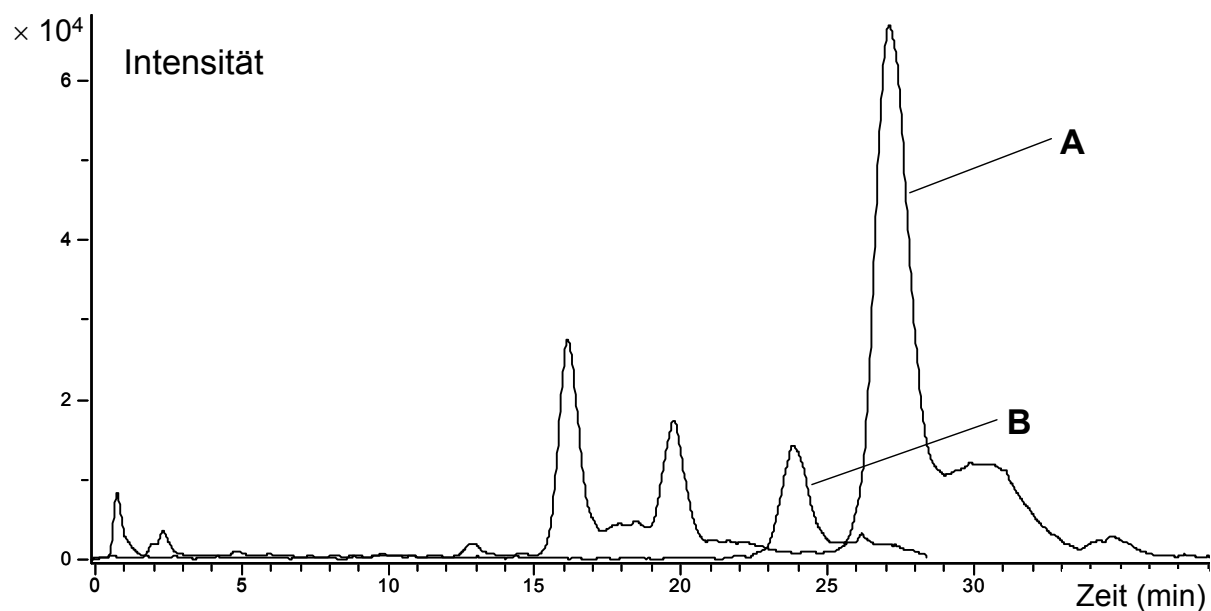


Abbildung 4.24 Repräsentative Ionenchromatogramme der Summe der Ionen 247+249: (A) Guanabenz-Inkubation mit kultivierten Schweinehepatozyten nach β -Glucuronidase-Zusatz, (B) Standard Guanoxabenz

4.3.3.3.1.2 Weitere Reaktionen

Im Ionenchromatogramm (Abb. 4.24), das eine Guanabenz-Inkubation mit Schweinehepatozytenkulturen zeigt, sind Metaboliten mit m/z 247 und 249 bei den Retentionszeiten $16,2 \pm 0,5$ min, $19,2 \pm 0,4$ min und $27,3 \pm 0,6$ min zu erkennen. Der Zuwachs der Masse des Guanabenz um 16 Einheiten entspricht möglicherweise einer einfachen Hydroxylierung. In denselben Inkubationen konnten aber keine Ionen mit 263 Th bzw. 265 Th nachgewiesen werden, die einen Hinweis auf eine doppelte Hydroxylierung geben würden.

4.3.3.3.2 Isomerisierungen

Bei den massenspektrometrischen Untersuchungen wurde ein Metabolit detektiert, der eine dem Photodegradationsprodukt von Guanabenz entsprechende Fragmentierung (s. 4.3.3.1) zeigt und ebenfalls bei $15,3 \pm 0,5$ min von der Säule eluiert wird. Die Ionen mit der m/z 231, 233, 214 und 172 stimmen mit denen des Photostabilitätstestprodukts überein.

4.3.3.3.3 Phase II-Metabolismus

4.3.3.3.3.1 Glucuronidierung

Aufgrund des Fehlens eines synthetischen Standards für das Guanabenz-*N*-glucuronid wurde in den Ansätzen nach folgenden denkbaren Ionen für diesen Metaboliten gesucht: m/z 407 $[M+H, \text{ mit } ^{35}\text{Cl}]^+$, m/z 409 $[M+H, \text{ mit } ^{37}\text{Cl}]^+$, m/z 429 $[M+\text{Na}]^+$, m/z 451 $[M-H+2\text{Na}]^+$ und m/z 231 $[\text{Guanabenz}+\text{H}]^+$. Ein Metabolit mit dem in Abb. 4.25 dargestellten Massenspektrum wurde gefunden. Die Retentionszeit betrug $4,6 \pm 0,2$ min. Diese beschriebene Verbindung konnte nicht durch β -Glucuronidase hydrolysiert werden.

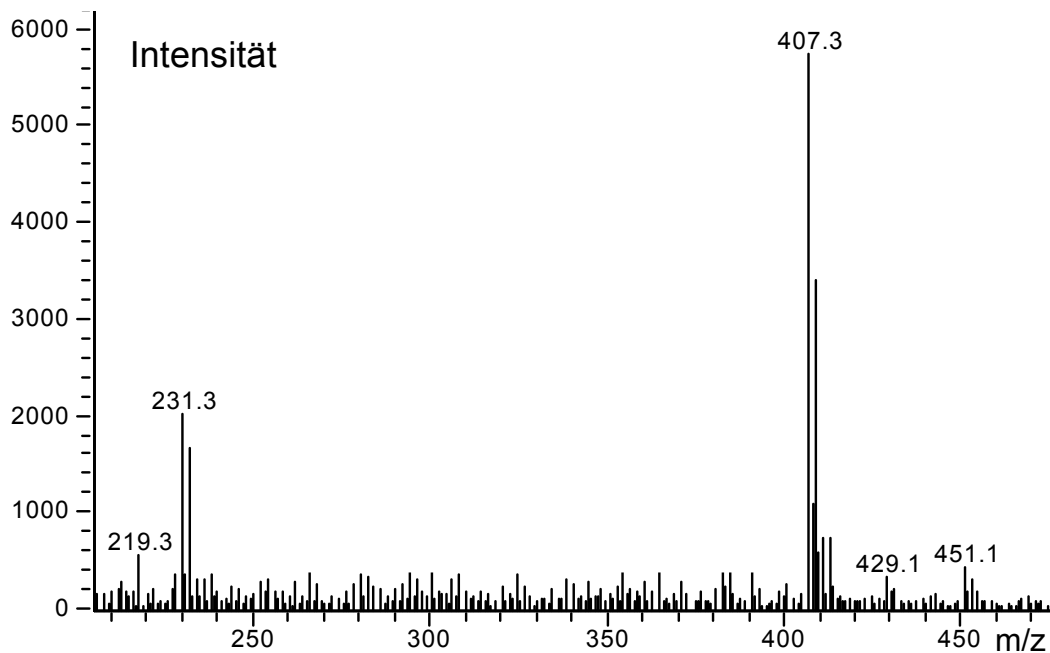


Abbildung 4.25 *Repräsentatives Massenspektrum eines Metaboliten mit der Retentionszeit $4,6 \pm 0,2$ min aus einer Guanabenz-Inkubation mit kultivierten Schweinehepatozyten*

Die Ionen 423 Th ($[M+H, \text{ mit } ^{35}\text{Cl}]^+$) und 425 Th ($[M+H, \text{ mit } ^{35}\text{Cl}]^+$), die auf Glucuronidierung von hydroxyliertem Guanabenz hindeuten, konnten in den Inkubationsansätzen mit Guanabenz nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein Signal mit der Retentionszeit $2,2 \pm 0,1$ min, das nach β -Glucuronidase-Behandlung verschwand (Abb. 4.26).

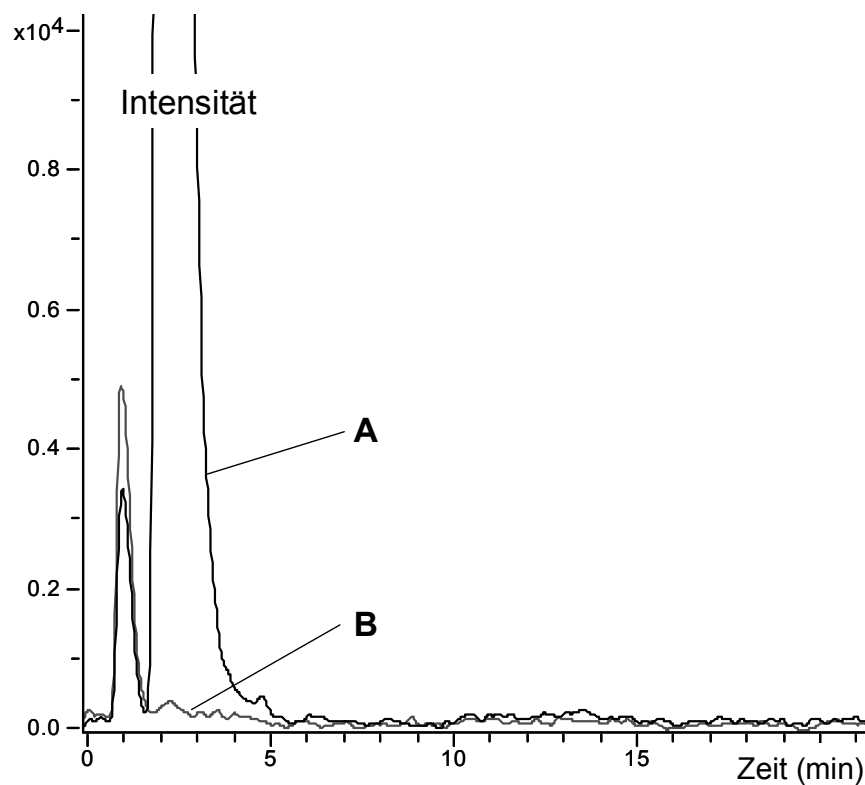


Abbildung 4.26 *Repräsentative Ionenchromatogramme der Summe der Ionen 423+425: (A) Guanabenz-Inkubation mit kultivierten Schweinehepatozyten, (B) Guanabenz-Inkubation mit kultivierten Schweinehepatozyten nach β -Glucuronidase-Behandlung*

4.3.3.3.2 Weitere Reaktionen

In Inkubationen mit porcinen Zellkulturen gab es keine Hinweise auf die Bildung von Guanabenz-*N*-sulfat und Guanabenz-*N*-acetat. In keiner Probe konnten mittels ESI charakteristische Ionen (Tab. 4.8) dieser potenziellen Phase II-Metaboliten nachgewiesen werden.

Tabelle 4.8 Erwartete, aber nicht beobachtete Massensignale für die potenziellen Phase II-Metaboliten Guanabenz-N-sulfat und Guanabenz-N-acetat

Substanz	Massenzahl	Fragmentionen
Guanabenz- <i>N</i> -sulfat	311	[M+H, mit ³⁵ Cl] ⁺
	313	[M+H, mit ³⁷ Cl] ⁺
	333	[M+Na] ⁺
	349	[M+K] ⁺
	231	[M+H-SO ₃] ⁺
Guanabenz- <i>N</i> -acetat	273	[M+H, mit ³⁵ Cl] ⁺
	275	[M+H, mit ³⁷ Cl] ⁺
	295	[M+Na] ⁺
	311	[M+K] ⁺
	231	[M+H-CH ₃ CO] ⁺

4.3.4 Diskussion

Anhand der Vorschrift von Shearer und DeAngelis (1979) konnte das (*E*)-Guanabenz unter Bestrahlung mit UV-Licht zur (*Z*)-Form isomerisiert werden. In Übereinstimmung mit den Literaturergebnissen zeigte sich, dass unter den Testbedingungen die Ausgangsverbindung bis zur Gleichgewichtseinstellung umgewandelt wurde. Analog zu der beschriebenen Vorgehensweise wurde für das (*E*)-Guanoxabenz verfahren. Da auch hierbei erwartungsgemäß ein Photodegradationsprodukt entstand, das entsprechende Massenfragmente wie das eingesetzte (*E*)-Isomer aufwies, wird ebenfalls eine Isomerisierung von Guanoxabenz angenommen (Abb. 4.27).

Identisches chromatographisches und massenspektrometrisches Verhalten konnte einerseits für Verbindungen in den Inkubationsansätzen und andererseits für die Photodegradationsprodukte des Guanoxabenz bzw. Guanabenz detektiert werden, so dass unter den Kulturbedingungen für die Hepatozyten vermutlich dieselbe Umwandlung zur (*Z*)-Form abläuft. Die Isomerisierung von Guanabenz hatten bereits Meacham *et al.* (1980) und Miyamoto *et al.* (1982) in *in vivo*-Untersuchungen in Menschen und Ratten gezeigt.

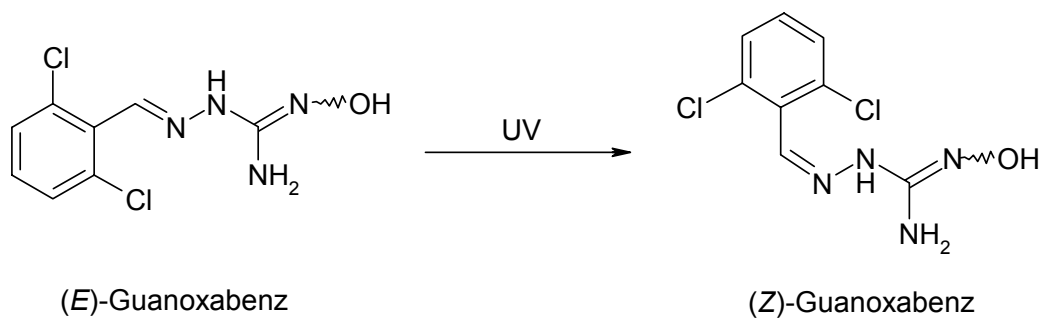


Abbildung 4.27 **Isomerisierung von Guanoxabenz unter UV-Bestrahlung**

Die bereits in früheren Studien zum metabolischen Zyklus beobachtete dominante *N*-Reduktion des *N*-Hydroxyamidinohydrazons (Clement *et al.* 1996) konnte nun erstmals in einer Hepatozytenkultur nachgewiesen werden. Im Unterschied zu den Untersuchungen mit porcinen mikrosomalen Präparationen gab es in dieser Arbeit keine Hinweise auf die entgegengesetzte *N*-Oxidation von Guanabenz (Abb. 4.28). Es konnten weder die Isomere des Guanoxabenz noch die dazugehörigen an Glucuronsäure gekoppelten Derivate detektiert werden, so dass die *N*-Reduktion in diesem Zellsystem somit die vorherrschende Reaktion darstellt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit älteren Studien am Menschen, bei denen nach Verabreichung von Guanabenz kein *N*-Oxidationsprodukt im Urin bestimmt wurde (Meacham *et al.* 1980). Deutlich höhere Umsetzungsraten der Reduktion im Vergleich zur Oxidation können das Fehlen des potenziellen Metaboliten Guanoxabenz erklären. Eventuell zwischenzeitlich gebildetes *N*-hydroxyliertes Guanabenz kann aufgrund der großen Reaktionsgeschwindigkeit nicht beobachtet werden.

Clement *et al.* (1996) fanden heraus, dass Guanoxabenz im Gegensatz zu Guanabenz im Ames-Test mutagene Eigenschaften aufweist. Die Dominanz der *N*-Reduktion spielt folglich in Hinblick auf die Toxizität eine wichtige Rolle. Eine rasche Umwandlung von hydroxylierten zum nicht-hydroxylierten Amidinohydrazon kann somit als detoxifizierender Prozess in diesem *in vitro*-System, das zur Simulation der *in vivo*-Bedingungen geeignet ist, angesehen werden.

Literaturbekannte Affinitätsstudien an α_2 -Adrenozeptoren aus der Ratte zeigen 100fach größere Wechselwirkungen des Guanabenz im Vergleich zum Guanoxabenz (Uhlen *et al.* 1998). Folglich stellt die in Hepatozyten rasch ablaufende *N*-Reduktion neben der Detoxifizierung eine Bioaktivierung des Prodrugs Guanoxabenz dar.

Unterschiede sind in Bezug auf weitere Phase I-Reaktionen in Guanoxabenz- und Guanabenz-Inkubationen zu verzeichnen. Guanoxabenz wurde nicht hydroxyliert, wohingegen das Ionenchromatogramm (s. 4.3.3.3.1.2) deutlich auf die Bildung von drei verschiedenen hydroxylierten Guanabenz-Metaboliten (m/z 247 bzw. 249) hinweist. Diese Beobachtung stimmt mit Studien in den Spezies Ratte und Mensch überein, in denen die Verbindungen (*E*)-4-Hydroxyguanabenz, (*Z*)-4-Hydroxyguanabenz und (*E*)-3-Hydroxyguanabenz als Biotransformationsprodukte von Guanabenz identifiziert wurden (Meacham *et al.* 1980, Miyamoto *et al.* 1982).

Erstmals gelang der Nachweis von fünf in Schweinehepatozyten gebildeten Guanoxabenzglucuroniden, die innerhalb eines HPLC-Chromatogramms voneinander getrennt werden konnten (Abb. 4.28). Im Massenspektrometer zeigten alle Verbindungen Fragmentierungsmuster, die über Clusterbildung mit Alkali-Ionen oder Abspaltung stabiler Moleküle erklärbar waren (s. 4.3.3.2.3.1). Die Bildung der fünf Glucuronide konnte sowohl über die durch β -Glucuronidase vermittelte Hydrolyse als auch über enzymatische Synthese mittels rekombinanter UDP-Glucuronyltransferasen (vgl. 5.3.4) bestätigt werden. Anhand der Massenspektren ließ sich die Position im Molekül, an der die Glucuronidierung stattfand, nicht näher charakterisieren. Neben Konjugationen am Sauerstoff der zwei Guanoxabenz-Isomere sind Reaktionen an unterschiedlichen Stickstoffen denkbar.

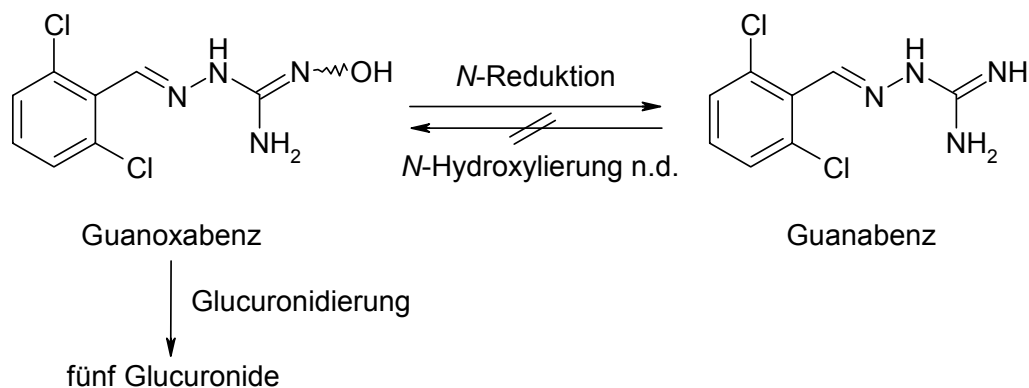


Abbildung 4.28 Guanoxabenz-Metabolismus in Schweinehepatozytenkulturen, n.d. = nicht detektierbar

Die unter 4.3.3.3.1 beschriebenen Ergebnisse demonstrieren, dass in Inkubationen mit Schweinehepatozytenkulturen ausgehend vom Guanabenz zwei Glucuronide gebildet werden. Bei dem einen Konjugat handelt es sich um ein *N*-Glucuronid von Guanabenz, worauf die Ionen mit der *m/z* 407 und die UGT-katalysierte Synthese (vgl. 5.3.5) hinweisen. β -Glucuronidase hydrolysierte dieses Reaktionsprodukt allerdings nicht. Identische Beobachtungen wurden aber auch für Studien mit dem Cyclooxygenase-Hemmer Valdecoxib beschrieben. Während sich die *N*-Glucuronide nicht hydrolysieren ließen, wurden aus den *O*-Glucuroniden nach β -Glucuronidase-Behandlung die entsprechenden Aglykone freigesetzt (Yuan *et al.* 2002).

Das zweite in den Guanabenz-Inkubationen auftretende Glucuronid stammt aufgrund der Massenzahl 423 von einem *C*- oder *N*-hydroxylierten Guanabenz, wobei generell eine Kopplung der Glucuronsäure an ein Stickstoff- oder Sauerstoffatom möglich wäre. Da Hydrolyseversuche mit β -Glucuronidase zwar einen guten Abbau des Konjugats, der für eine *O*-Glucuronidierung spricht (Zenser *et al.* 1999), aber kein Auftauchen von *N*-hydroxyliertem Guanabenz (Guanoxabenz) im Ionenchromatogramm bewirkten, handelt es sich vermutlich um ein *O*-Glucuronid eines *C*-hydroxylierten Guanabenz, das bereits Holmes *et al.* (1983) als häufig auftretenden Metaboliten beschrieben. Die Untersuchung von Pferdeurin auf Phase II-Metabolite des Guanabenz führte ebenfalls zum Nachweis eines Glucuronides von hydroxyliertem Guanabenz (Harkins *et al.* 2003). Aufgrund der gleichen Massen von *C*- und *N*-hydroxyliertem Guanabenz wurde in dieser Studie unter anderem die Bildung von Guanoxabenz-*O*-glucuronid diskutiert. Diese Hypothese konnte für Guanabenz-Inkubationen in Schweinehepatozytenkulturen widerlegt werden.

Weitere Phase II-Reaktionen wie Sulfatierungen und Acetylierungen konnten in diesem porcinen Zellsystem nicht für die Substrate Guanoxabenz und Guanabenz nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den unter 4.2.3.1 und 4.2.3.2 gezeigten Fakten für die stickstoffhaltigen Modellsubstanzen Debrisoquin und *N*-Hydroxydebrisoquin.

4.3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Diese *in vitro*-Studie befasste sich mit dem Phase I- und II-Metabolismus der Amidinohydrazone Guanabenz und Guanoxabenz in porcinen Hepatozytenkulturen. Sämtliche Metaboliten der zwei Substrate konnten in einem HPLC-Lauf aufgetrennt und mittels der Massenspektrometrie näher bestimmt werden.

Erstmalig konnte in einem den *in vivo*-Bedingungen nahen *in vitro*-System die Dominanz der *N*-Reduktion des Guanoxabenz zum Guanabenz nachgewiesen werden und somit sowohl Untersuchungsergebnisse mit Zellfragmenten (Clement *et al.* 1996) als auch solche aus klinischen Studien, die keine Hinweise auf die umgekehrte *N*-Hydroxylierung erbrachten, unterstreichen (Meacham *et al.* 1980). Auffällig war auch die ausgeprägte Bildung von fünf verschiedenen Guanoxabenzglucuroniden, die zum ersten Mal demonstriert werden konnte. Diese Reaktionen liefen im Vergleich zur *O*-Glucuronidierung von Benzamidoxim mit einer deutlich größeren Geschwindigkeit ab. Da neben den in erster Linie interessanten Reaktionen der Amidinohydrason-Gruppe auch weitere Umsetzungen beobachtet werden konnten, geben die Tabellen 4.9 und 4.10 jeweils einen Überblick über sämtliche in den Inkubationsansätzen betrachteten Reaktionen.

Tabelle 4.9 Übersicht über untersuchte Reaktionen des Guanoxabenz in Schweinehepatozytenkulturen

Nachgewiesene Reaktionen	Nicht detektierbare Reaktionen
Reduktion zum Guanabenz	Aromatische Hydroxylierungen
Fünf Guanoxabenzglucuronidierungen	Sulfatierung
	Acetylierung

Tabelle 4.10 Übersicht über untersuchte Reaktionen des Guanabenz in Schweinehepatozytenkulturen

Nachgewiesene Reaktionen	Nicht detektierbare Reaktionen
Drei aromatische Hydroxylierungen	<i>N</i> -Hydroxylierung zum Guanoxabenz
Guanabenz- <i>N</i> -glucuronidierung	Sulfatierung
Glucuronidierung eines C-hydroxylierten Guanabenz	Acetylierung

Neben der im Menschen nicht detektierbaren *N*-Oxidation von Guanabenz stimmen auch weitere in Tabelle 4.10 aufgeführten Reaktionen im Schwein mit denen im Menschen überein (Meacham *et al.* 1980). Der positiv ausfallende Vergleich der Ergebnisse zwischen den älteren *in vivo*-Studien und diesen aktuellen *in vitro*-Untersuchungen mit porcinen Hepatozytenkulturen zeigt abermals deutliche Hinweise auf den geeigneten Einsatz dieser Zellkulturen als Ersatz für Untersuchungen an lebenden Gesamtorganismen oder mit schlecht verfügbaren humanen Hepatozyten. Folglich sollten im Sinne der von Russell und Burch (1959) veröffentlichten Empfehlungen zum Umgang mit Tieren in wissenschaftlichen Experimenten zukünftig vermehrt Biotransformationsstudien mit Schweinehepatozytenkulturen durchgeführt werden und so ein Beitrag zum Tierschutz geleistet werden.

5 Einsatz von rekombinanten UGT-Isoenzymen zur Untersuchung der Glucuronidierung

5.1 Einleitung

5.1.1 Allgemeine Betrachtungen

Die UDP-Glucuronyltransferasen (UGTs) der Säugetiere stellen eine Supergenfamilie dar (Mackenzie *et al.* 1997). Die Klassifikation dieser Enzyme erfolgt anhand ihrer Abweichungen in der Aminosäuresequenz in die Familien UGT1 und UGT2, wobei letztere wiederum in zwei Subfamilien (2A und 2B) unterteilt wird. Bis heute sind 15 humane UGT-Isoenzyme identifiziert worden (Tukey und Strassburg 2000). Obwohl die Leber auch in Bezug auf die Glucuronidierung das Hauptstoffwechselorgan ist, kommen die UDP-Glucuronyltransferasen in zahlreichen weiteren Organen vor. Die Bioverfügbarkeit oral eingenommener Arzneimittel hängt folglich nicht nur von dem hepatischen „first pass“-Effekt ab, sondern auch von der häufig unterschätzten, bereits im Magen-Darm-Trakt stattfindenden Glucuronidierung der Wirkstoffe. Große interindividuelle Unterschiede in der Resorption von Substanzen können so nicht zuletzt aufgrund von Polymorphismen (s. 1.1.3.2) der humanen UGTs auftreten (Tukey und Strassburg 2000). Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über ihre Lokalisation im menschlichen Körper. Mit Ausnahme von UGT1A7 und UGT1A8, die im Gastrointestinaltrakt exprimiert werden, sind alle anderen Isoenzyme der Subfamilie 1A in der Leber nachgewiesen worden. Im hepatischen sowie im extrahepatischen Gewebe sind die Isoenzyme 2B4, 2B7 und 2B15 lokalisiert.

Tabelle 5.1 Organverteilung der humanen UDP-Glucuronyltransferasen (Tukey und Strassburg 2000, Fisher et al. 2001)

UGT-Isoenzym	Lokalisation (Organ)
1A1	Leber, Gallengänge, Magen, Kolon, Dünndarm
1A3	Leber, Gallengänge, Magen, Kolon, Dünndarm
1A4	Leber, Gallengänge, Kolon, Dünndarm
1A6	Leber, Gallengänge, Magen, Kolon, Gehirn, Dünndarm
1A7	Speiseröhre, Magen
1A8	Speiseröhre, Ileum, Jejunum, Kolon
1A9	Leber, Kolon, Niere
1A10	Speiseröhre, Magen, Gallengänge, Dünndarm, Kolon
2A1	Nasenepithel, Gehirn, fötale Lunge
2B4	Leber, Dünndarm
2B7	Speiseröhre, Leber, Dünndarm, Kolon, Gehirn, Niere, Pankreas
2B10	Speiseröhre, Leber, Brustdrüse, Prostata
2B11	Leber, Niere, Brustdrüse, Prostata, Nebenniere, Haut, Fettgewebe, Lunge
2B15	Speiseröhre, Leber, Prostata, Dünndarm
2B17	Prostata

Die UGT-Isoenzyme weisen nicht nur unterschiedliche Organverteilungen, sondern auch überlappende Substratspezifitäten und Substrataktivitäten auf. Ein Substrat kann folglich von mehreren Isoenzymen glucuronidiert werden und ein Isoenzym setzt eine große Anzahl verschiedener endogener bzw. exogener Verbindungen um (Wildt *et al.* 1999). Hingegen konnte kürzlich erstmals Serotonin (5-Hydroxytryptamin) als mögliches spezifisches Substrat des UGT1A6 identifiziert werden (Krishnaswamy *et al.* 2003). Während man zur Bestimmung von Cytochrom P450-Aktivitäten meist so genannte Markerreaktionen, die ausschließlich durch ein CYP-Isoenzym katalysiert werden, auswählt, werden für entsprechende Untersuchungen der UGTs bis dato keine spezifischen Substrate herangezogen. 17β -Estradiol (Abb. 5.1), ein endogenes Substrat für UGT1A1 und 1A3 (Radomska-Pandya

et al. 1999), ist ein Beispiel dafür. Die Isoenzyme UGT1A6, 1A9 und 2B15 glucuronidieren bevorzugt große sperrige Phenole, aber auch das 4-Methylumbelliferon, während UGT2B7 hauptsächlich die Hydroxylgruppe von Xenobiotika mit Morphin-Grundgerüsten konjugiert (Radomska-Pandya *et al.* 1999) und UGT2B4 an der Glucuronidierung von Codein und Carvedilol beteiligt ist (Court *et al.* 2003, Ohno *et al.* 2004). Das 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumarin (Abb. 5.1) ist hingegen sowohl für die UGTs 1A6, 1A9, 2B15 als auch für 2B4 und 2B7 als Substrat zur Aktivitätsbestimmung geeignet (Baranczweski *et al.* 2004, BD Biosciences 2004). Tertiäre Amine wie Amitriptylin, Imipramin und Trifluoperazin (Abb. 5.1) werden unter Katalyse des 1A4 zu *N*-Glucuroniden umgesetzt (Tab. 5.2).

Tabelle 5.2 Auswahl an endogenen und exogenen Substraten der hepatischen humanen UGT-Isoenzyme (Bock *et al.* 1999, Radomska-Pandya *et al.* 1999, Wildt *et al.* 1999, Court *et al.* 2003, Krishnaswamy *et al.* 2003, Ohno *et al.* 2004)

UGT-Isoenzym	Endogene Substrate	Exogene Substrate
1A1	Bilirubin, 17 β -Estradiol, Thyroxin	Quercetin, Ethinylestradiol, SN-38 (Irinotecan-Metabolit), 1-Naphthol
1A3	17 β -Estradiol, Estron	2-Aminofluoren, Scopoletin, Alizarin
1A4	Androsteron, verschiedene Pregnane	2-Aminofluoren, Benzidin, Amitriptylin, Imipramin, Trifluoperazin
1A6	Serotonin	4-Methylumbelliferon, 1-Naphthol, 4-Nitrophenol, Methylsalicylat, Paracetamol
1A9	Thyroxin, Estron, Retinolsäure	Propofol, Propranol, Ketoprofen, Ibuprofen, Butylphenol, Quercetin
2B4	Androsteron, verschiedene Pregnane	Carvedilol, Codein
2B7	Androsteron, Epitestosteron, 4-Hydroxyestron, Linolsäure	Morphin, Naloxon, Codein, Ibuprofen, Buprenorphin, S-Oxazepam, Valproinsäure
2B15	Dihydrotestosteron, 5 α -Androstan-3 α , 4-Hydroxyestron	Eugenol, 4-Methylumbelliferon, Naringenin, Phenolphthalein

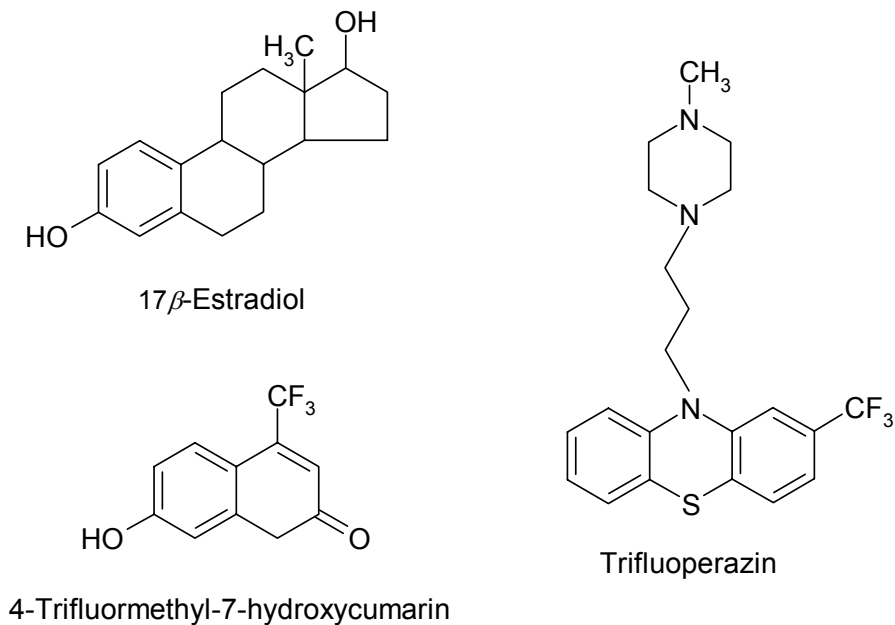


Abbildung 5.1 **Substrate für die Aktivitätsbestimmung der humanen hepatischen UGT-Isoenzyme** (UGT1A1 und 1A3 17β-Estradiol, UGT1A4 Trifluoperazin, UGT1A6, 1A9, 2B4, 2B7 und 2B15 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumarin)

Die UGTs sind membrangebundene Enzyme, deren aktives Zentrum zur luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ausgerichtet ist. Die Membran des ERs stellt eine Diffusionsbarriere für Substrat, Metabolit und Cofaktor dar, so dass zur Verhinderung der Latenz ein Porenbildner, wie z. B. Detergenzien oder Alamethicin, den Inkubationsansätzen hinzugefügt werden muss. Alamethicin ist ein aus 20 Aminosäuren bestehendes Peptid, das sich in die Membran einlagert und diese somit perforiert (Fisher *et al.* 2001).

5.1.2 Zielsetzung

Bisher lagen noch keine Daten zur Glucuronidierung von Amidoximen, *N*-Hydroxyguanidinen und *N*-Hydroxyamidinohydrasonen mit humanen UDP-Glucuronyltransferasen vor. Deshalb sollte aufbauend auf die in Kapitel 4 beschriebenen Untersuchungen dieser Substratklassen mit Hepatozytenkulturen nun erstmals gezeigt werden, welche humanen UGT-Isoenzyme an der Bildung dieser Glucuronide beteiligt sind. Hierzu sollten alle im Handel befindlichen rekombinanten humanen UGTs (1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B4, 2B7, 2B15), die in der Leber

lokalisiert sind, herangezogen werden. Da aufgrund von Polymorphismen einiger UGT-Gene große interindividuelle Unterschiede in Hinblick auf die Elimination und Detoxifizierung von Substanzen auftreten können (Wells *et al.* 2004), ist die Identifizierung der an den Umsetzungen beteiligten Isoenzyme von großer Bedeutung. Des Weiteren sollten die Ergebnisse der drei stickstoffhaltigen Verbindungen Benzamidoxim, *N*-Hydroxydebrisoquin und Guanoxabenz gegenübergestellt werden, um möglicherweise allgemeine Regeln für die Glucuronidierung entsprechender Substrate ableiten zu können.

Es wurde außerdem erhofft, dass ein Abgleich der beteiligten Enzyme mit Literaturdaten Hinweise auf den Bindungsort der Glucuronsäure im Substratmolekül liefern könnte, so dass die Metaboliten auf diese indirekte Weise als *N*- oder *O*-Glucuronide klassifizierbar wären.

Da im Studienverlauf keine oder nur sehr geringe Umsetzungsraten für die Glucuronidierung von Benzamidoxim zu verzeichnen waren, sollte die Aktivität aller eingesetzten UGT-Isoenzyme überprüft werden. Um dies zu ermöglichen, sollten zunächst für die Substrate 17 β -Estradiol, Trifluoperazin und 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumarin und deren Glucuronide jeweils neue HPLC-Methoden entwickelt werden.

5.2 Methoden

5.2.1 Charakterisierung der UGT-Isoenzyme

5.2.1.1 17 β -Estradiol-3-glucuronidierung

5.2.1.1.1 Inkubationsbedingungen

Die Überprüfung der Aktivität der UGT-Isoenzyme 1A1 und 1A3 wurde in Anlehnung an die Methode der Firma BD Biosciences bei 37°C im Schüttelwasserbad durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz bestand aus 150 μ M 17 β -Estradiol, 1 mg/ml UGT SupersomesTM und „UGT Reaction Mix“ Lösung A und B in einer Endkonzentration von 2 mM UDPGA; 50 mM TRIS-HCl Puffer pH 7,5; 10 mM MgCl₂ und 25 μ g/ml Alamethicin. Das Ansatzvolumen betrug 200 μ l. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde die Umsetzung durch Zugabe von 100 μ l eisgekühltem Acetonitril/Eisessig 94:6 (V/V) beendet. Dabei gefällte Proteine wurden durch fünfminütige Zentrifugation in einer Mikroliterzentrifuge bei 10000 U/min sedimentiert und der Überstand mittels HPLC analysiert. Um nicht-enzymatische Reaktionen auszuschließen, wurden analog ausgeführte Inkubationen, die als Proteinquelle „UGT insect cell control SupersomesTM“ enthielten, vermessen.

5.2.1.1.2 HPLC-Analytik

Die im Folgenden beschriebenen HPLC-analytischen Bedingungen wurden aufbauend auf die Methode der Firma BD Biosciences entwickelt.

HPLC-Pumpe	Gradientenpumpe W510 mit Systemkontroller (Waters, Milford, CT, USA)
Detektor	W486 Tunable Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)
Autosampler	W710 WISP (Waters, Milford, CT, USA)
Integrator	Maxima [®] -Software 820, Version 3.30 (Waters, Milford, CT, USA)

Stationäre Phase	LiChrospher® RP Select-B, 250 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm, in einer LiChroCART®-Kartusche mit Vorsäule RP Select-B, 4 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm (Merck, Darmstadt)		
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)		
Mobile Phase	Fließmittel A: Aqua bidest./Methanol/Acetonitril 85:9:6 (V/V/V), Zusatz von 20 µl Phosphorsäure 85% pro l Fließmittel Fließmittel B: Methanol		
Gradientenprofil	Laufzeit (min)	A (%)	B (%)
	0 – 10	80	20
	10 – 15	15	85
	15 – 25	15	85
	25 – 30	80	20
	30 – 40	80	20
Flussrate	1,0 ml/min		
Detektion	UV, 280 nm		
Injektionsvolumen	75 µl		
Retentionszeiten	17β-Estradiol-3-O-glucuronid: 19,7 ± 0,2 min 17β-Estradiol: 21,4 ± 0,2 min		

Die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte über eine 7-Punkt-Kalibrierung. Hierzu wurden Lösungen mit den Konzentrationen von 120 bis 1800 µM 17β-Estradiol-3-O-glucuronid im Fließmittel hergestellt und mittels HPLC vermessen. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde der Metabolit in Aqua bidest. gelöst und jeweils den Inkubationsansätzen (s. 5.2.1.1.1), die als Proteinquelle „UGT insect cell control Supersomes™“ enthielten, in einer bestimmten Menge zugesetzt, dass sich der Kalibrierung entsprechende Endkonzentrationen des Metaboliten für die Wiederfindungsansätze ergaben.

5.2.1.2 Trifluoperazin-*N*-glucuronidierung

5.2.1.2.1 Inkubationsbedingungen

Die Aktivität des UGT1A4 wurde analog zu der unter 5.2.1.1.1 beschriebenen Methode in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen im 37°C-Schüttelwasserbad bestimmt. Davon abweichend enthielt ein typischer Inkubationsansatz zusätzlich zu den „UGT Reaction Mix“ Lösungen A und B in bekannten Konzentrationen 200 µM Trifluoperazin als Substrat und 0,25 mg/ml UGT Supersomes™ als Proteinquelle.

5.2.1.2.2 HPLC-Analytik

Das von der Firma BD Biosciences entwickelte Verfahren wurde zur HPLC-analytischen Untersuchung von Trifluoperazin und dessen *N*-Glucuronid variiert.

HPLC-Pumpe	Gradientenpumpe W510 mit Systemkontroller (Waters, Milford, CT, USA)
Detektor	W486 Tunable Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)
Autosampler	W710 WISP (Waters, Milford, CT, USA)
Integrator	Maxima®-Software 820, Version 3.30 (Waters, Milford, CT, USA)
Stationäre Phase	LiChrospher® RP Select-B, 250 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm, in einer LiChroCART®-Kartusche mit Vorsäule RP Select-B, 4 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm (Merck, Darmstadt)
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)
Mobile Phase	Fließmittel A: 0,1% Trichloressigsäure in Aqua bidest./ Acetonitril 80:20 (V/V) Fließmittel B: 0,1% Trichloressigsäure in Aqua bidest./ Acetonitril 50:50 (V/V)

Gradientenprofil	Laufzeit (min)	A (%)	B (%)
	0 – 10	100	0
	10 – 18	0	100
	18 – 28	0	100
	28 – 35	100	0
	35 – 45	100	0
Flussrate	1,0 ml/min		
Detektion	UV, 256 nm		
Injektionsvolumen	75 µl		
Retentionszeiten	Trifluoperazin- <i>N</i> -glucuronid: 23,0 ± 0,2 min		
	Trifluoperazin: 24,7 ± 0,2 min		

Die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte über eine 6-Punkt-Kalibrierung. Es wurden Lösungen mit Konzentrationen von 30 bis 900 µM des Substrates Trifluoperazin im Fließmittel hergestellt und mittels HPLC vermessen. Da der Metabolit nicht käuflich zu erwerben war, wurde ein ähnlicher Absorptionskoeffizient für Substrat und Glucuronid vorausgesetzt. Die Peakflächen des Trifluoperazin-*N*-glucuronides wurden folglich über die mit Trifluoperazin erstellten Wiederfindungen in Konzentrationen umgerechnet. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden den typischen Inkubationsansätzen (mit „UGT insect cell control SupersomesTM“ als Proteinquelle) die oben angegebenen Konzentrationen des in Aqua bidest. gelösten Substrates hinzugefügt. Diese wurden dann wie Inkubationen behandelt und per HPLC bestimmt.

5.2.1.3 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumaringlucuronidierung

5.2.1.3.1 Inkubationsbedingungen

Die Testung auf Aktivität der UGT-Isoenzyme 1A6, 1A9, 2B4, 2B7 und 2B15 wurde entsprechend der unter 5.2.1.1.1 beschriebenen Vorschrift durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz bestand aus 50 µM 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumarin, UGT SupersomesTM und „UGT Reaction Mix“ Lösung A und B in einer Endkonzentration von 1 mM UDPGA; 50 mM TRIS-HCl Puffer pH 7,5; 10 mM MgCl₂ und 25 µg/ml Alamethicin. Für die Ansätze mit verschiedenen Isoenzymen wurden

unterschiedliche Enzymkonzentrationen gewählt: 0,05 mg/ml UGT Supersomes™ (1A6 und 1A9) und 0,25 mg/ml UGT Supersomes™ (2B4, 2B7 und 2B15).

5.2.1.3.2 HPLC-Analytik

HPLC-Pumpe	Gradientenpumpe W510 mit Systemkontroller (Waters, Milford, CT, USA)		
Detektor	W486 Tunable Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)		
Autosampler	W710 WISP (Waters, Milford, CT, USA)		
Integrator	Maxima®-Software 820, Version 3.30 (Waters, Milford, CT, USA)		
Stationäre Phase	LiChrospher® RP Select-B, 250 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm, in einer LiChroCART®-Kartusche mit Vorsäule RP Select-B, 4 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm (Merck, Darmstadt)		
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)		
Mobile Phase	Fließmittel A: Aqua bidest./Methanol/Acetonitril 87,5:9:3,5 (V/V/V), Zusatz von 20 µl Phosphorsäure 85% pro l Fließmittel Fließmittel B: Methanol		
Gradientenprofil	Laufzeit (min)	A (%)	B (%)
	0 – 10	90	10
	10 – 20	10	90
	20 – 25	10	90
	25 – 30	90	10
	30 – 40	90	10
Flussrate	0,8 ml/min		
Detektion	UV, 325 nm		
Injektionsvolumen	75 µl		
Retentionszeiten	4-Trifluormethyl-7-hydroxycumarin-O-glucuronid: 8,4 ± 1,0 min 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumarin: 25,7 ± 0,5 min		

Die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte über eine 7-Punkt-Kalibrierung. Hierzu wurden Lösungen mit den Konzentrationen von 50 bis 500 μM 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumarin-O-glucuronid im Fließmittel hergestellt und mittels HPLC vermessen. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde der Metabolit in Aqua bidest. gelöst und jeweils den Inkubationsansätzen (s. 5.2.1.3.1), die als Proteinquelle „UGT insect cell control SupersomesTM“ enthielten, in einer bestimmten Menge zugesetzt, so dass sich für die Ansätze der Wiederfindung der Kalibrierung entsprechende Endkonzentrationen des Metaboliten ergaben.

5.2.2 Glucuronidierung von Benzamidoxim

5.2.2.1 Inkubationsbedingungen

Ein typischer Inkubationsansatz bestand aus Benzamidoxim, Protein und den „UGT Reaction Mix“ Lösungen A und B in Endkonzentrationen von 2 mM UDPGA; 50 mM TRIS-HCl Puffer pH 7,5; 10 mM MgCl_2 und 25 $\mu\text{g/ml}$ Alamethicin. In Abhängigkeit vom UGT-Isoenzym wurden unterschiedliche Substrat- und Proteinkonzentrationen gewählt. Die Benzamidoxim-Konzentrationen betragen 150 μM für UGT1A1, 1A2 und „UGT insect cell control SupersomesTM“, 200 μM für UGT1A4 und 50 μM für UGT1A6, 1A9, 2B4, 2B7 und 2B15. In 1,5 ml-Reaktionsgefäßen wurden die Ansätze mit einem Volumen von 200 μl 6 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Inkubationen durch Einfrieren bei -20°C und anschließender Gefriertrocknung abgestoppt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C. Vor der Vermessung wurden sie in 40 μl Fließmittel A gelöst, 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand in die Probenschleife injiziert. Als Leerwerte dienten Inkubationsansätze mit „UGT insect cell control SupersomesTM“ als Proteinquelle, die den Proben entsprechend aufgearbeitet wurden.

5.2.2.2 LC/MS-Analytik

Zur quantitativen Bestimmung der Benzamidoxim-O-glucuronidierung wurden zunächst wässrige Lösungen der synthetischen Referenzsubstanz in Konzentrationen von 5 bis 250 μM hergestellt und diese dann unter Verwendung der unter 4.1.2.2 aufgeführten LC/MS-Methode vermessen. Die Peakflächen der Ionenchromatogramme mit der Summe der Ionen mit m/z 119, 137, 313, 335, 357 und 373 wurden mithilfe der Integrationssoftware (Data Analysis™, Version 3.0, Bruker Daltonics) erhalten.

5.2.3 Glucuronidierung von *N*-Hydroxydebrisoquin

5.2.3.1 Inkubationsbedingungen

Die Inkubationen wurden analog zu den unter 5.2.2.1 beschriebenen Ansätzen durchgeführt. Nach Anlösen des Substrats *N*-Hydroxydebrisoquin in reinem DMSO betrug die Endkonzentration des Lösungsmittels im Inkubationsansatz max. 0,25%. Um die Hydrolyseeigenschaften der Glucuronide in Anwesenheit von β -Glucuronidase zu bestimmen, wurden nach der sechsständigen Inkubation die Ansätze bei 10000 U/min 5 min lang zentrifugiert, halbiert und mit 8 μl Enzym bzw. 8 μl Aqua bidest. versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 16 h. Anschließend wurden die Proben eingefroren, gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert. Vor Vermessung wurden sie in 40 μl Fließmittel A gelöst, 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand in die HPLC-Anlage injiziert. Parallel zu den Inkubationen mit β -Glucuronidase wurden jeweils die entsprechenden Ansätze ohne Enzym per LC/MS vermessen.

5.2.3.2 LC/MS-Analytik

Die unter 4.2.2.4.1 beschriebenen LC/MS-analytischen Bedingungen wurden zur Untersuchung der Glucuronidierung des *N*-Hydroxydebrisoquins mittels UGT-Isoenzymen angewandt.

5.2.4 Glucuronidierung von Guanoxabenz bzw. Guanabenz

5.2.4.1 Inkubationsbedingungen

Die Inkubationen wurden entsprechend zu den unter 5.2.2.1 bzw. 5.2.3.1 beschriebenen Verfahren für die enzymatische Glucuronidierung bzw. Hydrolyse durchgeführt. Die Endkonzentration von DMSO, in dem das Substrat Guanoxabenz angelöst wurde, betrug im Inkubationsansatz maximal 0,25%.

5.2.4.2 LC/MS-Analytik

Die Glucuronidierung von Guanoxabenz und Guanabenz wurde mithilfe der unter 4.3.2.4 aufgeführten Methode analysiert.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Charakterisierung der UGT-Isoenzyme

5.3.1.1 17 β -Estradiol-3-glucuronidierung

Um das Ausmaß der Glucuronidierung zu bestimmen, wurden Kalibrierungen und Wiederfindungen durchgeführt (vergl. 5.2.1.1.2). Mithilfe der resultierenden Peakflächen des 17 β -Estradiol-3-glucuronids konnte die Umsetzung quantifiziert werden.

Die Kalibrierung ($r^2 > 0,9984$ und $n = 3$, je zweimal vermessen) und die Wiederfindung ($r^2 > 0,9972$ und $n = 3$, je zweimal vermessen) verliefen über den gesamten Konzentrationsbereich linear (Abb. 5.2). Die daraus abgeleiteten Wiederfindungsraten betragen 86,2 bis 91,8%, wobei für diese Abweichungen vermutlich Adhäsionseffekte des Metaboliten an das Kontrollprotein anzunehmen waren.

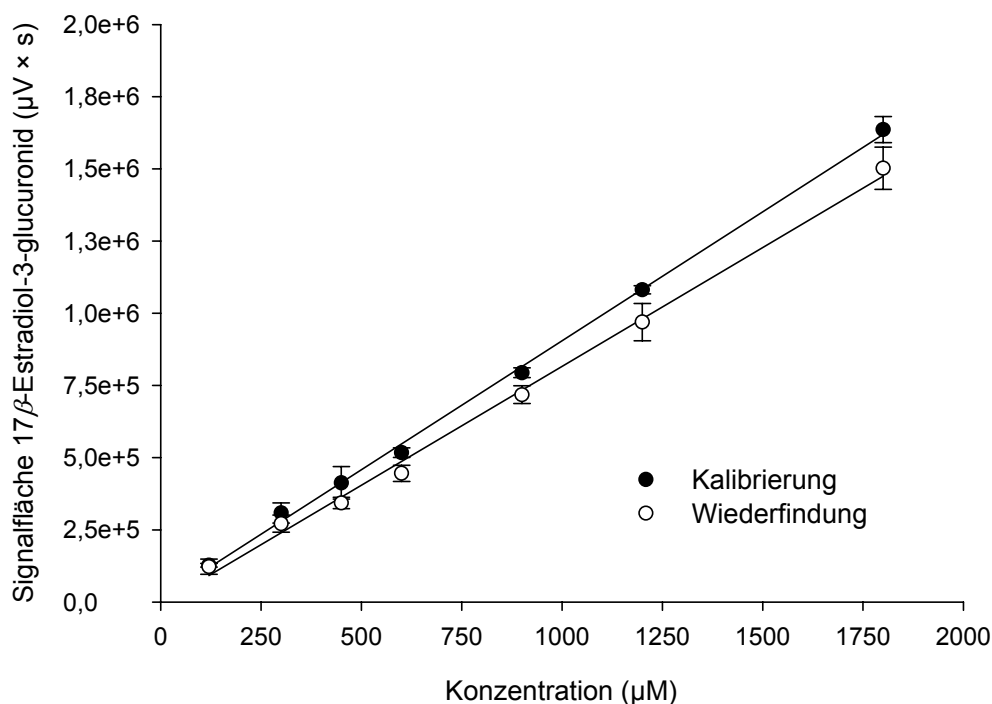


Abbildung 5.2 *Kalibrierung und Wiederfindung von 17β-Estradiol-3-glucuronid*
Die Signalfächen sind Mittelwerte ± SD aus $n = 3$ Ansätzen, je zweimal vermessen (Kalibrierung $r^2 = 0,9984$; Wiederfindung $r^2 = 0,9972$).

Die Umsetzungsraten für die Glucuronidierung von 17β-Estradiol-3-glucuronid mittels UGT1A1 bzw. 1A3 betragen 1550 ± 490 pmol/(min × mg Protein) bzw. 760 ± 60 pmol/(min × mg Protein).

5.3.1.2 Trifluoperazin-*N*-glucuronidierung

Für die Quantifizierung des in den Inkubationen mit Trifluoperazin entstandenen Glucuronids wurden mit der unter 5.2.1.2.2 aufgeführten neu entwickelten HPLC-Analytik (Abb. 5.3) Kalibrierungen und Wiederfindungen durchgeführt. Aus den Signalfächen des resultierenden Peaks des Trifluoperazins wurden die Konzentrationen des Trifluoperazin-*N*-glucuronids bestimmt.

Die Kalibrierung ($r^2 > 0,9942$ und $n = 3$, je zweimal vermessen) und Wiederfindung ($r^2 > 0,9994$ und $n = 3$, je zweimal vermessen) verliefen über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die daraus abgeleiteten Wiederfindungsraten betragen $77,4 \pm 18,6\%$.

Die Glucuronidierung des Trifluoperazin durch das UGT1A4 ergab einen Wert von 4300 ± 700 pmol/(min \times mg Protein) für die Umsetzungsrate.

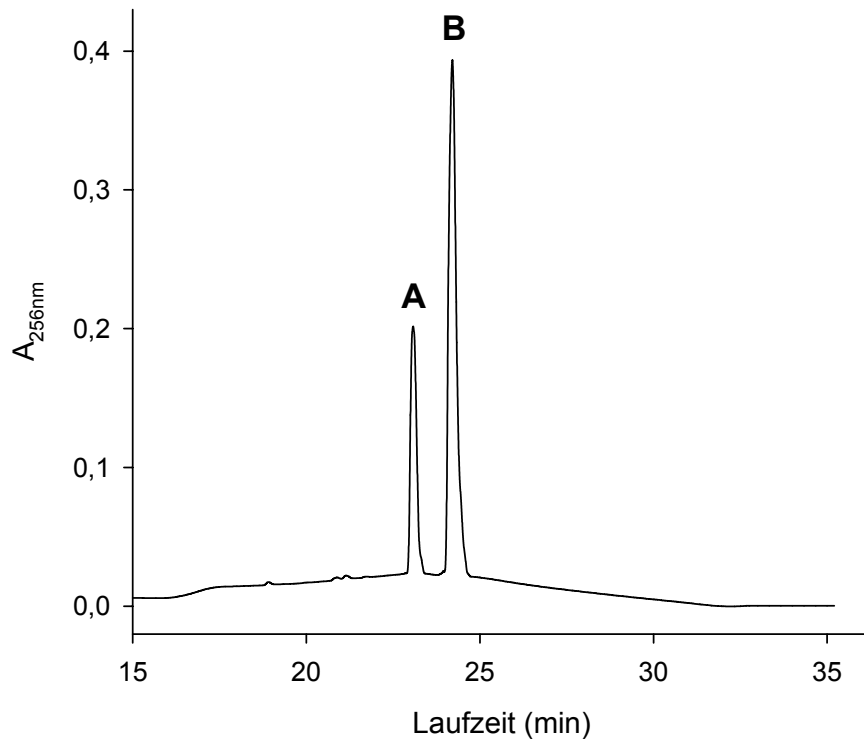


Abbildung 5.3 *Repräsentatives HPLC-Chromatogramm einer Trifluoperazin-inkubation mit UGT1A4: (A) Trifluoperazin-N-glucuronid, (B) Trifluoperazin*

5.3.1.3 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumaringlucuronidierung

Zur Quantifizierung des Metaboliten wurden Kalibrierungen und Wiederfindungen mit der unter 5.2.1.2.2 aufgeführten Analytik durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte über die Peakflächen, die aus der Absorptionsfähigkeit des 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumaringlucuronids resultierten.

Die Kalibrierung ($r^2 > 0,9998$ und $n = 3$, je zweimal vermessen) und Wiederfindung ($r^2 > 0,9918$ und $n = 3$, je zweimal vermessen) verliefen über den gesamten Konzentrationsbereich linear (Abb. 5.4). Die mittlere Wiederfindungsrate betrug 61,0%. Dieser geringe Wert lässt auf Adsorptionsphänomene am biologischen Material schließen.

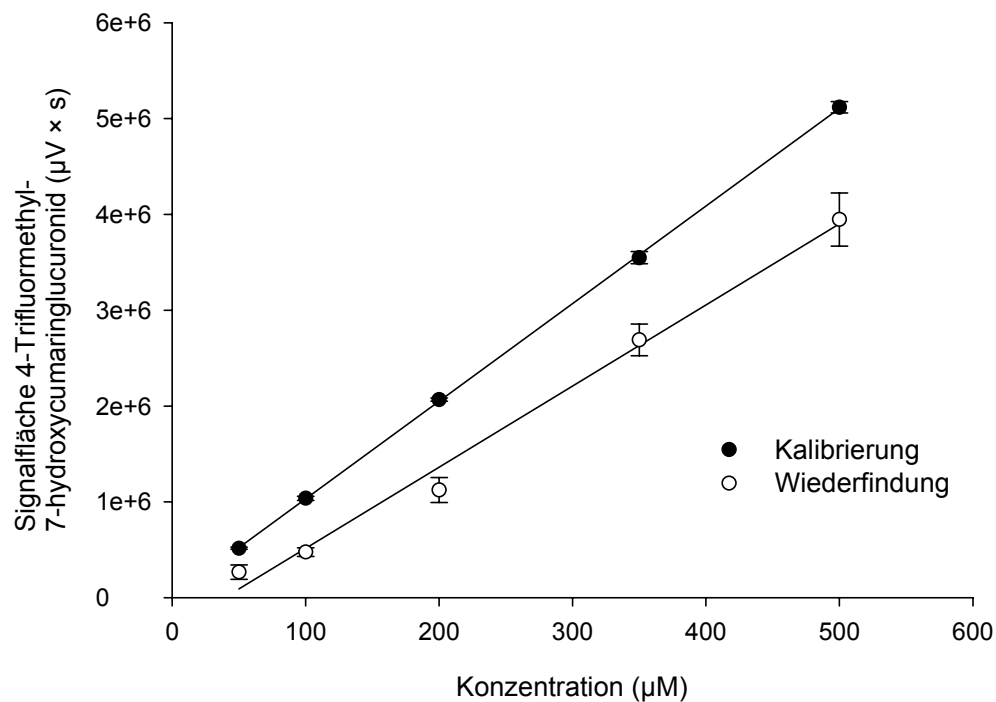


Abbildung 5.4 *Kalibrierung und Wiederfindung von 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumaringlucuronid*

Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$ Ansätzen, je zweimal vermessen (Kalibrierung $r^2 = 0,9998$; Wiederfindung $r^2 = 0,9918$).

Tabelle 5.3 gibt einen Überblick über die Bildungsrate von 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumaringlucuronid bei einer Substratkonzentration von 50 μ M.

Tabelle 5.3 *Übersicht der Umsetzungsrate von 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumarin zum Glucuronid mit verschiedenen UGT-Isoenzymen*

UGT-Isoenzyme	Aktivität \pm SD (pmol/(min \times mg Protein))
1A6	3990 \pm 490
1A9	7570 \pm 870
2B4	1510 \pm 240
2B7	1100 \pm 140
2B15	1140 \pm 80

5.3.2 Glucuronidierung von Benzamidoxim

Zur Quantifizierung des Benzamidoxim-O-glucuronids wurden die Peakflächen der Ionenchromatogramme der Summe der Ionen mit m/z 119, 137, 313, 335, 357 und 373 herangezogen. Die Kalibrierung ($r^2 > 0,9998$ und $n = 3$, je einmal vermessen) und Wiederfindung ($r^2 > 0,9949$ und $n = 3$, je einmal vermessen) verliefen über den gesamten Konzentrationsbereich linear.

Die Glucuronidierung des Benzamidoxims war in Inkubationen mit drei verschiedenen humanen rekombinanten UGT-Isoenzymen detektierbar. Das Isoenzym 1A9 bildete das Glucuronid mit einer Aktivität von $30,5 \pm 5,2$ pmol/(min \times mg Protein). Hingegen zeigten das UGT1A1 und 1A3 60fach geringere Umsetzungsraten für diese Konjugation (Abb. 5.5). Sowohl in den Inkubationsansätzen mit den „UGT insect cell control Supersomes™“ als auch mit den Isoenzymen 1A4, 1A6, 2B4, 2B7 und 2B15 konnte kein Benzamidoxim-O-glucuronid nachgewiesen werden.

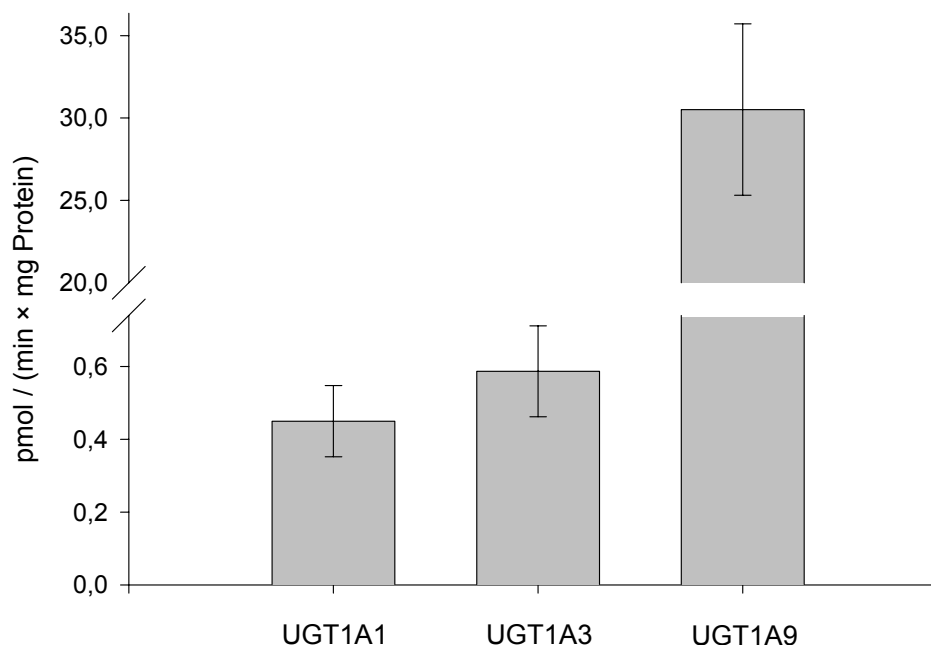


Abbildung 5.5

Bildung von Benzamidoxim-O-glucuronid durch drei humane hepatische rekombinante UDP-Glucuronyltransferasen (UGTs)
Die Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$ Inkubationen. Die Glucuronidierung von Benzamidoxim durch die Isoenzyme UGT1A4, 1A6, 2B4, 2B7 und 2B15 ist nicht detektierbar.

5.3.3 Glucuronidierung von *N*-Hydroxydebrisoquin

N-Hydroxydebrisoquin wurde mit den rekombinant exprimierten UGT-Isoenzymen nach der unter 5.2.3.1 beschriebenen Vorschrift inkubiert. Es zeigte sich, dass alle untersuchten UDP-Glucuronyltransferasen mit Ausnahme der Isoenzyme 1A6 und 2B4 das *N*-Hydroxydebrisoquin-*O*-glucuronid bildeten. Die Bildung des vermeintlichen *N*-Glucuronids des *N*-Hydroxydebrisoquins (vgl. 4.3.4) mit der Retentionszeit von $18,0 \pm 0,2$ min konnte nur in Inkubationen mit UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A9 und 2B7 detektiert werden. In Abbildung 5.6 sind die Ionenchromatogramme des Ions bei 368 Th vor und nach Behandlung einer UGT1A9-Inkubation mit β -Glucuronidase abgebildet.

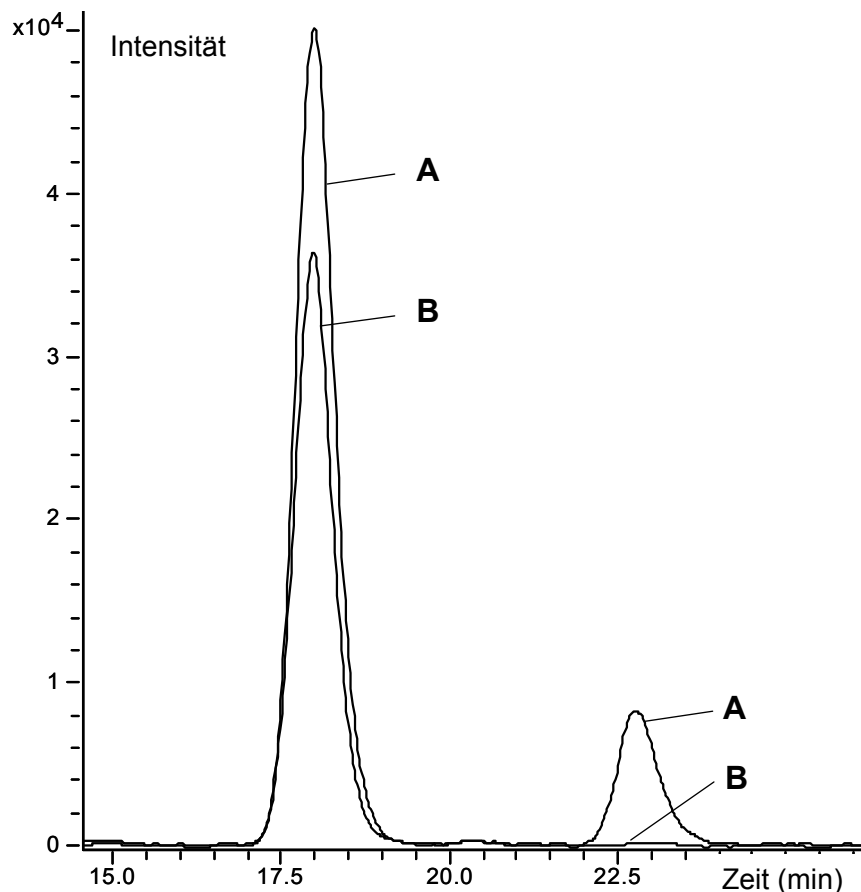


Abbildung 5.6 Repräsentatives Ionenchromatogramm für das Signal bei 368 Th als charakteristisches Ion von *N*-Hydroxydebrisoquin-glucuroniden mit den Retentionszeiten $18,0 \pm 0,2$ min und $22,5 \pm 0,3$ min: (A) UGT1A9-Inkubation, (B) UGT1A9-Inkubation nach Behandlung mit β -Glucuronidase

Es zeigte sich erneut, dass das *N*-Glucuronid schlechter hydrolysiert werden konnte als das *O*-Glucuronid. Inkubationen sämtlicher UGT-Isoenzyme wiesen ein der Abbildung 5.6 entsprechendes Mengenverhältnis der zwei Glucuronide untereinander auf. In den Kontrollansätzen mit „UGT insect cell control Supersomes™“ konnte keine Glucuronidierung nachgewiesen werden.

Da nur geringe Mengen des Standards *N*-Hydroxydebrisoquin-*O*-glucuronid (vgl. 4.2.2.1.2) zur Verfügung standen, wurde auf eine Kalibrierung und somit auf die Angabe absoluter Werte für die Glucuronidierungsaktivitäten verzichtet. Die Umsatzraten wurden folglich nur auf die Peakflächen der Ionenchromatogramme des Ions mit *m/z* 368, die Inkubationsdauer und die eingesetzte Proteinmenge bezogen (Tab. 5.4).

Tabelle 5.4 *Glucuronidierung von N-Hydroxydebrisoquin durch rekombinante humane UGT-Isoenzyme. Rangliste der metabolischen Aktivitäten dieser Reaktion, ≈ kein statistisch signifikanter Unterschied der Werte (Student's t-Test)*

Retentionszeiten der <i>N</i> -Hydroxydebrisoqinglucuronide (min)	Rangliste der Umsatzraten
18,0 ± 0,2	1A9 > 1A4 ≈ 1A1 > 2B7 ≈ 1A3
22,5 ± 0,3	1A9 > 1A1 > 1A3 ≈ 2B7 ≈ 1A4 ≈ 2B15

5.3.4 Glucuronidierung von Guanoxabenz

In Guanoxabenz-Inkubationen mit den humanen rekombinanten UGTs wurde die Bildung von fünf verschiedenen Guanoxabenzglucuroniden mit den Retentionszeiten 2,2 ± 0,2 min, 4,7 ± 0,2 min, 7,4 ± 0,3 min, 13,2 ± 0,3 min und 16,8 ± 0,5 min nachgewiesen. β -Glucuronidase hydrolysiert die Konjugate in einem unterschiedlich großen Ausmaß. In Inkubationen mit „UGT insect cell control Supersomes™“ konnte keine Glucuronidierung des Guanoxabenz detektiert werden. Exemplarisch ist in Abbildung 5.7 das Massenspektrum des zuletzt eluierten Glucuronids dargestellt. Neben dem Quasimolekülion bei 423 Th lassen sich alle gezeigten Ionen über die Bildung von Clustern mit Alkali-Ionen oder über Abspaltung stabiler Fragmente

erklären: 425 Th $[M+H, \text{ mit } ^{37}\text{Cl}]^+$, 445 Th $[M+\text{Na}]^+$, 461 Th $[M+\text{K}]^+$, 483 Th $[M-H+\text{Na}+\text{K}]^+$, 405 Th $[M+H-\text{H}_2\text{O}]^+$ und 247 Th $[\text{Guanoxabenz}+\text{H}]^+$.

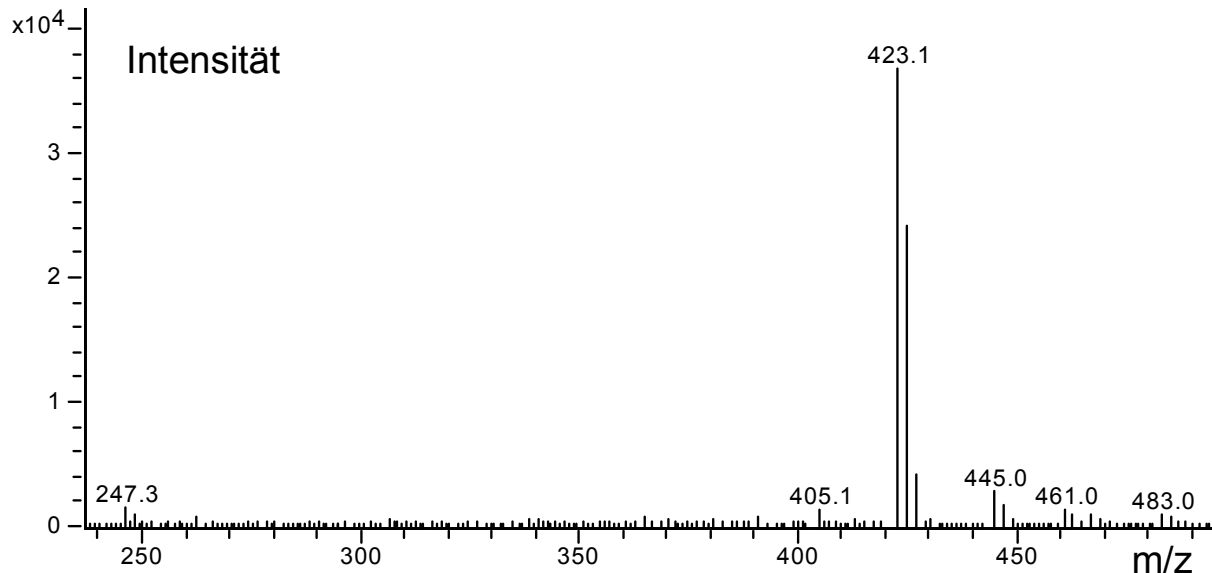


Abbildung 5.7 *Repräsentatives Massenspektrum eines durch UGT-Isoenzyme gebildeten Guanoxabenzglucuronids mit der Retentionszeit von $16,8 \pm 0,5$ min*

Da für keines der Glucuronide ein synthetischer Standard zur Verfügung stand, wurden die Umsetzungsraten über die Peakfläche der Ionenchromatogramme der Summe der Ionen 423 Th und 425 Th, die Inkubationsdauer und die eingesetzte Proteinmenge berechnet. Tabelle 5.5 gibt die Ranglisten der Bildungsraten der UGT-Isoenzyme für alle fünf nachgewiesenen Guanoxabenzglucuronide wieder. Es zeigte sich, dass das UGT1A9 und das UGT1A1 an den jeweiligen Reaktionen zu einem großen Anteil beteiligt sind. Das Glucuronid mit der Retentionszeit $13,2 \pm 0,3$ min wurde am meisten durch das Isoenzym 1A4 gebildet. Alle fünf gebildeten Glucuronide ließen sich durch Zusatz von β -Glucuronidase zu den Inkubationsansätzen vollständig oder teilweise hydrolysieren. Die Freisetzung des Aglykons lief sowohl für den Metaboliten mit der Retentionszeit $4,7 \pm 0,2$ min als auch für das nach $7,4 \pm 0,3$ min eluierte Glucuronid langsamer ab und war somit zum Zeitpunkt der Bestimmung nicht beendet.

Tabelle 5.5 *Glucuronidierung von Guanoxabenz durch rekombinante humane UGT-Isoenzyme. Rangliste der metabolischen Aktivitäten dieser Reaktion, \approx kein statistisch signifikanter Unterschied der Werte (Student's t-Test)*

Retentionszeiten der Guanoxabenz-glucuronide (min)	Rangliste der Umsetzungsraten
2,2 \pm 0,2	UGT1A9 > 1A1
4,7 \pm 0,2	UGT1A9 \approx 1A4 > 1A1 \approx 1A3 > 2B15 \approx 2B7 > 2B4
7,4 \pm 0,3	UGT1A9 > 2B15 > 1A1 > 2B7
13,2 \pm 0,3	UGT1A4 > 1A9 \approx 1A1 \approx 1A3 \approx 2B15 > 2B7 > 2B4 \approx 1A6
16,8 \pm 0,5	UGT1A9 > 1A1 \approx 2B15 \approx 1A4 > 1A3 > 2B7

5.3.5 Glucuronidierung von Guanabenz

Im Gegensatz zu den *N*-hydroxylierten Verbindungen wurde das Guanabenz nicht mit den acht humanen UGTs inkubiert, sondern nur mit dem Isoenzym 1A9. Diese Inkubation sollte nämlich nur zur Bekräftigung der in Hepatozyten gefundenen *N*-Glucuronidierung des Guanabenz dienen und nicht zu Zwecken der Strukturaufklärung dieses Konjugats herangezogen werden. Die Ansätze enthielten einen Metaboliten mit den Haptionen 407 und 409, der bei 4,6 \pm 0,2 min eluiert wurde. Diese MS-Signale deuten auf eine *N*-Glucuronidierung des Guanabenz hin (Abb. 5.8). Der Metabolit konnte nur teilweise enzymatisch durch β -Glucuronidase hydrolytisch in Glucuronsäure und sein Aglykon gespalten werden. Die Blindwerte mit „UGT insect cell control SupersomesTM“ enthielten dieses Konjugat nicht.

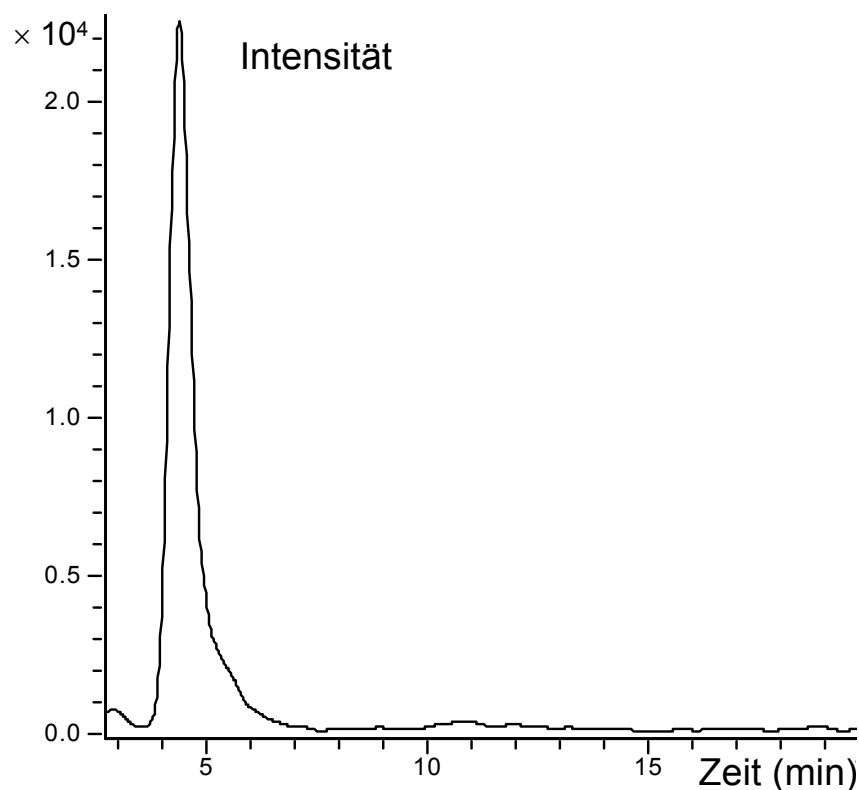


Abbildung 5.8 *Repräsentatives Ionenchromatogramm für das Signal bei 407 Th als charakteristisches Ion von Guanabenz-N-glucuronid mit der Retentionszeit $4,6 \pm 0,2$ min*

5.4 Diskussion

Aufbauend auf die vorangegangenen Studien mit Hepatozytenkulturen (s. Kapitel 4), die sich im Wesentlichen mit der Glucuronidierung von stickstoffhaltigen Verbindungen beschäftigten, sollte nun aufgeklärt werden, welche humanen UDP-Glucuronyltransferasen an den Reaktionen beteiligt sind.

Entsprechend der Glucuronidierung des Sauerstoffs von *N*-hydroxylierten Arylaminen, für die die Isoenzyme 1A9 und 1A7 begünstigt waren (Yueh *et al.* 2001), wurde Benzamidoxim hauptsächlich durch das UGT1A9 O-glucuronidiert, während UGT1A1 und 1A3 60fach geringere Konjugationsraten zeigten.

Die durch UGT1A9 katalysierte Glucuronidierung des Sauerstoffs lief jedoch in einem um den Faktor 250 geringeren Umfang ab als die O-Glucuronidierung des 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumarins in der Testung auf Aktivität. Ähnliche Unterschiede in den Umsetzungsraten berichteten aber bereits Strassburg *et al.*

(1999) für die Bildung von *N*-Hydroxyglucuroniden im Vergleich zur Glucuronidierung von phenolischen Hydroxylgruppen.

Die Inkubationen von *N*-Hydroxydebrisoquin mit den UGT-Isoenzymen zeigten die bevorzugte Bildung des Glucuronids mit der Retentionszeit $18,0 \pm 0,2$ min gegenüber der des *O*-Glucuronids, das nach $22,5 \pm 0,3$ min eluiert wurde. Das Verhältnis der beiden Metaboliten zueinander stimmt in diesen humanen rekombinanten UGT-Inkubationen mit den Ergebnissen aus den Ansätzen mit humanen Hepatozyten überein; die porcinen Hepatozyten bildeten hingegen überwiegend das zuletzt eluierte Konjugat.

Nachdem bereits ein *N*-Hydroxydebrisoquinglucuronid mithilfe der synthetischen Referenzsubstanz als *O*-gekoppelter Metabolit (Retentionszeit $22,5 \pm 0,3$ min) identifiziert werden konnte (s. 4.2.3.1.2.1 und 4.2.3.3.2.1), sollte nun anhand von Hydrolyseeigenschaften des Metaboliten und von Substratspezifitäten bzw. Substrataktivitäten der UGT-Isoenzyme die Struktur des anderen *N*-Hydroxydebrisoquinglucuronids aufgeklärt werden. Die geringere enzymatische Hydrolysierbarkeit dieses Konjugates mit β -Glucuronidase im Vergleich zu der des *O*-Glucuronids, die ebenfalls in den Hepatozyteninkubationen beobachtet wurde, weist laut Zenser *et al.* (1999) auf ein *N*-gekoppeltes Glucuronid hin. Die an der Reaktion beteiligten UGTs weisen folgende Präferenz auf: $1A9 > 1A4 \approx 1A1 > 2B7 \approx 1A3$. Das UGT1A9-Isoenzym zeigt somit signifikant die höchsten Umsetzungsraten. Da die Umsetzung von tertiären Aminen zu quartären *N*-Glucuroniden jedoch bevorzugt durch UGT1A4 und mit deutlich geringerer Effizienz auch durch UGT1A3, nicht aber unter Katalyse weiterer Isoenzyme abläuft (Green *et al.* 1998, Kaku *et al.* 2004, Wiener *et al.* 2004), ist eine Glucuronidierung des ringgebundenen Stickstoffs des *N*-Hydroxydebrisoquin auszuschließen. Die Betrachtung der Substratspezifitäten der an der Glucuronidierung beteiligten UGT-Isoenzyme gibt keine weiteren Aufschlüsse über die exakte Struktur des Metaboliten, da die UGTs 1A1, 1A3, 1A4 und 1A9 sowohl für die Konjugation von primären und sekundären Aminen, an die verschiedene Reste gebunden sind, als auch für die Glucuronidierung von Hydroxylaminen verantwortlich sind (Green und Tephly 1998, Radomska-Pandya *et al.* 1999, Ritter 2000).

Die Bildung sämtlicher Guanoxabenzglucuronide, die bereits in porcinen Hepatozyten gezeigt wurde (s. 4.3.3.2.3.2), konnte nun auch anhand der Inkubationen mit rekombinanten UDP-Glucuronyltransferasen für die Spezies Mensch demonstriert werden. Alle Glucuronide mit Ausnahme des Metaboliten mit der Retentionszeit $13,2 \pm 0,3$ min wurden größtenteils durch UGT1A9 gebildet. Das Isoenzym 1A1, das das Guanoxabenz meist auch in einem relativ großen Ausmaß glucuronidiert, scheint für den Metabolismus dieses Substrates ebenfalls von Bedeutung zu sein. Da an den Konjugationen zahlreiche UGT-Isoenzyme beteiligt sind und die Isoenzyme 1A3, 1A4 und 1A9 sowohl die Kopplung der Glucuronsäure an stickstoff- als auch an sauerstoffhaltige Verbindungen katalysieren können (Ciotti *et al.* 1999, Radomska-Pandya *et al.* 1999, Malfatti und Felton 2001), können anhand der Substratspezifitäten und der Isoenzymaktivitäten keine Aussagen zur Struktur der Guanoxabenzglucuronide abgeleitet werden. Die unter 4.3.4 postulierte Bildung von drei *N*-Glucuroniden neben zwei *O*-Glucuroniden (*E*- und *Z*-Isomer) kann folglich nur durch Studien zur Hydrolyse der Konjugate nach Behandlung der Inkubationsansätze mit β -Glucuronidase unterstrichen werden. Die nicht vollständige Freisetzung des Aglykons aus den Metaboliten mit den Retentionszeiten $4,7 \pm 0,2$ min und $7,4 \pm 0,3$ min in mit rekombinanten UGTs inkubierten Proben und in Inkubationen mit Schweinehepatozytenkulturen (vgl. 4.3.3.2.3.1) deuten auf *N*-Glucuronide hin (Zenser *et al.* 1999, Yueh *et al.* 2001).

Das Auffinden des *N*-Glucuronids von Guanabenz in Schweinehepatozyten-Inkubationen wurde nun mittels enzymatischer Synthese durch das rekombinante humane UGT1A9 bestätigt. Der Bindungsort der Glucuronsäure im Molekül konnte in dieser Versuchsreihe nicht aufgeklärt werden, zumal in anderen *in vitro*-Studien mit dem ebenfalls eine Amidinohydrazon-Struktur besitzenden Tegaserod *N*-Glucuronidierungen an drei Stickstoff-Atomen nachgewiesen wurden (Vickers *et al.* 2001).

Die Isoenzyme UGT1A9 und 1A1 sind an sämtlichen detektierten *O*- bzw. *N*-Glucuronidierungen von Benzamidoxim, *N*-Hydroxydebrisoquin und Guanoxabenz beteiligt, so dass sich daraus in Analogie zu früheren Studien mit Hydroxylaminen (Ciotti *et al.* 1999, Malfatti und Felton 2001, Yueh *et al.* 2001) allgemein eine bevorzugte Umsetzung von Amidoximen, *N*-Hydroxyguanidinen und *N*-Hydroxy-

amidinohydrazonen durch diese UGTs ableiten lässt. Da das UGT1A1 gegenüber dem 1A9 deutlich geringere Umsetzungsraten aufweist, ist die weit verbreitete genetische Variabilität dieses Isoenzym (Fisher *et al.* 2001) für den Metabolismus dieser Modellsubstanzen von geringer Bedeutung. Größere Relevanz könnte hingegen der erst kürzlich aufgedeckte Polymorphismus des UGT1A9s (Girard *et al.* 2004, Paoluzzi *et al.* 2004) haben, da das Isoenzym 1A9 die untersuchten Glucuronidierungen in der Regel mit der größten Effizienz durchführt. Die stark dominierende *N*-Reduktion der drei *N*-hydroxylierten Substrate in einem dem menschlichen Organismus nahen *in vitro*-System (s. Kapitel 4) relativiert allerdings den Einfluss der interindividuellen genetischen Unterschiede des UGT1A9s.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Mithilfe der drei neu etablierten HPLC-analytischen Methoden für die Substrate 17 β -Estradiol, 4-Trifluormethyl-7-hydroxycumarin und Trifluoperazin konnte die Aktivität der acht hepatischen humanen UGT-Isoenzyme erfolgreich bestimmt werden. Ferner wurde die Bildung sämtlicher Glucuronide der Substrate Benzamidoxim, *N*-Hydroxydebrisoquin, Guanoxabenz und Guanabenz, die für Inkubationen mit porcinen und humanen Hepatozyten beschrieben wurden (vgl. Kapitel 4), mittels enzymatischer Synthese bestätigt. Erstmals konnte aufgeklärt werden, welche humanen UGT-Isoenzyme an der Glucuronidierung der *N*-hydroxylierten Substrate beteiligt sind. Es zeigte sich, dass diese Reaktionen bevorzugt von den UGT1A9 und 1A1 katalysiert werden. Da für diese beiden Isoenzyme Polymorphismen (Miners *et al.* 2002, Girard *et al.* 2004) bekannt sind und Glucuronidierungen einen Beitrag zur Detoxifizierung von Substanzen leisten (Ritter 2000), sollte in Zukunft bei der Entwicklung von Arzneistoffen verstärkt auf die Aufklärung von involvierten Isoenzymen geachtet werden. Gleichzeitig sollten *in vitro*-Studien mit dem gut erforschten Hepatozytenkulturmodell (LeCluyse 2001) durchgeführt werden, um das Ausmaß der Glucuronidierung zu bestimmen und so den Einfluss von möglichen Polymorphismen bewerten zu können.

6 Einsatz von porcinen Hepatozytenkulturen für Induktionsstudien

6.1 Einleitung

6.1.1 Bisherige Untersuchungen

Die Testung von Arzneistoffkandidaten auf potenzielle Interaktionen, wie Enzyminduktionen, nimmt in der präklinischen Entwicklung eine bedeutende Rolle ein (Smith 2000). In der Vergangenheit wurden Studien zur Induktion der Cytochrom P450-Enzyme mit lebenden Tieren, meist Nagern, durchgeführt (Silva *et al.* 1998). Speziesunterschiede zwischen Ratte und Mensch schränkten aber diese *in vivo*-Versuche ein (Li *et al.* 1997). Rifampicin, ein potenter Induktor im Menschen und im Kaninchen, zeigte z. B. in der Ratte nur schwache induzierende Eigenschaften. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für den CYP1A2-Induktor Omeprazol gemacht (Shih *et al.* 1999). Pregnenolon-16 α -carbonitril bewirkte einen stark ausgeprägten Anstieg von CYP3A-Enzymen der Ratte, während in humanen Zellen keine derartigen Effekte beschrieben wurden (Li *et al.* 1997). Deshalb werden heute bevorzugt humane Hepatozytenkulturen für Induktionsstudien eingesetzt, da sie bezüglich Aussagekraft und Reproduzierbarkeit ein geeignetes *in vitro*-Modell darstellen (LeCluyse 2001).

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von humanen Leberproben ist jedoch die Anzahl der in der Forschung synthetisierten Substanzen, die so auf Induktionserscheinungen getestet werden können, limitiert (Smith 2000). In jüngster Zeit wird deshalb verstärkt nach Alternativen zu den humanen Hepatozyten geforscht. Die Entwicklung von „normalen“ humanen Zelllinien, in denen alle humanen CYP-Isoenzyme in einem natürlichen Verhältnis exprimiert werden, führte bisher nicht zum Erfolg (Li *et al.* 1997, Hewitt und Hewitt 2004). Da die bekannten, eher lipophilen Induktoren wenig Übereinstimmung in ihrem chemischen Aufbau aufweisen, ist die Vorhersage von induktiven Potenzialen neuer Arzneistoffkandidaten anhand der Molekülstruktur lediglich begrenzt möglich (Smith 2000). Viele Untersuchungen, die sich mit der Induktion von verschiedenen CYP-Isoenzymen in porcinen Leberzellen beschäftigten, weisen auf eine Eignung dieser Zellen für das benannte Einsatzgebiet hin. Tabelle 6.1 gibt einen Überblick über die

bereits in kultivierten Hepatozyten verschiedener Schweinerassen durchgeführten Studien. Die Ergebnisse zeigen große Übereinstimmung mit für den Menschen bekannten Induktoren (vgl. 1.1.6).

Tabelle 6.1 *In vitro-Studien zur Induktion von Cytochrom P450-Isoenzymen in porcinen Hepatozytenkulturen*

CYP-Subfamilie	Schweinerasse	Induktoren	Literatur
1A	Great Yorkshire × Dutch Landrace	β-Naphthoflavon (BNF)	Monshouwer <i>et al.</i> 1998
	German Landrace	3-Methylcholanthren	Hansen <i>et al.</i> 2000
	Yucatan Minipig	Omeprazol	Lu und Li 2001
	Great Yorkshire × Dutch Landrace	Polychlorierte Biphenyle	Van der Burght <i>et al.</i> 2000
	Large White/Piétrain	Phenobarbital	Desille <i>et al.</i> 1999
2B	Large White/Piétrain	Phenobarbital	Desille <i>et al.</i> 1999
2C	Great Yorkshire × Dutch Landrace	Phenobarbital Rifampicin	Monshouwer <i>et al.</i> 1998
2E1	Large White × Landrace	Aceton, Skatol (3-Methylindol)	Doran <i>et al.</i> 2002
3A	Great Yorkshire × Dutch Landrace	Dexamethason Phenobarbital Rifampicin	Monshouwer <i>et al.</i> 1998
	Large White/Piétrain	Phenobarbital	Desille <i>et al.</i> 1999
	Dorac Pigs	Rifampicin	Hosagrahara <i>et al.</i> 1999
	Danish Landrace × Duroc × Yorkshire	Carbamazepin Phenobarbital Phenylbutazon Phenytoin Rifampicin	Olsen <i>et al.</i> 1997, Skaanild und Friis 2000
	German Landrace	Aroclor 1254 3-Methylcholanthren β-Naphthoflavon Phenobarbital	Hansen <i>et al.</i> 2000
	Yucatan Minipig	Rifampicin	Lu und Li 2001

Während Phenobarbital und Rifampicin die Bildung des porcinen CYP3A-Isoenzym in den verschiedenen Schweinerassen steigern, sind Unterschiede in den induktiven Eigenschaften des Dexamethasons zwischen den Rassen festzustellen. Nur in der Kreuzung Great Yorkshire × Dutch Landrace konnte bis jetzt eine CYP3A-Induktion durch Dexamethason detektiert werden (Monshouwer *et al.* 1998), während Olsen *et al.* (1997) bzw. Hosagrahara *et al.* (1999) für die von ihnen untersuchten Rassen sowie Lu und Li (2001) für die Yucatan Minipigs dieses Phänomen nicht nachweisen konnten.

Außerdem sind bislang *in vivo*-Studien mit Schweinen der Rassen Yucatan Minipig, Göttingen Minipig und Large White/Piétrain durchgeführt worden, die zur Bestimmung der Induktion der CYP-Subfamilien 1A, 2A, 2B, 2C, 2E und 3A durch die jeweils eingesetzten Induktoren Phenobarbital, Ethanol bzw. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe dienten (Desille *et al.* 1999, Niemelä *et al.* 1999, Roos *et al.* 2002).

6.1.2 Zielsetzung

Bisherige Studien im Arbeitskreis mit Schweinehepatozytenkulturen als *in vitro*-Modell beschäftigten sich ausschließlich mit der qualitativen Bestimmung von Phase I- und Phase II-Metaboliten stickstoffhaltiger Modellsubstrate. Da Hepatozytenkulturen generell für verschiedenartige Testungen insbesondere in Hinblick auf Toxizität von Xenobiotika oder Interaktionen mit anderen Verbindungen geeignet sind (Gómez-Lechon *et al.* 2001, Petlevski 2003), sollte nun erstmals der Einsatz von porcinen Hepatozyten zur Untersuchung der Induktion von Cytochrom P450-Enzymen im Arbeitskreis etabliert werden. Hierfür sollten zunächst anhand bekannter Induktoren und Markerreaktionen in der Literatur beschriebene Methoden reproduziert werden. Das porcine CYP3A29, das große Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit dem humanen CYP3A4 aufweist (Rendic und Di Carlo 1997, Soucek *et al.* 2001), sollte mittels Rifampicin (s. Abb. 6.1 und Tab. 6.1) induziert und das Ausmaß der gesteigerten Expression mittels der Testosteron-6 β -hydroxylierung, einer Markerreaktion des untersuchten Enzyms (Olsen *et al.* 1997), quantifiziert werden. Die Untersuchung dieses porcinen Isoenzym ist von besonderer Bedeutung, da das humane Gegenstück sowohl für die Umsetzung

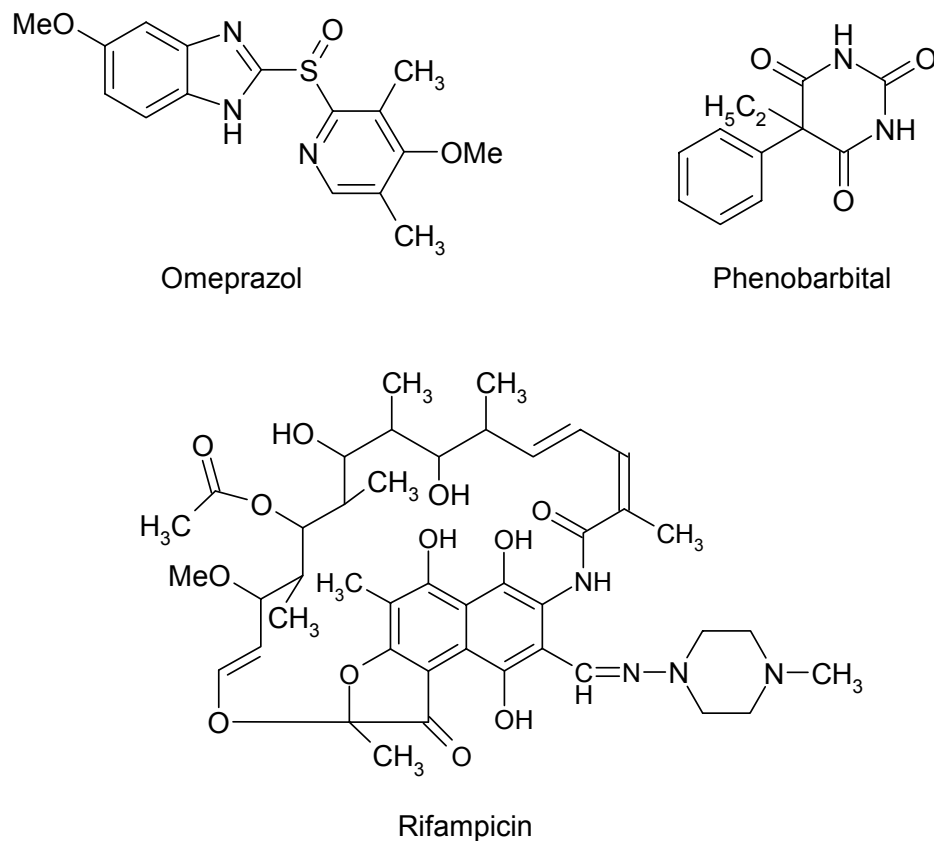


Abbildung 6.1 Induktoren der Cytochrom P450-Unterfamilien 1A (Omeprazol), 2C (Phenobarbital) und 3A (Rifampicin) (Daujot *et al.* 1992, Chen *et al.* 2004, Roymans *et al.* 2004)

zahlreicher Arzneistoffe verantwortlich ist, aber auch dessen Expression durch viele Substanzen reguliert werden kann. Weiterhin sollte ein Enzym der Cytochrom-Unterfamilie 2C untersucht werden. Hierfür wurde das Phenobarbital (Abb. 6.1), ein für Mensch und Schwein bekannter Induktor der CYP2C-Enzyme (Monshouwer *et al.* 1998, Chen *et al.* 2004), ausgewählt. Die Detektion der Induktion sollte über die Tolbutamidhydroxylierung (Abb. 6.2), einer typischen Reaktion des humanen CYP2C9s und des CYP2C19s erfolgen (Lasker *et al.* 1998, Shadle *et al.* 2004). Das porcine CYP2C42 weist 81% Übereinstimmung zu den Genen der humanen CYP2C9, CYP2C18 und CYP2C19 auf (Nissen *et al.* 1998).

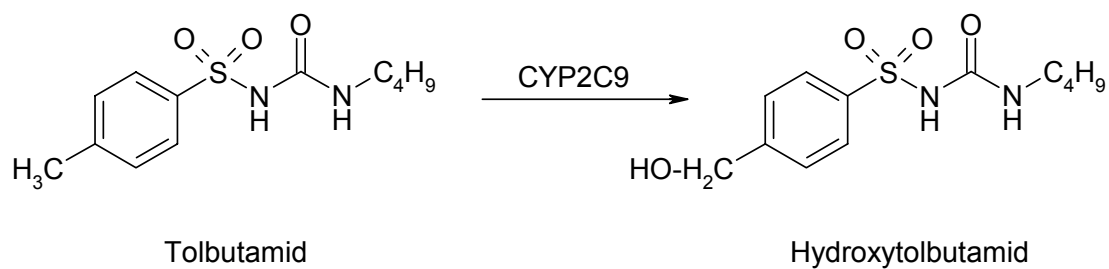


Abbildung 6.2 Tolbutamidhydroxylierung durch das humane CYP2C9-Isoenzym (Shadle et al. 2004)

Schließlich sollte Omeprazol (Abb. 6.1), bekannt für die Induktion von humanem CYP1A2 (Farrell und Murray 1990, Daujat *et al.* 1992), zur Induktion des entsprechenden Enzyms im Schwein eingesetzt werden und diese fluorimetrisch über das nach Deethylierung entstandene Resorufin (vgl. 3.1) detektiert werden. Zumal bisher keine diesbezüglichen Studien mit Hepatozyten des Deutschen Hausschweins bekannt waren, erschien die Wahl des Omeprazols als interessant. Lu und Li (2001) konnten bislang nur die entsprechende Reaktion in Leberzellen des Yucatan Minipigs nachweisen. Der Einsatz des Induktors Omeprazol führte außerdem dazu, dass somit Isoenzyme aus drei unterschiedlichen CYP-Unterfamilien (1A, 2C, 3A) durch drei verschiedene Induktortypen untersucht werden konnten.

6.2 Methoden

6.2.1 Herstellung der Induktions- und Inkubationsmedien

Zusätzlich zu dem im zweiten Kapitel (Tab. 2.1) dargestellten Kultivierungsmedium (Williams' E Medium + Zusätze), das zum Anwachsen der Zellen in den ersten 24 h nach der Kultivierung eingesetzt wurde, sind für Induktionsstudien ein serumfreies induktorhaltiges Induktionsmedium und ein serum- und induktorfrees, aber lösungsmittelhaltiges Kontrollmedium erforderlich (Lu und Li 2001).

Sowohl das Induktionsmedium als auch das Kontrollmedium bestanden aus einem Grundmedium, dem Williams' E Medium einschließlich der in Tabelle 6.2 aufgelisteten Zusätze.

Tabelle 6.2 Zusammensetzung des Grundmediums (Williams' E Medium zuzüglich der aufgeführten Bestandteile)

Bestandteil	Konzentration im Medium
Glucagon	0,014 µg/ml
Prednisolon	9,6 µg/ml
Insulin	0,16 U/ml
Glutamin	2 mM
Penicillin	150 U/ml
Streptomycin	150 µg/ml

Zu Induktionszwecken wurde das Grundmedium mit täglich frisch in DMSO gelöstem Induktor versetzt, während zur Herstellung des dazugehörigen Kontrollmediums nur die entsprechende DMSO-Menge, die maximal 0,15% betrug, dem Grundmedium hinzugefügt wurde. Die Konzentrationen der Induktoren für die verschiedenen Cytochrom P450-Enzyme, die in unterschiedlichen Studien untersucht wurden, sind in der Tabelle 6.3 aufgeführt.

Tabelle 6.3 Eingesetzte Induktorkonzentrationen

Zu induzierendes porcines Cytochrom P450-Isoenzym	Induktor	Induktorkonzentration im Medium (µM)
CYP1A2	Omeprazol	50 (Li <i>et al.</i> 1997, Lu und Li 2001)
CYP2C42	Phenobarbital	1500 (Monshouwer <i>et al.</i> 1998)
CYP3A29	Rifampicin	25 (Lu und Li 2001, Roymans <i>et al.</i> 2004)

Als Vorinkubationsmedium diente eine 3 mM Salicylamidlösung in Krebs-Henseleit-Puffer (KHB-Puffer) pH 7,4 (Lu und Li 2001). Das Inkubationsmedium bestand aus dem Vorinkubationsmedium, dem das Markersubstrat für das jeweilig induzierte P450-Isoenzym hinzugefügt wurde. Folgende Endkonzentrationen der Substrate bzw. des Lösungsmittels wurden eingesetzt: 2,5 µM 7-Ethoxyresorufin (CYP1A2), 50 µM Tolbutamid (CYP2C42), 175 µM Testosteron (CYP3A29) und 0,25% DMSO.

6.2.2 Durchführung der Induktion

Das Ausplattieren der Schweinehepatozyten, der erste Mediumswechsel und die Kultivierung der Zellen erfolgten nach den in Kapitel 2 beschriebenen Methoden.

Die Induktionsstudien begannen 24 h nach dem Ausplattieren. Hierfür wurde zunächst das alte serumhaltige Medium entfernt und durch frisch hergestelltes Induktionsmedium ersetzt. Je Studienansatz wurde nur ein Cytochrom P450-Isoenzym induziert. Parallel wurden auf die entsprechende Weise weitere Zellkulturplatten mit Kontrollmedium behandelt. Als Leerwerte dienten hepatozytenfreie Gewebekulturplatten mit Induktionsmedium. Im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte erfolgte die Induktion über einen Zeitraum von 1-3 Tagen. Alle 24 h wurden die Hepatozyten von dem alten Medium befreit und mit dem jeweilig neuen überschichtet (4 ml je Petrischalen).

6.2.3 Inkubation von Markersubstraten

Das Ausmaß der Induktion wurde über die Umsetzung von Markersubstraten der einzelnen CYP-Isoenzyme bestimmt. Hierfür wurden nach 24, 48 bzw. 72 h Induktion jeweils drei bis neun Zellkulturschalen zur Untersuchung der Induktions-, Kontroll- und Leerwerte herangezogen. Das Medium wurde von den Gewebekulturplatten abgesaugt und die Hepatozyten zweimal mit 2 ml warmer 0,15 M NaCl-Lösung gewaschen. Es folgte eine zehnmünütige Vorinkubation mit 37°C warmem Vorinkubationsmedium bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte. Im Anschluss wurden die zellbewachsenen Petrischalen mit der substrathaltigen Inkubationslösung unter Standardbedingungen 60 min im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Zellüberstand abgenommen. Die Proben zur Bestimmung der CYP1A2-Induktion wurden direkt nach der unter 6.2.6 beschriebenen Methode vermessen. Die Ansätze, die zur späteren Analyse der 6β-Hydroxylierung von Testosteron bzw. der Methylhydroxylierung von Tolbutamid per HPLC dienten, wurden bei -20°C eingefroren, gefriergetrocknet und bis zur Vermessung bei -20°C gelagert. Mit den Kontroll- bzw. Leerwertansätzen wurde entsprechend verfahren.

6.2.4 HPLC-Analytik zur Bestimmung der 6 β -Hydroxylierung von Testosteron

Die Proben wurden in 150 μ l Fließmittel gelöst, bei 10000 U/min zentrifugiert und der klare Überstand per HPLC analysiert. Die Quantifizierung des 6 β -Hydroxytestosteron erfolgte nach der unter 3.2.2.3 beschriebenen Methode.

6.2.5 HPLC-Analytik zur Bestimmung der Methylhydroxylierung von Tolbutamid

Vor Vermessung wurden die gefriergetrockneten Proben in 150 μ l Fließmittel gelöst, bei 10000 U/min zentrifugiert und ein Teil des Überstands in die HPLC injiziert. Die von Siebe (1998) entwickelten HPLC-analytischen Bedingungen wurden leicht modifiziert.

HPLC-Pumpe	Gradientenpumpe W510 mit Systemkontroller (Waters, Milford, CT, USA)
Detektor	W486 Tunable Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)
Autosampler	W710 WISP (Waters, Milford, CT, USA)
Integrator	Maxima [®] -Software 820, Version 3.30 (Waters, Milford, CT, USA)
Stationäre Phase	LiChrospher [®] 100 RP-8, 125 \times 4 mm, Partikelgröße 5 μ m, in einer LiChroCART [®] -Kartusche mit Vorsäule RP Select-B, 4 \times 4 mm, Partikelgröße 5 μ m (Merck, Darmstadt)
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)
Mobile Phase	Fließmittel A: Aqua bidest./ Acetonitril 87:13 (V/V) pH 2,7, eingestellt mit Phosphorsäure 85% Fließmittel B: Acetonitril

Gradientenprofil	Laufzeit (min)	A (%)	B (%)
	0 – 30	100	0
	30 – 35	65	35
	35 – 40	65	35
	40 – 45	100	0
	45 – 55	100	0

Flussrate	1,0 ml/min
Detektion	UV, 220 nm
Injektionsvolumen	10 μ l
Retentionszeiten	Hydroxytolbutamid: $27,7 \pm 0,5$ min Tolbutamid: $41,6 \pm 0,2$ min

Der verwendete Eluent wurde nach der Herstellung durch einen Sartorius-Membranfilter (Porendurchmesser 0,45 μ m) filtriert und im Ultraschallbad 15 min entgast. Die Standardverbindungen und die Leerwerte wurden jeweils parallel zu den Induktions- und Kontrollansätzen vermessen.

Die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte über eine 7-Punkt-Kalibrierung. Hierzu wurden Lösungen mit den Konzentrationen von 5 bis 75 μ M Hydroxytolbutamid im Fließmittel hergestellt und mittels HPLC vermessen. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die oben angegebenen Konzentrationen des Metaboliten in 50 μ M substrathaltigem Medium hergestellt, auf Zellkulturschalen ohne Hepatozyten inkubiert und dann wie die Inkubationsansätze (s. 6.2.3) behandelt.

6.2.6 Fluorimetrische Bestimmung der Deethylierung von 7-Ethoxyresorufin

Die fluorimetrische Bestimmung von Resorufin wurde direkt im Anschluss an die Inkubationen nach dem unter 3.2.2.2 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Da das in dem Inkubationsmedium enthaltende Salicylamid die Glucuronidierung und Sulfatierung von Resorufin verhindert (Nakagawa und Tayama 2000), wurden die Proben von den Angaben in 3.2.2.2 abweichend nicht durch Enzymzusatz dekonjugiert.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Induktion des porcinen CYP3A29-Isoenzym

Die 6 β -Hydroxylierung des Testosterons stellt eine Markerreaktion für das humane Cytochrom P450 3A4-Isoenzym und aufgrund der großen Ähnlichkeit in der Primärstruktur auch für das entsprechende porcine CYP3A29-Isoenzym dar (Olsen *et al.* 1997, Rendic und Di Carlo 1997, Soucek *et al.* 2001). Das Ausmaß der Induktion durch Rifampicin wurde folglich anhand dieser Markerreaktion bestimmt (Skaanild und Friis 2000, Lu und Li 2001). Hierfür wurden zunächst Kalibrierungen und Wiederfindungen durchgeführt, wobei die erhaltenen Signalflächen des 6 β -Hydroxytestosterons zur Quantifizierung desselben dienen (vergl. 3.3.2.3).

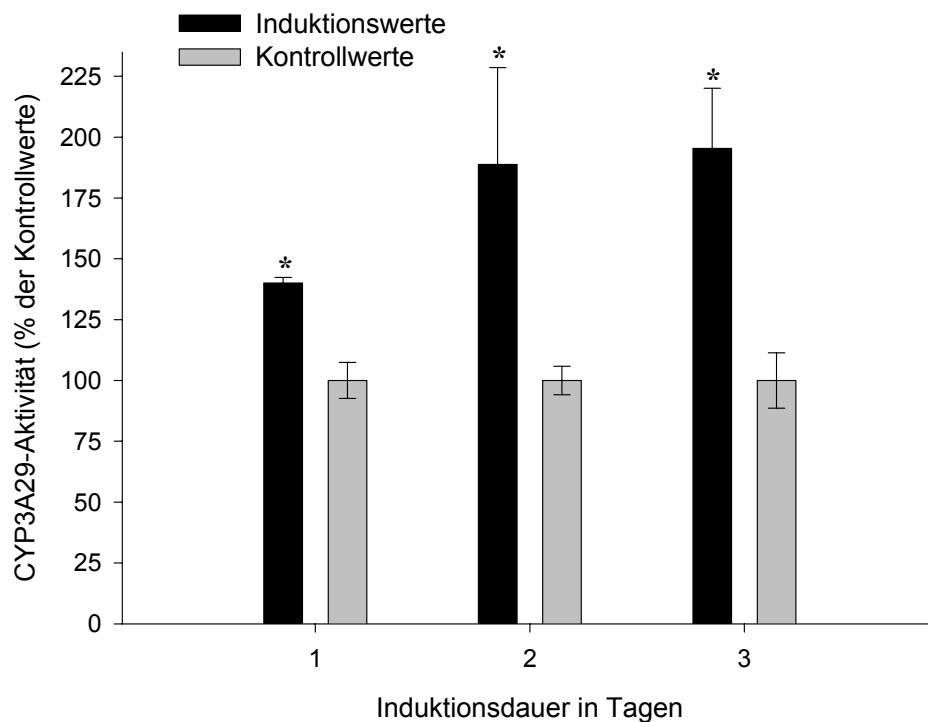


Abbildung 6.3

Steigerung der durch CYP3A29 katalysierten 6 β -Hydroxylierung von Testosteron in mit Rifampicin behandelten Schweinehepatozytenkulturen gegenüber den Kontrollansätzen

Aufgetragene Werte wurden auf den Kontrollwert (100%) bezogen und repräsentieren Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei separaten Inkubationsansätzen. * Statistisch signifikanter Unterschied zu Kontrollansätzen $p < 0,01$ (Student's *t*-Test)

Die Abbildung 6.3 zeigt die prozentuale CYP3A29-Aktivität in den mit Induktor behandelten Schweinehepatozyten bezogen auf den Kontrollwert (100%) an drei aufeinander folgenden Tagen. Zu allen Messzeitpunkten waren die Umsetzungsraten in den induzierten Proben gegenüber den Kontrollansätzen signifikant erhöht. Begonnen mit einem Induktionswert von 125% nach 24 Stunden stiegen die Werte auf ca. 180% nach 48 bzw. 72 Stunden Induktionszeit an.

6.3.2 Induktion eines porcinen CYP2C-Isoenzym

Die durch Phenobarbital hervorgerufene Induktion der porcinen CYP2C-Isoenzyme (Monshouwer *et al.* 1998) wurde über die Methylhydroxylierung des Tolbutamids, einer für Mensch und Schwein typischen Reaktion der zur CYP2C-Familie gehörenden Isoenzyme (Anzenbacher *et al.* 1998), bestimmt. Zur Quantifizierung des Metaboliten wurden Kalibrierungen und Wiederfindungen mit der unter 6.2.5 beschriebenen Analytik durchgeführt und so die Konzentrationen mit den entsprechenden Peakflächen des Hydroxytolbutamids korreliert.

Die Kalibrierungen ($r^2 > 0,9978$ und $n = 3$, je zweimal vermessen) und Wiederfindungen ($r^2 > 0,9921$ und $n = 3$, je zweimal vermessen) von Hydroxytolbutamid verliefen über den gesamten Konzentrationsbereich linear (Abb. 6.4). Die daraus abgeleiteten Wiederfindungsraten betragen $83,3 \pm 4,0\%$, wobei für die Abweichungen Adhäsionseffekte des Metaboliten an die Zellkulturschale und Verluste bei der Gefriertrocknung anzunehmen waren.

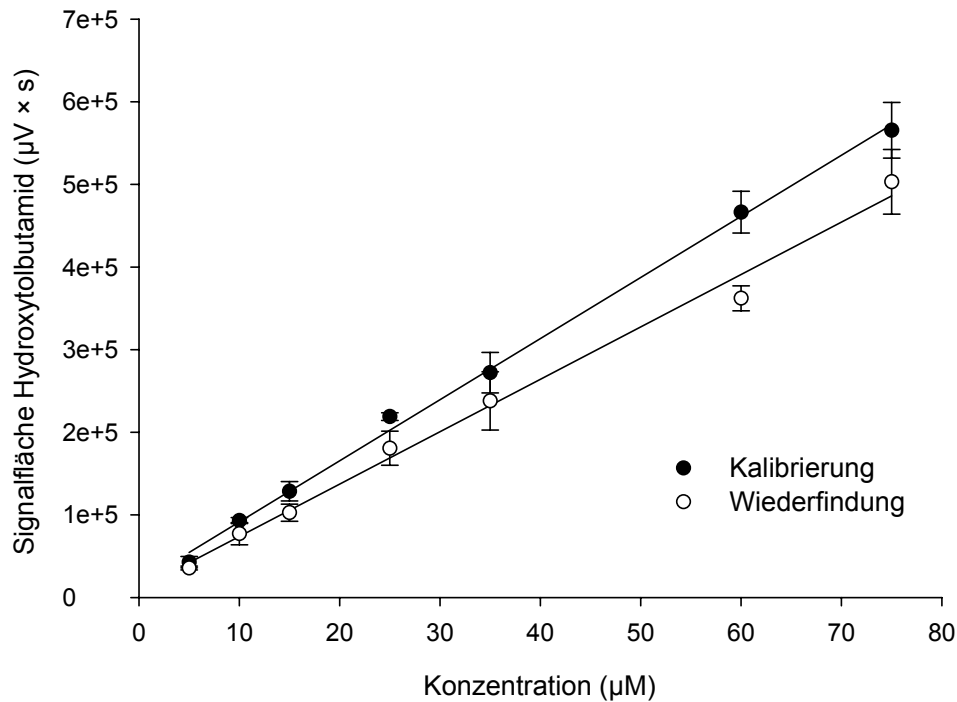


Abbildung 6.4 *Kalibrierung und Wiederfindung von Hydroxytolbutamid*
 Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$ Ansätzen, je zweimal vermessen (Kalibrierung $r^2 = 0,9978$; Wiederfindung $r^2 = 0,9921$).

Tabelle 6.4 gibt einen Überblick über die Bildungsrate von Hydroxytolbutamid in mit Phenobarbital behandelten und unbehandelten porcinen Hepatozytenkulturen.

Tabelle 6.4 *Übersicht der Umsetzungsrate von Tolbutamid zum hydroxylierten Metaboliten durch CYP2C-Isoenzyme in Schweinehepatozytenkulturen*

Induktionsdauer (h)	Aktivität \pm SD (pmol/(min \times 3×10^6 Zellen))	
	Induktion	Kontrolle
24	45,1 \pm 1,4	14,9 \pm 1,4
48	101,4 \pm 13,7	23,0 \pm 2,8
72	182,1 \pm 12,3	49,6 \pm 4,5

In Abbildung 6.5 sind die prozentualen CYP2C-Aktivitäten bezogen auf die Kontrollwerte ohne Phenobarbital-Behandlung (100%) bezüglich der Tolbutamid-hydroxylierung in kultivierten Schweinehepatozyten über einen Induktionszeitraum von drei Tagen dargestellt. Innerhalb der ersten zwei Tage waren steigende prozentuale Aktivitäten des CYP2C-Isoenzym von 300% am ersten Tag auf 440% am zweiten Tag zu verzeichnen. Das Verhältnis der Hydroxytolbutamid-Bildung in induzierten Zellen zu dem in nicht induzierten Zellen verringerte sich nach 72 Stunden wieder auf 370%. Statistisch signifikante Unterschiede waren zwischen den auf die Kontrollwerte bezogenen CYP2C-Aktivitäten der induzierten Ansätze und den jeweiligen Kontrollen an allen drei Tagen zu verzeichnen.

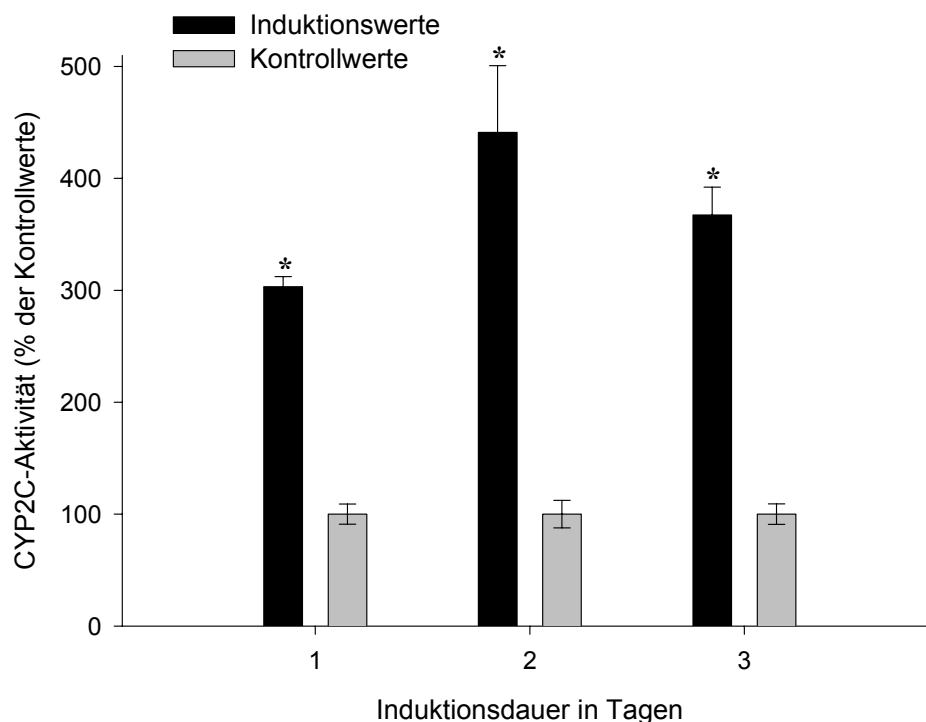


Abbildung 6.5

Steigerung der durch CYP2C katalysierten Methylhydroxylierung von Tolbutamid in mit Phenobarbital behandelten Schweinehepatozytenkulturen gegenüber den Kontrollansätzen

Aufgetragene Werte wurden auf den Kontrollwert (100%) bezogen und repräsentieren Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei separaten Inkubationsansätzen. * Statistisch signifikanter Unterschied zu Kontrollansätzen $p < 0,001$ (Student's t-Test)

6.3.3 Induktion des porcinen CYP1A2

Um den Einfluss der induzierenden Wirkung des Omeprazols auf CYP1A2-Isoenzyme bestimmen zu können, wurde in den Hepatozyten auf die Deethylierung des 7-Ethoxyresorufins hin getestet (Lu und Li 2001). Die resultierenden Fluoreszenzintensitäten der Kalibrierungen und Wiederfindungen (vergl. 3.2.2.2) wurden für die Auswertung des in den Inkubationsansätzen gebildeten Resorufins herangezogen.

Nach 24, 48 und 72 Stunden resultierten jeweils signifikant höhere Enzymaktivitätswerte aus den induzierten Zellkulturen gegenüber denen der Kontrolle. Verdoppelte bis 2,5fache Umsetzungsraten des CYP1A2s waren nach Induktion durch Omeprazol innerhalb der drei Induktionstage zu verzeichnen (Abb. 6.6).

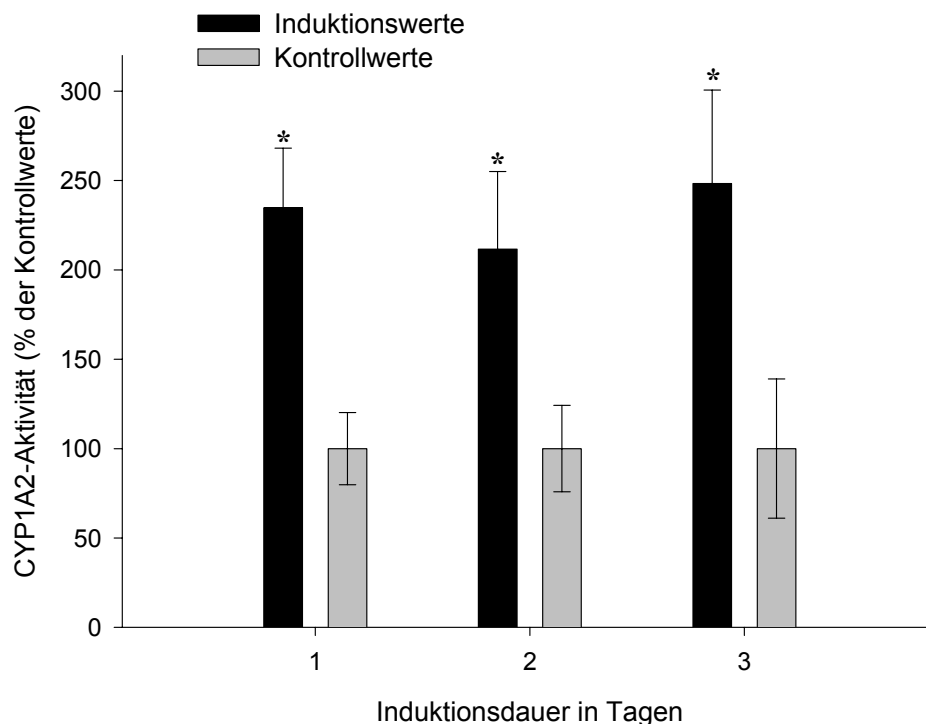


Abbildung 6.6

Steigerung der durch CYP1A2 katalysierten Deethylierung von Ethoxyresorufin in mit Omeprazol behandelten Schweinehepatozytenkulturen gegenüber den Kontrollansätzen

Aufgetragene Werte wurden auf den Kontrollwert (100%) bezogen und repräsentieren Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei separaten Inkubationsansätzen. * Statistisch signifikanter Unterschied zu Kontrollansätzen $p < 0,001$ (Student's *t*-Test)

Trotz leicht absinkender absoluter Umsetzungsraten in den Induktions- und Kontrollansätzen während der Kultivierungszeit (Tab. 6.5) konnten die induktiven Eigenschaften des Omeprazols, das in Konzentrationen von 50 μM eingesetzt wurde, bezüglich des CYP1A2-Isoenzym des Deutschen Hausschweins eindeutig gezeigt werden. Die nach 48 Stunden ermittelten Induktionswerte schwankten in Abhängigkeit von den Schweinehepatozytenchargen zwischen 172% und 920%.

Tabelle 6.5 *Übersicht der Umsetzungsraten von 7-Ethoxyresorufin zum Resorufin durch CYP1A2-Isoenzyme in mit Omeprazol behandelten Schweinehepatozytenkulturen und entsprechenden Kontrollansätzen*

Induktionsdauer (h)	Aktivität \pm SD (pmol/(min \times 3 \times 10 ⁶ Zellen))	
	Induktion	Kontrolle
24	27 \pm 4	11 \pm 2
48	18 \pm 4	9 \pm 2
72	18 \pm 3	7 \pm 3

6.4 Diskussion

Die in dieser Arbeit dargestellten Induktionsstudien wurden im Einklang mit allgemein anerkannten Testbedingungen durchgeführt (Li *et al.* 1997, Coecke *et al.* 1999). Da aber erst in den letzten Jahren verstärkt auf eine Standardisierung von Kultivierungstechniken geachtet wird (Madan *et al.* 2003), ist ein Vergleich mit älteren Studien nur eingeschränkt möglich. Das Ausmaß der Enzyminduktion wird durch unterschiedliche Induktorkonzentrationen erheblich beeinflusst (Li *et al.* 1997, Lu und Li 2001), so dass eine diesbezügliche Uneinheitlichkeit der Studien die Gegenüberstellung der jeweiligen Ergebnisse ebenso erschwert.

Zur Diskussion der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden deshalb nur diejenigen Studien herangezogen, die nach gleicher oder sehr ähnlicher Methodik durchgeführt wurden.

Der in der vorliegenden Studie erzielte vierfache Anstieg der Tolbutamidhydroxylierung nach 48 Stunden Phenobarbital-Behandlung (1,5 mM) ist mit einer von Monshouwer *et al.* (1998) ebenfalls für Schweinehepatozytenkulturen beschriebenen Steigerung um 300% vergleichbar und zeigt somit eine Reproduzierbarkeit der Literaturdaten durch das in dieser Arbeit angewandte Verfahren. In ähnlich angelegten Studien mit menschlichen Zellen führten etwas geringere Induktorkonzentrationen von 1 mM sogar zu einer sechsfachen Erhöhung der mRNA des CYP2C9s und zu zehnfach erhöhten mRNA-Mengen des CYP2C19s (Raucy *et al.* 2002). Demzufolge wurde festgestellt, dass die Phenobarbital-vermittelte CYP2C-Induktion in Zellkulturen des Schweins trotz größerer Induktorkonzentration etwas geringer ausfällt als in denen des Menschen.

Die Untersuchung der CYP3A29-Induktion durch Einsatz von Rifampicin (25 µM) diente ebenfalls zur Etablierung der Methode im Arbeitskreis. Von mir gezeigte Induktionswerte um 180% in Schweinehepatozytenkulturen entsprechen denen aus mit Hepatozyten des Yucatan Minipigs unter denselben Bedingungen durchgeführten Studien (Lu und Li 2001). Dazu parallel analysierte Induktionsansätze mit humanen Leberzellen ergaben eine vier- bis 30fache Steigerung der Testosteron-6β-Hydroxylierung bei Rifampicin-Konzentrationen zwischen 30 und 100 µM (Lu und Li 2001, Roymans *et al.* 2004). Diese Ergebnisse demonstrieren zum einen die Vergleichbarkeit der durch Rifampicin-vermittelten CYP3A29-Induktion in Zellen des Yucatan Minipigs und des Deutschen Hausschweins, ferner zeigen sie aber auch, dass die Induktion dieses Isoenzym im Menschen in einem deutlich höheren Umfang abläuft.

Erstmals konnte in dieser Arbeit die Induzierbarkeit des porcinen CYP1A2 durch Omeprazol (50 µM) in Hepatozyten des Deutschen Hausschweins gezeigt werden. Nach 48 Stunden gemessene Werte, die das Ausmaß der Expressionsteigerung angeben, lagen in verschiedenen Zellchargen zwischen 178% und 920%, während Lu und Li (2001) fünf- bis siebenfache Erhöhungen des CYP1A2 bei einer Induktorkonzentration von 100 µM im Yucatan Minipig nachwiesen. Die dargestellten großen interindividuellen Schwankungen im Ansprechverhalten auf die induzierenden Substanzen stehen in Einklang mit früheren Studien und verdeutlichen

die Notwendigkeit der Durchführung der Versuche mit mehreren Leberzellchargen (Silva *et al.* 1998, Lin und Lu 2001, Madan *et al.* 2003). Im Gegensatz zu der Dexamethason-vermittelten CYP3A29-Induktion, die nur in der Kreuzung Great Yorkshire × Dutch Landrace (Monshouwer *et al.* 1998), nicht aber in Yucatan Minipigs (Lu und Li 2001) detektiert werden konnte, wurde die CYP1A2-Induktion durch Omeprazol sowohl in Hepatozyten des Deutschen Hausschweins als auch in denen des Yucatan Minipigs nachgewiesen, so dass diesbezüglich keine Variabilitäten zwischen den Schweinerassen in Erscheinung traten. Roymans *et al.* (2004) ermittelten nach 48stündiger Omeprazol-Behandlung (50 µM) eine Zunahme der 7-Ethoxyresorufindeethylierung in Inkubationen mit menschlichen Zellen um 3800% gegenüber den Kontrollansätzen. Dieses Ergebnis spiegelt abermals das bessere Ansprechen der humanen Zellen auf den Induktor im Vergleich zu den porcinen Zellen wieder.

Eine qualitativ übereinstimmende Induktionsfähigkeit der drei untersuchten CYP-Isoenzyme der Spezies Schwein und Mensch durch bestimmte Induktoren konnte in dieser Arbeit mithilfe der eingesetzten Hepatozyten des Deutschen Hausschweins und durch anschließenden Vergleich mit Literaturdaten aus Studien mit humanen Zellen (Monshouwer *et al.* 1998, Lu und Li 2001, Roymans *et al.* 2004) gezeigt werden. Obwohl das Ausmaß der Phenobarbital-, Rifampicin- und Omeprazol-vermittelten Enzyminduktionen in Schweinehepatozyten gegenüber Ansätzen mit humanen Zellen (Lu und Li 2001, Roymans *et al.* 2004) jeweils verringert war, besteht bezüglich der durch Omeprazol hervorgerufenen CYP1A2-Induktion eine größere quantitative Übereinstimmung zwischen Mensch und Schwein als zwischen Mensch und Ratte, in der dieser Induktor kaum Wirkung zeigte (Shih *et al.* 1999). Diese Beobachtung unterstreicht Schlussfolgerungen früherer Studien, die auf eine Eignung porciner Hepatozytenkulturen für den Einsatz in qualitativ ausgelegten Screening-Untersuchungen hinwiesen (vgl. Tab. 6.1).

Da sämtliche aus *in vivo*-Studien am Menschen bekannte CYP-Induktoren auch *in vitro* in Zellkultursystemen ihre Wirkung offenbaren (Li *et al.* 1997), ist somit eine qualitative Übertragbarkeit der *in vitro*-Daten möglich (Silva *et al.* 1998). Die Übertragung von *in vitro* beschriebenen Konzentrationsabhängigkeiten auf die

Situation in lebenden Organismen gestaltet sich schwierig. Hingegen ist die Einordnung der getesteten Substanzen nach ihrem Induktionspotenzial in eine Rangliste anhand des Vergleichs der induktiven Eigenschaften neuer Verbindungen zu denen eines bekannten Standards (Positivkontrolle) eine häufig praktizierte Methode (LeCluyse 2001). Es ist allerdings bekannt, dass der Protonenpumpeninhibitor Omeprazol *in vivo* selten in ausreichender Konzentration vorliegt, um signifikante, klinisch relevante Arzneimittel-Interaktionen hervorzurufen (Daujat *et al.* 1992, Dilger *et al.* 1999, LeCluyse *et al.* 2000).

6.5 Zusammenfassung und Ausblick

Mit dem hier gezeigten Verfahren lassen sich die untersuchten porcinen CYP-Isoenzyme 1A2, 2C42 und 3A29 durch für den Menschen bekannte Induktoren, denen drei unterschiedliche Induktionsmechanismen zugrunde gelegt werden (s. 1.1.6), in ihrer Expression statistisch signifikant steigern. Mittels der erfolgreich verlaufenden Reproduktion der Phenobarbital- bzw. Rifampicin-vermittelten Induktion des CYP2C42s und des CYP3A29s konnte die unter 6.2 beschriebene Methode im Arbeitskreis etabliert werden. Außerdem konnte erstmals eine signifikante Erhöhung des porcinen Cytochrom P450-Isoenzym 1A2 durch 24- bis 72stündige Omeprazol-Einwirkung auf Hepatozytenkulturen des Deutschen Hausschweins gegenüber den Basalwerten gezeigt werden. Diese Beobachtung stimmt mit der entsprechenden Induktion in menschlichen Zellen und denen des Minipigs überein (Lu und Li 2001), so dass im Gegensatz zur Ratte, in der Omeprazol nur eine sehr schwach induzierende Wirkung aufweist (Lu und Li 2001), eine größere Ähnlichkeit der zwei Schweinerassen mit dem Menschen bezüglich der CYP-Induzierbarkeit festzustellen ist.

Nach dem heutigen Forschungsstand werden zurzeit jedoch die humanen Hepatozytenkulturen als Goldstandard für den Einsatz in Induktionsstudien angesehen (LeCluyse 2001). Als Alternative zu dem limitierten Humanzellangebot bieten sich Präparationen aus Schweineleber an, die in einer großen Menge von Schlachttieren verfügbar sind. Sowohl ethische Gründe als auch günstige Anschaffungspreise sprechen für den Einsatz von porcinen Hepatozytenkulturen als

in vitro-Modell für Induktionsstudien. Um eine weit verbreitete Testung zu ermöglichen, sollten in Zukunft noch mehr Daten zur Induktion in porcinen Leberzellen, insbesondere der selten untersuchten CYP2A-, 2B-, 2C-, 2E- und 4A-Isoenzyme, aber auch der Phase II-Enzyme gesammelt werden, um offene Fragen bezüglich der Korrelation des Metabolismus der Spezies Schwein und Mensch beantworten zu können (Li *et al.* 1997).

Validierte Verfahren (Coecke *et al.* 1999) wären ebenso wie der Einsatz einer einheitlichen Schweinerasse für die Zukunft wünschenswert, um die einzelnen Studien besser miteinander vergleichen zu können.

Das Induktionspotenzial von Wirksubstanzen kann jedoch weder durch *in vitro*- oder *in vivo*-Studien noch *in silico* mittels Computerprogrammen ganz korrekt vorhergesagt werden, so dass erst die kombinierte Auswertung von experimentellen und virtuellen Daten zu einer Verbesserung der Erfolgsrate führen wird (Mankowski und Ekins 2003). Die langfristig angestrebte quantitative Extrapolation der *in vitro*-Daten auf die *in vivo*-Situation bleibt für die pharmazeutische Wissenschaft eine der größten Herausforderungen der nächsten Jahre (LeCluyse 2001, Lin und Lu 2001).

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit dem Einsatz von Hepatozytenkulturen, die in einem großen Umfang die *in vivo*-Situation nachahmen, sowohl für Untersuchungen induktiver Eigenschaften von Xenobiotika als auch für Biotransformationsstudien stickstoffhaltiger Modellsubstanzen. Das Auffinden von Phase II-Metaboliten sowie die Aufklärung der an diesen Konjugationen beteiligten UDP-Glucuronyltransferase-Isoenzyme nahmen hierbei eine zentrale Rolle ein.

Vorangegangene Studien zeigten bereits die Eignung von porcinen Hepatozytenkulturen für Metabolismusstudien (Clement *et al.* 2001, Zuber *et al.* 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach literaturbekannter Vorschrift (Christiansen 2000) zunächst porcine Hepatozyten aus schlachtfischem Lebergewebe isoliert und erfolgreich kultiviert. Durch Optimierung einiger Parameter während der Gewinnung konnten Ausbeute und Vitalität der Zellen leicht gesteigert werden. Umfassende Charakterisierungen der Hepatozyten mittels verschiedener Markersubstrate für Phase I- und Phase II-Reaktionen wiesen auf eine ebenfalls gute metabolische Qualität hin. Der Erhalt der Enzymaktivitäten über einen Zeitraum von mehreren Tagen ermöglichte – im Einklang mit früheren Studien (Zurlo und Arterburn 1996, LeCluyse 2001) – den Einsatz der Leberzellkulturen als *in vitro*-Modell für weiterführende Metabolismus- und Induktionsstudien. Um mögliche Korrelationen zwischen dem porcinen und humanen Metabolismus aufdecken zu können, wurden zusätzlich kommerziell erworbene, kryokonservierte humane Hepatozyten in Kultur gehalten.

Für die Untersuchung der Biotransformation verschiedener stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen, die Amidin-, Guanidin- und Amidinohydrazonestrukturen enthielten, wurden die Modellsubstanzen Benzamidin, Debrisoquin und Guanabenz sowie deren *N*-hydroxylierten Derivate (Benzamidoxim, *N*-Hydroxydebrisoquin, Guanoxabenz) ausgewählt und entsprechende LC/MS-analytische Methoden entwickelt.

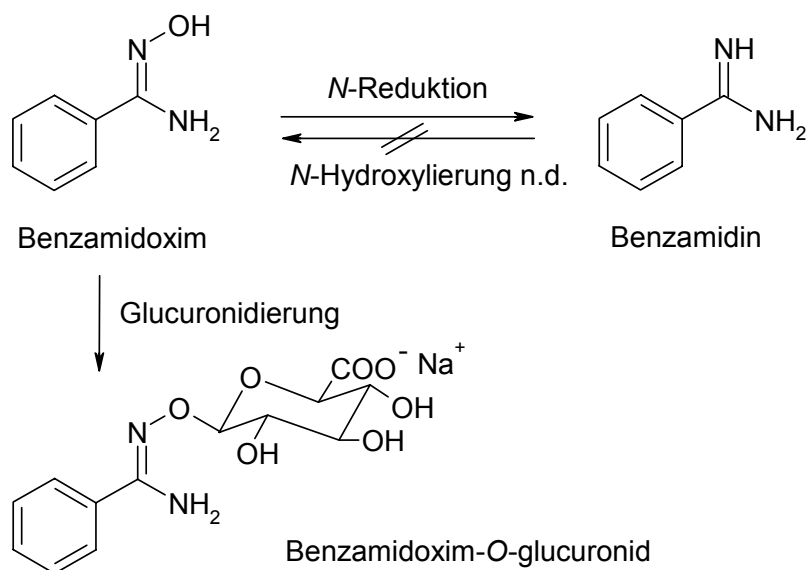


Abbildung 7.1 Nachgewiesene Biotransformationsreaktionen des Benzamidoxims in humanen Hepatozytenkulturen, n.d. nicht detektierbar

In Analogie zu früheren Studien mit mikrosomalen Präparationen (Clement *et al.* 1993c, Clement *et al.* 1996, Clement 2002) konnte nun erstmals in porcinen und humanen Hepatozytenkulturen die Dominanz der *N*-Reduktion der *N*-hydroxylierten Derivate gezeigt werden (Abb. 7.1, 7.2, 7.3). Die *N*-Oxygenierung konnte weder für die Amidin- und Guanidin- noch für die Amidinohydrasonstrukturen detektiert werden. Diese Beobachtung bestätigt zum einen das Prinzip des Einsatzes von Amidoximen als Prodrug von Amidinen auch in einer zellulären Umgebung (Abb. 7.1). Zum anderen kann die rasche Umwandlung des Guanoxabenz (Abb. 7.2), das im Gegensatz zum *N*-reduzierten Guanabenz mutagene Eigenschaften im Ames-Test aufweist (Clement *et al.* 1996), in Hinblick auf die Detoxifizierung als bedeutender Prozess angesehen werden.

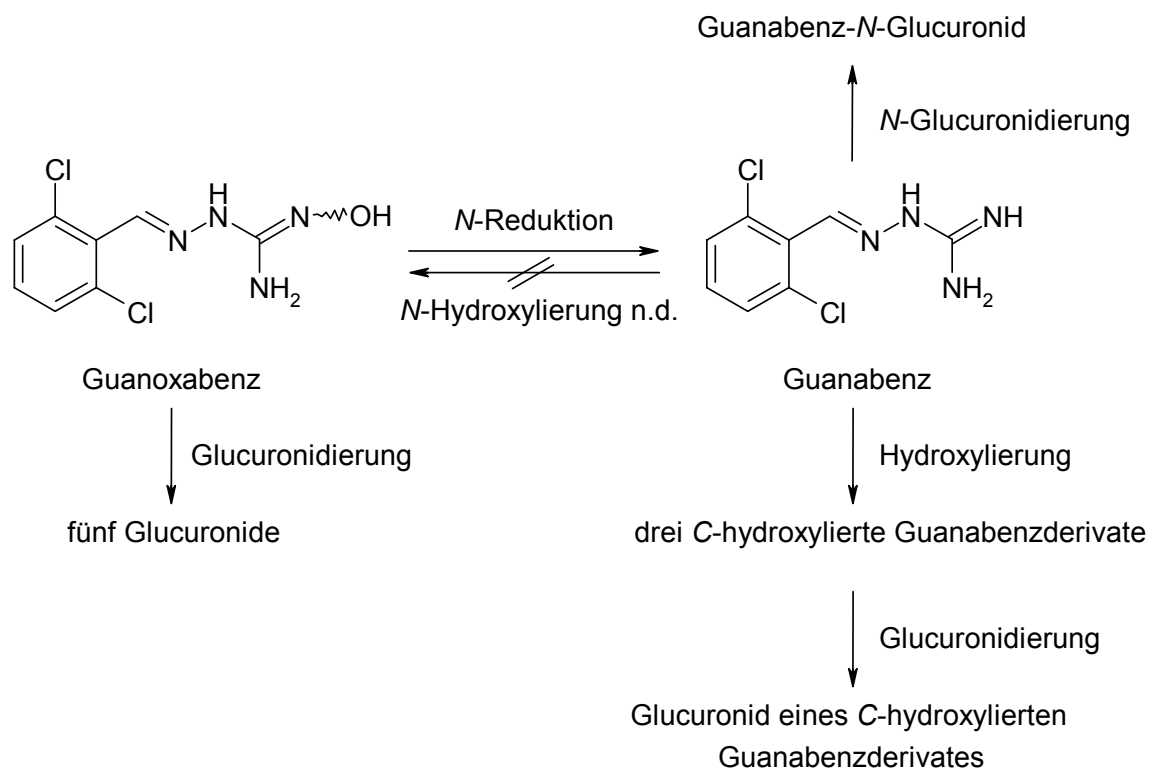


Abbildung 7.2 *Nachgewiesene Biotransformationsreaktionen von Guanoxabenz und Guanabenz in Schweinehepatozytenkulturen, n.d. nicht detektierbar*

Anhand von Massenspektren bzw. der erfolgreich synthetisierten Referenzsubstanz *N*-Hydroxydebrisoquin-*O*-glucuronid (Abb. 7.3) gelang erstmals der Nachweis von *O*- bzw. *N*-Glucuronidierungen der Substrate *N*-Hydroxydebrisoquin und Guanoxabenz. Hingegen waren die Hepatozyten nur in der Lage *O*-, nicht aber *N*-Glucuronide des Benzamidoxims zu bilden. Dieser Unterschied scheint strukturell bedingt und nicht von der Enzymaktivität abhängig zu sein, da sämtliche in Hepatozyten gebildete Glucuronide auch mittels UDP-Glucuronyltransferasen enzymatisch gewonnen werden konnten. Weitere Phase II-Reaktionen wie Sulfatierungen und Acetylierungen der sechs stickstoffhaltigen Substrate wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht in Hepatozytenkulturen nachgewiesen.

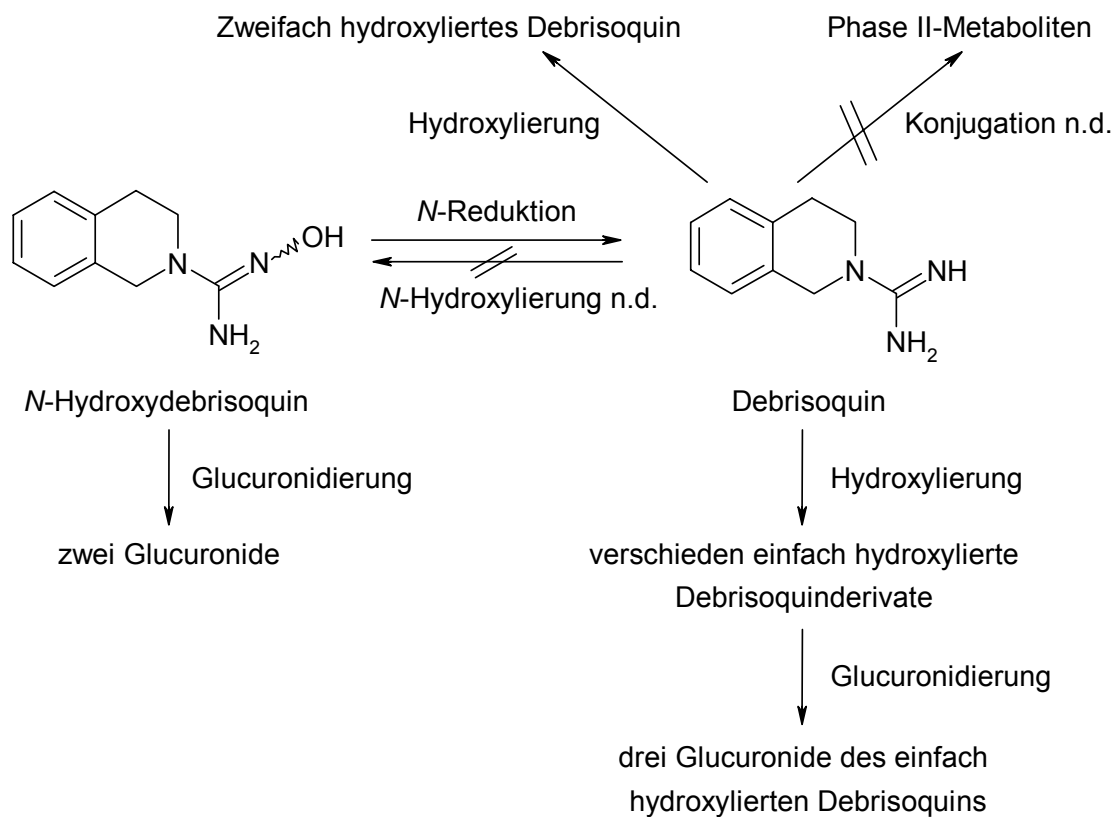


Abbildung 7.3 *Nachgewiesene Biotransformationsreaktionen von N-Hydroxydebrisoquin und Debrisoquin in porcinen und humanen Hepatozytenkulturen, n.d. nicht detektierbar*

Die dargestellten großen Übereinstimmungen des Metabolismus der untersuchten Verbindungen in porcinen und humanen Leberparenchymzellen (s. Kapitel 4) verdeutlichen abermals die diesbezügliche Ähnlichkeit der Spezies Schwein und Mensch und unterstreichen somit die Eignung der porcinen Hepatozytenkulturen als alternatives *in vitro*-Modell für Biotransformationsstudien anstelle der schlecht verfügbaren humanen Hepatozyten. Zudem demonstriert der Vergleich der Resultate mit älteren Studien, der größtenteils gute *in vitro-in vivo*-Korrelationen erbrachte, erneut die Möglichkeit des Ersatzes von Untersuchungen an lebenden Gesamtorganismen durch diese Zellkulturen.

Aufbauend auf die Identifizierung der Glucuronide der Modellsubstanzen wurde untersucht, welche humanen UGT-Isoenzyme an diesen Reaktionen beteiligt sind. Anhand der *N*-hydroxylierten Testverbindungen wurde so erstmals festgestellt, dass die UGTs 1A9 und 1A3 bevorzugt die Konjugationen von *N*-hydroxylierten Amidinen, Guanidinen, Amidinohydrazone mit aktivierter Glucuronsäure katalysieren. Obwohl für beide UGT-Isoenzyme genetische Polymorphismen bekannt sind (Miners *et al.* 2002, Girard *et al.* 2004), relativiert sich allerdings in diesem Fall der Einfluss der interindividuellen genetischen Unterschiede, da die *N*-Reduktion und nicht die Glucuronidierung die stark vorherrschende Reaktion dieser Substrate in Hepatozytenkulturen darstellt. In der Arzneistoffentwicklung sollte jedoch der Einfluss der Glucuronidierung verstärkt beachtet sowie die Aufklärung von involvierten Isoenzymen intensiviert werden, da die UGTs im Allgemeinen einen entscheidenden Beitrag zur Detoxifizierung und Eliminierung von Substanzen leisten (Wells *et al.* 2004).

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Einflüsse von literaturbekannten Induktoren des Menschen auf porcine Cytochrom P450-Enzyme anhand von Schweinehepatozytenkulturen. Durch die Bestimmung charakteristischer, durch Rifampicin bzw. Phenobarbital hervorgerufener, induzierender Effekte auf das CYP3A29 bzw. auf CYP2C-Enzyme wurde zunächst die Eignung des Einsatzes dieser porcinen Zellkulturen überprüft. Im Weiteren bewirkte Omeprazol – entsprechend *in vitro*-Studien mit humanen Leberparenchymzellen – eine signifikante Aktivitätssteigerung des Cytochrom P450-Isoenzym 1A2. Diese Beobachtung, die erstmals in Zellen des Deutschen Hausschweins gemacht wurde, bestätigt in Bezug auf die Induzierfähigkeit von CYP-Isoenzymen abermals eine größere Ähnlichkeit des Menschen zum Schwein als zur Spezies Ratte, in der Omeprazol nur sehr schwache Induktionseigenschaften aufwies (Lu und Li 2001). Obwohl noch weitere grundlegende Studien zur Induktion selten untersuchter CYP-Isoenzyme folgen sollten und die quantitative Extrapolation der *in vitro*-Daten eine große Herausforderung für die nächsten Jahre bleibt, weist das gezeigte Ergebnis auf die zukünftige Möglichkeit eines verstärkten Einsatzes von Schweinehepatozytenkulturen für qualitativ ausgelegte Induktionsstudien hin. Neben der neuen Methodik der Kryokonservierung von Zellen könnte der Einsatz von porcinen Hepatozyten die

Problematik der limitierten Verfügbarkeit von humanem Lebergewebe für diesen Bereich verringern. Außerdem könnte im Sinne von Russell und Burch (1959) nicht nur durch Einschränkung der Anzahl der Tierversuche in wissenschaftlichen Experimenten ein Beitrag zum Tierschutz geleistet werden, sondern auch durch die Verwendung von überschüssigem Lebergewebe von Schlachttieren anstelle von extra für Forschungszwecke angezüchteten Labortieren.

8 Materialien und Geräte

8.1 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Reinheit von folgenden Firmen bezogen:

Substanz	Firma
17 β -Estradiol	Sigma
17 β -Estradiol-3-glucuronid	Sigma
4-Hydroxytolbutamid	Sigma
4-Nitrophenol	Merck
4-Nitrophenylglucuronid	Merck
4-Nitrophenylsulfat	Merck
4-Trifluormethyl-7-hydroxycumarin	Sigma
4-Trifluormethyl-7-hydroxycumaringlucuronid	Sigma
6 β -Hydroxytestosteron	Sigma
7-Ethoxycumarin	Sigma
7-Ethoxyresorufin	Sigma
7-Hydroxycumarin	Aldrich
Acetatpuffer pH 4,5	Sigma
Acetonitril	Baker
Albumin (Schwein)	Sigma
Ameisensäure	Merck
Ammoniumacetat Fractopur	Merck
Ammoniumformiat puriss. p.a.	Fluka
Antikörper gegen Schweinealbumin	Universal Biologicals Ltd., England
Arylsulfatase	Boehringer Mannheim
Benzamidinhydrochlorid	Sigma

Benzamidin- <i>N</i> -acetat	Eigenherstellung
Benzamidin- <i>N</i> -sulfat	Eigenherstellung
Benzamidoxim	Eigenherstellung
Benzamidoxim- <i>O</i> -acetat	Eigenherstellung
Benzamidoxim- <i>O</i> -glucuronid	Eigenherstellung
Benzamidoxim- <i>O</i> -sulfat	Eigenherstellung
Cadmiumcarbonat	Fluka
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Citronensäure-Monohydrat	Merck
Cytotoxicity Testkit LDH	Roche Diagnostics GmbH
Debrisoquinsulfat	Sigma
Dimethylsulfoxid	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
DMEM (10×)	Biochrom
EDTA	Merck
Eisessig	Merck
Ethanol	Merck
Fötale Kälberserum	Biochrom
Glucagon	Sigma
Glucose-wasserfrei	Merck
Guanabenzacetat	Herstellung im Arbeitskreis
Guanoxabenztosylat	Herstellung im Arbeitskreis
Hepatocyte Incubation Medium	In Vitro Technologies, USA
Hepatocyte Plating Medium	In Vitro Technologies, USA
Hepatocyte Thawing Medium	In Vitro Technologies, USA
Hydroxylaminhydrochlorid	Merck
HEPES	Biochrom
Insulin	Sigma

Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumphosphat	Fluka
KHB-Puffer modifiziert	Sigma
Kollagen R-Lösung	SERVA
Kollagenase Typ CLS II	Biochrom
L-Glutamin	Biochrom
Methanol	Baker
Natriumcarbonat-wasserfrei	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Fluka
N-Hydroxydebrisoquin	Eigensynthese
N-Hydroxydebrisoquin-O-glucuronid	Eigensynthese
N-Phenylharnstoff	Aldrich
Omeprazol	Sigma
<i>ortho</i> -Phenylendiamin (OPD)	Sigma
PBS-Dulbecco	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Phenobarbital	Sigma
Phosphorsäure 85%	Fluka
Plattierbare kryokonservierte Hepatozyten	In Vitro Technologies, USA
Prednisolon	Sigma
Resorufin	Sigma
Rifampicin	Sigma
Salicylamid	Fluka
Salzsäure	Merck

Schwefelsäure	Merck
β -Glucuronidase	Roche Diagnostics GmbH
β -Glucuronidase/Sulfatase	Sigma
Testosteron	Sigma
Tolbutamid	ICN Biomedicals Inc., USA
Trichloressigsäure	Fluka
Triethylamin	Fluka
Trifluoperazindihydrochlorid	Fluka
Trispuffer mit Alamethicin und $MgCl_2$ („UGT Reaction mix“ Lösung B)	BD Gentest, USA
Trypanblau	Sigma
Tween 20	Sigma
UDPGA-Lösung („UGT Reaction mix“ Lösung A)	BD Gentest, USA
UGT-Isoenzyme (UGT Supersomes TM)	BD Gentest, USA
Williams' E Medium	Biochrom

8.2 Geräte

Wasserbad mit Temperaturregler (Lauda Thermostat, Lauda-Königshofen)

Schlauchpumpe IPS (Ismatec, Zürich, Schweiz)

Kühlzentrifuge Megafuge 1.0R Rotor 3360 (Heraeus, Osterode am Harz)

Pipettierhilfe accujet (Brand, Wertheim)

Begasungsbrutschrank B 5060 EK/CO₂ (Heraeus, Osterode am Harz)

Sterile Werkbank LaminAir HB 2448 (Heraeus, Osterode am Harz)

Mikroskop CK 2 (Olympus, Hamburg)

Schüttelwasserbad GFL 1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)

Gefriertrocknung, alpha 2-4 (Christ, Osterode am Harz)

Mikroliterzentrifuge EBA 12 (Hettich, Tuttlingen)

Ultraschallbad Sonorex Super RK 510 H (Bandelin, Berlin)

Autoklav Sanoklav La-MCA-203 (Wolf, Geislingen)

Feinwaage MC 1 (Sartorius, Göttingen)

Microplatten-Reader Titertek Plus MK II Malvern Instruments (Titertek, Huntsville/USA)

Fluorimeter LS-5B mit Drucker GP-100 (Perkin Elmer, Überlingen)

Vibrationsmischer IKA Vibrax VF2 (Janke & Kunkel, Staufen)

Glasgeräte zur Perfusion der Leber (Herstellung durch Eydam, Kiel)

Kernresonanzspektrometer ARX 300 (Bruker, Bremen)

Diverse Pipetten, Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml), Cell⁺ Gewebekulturschalen (Durchmesser 60 mm), 96well-Mikrotiterplatten, Plastikschraubgefäße (15 ml und 50 ml), Acrylküvetten für Fluoreszenzmessungen (Sarstedt, Nümbrecht)

Genauere Beschreibungen der HPLC-Anlagen, des Säulenmaterials und des Massenspektrometers befinden sich in den jeweiligen Kapiteln.

9 Literaturverzeichnis

ALBERT A., GOLDACRE R., SIEST G.

The strenght of heterocyclic bases. *J Chem Soc*: 2240-2249, **1948**

ALLEN J. G., EAST P. B., FRANCIS R. J., HAIGH J. L.

Metabolism of debrisoquine sulfate. Identification of some urinary metabolites in rat and man. *Drug Metab Dispos* 3: 332-337, **1975**

ANDERSSON T. B., SJÖBERG H., HOFFMANN K.-J., BOOBIS A. R., WATTS P., EDWARDS R. J., LAKE B. G., PRICE R. J., RENWICK A. B., GÓMEZ-LECHÓN M. J., CASTELL J. V., INGELMAN-SUNDBERG M., HIDESTRAND M., GOLDFARB P. S., LEWIS D. F. V., CORCOS L., GUILLOUZ A., TAAVITSAINEN P., PELKONEN O.

An assessment of human liver-derived *in vitro* systems to predict the *in vivo* metabolism and clearance of almokant. *Drug Metab Dispos* 29: 712-720, **2001**

ANZENBACHER P., SOUCEK P., ANZENBACHEROVÁ E., GUT I., HRUBÝ K., SVOBODA Z., KVETINA J.

Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes comparison with human liver samples. *Drug Metab Dispos* 26: 56-59, **1998**

BACHMANN K., BYERS J., GHOSH R.

Prediction of *in vivo* hepatic clearance from *in vitro* data using cryopreserved human hepatocytes. *Xenobiotica* 33: 475-483, **2003**

BADER A., KNOP E., KERN A., BOKER K., FRUHAUF N., CROME O., ESSELMANN H., PAPE C., KEMPKA G., SEWING K. F.

3-D coculture of hepatic sinusoidal cells with primary hepatocytes-design of an organotypical model. *Exp Cell Res* 226: 223-233, **1996**

BADER A., RINKES I. H., CLOSS E. I., RYAN C. M., TONER M., CUNNINGHAM J. M., TOMPKINS R. G., YARMUSH M. L.

A stable long-term hepatocyte culture system for studies of physiologic processes: Cytokine stimulation of the acute phase response in rat and human hepatocytes. *Biotechnol Prog* 8: 219-225, **1992**

BAILEY D. M., DEGRAZIA C. G.

Hydroxyguanidines. A new class of antihypertensive agents. *J Med Chem* 16: 151-156, **1973**

BARANCZEWSKI P., KALLIN A., ANDERSSON A., HAGIGI S., ABERG M., POSTLIND H., MANKOWITZ L.

Development of an assay using 4-trifluoromethylumbelliferyl as a marker substrate for assessment of drug-drug interactions to multiple isoforms of UDP-glucuronosyltransferases. *Assay Drug Dev Technol* 2: 345-352, **2004**

BARKER P., GENDLER P. L., RAPOPORT H.

Acylation of dibasic compounds containing amino amidine and aminoguanidine functions. *J Org Chem* 46: 2455-2465, **1981**

BAYLISS M. K., BELL J. A., WILSON K., PARK G. R.

7-Ethoxycoumarin O-deethylase kinetics in isolated rat, dog and human hepatocyte suspension. *Xenobiotica* 24: 231-241, **1994**

BD BIOSCIENCES

www.bdbiosciences.com/discovery_labware/gentest, **2004**

BEHNSIA K., BHATIA S., JASTROMB N., BALIS U., SULLIVAN S., YARMUSH M., TONER M.

Xenobiotic metabolism by cultured primary porcine hepatocytes. *Tissue Eng* 6: 467-479, **2000**

BENEDETTI M. S.

Biotransformation of xenobiotics by amine oxidases. *Fundam Clin Pharmacol* 15: 75-84, **2001**

BERRY M. N., EDWARDS A. M., BARRITT G. J.

Isolated hepatocytes preparation, properties and applications. In: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, Burdon R. H.; van Knippenberg P. H. (Hrsg.), Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, **1991**

BERRY M. N., FRIEND D. S.

High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: A biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43: 506-520, **1969**

BERRY M. N., GRIVELL A. R., GRIVELL M. B., PHILLIPS J. W.

Isolated hepatocytes - Past, present and future. *Cell Biol Toxicol* 13: 223-233, **1997**

BISELL D. M., HAMMAKER L. E., MEYER U. A.

Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. *J Cell Biol* 59: 722-734, **1973**

BLAAUBOER B. J., BOOBIS A. R., CASTELL J. V., COECKE S., GROOTHUIS M. M., GUILLOZO A., HALL T. J., HAWKSWORTH G. M., LORENZON G., MILTENBURGER H. G., ROGIERS V., SKETT P., WIEBEL F.

The practical applicability of hepatocyte cultures in routine testing. *ATLA* 22: 231-241, **1994**

BOCK K. W., GSCHMAIDMEIER H., HEEL H., LEHMKÖSTER T., MÜNDEL P. A., BOCK-HENNIG B. S.

Functions and transcriptional regulation of PAH-inducible human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* 31: 411-422, **1999**

BRANDON E. F. A., RAAP C. D., MEIJERMAN I., BEIJNEN J. H., SCHELLENS J. H. M.

An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: Pros and contras. *Toxicol Appl Pharmacol* 15: 233-246, **2003**

BRUNELLE F. M., VERBEECK R. K.

Conjugation-deconjugation cycling of diflunisal via β -glucuronidase catalyzed hydrolysis of its acylglucuronide in the rat. *Life Science* 60: 2013-2021, **1997**

BURCHELL B.

Glucuronidation: Towards the next millennium. In: *Drug Metabolism: Towards the next millennium*, Gooderham N. J. (Hrsg.), IOS Press, Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC, 80-88, **1998**

BURKE M. D., MAYER R. T.

Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* 2: 583-588, **1974**

BURKE M. D., THOMPSON S., WEAVER R. J., WOLF C. R., MAYER R. T.

Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol* 48: 923-936, **1994**

CALI J. J., RUSSELL D. W.

Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 266: 7774-7778, **1991**

CHEN Y., FERGUSON S. S., NEGISHI M., GOLDSTEIN J. A.

Induction of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 495-501, **2004**

CHEN Z., DING Y., ZHANG H.

Cryopreservation of suckling pig hepatocytes. *Ann Clin Lab Sci* 31: 391-398, **2001**

CHRISTIANSEN K.

Charakterisierung und Einsatz von Hepatozyten-Kulturen als *in vitro*-Modell zur Untersuchung von Phase 2-Reaktionen des Benzamidoxims. *Dissertation*, Kiel, **2000**

CIOTTI M., LAKSHMI V. M., BASU N., DAVIS B. B., OWENS I. S., ZENSER T. V.

Glucuronidation of benzidine and its metabolites by cDNA-expressed human UDP-glucuronosyltransferases and pH stability of glucuronides. *Carcinogenesis* 20: 1963-1969, **1999**

CLEMENT B.

The N-oxidation of benzamidines *in vitro*. *Xenobiotica* 13: 467-473, **1983**

CLEMENT B.

Biotransformation stark basischer funktioneller Gruppen durch Stickstoffoxidation. In: *Hochschulsammlung Naturwissenschaft Chemie und Pharmazie Band 3*, Hochschulverlag, Freiburg, **1986**

CLEMENT B.

Oxidation and reduction of nitrogen via CYP450: Importance of the reduction of genotoxic N-hydroxylated functional group. In: *Drug Metabolism: Towards the next millennium*, Gooderham N. J. (Hrsg.), IOS Press, Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC, 59-71, **1998**

CLEMENT B.

Reduction of *N*-hydroxylated compounds: Amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as prodrugs of amidines. *Drug Metab Rev* 34: 565-579, **2002**

CLEMENT B., CHRISTIANSEN K., GIRRESER U.

Phase 2 metabolites of *N*-hydroxylated amidines (amidoximes): Synthesis, *in vitro* formation by pig hepatocytes, and mutagenicity testing. *Chem Res Toxicol* 14: 319-326, **2001**

CLEMENT B., DEMESMAEKER M.

Formation of guanoxabenz from guanabenz in human liver. A new metabolic marker for CYP1A2. *Drug Metab Dispos* 25: 1266-1271, **1997a**

CLEMENT B., DEMESMAEKER M.

Microsomal catalyzed *N*-hydroxylation of guanfacine and reduction of *N*-hydroxyguanfacine. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 330: 303-306, **1997b**

CLEMENT B., DEMESMAEKER M., LINNE S.

Microsomal catalyzed *N*-hydroxylation of guanabenz and reduction of the *N*-hydroxylated metabolite: Characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. *Chem Res Toxicol* 9: 682-688, **1996**

CLEMENT B., IMMEL M., SCHMITT S., STEINMANN U.

Biotransformation of benzamidine and benzamidoxime *in vivo*. *Arch Pharm (Weinheim)* 326: 807-812, **1993b**

CLEMENT B., IMMEL M., TERLINDEN R., WINGEN F. J.

Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine *in vivo*. *Arch Pharm (Weinheim)* 325: 61-62, **1992**

CLEMENT B., JUNG F.

N-Hydroxylation of the antiprotozoal drug pentamidine catalyzed by rabbit liver cytochrome P-450 2C3 or human liver microsomes, microsomal retroreduction, and further oxidative transformation of the formed amidoximes. Possible relationship to the biological oxidation of arginine to *N*-hydroxyarginine, citrulline, and nitric oxide. *Drug Metab Dispos* 22: 486-497, **1994**

CLEMENT B., JUNG F.

N-Hydroxylation and *N*-dealkylation by P450C3 of *N*-methylbenzamidine: *N*-Oxidative dealkylation of one functional group. *Xenobiotica* 25: 443-455, **1995**

CLEMENT B., JUNG F., PFUNDER H.

N-Hydroxylation of benzamidine to benzamidoxime by a reconstituted cytochrome P-450 oxidase system from rabbit liver: Involvement of cytochrome P-450 IIC3. *Mol Pharmacol* 43: 335-342, **1993a**

CLEMENT B., KUNZE T.

In vitro oxygenation of *N,N'*-diphenylguanidines. *Xenobiotica* 23: 155-167, **1993**

CLEMENT B., LOMB R., MÖLLER W.

Isolation and characterization of the protein compounds of the liver microsomal O₂-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *J Biol Chem* 272: 19615-19620, **1997**

CLEMENT B., LOPIAN K.

Characterization of *in vitro* biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab Dispos* 31: 645-51, **2003**

CLEMENT B., SCHULTZE-MOSGAU M. H., RICHTER P. H., BESCH A.

Cytochrome P450-dependent *N*-hydroxylation of an aminoguanidine (amidinohydrazone) and microsomal retroreduction of the *N*-hydroxylated product. *Xenobiotica* 24: 671-688, **1994**

CLEMENT B., SCHULTZE-MOSGAU M.-H., WOHLERS H.

Cytochrome P450 dependent *N*-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the *N*-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. Similarity with the oxidation of arginine to citrulline and nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 46: 2249-2267, **1993c**

CLEMENT B., WISSEL S.

Studies on the microsomal *N*-oxygenation of isothioureas. *Progress in pharmacology and clinical pharmacology* 8: 219-227, **1991**

CLEMENT B., ZIMMERMANN M.

Mechanism of the microsomal *N*-hydroxylation of para-substituted benzamidines. *Biochem Pharmacol* 37: 4747-4752, **1988**

COECKE S., ROGIERS V., BAYLISS M., CASTELL J., DOEHMER J., FABRE G., FRY J., KERN A., WESTMORELAND C.

The use of long-term hepatocyte cultures for detecting induction of drug metabolising enzymes: The current status. *ATLA* 27: 579-638, **1999**

COON M. J., DING X. X., PERNECKY S. J., VAZ A. D.

Cytochrome P450: Progress and predictions. *Faseb J* 6: 669-673, **1992**

COUGHTRIE M. W., DAJANI R., KAUFFMAN F. C., RUBIN G. L., SHARP S.

Sulfotransferases and the biology of sulfation. Gooderham, N. J. (Hrsg.), IOS Press, Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC, **1998b**

COUGHTRIE M. W., JOHNSTON L. E.

Interactions between dietary chemicals and human sulfotransferases-molecular mechanisms and clinical significance. *Drug Metab Dispos* 29: 522-528, **2001**

COUGHTRIE M. W., SHARP S., MAXWELL K., INNES N. P.

Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem Biol Interact* 109: 3-27, **1998a**

- COURT M. H., KRISHNASWAMY S., HAO Q., DUAN S. X., PATTEN C. J., VON MOLTKE L. L., GREENBLATT D. J.
Evaluation of 3'-azido-3'-deoxythymidine, morphine, and codeine as probe substrates for UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) in human liver microsomes: specificity and influence of the UGT2B7*2 polymorphism. *Drug Metab Dispos* 31: 1125-1133, **2003**
- COUTTS R. T., BECKETT A. H.
Metabolic N-oxidation of primary and secondary aliphatic medicinal amines. *Drug Metab Dispos* 6: 51-104, **1977**
- CROCI T., WILLIAMS G. M.
Activities of several phase I and phase II xenobiotic biotransformation enzymes in cultured hepatocytes from male and female rats. *Biochem Pharmacol* 34: 3029-3035, **1985**
- DABOS K. J., NELSON L. J., HEWAGE C. H., PARKINSON J. A., HOWIE A. F., SADLER I. H., HAYES P. C., PLEVRIS J. N.
Comparison of bioenergetic activity of primary porcine hepatocytes cultured in four different media. *Cell Transplant* 13: 213-229, **2004**
- DAMBROVA M., UHLEN S., WELCH C. J., PRUSIS P., WIKBERG J. E.
Characterization of the enzymatic activity for biphasic competition by guanoxabenz (1-(2,6-dichlorobenzylidene-amino)-3-hydroxyguanidine) at α_2 -adrenoceptors. II. Description of a xanthine-dependent enzymatic activity in spleen cytosol. *Biochem Pharmacol* 56: 1121-1128, **1998a**
- DAMBROVA M., UHLEN S., WIKBERG J. E.
Characterization of guanoxabenz reducing activity in rat brain. *Pharmacol Toxicol* 83: 158-163, **1998b**
- DAUJAT M., PERYT B., LESCA P., FOURTANIER G., DOMERGUE J., MAUREL P.
Omeprazole, an inducer of human CYP1A1 and 1A2, is not a ligand for the Ah receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 820-825, **1992**
- DAVIS J. M.
Basic cell culture: A practical approach. Oxford University Press, Oxford, **1994**
- DE BARTOLO L., BADER A.
Review of a flat membrane bioreactor as a bioartificial liver. *Ann Transplant* 6: 40-46, **2001**
- DESILLE M., CORCOS L., L'HELGOULAC'H A., FRÉMOND B., CAMPION J.-P., GUILLOUZO A., CLÉMENT B.
Detoxifying activity in pig livers and hepatocytes intended for xenotherapy. *Transplantation* 68: 1437-1443, **1999**
- DIAZ G. J., SQUIRES E. J.
Phase II *in vitro* metabolism of 3-methylindole metabolites in porcine liver. *Xenobiotica* 33: 485-498, **2003**

DILGER K., ZHENG Z., KLOTZ U.

Lack of drug interaction between omeprazole, lansoprazole, pantoprazole and theophylline. *Br J Clin Pharmacol* 48: 438-444, **1999**

DISTLERATH L. M., REILLY P. E. B., MARTIN M. V., DAVIS G. G., WILKINSON G. R., GUENGERICH F. P.

Purification and characterization of the human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* 260: 9057-9067, **1985**

DIXIT V., GITNICK G.

Artificial liver support: State of the art. *Scand J Gastroenterol Suppl* 220: 101-114, **1996**

DONATO M. T., CASTELL J. V., GOMEZ-LECHON M. J.

Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: Comparison with other hepatic cellular models. *J Hepatol* 31: 542-549, **1999**

DONATO M. T., VIITALA P., RODRIGUEZ-ANTONA C., LINDFORS A., CASTELL J., RAUNIO H., GÓMEZ-LECHÓN M. J., PELKONEN O.

CYP2A5/CYP2A6 expression in mouse and human hepatocytes treated with various *in vivo* inducers. *Drug Metab Dispos* 28: 1321-1326, **2000**

DORAN E., WHITTINGTON F. W., WOOD J. D., MCGIVAN J. D.

Cytochrome P450IIE1 (CYP2E1) is induced by skatole and this induction is blocked by androstenone in isolated hepatocytes. *Chem Biol Interact* 140: 81-92, **2002**

DUNN J. C. Y., TOMPKINS R. G., YARMUSH M. L.

Long-term *in vitro* function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog* 7: 237-245, **1991**

DUNN J. C. Y., YARMUSH M. L., KOEBE H. G., TOMPKINS R. G.

Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *The FASEB Journal* 3: 174-177, **1989**

ECVAM

<http://ecvam.jrc.cec.eu.int>, **2004**

EIERMANN B., EDLUND P. O., TJERNBERG A., DALEN P., DAHL M. L., BERTILSSON L.

1- and 3-hydroxylations, in addition to 4-hydroxylation, of debrisoquine are catalyzed by cytochrome P450 2D6 in humans. *Drug Metab Dispos* 26: 1096-1101, **1998**

ESTRADA-RODGERS L., LEVY G. N., WEBER W. W.

Substrate selectivity of mouse N-acetyltransferases 1, 2, and 3 expressed in COS-1 cells. *Drug Metab Dispos* 26: 502-505, **1998**

ETHELL B. T., RIEDEL J., ENGLERT H., JANTZ H., OEKONOMOPOULOS R., BURCHELL B.
Glucuronidation of HMR1098 in human microsomes: Evidence for the involvement of UGT1A1 in the formation of S-glucuronides. *Drug Metab Dispos* 31: 1027-1034, **2003**

ETTMAYER P., AMIDON G. L., CLEMENT B., TESTA B.
Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem* 47: 2393-2404, **2004**

FARRELL G. C., MURRAY M.
Human cytochrome P450 isoforms. Their genetic heterogeneity and induction by omeprazole. *Gastroenterology* 99: 885-889, **1990**

FISHER M. B., PAINE M. F., STRELEVITZ T. J., WRIGHTON S. A.
The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metab Rev* 33: 273-297, **2001**

FORTH W., HENSCHLER D., RUMMEL W., FÖRSTERMANN U., STARKE K.
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag, München, **2001**

FRESHNEY R. I.
Tierische Zellkulturen - Ein Methoden-Handbuch. de Gruyter, Berlin, New York, 189-197, **1990**

FRETLAND A. J., OMIECINSKI C. J.
Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chem Biol Interact* 129: 41-59, **2000**

FRIEDRICH S.
Aktivität und Kinetik eines mikrosomalen CYP2D-Enzyms. *Dissertation*, Kiel, **2003**

FRÖHLICH A., CHRISTIANSEN K., CLEMENT B., GIRRESER U.
Phase 2 metabolites of amidoximes and amidines. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 334 (Suppl 2, 1-89): 35, **2001**

GEBHARDT R. K., HENGSTLER J. G., MULLER D., GLÖCKNER R., BUENNING P., LAUBE B., SCHMELZER E., ULLRICH M., UTESCH D., HEWITT N., RINGEL M., HILZ B. R., BADER A., KOOSE A. T., BURGER H.-J., MAAS J., OESCH F.
New hepatocyte *in vitro* systems for drug metabolism: Metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev* 35: 145-213, **2003**

GIRARD H., COURT M. H., BERNARD O., FORTIER L. C., VILLENEUVE L., HAO Q., GREENBLATT D. J., VON MOLTKE L. L., PERUSSED L., GUILLEMETTE C.
Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: Evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics* 14: 501-515, **2004**

- GLATT H.
Sulfation and sulfotransferases 4: Bioactivation of mutagens via sulfation. *Faseb J* 11: 314-321, **1997**
- GOEPTAR A. R., SCHEERENS H., VERMEULEN N. P.
Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* 25: 25-65, **1995**
- GOMEZ-LECHON M. J., PONSODA X., BORT R., CASTELL J. V.
The use of cultured hepatocytes to investigate the metabolism of drugs and mechanisms of drug hepatotoxicity. *Altern Lab Anim* 29: 225-231, **2001**
- GOODERHAM N. J., MURRAY S., LYNCH A. M., YADOLLAHI-FARSANI M., ZHAO K., BOOBIS A. R., DAVIES D. S.
Food-derived heterocyclic amine mutagens: Variable metabolism and significance to humans. *Drug Metab Dispos* 29: 529-534, **2001**
- GRANT D. M., GOODFELLOW G. H., SUGAMORI K., DURETTE K.
Pharmacogenetics of the human arylamine *N*-acetyltransferases. *Pharmacology* 61: 204-211, **2000**
- GREEN M. D., KING C. D., MOJARRABI B., MACKENZIE P. I., TEPHLY T. R.
Glucuronidation of amines and other xenobiotics catalyzed by expressed human UDP-glucuronosyltransferase 1A3. *Drug Metab Dispos* 26: 507-512, **1998**
- GREEN M. D., TEPHLY T. R.
Glucuronidation of amine substrates by purified and expressed UDP-glucuronosyltransferase proteins. *Drug Metab Dispos* 26: 860-867, **1998**
- GUENGERICH F. P.
Enzymology of rat liver cytochromes P-450. In: *Mammalian cytochromes P-450*, Guengerich F. P. (Hrsg.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, **1987**
- GUENGERICH F. P.
Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem* 266: 10019-10022, **1991**
- GUENGERICH F. P.
Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 14: 611-650, **2001**
- GUILLOUZO A., GUGUEN-GUILLOUZO C.
Isolated and cultured hepatocytes. John Libbey Eurotext Ltd/INSERM, London, **1986**
- GUILLOUZO A., MOREL F., FARDEL O., MEUNIER B.
Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies. *Toxicology* 82: 209-219, **1993**

- GUSTAFSSON D., NYSTROM J. E., CARLSSON S., BREDBERG U., ELG M., GYZANDER E., UNGELL A. L.
Pharmacodynamic properties of H 376/95, a prodrug of the direct thrombin inhibitor melagatran, intended for oral use. *Blood* 94 (10 Suppl. 1): 26a, **1999**
- GUSTAFSSON D., NYSTROM J., CARLSSON S., BREDBERG U., ERIKSSON U., GYZANDER E., ELG M., ANTONSSON T., HOFFMANN K., UNGELL A., SORENSEN H., NAGARD S., ABRAHAMSSON A., BYLUND R.
The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: Intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb Res* 101: 171-81, **2001**
- HALL J. E., KERRIGAN J. E., RAMACHANDRAN K., BENDER B. C., STANKO J. P., JONES S. K., PATRICK D. A., TIDWELL R. R.
Anti-pneumocystis activities of aromatic diamidoxime prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 666-674, **1998**
- HAMILTON G., TYLER L. O., COOK S., GUAN R., BAUGHMAN T. M., ZHAO Z., SILVER I. S.
Use and optimization of human hepatocytes to support metabolism studies in early drug discovery. *Drug Metab Rev Suppl* 34: 104, **2002**
- HAMMER C.
Xenotransplantation: Hoffnung oder Irrweg? *Arzneim Forsch* 50: 223-224, **2000**
- HANSEN T., BORLAK J., BADER A.
Cytochrome P450 enzyme activity and protein expression in primary porcine enterocyte and hepatocyte cultures. *Xenobiotica* 30: 27-46, **2000**
- HARKINS J. D., DIRIKOLU L., LEHNER A. F., HUGHES C., SCHROEDTER D., MAYER B., BRATTON C., FISHER M. V., TOBIN T.
The detection and biotransformation of guanabenz in horses: A preliminary report. *Vet Ther* 4: 197-209, **2003**
- HAUPTMANN J., PAINTZ M., KAISER B., RICHTER M.
Reduction of a benzamidoxime derivative to the corresponding benzamidine *in vivo* and *in vitro*. *Pharmazie* 43: 559-560, **1988**
- HEWITT N. J., HEWITT P.
Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica* 34: 243-256, **2004**
- HOLMES B., BROGDEN R. N., HEEL R. C., SPEIGHT T. M., AVERY G. S.
Guanabenz a review of its pharmacodynamic properties and therapeutics efficacy in hypertension. *Drugs* 26: 212-229, **1983**
- HOOS R., HUIXIN J., VASELLA A., WEISS P.
Synthesis and enzymatic evaluation of substrates and inhibitors of β -glucuronidases. *Helv Chim Acta* 79: 1757-1784, **1996**

HORSLEN S. P., HAMMEL J. M., FRISTOE L. W., KANGAS J. A., COLLIER D. S., SUDAN D. L., LANGNAS A. N., DIXON R. S., PRENTICE E. D., SHAW B. W., JR., FOX I. J.
Extracorporeal liver perfusion using human and pig livers for acute liver failure. *Transplantation* 70: 1472-1478, **2000**

HOSAGRAHARA V. P., HANSEN L. K., REMMEL R. P.
Induction of the metabolism of midazolam by rifampin in cultured porcine hepatocytes: Preliminary evidence for CYP3A isoforms in pigs. *Drug Metab Dispos* 27: 1512-1518, **1999**

HOWARD R. B., CHRISTENSEN A. K., GIBBS F. A., PESCH L. A.
The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *J Cell Biol* 35: 675-684, **1967**

IDLE J. R., MAHGOUB A., ANGELO M. M., DRING L. G., LANCASTER R., SMITH R. L.
The metabolism of [¹⁴C]-debrisoquine in man. *Br J Clin Pharmacol* 7: 257-266, **1979**

ILETT K. F., KADLUBAR F. F., MINCHIN R. F.
1998 International meeting on the arylamine *N*-acetyltransferases: Synopsis of the workshop on nomenclature, biochemistry, molecular biology, interspecies comparisons, and role in human disease risk. *Drug Metab Dispos* 27: 957-959, **1999**

INGELMAN-SUNDBERG M., JOHANSSON I.
Electron flow and complex formation during cytochrome P-450-catalyzed hydroxylation reactions in reconstituted membrane vesicles. *Acta Chem Scand B* 38: 845-851, **1984**

ISMAIL I. M., DEAR G. J., ROBERTS A. D., PLUMB R. S., AYRTON J., SWEATMAN B. C., BOWERS G. D.
N-*O*-Glucuronidation: A major human metabolic pathway in the elimination of two novel anticonvulsant drug candidates. *Xenobiotica* 32: 29-43, **2002**

IWATSUBO T., HIROTA N., OOIE T., SUZUKI H., SHIMADA N., CHIBA K., ISHIZAKI T., GREEN C. E., TYSON C. A., SUGIYAMA Y.
Prediction of *in vivo* drug metabolism in the human liver from *in vitro* metabolism data. *Pharmacol Ther* 73: 147-171, **1997**

JANSEN P. L. M., MULDER G. J., BURCHELL B., BOCK K. W.
New development in glucuronidation research: Report of a workshop on "Glucuronidation, its role in health and disease". *Hepatology* 15: 532-544, **1992**

JURIMA-ROMET M., CASLEY W. L., LEBLANC C. A., NOWAKOWSKA M.
Evidence for the catalysis of dextromethorphan *O*-demethylation by a CYP2D6-like enzyme in pig liver. *Toxicol In Vitro* 14: 253-263, **2000**

KAKU T., OGURA K., NISHIYAMA T., OHNUMA T., MURO K., HIRATSUKA A.
Quaternary ammonium-linked glucuronidation of tamoxifen by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4. *Biochem Pharmacol* 67: 2093-2102, **2004**

KARHAN W.

Charakterisierung, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Mechanismus eines mikrosomalen, N-reduktiven Biotransformationssystems. *Dissertation*, Kiel, **2002**

KERN A., BADER A., PICHLMAYR R., SEWING K.-F.

Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem Pharmacol* 54: 761-772, **1997**

KERN A., MÖLLER J. G., LANG D., THASLER W. E., BADER A.

Prediction of the induction potential of drug candidates in primary hepatocytes: *In vitro* regulation of human cytochrome P450 and clinical outcome. *Drug Metab Rev Suppl* 34: 123, **2002**

KIESE M.

Oxidation of aniline to nitrosobenzene in dogs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 235: 354-359, **1959**

KITAMURA S., FUKUSHI I., MIYAWAKI T., KAWAMURA M., TERASHITA E., NAKA T.

Orally active GPIIb/IIIa antagonists: Synthesis and biological activities of masked amidines as prodrugs of 2-[(3S)-4-[(2S)-2-(4-amidinobenzoylamino)-3-(4-methoxyphenyl)propanoyl]-3-(2-methoxy-2-oxoethyl)-2-oxopiperazinyl]acetic acid. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 49: 268-277, **2001**

KOEBE H. G., MUHLING B., DEGLMANN C. J., SCHILDBERG F. W.

Cryopreserved porcine hepatocyte cultures. *Chem Biol Interact* 121: 99-115, **1999**

KOEBE H. G., PAHERNIK S., EYER P., SCHILDBERG F. W.

Collagen gel immobilization: A useful cell culture technique for long-term metabolic studies on human hepatocytes. *Xenobiotica* 24: 95-107, **1994**

KOSTRUBSKY V. E., RAMACHANDRAN V., VENKATARAMANAN R., DORKO K., ESPLIN J. E., ZHANG S., SINCLAIR J. F., WRIGHTON S. A., STROM S. C.

The use of human hepatocyte cultures to study the induction of cytochrome P-450. *Drug Metab Dispos* 27: 887-894, **1999**

KRISHNASWAMY S., DUAN S. X., VON MOLTKE L. L., GREENBLATT D. J., COURT M. H.

Validation of serotonin (5-hydroxytryptamine) as an *in vitro* substrate probe for human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A6. *Drug Metab Dispos* 31: 133-139, **2003**

KURIAN J. R., BAJAD S., MILLER J. L., CHIN N. A., TREPANIER L. A.

NADH cytochrome b₅ reductase and cytochrome b₅ catalyze the microsomal reduction of xenobiotic hydroxylamines and amidoximes in humans. *J Pharmacol Exp Ther*, **2004**

LANGSCH A., BADER A.

Longterm stability of phase I and phase II enzymes of porcine liver cells in flat membrane bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 76: 115-125, **2001**

- LASKER J. M., WESTER M. R., ARAMSOMBATDEE E., RAUCY J. L.
Characterization of CYP2C19 and CYP2C9 from human liver: Respective roles in microsomal tolbutamide, S-mephenytoin, and omeprazole hydroxylations. *Arch Biochem Biophys* 353: 16-28, **1998**
- LAU Y. Y., SAPIDOU E., CUI X., WHITE R. E., CHENG K. C.
Development of a novel *in vitro* model to predict hepatic clearance using fresh, cryopreserved, and sandwich-cultured hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 30: 1446-1454, **2002**
- LECLUYSE E., MADAN A., HAMILTON G., CARROLL K., DEHAAN R., PARKINSON A.
Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol* 14: 177-188, **2000**
- LECLUYSE E. L.
Human hepatocyte culture systems for the *in vitro* evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci* 13: 343-368, **2001**
- LEWIS D. F.
Human cytochromes P450 associated with the phase 1 metabolism of drugs and other xenobiotics: A compilation of substrates and inhibitors of the CYP1, CYP2 and CYP3 families. *Curr Med Chem* 10: 1955-1972, **2003**
- LI A. P., GORYCKI P. D., HENGSTLER J. G., KEDDERIS G. L., KOEBE H. G., RAHMANI R., DE SOUSAS G., SILVA J. M., SKETT P.
Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: Consensus of an international expert panel. *Chem Biol Interact* 121: 117-123, **1999**
- LI A. P., MAUREL P., GOMEZ-LECHON M. J., CHENG L. C., JURIMA-ROMET M.
Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: Present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P450 induction. *Chem Biol Interact* 107: 5-16, **1997**
- LIGHTFOOT T., ELLIS S. W., MAHLING J., ACKLAND M. J., BLANEY F. E., BIJLOO G. J., DE GROOT M. J., VERMEULEN N. P., BLACKBURN G. M., LENNARD M. S., TUCKER G. T.
Regioselective hydroxylation of debrisoquine by cytochrome P4502D6: Implications for active site modelling. *Xenobiotica* 30: 219-233, **2000**
- LIN J. H., LU A. Y.
Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 535-567, **2001**
- LINDL T., BAUER J.
Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, **1994**
- LIU H. L., WANG I. J., GUO H. T., WANG Y. M., LIU J., YU Y. C.
Cryopreservation and gel collagen culture of porcine hepatocytes. *World J Gastroenterol* 10: 1010-1014, **2004**

- LIYOU N. E., BULLER K. M., TRESILLIAN M. J., ELVIN C. M., SCOTT H. L., DODD P. R., TANNENBERG A. E., MCMANUS M. E.
Localization of a brain sulfotransferase, SULT4A1, in the human and rat brain: An immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 51: 1655-64, **2003**
- LÖFFLER P., PETRIDES P. E.
Biochemie und Pathobiochemie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2003**
- LOMB R.
Enzymatische Grundlagen der *N*-reduktiven Biotransformation von *N*-hydroxylierten Amidinen, Guanidinen und Amidinohydrasonen. *Dissertation*, Kiel, **1995**
- LU C., LI A. P.
Species comparison in P450 induction: Effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, sprague-dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem Biol Interact* 134: 271-281, **2001**
- MACGREGOR J. T., COLLINS J. M., SUGIYAMA Y., TYSON C. A., DENAN J., SMITH L., ANDERSEN M., CURREN R. D., HOEUTSON J. B., KADLUBAR F., KEDDERIS G. L., KRISHNAN K., LI A. P., PARCHMENT R. E., THUMMEL K., TOMASZEWSKI J. E., ULRICH R., VICKERS A. E. M., WRIGHTON S. A.
In vitro human tissue models in risk assessment: Report of a consensus-building workshop. *Toxicol Sci* 59: 17-36, **2001**
- MACKENZIE P. I., OWENS, I. S., BURCHELL, B., BOCK, K. W., BAIROCH, A., BÉLANGER, A., FOURNEL-GIGLEUX, S., GREEN, M., HUM, D. W., IYANAGI, T., LANCET, D., LOUISISOT, P., MAGDALOU, J., CHOWDHURY, J. R., RITTER, J. K., SCHACHTER, H., TEPHLY, T. R., TIPTON, K.F., NEBERT, D. W.
The UDP glycosyltransferase gene superfamily: Recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7: 255-269, **1997**
- MADAN A., GRAHAM R. A., CARROLL K. M., MUDRA D. R., BURTON L. A., KRUEGER L. A., DOWNEY A. D., CZERWINSKI M., FORSTER J., RIBADENEIRA M. D., GAN L. S., LECLUYSE E. L., ZECH K., ROBERTSON P., KOCH P., ANTONIAN L., WAGNER G., YU L., PARKINSON A.
Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 31: 421-431, **2003**
- MAHGOUB A., IDLE J. R., DRING L. G., LANCASTER R., SMITH R. L.
Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 2: 584-586, **1977**
- MALFATTI M. A., FELTON J. S.
N-Glucuronidation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and *N*-hydroxy-PhIP by specific human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis* 22: 1087-1093, **2001**
- MANKOWSKI D. C., EKINS S.
Prediction of human drug metabolizing enzyme induction. *Curr Drug Metab* 4: 381-391, **2003**

MASUR H.

Prevention and treatment of pneumocystis pneumonia. *N Engl J Med* 327: 1853-1860, **1992**

MEACHAM R. H., CHIANG S. T., KICK C. J., SISENWINE S. F., JUSKO W. J., RUELIUS H. W.
Pharmacokinetics disposition of guanabenz in the rhesus monkey. *Drug Metab Dispos* 9: 509-514, **1981**

MEACHAM R. H., EMMETT M., KYRIAKOPOULOS A. A., CHIANG S. T., RUELIUS H. W.,
WALKER B. R., NARINS R. G., GOLDBERG M.
Disposition of ¹⁴C-guanabenz in patients with essential hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 27: 44-52, **1980**

MINERS J. O., MACKENZIE P. I.

Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther* 51: 347-369, **1991**

MINERS J. O., MCKINNON R. A., MACKENZIE P. I.

Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance. *Toxicology* 181-182: 453-456, **2002**

MINERS J. O., SMITH P. A., SORICH M. J., MCKINNON R. A., MACKENZIE P. I.

Predicting human drug glucuronidation parameters: Application of *in vitro* and *in silico* modelling approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 1-25, **2004**

MIYAMOTO A., SODA Y., MORI I., YOKOYAMA N., HORISAKA K., SHICHINO F., SHIMADA A.,
KASHIMA K., KATAOKA T., TATSUMI H.

Metabolic fate of guanabenz-acetate. *Iyakuhin Kenkyu* 13: 1214-1230, **1982**

MONSHOUWER M., KLOOSTER G. A. E. v. T., NIMEIJER S. M., WITKAMP R. F., MIERT A. S.
J. P. A. M. v.

Characterization of cytochrome P450 isoenzymes in primary cultures of pig hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 12: 715-723, **1998**

MORGAN E. T., SEWER H. I., GONZALEZ F. J., LEE Y.-H., TUKEY R. H., OKINO S., VU T.,
CHEN Y.-H., SIDHU J. S., OMIECINSKI C. J.

Physiological and pathophysiological regulation of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* 26: 1232-1240, **1998**

MORGAN S. J., DARLING D. C.

Kultur tierischer Zellen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1994**

MULDER G. J., JAKOBY W. B.

Sulfation. In: *Conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach*, Mulder G. J. (Hrsg.), Taylor & Francis Ltd, London, New York, Philadelphia, 107-161, **1990**

MURPHY P. V., BRADLEY H., TOSIN M., PITT N., FITZPATRICK G. M., GLASS W. K. Development of carbohydrate-based scaffolds for restricted presentation of recognition groups. Extension to divalent ligands and implications for the structure of dimerized receptors. *J Org Chem* 68: 5692-5704, **2003**

MUTSCHLER E., GEISLINGER G., KROEMER H. K., SCHÄFER-KORTING M. Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2001**

NAKAGAWA Y., TAYAMA S. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 74: 99-105, **2000**

NEBERT D. W., ADESNIK M., COON M. J., ESTABROOK R. W., GONZALEZ F. J., GUENGERICH F. P., GUNSALUS I. C., JOHNSON E. F., KEMPER B., LEVIN W., ET AL. The P450 gene superfamily: Recommended nomenclature. *DNA* 6: 1-11, **1987**

NEBERT D. W., GONZALEZ F. J. P450 genes: Structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 56: 945-993, **1987**

NELSON D. R., KOYMANS L., KAMATAKI T., STEGEMAN J. J., FEYEREISEN R., WAXMAN D. J., WATERMAN M. R., GOTOH O., COON M. J., ESTABROOK R. W., GUNSALUS I. C., NEBERT D. W. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42, **1996**

NIEMELÄ O., PARKKILA S., PASANEN M. K., VIITALA K., VILLANUEVA J. A., HALSTED C. H. Induction of cytochrome P450 enzymes and generation of protein-aldehyde adducts are associated with sex-dependent sensitivity to alcohol-induced liver disease in micropigs. *Hepatology* 30: 1011-1017, **1999**

NISSEN P. H., WINTERO A. K., FREDHOLM M. Mapping of porcine genes belonging to two different cytochrome P450 subfamilies. *Anim Genet* 29: 7-11, **1998**

NUSSLER A. K., WANG A., NEUHAUS P., FISCHER J., YUAN J., LIU L., ZEILINGER K., GERLACH J., ARNOLD P. J., ALBRECHT W. The suitability of hepatocyte culture models to study various aspects of drug metabolism. *Altex* 18: 91-101, **2001**

OHNO A., SAITO Y., HANIOKA N., JINNO H., SAEKI M., ANDO M., OZAWA S., SAWADA J. Involvement of human hepatic UGT1A1, UGT2B4, and UGT2B7 in the glucuronidation of carvedilol. *Drug Metab Dispos* 32: 235-239, **2004**

OLSEN A. K., HANSEN K. T., FRIIS C. Pig hepatocytes as an *in vitro* model to study the regulation of human CYP3A4: Prediction of drug-drug interactions with 17 α -ethynylestradiol. *Chem Biol Interact* 107: 93-108, **1997**

ORTIZ DE MONTELLANO P. R.

Oxygen activation and transfer. In: *Cytochrom P450*, Ortiz de Montellano P. R. (Hrsg.), Plenum Press, New York, 217-257, **1986**

PAOLUZZI L., SINGH A. S., PRICE D. K., DANESI R., MATHIJSSSEN R. H., VERWEIJ J., FIGG W. D., SPARREBOOM A.

Influence of genetic variants in UGT1A1 and UGT1A9 on the *in vivo* glucuronidation of SN-38. *J Clin Pharmacol* 44: 854-860, **2004**

PARENTI G., MERONI G., BALLABIO A.

The sulfatase gene family. *Curr Opin Genet Dev* 7: 386-391, **1997**

PETLEVSKI R.

Hepatocyte culture: An important model for biochemical and toxicological studies. *Periodicum Biologorum* 105: 109-113, **2003**

PLANT N. J., GIBSON G. G.

Evaluation of the toxicological relevance of CYP3A4 induction. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6: 50-56, **2003**

PROUGH R. A., BROWN M. I., DANNAN G. A., GUENGERICH F. P.

Major isozymes of rat liver microsomal cytochrome P-450 involved in the *N*-oxidation of *N*-isopropyl- α -(2-methylazo)-*p*-toluamide, the azo derivative of procarbazine. *Cancer Res* 44: 543-548, **1984**

RADOMINSKA-PANDYA A., CZERNIK P. J., LITTLE J. M., BATTAGLIA E., MACKENZIE P. I.

Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* 31 (4): 817-899, **1999**

RAUCY J. L.

Regulation of CYP3A4 expression in human hepatocytes by pharmaceuticals and natural products. *Drug Metab Dispos* 31: 533-539, **2003**

RAUCY J. L., MUELLER L., DUAN K., ALLEN S. W., STROM S., LASKER J. M.

Expression and induction of CYP2C P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 475-482, **2002**

REESE J. A., BYARD J. L.

Isolation and culture of adult hepatocytes from liver biopsies. *In Vitro* 17: 935-940, **1981**

RENDIC S., DI CARLO F. J.

Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 29: 413-580, **1997**

RITTER J. K.

Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 129: 171-193, **2000**

ROOS P. H., TSCHIRBS S., WELGE P., HACK A., THEEGARTEN D., MOGILEVSKI G., WILHELM M.

Induction of cytochrome P450 1A1 in multiple organs of minipigs after oral exposure to soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Arch Toxicol* 76: 326-334, **2002**

ROSE J., CASTAGNOLI N., JR.

The metabolism of tertiary amines. *Med Res Rev* 3: 73-88, **1983**

ROYMANS D., VAN LOOVEREN C., LEONE A., PARKER J. B., McMILLIAN M., JOHNSON M. D., KOGANTI A., GILISSEN R., SILBER P., MANNENS G., MEULDERMANS W.

Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 67: 427-437, **2004**

RUCKPAUL K.

Cytochrome P450 abhängige Enzyme - Targetenzyme für die Arzneistoffentwicklung? *Pharm Unserer Zeit* 22: 296-304, **1993**

RUSCHE B.

The 3Rs and animal welfare - Conflict or the way forward? *Altex* 20 (Suppl 1): 63-76, **2003**

RUSSELL W. M. S., BURCH R. L.

The principles of human experimental technique. Methuen, London, **1959**

SAKAMOTO K., NAKAMURA Y.

Urinary metabolites of pinacidil. II. Species difference in the metabolism of pinacidil. *Xenobiotica* 23: 649-656, **1993**

SANTI A., ANFOSSI P., COLDHAM N. G., CAPOLONGO F., SAUER M. J., MONTESISSA C.

Biotransformation of benzydamine by microsomes and precision-cut slices prepared from cattle liver. *Xenobiotica* 32: 73-86, **2002**

SAVAS Ü., GRIFFIN K. J., JOHNSON E. F.

Molecular mechanism of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: An expanded role for nuclear hormone receptors. *Mol Pharmacol* 56: 851-857, **1999**

SCHÄMANN M., SCHÄFER H. J.

TEMPO-mediated anodic oxidation of methyl glycosides and 1-methyl and 1-azido disaccharides. *Eur J Org Chem* 2: 351-358, **2003**

SCHÄNZER W., OPFERMANN G., DONIKER M.

17-Epimerization of 17 α -methyl anabolic steroids in humans: Metabolism and synthesis of 17 α -hydroxy-17 β -methyl steroids. *Steroids* 57: 537-550, **1992**

SCHNÖRWANGEN E.

N-hydroxylierte Derivate physiologischer Guanidine: Synthesen und ihr Vermögen zur NO-Freisetzung durch NO-Synthasen oder Cytochrom-P450. *Dissertation*, Kiel, **1994**

SEGLÉN P. O.

Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13: 29-83, **1976**

SHADLE C. R., LEE Y., MAJUMDAR A. K., PETTY K. J., GARGANO C., BRADSTREET T. E., EVANS J. K., BLUM R. A.

Evaluation of potential inductive effects of aprepitant on cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *J Clin Pharmacol* 44: 215-223, **2004**

SHEARER C. M., DEANGELIS N. J.

Guanabenz degradation products and stability assay. *J Pharm Sci* 68: 1010-1012, **1979**

SHEIL A. G.

Xenogeneic bioartificial liver support: Where are we now? *Transplant Proc* 34: 2493-2495, **2002**

SHIH H., PICKWELL G. V., GUENETTE D. K., BILIR B., QUATTROCHI L. C.

Species differences in hepatocyte induction of CYP1A1 and CYP1A2 by omeprazole. *Hum Exp Toxicol* 18: 95-105, **1999**

SIEBE J.

Biotransformation des Glyceroltrinitrats und von Amidinen und Guanidinen durch humane Cytochrom P450 Isoenzyme. *Dissertation*, Kiel, **1998**

SILVA J. M., MORIN P. E., DAY S. H., KENNEDY B. P., PAYETTE P., RUSHMORE T., YERGEY J. A., NICOLL-GRIFFITH D. A.

Refinement of an *in vitro* cell model for cytochrome P450 induction. *Drug Metab Dispos* 26: 490-496, **1998**

SKAANILD M. T., FRIIS C.

Characterization of the P450 system in Göttingen minipigs. *Pharmacol Toxicol* 80 Suppl 2: 28-33, **1997**

SKAANILD M. T., FRIIS C.

Cytochrome P450 sex differences in minipigs and conventional pigs. *Pharmacol Toxicol* 85: 174-180, **1999**

SKAANILD M. T., FRIIS C.

Expression changes of CYP2A and CYP3A in microsomes from pig liver and cultured hepatocytes. *Pharmacol Toxicol* 87: 174-178, **2000**

SKETT P.

Problems in using isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism/metabolism-based toxicity testing - Solutions? *Toxicol In Vitro* 8: 491-504, **1994**

SKETT P., TYSON C., GUILLOUZO A., MAIER P.

Report on the international workshop on the use of human *in vitro* liver preparations to study drug metabolism in drug development. Held at Utrecht, The Netherlands, 6-8 September 1994. *Biochem Pharmacol* 50: 280-285, **1995**

SMITH D. A.

Induction and drug development. *Eur J Pharm Sci* 11: 185-189, **2000**

SONG Y., CLIZBE L., BHAKTA C., TENG W., WONG P., HUANG B., TRAN K., SINHA U., PARK G., REED A., SCARBOROUGH R. M., ZHU B. Y.

Design and synthesis of factor Xa inhibitors and their prodrugs. *Bioorg Med Chem Lett* 13: 297-300, **2003**

SOUCEK P., ZUBER R., ANZENBACHEROVÁ E., ANZENBACHER P., GUENGERICH F. P.

Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs. *BMC Pharmacology* 1: 11, **2001**

STEUDEL R., SCHENK P. W.

Hydroxylamin. In: *Handbuch der präparativen anorganischen Chemie*, Brauer G. (Hrsg.), Ferdinand Enke, Stuttgart, **1975**

STRASSBURG C. P., STRASSBURG A., NGUYEN N., LI Q., MANNS M. P., TUKEY R. H.

Regulation and function of family 1 and family 2 UDP-glucuronosyltransferase genes (UGT1A, UGT2B) in human oesophagus. *Biochem J* 338: 489-498, **1999**

SZOTAKOVA B., BALIHAROVA V., LAMKA J., NOZINOVA E., WSOL V., VELIK J., MACHALA M., NECA J., SOUCEK P., SUSOVA S., SKALOVA L.

Comparison of *in vitro* activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep. *Res Vet Sci* 76: 43-51, **2004**

TESTA B.

Biochemistry of redox reactions. Testa B. & Caldwell J. (Hrsg.), Academic Press Inc., San Diego, California, **1995**

a) S. 1-10

b) S. 42-45

c) S. 50-53

d) S. 103-106

e) S. 323-327

f) S. 398-437

TESTA B., JENNER P.

Drug metabolism: Chemical and biochemical aspects. Testa B. & Jenner P. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, **1976**

TIERSCHUTZBERICHT

Tierschutzbericht – Bericht über den Stand des Tierschutzes, Deutscher Bundestag 15. Wahlperiode, 108-109 (Tabelle 3), **2003**

TUKEY R. H., STRASSBURG C. P.

Human UDP-glucuronosyltransferases: Metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 581-616, **2000**

- UBEAUD G., SCHILLER C.-D., HURBIN F., JAECK D., COASSOLO P.
Comparison of the stability of some major cytochrome P450 and conjugation reactions in rat, dog and human hepatocyte monolayers. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 26: 37-45, **2001**
- UHLEN S., DAMBROVA M., TIGER G., OLIVER D. W., WIKBERG J. E.
Characterization of the enzymatic activity for biphasic competition by guanoxabenz (1-(2,6-dichlorobenzylidene-amino)-3-hydroxyguanidine) at α_2 -adrenoceptors. I. Description of an enzymatic activity in spleen membranes. *Biochem Pharmacol* 56: 1111-1119, **1998**
- ULLRICH V., WEBER P.
The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 353: 1171-1177, **1972**
- VAN DER BURGH A. S., TYSKLIND M., ANDERSSON P. L., JEAN HORBACH G., VAN DEN BERG M.
Structure dependent induction of CYP1A by polychlorinated biphenyls in hepatocytes of male castrated pigs. *Chemosphere* 41: 1697-708, **2000**
- VICKERS A. E. M., ZOLLINGER M., DANNECKER R., TYNES R., HEITZ F., FISCHER V.
In vitro metabolism of tegaserod in human liver and intestine: Assessment of drug interactions. *Drug Metab Dispos* 29: 1269-1276, **2001**
- WALSH J. S., PATANELLA J. E., HALM K. A., FACCHINE K. L.
An improved HPLC assay for the assessment of liver slice metabolic viability using 7-ethoxycoumarin. *Drug Metab Dispos* 23: 869-874, **1995**
- WEAVER R. J., THOMPSON S., SMITH G., DICKINS M., ELCOMBE C. R., MAYER R. T., BURKE M. D.
A comparative study of constitutive and induced alkoxyresorufin O-dealkylation and individual cytochrome P450 forms in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), human, mouse, rat and hamster liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 47: 763-773, **1994**
- WEBER W. W., LEVY G. N., HEIN D. W.
Acetylation. In: *Conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach*, Mulder G. J. (Hrsg.), Taylor & Francis Ltd, London, New York, Philadelphia, 163-191, **1990**
- WEINSHILBOUM R. M., OTTERNESS D. M., AKSOY I. A., WOOD T. C., HER C., RAFTOGIANIS R. B.
Sulfation and sulfotransferases 1: Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *Faseb J* 11: 3-14, **1997**
- WELLER T., ALIG L., BERESINI M., BLACKBURN B., BUNTING S., HADVARY P., MULLER M. H., KNOPP D., LEVET-TRAFIT B., LIPARI M. T., MODI N. B., MULLER M., REFINO C. J., SCHMITT M., SCHONHOLZER P., WEISS S., STEINER B.
Orally active fibrinogen receptor antagonists. 2. Amidoximes as prodrugs of amidines. *J Med Chem* 39: 3139-3147, **1996**

- WELLS P. G., MACKENZIE P. I., CHOWDHURY J. R., GUILLEMETTE C., GREGORY P. A., ISHII Y., HANSEN A. J., KESSLER F. K., KIM P. M., CHOWDHURY N. R., RITTER J. K.
Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferases in health and disease. *Drug Metab Dispos* 32: 281-290, **2004**
- WIENER D., DOERGE D. R., FANG J. L., UPADHYAYA P., LAZARUS P.
Characterization of *N*-glucuronidation of the lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in human liver: Importance of UDP-glucuronosyltransferase 1A4. *Drug Metab Dispos* 32: 72-79, **2004**
- WILDT S. N., KEARNS G. L., LEEDER J. S., VAN DEN ANKER J. N.
Glucuronidation in humans pharmacogenetic and developmental aspects. *Clin Pharmacokinet* 36: 439-452, **1999**
- WITKAMP R. F., NIJMEIJER S. M., MONSHOUWER M., VAN MIERT A. S. J. P. A. M.
The antibiotic tiamulin is a potent inducer and inhibitor of cytochrome P4503A via the formation of a stable metabolic intermediate complex. *Drug Metab Dispos* 23: 542-547, **1995**
- WOHLERS H.
Studien zur Biotransformation von Guanidinen und Amidinen mit Hepatozyten und Mikrosomen. *Dissertation*, Kiel, **1994**
- YAMAZAKI H., NAKANO M., GILLAM E. M., BELL L. C., GUENGERICH F. P., SHIMADA T.
Requirements for cytochrome b₅ in the oxidation of 7-ethoxycoumarin, chlorzoxazone, aniline, and *N*-nitrosodimethylamine by recombinant cytochrome P450 2E1 and by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 52: 301-309, **1996**
- YUAN J. J., YANG D. C., ZHANG J. Y., BIBLE R., JR., KARIM A., FINDLAY J. W.
Disposition of a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, valdecoxib, in human. *Drug Metab Dispos* 30: 1013-1021, **2002**
- YUEH M.-F., NGUYEN N., FAMOURZADEH M., STRASSBURG C. P., ODA Y., GUENGERICH F. P., TUKEY R. H.
The contribution of UDP-glucuronosyltransferase 1A9 on CYP1A2-mediated genotoxicity by aromatic and heterocyclic amines. *Carcinogenesis* 22: 943-950, **2001**
- ZELKO I., NEGISHI M.
Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 1-6, **2000**
- ZENSER T. V., LAKSHMI V. M., DAVIS B. B.
Human and *Escherichia coli* beta-glucuronidase hydrolysis of glucuronide conjugates of benzidine and 4-aminobiphenyl, and their hydroxy metabolites. *Drug Metab Dispos* 27: 1064-1067, **1999**
- ZIEGLER D. M.
Flavin-containing monooxygenases: Catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metab Rev* 19: 1-32, **1988**

ZUBER R., ANZENBACHEROVA E., ANZENBACHER P.
Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med* 6:
189-198, **2002**

ZURLO J., ARTERBURN L. M.
Characterization of a primary hepatocyte culture system for toxicological studies. *In
Vitro Cell Dev Biol Anim* 32: 211-220, **1996**

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Bernd Clement.

Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des sehr interessanten Themas und die diesbezügliche Diskussionsbereitschaft sowie für die mir stets erwiesene Förderung möchte ich mich bei meinem Doktorvater herzlich bedanken.

HD Dr. Thomas Kunze, Kirsten Braß, Anja Bürenheide, Sandra Nehlsen, Dana zur Nieden, Thomas Behrendt, Maren König, Simone Schicht, Torben Schultka und Melissa Zietz danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung des 6. Semesters.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ulrich Girreser für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft rund um die LC/MS sowie für unverzichtbare Ratschläge bei synthetischen Fragestellungen.

Bei Dr. Kai Christiansen möchte ich mich für die hilfreiche Einführung in das Arbeiten mit Hepatozytenkulturen und den wichtigen Gedankenaustausch in der Anfangsphase bedanken. Melissa Zietz danke ich für ihr großes Engagement bei der Durchführung synthetischer Arbeiten. Sven Wichmann sei für seine schnelle Hilfe bei HPLC-Problemen gedankt.

Für das zügige und sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit sowie für ihre wertvollen Anregungen bedanke ich mich bei Anja Bürenheide, Uwe Buss, Dr. Ulrich Girreser, Stephanie Wolf und meinen Eltern.

Silke Friedrich, Sabine Heberling und Stephanie Wolf sei für eine freundliche und unkomplizierte Bürogemeinschaft im 2. und 3. Stock gedankt.

Weiterhin danke ich den Professoren, Mitarbeitern und Kollegen des Pharmazeutischen Institutes, insbesondere denen meines Arbeitskreises, für die gute Arbeitsatmosphäre.

Einen herzlichen Dank möchte ich überdies allen Kollegen und Freunden aussprechen, mit denen ich auch außerhalb des Institutes viele nette gemeinsame Stunden verbracht habe.

Besonders danke ich Carsten für die schöne gemeinsame Zeit und dafür, dass er mir in den letzten Jahren immer zur Seite stand.

Meinen Eltern, die mir stets ein großer Rückhalt waren, danke ich von ganzem Herzen für ihr Vertrauen, ihr Verständnis und ihre liebevolle Unterstützung.

Persönliche Daten

Name	Fröhlich
Vornamen	Anja Kristina
Geburtstag	8. Dezember 1975
Geburtsort	Flensburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

1982 - 1986	Grundschule Sieverstedt
1986 - 1995	Gymnasium Satrup
Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife

Studium und Ausbildung

1995 - 1999	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
September 1997	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
1998 - 1999	Wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel
Dezember 1999	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2000	Praktisches Jahr in der Anker-Apotheke, Kiel
Januar 2001	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Approbation als Apothekerin

Berufliche Tätigkeit und Weiterbildung

seit April 2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
seit Juni 2004	Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, 27. Oktober 2004

Anja Kristina Fröhlich

FRÖHLICH A. K., GIRRESER U., CLEMENT B.

Metabolism of benzamidoxime (*N*-hydroxyamidine) in human hepatocytes and role of UDP-glucuronosyltransferases. *Xenobiotica*, zur Publikation eingereicht

FRÖHLICH A. K., GIRRESER U., CLEMENT B.

Metabolism of *N*-hydroxyguanidines (*N*-hydroxydebrisoquine) and *N*-hydroxyamidino-hydrazones (guanoxabenz) in human and porcine hepatocytes, identification of new types of glucuronides. *Biochemical Pharmacology*, zur Publikation eingereicht

Primäre Hepatozytenkulturen stellen ein geeignetes *in vitro*-Modell für Biotransformationsstudien und zur Aufklärung potenzieller Interaktionen von Xenobiotika dar. Im Gegensatz zu den häufig eingesetzten Leberparenchymzellen der Ratte, die jedoch große Speziesunterschiede zum Metabolismus des Menschen aufweist, gelten Hepatozyten porcinen Ursprungs als mögliche Alternative für das begrenzt verfügbare humane Lebermaterial. In dieser Arbeit wurden deshalb vergleichende Phase I- und Phase II-Studien anhand bestimmter stickstoffhaltiger Modellverbindungen in porcinen und humanen Hepatozytenkulturen sowie Studien zur Cytochrom P450-Induktion mit Schweinehepatozyten durchgeführt. Beide Spezies wiesen bezüglich der untersuchten Reaktionen große Übereinstimmungen auf. Aufgrund des Einsatzes zahlreicher *N*-hydroxylierter Verbindungen als Prodrugs war neben der *N*-reduktiven Aktivierung insbesondere die Untersuchung von Phase II-Metaboliten der Modellsubstrate Benzamidoxim (Amidoxim), *N*-Hydroxydebrisoquin (*N*-Hydroxyguanidin) und Guanoxabenz (*N*-Hydroxyamidinohydrazon) von großer Bedeutung. LC/MS-Studien lieferten Hinweise auf die Bildung mehrerer Konjugate sowohl in Hepatozytenkulturen als auch mit UDP-Glucuronyltransferasen. Hierbei ermöglichten synthetische Referenzsubstanzen die eindeutige Identifizierung der *O*-Glucuronide von *N*-Hydroxydebrisoquin und Benzamidoxim.

Abstract

Primary hepatocyte cultures have become an appropriate tool for testing the metabolism and interaction potential of xenobiotics *in vitro*. Rats show a great difference in metabolism compared to humans and were formerly used for these kinds of experiments. Porcine hepatocytes might be considered as an alternative to human liver tissue specimens whose availability is restricted. Thus, human and porcine hepatocytes were incubated with nitrogenous model compounds and inducers of cytochrome P450, respectively. The metabolism and the induction ability were compared with those of both species and literature data. Regarding the studied reactions the results obtained which both species showed great similarity. Several *N*-hydroxylated compounds act as prodrugs of their *N*-reduced pharmacologically active derivatives. Therefore, the objective of the present work was to investigate the phase II metabolism of the model substrates benzamidoxime (amidoxime), *N*-hydroxydebrisoquine (*N*-hydroxyguanidine) and guanoxabenz (*N*-hydroxyamidino-hydrazone). Metabolites formed by hepatocytes and UDP-glucuronosyltransferases were analysed by liquid chromatography/mass spectrometry. *O*-Glucuronides of *N*-hydroxydebrisoquine and benzamidoxime were identified by comparing with authentic synthetic compounds.

