



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„In vitro Metabolismus neuer Anthrachinone in
verschiedenen Hepatozytenmodellen“

verfasst von / submitted by

Theresa Haas

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie UniStG

Betreut von / Supervisor:

a.o. Univ.Prof. Mag.pharm. Dr.rer.nat. Martin Czejka

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Wien, 2016

Danksagung

Die vorliegende Diplomarbeit wurde an der Division für klinische Pharmazie und Diagnostik an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien verfasst.

Besonders danke ich Herrn Univ. Prof. Mag. Dr. Martin Czejka, für die Bereitstellung des Themas und die fachliche und hilfsbereite Unterstützung.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau Mag Nairi Baroian für die Betreuung bei der praktischen Arbeit sowie ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihr Engagement bedanken.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Mag. Marie Kitzmüller für ihre tatkräftige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich in jeder Situation unterstützt haben, sowie meinem Freund, Michael, der mich immer wieder motiviert hat.

Schließlich möchte ich mich auch bei all meinen Freunden und Studienkollegen bedanken, die mich während der Studienzeit begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Theoretischer Teil	1
1.1	Anthrachinone	1
1.2	Metabolismus allgemein	1
1.2.1	Bedeutung	1
1.2.1.1	First-Pass Effekt	2
1.2.1.2	Aktivierung und Inaktivierung	2
1.2.2	Phasen des Metabolismus	2
1.2.2.1	Phase 0	3
1.2.2.2	Phase I	3
1.2.2.3	Phase II	4
1.2.2.4	Phase III	4
1.2.3	Einflussfaktoren des Metabolismus	5
1.2.3.1	Enzyminduktion	5
1.2.3.2	Enzymhemmung	5
1.2.3.3	Polymorphismus	6
1.2.3.4	Speziesunterschiede	6
1.2.3.5	Geschlechtsspezifische Unterschiede	7
1.3	Metabolismus speziell	7
1.3.1	Anthrazykline	8
1.4	In vitro Metabolismus	10
1.4.1	Hepatozyten	10
1.5	Rationale	11
2	Experimenteller Teil	12
2.1	Chemikalien und Reagenzien	12
2.2	Geräte und Materialien	13
2.2.1	Geräte und Materialien zur Herstellung des Eluenten	13
2.2.2	Geräte und Materialien für die Probenherstellung	13
2.3	Verwendete Software	15
2.4	Allgemeine Vorbereitung	15
2.4.1	Herstellung der Eluenten und der Waschflüssigkeit	15
2.4.2	Herstellung von Phosphatpuffer	16
2.5	Hepatozytenversuche	17

2.5.1	Vorbereitungen.....	17
2.5.1.1	Allgemeine Vorbereitungen	17
2.5.1.2	Vorbereitung der Laminar Air Flow Werkbank	18
2.5.1.3	Herstellung der Stammlösungen	18
2.5.1.3.1	SL 11, SL 22 und Testosteron	18
2.5.1.3.2	Inhibitoren	21
2.5.1.4	Vorbereitung Hepatozyten	25
2.5.1.5	Zellen zählen	26
2.5.2	Probendurchführung.....	26
2.5.2.1	Metabolische Stabilität nach Invitrogen	26
2.5.2.2	Leerwertproben	27
2.5.2.3	Inhibitionsversuche	28
2.5.2.4	Probenentnahme	29
2.5.2.5	Proteinfällung.....	30
2.5.2.6	Zentrifugation.....	30
2.5.2.7	Befüllung der HPLC Vials	31
2.5.3	Probenanalyse mit HPLC-Anlage.....	31
3	Ergebnisse und Diskussion	33
3.1	Auswertung.....	33
3.1.1	Allgemeine Berechnung	33
3.2	Ergebnisse	33
3.2.1	SL 22.....	33
3.2.2	SL 11.....	36
3.2.2.1	Substanzinstabilität.....	37
3.2.2.2	Humane Hepatozyten	40
3.2.2.2.1	Männliche Hepatozyten	40
3.2.2.2.2	Weibliche Hepatozyten	46
3.2.2.3	Animale Hepatozyten	54
3.2.2.3.1	Hepatozyten von Ratten	54
3.2.2.3.2	Hepatozyten von Affen.....	60
3.2.2.4	Vergleich zwischen humanen und animalen Hepatozyten	65
3.2.3	Inhibitionsversuche mit SL 11.....	68
4	Zusammenfassung	72

5	Summary.....	75
6	Conclusio.....	78
7	Literaturverzeichnis	79
8	Abbildungsverzeichnis	81
9	Tabellenverzeichnis	84
10	Abkürzungsverzeichnis.....	85

1 Theoretischer Teil

1.1 Anthrachinone

In dieser Diplomarbeit wird der Metabolismus von neuen Anthrachinonen an verschiedenen Hepatozytenmodellen untersucht. Diese Anthrachinonderivate werden von der Firma Sealife Pharma GmbH aus Tulln synthetisiert und weisen eine antivirale, antibiotische und auch eine zytostatische Aktivität auf. Ihre Benennung erfolgt durch die Buchstaben SL und nachgestellte Ziffern. In diesem Fall handelt es sich um SL 11 und SL 22, die eine gleiche Grundstruktur aufweisen, aber sich in den Resten unterscheiden.

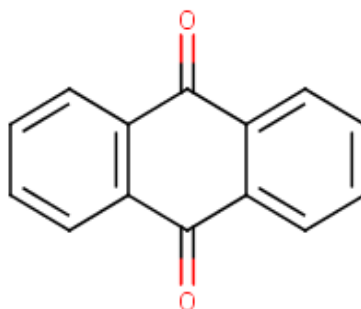


Abbildung 1: Grundstruktur Anthrachinone

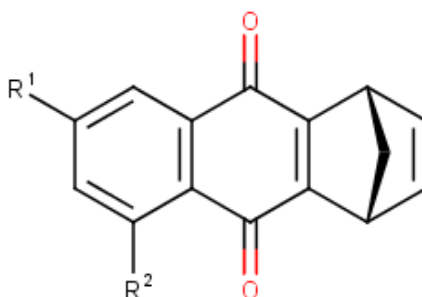


Abbildung 2: Grundstruktur SL 11, SL 22

1.2 Metabolismus allgemein

1.2.1 Bedeutung

Unter dem Begriff Metabolismus bzw. Biotransformation versteht man den Umbau von Arzneistoffen, aber auch Giften im Körper. Diese Begriffe kann man unter der Sammelbezeichnung Xenobiotika zusammenfassen. Die Leber ist das Organ mit der

weitaus höchsten Fremdstoff metabolisierenden Aktivität. Vor allem für lipidlösliche Substanzen ist die Biotransformation lebensnotwendig. Diese Verbindungen werden im Körper zwar gut resorbiert und im Organismus verteilt, aber können nur schwer ohne Biotransformation ausgeschieden werden, da sie immer wieder durch glomeruläre Filtration im Nierentubulus oder nach biliärer Exkretion im Darm rückresorbiert werden. Deshalb werden vor allem nicht polare fettlösliche Arzneistoffe zu polaren wasserlöslichen Molekülen umgewandelt, damit sie leichter ausgeschieden werden können. Diese Umwandlungsprodukte werden Metaboliten genannt. [1] [2]

1.2.1.1 First-Pass Effekt

Ein Arzneistoff kann bereits während der Resorption aus dem Magen-Darm-Kanal, bevor er den systemischen Kreislauf erreicht, in der Darmmukosa und beim ersten Durchgang durch die Leber zu einem großen Anteil durch die Leberenzyme zu unwirksamen Metaboliten umgewandelt werden. Dieser Anteil steht für die pharmakodynamische Wirkung nicht mehr zur Verfügung und somit wird die Bioverfügbarkeit beträchtlich vermindert. [1] [2]

1.2.1.2 Aktivierung und Inaktivierung

Meistens handelt es sich um inaktivierende metabolische Vorgänge. Dabei werden pharmakodynamisch aktive oder toxische Substanzen in inaktive Substanzen umgewandelt. Diesen Vorgang bezeichnet man als Entgiftung. Durch die Konjugationsreaktion kommt es im Allgemeinen zu einer Abnahme der Wirksamkeit und der Toxizität.

Die Biotransformation kann aber auch eine aktivierende Wirkung haben. Dabei wird aus einem nicht wirksamen Stoff, dem Prodrug, im Körper erst ein wirksamer Arzneistoff gebildet. Weiters ist die Entstehung von toxischen Substanzen möglich. Diesen Vorgang bezeichnet man als Giftung. [2]

1.2.2 Phasen des Metabolismus

Der Metabolismus von Xenobiotika wird in 4 Phasen unterteilt, wobei nur in Phase I und Phase II Umbauprozesse stattfinden.

Tabelle 1: Übersicht Phase I und Phase II [1]

Phase I	Phase II
Oxidation	Konjugation mit: Glucuronsäure
Reduktion	Sulfat
Hydrolyse	Acetat
	Glutathion

1.2.2.1 Phase 0

Als Phase 0 wird die Aufnahme des Xenobiotikums bezeichnet. Dies geschieht entweder durch passive Diffusion oder durch einwärts gerichtete Transporter. [6]

1.2.2.2 Phase I

Phase I Reaktionen sind Funktionalisierungsreaktionen, es werden funktionelle Gruppen in das unpolare Molekül eingeführt oder entsprechende funktionelle Gruppen freigelegt. Zu den wichtigen Phase I Reaktionen zählen Oxidation, Reduktion und Hydrolyse. Diese Reaktionen sind häufig Voraussetzungen dafür, dass Arzneistoffe Substrate für Phase II Reaktionen werden. Wenn ein Arzneistoff geeignete funktionelle Gruppen für die Konjugation besitzt kann auch ohne vorhergehende Phase I Reaktion eine direkte Konjugation stattfinden.

Für die oxidativen Abbauschritte sind die mischfunktionellen Monooxygenasen die zentralen Enzyme. Diese enthalten Cytochrom P450 (CYP) und sind im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die Einteilung der unterschiedlichen CYPs erfolgt entsprechend dem Grad der Homologie in der Aminosäuresequenz. Die Enzyme werden in Familien (z.B.:CYP 2), Subfamilien (z.B.: CYP 2C) und letztendlich in Isoformen (z.B.: CYP 2 C8) unterteilt. Am Arzneistoffwechsel sind vor allem die Genfamilien der CYP 1, 2 und 3 beteiligt. CYP 3A4 ist das wichtigste Cytochrom P 450 mit zirka 30% des CYP-Gehalts. Dabei sind 60% der therapeutisch eingesetzten Arzneistoffe CYP 3A4-Substrate. Die Isoform der CYP 2C Familie machen 30%, 1A2 etwa 15% und CYP 2E1 etwa 10% des CYP-Gehalts aus. Es sind aber auch noch andere Enzyme am Phase I Metabolismus beteiligt.

Tabelle 2: Weitere Enzyme des Phase I Metabolismus [4]

nicht-CYP-Oxidationsenzyme	weitere Enzyme
Alkoholdehydrogenase	Reduktasen
Aldehyddehydrogenase	Esterasen
Xanthinoxidase	Epoxidhydrolasen
Aminoxidase	

Für die Oxidation von Arzneistoffen wird sowohl NADPH als auch molekularer Sauerstoff (O_2) benötigt. Dabei wird ein Atom des Sauerstoffmoleküls zur Oxidation des Substrats gebraucht und das andere Atom zu Wasser reduziert. [2] [4]

Reaktion: $O_2 + 2e^-$ wird zu $H_2O + S-O$ [6]

1.2.2.3 Phase II

Im Phase II Metabolismus finden Kopplungsreaktionen statt, die durch Transferasen katalysiert werden. Wenn die Metaboliten noch nicht ausscheidungsfähig sind, können sie mit Glucuronsäure, Sulfat, Acetat und dergleichen konjugiert werden. Dadurch werden sehr polare Gruppen in das Molekül eingeführt. Normalerweise sind Phase II Metaboliten unwirksam. Diese Konjugate sind dann sehr polar und können schneller ausgeschieden werden. [1] [3] [4]

Tabelle 3: Enzyme des Phase II Metabolismus [4]

Enzyme
Glucuronosyltransferasen: Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen
Glutathion-S-Transferasen
N-Acetyltransferasen
Sulfotransferasen
Methyltransferasen
Aminosäuren-N-Acyltransferasen

1.2.2.4 Phase III

Unter Phase III Metabolismus versteht man Transportprozesse durch spezifische Transportproteine. [6]

Tabelle 4: Transportproteine [6]

Transportproteine
ATP-bindende Kassetten Transporter = ABC-Transporter
Organische Anionen - Transporter
Organische Kationen – Transporter

1.2.3 Einflussfaktoren des Metabolismus

Bestimmte Arzneistoffe können die für die Biotransformation wichtigen Enzyme induzieren aber auch inhibieren. Je nachdem muss die therapeutische Dosis entweder erhöht oder gesenkt werden. [3] [4]

Ebenso kann die Biotransformation geschlechtsspezifische und speziesspezifische Unterschiede zeigen. [5] [20] [21]

1.2.3.1 Enzyminduktion

Unter Enzyminduktion versteht man die Zunahme der Enzymmenge, entweder durch vermehrte Gentranskription oder durch verminderten Enzymabbau. Die meisten klinisch relevanten Interaktionen treten beim CYP 3A4 Substrat auf.

Bei einer Enzyminduktion durch eine Zweitsubstanz löst das zusätzlich gegebene Mittel eine Zunahme der Enzymkonzentration aus. Dadurch kommt es zu einem schnelleren Abbau der Erstsustanz und der Blutspiegel sinkt ab. Somit wird das Medikament wirkungslos. Enzym-induzierende Pharmaka kommen in vielen Arzneimittelgruppen vor. Deshalb ist es wichtig auf die möglichen Interaktion und Wechselwirkungen zu achten. [3] [4]

1.2.3.2 Enzymhemmung

Bei der Enzymhemmung kommt es durch eine Zweitsubstanz zu einer Abnahme der Enzymaktivität. Daher steigt die Konzentration des primären Medikaments im Körper an und die Wahrscheinlichkeit dass Nebenwirkungen auftreten nimmt stark zu. [3]

Tabelle 5: Beispiele für CYP 3A4 –Inhibitoren und –Induktoren [4]

Induktoren	Reversible Inhibitoren	Irreversible Inhibitoren
Rifampicin	Cimetidin	Grapefruitsaft
Carbamazepin	Clarithromycin	

Dexamethason	Erythromycin	
Phenytoin	Ciclosporin	
Barbiturate	Ketoconazol	
	Verapamil	

1.2.3.3 Polymorphismus

Es kann vorkommen, dass Arzneistoffe bei verschiedenen Personen unterschiedlich wirken. Der Grund dafür ist, dass es unterschiedliche genetische Variationen von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen gibt. Genetische Variationen mit einer Allelhäufigkeit von über 1% in der Bevölkerung werden als Polymorphismus bezeichnet. Der CYP 2D6 Polymorphismus ist bisher am besten untersucht. In diesem Zusammenhang spricht man von defizienten Metabolisierern = poor metabolisers, bei diesen ist die Elimination des betroffenen Arzneistoffes erheblich eingeschränkt. Daher kommt es zur Kumulation und daraus resultierend zu Nebenwirkungen. Im Gegensatz dazu sind auch extrem schnelle Metabolisierer = ultrarapid metabolisers bekannt. Hier muss aufgrund der erhöhten Enzymaktivität die Standarddosis erhöht werden, um eine therapeutische Wirkung zu erreichen. [1] [4]

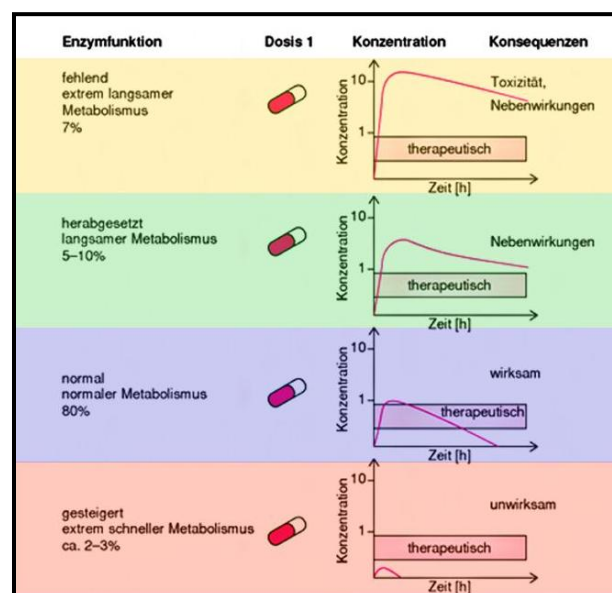


Abbildung 3: Genetischer Polymorphismus des CYP 2D6 Gens [4]

1.2.3.4 Speziesunterschiede

Tiermodelle werden häufig zur Entwicklung neuer Medikamente verwendet. Diese sollen Aufschlüsse über das metabolische Verhalten der neuen Verbindung beim

Menschen geben. Deshalb ist es wichtig zu erkennen, dass sich Menschen in Hinblick auf die Expression und katalytische Aktivitäten der arzneistoffmetabolisierenden Enzyme von Tieren unterscheiden.

CYP 2E1 zeigt keinen großen Unterschied zwischen den Arten, deshalb ist eine Extrapolation vom Tiermodell auf Menschen möglich. Im Gegensatz dazu zeigen sich Unterschiede zwischen den Arten bei CYP 1A, -2C und -3A. Daher muss man bei der Extrapolation vorsichtig sein.

Die Speziesunterschiede beruhen meist eher auf quantitative als auf qualitative Unterschiede. Außerdem kann die Geschwindigkeit der Biotransformation auch in Zusammenhang mit der Ausscheidungsgeschwindigkeit stehen. Die Ausscheidung von Fremdstoffen ist von der vorhergehenden Biotransformation abhängig, da lipophile Stoffe in der Niere vollständig rückresorbiert werden.

Während die Biotransformation von eineiigen Zwillingen fast identisch ist, zeigt sie bei zweieiigen Zwillingen schon erhebliche Differenzen. Bei verschiedenen Arten werden diese Unterschiede noch größer. [5] [20]

1.2.3.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Pharmakokinetik sind potentiell wichtige Faktoren für die klinische Wirksamkeit von Arzneimitteln. Die Unterschiede im Metabolismus können in molekularen und physiologischen Faktoren eingeteilt werden. Zu den wichtigsten molekularen Faktoren gehören Arzneistofftransporter und arzneimittelmetabolisierende Enzyme. Wenn man die einzelnen Monooxygenasen misst, ergeben sich für manche oxidative Reaktionen Geschlechtsunterschiede und für andere nicht. Männer scheinen eine höhere Aktivität von CYP 1A2, CYP 2E1, dem Arzneistofftransporter P-Glykoprotein, einigen Isoformen von Glucuronosyltransferasen und Sulfotransferasen als Frauen zu haben. Frauen haben eine höhere CYP 2D6 Aktivität.

Physiologische Faktoren, die zu geschlechtsspezifischen Unterschieden führen sind niedrigeres Körpergewicht, Organgröße, höherer Anteil von Körperfett und eine niedrigere glomeruläre Filtrationsrate bei Frauen im Vergleich zu Männern.

Obwohl diese Geschlechtsunterschiede für viele Medikamente festgestellt wurden sind die Unterschiede in der Regel nur geringfügig. [5] [21]

1.3 Metabolismus speziell

Anthrachinone können auch als cycloannelierte Naphthochinone bezeichnet werden, da ihre Grundstruktur ein Naphthochinon beinhaltet.

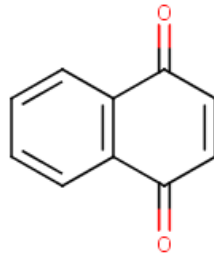


Abbildung 4: Grundstruktur Naphthochinon [8]

Ebenso enthalten auch Anthrazykline ein Naphthochinon. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass der Metabolismus von Anthrachinonen ähnlich wie der von Anthrazyklinen verläuft. Die Struktur innerhalb des roten Kreises stellt wiederum das Naphthochinon dar.

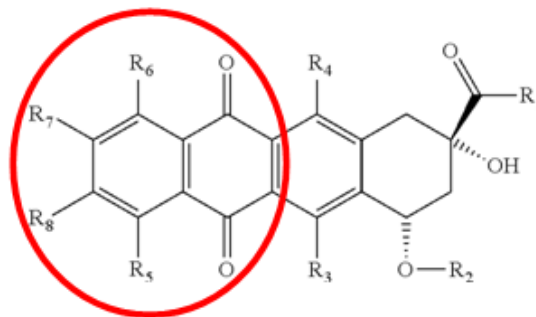


Abbildung 5: Grundstruktur Anthrazykline [9]

Tetrazykline haben eine etwas andere Grundstruktur als Anthrazykline. Im Gegensatz zu diesen enthalten sie kein Naphthochinon. Daher haben sie einen anderen Metabolismus als Anthrachinone und Anthrazykline. Im roten Kreis ist der Unterschied hervorgehoben.

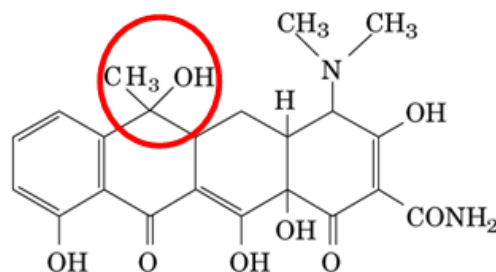


Abbildung 6 Tetrazykline [10]

1.3.1 Anthrazykline

Anthrazykline sind Verbindungen die in der Krebstherapie eingesetzt werden. Die wichtigsten dieser Klasse sind Epirubicin, Doxorubicin, Daunorubicin und Idarubicin.

Der Stoffwechselweg von Doxorubicin ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

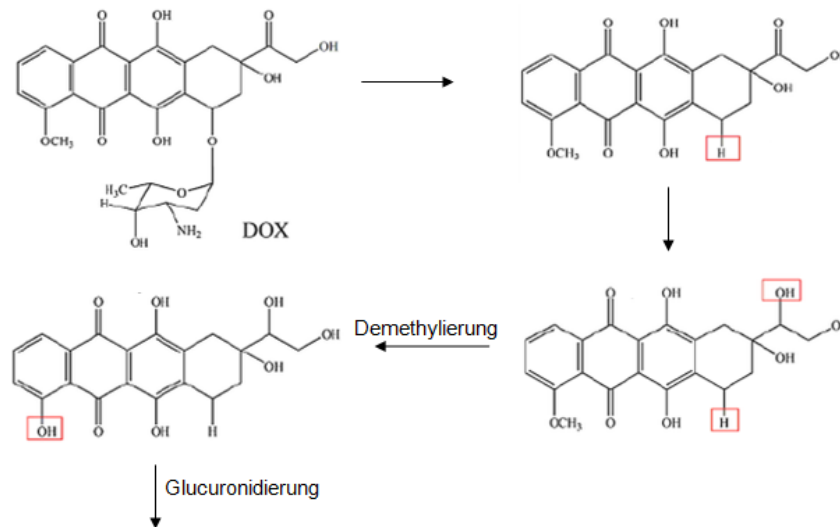


Abbildung 7: Stoffwechselweg Doxorubicin [13]

Im Rahmen der Phase I des Metabolismus kommt es zu einer Demethylierungsreaktion von Doxorubicin. Anschließend findet eine Glucuronidierung statt, welche zur Phase II gehört.

Anthrazyklin-Antibiotika haben eine zytotoxische Wirkung, welche sie an verschiedenen Phasen des Mitosezyklus umsetzen. Dies bestimmt ihre hohe therapeutische Aktivität, führt aber auch zu erheblichen Nebenwirkungen wie Kardiotoxizität. [11] [12] [13]

Die Mechanismen der Anthrazyklin abhängigen Kardiotoxizität sind sehr vielfältig. Viele Beobachtungen zeigen, dass Wechselwirkungen mit dem zellulären Eisenstoffwechsel wichtig sind. Der genaue molekulare Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt, aber wahrscheinlich ist die Bildung freier Sauerstoffradikale durch Anthrazykline dafür verantwortlich. Dabei kommt es vorübergehend zur Bildung eines Semichinonradikals, welches sein freies Elektron schnell weiter auf molekularen Sauerstoff überträgt. Dadurch entstehen Superoxidradikale und das Anthrazyklin wird wieder zu seiner ursprünglichen Form, dem Chinon reoxidiert. Diese Reaktion wird durch NADH / NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen katalysiert, kann aber auch spontan oder unter Beteiligung von freiem Eisen ablaufen. Aus dem entstandenen Superoxid werden weitere radikale Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. Dieser Überschuss an freien Radikalen kann für folgende Vorgänge verantwortlich sein:

- Einleitung von Apoptose in den Kardiomyozyten
- Membranschädigungen
- Beeinflussung der Genexpression
- Schädigung der DNA



In vitro bedeutet, dass der Metabolismus von Arzneistoffen außerhalb des lebenden

Mit Hepatozyten bzw. Leberzellen können Untersuchungen zum Phase I und Phase II

Leider sind frisch isolierte Hepatozyten nur 4 Stunden haltbar. Deshalb werden neben

1.5 Rationale

Bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe ist nicht nur die Wirkstärke und Selektivität wichtig, sondern auch der Metabolismus ein wesentlicher Aspekt. Daher sind gute metabolische Eigenschaften ein Ziel der Arzneimittelentwicklung. Es können sowohl aktive als auch inaktive Metaboliten gebildet werden. Diese haben wesentlichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und Wirkung aber auch auf die Nebenwirkungen eines Arzneistoffes. [18] [19]

Ziel dieser Diplomarbeit ist es die Metabolisierung von SL 11 und SL 22 zu untersuchen. Hierfür werden verschiedene Hepatozytenmodelle verwendet, wie Hepatozyten von Menschen, Ratten und Affen. Damit sollen Rückschlüsse auf den Abbau der Substanzen und der dadurch gebildeten Abbauprodukte gezogen werden können. Die Untersuchung der Substanzinstabilität, der metabolischen Stabilität und der metabolischen Umsetzung werden für die Beurteilung des Metabolismus herangezogen. Ebenso soll der Unterschied der Metabolisierung in menschlichen und tierischen Hepatozyten untersucht werden.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden auch Inhibitionsversuche mit verschiedenen CYP-Inhibitoren durchgeführt.

2 Experimenteller Teil

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Im Folgenden sind die für die Probenaufbereitung verwendeten Chemikalien und Reagenzien aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Name der Chemikalie/n	Herstellungsfirma bzw. Zulassungsinhaber
ACN (Acetonitril)	Merck KG
Alkohol 70%	
Analysierte Substanzen SL 11, SL 22	Sealife Pharma GmbH Tulln
Aqua destillata	Department für Pharmakologie, Universität Wien
Cell-Maintenance Cocktail-B	Invitrogen™-Life Technologies, USA
Cyropreserved Hepatocyte Recovery Medium	Invitrogen™-Life Technologies, USA
Dexamethason	Invitrogen™-Life Technologies, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid) > 99,9%, D4540	Sigma-Aldrich
Essigsäure > 99,9%, 338826	Sigma-Aldrich
Inhibitoren: Ketoconazol Chlormethiazol Ticlopidin α -Naphthoflavin Quinidine Fluconazol	Sigma-Aldrich
Phosphatpuffertablette P4417-50TAB	Sigma-Aldrich
Sealife Compounds Wasser/Essigsäure (Verhältnis 1000:1))	Hergestellt an der Universität Wien aus Bestandteilen der Merck-KG

Sealife Compounds Acetonitril/Essigsäure (Verhältnis 1000:1)	Hergestellt an der Universität Wien aus Bestandteilen der Merck-KG
Testosteron, 86500, 5G	Sigma Aldrich
Trypanblau 0,4%, T8154	Sigma-Aldrich
Williams Medium E	Invitrogen™-Life Technologies, USA

2.2 Geräte und Materialien

2.2.1 Geräte und Materialien zur Herstellung des Eluenten

Die Eluenten wurden bereits in Tabelle 5 (Sealife Compounds) aufgelistet. Mit Hilfe welcher Geräte sie hergestellt wurden, sei in der folgenden Tabelle erläutert:

Tabelle 7: Geräte und Materialien zur Herstellung der Eluenten

Gerät	Produktinformation	Hersteller
Magnetrührer	MR 300 1 K	Heidolph Instruments
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Typ: RK 510	Bandelin electronic GmbH
Parafilm	Laboratory Film „M“	Bemis Company

2.2.2 Geräte und Materialien für die Probenherstellung

Tabelle 8: Geräte und Materialien für die Probenherstellung

Bezeichnung	Produktinformation	Herstellungsfirma
12-well-plate	Multiwell, Sterile	Merck VWR International
Analysenwaage	Sartorius H110	Sartorius Mechatronics Austria GmbH
Automatische Pipette		Hirschmann Laborgeräte
Centrifuge Tubes, Super Clear	15 ml	Merck VWR International
Deckglas	18 x 18 mm	
Einmal Latexhandschuhe	Class 1, AQL 1,5	Merck VWR International
Eppendorf-Gefäße	Micro Tubes, Plastibrand,	Brand GmbH

	1,5 ml	Deutschland
Eppendorf-Pipetten	2-20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl	Research Plus
Eppendorf-Pipettenspitzen	Universal blue tips: 50-1000µl Universal yellow tips: 2-200µl	Merck VWR International
Eprouvetten	Plastibrand	Brand GmbH Deutschland
Heizblock	Techne DRI-Block DB 2A	Techne (Cambridge)
Hepatozyten	human männlich, human weiblich, animal von Ratten, animal von Affen	Invitrogen™-Life Technologies, USA
HPLC Caps	8-SC Deckel für HPLC-Fläschchen	Biolab GmbH
HPLC Mikrovials	02-MTV	Biolab GmbH
HPLC Septum	8-ST 15	Biolab GmbH
HPLC Vials	2SV(A) P317	Biolab GmbH
HPLC Anlage	Hitachi Chromaster	Merck VWR International
Inkubator		Heraeus Instruments GmbH
Küchenrolle		
Kühlschrank		Liebherr profi line
Laminar Biosafe 2		Ehret GmbH
Magnetrührer	MR 3001K	Heidolph Instruments GmbH
Mikroskop	Nicon Eclipse Te2000-S	Nicon GmbH
Pasteurpipette aus Glas	150 mm Länge	Merck VWR International

Pipettensauger		
Tiefkühlschrank	UF755G	Dometic
Vortex		Velp scientifica
Wasserbad	Transonic Digital	Elma Schmidbauer GmbH
Zählkammer	Neubauer	Assistent Deutschland
Zentrifuge	Galaxy 16 DH	Merck VWR International
Zentrifuge	Laborfuge 400	Heraeus Instruments GmbH

2.3 Verwendete Software

Tabelle 9: Software

Software	Verwendungszweck
Graph Pad Prism 6	Erstellung von Graphiken
Microsoft Office Excel	Auflistung der Daten
Microsoft Office Word	Bearbeitung und Niederschrift

2.4 Allgemeine Vorbereitung

Sowohl Eluenten, Waschflüssigkeit als auch Phosphatpuffer benötigen eine kurze Aufarbeitung, die hier kurz erläutert wird.

2.4.1 Herstellung der Eluenten und der Waschflüssigkeit

Die für die HPLC-Analyse notwendigen Eluenten setzen sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- Eluent A: 1:1000 (Essigsäure: Wasser dest.)

In eine 1 l Flasche werden 999 ml destilliertes Wasser vorgelegt und anschließend mit 1 ml Essigsäure versetzt.

- Eluent B: 1:1000 (Essigsäure: ACN)

Hier werden 999 ml ACN verwendet und 1 ml Essigsäure hinzugefügt

- Waschflüssigkeit: 20:80 (Wasser dest. : ACN)

Für die Waschflüssigkeit werden 200 ml destilliertes Wasser und 800 ml ACN verwendet.



Abbildung 9: Eluenten

Sowohl die Eluenten, als auch die Waschflüssigkeit wurden nach dem zusammenmischen mit einem Magnetstäbchen versetzt und mit dem Magnetrührer einige Minuten lang gut durchmischt. Anschließend werden die Gefäße mit Parafilm verschlossen und für 30 Minuten ins Ultraschallbad gestellt damit die Luft entweichen kann.



Abbildung 10: Ultraschallbad

2.4.2 Herstellung von Phosphatpuffer

PBS: pH 7,4

Eine Tablette „phosphat bufferd tablet“ wird in 200 ml destilliertem Wasser gelöst und durchmischt.

2.5 Hepatozytenversuche

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Hepatozytenversuche durchgeführt. Es handelte sich dabei um Hepatozyten von Männern, Frauen, Ratten und Affen.

2.5.1 Vorbereitungen

2.5.1.1 Allgemeine Vorbereitungen

Zunächst wird das Williams Medium E (=WME), welches dem Erhalt der Hepatozyten dient, hergestellt. Es wird mit 20 ml Hepatozyten Maintenance und 5 µl Dexamethason versetzt. Danach ist das Medium im Kühlschrank 31 Tage lang haltbar. Vor der Durchführung des Hepatozytenversuchs muss es 2 Stunden im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden.

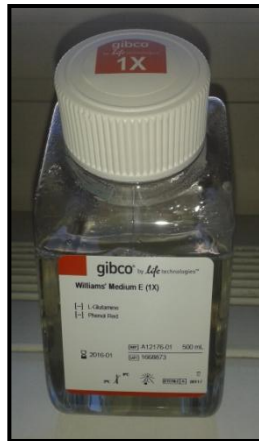


Abbildung 11: WME

Ebenso musste das CHRM (=Recovery Medium) im Wasserbad zwei Stunden erwärmt werden.



Abbildung 12: Wasserbad

Weiters wurde das Gegengewicht für die Zentrifuge vorbereitet, welches 51,5 ml beinhalten soll. Diese 51,5 ml setzten sich aus 50 ml CHRM und 1,5 ml Zellen zusammen.

2.5.1.2 Vorbereitung der Laminar Air Flow Werkbank

Während das Medium im Wasserbad erwärmt wird kann die Laminar Air Flow Werkbank, auch Reinraumwerkbank genannt, vorbereitet werden. In dieser herrscht ein Luftstrom, durch den die Kontaminationen gering gehalten werden. Es ist sehr wichtig unter diesen Bedingungen zu arbeiten, weil die Hepatozyten sehr empfindlich sind und bereits kleine Verunreinigungen ausreichen um sie abzutöten.

Vor Beginn des Versuches wird die Oberfläche der Werkbank mit Alkohol 70% desinfiziert. Alle Gefäße und für den Probendurchgang notwendige Utensilien, wie Halterungen, Platten, Pipetten usw. werden bereit gelegt und vor dem Hineingeben ebenfalls desinfiziert.



Abbildung 13: Laminar Air Flow Werkbank

Auch das Gegengewicht für die Zentrifuge wird bereits vorbereitet.

2.5.1.3 Herstellung der Stammlösungen

2.5.1.3.1 SL 11, SL 22 und Testosteron

SL 11

Für SL 11 wird eine Stock solution mit 15 mmol, sowie 3 weitere Konzentrationen mit 40 μ mol, 20 μ mol und 10 μ mol hergestellt.

- Für die Stock solution mit 15 mmol werden 5,93 mg SL 11 in ein Eppendorfgefäß genau eingewogen und in 994 μ l DMSO 100% gelöst.

- Zur Herstellung der 40 μmol Lösung werden 5984 μl WME in eine Tube vorgelegt und 16 μl der Stock solution mit einer Eppendorf Pipette zugefügt. Nun wird die Tube verschlossen und gut geschüttelt um eine homogene Lösung zu erhalten. (wahre Konzentration in den Zellen: 20 μmol)
- Für die nächste Konzentration wird eine 1:1 Verdünnung hergestellt. Es werden 3 ml WME in eine neue Tube vorgelegt und 3 ml der 40 μmol Lösung hinzugefügt. (wahre Konzentration in den Zellen: 10 μmol)
- Um eine 10 μmol Lösung herzustellen werden 3 ml WME mit 3 ml der vorangegangenen Verdünnung zusammengefügt. (wahre Konzentration in den Zellen: 5 μmol)

Für die größeren Volumina wird eine automatische Pipette verwendet. Zwischen den Verdünnungen ist es wichtig, dass die Lösungen gut durchmischt werden.



Abbildung 14: automatische Pipette

Anhand des Molekulargewichts von SL 11, das 395 beträgt, kann die einzusetzende Menge berechnet werden.

Berechnung:

- 1 mol = 395 g/l
15 mmol = 5925 mg/l
→ 5,93 mg/ml SL 11 muss man einwiegen
- 15 mmol.....6000 μl
0,04 mmol.....16 μl
→ 16 μl Stock solution + 5984 μl WME

SL 22

Auch für SL 22 wird eine Stock solution mit 2,2779 mmol und 3 weitere Konzentrationen mit 40 µmol, 20 µmol, 10 µmol hergestellt.

- Für die Stock solution wird 1 mg SL 22 in ein Eppendorfgefäß eingewogen und in 999 µl DMSO 100% gelöst.
- Zur Herstellung der 40 µmol Konzentration werden 2947,4 µl WME in ein Tube vorgelegt und 52,6 µl der Stock solution zupipettiert. (wahre Konzentration in den Zellen: 20 µmol)
- Für die 20 µmol Lösung wird eine 1:1 Verdünnung hergestellt. Es werden 1,5 ml Medium mit 1,5 ml der zuvor hergestellten Konzentration gemischt. (wahre Konzentration in den Zellen: 10 µmol)
- Um eine 10 µmol Verdünnung zu erhalten wird wieder eine 1:1 Verdünnung hergestellt. (wahre Konzentration in den Zellen: 5 µmol)

Hier können wieder mit Hilfe des Molekulargewichts von SL 22, welches 439 beträgt, die einzusetzenden Mengen berechnet werden.

Berechnung:

- 1 mol = 439 g/l
2,2779 mmol = 999,99 mg/l
————→ 1 mg/ml SL 11 muss man einwiegen
- 2,2779 mmol.....3000 µl
0,04 mmol.....52,6 µl
————→ 52,6 µl Stock solution + 2947,4 µl WME

Testosteron

Ebenso wird für Testosteron eine Stock solution mit 15 mmol und 3 weitere Konzentrationen mit 20 µmol, 10 µmol und 2 µmol hergestellt.

- Für die Stock solution werden 4,33 mg Testosteron in ein Eppendorfgefäß eingewogen und dann mit 996 µl DMSO 100% gelöst.

- Um eine Konzentration von 20 μmol zu erhalten werden 11984 μl WME in eine Tube vorgelegt und mit 16 μl Stock solution versetzt. (wahre Konzentration in den Zellen: 10 μmol)
- Um die 10 μmol Lösung zu erhalten wird eine 1:1 Verdünnung hergestellt. Es werden 5 ml WME mit 5 ml der vorherigen Verdünnung gemischt. (wahre Konzentration in den Zellen: 5 μmol)
- Für die letzte Konzentration werden 8 ml WME vorgelegt und 2 ml der 10 μmol Lösung hinzugefügt. (wahre Konzentration in den Zellen: 1 μmol)

Die Stock solution mit 10 mmol wird wie folgt hergestellt. Dazu werden 2,88 mg Testosteron in 997 μl DMSO 100% gelöst. Anschließend wird eine 100 μmol Verdünnung hergestellt. Dafür werden 4950 μl Medium vorgelegt und mit 50 μl der Stock solution gut gemischt.

Wiederum ist auf die gute Homogenisierung der Lösungen zu achten.

Anhand des Molekulargewichts von Testosteron, das 288,42 beträgt, kann die einzusetzende Menge berechnet werden.

Berechnung:

- | | |
|---|---|
| • 1 mol = 288,42 g/l | 1 mol = 288,42 g/l |
| 15 mmol = 4326,3 mg/l | 10 mmol = 2884,2 mg/l |
| ————→ 4,33 mg/ml Testosteron | ————→ 2,88 mg/ml Testosteron |
| muss man einwiegen | muss man einwiegen |
| • 15 mmol.....12000 μl | 10 mmol.....5000 μl |
| 0,02 mmol.....16 μl | 0,1 mmol.....50 μl |
| ————→ 16 μl Stock solution + | ————→ 50 μl Stock solution + |
| 11984 μl WME | 4950 μl WME |

2.5.1.3.2 Inhibitoren

Die folgenden Inhibitoren sind Hautmodelle und kommen in der Haut vor.

Für die Inhibitoren werden eine Stock solution und 3 weitere Konzentrationen 40 μmol , 20 μmol und 4 μmol hergestellt.

Ketoconazol: CYP 3A4 Inhibitor

Für die 10 mmol Stock solution werden 5,3 mg Ketoconazol in 995 μl DMSO 100% gelöst.

Anschließend werden die Verdünnungen folgendermaßen vorgenommen:

- 40 µmol: 24 µl der 10 mmol Stock solution und 5976 µl WME.
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 10 µmol)
- 20 µmol: 3 ml der vorhergehenden Verdünnung (40 µmol) und 3 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 5 µmol)
- 4 µmol: 1 ml der vorhergehenden Verdünnung (20 µmol) und 4 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 1 µmol)

Chlormethiazol: CYP 2E1 Inhibitor

Für diesen Inhibitor ist eine 13 mmol Stock solution herzustellen. Dazu werden 2,6 mg Chlormethiazol in 997,4 µl DMSO 100% gelöst.

Danach werden die Verdünnungen wie folgt hergestellt:

- 40 µmol: 18,5 µl der 13 mmol Stock solution und 5981,5 µl WME.
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 10 µmol)
- 20 µmol: 3 ml der vorhergehenden Verdünnung (40 µmol) und 3 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 5 µmol)
- 4 µmol: 1 ml der vorhergehenden Verdünnung (20 µmol) und 4 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 1 µmol)

Ticlopidin: CYP 2B6 Inhibitor

Zur Herstellung der 15 mmol Stock solution werden 4,5 mg Ticlopidin in 995,5 µl DMSO 100% gelöst.

Die weiteren Verdünnungen werden folgendermaßen hergestellt:

- 40 µmol: 16 µl der 15 mmol Stock solution und 5984 µl WME.
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 10 µmol)
- 20 µmol: 3 ml der vorhergehenden Verdünnung (40 µmol) und 3 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 5 µmol)
- 4 µmol: 1 ml der vorhergehenden Verdünnung (20 µmol) und 4 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 1 µmol)

α-Naphthoflavin: CYP 1A2 Inhibitor

Es wird eine 15 mmol Stock solution hergestellt. Hierfür werden 4 mg α-Naphthoflavin eingewogen und mit 996 µl DMSO 100% versetzt.

Nun werden die Verdünnungen hergestellt:

- 40 μmol : 16 μl der 15 mmol Stock solution und 5984 μl WME.
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 10 μmol)
- 20 μmol : 3 ml der vorhergehenden Verdünnung (40 μmol) und 3 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 5 μmol)
- 4 μmol : 1 ml der vorhergehenden Verdünnung (20 μmol) und 4 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 1 μmol)

Quinidine: CYP 2D6 Inhibitor

Die 15 mmol Stock solution wird aus 4,8 mg Quinidine und 995,2 μl DMSO 100% hergestellt.

Die weiteren Verdünnungen werden wie folgt hergestellt:

- 40 μmol : 16 μl der 15 mmol Stock solution und 5984 μl WME.
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 10 μmol)
- 20 μmol : 3 ml der vorhergehenden Verdünnung (40 μmol) und 3 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 5 μmol)
- 4 μmol : 1 ml der vorhergehenden Verdünnung (20 μmol) und 4 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 1 μmol)

Fluconazol: CYP 2C9 Inhibitor

Es wird eine 15 mmol Stock solution hergestellt. Dazu werden 4,6 mg Fluconazol eingewogen und in 995,4 μl DMSO 100% gelöst.

Anschließend werden die Verdünnungen hergestellt:

- 40 μmol : 16 μl der 15 mmol Stock solution und 5984 μl WME.
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 10 μmol)
- 20 μmol : 3 ml der vorhergehenden Verdünnung (40 μmol) und 3 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 5 μmol)
- 4 μmol : 1 ml der vorhergehenden Verdünnung (20 μmol) und 4 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen beträgt 1 μmol)

Mit Hilfe des Molekulargewichts der Inhibitoren können wieder die einzusetzenden Mengen berechnet werden.

Tabelle 10: Berechnung der einzusetzenden Mengen der Inhibitoren

Ketoconazol: MG = 531,4	Chlormethiazol: MG = 198,11	Ticlopidin: MG = 300,25
1 mol = 531,4 g/l 10 mmol = 5314 mg/l → 5,3 mg/ml	1 mol = 198,11 g/l 13 mmol = 2575,43 mg/l → 2,6 mg/ml	1 mol = 300,25 g/l 15 mmol = 4503,75mg/l → 4,5 mg/ml
10 mmol.....6000 µl 0,04 mmol.....24 µl → 24 µl SS+ 5976 µl WME	13 mmol.....6000 µl 0,04 mmol.....18,5 µl → 18,5 µl SS+ 5981,5 µl WME	15 mmol.....6000 µl 0,04 mmol.....16 µl → 16 µl SS+ 5984 µl WME
α -Naphthoflavin: MG = 273,3	Quinidine: MG = 324,42	Fluconazol MG = 306,27
1 mol = 273,3 g/l 15 mmol = 4099,5mg/l → 4,1 mg/ml	1 mol = 324,42 g/l 15 mmol = 4866,3 mg/l → 4,8 mg/ml	1 mol = 306,27 g/l 15 mmol = 4594,05 mg/l → 4,6 mg/ml
15 mmol.....6000 µl 0,04 mmol.....16 µl → 16 µl SS+ 5984 µl WME	15 mmol.....6000 µl 0,04 mmol.....16 µl → 16 µl SS+ 5984 µl WME	15 mmol.....6000 µl 0,04 mmol.....16 µl → 16 µl SS+ 5984 µl WME

Folgende Konzentrationen von SL 11 sind für den Inhibitionsversuch notwendig: 40 µmol, 20 µmol und 4 µmol. Es wird wieder eine 15 mmol Stock solution hergestellt, wie bereits beim Punkt Herstellung der Stammlösungen SL 11 erwähnt wurde.

- 40 µmol: 27 µl der 15 mmol Stock solution und 9973 µl WME.
(die wahre Konzentration in den Zellen + Inhibitor: 10 µmol)
- 20 µmol: 4 ml der vorhergehenden Verdünnung (40 µmol) und 4 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen + Inhibitor: 5 µmol)
- 10 µmol: 3 ml der vorhergehenden Verdünnung (20 µmol) und 3 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen: 5 µmol)
- 4 µmol: 1 ml der vorhergehenden Verdünnung (10 µmol) und 4 ml WME
(die wahre Konzentration in den Zellen + Inhibitor: 1 µmol)

2.5.1.4 Vorbereitung Hepatozyten

Die benötigte Menge an Hepatozyten wird aus dem flüssigen Stickstoff, in dem sie bei -196°C eingefroren waren, um sie länger haltbar zu machen, entnommen.



Abbildung 15: Gefäß für flüssigen Stickstoff

Dann werden sie für 1 Minute 50 Sekunden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und vorsichtig geschwenkt bis sie sich von der Wand ablösen. Nun wird der Zellbehälter desinfiziert und unter die Laminar Air Flow Werkbank gegeben. Danach werden die Zellen händisch in das CHRM übergeführt und mit 1 ml CHRM nachgespült um möglichst alle Hepatozyten zu erhalten. Anschließend werden die Zellen durch kopfüber schwenken im Medium homogenisiert und danach je nach Hepatozytenart 10 Minuten, bei unterschiedlichen Umdrehungen zentrifugiert. Bei humanen Zellen zentrifugiert man bei 750 Umdrehungen pro Minute und bei animalen Hepatozyten von Ratten bei 600 Umdrehungen pro Minute. Durch die Zentrifugalkraft setzen sich die Zellen unten ab und man kann das CHRM nun einfach entsorgen, da es nicht mehr benötigt wird. Nun wird eine andere Flüssigkeit hinzugefügt damit die Hepatozyten überleben können. Hierfür wird WME verwendet, worin das Zellpellet durch kreisrunde Bewegungen zum Lösen gebracht wird. Pro 1 Million Zellen wird 1 ml WME hinzugefügt.



Abbildung 16: Zentrifuge

2.5.1.5 Zellen zählen

Nun müssen die Zellen gezählt werden. Dazu werden 100 µl Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß gegeben, mit 700 µl Medium und 200 µl Trypanblau 0,4% versetzt und gut durchmischt. Anschließend werden davon 10 µl entnommen und in die jeweilige Zählkammer, worüber sich ein Deckglas befindet, pipettiert. Anschließend werden auf jeder Seite 3 Quadrate gezählt und dann wird der Durchschnitt daraus gebildet. Durch die Färbung oder Nicht-Färbung mit Trypanblau kann man gut erkennen, ob es sich um lebende oder tote Zellen handelt. Es nehmen nämlich nur tote Zellen den Farbstoff an und werden dadurch dunkelblau.

Berechnungen:

- Zellen pro ml = Lebende intakte Zellen pro Quadrat Dilutionsfaktor (10) x 10000
- Viabilität % = $\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen pro Quadrat}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}} \times 100$

Es ist wichtig, dass genügend lebende Zellen vorhanden sind und die Viabilität mindestens 80 % beträgt.

Humane weibliche Hepatozyten:

3670000 Zellen/ml

Viabilität: 93,03%

Hepatozyten von Ratten:

3400000 Zellen/ml

Viabilität: 78%

2.5.2 Probendurchführung

2.5.2.1 Metabolische Stabilität nach Invitrogen

Dieser Versuch wird nach den Angaben von Invitrogen – Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) durchgeführt.

Es werden 500 µl der zuvor hergestellten Konzentrationen von SL 11 oder SL 22 und 500 µl der Hepatozytenzellsuspension in 12-well-plate laut Pipettierschema pipettiert.



Abbildung 17: 12-well-plate

Ebenso wird eine Negativ-Kontrolle mit toten Zellen durchgeführt. Hierfür werden 500 µl der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wird diese 5 Minuten in einem Wasserbad mit mindestens 50°C erhitzt. Dadurch werden die Zellen abgetötet und die enzymatische Reaktion wird gestoppt. Diese Zellen und 500 µl WME werden in den vorhergesehenen Bereich pipettiert.

Es wird auch eine Negativ-Kontrolle mit lebenden Zellen durchgeführt. Dafür werden 500 µl der lebenden Zellsuspension und 500 µl WME verwendet.

Nach folgenden Pipettierschema wurde gearbeitet:

Tabelle 11: Pipettierschema metabolische Stabilität SL 11

Hep + SL 11 10µmol 5µmol*	Hep + SL 11 40µmol 20µmol*		Hep + Testos 2µmol 1µmol*
Hep + SL 11 20µmol 10µmol*		negativ Kontrolle lebend	negativ Kontrolle tot

Tabelle 12: Pipettierschema metabolische Stabilität SL 22

Hep + S L22 10µmol 5µmol *	Hep + SL 22 40µmol 20µmol *		Hep + Testos 100µmol 50µmol *
Hep + SL 22 20µmol 10µmol*		WME + SL 22 20 µmol 10 µmol*	Negativ Kontrolle lebend

* Man kann davon ausgehen, dass die Substanzen 1:1 verdünnt werden, da die Hepatozytensuspension (=Hep) und die jeweilige Konzentration der gelösten Substanz (=SL 11/ SL 22) in einem Verhältnis von 1:1 zugegeben wird. Deshalb ist die wahre Konzentration in den Zellen jeweils die Hälfte der Ausgangskonzentration. Ebenso wird eine Konzentration von Testosteron (=Testos) mit Hepatozyten im Verhältnis 1:1 versetzt. Deshalb kann man auch davon ausgehen, dass die Substanz wiederum dementsprechend verdünnt wird.

2.5.2.2 Leerwertproben

Ebenfalls werden Leerwertproben in Wells pipettiert, also wird anstelle von Hepatozyten 500 µl WME verwendet. Dies erfolgt nach dem gleichen Pipettierschema. So lässt sich der Abbau der Substanz auch ohne Hepatozyten beurteilen.

2.5.2.3 Inhibitionsversuche

Es werden 125 µl von SL 11 in den 3 vorher hergestellten Konzentrationen und 125 µl der vorher hergestellten Konzentrationen der Inhibitoren laut Pipettierschema in eine 12-well-plate pipettiert. Dann werden noch 250 µl der Hepatozytenzellsuspension hinzugefügt. Es werden auch Proben ohne Inhibitoren durchgeführt. Hier wird anstelle der Inhibitoren 125µl WME pipettiert. Wiederum werden Leerwertproben durchgeführt. Hierfür wird anstelle der Inhibitoren und der Hepatozyten WME verwendet. Die Platten werden anschließend für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach können die Platten aus der Laminar Air Flow Werkbank entfernt werden. Nun wird zu jeder Probe 1 ml ACN zur Termination hinzugefügt. Die klaren Überstände der einzelnen Proben werden in Eppendorfgefäße übergeführt und gevortext.



Abbildung 18: Vortex

Anschließend werden die Proben bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nun können die HPLC Vials mit dem klaren Überstand mit Hilfe einer Pasteurpipette befüllt werden. Hier sind keine Mikrovials notwendig, da es sich um größere Volumina handelt. Danach erfolgt die Analyse in der HPLC:

Tabelle 13: Pipettierschema Inhibitionsversuche

SL 11 4µmol Keto 4µmol Hep	SL 11 4µmol Chlor 4µmol Hep	SL 11 4µmol Ticl 4µmol Hep	SL 11 4µmol α-N 4µmol Hep	SL 11 4µmol Qu 4µmol Hep	SL 11 4µmol Flu 4µmol Hep
SL 11 20µmol Keto 20µmol Hep	SL 11 20µmol Chlor 20µmol Hep	SL 11 20µmol Ticl 20µmol Hep	SL 11 20µmol α-N 20µmol Hep	SL 11 20µmol Qu 20µmol Hep	SL 11 20µmol Qu 20µmol Hep

SL 11 40µmol Keto 40µmol Hep	SL 11 40µmol Chlor 40µmol Hep	SL 11 40µmol Ticl 40µmol Hep	SL 11 40µmol α-N 40µmol Hep	SL 11 40µmol Qu 40µmol Hep	SL 11 40µmol Qu 40µmol Hep
SL 11 4µmol WME Hep	SL 11 20µmol WME Hep	SL 11 40µmol WME Hep	SL 11 4µmol WME WME	SL 11 20µmol WME WME	SL 11 40µmol WME WME

Hier werden die Ausgangskonzentrationen der gelösten Substanzen (SL 11 / Inhibitoren) um 1:4 verdünnt. Daher ist die wahre Konzentration in den Zellen jeweils ein Viertel der Ausgangskonzentration. Diese werden bereits unter dem Punkt Herstellung von Stammlösungen Inhibitoren angegeben.

2.5.2.4 Probenentnahme

Vor jeder Probenentnahme müssen die Platten gut geschwenkt werden, weil sich die Hepatozyten unten absetzen. So kommt es dadurch zu einer guten Durchmischung. Es wird mit der Probenentnahme begonnen, sobald die 12-Well-Platten fertig befüllt sind.

Nach folgenden Zeitpunkten werden die Proben gezogen:

- 0 Minuten
- 15 Minuten
- 30 Minuten
- 60 Minuten
- 120 Minuten
- 180 Minuten
- 240 Minuten
- 300 Minuten
- 1440 Minuten

Zwischen den Abnahmezeiten wird die Platte immer in den Inkubator bei 37°C gegeben. Dies ist sehr wichtig, da dadurch für die Zellen Körpertemperatur simuliert wird.



Abbildung 19: Inkubator

Zu den Abnahmezeitpunkten werden aus jedem Well mit einer Pipette 80 μ l entnommen und in ein vorbereitetes und beschriftetes Eppendorfgefäß gegeben. Dabei wird die Pipettenspitze innerhalb des Gefäßes abgeworfen.

2.5.2.5 Proteinfällung

Da nun die Zellen getötet werden, ist es nicht mehr notwendig unter der Laminar Air Flow Werkbank zu arbeiten. In jedes Eppendorfgefäß werden 80 μ l ACN hinzugefügt um die Reaktion zu stoppen und die Proteine zu fällen. Danach wird noch einmal durch die zuvor abgeworfene Pipettenspitze gespült.



Abbildung 20: Spülen der Pipettenspitze

2.5.2.6 Zentrifugation

Die Proben werden 5 Minuten bei 12 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Dadurch setzen sich die vorher gefällten Proteine ab und darüber bildet sich ein klarer Überstand.



Abbildung 21: Zentrifuge für Eppendorfgefäße

2.5.2.7 Befüllung der HPLC Vials

Mit einer Pasteurpipette werden jetzt die HPLC Mikroinserte bis zur blauen Welle mit der klaren Lösung luftblasenfrei befüllt. Diese gibt man dann in vorher beschriftete HPLC Fläschchen und verschließt diese mit einem so genannten Cap, mit Septum.



Abbildung 22: Beschriftete HPLC Vials

Die Verwendung von Mikroinserten ist sehr wichtig, weil es sich um sehr kleine Volumina handelt, die hier abgenommen werden. Würde man normale HPLC Vials verwenden, könnte die Injektionsnadel der HPLC nicht genug Flüssigkeit entnehmen, da die Mengen zu klein sind.



Abbildung 23: Cap mit Septum, Mikrovial

2.5.3 Probenanalyse mit HPLC-Anlage



Abbildung 24: HPLC-Anlage

Die Analyse der vorbereiteten Proben erfolgt mit Hilfe der High Performance Liquid Chromatographie. Dies ist eine Form der Säulenchromatographie, wo das Elutionsmittel

mithilfe von Pumpen durch die Trennsäule gedrückt wird. Sie dient der Trennung von Substanzgemischen. Durch die entstehenden Peaks können qualitative als auch quantitative Aussagen getroffen werden. Die Elutionszeit ist dabei ein Charakteristikum für die jeweilige Substanz. Die Analyse erfolgt mit Hilfe von Umkehrphasen-Chromatographie, das heißt es wird mit einer apolaren stationären Phase und einer polaren mobilen Phase gearbeitet. [7]

In der folgenden Tabelle werden einige wichtige Parameter erläutert:

Tabelle 14: Wichtige Bestandteile der HPLC-Anlage

HPLC-Anlage	Merck VWR HITACHI Chromaster
Autosampler	5210
Analysenzeit	42/45 Minuten
Column Oven	5310, Temperatur 36°C
Injektionsvolumen	40 µl
Pumpe	5110
Temperatur der Säule	36 +/- 1°C
UV-Detektor	5410
Wellenlängen	235/270 nm

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Auswertung

3.1.1 Allgemeine Berechnung

Bei diesen Versuchen wurden auch Leerwertproben durchgeführt, das heißt, anstelle von Hepatozytenzellsuspension wurde Medium verwendet und damit 100% Werte ermittelt. Mit diesen können die unterschiedlichen Stabilitäten und Instabilitäten sowie die metabolische Umsetzung berechnet werden. (berechnete Werte siehe Ergebnisteil S.37 ff.).

- Substanzinstabilität

Die Instabilität von SL 11 ergibt sich aus der Differenz der Peakfläche des Standards und der Peakfläche des Leerwerts. Danach können mit Hilfe einer Schlussrechnung die Prozente ermittelt werden, wobei die Peakfläche des Standards als 100% Wert verwendet wird.

- Metabolische Stabilität

Hier wird jener Anteil von SL 11 berechnet, der nach Hepatozytenzugabe noch stabil ist. Mit einer Schlussrechnung kann die metabolische Stabilität prozentuell ermittelt werden. Als 100% Wert wird die Peakfläche des Standards herangezogen.

- Metabolische Umsetzung

Diese bezieht sich auf die Menge von SL 11 die enzymatisch umgesetzt wird. Hierfür wird zunächst die Differenz aus der Peakfläche des Leerwertes und der Peakfläche des Wertes mit Hepatozyten gezogen. Anschließend kann wieder mit einer Schlussrechnung die prozentuelle metabolische Umsetzung berechnet werden. Als 100% Wert wird die Peakfläche des Leerwertes herangezogen.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 SL 22

Die Versuche mit SL 22 wurden an Hepatozyten von Menschen, Ratten und Affen durchgeführt. Dabei merkt man, dass SL 22 zu SL 11 metabolisiert wird.

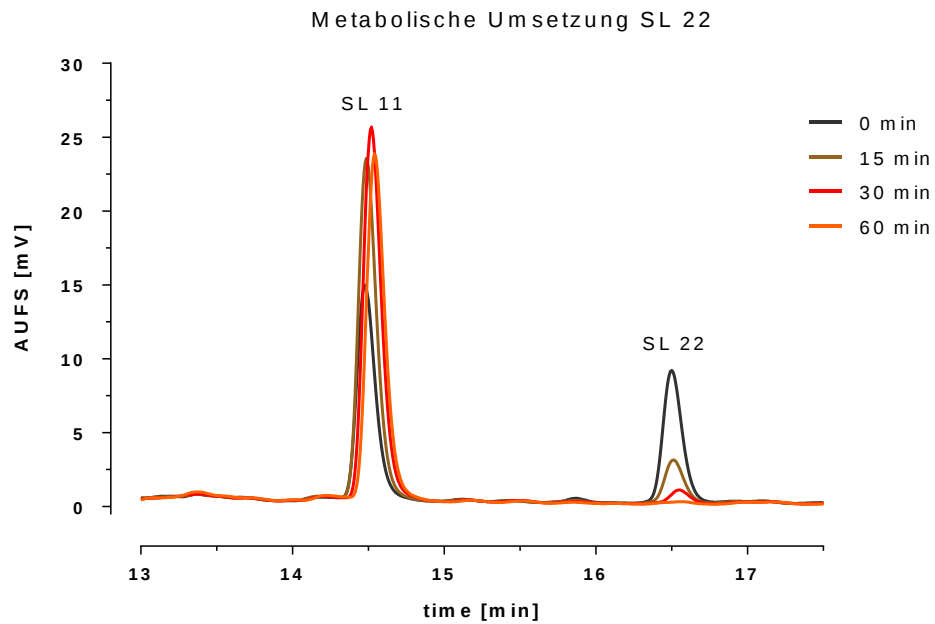
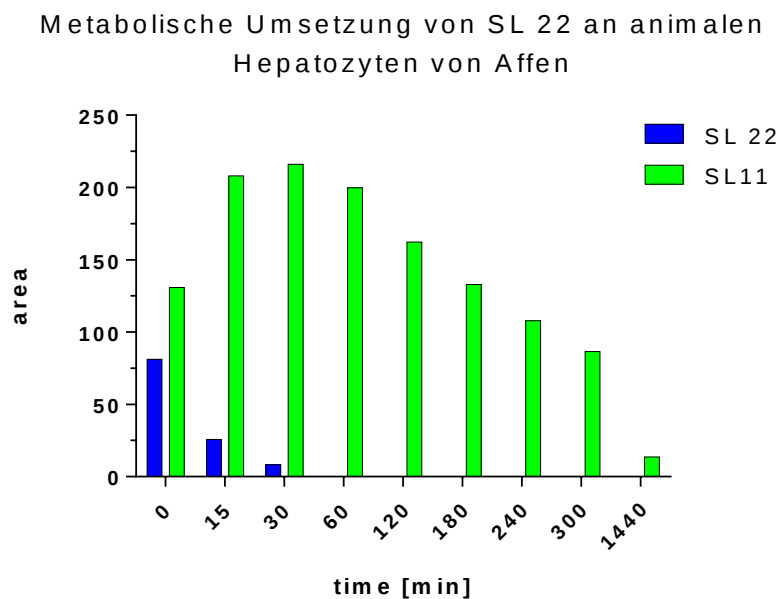
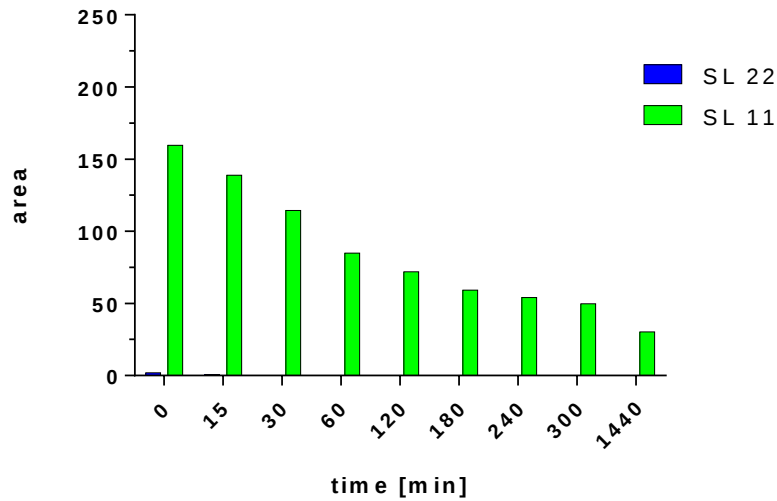


Abbildung 25: Metabolisierung von SL 22

Die Retentionszeit von SL 22 findet sich bei 16,5 Minuten, wobei SL 11 eine Retentionszeit von 14,4 Minuten aufweist. Anhand der Chromatogramme und der Peakflächen wird schnell deutlich, dass SL 22 schnell abgebaut wird und SL 11 entsteht. Also ist SL 22 ein Prodrug das durch Metabolisierung in der Leber in SL 11 umgewandelt wird.



Metabolische Umsetzung von SL 22 an animalen Hepatozyten von Ratten



Metabolische Umsetzung SL 22 an humanen Hepatozyten

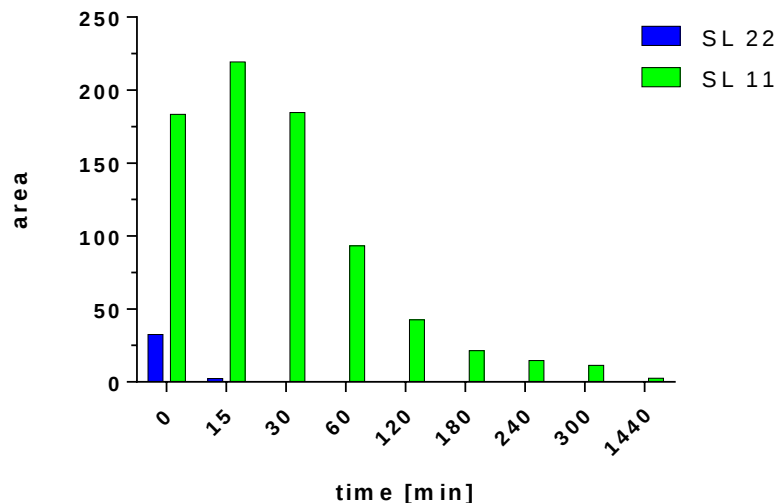


Abbildung 26: Metabolische Umsetzung von SL 22 bei einer Konzentration von 10 μmol

Anhand dieser Diagramme erkennt man, dass bei der Probenentnahme bei 0 Minuten noch eine geringe Konzentration von SL 22 vorhanden ist. Der Großteil wurde aber bereits zu SL 11 umgewandelt. Spätestens nach 30 Minuten ist das gesamte SL 22 metabolisiert worden.

Bei dem Versuch mit animalen Hepatozyten von Affen ist die Konzentration von SL 22 nach 0 Minuten noch am größten, während bei den Hepatozyten von Ratten bereits bei der ersten Probenentnahme fast das ganze SL 22 umgewandelt wurde.

3.2.2 SL 11

Zusätzlich zu den Proben mit SL 11 wurde auch immer mindestens eine molare Konzentration von Testosteron mit der Hepatozytensuspension versetzt. Dies dient zur Vergewisserung, dass die angegebene Arbeitsweise funktioniert und Testosteron auch tatsächlich metabolisiert wird. Die Retentionszeit liegt bei 15,6 Minuten.

Tabelle 15: Peakflächen von Testosteron 50 µmol

Zeit (min)	area
0	197,8
15	168,9
30	111,0
60	60,1
120	10,5
180	0
240	0
300	0

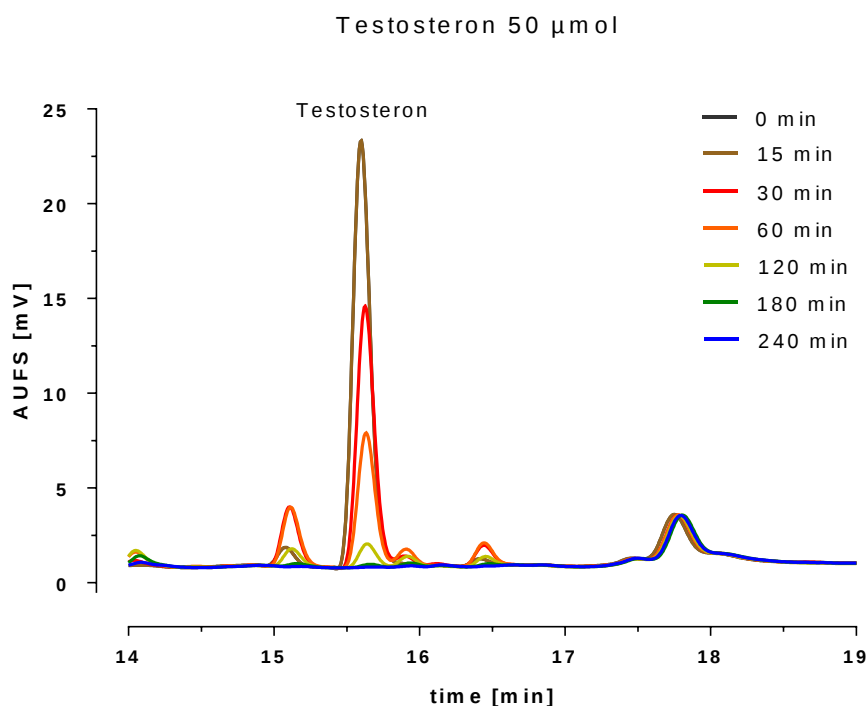


Abbildung 27: Enzymatischer Abbau von Testosteron

Damit kann man beweisen, dass das durchgeführte Zellsystem funktioniert. Der Testosteronpeak wird mit der Zeit immer kleiner, das heißt, es findet mit der Zeit ein enzymatischer Abbau statt. Nach 3 Stunden wurde Testosteron vollständig von den Hepatozyten umgesetzt. Dies stimmt auch mit der vorhandenen Literatur überein.

3.2.2.1 Substanzinstabilität

Bei der Versuchsreihe mit Hepatozyten wurden auch Leerwertproben durchgeführt. Hier wurde anstelle von Hepatozytenzellsuspension Medium zugefügt. Daraus kann man die Instabilität von SL 11 berechnen.

Die Peakflächen der Leerwerte stellen jenen Teil der Substanz dar, der stabil ist.

Tabelle 16: Peakflächen der Standards

area Standard		
5 μmol	10 μmol	20 μmol
92,6	184,3	389,8

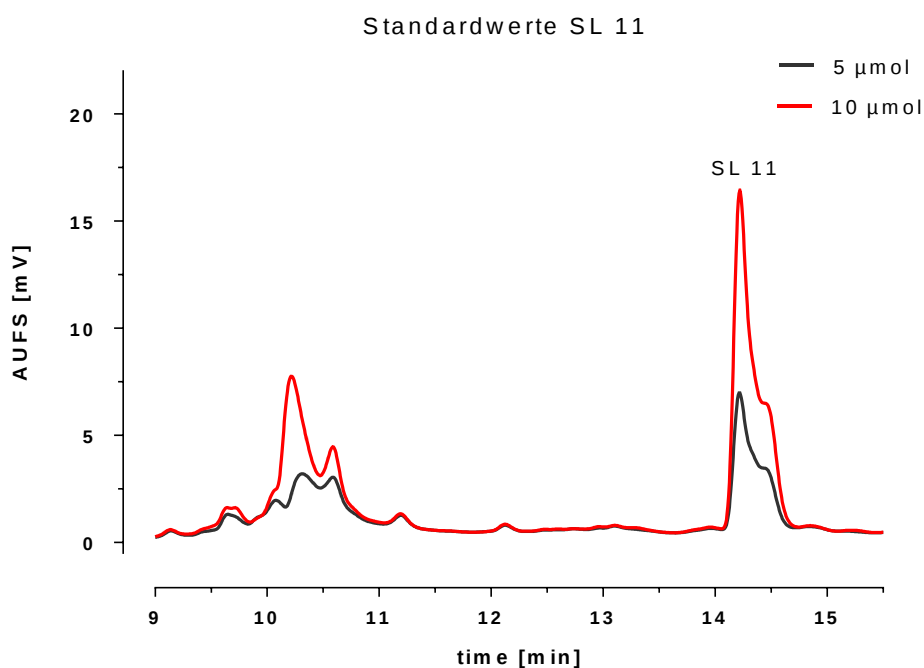


Abbildung 28: Chromatogramme der Standards

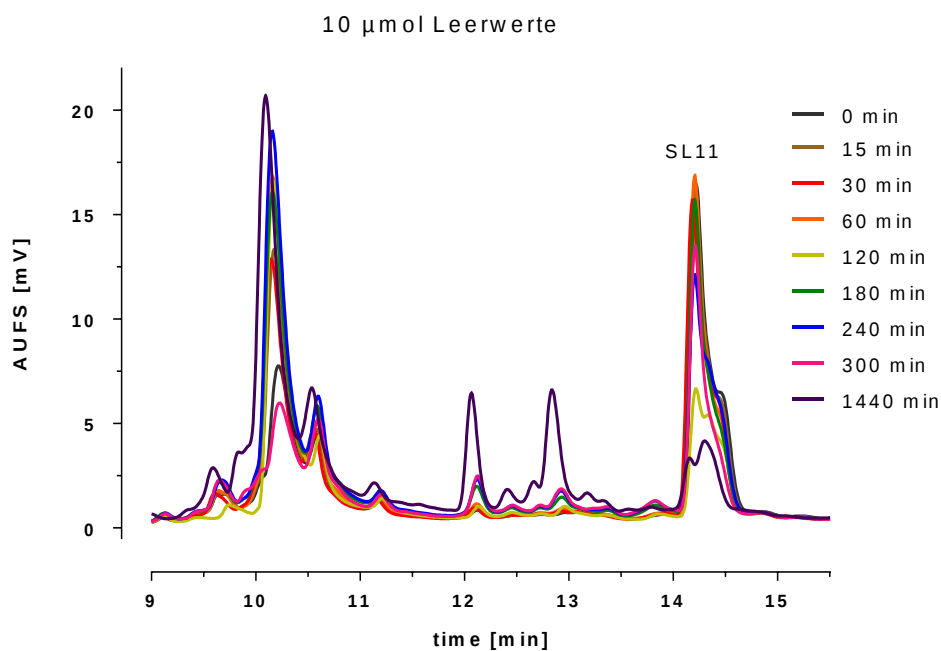


Abbildung 29: Chromatogramme der Leerwerte bei einer Konzentration von 10 µmol

Tabelle 17: Peakfläche von SL 11 der Leerwerte

Zeit [min]	area Leerwerte		
	5 µmol	10 µmol	20 µmol
0	92,6	184,3	389,8
15	92,2	184,2	361,7
30	92,2	184,2	360,2
60	86,4	184,1	352,6
120	85,5	183,5	345,4
180	71,4	182,1	295,4
240	58,0	174,3	270,7
300	55,2	146,8	262,4

Tabelle 18: Instabilität von SL 11

Zeit [min]	Substanzinstabilität [%]		
	5 µmol	10 µmol	20 µmol
0	0,0	0,0	0,0
15	0,4	0,1	7,2
30	0,4	0,1	7,6
60	6,7	0,1	9,5

120	7,7	0,4	11,4
180	22,9	1,2	24,2
240	37,4	5,4	30,6
300	40,4	20,3	32,7

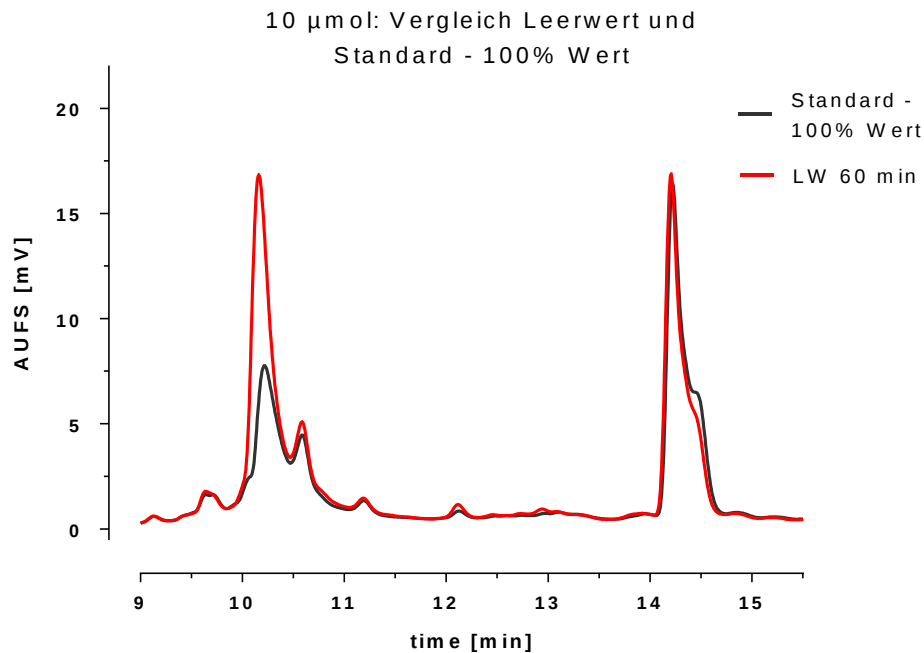


Abbildung 30: Vergleich Standard – 100% Wert und Leerwert bei einer Konzentration von 10 μmol

Der Leerwertpeak ist nur geringfügig kleiner als der Peak des Standards bei derselben Konzentration. Daher ist die Substanz unter den gegebenen Bedingungen relativ stabil

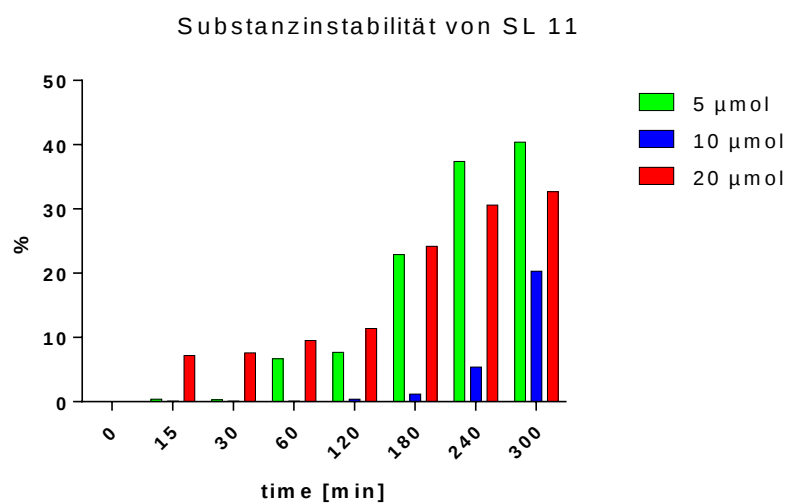


Abbildung 31: Instabilität von SL 11

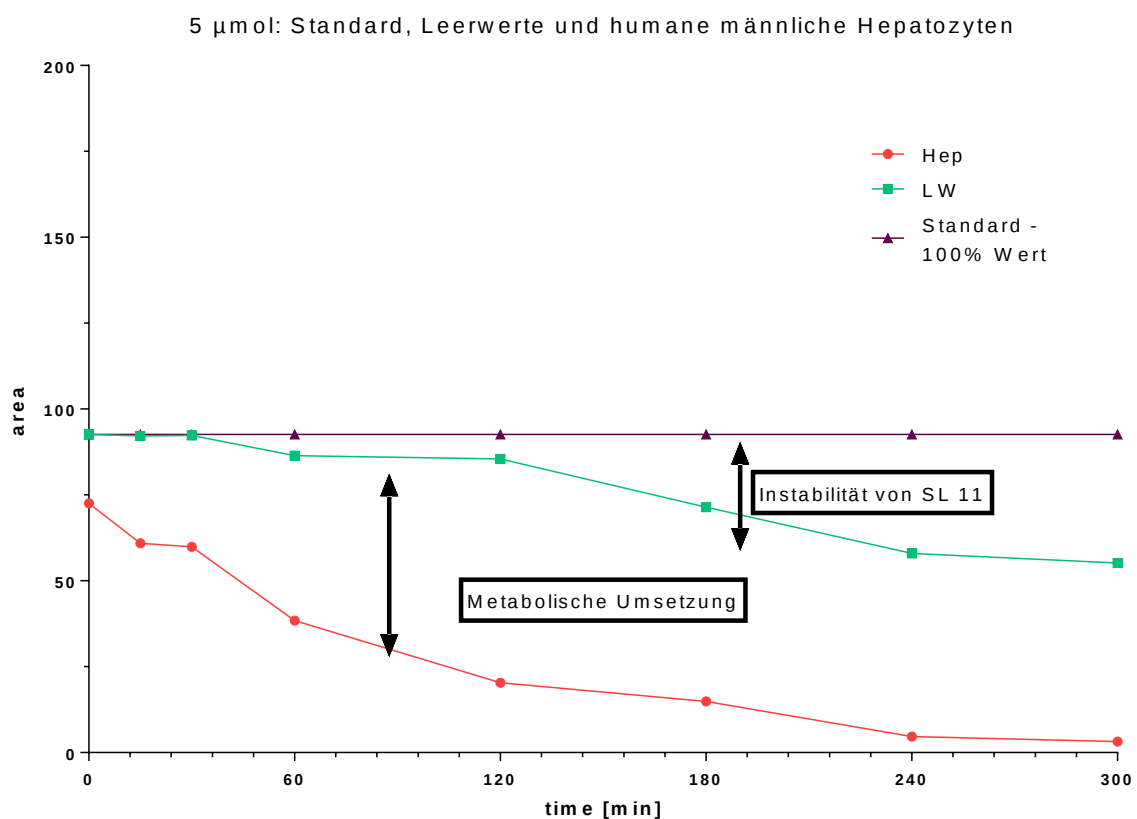
Bei den ersten Abnahmezeitpunkten ist die Substanz sehr stabil, da man keinen Unterschied zum 100% Wert erkennen kann. Bei der 20 μmol Konzentration kommt es bereits nach 15 Minuten zu einer geringen Instabilität von 7,2%. Erst nach 60 Minuten beträgt die Instabilität bei der 5 μmol Konzentration 6,7%, während die 10 μmol Konzentration stabiler zu sein scheint. Hier kommt es erst nach 240 Minuten zu einer geringen Instabilität von 5,4%. Es kommt zu keiner Annäherung der drei Konzentrationen. Nach 300 Minuten ist bei der niedrigeren Konzentration 40% der Substanz zerfallen, bei der mittleren nur 20% und bei der höchsten sind 32% der Substanz instabil. Die niedrigste Konzentration scheint daher am Instabilsten zu sein, während die 10 μmol Konzentration die höchste Stabilität aufweist.

3.2.2.2 Humane Hepatozyten

Im Zuge der Versuchsreihe mit SL 11 wurden Proben mit verschiedenen Hepatozytenmodellen durchgeführt. Einerseits verwendeten wir männliche Hepatozyten, aber auch weibliche kamen zum Einsatz.

3.2.2.2.1 Männliche Hepatozyten

Überblick: Instabilität, metabolische Umsetzung und metabolische Stabilität



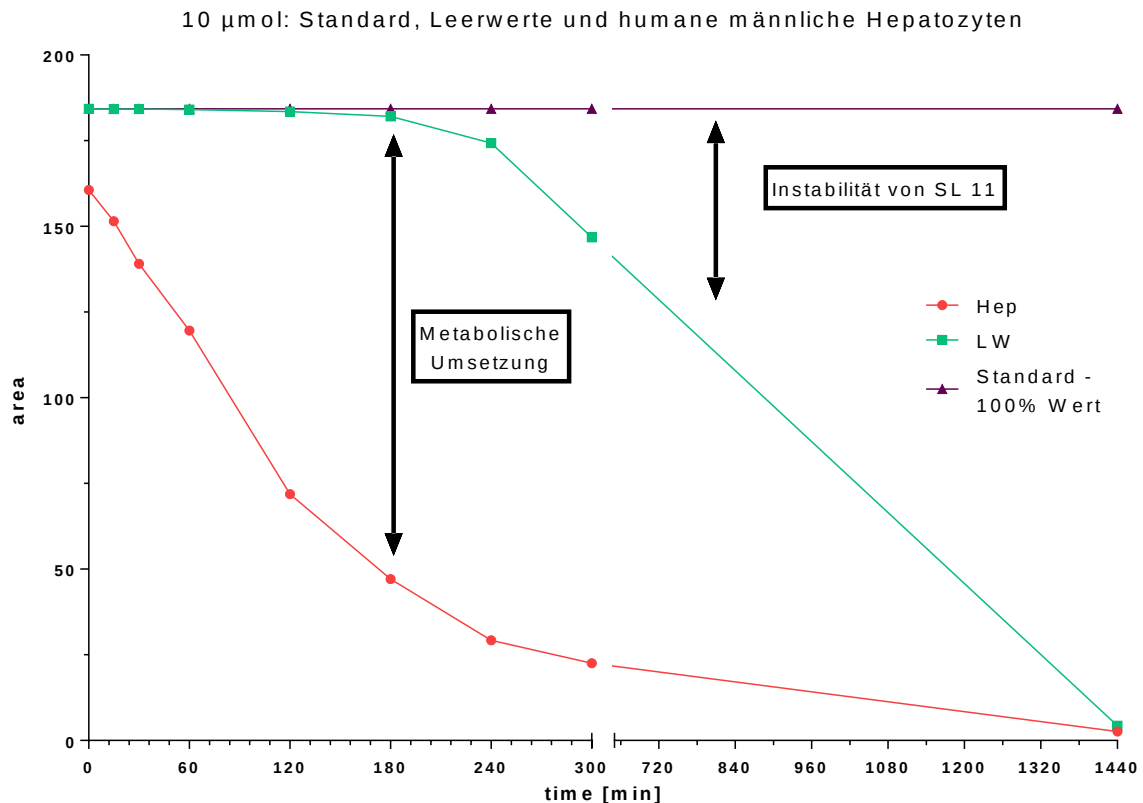


Abbildung 32: Vergleich SL 11: Standard – 100% Wert, Leerwerte und humane männliche Hepatozyten in 2 Konzentrationen

Die Instabilität von SL 11 ist gering. Eine höhere Substanzabnahme erfolgt erst nach Zugabe der Hepatozyten. Die Metabolische Stabilität bezieht sich auf jene Menge der Substanz, die nach Zugabe der Hepatozyten noch vorhanden ist. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe des Standard – 100% Wert, welche hier als violette Linie dargestellt ist.

Die metabolische Umsetzung bezieht sich auf jenen Teil der Substanz, der unter Berücksichtigung der Substanzinstabilität tatsächlich von Enzymen abgebaut wurde. Hier wird die Differenz zwischen den Peakflächen der Leerwerte und der Hepatozyten gezogen.

Tabelle 19: Metabolische Stabilität von SL 11 – humane männliche Hepatozyten

Zeit [min]	Metabolische Stabilität [%]	
	5 µmol	10 µmol
0	78,3	87,1
15	65,8	82,2
30	64,7	75,5

60	41,5	64,9
120	21,9	39,0
180	16,1	25,6
240	5,1	15,8
300	3,5	12,2

Metabolische Stabilität von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten

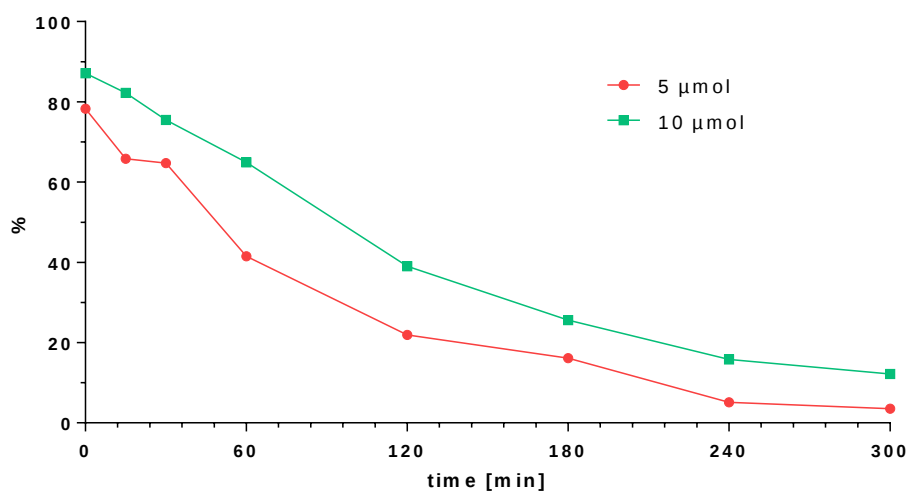


Abbildung 33: Metabolische Stabilität von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten

Die Metabolische Stabilität ist am Anfang noch sehr hoch und liegt bei der ersten Probenentnahme zwischen 78 und 87%. Nach zwei Stunden sinkt sie aber rapide ab und beträgt nur mehr 21 – 39%. Nach fünf Stunden ist nur mehr zwischen 3 und 12% der Ausgangssubstanz vorhanden.

Tabelle 20: Metabolische Umsetzung von SL 11 – humane männliche Hepatozyten

Zeit [min]	Metabolische Umsetzung [%]	
	5 µmol	10 µmol
0	21,7	12,9
15	33,9	17,8
30	35,1	24,5
60	55,6	35,0
120	76,3	60,8
180	79,1	74,1
240	91,9	83,2
300	94,2	84,7

Metabolische Umsetzung von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten

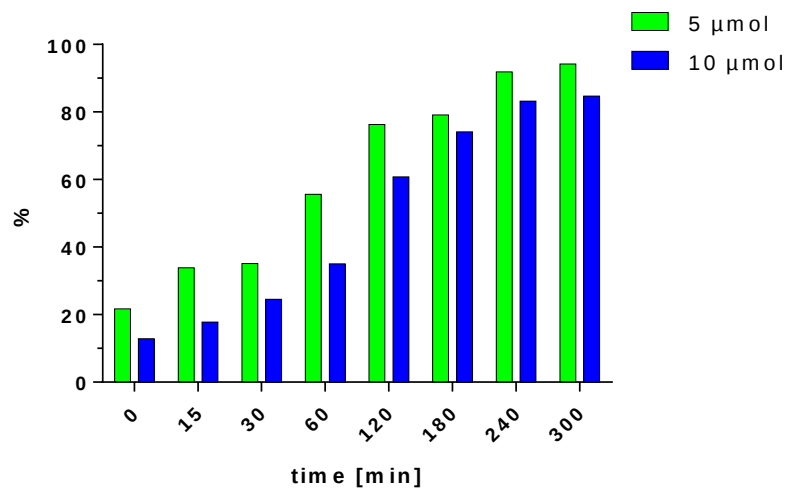
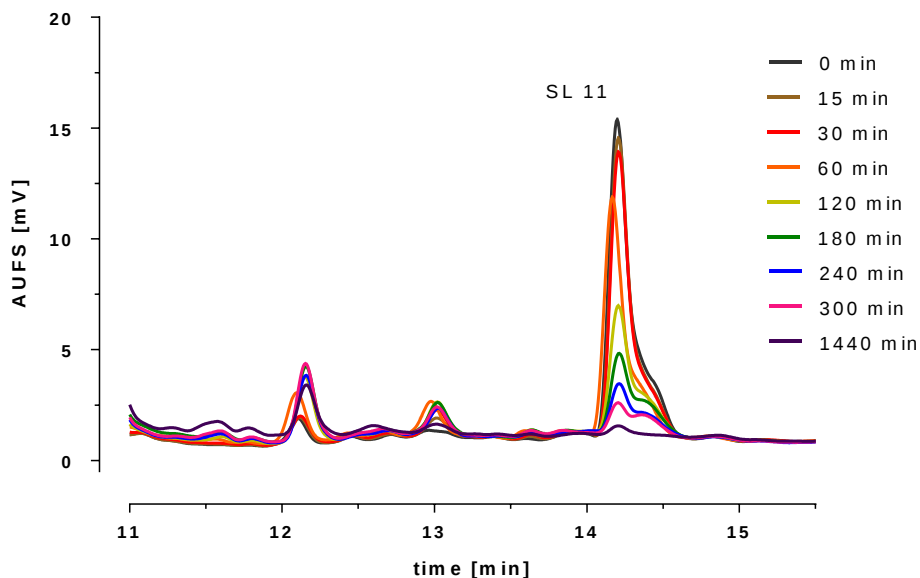


Abbildung 34: Metabolische Umsetzung von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten

Bei der 5 µmol Konzentration wird mehr SL 11 metabolisch umgesetzt. Bis zur dritten Probenziehung ist die metabolische Umsetzung noch eher gering zwischen 24 und 35%. Danach steigt sie stark an und beträgt nach fünf Stunden zwischen 84 - 94%. Der restliche Abbau von SL 11 ist wahrscheinlich auf Umlagerungs- bzw. Zerfallsprodukte zurückzuführen.

Überblick: Abbauprodukte SL 11

10 µmol humane männliche Hepatozyten



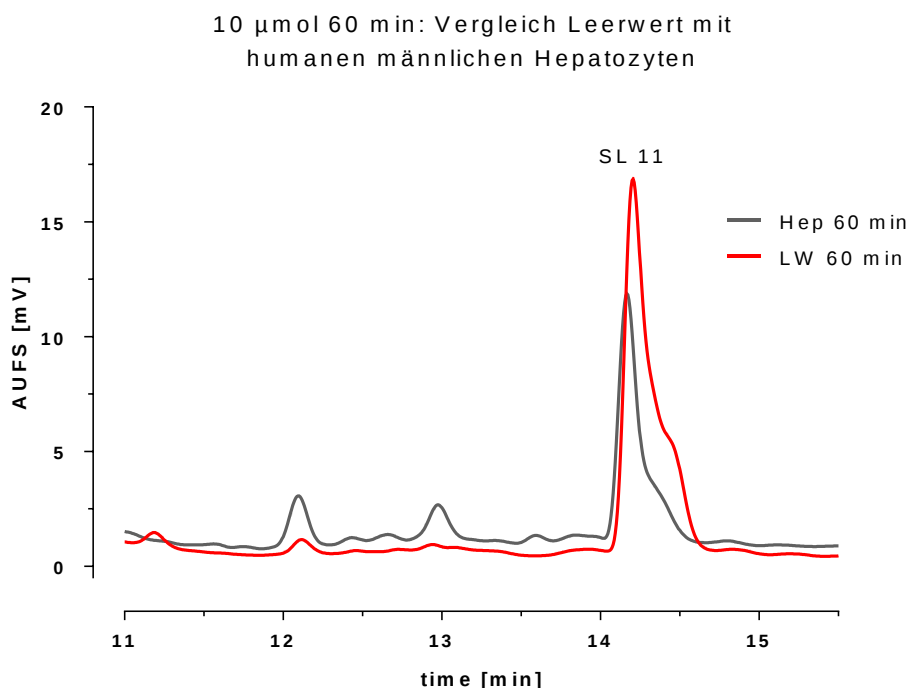
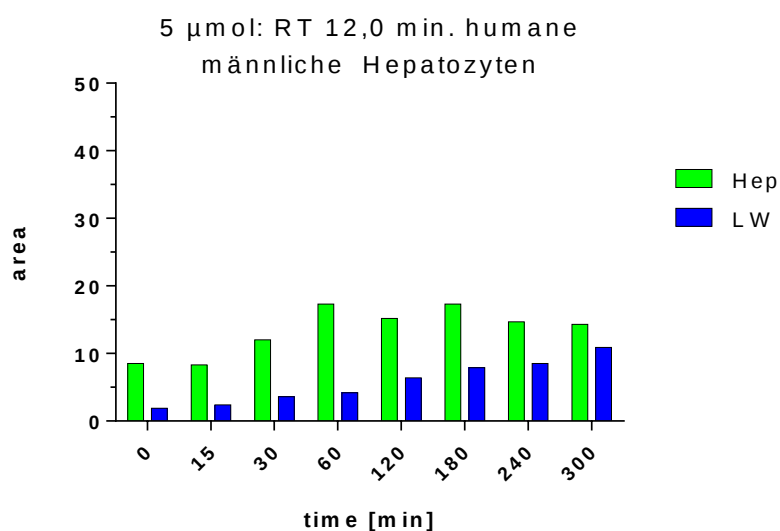


Abbildung 35: Entstehende Verbindungen durch den Abbau von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten

Beim Vergleich der Chromatogramme des Leerwertes und jener Probe, welche mit Hepatozyten durchgeführt wurde, sieht man, dass sie dasselbe Peakmuster aufweisen. Die Peaks unterscheiden sich nicht in der Retentionszeit, sondern in der Höhe. Daher treten quantitative Unterschiede auf, aber keine qualitativen. Also werden durch die Metabolisierung keine neuen Verbindungen gebildet.

In den Proben mit den humanen männlichen Hepatozyten finden sich vor allem 2 verschiedene Verbindungen, bei den Retentionszeiten von 12,0 und 12,9 Minuten, wobei SL 11 eine Retentionszeit von 14,4 Minuten aufweist.



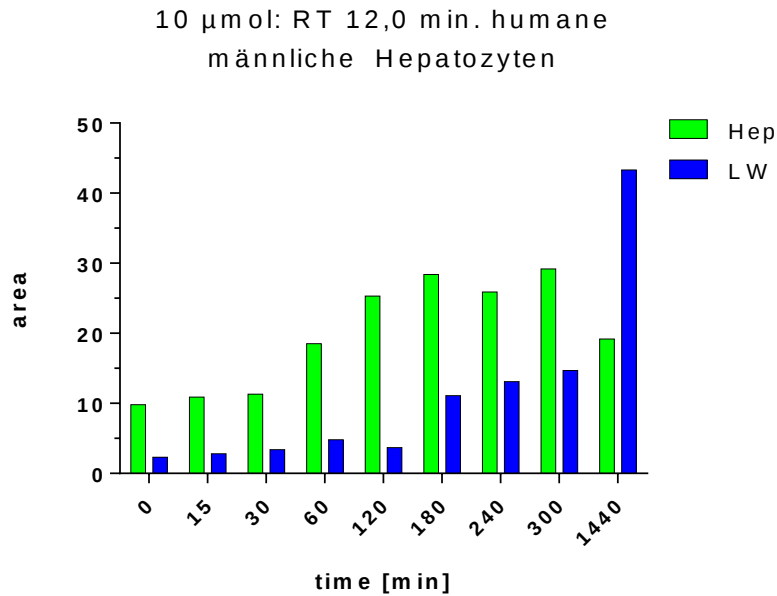
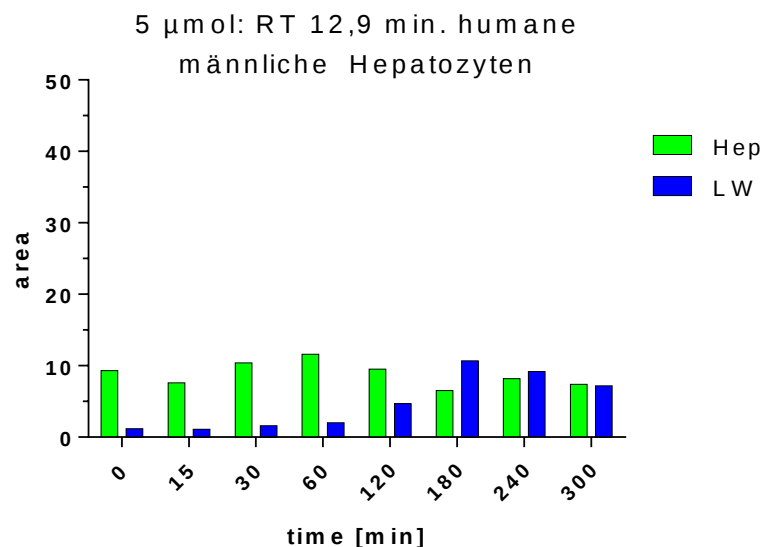


Abbildung 36: Retentionszeit 12,0 Minuten bei 2 Konzentrationen von humanen männlichen Hepatozyten

Die Verbindung mit der Retentionszeit bei 12,0 Minuten ist über einen Zeitraum von 30 Minuten relativ konstant. Danach kommt es zu einem weiteren Substanzanstieg bis zu der Probenziehung nach fünf Stunden. Bei der 10 μmol Konzentration kommt es nach 24 Stunden zu einem Abfall bei der Probe mit den Hepatozyten, während es beim Leerwert zu einem starken Anstieg kommt.



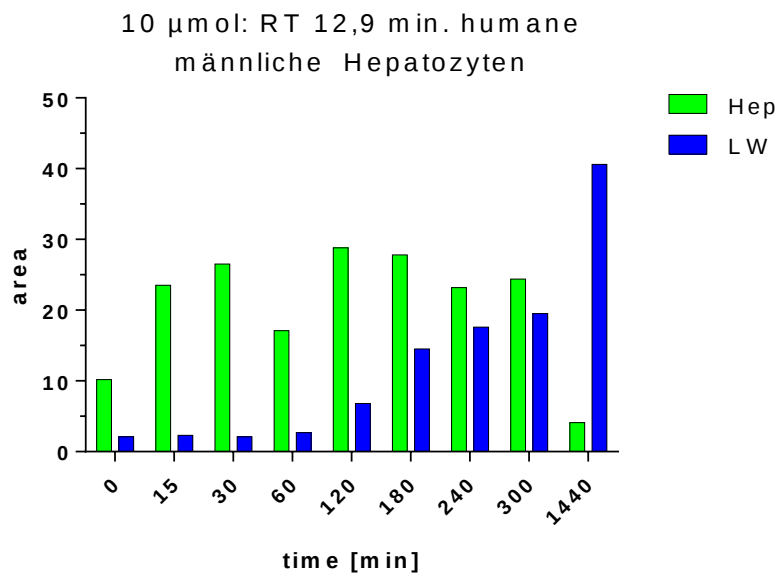


Abbildung 37: Retentionszeit 12,9 Minuten bei 2 Konzentrationen von humanen männlichen Hepatozyten

Die zweite Verbindung ist jene mit der Retentionszeit bei 12,9 Minuten. Diese wird in ähnlichen Mengen gebildet wie jene bei 12,0 Minuten. Diese Verbindung ist über einen Zeitraum von fünf Stunden relativ konstant. Bei der höheren Konzentration kommt es nach 24 Stunden zu einem starken Abfall bei der Probe mit den Hepatozyten während es beim Leerwert zu einem hohen Anstieg kommt. Dies kann ebenso bei der Verbindung mit der Retentionszeit von 12,0 Minuten beobachtet werden.

3.2.2.2 Weibliche Hepatozyten

Überblick: Instabilität, metabolische Umsetzung und metabolische Stabilität

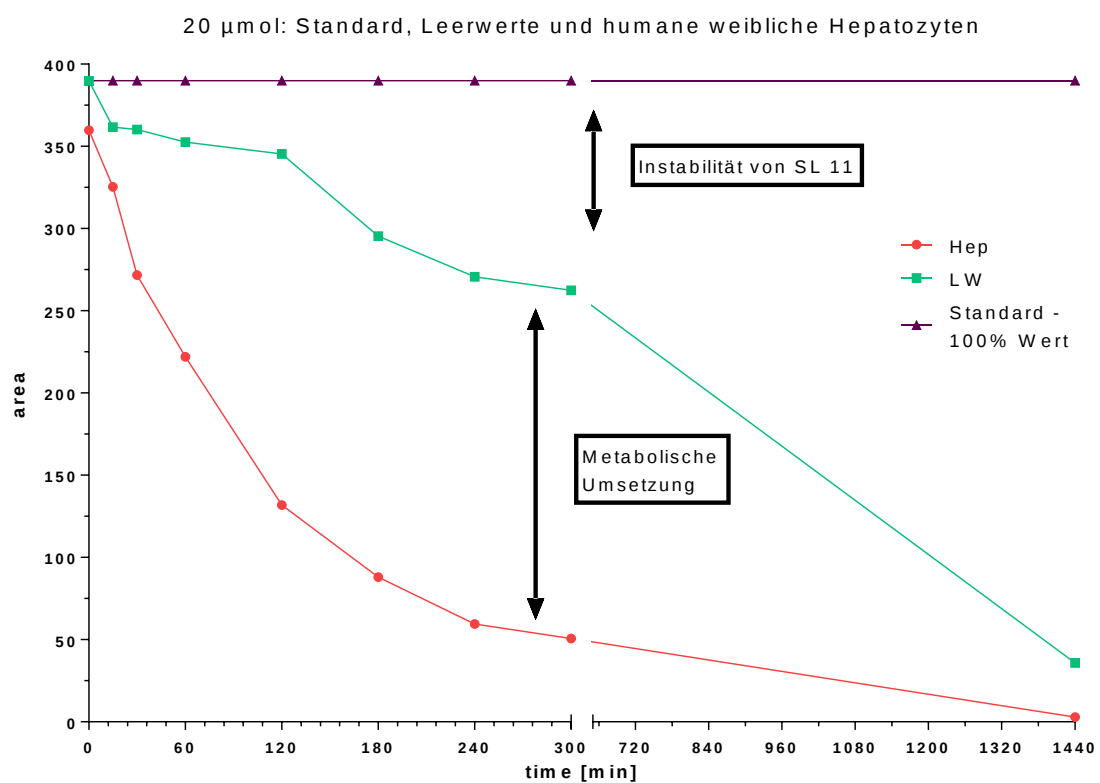
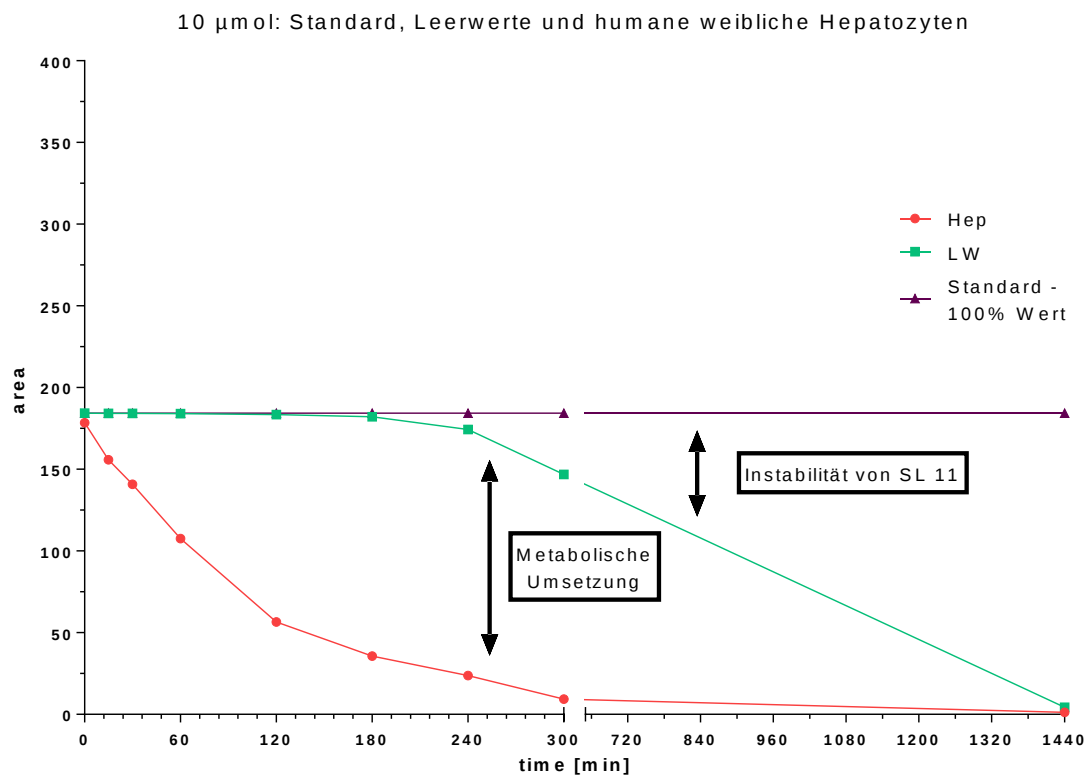


Abbildung 38: Vergleich SL 11: Standard – 100% Wert, Leerwerte und weibliche Hepatozyten in 2 Konzentrationen

Auch bei den weiblichen Hepatozyten zeigt sich im Vergleich zu den Leerwertproben ein ähnliches Bild. Auch hier ist die Substanzinstabilität eher gering und der größte Teil von SL 11 wird metabolisch umgesetzt.

Die Berechnungen erfolgen in gleicher Weise wie bei den männlichen Hepatozyten.

Tabelle 21: Metabolische Stabilität von SL 11 - humane weibliche Hepatozyten

Zeit [min]	Metabolische Stabilität [%]	
	10 µmol	20 µmol
0	96,9	92,3
15	84,5	83,5
30	76,4	69,7
60	58,4	57,0
120	30,7	33,8
180	19,4	22,6
240	12,9	15,3
300	5,0	13,0
1440	0,7	0,7

Metabolische Stabilität von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten

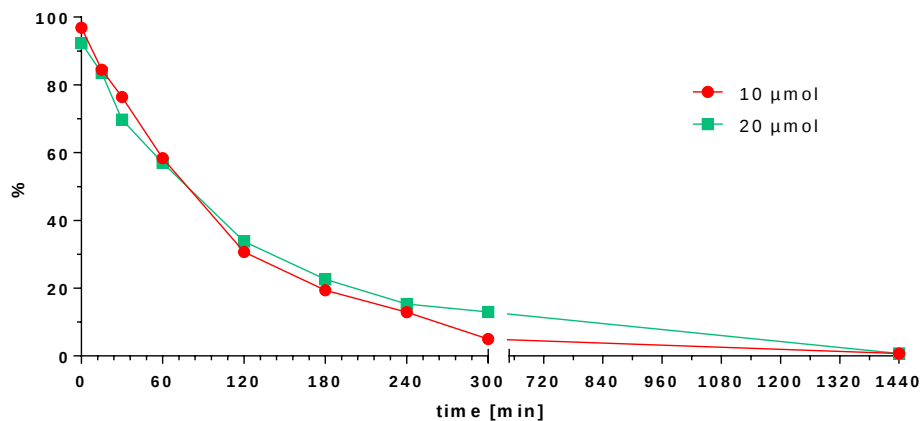


Abbildung 39: Metabolische Stabilität von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten

Die metabolische Stabilität ist anfangs noch sehr hoch, fällt aber kontinuierlich ab. Nach einer Stunde beträgt sie noch zirka 57% und nach sechs Stunden nur mehr zwischen 5 und 13%. Die metabolische Stabilität fällt weiter ab und erreicht nach 24 Stunden nur mehr 0,7%.

Tabelle 22: Metabolische Umsetzung von SL 11 – humane weibliche Hepatozyten

Zeit [min]	Metabolische Umsetzung [%]	
	10 µmol	20 µmol
0	3,1	7,7
15	15,4	10,0
30	23,6	24,6
60	41,6	37,0
120	69,2	61,8
180	80,4	70,2
240	86,3	78,0
300	93,7	80,7

Metabolische Umsetzung von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten

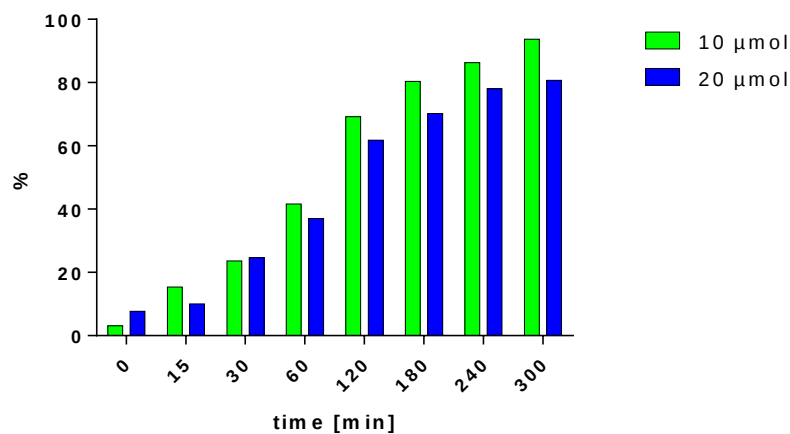
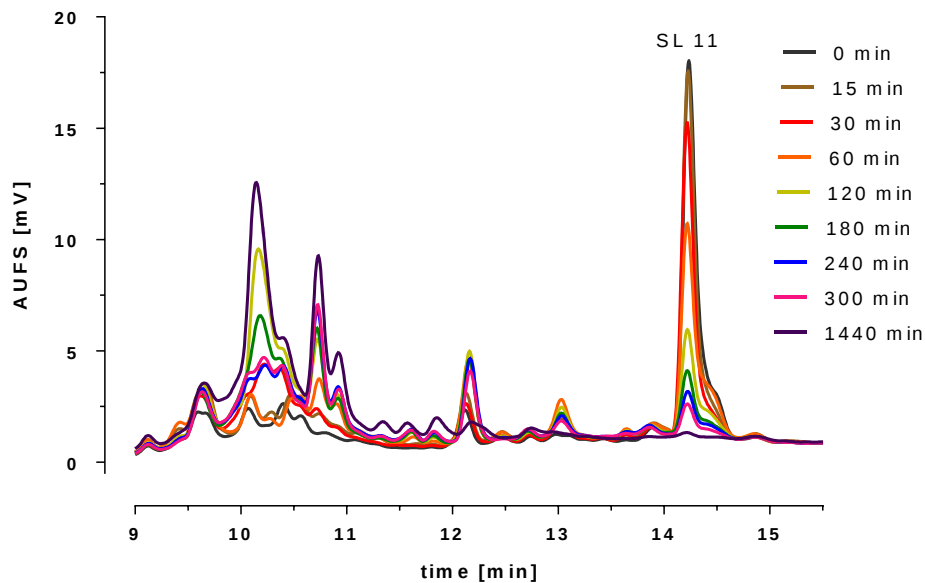


Abbildung 40: Metabolische Umsetzung von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten

Bei 10 µmol findet sich die höchste metabolische Umsetzung von SL 11. Anfangs ist diese noch sehr gering zwischen 3,1 und 7,7%, steigt aber dann stark an und beträgt nach drei Stunden 70 - 80%. Bei der 10 µmol Konzentration ist die höchste metabolische Umsetzung nach 5 Stunden erreicht mit 93%, wobei diese bei der 20 µmol Konzentration nur 80% beträgt.

Überblick: Abbauprodukte SL 11

10 μmol humane weibliche Hepatozyten



10 μmol 60 min: Vergleich Leerwert mit humanen weibliche Hepatozyten

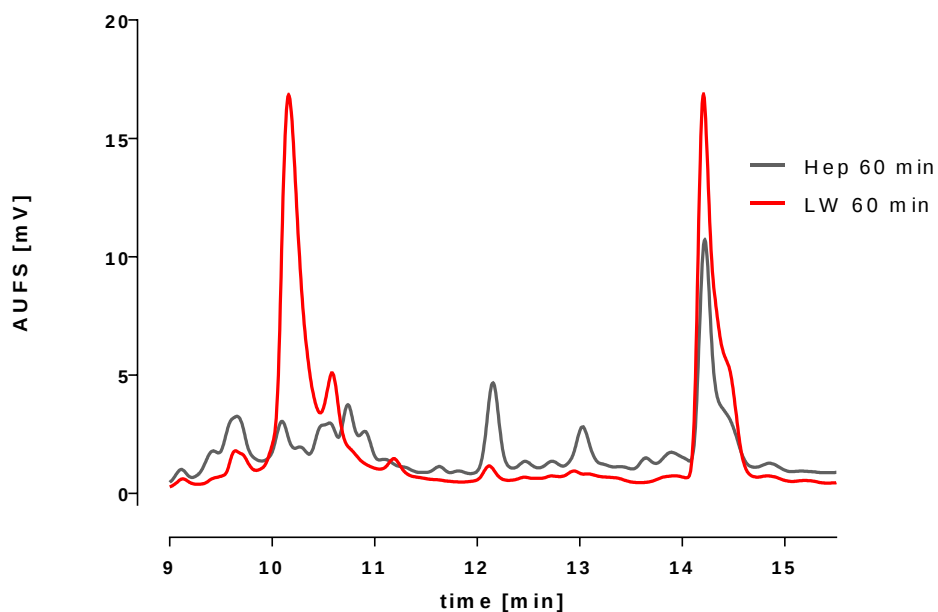


Abbildung 41: Entstehende Verbindungen durch den Abbau von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten

Bei den weiblichen Hepatozyten finden sich wieder dieselben Peaks wie bei den Leerwertproben. Jedoch liegen auch hier wieder quantitative Unterschiede vor. Hier werden vor allem Verbindungen mit den Retentionszeiten 10,7; 11,0; 12,0 und 12,9 Minuten gefunden.

Zwei Verbindungen wurden gefunden, die bei den Leerwerten nicht vorhanden sind. Also treten hier auch qualitative Unterschiede auf. Diese liegen bei einer Retentionszeit von 11,6 und 11,8 Minuten.

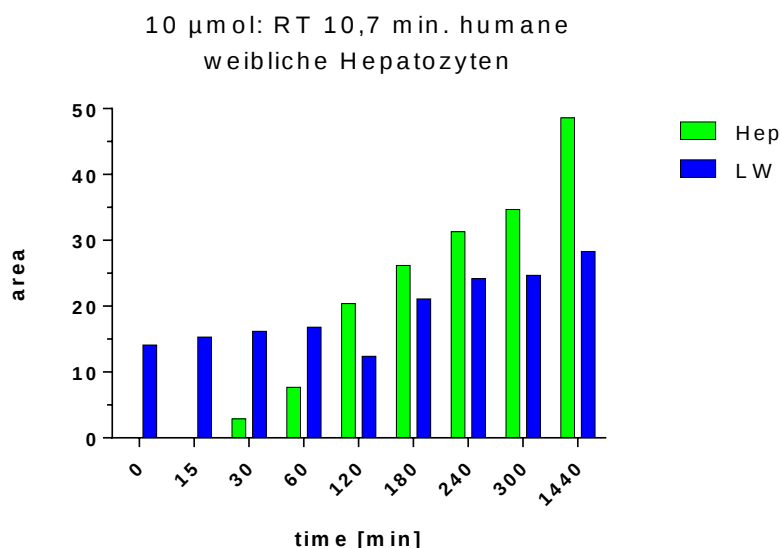


Abbildung 42: Retentionszeit 10,7 Minuten von humanen weiblichen Hepatozyten bei einer Konzentration von 10 μ mol

Das Abbauprodukt mit einer Retentionszeit von 10,7 Minuten kann in jenen Proben mit den Hepatozyten bei 0 und 15 Minuten noch nicht nachgewiesen werden. Ab der Probenziehung bei 30 Minuten steigt die Konzentration der Verbindung stark an. Nach 24 Stunden zeigt sich noch mal ein weiterer Anstieg und man sieht einen deutlichen Unterschied zwischen dem Leerwert und der Probe mit den Hepatozyten. Somit wird im Zuge der metabolischen Aktivität diese Verbindung verstärkt gebildet.

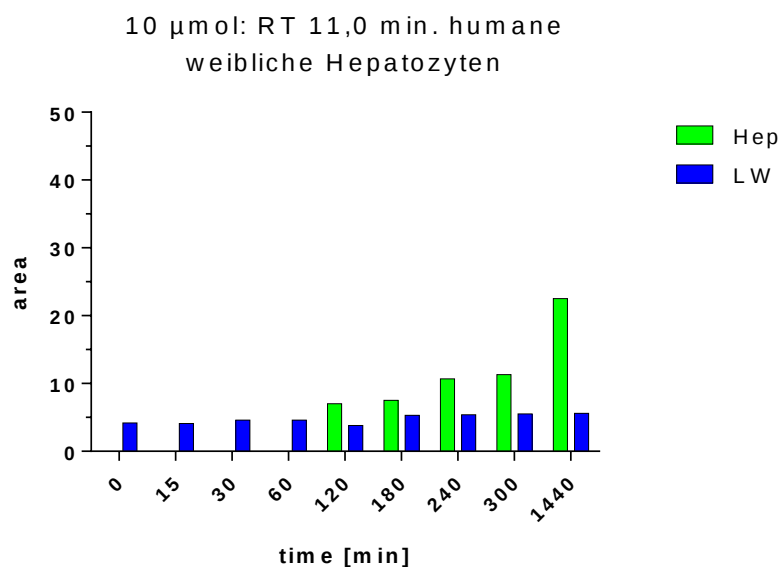


Abbildung 43: Retentionszeit 11,0 Minuten von humanen weiblichen Hepatozyten bei einer Konzentration von 10 μ mol

Eine weitere Verbindung ist jene mit einer Retentionszeit von 11,0 Minuten. Diese wird in wesentlich geringeren Mengen gebildet, als die bei 10,7 Minuten. In den Leerwertproben ist sie von Anfang an vorhanden, während sie bei den Proben mit Hepatozyten erst nach zwei Stunden das erste Mal nachgewiesen werden kann. Von da an steigt die Konzentration stetig an. Es wird durch die Zugabe der Hepatozyten wesentlich mehr gebildet als bei den Leerwertproben, somit wird die Verbindung durch die metabolische Aktivität verstärkt gebildet.

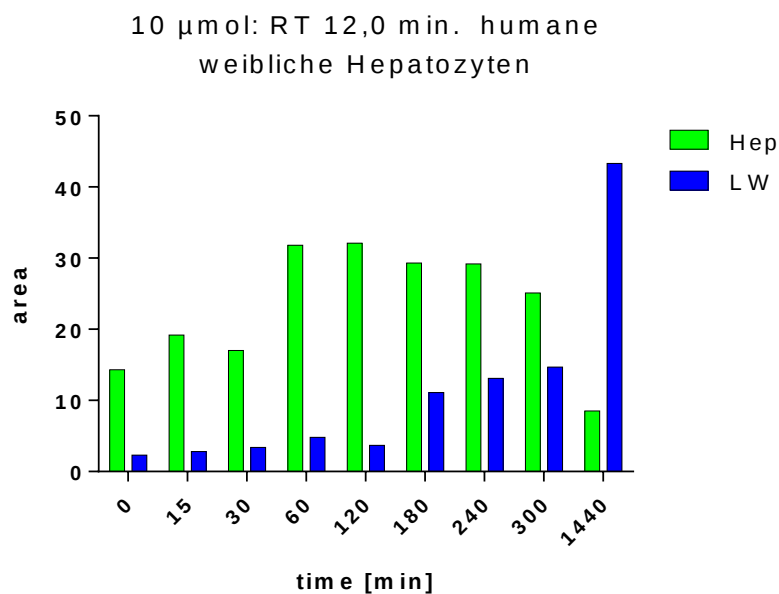


Abbildung 44: Retentionszeit 12,0 Minuten von humanen weiblichen Hepatozyten bei einer Konzentration von 10 μ mol

Das Abbauprodukt mit der Retentionszeit bei 12,0 Minuten ist über einen Zeitraum von 30 Minuten relativ konstant. Danach kommt es zu einem weiteren Substanzzanstieg. Nach 24 Stunden ist ein Abfall bei der Probe mit den Hepatozyten ersichtlich, während es beim Leerwert zu einem starken Anstieg kommt.

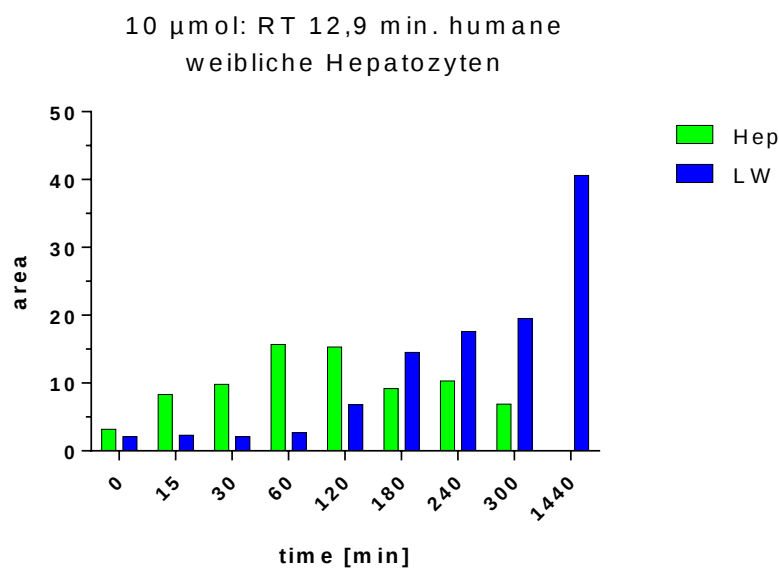
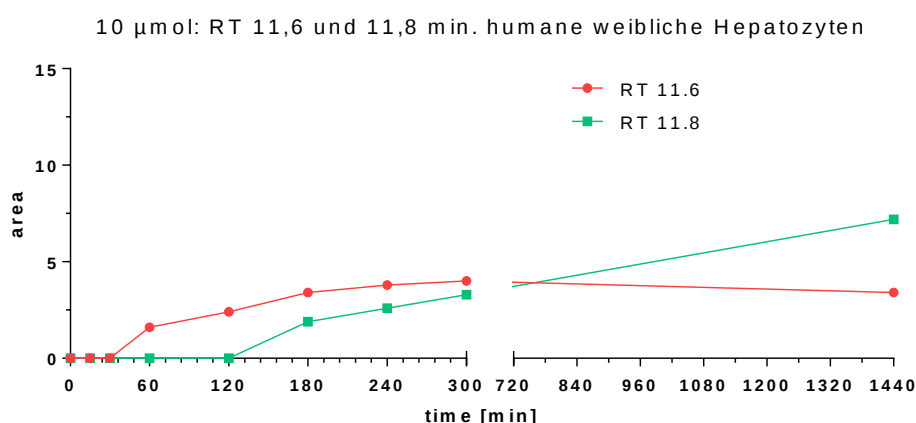


Abbildung 45: Retentionszeit 12,9 Minuten von humanen weiblichen Hepatozyten bei einer Konzentration von 10 μ mol

Das Abbauprodukt, welches eine Retentionszeit von 12,9 Minuten aufweist, nimmt in den ersten Stunden zu und dann nach zwei Stunden stärker ab. Nach 24 Stunden ist nichts mehr von dieser Verbindung vorhanden. Bei den Leerwertproben kommt es zu einer stetigen Zunahme, besonders nach 24 Stunden steigt die Konzentration stark an. Ab drei Stunden wird die Verbindung zu allen weiteren Probenziehungen in größeren Konzentrationen gebildet als in den weiblichen Hepatozyten. Möglicherweise wird die Verbindung durch die enzymatische Aktivität der weiblichen Hepatozyten weiter metabolisiert.



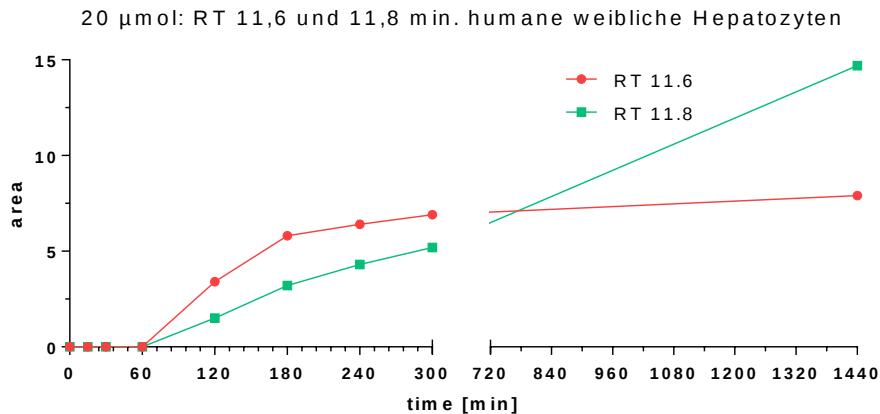


Abbildung 46: Retentionszeit 11,6 und 11,8 Minuten bei 2 Konzentrationen von humanen weiblichen Hepatozyten

Diese beiden Verbindungen, mit den Retentionszeiten von 11,6 und 11,8 Minuten kommen bei den Leerwerten nicht vor. Außerdem nimmt ihre Konzentration stetig zu, daher könnte es sich hier um Metaboliten handeln. Bei den ersten drei Probenziehungen ist noch nichts von diesen beiden Substanzen vorhanden, aber nach 60 Minuten beginnen sie stetig zu steigen.

3.2.2.3 Animale Hepatozyten

SL 11 wurde im Rahmen der Versuchsreihe auch an animalen Hepatozyten getestet. Diese Versuche wurden an Hepatozyten von Ratten und Affen durchgeführt.

3.2.2.3.1 Hepatozyten von Ratten

Überblick: Instabilität , metabolische Umsetzung und metabolische Stabilität

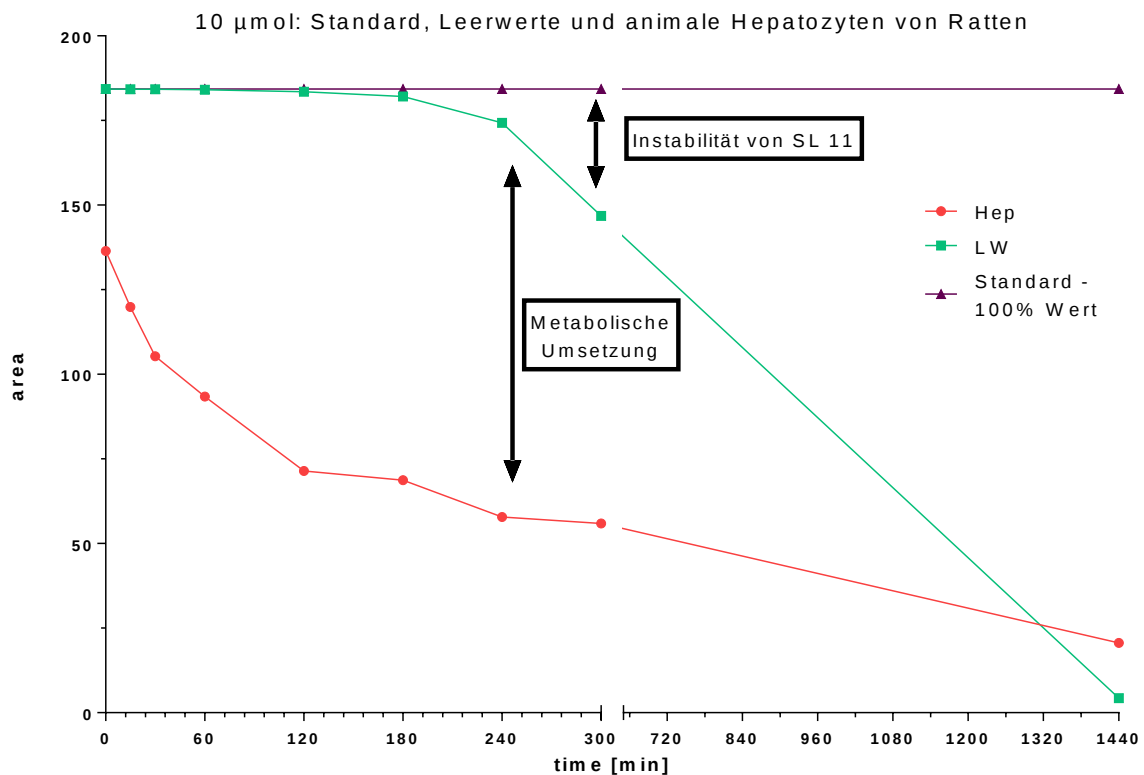
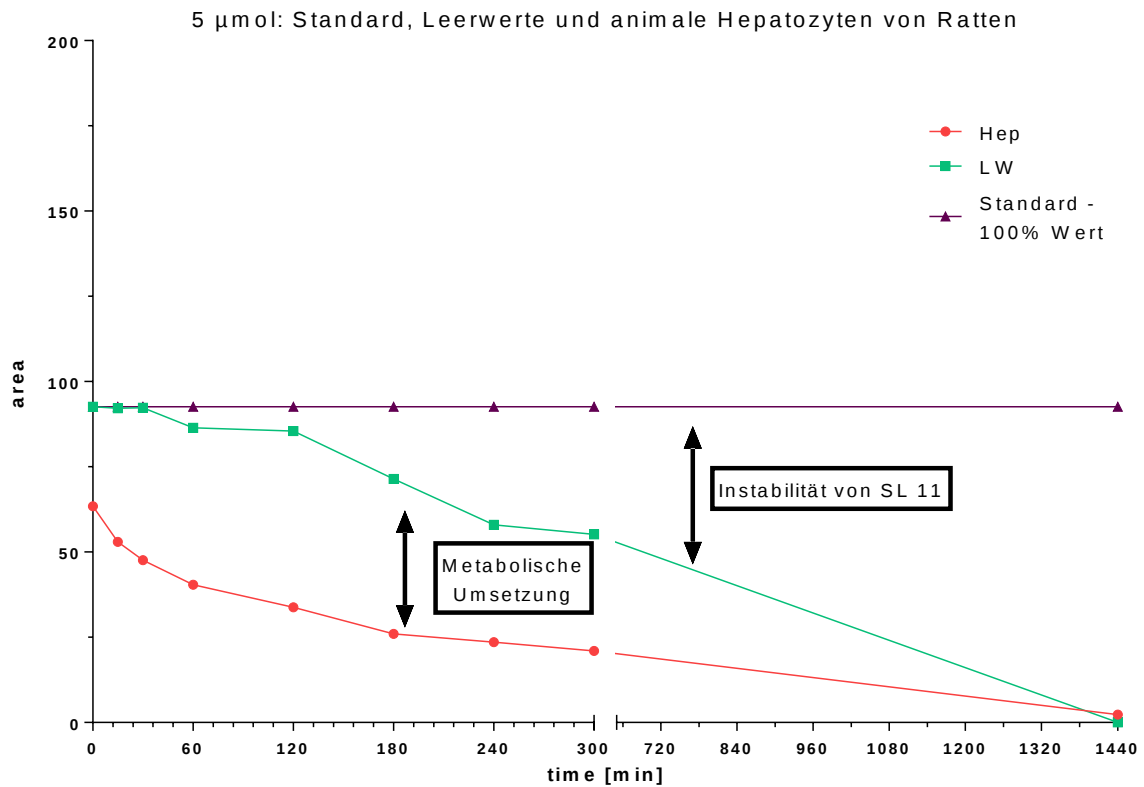


Abbildung 47: Vergleich SL 11: Standard – 100% Wert, Leerwerte und animale Hepatozyten von Ratten in 2 Konzentrationen

Auch bei den Hepatozyten von Ratten weist SL 11 eine hohe Stabilität auf, die größere Substanzabnahme erfolgt durch die Zugabe der Hepatozyten. Die Berechnung erfolgt in gleicher Weise wie bei den humanen Hepatozyten.

Tabelle 23: Metabolische Stabilität von SL 11 - animale Hepatozyten von Ratten

Zeit [min]	Metabolische Stabilität [%]	
	5 μmol	10 μmol
0	68,4	74,0
15	57,2	65,1
30	51,4	57,1
60	43,6	50,7
120	36,4	38,7
180	28,0	37,2
240	25,4	31,3
300	22,6	30,3
1440	2,5	11,2

Metabolische Stabilität von SL 11 der animalen Hepatozyten von Ratten

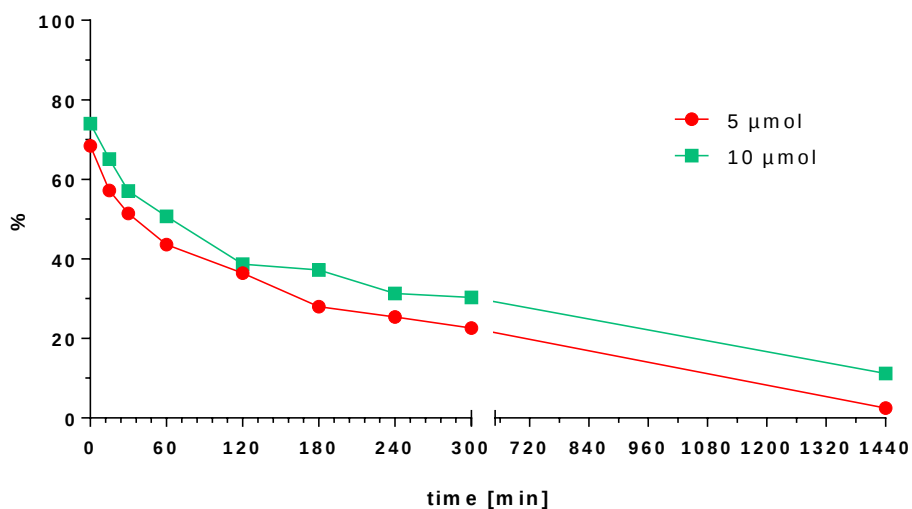


Abbildung 48: Metabolische Stabilität von SL 11 der animalen Hepatozyten von Ratten

Die metabolische Stabilität ist am Anfang noch sehr hoch und liegt bei der ersten Probenentnahme zwischen 68 und 74%. Diese nimmt dann kontinuierlich ab und beträgt nach vier Stunden nur mehr 25 - 31%. Nach fünf Stunden sind noch zwischen 22 und 30% der ursprünglichen Substanz vorhanden.

Tabelle 24: Metabolische Umsetzung von SL 11 – animale Hepatozyten von Ratten

Zeit [min]	Metabolische Umsetzung [%]	
	5 μmol	10 μmol
0	31,6	26,0
15	42,5	34,9
30	48,4	42,8
60	53,3	49,3
120	60,5	61,1
180	63,7	62,3
240	59,4	66,9
300	62,0	62,0

Metabolische Umsetzung von SL 11 der animalen Hepatozyten von Ratten

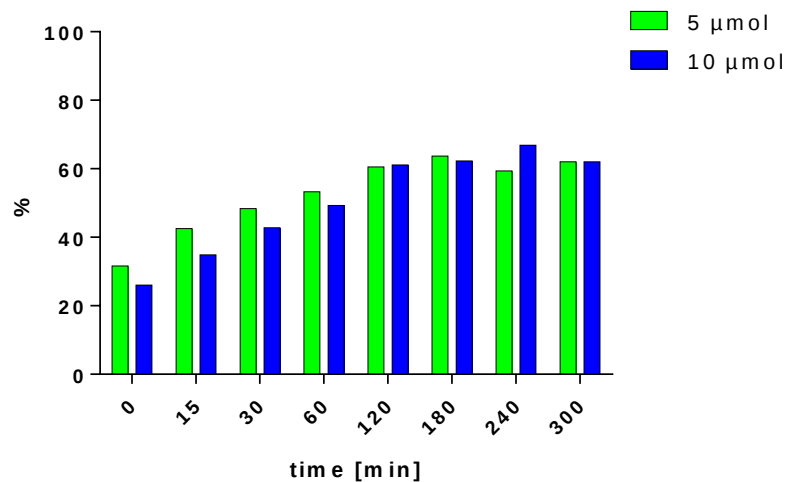


Abbildung 49: Metabolische Umsetzung von SL 11 der animalen Hepatozyten von Ratten

Die metabolische Umsetzung beträgt anfangs zwischen 26 und 31%. Diese steigt bis zur Probenziehung nach drei Stunden stetig an und erreicht zirka 62%. Danach verhält sich die metabolische Umsetzung relativ konstant.

Überblick: Abbauprodukte von SL 11

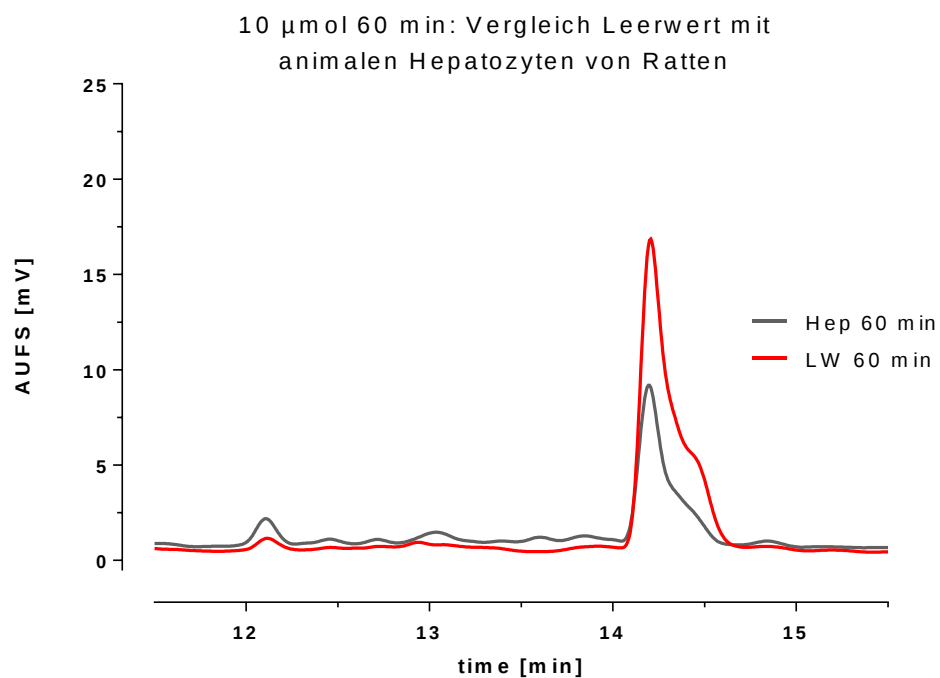
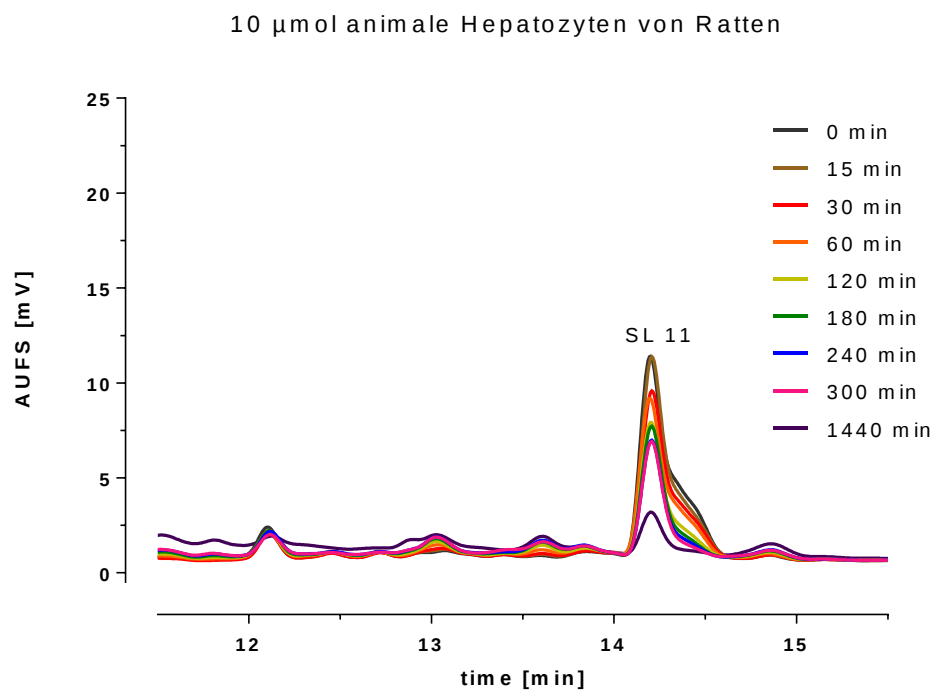
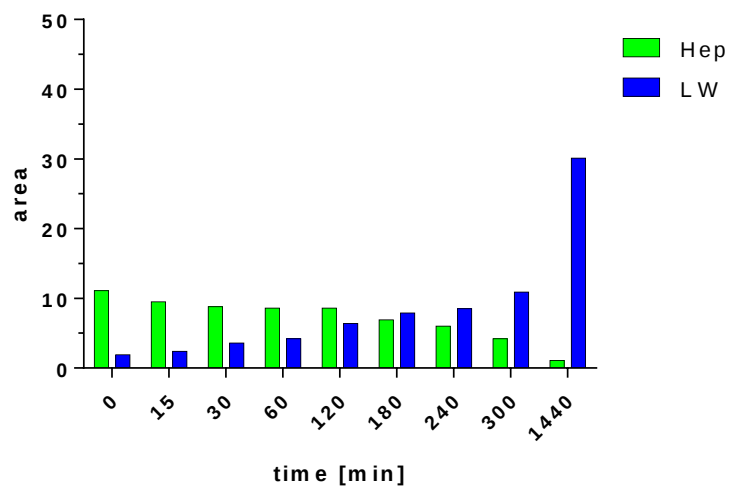


Abbildung 50: Entstehende Verbindungen durch den Abbau von SL 11 der animalen Hepatozyten von Ratten

Auch bei den Hepatozyten von Ratten kann man durch den Vergleich der Chromatogramme der Leerwerte und jener Proben, die mit den Hepatozyten durchgeführt wurden, feststellen, dass diese das gleiche Peakmuster aufweisen. Ebenso treten hier quantitative Unterschiede auf, aber keine qualitativen. In diesen Proben findet sich vor allem eine Verbindung und zwar jene mit der Retentionszeit von 12,0 Minuten.

5 μ mol: RT 12,0 min. Hepatozyten von Ratten



10 μ mol: RT 12,0 min. Hepatozyten von Ratten

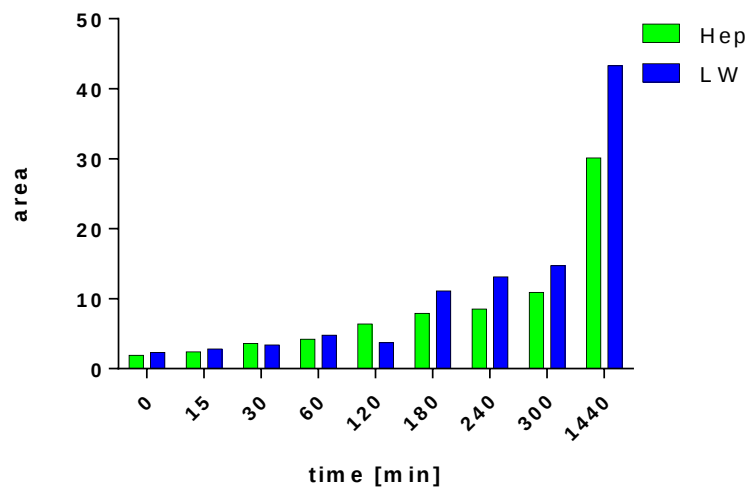


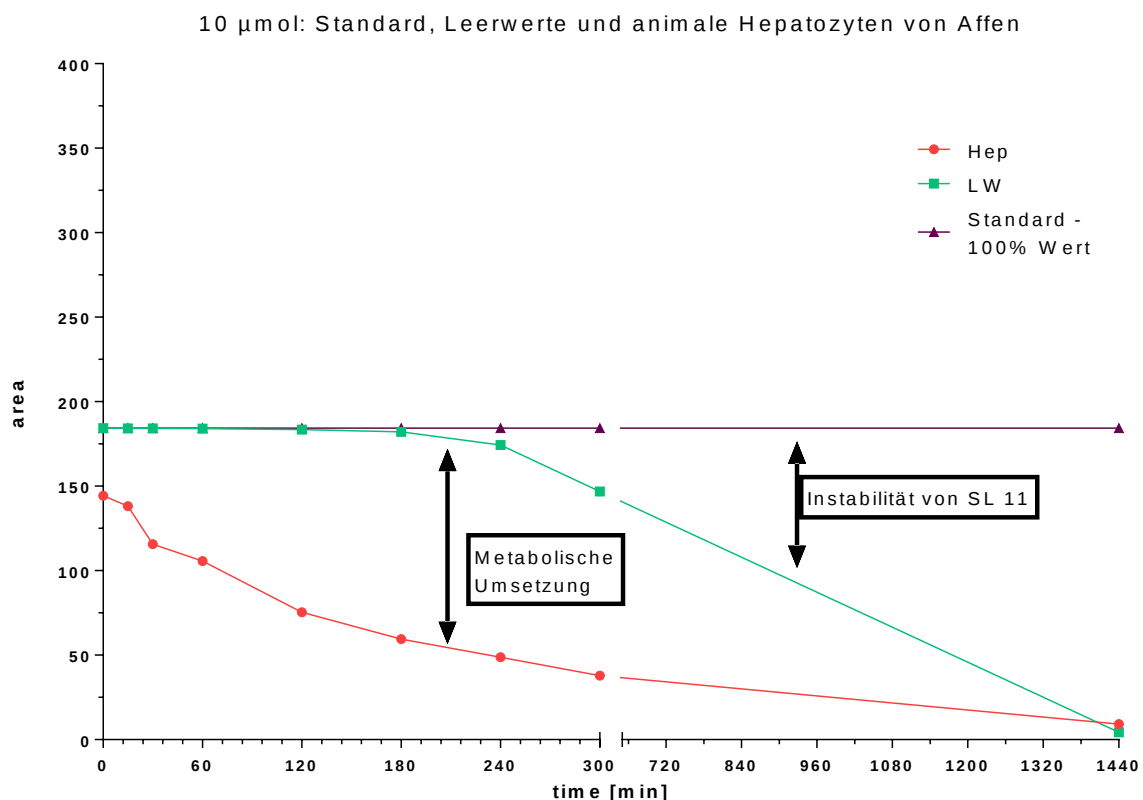
Abbildung 51: Retentionszeit 12,0 Minuten bei 2 Konzentrationen von animalen Hepatozyten von Ratten

Bei diesem Abbauprodukt verhalten sich die beiden Konzentrationen etwas unterschiedlich. Nach der ersten Probenziehung findet sich bei der 5 µmol Probe die höchste Konzentration der Substanz, danach nimmt sie stetig ab. Die Leerwertproben verhalten sich genau umgekehrt, hier nimmt die Konzentration stetig zu.

Bei der 10 µmol Probe ist die Konzentration nach der ersten Probenziehung am niedrigsten und steigt stetig an. Die Leerwertproben verhalten sich ähnlich. Bei diesen wird die Verbindung ab der Probenentnahme nach drei Stunden zu allen Zeitpunkten in größeren Mengen gebildet als in den Hepatozyten von Ratten.

3.2.2.3.2 Hepatozyten von Affen

Überblick: Instabilität, metabolische Umsetzung und metabolische Stabilität



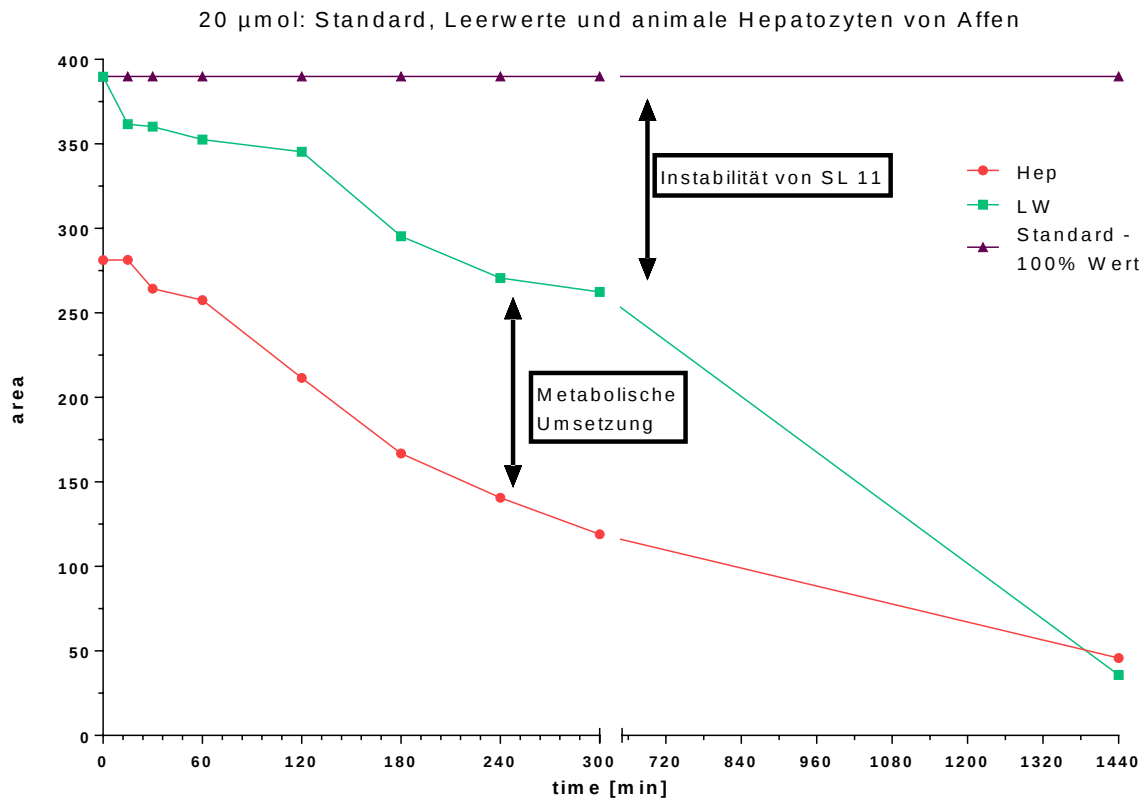


Abbildung 52: Vergleich SL 11: Standard – 100% Wert, Leerwerte und animale Hepatozyten von Affen in 2 Konzentrationen

Auch hier zeigt sich im Vergleich zu den Leerwertproben ein ähnliches Bild. Die Substanzinstabilität ist relativ gering. Der größere Teil von SL 11 wird nach Zugabe der Hepatozyten von Affen metabolisch umgesetzt. Die Berechnungen erfolgen in gleicher Weise wie bei den humanen Hepatozyten.

Tabelle 25: Metabolische Stabilität von SL 11 – animale Hepatozyten von Affen

Zeit [min]	Metabolische Stabilität [%]	
	10 µmol	20 µmol
0	78,4	72,2
15	75,0	72,2
30	62,7	67,8
60	57,4	66,1
120	40,9	54,3
180	32,2	42,8
240	26,5	36,1
300	20,6	30,6
1440	5,0	11,7

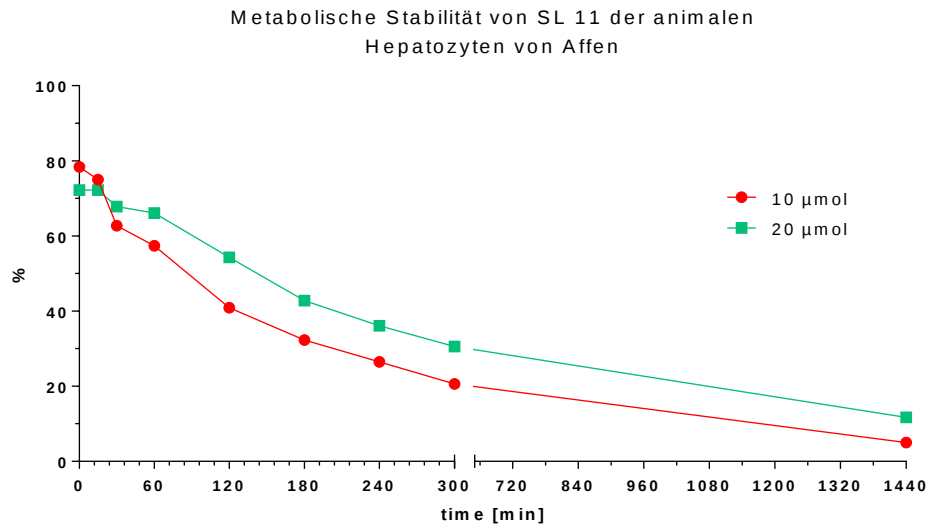


Abbildung 53: Metabolische Stabilität von SL 11 der animalen Hepatozyten von Affen

Die metabolische Stabilität ist zu Beginn sehr hoch und liegt zwischen 72 und 78%. Danach nimmt diese stetig ab und sinkt nach drei Stunden auf 32 - 42%. Nach fünf Stunden kommt es zu einer weiteren Abnahme. Hier beträgt die metabolische Stabilität noch 20 – 30%.

Tabelle 26: Metabolische Umsetzung von SL 11 – animale Hepatozyten von Affen

Zeit [min]	Metabolische Umsetzung [%]	
	10 µmol	20 µmol
0	21,6	27,8
15	25,0	22,2
30	37,2	26,6
60	42,6	27,0
120	58,9	38,7
180	67,3	43,5
240	72,0	48,1
300	74,2	54,6

Metabolische Umsetzung von SL 11 der animalen Hepatozyten von Affen

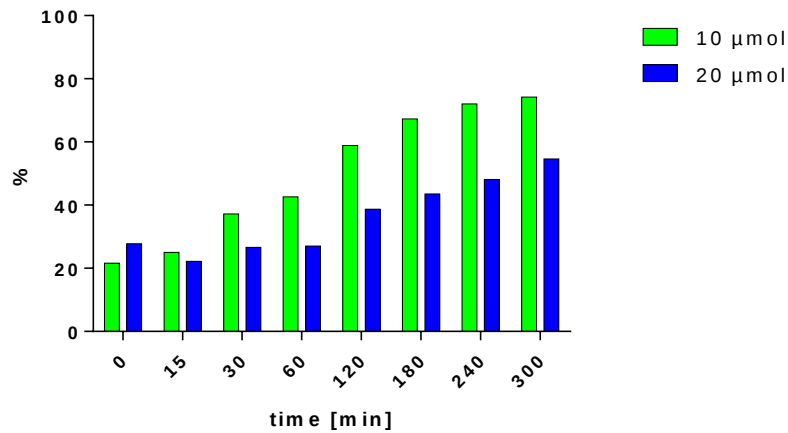
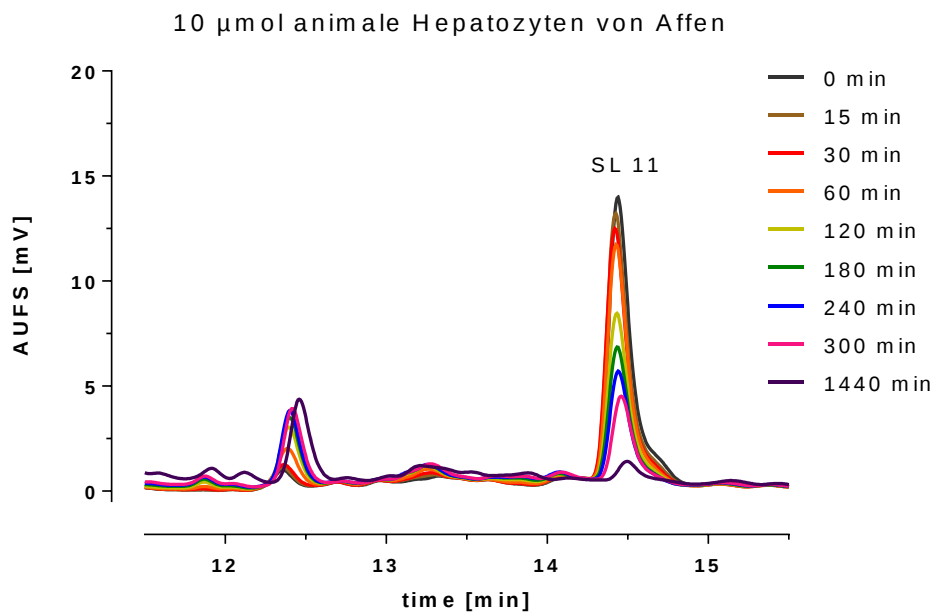


Abbildung 54: Metabolische Umsetzung von SL 11 der animalen Hepatozyten von Affen

Bei einer Konzentration von 10 µmol wird am meisten SL 11 metabolisch umgesetzt. Zu Beginn ist diese noch niedrig bei 21 – 27% steigt aber stetig an. Nach fünf Stunden liegt sie bereits zwischen 54 – 74%.

Überblick: Abbauprodukte von SL 11



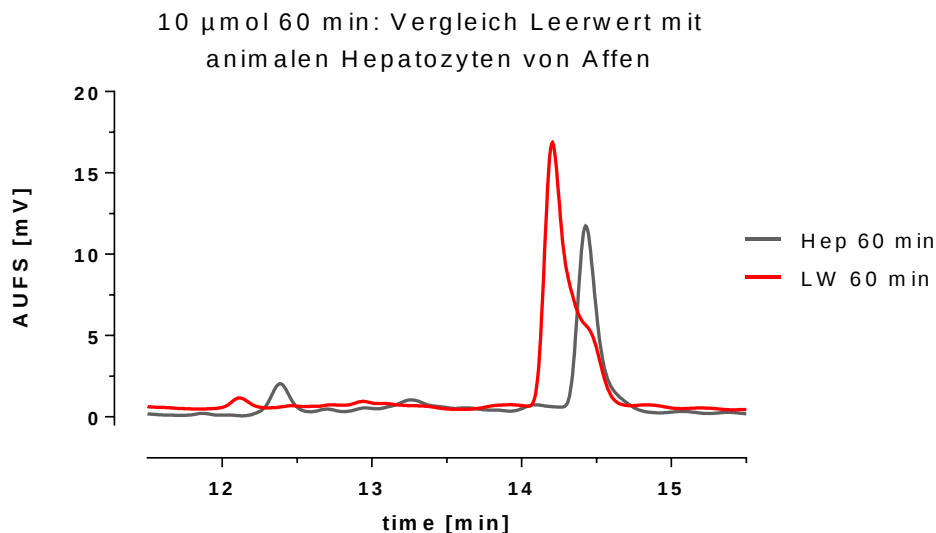


Abbildung 55: Entstehende Verbindungen durch den Abbau von SL 11 der animalen Hepatozyten von Affen

Auch bei den Hepatozyten von Affen treten keine neuen Verbindungen im Zuge der Metabolisierung auf. Bei der Betrachtung des Chromatogramms Abb.55 muss darauf geachtet werden, dass es zu einer kleinen Verschiebung der Peaks gekommen ist. Diese können dennoch eindeutig zugeordnet werden und es finden sich wieder die gleichen Peaks, wie bei den Leerwertproben. Es treten also quantitative Unterschiede auf, aber keine qualitativen.

Bei den Proben mit Hepatozyten von Affen findet sich vor allem eine Verbindung mit der Retentionszeit 12,0 Minuten.

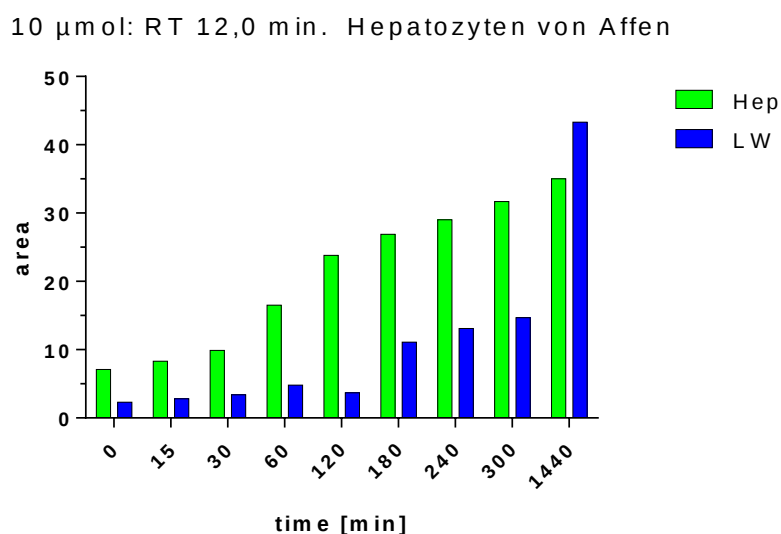


Abbildung 56: Retentionszeit 12,0 Minuten von animalen Hepatozyten von Affen bei einer Konzentration von 10 μmol

Die Verbindung mit einer Retentionszeit von 12,0 Minuten zeigt von Beginn an einen starken Anstieg der Konzentrationen. Die Leerwerte haben bei den Probenziehungen von 0 bis 300 Minuten eine viel niedrigere Konzentration als die Proben, welche mit Hepatozyten von Affen durchgeführt wurden. Nach 24 Stunden kommt es aber zu einem starken Anstieg bei den Leerwertproben.

3.2.2.4 Vergleich zwischen humanen und animalen Hepatozyten

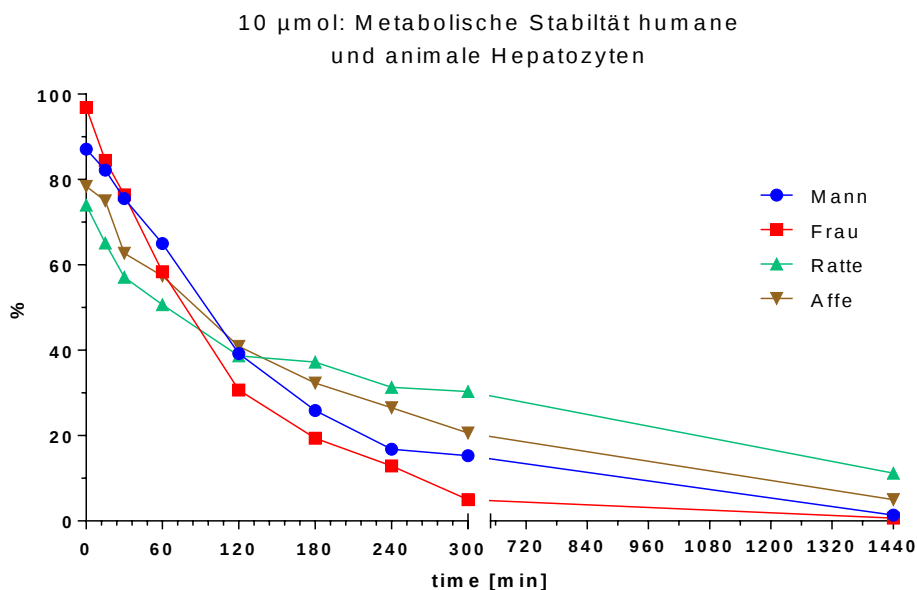


Abbildung 57: Vergleich der metabolischen Stabilität humaner männlicher, weiblicher Hepatozyten und animaler Hepatozyten von Ratten, Affen

Die humanen weiblichen Hepatozyten zeigen zwar zu Beginn die höchste metabolische Stabilität, aber die Kurve fällt rasch ab. Nach 120 Minuten erreichen sie bereits den niedrigsten Wert.

Die humanen männlichen Hepatozyten verhalten sich ähnlich wie die weiblichen. Zu Beginn zeigen sie die zweithöchste metabolische Stabilität, aber auch diese Kurve fällt rasch ab.

Bei den animalen Hepatozyten ist das Verhalten umgekehrt. Am Anfang erreichen sie einen etwas niedrigeren Wert, dieser fällt dann aber nicht so rasch ab. Die Hepatozyten von Ratten haben nach 5 Stunden noch den höchsten Wert, dicht gefolgt von den Affen.

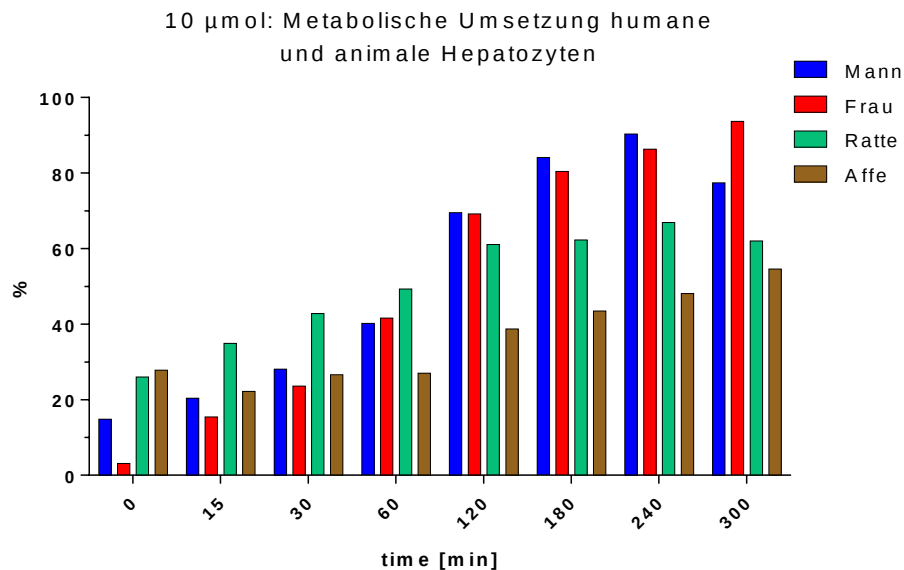


Abbildung 58: Vergleich der metabolischen Umsetzung humaner männlicher, weiblicher Hepatozyten und animaler Hepatozyten von Ratten, Affen

Anfangs weisen die animalen Hepatozyten eine höhere metabolische Umsetzung auf als die humanen. Nach dem Abnahmezeitpunkt bei 120 Minuten überholen die Proben mit den humanen Hepatozyten aber die anderen. Nach 5 Stunden besitzen die Affen die niedrigste metabolische Umsetzung, dicht gefolgt von den Ratten. Danach kommen die männlichen Hepatozyten und die höchste metabolische Stabilität weisen die Proben mit den weiblichen Hepatozyten auf.

Abbauprodukte von SL 11

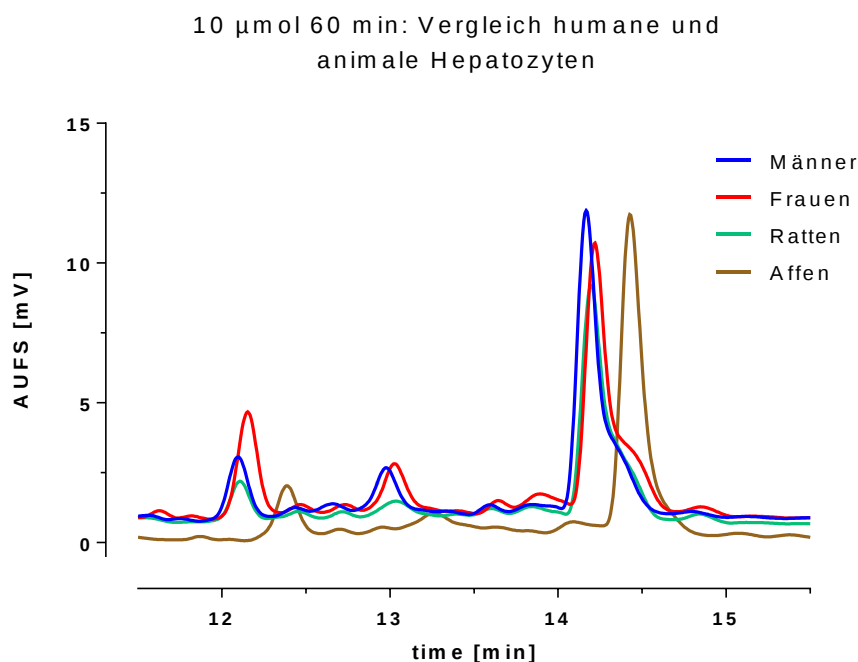


Abbildung 59: Vergleich der Abbauprodukte humaner männlicher, weiblicher Hepatozyten und animaler Hepatozyten von Ratten, Affen

Bei allen vier Hepatozytenmodellen wird das Abbauprodukt mit der Retentionszeit bei 12,0 Minuten gebildet. Zusätzlich wird bei den humanen Hepatozyten auch eine Verbindung bei der Retentionszeit von 12,9 Minuten gebildet.

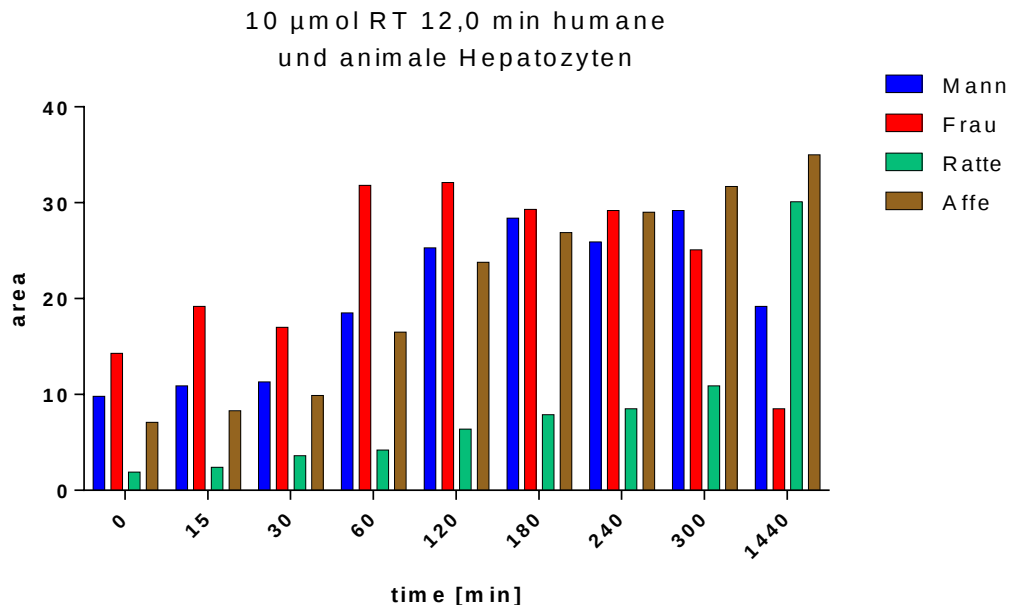


Abbildung 60: RT 12,0 min: Vergleich humaner männlicher, weiblicher Hepatozyten und animaler Hepatozyten von Ratten, Affen

Bei der Verbindung mit einer Retentionszeit von 12,0 Minuten sind zunächst bei den humanen Hepatozyten höhere Peakflächen ersichtlich. Die Proben, die mit den animalen Hepatozyten von Ratten durchgeführt wurden, weisen bis zu der Probenziehung nach fünf Stunden die niedrigsten Peakflächen auf. Nach 24 Stunden kommt es zu einem starken Anstieg bei den Hepatozytenproben von Ratten und zu einer Annäherung mit den Affen. Die humanen Proben verhalten sich anders, hier kommt es nach 24 Stunden zu einem starken Abfall.

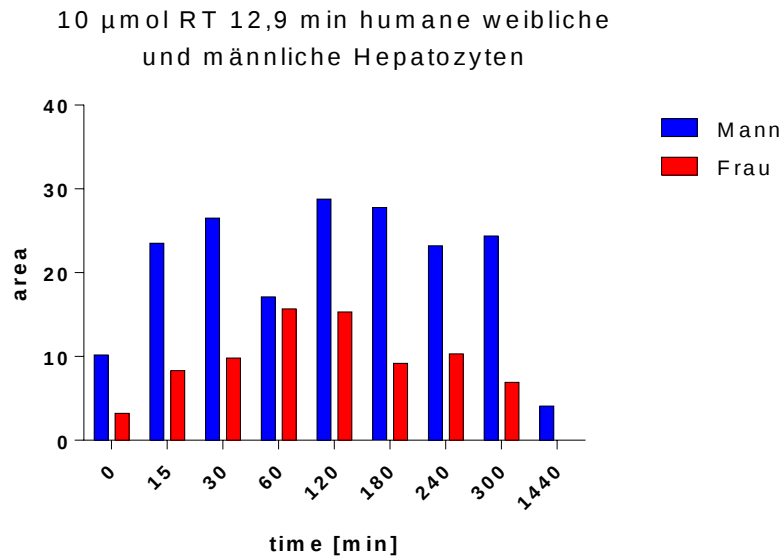


Abbildung 61: RT 12,9 min: Vergleich humaner männlicher und weiblicher Hepatozyten

Die Verbindung bei 12,9 Minuten weist bei allen Probenentnahmen bei den männlichen Hepatozyten höhere Peakflächen auf als bei den weiblichen Hepatozyten. Bei beiden kann beobachtet werden, dass die Peakflächen zunächst stark zunehmen, dann aber nach 24 Stunden wieder abnehmen. Bei den weiblichen Hepatozyten ist beim letzten Abnahmezeitpunkt nichts mehr von dieser Verbindung vorhanden.

3.2.3 Inhibitionsversuche mit SL 11

Im Zuge der Versuchsreihe mit Inhibitoren wurden auch immer Leerwertproben ohne die Inhibitoren durchgeführt. Durch Vergleich der Peakflächen der Proben mit Inhibitoren und jener ohne, können Rückschlüsse gezogen werden, ob eine Umsetzung von SL 11 mit dem jeweiligen CYP erfolgt. Es wurden Inhibitionsversuche an humanen weiblichen, männlichen und an animalen Hepatozyten von Affen durchgeführt, wobei immer die Peakflächen von SL 11 bei 14,4 Minuten ausgewertet wurden.

Verwendete Inhibitoren:

- Ketoconazol: CYP 3A4 Inhibitor
- Chlormethiazol: CYP 2E1 Inhibitor
- Ticlopidin: CYP 2B6 Inhibitor
- α -Naphthoflavon: CYP 1A2 Inhibitor
- Quinidine: CYP 2D6 Inhibitor
- Fluconazol: CYP 2C9 Inhibitor

Tabelle 27: Peakflächen der Inhibitoren – humane männliche Hepatozyten

Konzentration [μmol]	area						
	LW	Keto	Chlor	Ticl	α-N	Qu	Flu
4	21,8	3,5	12,2	12,2	14,2	5,3	18,1
20	25,3	38,7	39,2	37,6	41,8	37,0	35,9
40	72,7	89,9	89,2	90,6	90,2	86,4	78,3

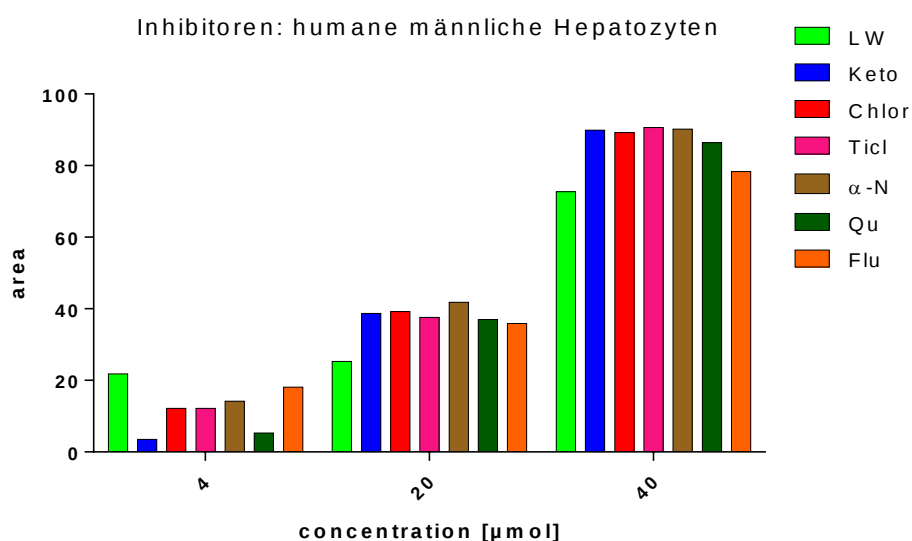


Abbildung 62: Inhibitionsversuch an humanen männlichen Hepatozyten

Beim Inhibitionsversuch mit humanen männlichen Hepatozyten treten keine starken Unterschiede zwischen dem Leerwert ohne Inhibitor und den Proben, die mit Inhibitor durchgeführt wurden, auf. Daher kann man davon ausgehen, dass keine Umsetzung von SL 11 mit CYP 3A4, 2E1, 2B6, 1A2, 2D6 und 2C9 stattfindet.

Tabelle 28: Peakflächen der Inhibitoren – humane weibliche Hepatozyten

Konzentration [μmol]	area						
	LW	Keto	Chlor	Ticl	α-N	Qu	Flu
4	7,5	7,1	2,1	6,5	3,3	3,6	7,4
20	43,4	47,6	48,2	46,2	47,6	45,0	40,0
40	88,3	107,6	101,1	90,1	102,1	93,6	91,6

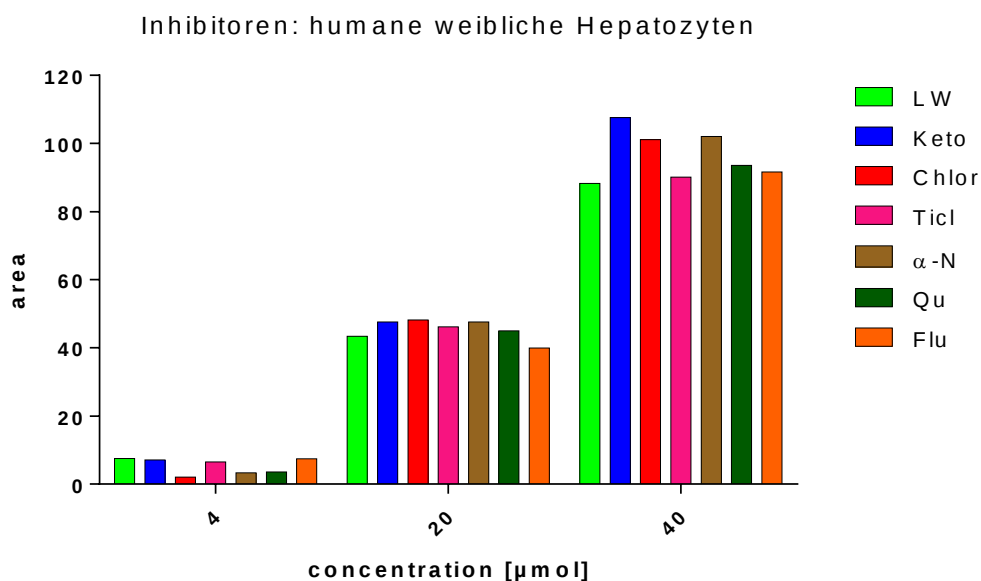


Abbildung 63: Inhibitionsversuch an humanen weiblichen Hepatozyten

Beim Versuch mit humanen weiblichen Hepatozyten kommt man zum gleichen Ergebnis wie bei den männlichen Hepatozyten. Es treten keine starken Unterschiede zwischen der Leerwertprobe und den anderen auf. Daher erfolgt auch hier keine Umsetzung von SL 11 durch die getesteten CYPs.

Tabelle 29: Peakflächen der Inhibitoren – animale Hepatozyten von Affen

Konzentration [μmol]	area		
	LW	Chlor	α-N
4	2,2	2,7	2,4
20	36,7	41,0	34,8
40	84,1	96,3	86,3

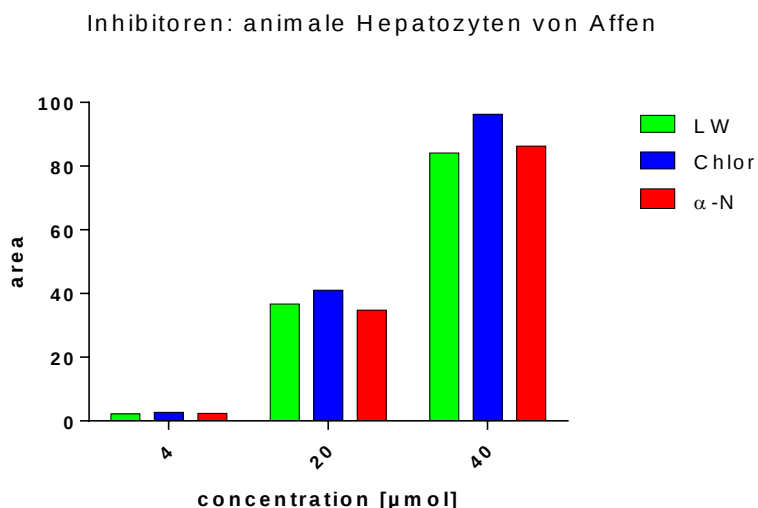


Abbildung 64: Inhibitionsversuche an animalen Hepatozyten von Affen

Auch beim Inhibitionsversuch an Hepatozyten von Affen treten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wert ohne Inhibitor und den Werten mit den Inhibitoren auf.

Daher kann man davon ausgehen, dass es zu keiner Umsetzung von SL 11 mit CYP 2E1 und CYP 1A2 kommt.

Schlussendlich waren die Inhibitionsversuche nicht sehr aussagekräftig.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde der Metabolismus von neuen Anthrachinonderivaten an humanen und animalen Hepatozyten untersucht.

Durch die Versuche mit SL 22 stellte sich heraus, dass SL 22 zu SL 11 metabolisiert wird. Daher kann SL 22 als Prodrug bezeichnet werden, dessen aktiver Metabolit SL 11 darstellt.

Tabelle 30: Peakflächen SL 11 und SL 22

Zeit [min]	area			
	10 µmol		20 µmol	
	SL 11	SL 22	SL 11	SL 22
0	130,8	81,1	241,3	154,7
15	208,0	25,8	405,1	63,9
30	216,1	8,3	471,3	23,1
60	199,9	0,0	463,9	0,0

Anhand der Peakflächen kann man erkennen, dass nach null Minuten noch eine geringe Konzentration von SL 22 vorhanden ist. Diese nimmt immer weiter ab, bis es nach einer Stunde vollständig zu SL 11 metabolisiert wurde.

Während der Versuchsreihe mit Hepatozyten wurde die Metabolisierung von SL 11 untersucht. Parallel dazu wurden Leerwertproben durchgeführt, welche zeigen, dass SL 11 unter den gegebenen Bedingungen eine hohe Stabilität aufweist. Die Substanzinstabilität von SL 11 beträgt in allen Konzentrationen unter 50%. Erst nach Zugabe der Hepatozyten kommt es zu einem starken enzymatischen Substanzabbau. Die metabolische Umsetzung liegt bei den humanen und animalen Hepatozyten über 50%. Im Vergleich weisen die animalen Hepatozyten eine höhere metabolische Stabilität und somit eine geringere metabolische Umsetzung von SL 11 auf.

Tabelle 31: 10 µmol: metabolische Umsetzung humaner männlicher, weiblicher Hepatozyten und animaler Hepatozyten von Ratten, Affen

Zeit [min]	Metabolische Umsetzung [%]			
	Mann	Frau	Ratte	Affe
0	12,9	3,1	26,0	21,6
15	17,8	15,4	34,9	25,0
30	24,5	23,6	42,8	37,2

60	35,0	41,6	49,3	42,6
120	60,8	69,2	61,1	58,9
180	74,1	80,4	62,3	67,3
240	83,2	86,3	66,9	72,0
300	84,7	93,7	62,0	74,2

Weiters wird ersichtlich, dass sich bei den humanen männlichen und den animalen Hepatozyten von Ratten und Affen keine neuen Metaboliten durch Zugabe der Hepatozyten bilden. Diese drei Hepatozytenmodelle weisen dieselben Peaks wie die Leerwerte auf, die einzelnen Abbauprodukte unterscheiden sich aber quantitativ. Bei den humanen weiblichen Hepatozyten treten noch zusätzlich die Verbindungen bei 11,6 und 11,8 Minuten auf, welche bei den Leerwerten nicht vorkommen.

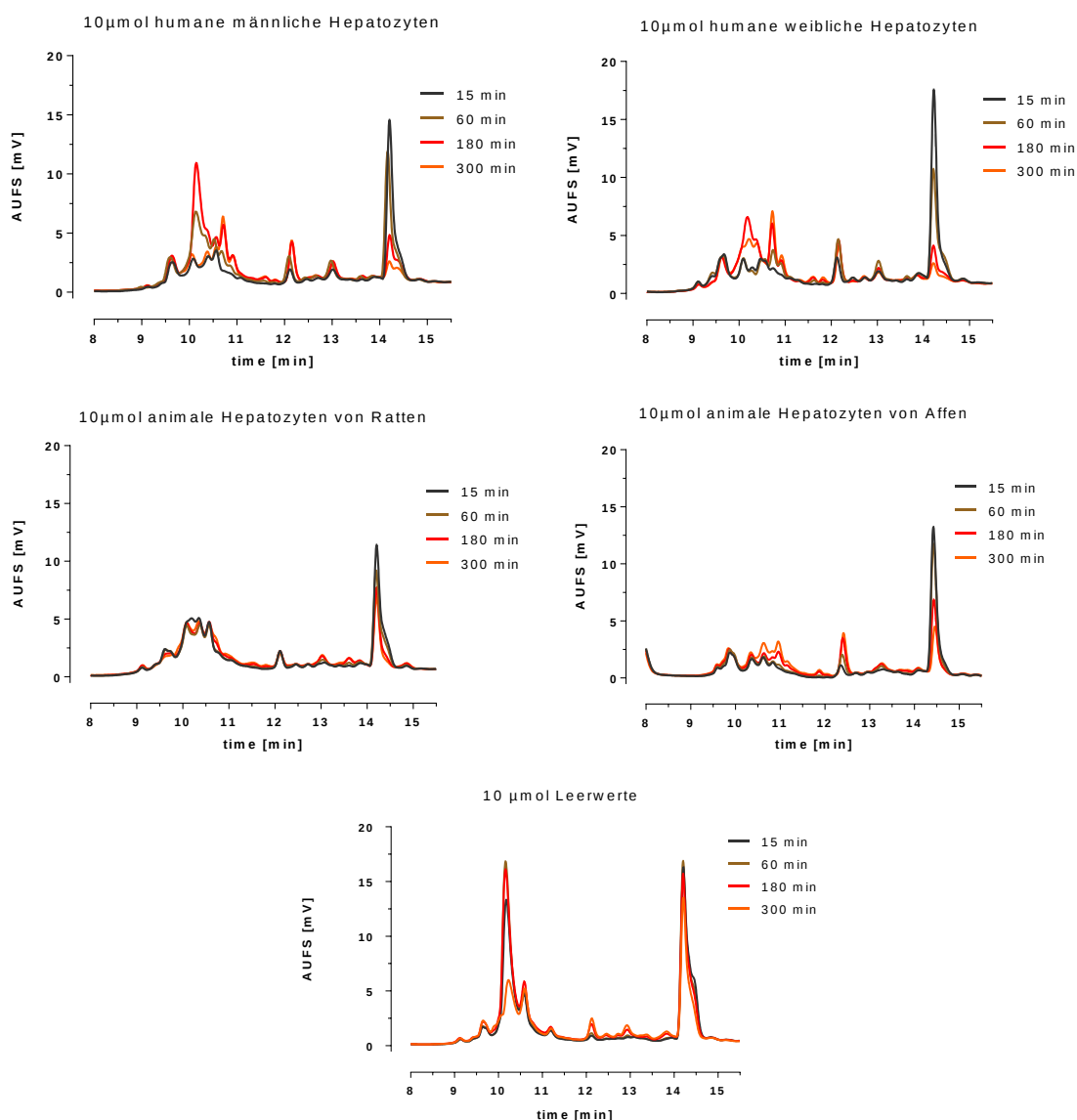


Abbildung 65: Vergleich von humanen und animalen Hepatozyten und Leerwerten

Bei den humanen Hepatozyten werden mehr Metaboliten gebildet als bei den animalen. Außerdem weisen die Verbindungen höhere Peaks bei den humanen Hepatozyten auf als bei den animalen. Somit wird vor allem bei den humanen Hepatozyten die Bildung von Umlagerungsprodukten durch die Zellen gefördert.

5 Summary

This thesis focuses on the metabolism of new Anthraquinone derivatives on human and animal hepatocytes. The experiment with SL 22 showed that SL 22 is metabolized to SL 11. Therefore, SL 22 can be called a prodrug whose active metabolite represents SL 11.

Table 32: peak area SL 11 and SL 22

time [min]	area			
	10 μ mol		20 μ mol	
	SL 11	SL 22	SL 11	SL 22
0	130,8	81,1	241,3	154,7
15	208,0	25,8	405,1	63,9
30	216,1	8,3	471,3	23,1
60	199,9	0,0	463,9	0,0

On the basis of the peak areas it can be seen that after zero minutes, a low concentration of SL 22 is still present. This continues to decrease until it is completely metabolized after one hour to SL 11

During this test series with hepatocytes, the metabolism of SL 11 was analyzed. Moreover blank samples were conducted, which indicate that SL 11 shows a high stability under these circumstances. The substance instability in all concentrations is under 50%. Only after the addition of hepatocytes, there is a strong enzymatic substance reduction. The metabolic transformation in human and animal hepatocytes is more than 50%. By contrast, the animal hepatocytes show a higher metabolic stability and therefore a lower metabolic transformation of SL 11.

Table 33: 10 μ mol: metabolic transformation human male, female hepatocytes and animal hepatocytes of rats, monkeys

time [min]	metabolic transformation [%]			
	man	woman	rat	monkey
0	12,9	3,1	26,0	21,6
15	17,8	15,4	34,9	25,0
30	24,5	23,6	42,8	37,2
60	35,0	41,6	49,3	42,6
120	60,8	69,2	61,1	58,9

180	74,1	80,4	62,3	67,3
240	83,2	86,3	66,9	72,0
300	84,7	93,7	62,0	74,2

Additionally, the analyses revealed that in human male and animal hepatocytes from rats and monkeys, no new metabolites were formed by the addition of hepatocytes. These three hepatocyte models have the same peaks as the blank samples, but the individual reduction products differ quantitatively. In the human female hepatocytes, additional compounds occur at 11,6 and 11,8 minutes, which do not occur in the blank samples.

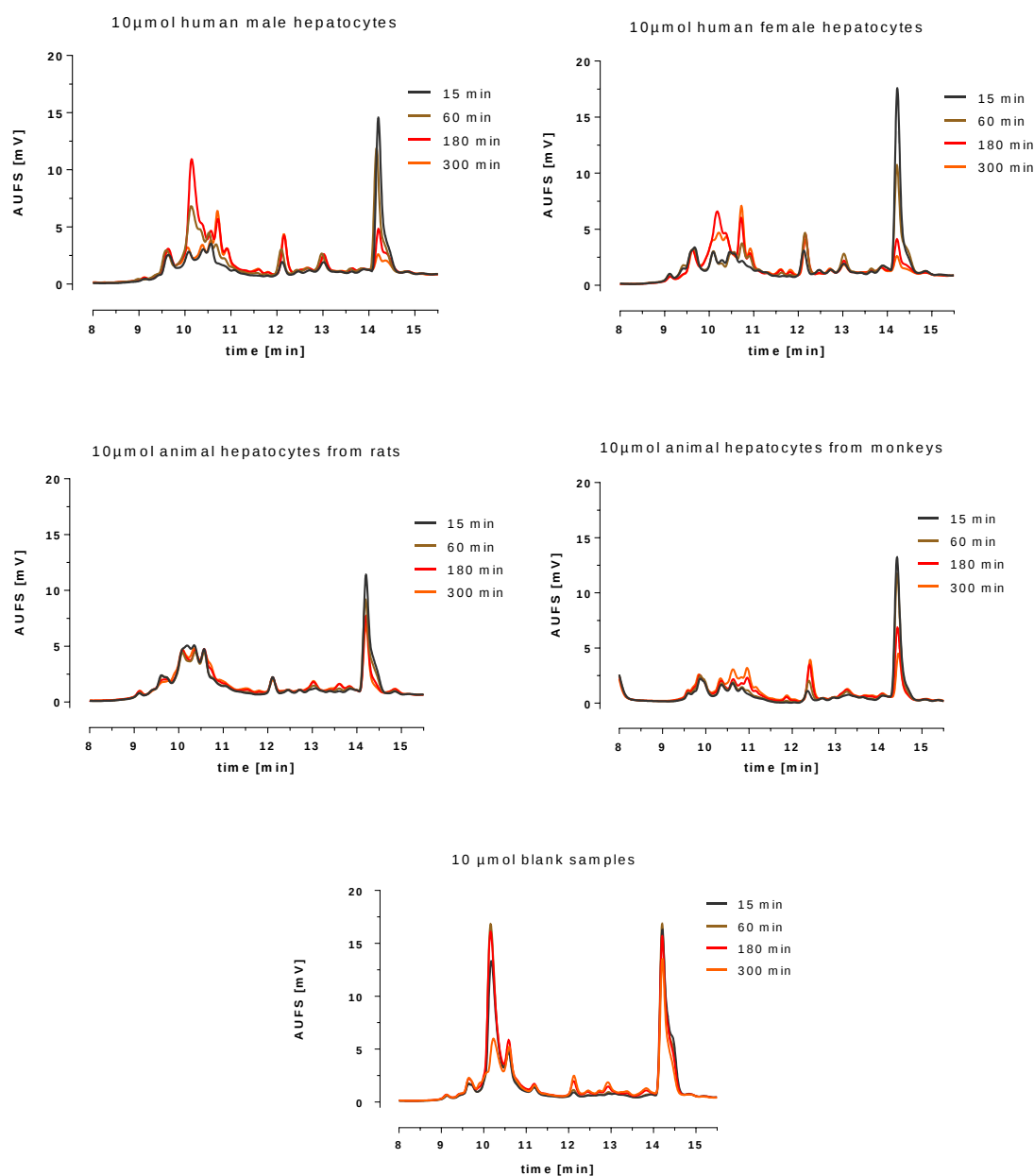


Figure 66: Comparison of human and animal hepatocytes and blank samples

With the human hepatocytes, more metabolites are formed than with the animal ones. In addition, the compounds have higher peaks in human hepatocytes than in the animal ones. As a conclusion, the formation of relocated products of human hepatocytes is particularly stimulated by the cells.

6 Conclusio

In der vorliegenden Diplomarbeit konnten wesentliche Erkenntnisse bezüglich des Metabolismus von SL 11 und SL 22, als auch über die Substanzinstabilität und die metabolische Stabilität von SL 11 gewonnen werden.

Es wurde herausgefunden, dass SL 22 ein Prodrug darstellt. Diese Information ist wichtig für die Herstellung von Arzneiformulierungen und anschließender Verabreichung. Dabei muss auf die enzymatische Aktivierung geachtet werden.

SL 11 ist unter den gegebenen Bedingungen relativ stabil. Die Instabilität liegt bei allen drei Konzentrationen auch nach fünf Stunden noch unter 50%.

Die Metabolisierung von SL 11 liegt bei diesen Versuchen über 50%, wobei die Abbauprodukte wahrscheinlich einerseits aufgrund von Umlagerungs- und Zerfallsprozessen und andererseits durch die Enzyme der Hepatozyten entstehen.

Die Inhibitionsversuche, die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführt wurden brachten keine aussagekräftigen Ergebnisse.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Claus-Jürgen Estler; Harald Schmidt: Pharmakologie und Toxikologie-Für Studium und Praxis, 6. Auflage, 2007, Schattauer GmbH, Stuttgart, p.25-30; 47-49
- [2] Hermann Bader: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 1982, edition medizin der Verlag Chemie GmbH, Weinheim, p.14-17; 22
- [3] Heinz Lüllmann; Klaus Mohr; Lutz Hein: Pharmakologie und Toxikologie, 17. Auflage, 2010, George Thieme Verlag KG, Stuttgart, p.34; 56
- [4] K. Aktories; U. Förstermann; D. Hofmann; K. Starke: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage, 2009, Urban & Fischer / Elsevier GmbH, München, p. 48-57; 61-63
- [5] Max Frimmer: Pharmakologie und Toxikologie – ein Lehrbuch für Veterinärmediziner und Naturwissenschaftler, 3. Auflage, 1986, F.K- Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, p. 40-42
- [6] Thomas Efferth: Molekulare Pharmakologie und Toxikologie, 2006, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 5-6, 19-20
- [7] Gerhard Rücker; Michael Neugebauer, Günter Georg Willems: Instrumentelle pharmazeutische Analytik – Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmehtoden, 3. Auflage, 2001, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, p. 440, 448-461
- [8] Lexikon der Biochemie - Naphthochinone, 1999, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- [9] <http://www.google.com/patents/US8425927> Zugegriffen am: 18.01.2016
- [10] <http://www.yalescientific.org/2013/12/mining-for-drugs-the-search-for-natural-treatment-products/> Zugegriffen am: 18.01.2016
- [11] H. Brockmann: Anthracyclinones and Anthracyclines. (Rhodomycinone, Pyrromycinone and Their Glycosides, Fortschr Chem Org Naturst, 1963.21: p. 121-82.

- [12] <http://enteromed.co.uk/clinical-evidence/oncology/> Zugegriffen am: 18.01.2016
- [13] https://www.researchgate.net/figure/51483367_fig1_Figure-1-Possible-doxorubicin-DOX-metabolic-pathways-13-Changes-in-the-chemical Zugegriffen am: 18.01.2016
- [14] <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2014.00025/full> Zugegriffen am: 18.01.2016
- [15] <https://www.aerzteblatt.de/pdf/103/37/a2393.pdf> Zugegriffen am: 18.01.2016
- [16] <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/32612.pdf> Zugegriffen am: 18.01.2016
- [17] Ian R. Phillips; Elizabeth A. Shephard: Cytochrome P450 Protocols - Methods in Molecular Biology, 2. Auflage, 2010, Humana Press, Totowa, p. 255-256
- [18] Bernd Clement: Die Bedeutung der Biotransformation in der Arzneistoffentwicklung und Therapie, p. 24
- [19] Hans Marquardt; Siegfried Schäfer: Lehrbuch der Toxikologie, 2. Auflage, 2003, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart p.90
- [20] Marcella Martignoni; Geny MM Groothuis; Ruben de Kanter: Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction, 2006, Informa UK Ltd, p.875-876
- [21] Bernd Meibohm; Ingrid Beierle; Hartmut Derendorf: How Important Are Gender Differences in Pharmacokinetics?, 2002, Adis International Limited, p.329-330

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur Anthrachinone	1
Abbildung 2: Grundstruktur SL 11, SL 22.....	1
Abbildung 3: Genetischer Polymorphismus des CYP 2D6 Gens [4].....	6
Abbildung 4: Grundstruktur Naphthochinon [8].....	8
Abbildung 5: Grundstruktur Anthrazykline [9]	8
Abbildung 6 Tetrazykline [10].....	8
Abbildung 7: Stoffwechselweg Doxorubicin [13].....	9
Abbildung 8: Redoxzyklus und freie Radikalproduktion von Doxorubicin [16].....	10
Abbildung 9: Elutenten.....	16
Abbildung 10: Ultraschallbad	16
Abbildung 11: WME	17
Abbildung 12: Wasserbad.....	17
Abbildung 13: Laminar Air Flow Werkbank	18
Abbildung 14: automatische Pipette.....	19
Abbildung 15: Gefäß für flüssigen Stickstoff.....	25
Abbildung 16: Zentrifuge.....	25
Abbildung 17: 12-well-plate.....	26
Abbildung 18: Vortex.....	28
Abbildung 19: Inkubator	29
Abbildung 20: Spülen der Pipettenspitze.....	30
Abbildung 21: Zentrifuge für Eppendorfgefäße.....	30
Abbildung 22: Beschriftete HPLC Vials	31
Abbildung 23: Cap mit Septum, Mikroval.....	31
Abbildung 24: HPLC-Anlage	31
Abbildung 25: Metabolisierung von SL 22.....	34
Abbildung 26: Metabolische Umsetzung von SL 22 bei einer Konzentration von 10 µmol	35
Abbildung 27: Enzymatischer Abbau von Testosteron	36
Abbildung 28: Chromatogramme der Standards	37
Abbildung 29: Chromatogramme der Leerwerte bei einer Konzentration von 10 µmol	38
Abbildung 30: Vergleich Standard – 100% Wert und Leerwert bei einer Konzentration von	39
Abbildung 31: Instabilität von SL 11.....	39
Abbildung 32: Vergleich SL 11: Standard – 100% Wert, Leerwerte und humane männliche Hepatozyten in 2 Konzentrationen.....	41

Abbildung 33: Metabolische Stabilität von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten	42
Abbildung 34: Metabolische Umsetzung von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten	43
Abbildung 35: Entstehende Verbindungen durch den Abbau von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten.....	44
Abbildung 36: Retentionszeit 12,0 Minuten bei 2 Konzentrationen von humanen männlichen Hepatozyten.....	45
Abbildung 37: Retentionszeit 12,9 Minuten bei 2 Konzentrationen von humanen männlichen Hepatozyten.....	46
Abbildung 38: Vergleich SL 11: Standard – 100% Wert, Leerwerte und weibliche Hepatozyten in 2 Konzentrationen	47
Abbildung 39: Metabolische Stabilität von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten.....	48
Abbildung 40: Metabolische Umsetzung von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten.....	49
Abbildung 41: Entstehende Verbindungen durch den Abbau von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten	50
Abbildung 42: Retentionszeit 10,7 Minuten von humanen weiblichen Hepatozyten bei einer Konzentration von 10 µmol.....	51
Abbildung 43: Retentionszeit 11,0 Minuten von humanen weiblichen Hepatozyten bei einer Konzentration von 10 µmol.....	51
Abbildung 44: Retentionszeit 12,0 Minuten von humanen weiblichen Hepatozyten bei einer Konzentration von 10 µmol.....	52
Abbildung 45: Retentionszeit 12,9 Minuten von humanen weiblichen Hepatozyten bei einer Konzentration von 10 µmol.....	53
Abbildung 46: Retentionszeit 11,6 und 11,8 Minuten bei 2 Konzentrationen von humanen weiblichen Hepatozyten	54
Abbildung 47: Vergleich SL 11: Standard – 100% Wert, Leerwerte und animale Hepatozyten von Ratten in 2 Konzentrationen	55
Abbildung 48: Metabolische Stabilität von SL 11 der animalen Hepatozyten von Ratten	56
Abbildung 49: Metabolische Umsetzung von SL 11 der animalen Hepatozyten von Ratten	57
Abbildung 50: Entstehende Verbindungen durch den Abbau von SL 11 der animalen Hepatozyten von Ratten	58

Abbildung 51: Retentionszeit 12,0 Minuten bei 2 Konzentrationen von animalen Hepatozyten von Ratten.....	59
Abbildung 52: Vergleich SL 11: Standard – 100% Wert, Leerwerte und animale Hepatozyten von Affen in 2 Konzentrationen.....	61
Abbildung 53: Metabolische Stabilität von SL 11 der animalen Hepatozyten von Affen....	62
Abbildung 54: Metabolische Umsetzung von SL 11 der animalen Hepatozyten von Affen.....	63
Abbildung 55: Entstehende Verbindungen durch den Abbau von SL 11 der animalen Hepatozyten von Affen.....	64
Abbildung 56: Retentionszeit 12,0 Minuten von animalen Hepatozyten von Affen bei einer Konzentration von 10 µmol	64
Abbildung 57: Vergleich der metabolischen Stabilität humaner männlicher, weiblicher Hepatozyten und animaler Hepatozyten von Ratten, Affen.....	65
Abbildung 58: Vergleich der metabolischen Umsetzung humaner männlicher, weiblicher Hepatozyten und animaler Hepatozyten von Ratten, Affen.....	66
Abbildung 59: Vergleich der Abbauprodukte humaner männlicher, weiblicher Hepatozyten und animaler Hepatozyten von Ratten, Affen	66
Abbildung 60: RT 12,0 min: Vergleich humaner männlicher, weiblicher Hepatozyten und animaler Hepatozyten von Ratten, Affen	67
Abbildung 61: RT 12,9 min: Vergleich humaner männlicher und weiblicher Hepatozyten.....	68
Abbildung 62: Inhibitionsversuch an humanen männlichen Hepatozyten	69
Abbildung 63: Inhibitionsversuch an humanen weiblichen Hepatozyten.....	70
Abbildung 64: Inhibitionsversuche an animalen Hepatozyten von Affen.....	70
Abbildung 65: Vergleich von humanen und animalen Hepatozyten und Leerwerten	73
Figure 66: Comparison of human and animal hepatocytes and blank samples	76

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Phase I und Phase II [1]	3
Tabelle 2: Weitere Enzyme des Phase I Metabolismus [4]	4
Tabelle 3: Enzyme des Phase II Metabolismus [4]	4
Tabelle 4: Transportproteine [6].....	5
Tabelle 5: Beispiele für CYP 3A4 –Inhibitoren und –Induktoren [4].....	5
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	12
Tabelle 7: Geräte und Materialien zur Herstellung der Eluenten.....	13
Tabelle 8: Geräte und Materialien für die Probenherstellung	13
Tabelle 9: Software	15
Tabelle 10: Berechnung der einzusetzenden Mengen der Inhibitoren	24
Tabelle 11: Pipettierschema metabolische Stabilität SL 11.....	27
Tabelle 12: Pipettierschema metabolische Stabilität SL 22.....	27
Tabelle 13: Pipettierschema Inhibitionsversuche	28
Tabelle 14: Wichtige Bestandteile der HPLC-Anlage.....	32
Tabelle 15: Peakflächen von Testosteron 50 µmol	36
Tabelle 16: Peakflächen der Standards.....	37
Tabelle 17: Peakfläche von SL 11 der Leerwerte	38
Tabelle 18: Instabilität von SL 11.....	38
Tabelle 19: Metabolische Stabilität von SL 11 – humane männliche Hepatozyten.....	41
Tabelle 20: Metabolische Umsetzung von SL 11 – humane männliche Hepatozyten	42
Tabelle 21: Metabolische Stabilität von SL 11 - humane weibliche Hepatozyten	48
Tabelle 22: Metabolische Umsetzung von SL 11 – humane weibliche Hepatozyten	49
Tabelle 23: Metabolische Stabilität von SL 11 - animale Hepatozyten von Ratten.....	56
Tabelle 24: Metabolische Umsetzung von SL 11 – animale Hepatozyten von Ratten.....	57
Tabelle 25: Metabolische Stabilität von SL 11 – animale Hepatozyten von Affen	61
Tabelle 26: Metabolische Umsetzung von SL 11 – animale Hepatozyten von Affen.....	62
Tabelle 27: Peakflächen der Inhibitoren – humane männliche Hepatozyten	69
Tabelle 28: Peakflächen der Inhibitoren – humane weibliche Hepatozyten.....	69
Tabelle 29: Peakflächen der Inhibitoren – animale Hepatozyten von Affen.....	70
Tabelle 30: Peakflächen SL 11 und SL 22.....	72
Tabelle 31: 10 µmol: metabolische Umsetzung humaner männlicher, weiblicher Hepatozyten und animaler Hepatozyten von Ratten, Affen.....	72
Table 32: peak area SL 11 and SL 22	75
Table 33: 10 µmol: metabolic transformation human male, female hepatocytes and animal hepatocytes of rats, monkeys.....	75

10 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
α -N	alpha-Naphthoflavon
CHRM	Cryopreserved Hepatocyte Recovery Medium
Chlor	Chlormethiazol
CYP	Cytochrom
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxorubicin
Flu	Fluconazol
g	Gramm
Hep	Hepatozyten
HPLC	High-performance liquid chromatography
Keto	Ketoconazol
l	Liter
LW	Leerwert
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Milimol
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
WME	Williams Medium E
PBS	Phosphatpuffer
ROS	radikale Sauerstoffspezies
Qu	Quinidine
SS	Stock solution
Ticl	Ticlopidin
Testos	Testosteron
μ l	Mikroliter