



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Phase I und II Metabolismus von
Anthrachinonderivaten“

verfasst von

Astrid Köberl

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie UniStG

Betreut von:

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, 2015

Danksagung

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

Ich möchte mich bei a.o. Univ. Prof. Mag. Dr. Martin Czejka für die Bereitstellung des Themas und die fachliche und hilfsbereite Betreuung bedanken.

Zudem möchte ich Mag. Nairi Baroian, die meine praktische Arbeit tatkräftig unterstützt und sich immer Zeit für meine Fragen genommen hat, für das große Engagement danken. Eine weiterer Dank gilt Mag. Marie Kitzmüller, welche mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Zutiefst zu Dank verpflichtet bin ich meinen Eltern, welche mich über die Jahre unterstützt und mir das Studium ermöglicht haben.

Danke auch an meinen Freund, Martin, der mich während des gesamten Studiums immer wieder motiviert und mich in schwierige Zeiten begleitet und unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1.	Theoretischer Teil	1
1.1.	Anthrachinone	1
1.2.	Metabolismus	1
1.2.1.	Bedeutung	1
1.2.1.1.	First-Pass Metabolismus.....	1
1.2.1.2.	Inaktivierung, Aktivierung und Giftung.....	2
1.2.1.3.	Speziesunterschiede.....	2
1.2.2.	Phasen des Metabolismus.....	2
1.2.2.1.	Phase 0	2
1.2.2.2.	Phase I	2
1.2.2.3.	Phase II	3
1.2.2.4.	Phase III	3
1.2.3.	Einflussfaktoren	4
1.2.3.1.	Geschlechtsspezifische Unterschiede.....	4
1.2.3.2.	Enzyminduktion und -inhibition	4
1.2.3.3.	Polymorphismus	5
1.3.	In vitro Metabolismus Bestimmungen	5
1.3.1.	Hepatozyten	5
1.3.2.	Leber S9 Fraktion	6
1.3.3.	Lebermikrosomen	6
1.3.4.	cDNA exprimierte P450 Isoformen.....	6
1.4.	Enzymkinetik	7
1.4.1.	Carboxylesterase.....	7
1.4.2.	Michaelis-Menten-Kinetik.....	7
1.5.	Rationale	8
2.	Experimenteller Teil	9
2.1.	Materialien und Geräte	9
2.2.	Reagenzien und Chemikalien.....	10
2.3.	Software	10
2.4.	Allgemeine Vorbereitungen	11
2.4.1.	Herstellung der Eluenten und der Waschflüssigkeit	11
2.4.2.	Herstellung Phosphatpuffer	11
2.5.	Esterasemodell.....	11
2.5.1.	Probenvorbereitung	11
2.5.1.1.	Herstellung der Stammlösungen.....	11
2.5.1.2.	Berechnung der einzusetzenden Mengen.....	12

2.5.2.	Probendurchführung.....	13
2.5.2.1.	Erstellung einer Eichgerade.....	13
2.5.2.2.	Mischung der Stammlösungen	14
2.5.2.3.	Probenentnahme und Proteinfällung	14
2.5.2.4.	Zentrifugation und Befüllung der HPLC Vials.....	15
2.6.	Hepatozytenversuche	15
2.6.1.	Probenvorbereitung.....	15
2.6.1.1.	Vorbereitung der Sterilwerkbank.....	15
2.6.1.2.	Herstellung des Williams Medium E	16
2.6.1.3.	Herstellung der Stammlösungen und Verdünnungen.....	16
2.6.1.4.	Vorbereitung der Hepatozyten.....	18
2.6.1.5.	Zellen zählen	18
2.6.2.	Probendurchführung.....	19
2.6.2.1.	Erstellung einer Eichgerade.....	19
2.6.2.2.	Metabolische Stabilität nach Invitrogen	19
2.6.2.3.	Leerwerte	20
2.6.2.4.	Probenentnahme und Proteinfällung	20
2.6.2.5.	Zentrifugation und Befüllung der HPLC Vials.....	20
2.7.	Analyseverfahren HPLC.....	21
3.	Ergebnisse und Diskussion.....	22
3.1.	Auswertung.....	22
3.1.1.	Allgemeine Erklärungen Michaelis-Menten-Kinetik.....	22
3.1.2.	Erstellung der Michaelis-Menten-Kinetik.....	23
3.1.3.	Allgemeine Berechnungen der Hepatozytenversuche	25
3.2.	Ergebnisse Esterase	26
3.2.1.	Metabolisierung SL 22.....	26
3.2.2.	Michaelis-Menten-Kinetik	27
3.2.2.1.	5 Units.....	27
3.2.2.2.	1 Unit.....	32
3.2.2.3.	Abbauprodukt bei 14,2 Minuten	37
3.3.	Ergebnisse Hepatozyten	38
3.3.1.	Substanzinstabilität	38
3.3.2.	Humane männliche Hepatozyten.....	41
3.3.3.	Humane weibliche Hepatozyten	51
3.3.4.	Vergleich der männlichen und weiblichen Hepatozyten.....	60
4.	Zusammenfassung	69
5.	Summary.....	71

6.	Conclusio	73
7.	Literaturverzeichnis	74
8.	Abbildungsverzeichnis	76
9.	Tabellenverzeichnis	79
10.	Abkürzungsverzeichnis	80
11.	Curriculum Vitae	81

1. Theoretischer Teil

1.1. Anthrachinone

In der vorliegenden Diplomarbeit wird der Metabolismus von neuen Anthrachinonderivaten, welche von der Firma Sealife Pharma GmbH aus Tulln synthetisiert werden, untersucht. Diese Substanzen weisen eine antibakterielle und auch zytostatische Wirkung auf. Die Benennung der Substanzen erfolgt mit der Abkürzung SL und einer nachstehenden Zahl. Die Versuche beziehen sich auf die Metabolisierung von SL 11 und SL 22. Die unterschiedlichen Substanzen weisen die gleiche Grundstruktur auf, wobei sie sich bezüglich der Reste unterscheiden.

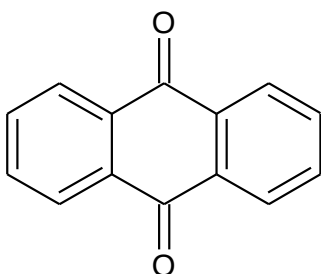


Abb.1: Allgemeine Anthrachinon Grundstruktur

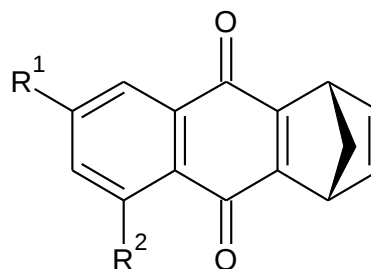


Abb.2: SL 11 und SL 22 Grundstruktur

1.2. Metabolismus

1.2.1. Bedeutung

Der Begriff Metabolismus bzw. Biotransformation umfasst Prozesse, die exogene Substanzen, so genannte Xenobiotika, zu wasserlöslichen Verbindungen umwandeln. Diese Umwandlungsprodukte werden Metabolite genannt. Lipophile Substanzen können nur schwer ausgeschieden werden, da sie immer wieder durch die Niere rückresorbiert werden würden. Im Zuge des Metabolismus werden somit hydrophile und daher leicht ausscheidbare Stoffe gebildet. Der überwiegende Teil der Biotransformation findet in der Leber statt. [2] [3]

1.2.1.1. First-Pass Metabolismus

Wenn ein Arzneistoff oral zugeführt wird, wird dieser im Magen-Darm Trakt resorbiert und dadurch über die Pfortader in die Leber transportiert. Somit wird der Arzneistoff bereits vor der Verteilung im Körper in der Leber metabolisiert. Dies beeinflusst maßgeblich die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen. [3]

1.2.1.2. Inaktivierung, Aktivierung und Giftung

In vielen Fällen werden Substanzen durch metabolische Vorgänge inaktiviert. Viele Metaboliten sind daher unwirksam oder in ihrer Wirkung stark abgeschwächt. Im Gegensatz zur Inaktivierung kann allerdings auch eine Aktivierung des Arzneistoffes erfolgen. Somit stellt der Metabolit die eigentliche wirksame Verbindung dar. In diesem Fall wird die Ausgangsverbindung als Prodrug bezeichnet, welche durch enzymatische Umwandlung aktiviert wird. Die Aktivierung kann allerdings auch nicht-enzymatisch erfolgen. Es handelt sich hierbei um chemisch aktivierte Prodrugs, bei welchen intramolekulare Umlagerungsprodukte die eigentliche Wirkform darstellen. Die, im Zuge der Aktivierung gebildeten Metaboliten, können jedoch auch unerwünscht sein und toxische oder karzinogene Eigenschaften besitzen. [4] [5] [6]

1.2.1.3. Speziesunterschiede

Die Quantität und Qualität der gebildeten Metaboliten hängt von vielen unterschiedlichen Faktoren ab, wobei der wesentlichste Faktor die Spezies-Abhängigkeit betrifft. Fremdstoffmetabolisierende Enzyme finden sich bei den meisten höheren Tieren, wobei Unterschiede in Art und Menge der Enzyme vorliegen. Dadurch ist es oft problematisch Ergebnisse eines Tierversuches auf den Menschen zu übertragen. [1]

1.2.2. Phasen des Metabolismus

Der Metabolismus wird in vier Phasen eingeteilt, wobei die enzymatischen Umwandlungsprozesse in Phase I und Phase II erfolgen. [7]

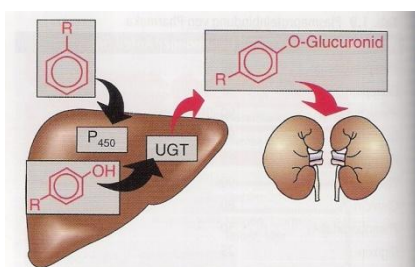


Abb.3.: Phase I und Phase II Metabolismus [4]

1.2.2.1. Phase 0

Als Phase 0 wird die zelluläre Aufnahme der Xenobiotika ins Zytosol bezeichnet. [7]

1.2.2.2. Phase I

Die Phase I wird durch Funktionalisierungsreaktionen bestimmt, dies bedeutet, dass funktionelle Gruppen in das unpolare Molekül eingeführt werden. Der oxidative Phase I

Metabolismus wird durch Monooxygenasen bestimmt, diese werden Cytochrom P450 Enzyme (=CYP) genannt. Sie befinden sich vor allem in der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Die Einteilung der unterschiedlichen CYPs erfolgt gemäß dem Grad der Homologie in der Aminosäuresequenz. Die Enzyme werden in Familien (z.B. CYP 2), Subfamilien (z.B. CYP 2C) und schlussendlich in Isoformen (z.B. CYP 2C9) gegliedert. Im Zuge der enzymatischen Reaktion wird ein Sauerstoffatom eines molekularen Sauerstoffs auf ein Substrat transferiert. Das zweite Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert, wobei NADPH verbraucht wird. [1] [4]



Am Arzneistoffmetabolismus sind vor allem die Genfamilien der CYP 1,2 und 3 beteiligt. CYP 3A4 ist dabei das wichtigste, es beträgt 30% der gesamten CYP P450 Enzyme. 60% aller Arzneistoffe sind CYP 3A4 Substrate. Die Isoformen der CYP 2C Familie machen 30%, 1A2 15% und CYP 2D6, -2A6, -2B6 gemeinsam 10% des CYP Gehalts aus. Im Phase I Metabolismus treten allerdings noch weitere Enzyme auf. [4]

Tab.1: Weitere Enzyme des Phase I Metabolismus [4]

Oxidationsenzyme	weitere Enzyme
Alkoholdehydrogenasen	Reduktasen
Aldehyddehydrogenasen	Esterasen
Xanthinoxidasen	Epoxidhydrolasen
Aminooxidasen	

1.2.2.3. Phase II

In der Phase II finden Konjugationsreaktionen statt, somit werden die funktionellen Gruppen mit sehr polaren endogenen Molekülen gekoppelt. Ein Arzneistoff kann jedoch auch ohne vorausgegangene Phase I Reaktion funktionelle Gruppen besitzen, welche direkt konjugiert werden können. Die entstehenden Konjugate sind größtenteils unwirksam und sehr polar und somit wasserlöslich. Daher können sie biliär oder renal ausgeschieden werden. [4]

Tab.2: Enzyme des Phase II Metabolismus [7]

Glucuronosyltransferasen	Glutathion-S-Transferasen	N-Acetyltransferasen
Sulfotransferasen	Methyltransferasen	Aminoacyltransferasen

1.2.2.4. Phase III

Unter Phase III Metabolismus versteht man den Transport der Metaboliten, welche in Phase II gebildet werden, aus der Zelle. Im Unterschied zu den beiden vorangegangenen Phasen erfolgt hier keine weitere chemische Veränderung. Das Ausschleusen aus der Zelle erfolgt häufig über ATP abhängige ABC Transporter. [7]

1.2.3. Einflussfaktoren

Es liegt eine Variabilität der Biotransformation vor, dies bedeutet, dass unterschiedliche Individuen mehr oder weniger Metaboliten bilden. Dementsprechend wird die Wirkung des Arzneistoffes beeinflusst, wobei der therapeutische Effekt vermindert aber auch ausbleiben oder verstärkt auftreten kann. [5]

1.2.3.1. Geschlechtsspezifische Unterschiede

Im Zuge des Metabolismus sind einige geschlechtsspezifische Unterschiede zu erkennen. Viele derartige Untersuchungen wurden mit Ratten durchgeführt. Wobei weibliche Ratten 10-30% weniger CYP Enzyme aufweisen. Zudem werden manche CYP Isoformen nur in weiblichen oder männlichen Ratten exprimiert. Unterschiede zeigen sich auch bei den verschiedenen Transferasen. Männliche Ratten weisen eine höhere Metabolisierungsrate auf. Bei Vergleichen zwischen Menschen und Ratten muss allerdings darauf geachtet werden, dass die CYP Enzyme bei Ratten in Art und Menge variieren. Beim Menschen treten jedoch nur quantitative Unterschiede auf. [8]

Bezüglich des Phase I Metabolismus weisen Menschen bei den verschiedenen CYP Enzymen variable Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern auf. Wobei Enzymen des Phase II Metabolismus bei Männern eine erhöhte Aktivität aufzeigen. Die Expression von CYP 3A4 unterscheidet sich wesentlich zwischen Mann und Frau. Viele Arzneistoffe, die über CYP 3A4 metabolisiert werden, weisen bei Frauen eine höhere Clearance auf und werden somit schneller metabolisiert und eliminiert. Es konnten keine Unterschiede zwischen prä- und postmenopausalen Frauen erkannt werden. Auch CYP 2B6 weist vermutlich eine vermehrte Aktivität bei Frauen auf, jedoch treten bei diesem Enzym hohe individuelle Schwankungen auf. CYP 1A2, 2E1 und 2D6 zeigen eine höhere Aktivität bei Männern. Für CYP 2C19 und 2C9 konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede erkannt werden. Generell zeigt sich auch beim Menschen, dass Frauen höhere Plasmaspiegel und somit niedrigere Metabolisierungsraten aufweisen. Jedoch dürfen vor allem die Unterschiede bezüglich CYP 3A4 beim Arzneistoffmetabolismus nicht außer Acht gelassen werden. [8] [9] [10] [11]

1.2.3.2. Enzyminduktion und -inhibition

Endogene wie auch exogene Substanzen können die Funktion metabolisierender Enzyme beeinflussen. Dabei kann die Enzymaktivität induziert wie auch inhibiert werden. Viele Arzneistoffe aber auch Nahrungsmittel sind solche Inhibitoren oder Induktoren. Daher ist es besonders wichtig auf mögliche Interaktionen und Wechselwirkungen zu achten. Betroffen sind in beiden Fällen vor allem CYP 3A4 Substrate. Die Folge von

Enzyminduktoren ist ein verstärkter Abbau sowie eine verminderte Wirkung der CYP 3A4 Substrate. Konsequenzen einer CYP 3A4 Inhibition sind dabei erhöhte Plasmaspiegel und dadurch die erhöhte Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen. [4] [11]

Tab.3: Beispiele für Enzyminduktoren und –inhibitoren [4]

Induktoren	Reversible Inhibitoren	Irreversible Inhibitoren
Rifampicin	Ketoconazol, Itraconazol	Grapefruitsaft
Phenytoin, Carbamazepin	Verapamil, Diltiazem	
Johanniskrautextrakt	Erythromycin	
	Ciclosporin	

1.2.3.3. Polymorphismus

Die Aktivität der metabolisierenden Enzyme kann bei unterschiedlichen Individuen stark variieren. Das bedeutet, dass bestimmte Enzyme fehlen bzw. nur in geringen Mengen exprimiert werden oder vermehrt gebildet werden. [5]

Ein häufiges Beispiel für einen Polymorphismus betrifft dabei das CPY 2D6 und CYP 2C19. Man spricht in diesem Zusammenhang von „defizienten Metabolisierern“, bei welchen eine Standarddosis, von Substanzen die normalerweise durch CYP 2D6 oder 2C19 metabolisiert werden, zu erhöhten Risiko für Nebenwirkungen führen kann. Da diese Verbindungen nur langsam abgebaut werden können und sich somit die Plasmaspiegel erhöhen. Jedoch sind auch „ultrarapide Metabolisierer“ bekannt, bei welchen durch die vermehrte Enzymaktivität die Standarddosis erhöht werden muss um einen therapeutischen Effekt erzielen zu können. [4]

1.3. In vitro Metabolismus Bestimmungen

1.3.1. Hepatozyten

Hepatozyten haben eine große Bedeutung um den Phase I und II Metabolismus von Substanzen untersuchen zu können. Bei Hepatozyten handelt es sich um parenchymale Zellen der Leber, welche hauptsächlich für den Metabolismus von Xenobiotika verantwortlich sind. Sie beinhalten alle am Metabolismus beteiligten Enzyme, die zytosolischen wie auch membranständigen Enzyme. Für die Gewinnung von Hepatozyten ist frisches Ausgangsmaterial von großer Bedeutung, wodurch auch die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt wird. Daraus resultieren allerdings auch einige Probleme bei der Versuchsdurchführung mit Hepatozyten. Frisch isolierte Hepatozyten können nur vier Stunden überleben. Zudem ist die Verfügbarkeit menschlicher Leber eingeschränkt. Ein weiteres Problem ist, dass nicht jedes pharmazeutisches Labor die Möglichkeiten hat eine

Hepatozytenisolierung durchzuführen. Somit werden neben frischen Leberzellen auch kryokonservierte Zellen verwendet. Kryokonservierung bedeutet, dass biologisches Material mit Hilfe von flüssigem Stickstoff bei -196°C tiefgefroren wird. Es kann nach beliebiger Zeit wieder aufgetaut und verwendet werden. Nach dem Auftauen kann es jedoch zu einer verringerten Viabilität sowie einer verringerten metabolischen Kapazität kommen. Dennoch bleiben auch bei kryokonservierten Hepatozyten die meisten hepatozellulären Funktionen erhalten. [2] [12] [13] [14]

1.3.2. Leber S9 Fraktion

Die Leber S9 Fraktion ist eine submitochondriale Fraktion, welche zytosolische sowie auch membrangebundene Enzyme beinhaltet. Die Abkürzung S stammt von „supernatant“ (=Überstand) und 9 steht für die Zentrifugation bei 9000g (g= Erdbeschleunigung). Die Gewinnung erfolgt aus homogenisierter Leber und anschließender Zentrifugation. Um eine anhaltende Enzymaktivität zu gewährleisten muss die Lagerung bei -80°C erfolgen. [15]

1.3.3. Lebermikrosomen

Durch Zentrifugation der S9 Fraktion bei 100.000 g erhält man die so genannten Mikrosomen. Es handelt sich also auch bei den Mikrosomen um eine Zellfraktion, wobei die Funktion der Cytochrome wiederum erhalten bleibt. Es liegen hier überwiegend membranständige Enzyme vor. Im Vergleich zu den Hepatozyten kann jedoch nur der Phase I Metabolismus untersucht werden. Auch hier ist eine Lagerung bei -80°C notwendig, um die Enzymaktivität zu erhalten. [2] [4] [15]

1.3.4. cDNA exprimierte P450 Isoformen

Die cDNA Sequenzen, welche für die humanen Cytochrome der Familie P450 kodieren, sind bekannt. Diese kodierenden Regionen können mit Hilfe einer reversen Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion isoliert werden. Dadurch können Vektoren mit dieser Erbinformation hergestellt werden, die danach in Zellen (z.B. Escherichia coli) transferiert werden. Diese exprimieren anschließend die gewollten Proteine. Hierbei kann die Expressionsrate gesteuert und somit erhöht werden, indem zusätzliche Promotorregionen eingeführt werden. [2] [12]

1.4. Enzymkinetik

1.4.1. Carboxylesterase

Carboxylesterasen werden vor allem in der Leber, aber auch in anderen Organen und Geweben wie z.B. Niere, Blut, Hirn, Lunge und Haut gebildet. Sowohl zytosolische wie auch membrangebundene Carboxylesterasen sind am Metabolismus von Xenobiotika beteiligt. Diese Enzyme katalysieren Carbonsäureester zu Carbonsäuren und einen Alkohol. [16]

$R_1COOR_2 + H_2O$ wird zu $R_1COOH + R_2OH$ [16]

Beim Menschen werden vor allem zwei Isoformen unterschieden, hCE-1 und hCE-2. Diese beiden unterscheiden sich vor allem in ihrer Substratspezifität. Zusätzlich wurde eine dritte spezifische Carboxylesterase, hCE-3, im Gehirn identifiziert. Porcine Carboxylesterasen werden von einer Schweineleber extrahiert und häufig für metabolische Untersuchungen verwendet. Es werden drei Isoenzyme unterschieden α -, β - und γ -PLE. Diese unterscheiden sich wiederum in ihrer Substratspezifität. [16] [17]

1.4.2. Michaelis-Menten-Kinetik

Die Enzymaktivität bezieht sich auf die Anzahl der Substratmoleküle, die pro Sekunde in Produktmoleküle umgesetzt werden. Diese wird in Units angegeben, wobei 1 Unit bedeutet das 1 μmol Substrat pro Minute umgesetzt wird. Zuerst wird ein Enzym-Substrat-Komplex gebildet, welcher in einen Enzym-Produkt-Komplex umgewandelt wird und anschließend zerfällt dieser in Enzym und Produkt. Es kann zwischen unterschiedlichen Reaktionstypen unterschieden werden. Reaktion erster Ordnung bedeutet, dass die Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration abhängig ist wobei eine Reaktion nullter Ordnung konzentrationsunabhängig und konstant abläuft. Bei der Erstellung eines Michaelis-Menten-Diagramms ist die Enzymkonzentration konstant während die Substratkonzentration variiert. Jeder Punkt des Michaelis-Menten-Graphs steht für eine Reaktionsgeschwindigkeit bei einer bestimmten Substratkonzentration. [18]

Das Michaelis-Menten-Diagramm kann in drei Bereiche unterteilt werden:

- Bei niedrigen Substratkonzentrationen liegt eine Reaktion erster Ordnung vor, da die Geschwindigkeit proportional zur Substratkonzentration steigt. Alle Substratmoleküle können an ein Enzymmolekül binden. [18]
- Mittlere Substratkonzentrationen stellen den Übergang zwischen erster und nullter Ordnung dar. Trotz Erhöhung der Substratkonzentration wird die Zunahme der Geschwindigkeit immer geringer. Substratmoleküle müssen um ein freies Enzymmolekül konkurrieren. [18]

- Hohe Substratkonzentrationen ziehen eine Enzymsättigung mit sich, dies bedeutet, dass weitere Substraterhöhung keinen Einfluss mehr auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat. Somit liegt eine Reaktion nullter Ordnung vor. [18]

Wichtige Parameter einer Michaelis-Menten-Kinetik stellen die Maximalgeschwindigkeit und die Michaeliskonstante dar. V_{max} wird bei Enzymsättigung erreicht und stellt somit die höchste Geschwindigkeit dar mit der die enzymatische Umsetzung erfolgen kann. K_m entspricht $V_{max}/2$. Das bedeutet, dass K_m sich auf jene Substratkonzentration bezieht, bei der eine Enzymaktivität mit halbmaximaler Geschwindigkeit vorliegt. Demnach liegt die Hälfte der Enzyme als Substrat-Enzym-Komplex vor, wodurch K_m auch als Halbsättigungskonzentration bezeichnet wird. K_m beschreibt die Affinität eines Enzyms zum jeweiligen Substrat. Bei niedrigem K_m liegt eine hohe Affinität vor, weil nur eine geringe Substratkonzentration für die Erreichung der halbmaximalen Geschwindigkeit notwendig ist. Demzufolge entspricht ein hohes K_m einer niedrigen Affinität, da hier hohe Substratmengen nötig sind um eine Halbsättigung des Enzyms zu erzielen. [18] [19]

1.5. Rationale

Der Metabolismus ist ein wesentlicher Aspekt bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe, dadurch sind diesbezügliche Untersuchungen in der präklinischen Phase von großer Bedeutung. Die Bildung möglicher aktiver wie auch inaktiver Metaboliten hat wesentlichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und Wirkung aber auch auf die Nebenwirkungen eines Arzneistoffes. [1]

Ziel dieser Diplomarbeit ist es, die Metabolisierung von SL 11 sowie die enzymatische Umsetzung von SL 22 zu untersuchen. Hierfür werden humane Hepatozyten sowie porcine Carboxylesterasen verwendet. Somit sollen Rückschlüsse auf den Abbau der Substanzen und der dadurch gebildeten Abbauprodukte gezogen werden können. Die Untersuchung der metabolischen Stabilität, der metabolischen Umsetzung sowie der Substanzinstabilität sollen für die Beurteilung des Metabolismus herangezogen werden.

Zudem soll eine Michaelis-Menten-Kinetik erstellt und damit Informationen über die enzymatische Umsetzung durch Carboxylesterasen gewonnen werden.

2. Experimenteller Teil

2.1. Materialien und Geräte

Tab.4: Verwendete Materialien und Geräte

Bezeichnung	Herstellungsfirma
12-well-plate, Multiwell, Sterile	Merck VWR International
Analysewaage	Satorius Mechatronics Austria GmbH
Automatische Pipette, pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Carboxylesterase, from porcine liver, E3019	Sigma-Aldrich
Centrifuge Tubes, Super Clear, 15 ml	Merck VWR International
Deckglas, 18x18 mm	
Einmal Latexhandschuhe	Merck VWR International
Eppendorf Pipettenspitzen: Universal blue tips: 50-1000 µl Universal yellow tips: 2-200 µl	Merck VWR International
Eppendorfgefäße, Plastibrand, 1,5 ml	BRAND GmbH Deutschland
Eppendorf-Pipetten 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Research Plus
Epruvetten, Plastibrand	Brand GmbH Deutschland
Heizblock, Dir-Block	Techne
Hepatozyten: human männlich	Invitrogen™ – Life Technologies, USA
HPLC Caps, 8-SC	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	
Laminar Biosafe 2	Ehret GmbH
Magnetrührer MR 3001K	Heidolph Instruments GmbH
Mikroskop, Nikon Eclipse Te2000-S	Nikon GmbH
Parafilm, Laboratory Film „M“	Bemis Company
Pasteurpipette Glas, 150 mm	Merck VWR International
Pipetten 5ml, 10ml, 25ml Stripette	Sigma-Aldrich
Pipettensauger	
Pipettenspitzen, disposable steril tips 50-1000 µl, 2-200 µl	Merck VWR International
Ultraschallbad Bandelin Sonorex	Bandelin electronic GmbH

Vortex	Velp Scientifica
Wasserbad, Transonic Digital	Elma Schmidbauer GmbH
Zählkammer, Neubauer	Assistent Deutschland
Zentrifuge, Galaxy 16DH	Merck VWR International
Zentrifuge, Laborfuge 400	Heraeus Instruments GmbH

2.2. Reagenzien und Chemikalien

Tab.5: Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Herstellungsfirma
Acetonitril >99,9% HPLC gradient grade	Chem-Lab NV
Alkohol 70%	
Analysierte Substanzen SL 11, SL 22	Sealife Pharma GmbH Tulln
Aqua destillata	Department für Pharmakognosie, Universität Wien
Cell-Maintenance Cocktail-B	Invitrogen™ – Life Technologies, USA
Cryopreserved Hepatocyte Recovery Medium	Invitrogen™ – Life Technologies, USA
Dexamethason	Invitrogen™ – Life Technologies, USA
Dimethylsulfoxid >99,9%, D4540	Sigma-Aldrich
Essigsäure>99,9%, 338826	Sigma-Aldrich
Phosphatpuffertablette P4417-50TAB	Sigma-Aldrich
Testosteron, 86500-5G	Sigma-Aldrich
Trypanblau 0,4%, T8154	Sigma-Aldrich
Williams Medium E	Invitrogen™ – Life Technologies, USA

2.3. Software

Tab.6: Verwendete Software

Microsoft Office Word
Microsoft Office Excel
Graph Pad Prim 6

2.4. Allgemeine Vorbereitungen

2.4.1. Herstellung der Eluenten und der Waschflüssigkeit

Eluent A:

1:1000 (Essigsäure:Wasser dest.)

Es werden 999 ml destilliertes Wasser in eine 1 Liter Flasche vorgelegt und danach mit 1 ml Essigsäure versetzt.

Eluent B:

1:1000 (Essigsäure:ACN)

Für diesen Eluenten werden dementsprechend 999 ml ACN verwendet und 1 ml Essigsäure hinzugefügt.

Waschflüssigkeit:

20:80 (Wasser dest.:ACN)

Hierzu werden 200 ml destilliertes Wasser und 800 ml ACN gemischt.

Beide Eluenten sowie die Waschflüssigkeit werden mit einem Magnetstäbchen versetzt und mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt. Danach werden die Flaschen mit einem Parafilm verschlossen und für 30 min ins Ultraschallbad gestellt. Auf diese Weise kann die Luft aus den Flaschen entweichen.

2.4.2. Herstellung Phosphatpuffer

PBS (pH=7,4)

Eine Phosphatpuffertablette wird in 200 ml destillierten Wasser gelöst und durchmischt. Der Puffer wird jedes Monat frisch hergestellt.

2.5. Esterasemodell

2.5.1. Probenvorbereitung

2.5.1.1. Herstellung der Stammlösungen

Stammlösung SL 22

Es wird eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Dazu wird 1 mg SL 22 in ein Eppendorf Gefäß eingewogen und in 1 ml DMSO 100% gelöst. Danach

wird die Lösung am Vortex durchmischt. Das Eppendorfgefäß wird anschließend mit Alufolie umwickelt, da möglicherweise eine Lichtempfindlichkeit der Substanz vorliegt.

Stammlösung CES

Auch hierfür wird eine Konzentration von 1 mg/ml benötigt, wodurch man wiederum 1 mg CES in ein Eppendorfgefäß einwiegt, danach wird 1 ml PBS hinzugefügt. Diese Lösung wird wieder homogenisiert.

Stammlösung SL 11

Für die Eichgerade wird eine 1 mg/ml Lösung von SL 11 hergestellt. 1 mg der Substanz werden in 1 ml DMSO 100% gelöst und mit dem Vortex durchmischt. Auch hier ist ein Lichtschutz mit Hilfe von Alufolie erforderlich.

2.5.1.2. Berechnung der einzusetzenden Mengen

Die Berechnung erfolgte mit einem so genannten „Calculator“

BEZOGEN AUF EIN VOLUMEN VON 1.00 ML

Reaktand	Volumen [µl]	Dimension	gewünschte KONZ. bzw. Aktivität
Carboxylesterase 20000 U / 1000 mg EW: 1 mg/1 ml = 20 Units	250	U/ml	5
MG198B 1000 µg/ml 1.0 µg/1 µl	10	µg/ml µmol	10.0 22.8
Na ₂ HPO ₄ pH=7.4 1 g/l	740	g mmol	1.0 7.1

Abb.4: Calculator

In diesem „Calculator“ wird die verwendete Menge Carboxylesterase und die eingesetzte Substratmenge eingegeben und somit wird die richtige Menge an PBS errechnet. Es wird dabei auch die Substratkonzentration von µg/ml auf µmol umgerechnet.

Berechnung:

PBS= 1000 µl – Substratlösung µl – Esterase µl

µmol= Substratkonzentration µg * 1000 / MG (Molekulargewicht von SL 22=439 g/mol)

Tab.7: Mengen der verwendeten Substanzen

Substrat [μ l]	Substrat [μ mol]	Esterase [μ l]	PBS [μ l]
10	22,8	250	740
20	45,6	250	730
40	91,1	250	710
80	182,2	250	670
120	273,3	250	630
300	683,3	250	450
450	1025	250	300
10	22,8	50	940
20	45,6	50	930
40	91,1	50	910
80	182,2	50	870
120	273,3	50	830
300	683,3	50	650
450	1025	50	500

- 1 mg/ml Enzym entspricht 20 Units
 - 250 μ l der Stammlösung entsprechen 5 Units
 - 50 μ l der Stammlösung entsprechen 1 Unit

2.5.2. Probendurchführung

2.5.2.1. Erstellung einer Eichgerade

Es werden fünf Konzentrationen des Metaboliten SL 11 hergestellt. Folgende Konzentrationen werden gewählt:

50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 12,5 μ g/ml, 6,25 μ g/ml, 3,125 μ g/ml

Berechnung:

Stammlösung= 1 mg/ml

Verdünnung 1:20 = Konzentration von 50 μ g/ml

1 Teil SL + 19 Teile PBS

100 μ l SL + 1900 μ l PBS

→ vortexen

Für die Herstellung der restlichen Konzentrationen wird von der jeweils vorangegangenen Konzentration eine 1:1 Verdünnung vorgenommen. Danach werden die jeweiligen Verdünnungen in beschriftete HPLC Vials gefüllt und in den Autosampler gestellt.

2.5.2.2. Mischung der Stammlösungen

Es werden die entsprechenden Mengen der CES-Lösung sowie PBS mit Hilfe von Eppendorf Pipetten in Eprouvetten gefügt. Danach pipettiert man die unterschiedlichen Substratmengen in die vorgesehenen Reagenzgläser. Diese werden gevortext und danach in einen Heizblock, welcher auf 37°C temperiert ist, gestellt. Die Eprouvetten werden danach mit einem Parafilm verschlossen um den Inhalt vor äußeren Kontaminationen zu schützen.



Abb.5: Vortex



Abb.6: Heizblock

2.5.2.3. Probenentnahme und Proteinfällung

Es werden folgende Zeitpunkte gewählt:

0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, zum Teil 90 min, 120 min und 180 min

Zu den jeweiligen Zeitpunkten werden von jeder Eprouvette, mit Hilfe von Eppendorf Pipetten, 100 µl Probe entnommen und in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Danach werden 100 µl ACN zugefügt und der Inhalt nun am Vortex durchmischt. Dadurch wird die Reaktion gestoppt und die Proteine gefällt.



Abb.7: Probenentnahme



Abb.8: Probenpipettierung in Eppendorfgefäß

2.5.2.4. Zentrifugation und Befüllung der HPLC Vials

Anschließend werden die Proben bei 7000 U/min 5 min zentrifugiert. Dadurch setzen sich die vorher gefällten Proteine ab und darüber bildet sich ein klarer Überstand.

Mit einer Pasteurpipette wird nun diese klare Lösung in HPLC Mikroinsätze, bis zur blauen Welle, gefüllt. Diese werden danach in die beschrifteten HPLC Fläschchen gegeben und mit einem so genannten Cap, mit Septum, verschlossen.

Die Verwendung der Mikroinsätze ist hier essentiell, da es sich um sehr kleine Volumina handelt die abgenommen werden müssen. Für normale HPLC Vials wären diese Mengen zu klein und die Injektionsnadel der HPLC könnte nicht genug Flüssigkeit entnehmen.



Abb.9: Zentrifuge



Abb.10: Klarer Überstand und Mikroeinsatz



Abb.11: Beschriftete HPLC Vials

2.6. Hepatozytenversuche

2.6.1. Probenvorbereitung

2.6.1.1. Vorbereitung der Sterilwerkbank

Da bei diesen Versuchen mit Hepatozyten gearbeitet wird, müssen diese unter einer so genannten sterilen Werkbank, auch Reinraumwerkbank genannt, stattfinden.

Durch den Luftstrom werden Kontaminationen so gering wie möglich gehalten. Dies ist

sehr wichtig, da bereits kleine Verunreinigungen die Zellen töten können.

Die Oberfläche der Werkbank wird zuerst mit Alkohol 70% desinfiziert. Anschließend werden alle Gefäße, die unter der Werkbank benötigt werden, ebenfalls desinfiziert und hergerichtet.

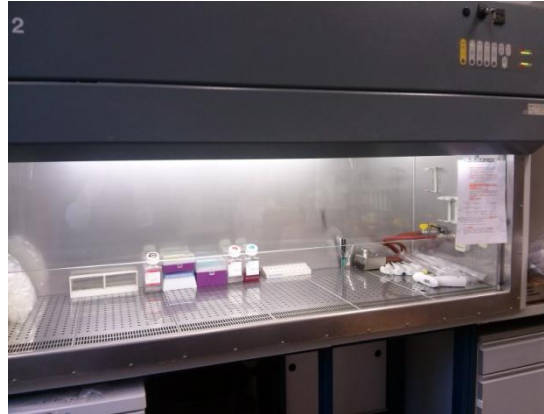


Abb.12: Sterilwerkbank

2.6.1.2. Herstellung des Williams Medium E

Das Williams Medium E wird mit 20 ml Hepatozyten Maintenance und 5 μ l Dexamethason versetzt. Das Medium ist nun im Kühlschrank für ein Monat haltbar. Es dient zur Erhaltung der lebenden Zellen. Vor dem Versuch muss es für 2 h im Wasserbad bei 37°C erwärmt werden.



Abb.13: Wasserbad

2.6.1.3. Herstellung der Stammlösungen und Verdünnungen

SL 11

Es werden folgende Konzentrationen hergestellt:

Stock Solution 30 mmol, 200 μ mol, 100 μ mol, 50 μ mol

Für eine Lösung mit einer Konzentration von 30 mmol werden 11,85 mg SL 11 in ein Eppendorfgefäß eingewogen und in 990 μ l DMSO 100% gelöst. Um eine Konzentration von 200 μ mol zu erhalten werden 11920 μ l WME in ein Tube vorgelegt und 80 μ l der Stock Solution, mit Hilfe einer Eppendorf Pipette, zugefügt. Das Tube wird verschlossen

und geschüttelt um eine homogene Lösung zu erhalten. Für die beiden weiteren Konzentrationen wird nun eine 1:1 Verdünnung vorgenommen, wobei 6 ml WME in ein neues Tube vorgelegt und 6 ml der vorangegangenen Verdünnung hinzugefügt werden. Hierfür wird, vor allem für die größeren Volumina, eine automatische Pipette verwendet. Zwischen den Verdünnungen muss eine Durchmischung der Lösungen erfolgen.

Berechnung: MG=395

1 mol=395 g/l

30 mmol=11850 mg/l

→ 11,85 mg/ml

30 mmol.....1200 µl

0,2 mmol.....80 µl

→ 80 µl Stock Solution + 1920 µl WME

Testosteron

Auch für Testosteron wird eine Stock Solution mit 30 mmol, sowie zwei weitere Konzentrationen mit 100 µmol und 200 µmol hergestellt.

Für die Stock Solution werden 8,65 mg Testosteron in ein Eppendorfgefäß eingewogen und danach mit 991 µl DMSO 100% versetzt. Die Herstellung der 200 µmol Lösung erfolgt, indem 5960 µl WME in ein Tube vorgelegt und mit 40 µl Stock Solution versetzt werden. Für die nächste Konzentration von 100 µmol resultiert eine 1:1 Verdünnung der 200 µmol Lösung. Wiederum ist auf eine Homogenisierung der Lösungen zu achten.

Berechnungen: MG=288,42

1 mol=288,42 g/l

30 mmol=8652,6 mg/l

→ 8,65 mg/ml

30 mmol.....6000 µl

0,2 mmol.....40 µl

→ 40 µl Stock Solution + 5960 µl WME



Abb.14: Herstellung der Verdünnungsreihe

2.6.1.4. Vorbereitung der Hepatozyten

Die Hepatozyten befinden sich in flüssigem Stickstoff. Daher werden die Zellen zu Beginn des Versuchs in einem 37 Grad warmen Wasserbad für 2 min aufgetaut. Danach werden die Zellen in das sogenannte CHRM (=Recovery Medium), welches für 2 h auf 37 Grad erwärmt wurde, durch händisches umschütten, übergeführt. Um möglichst alle Hepatozyten zu erhalten, wird mit 1 ml CHRM nachgespült. Nun werden die Zellen, durch umschwenken, im Medium homogenisiert und anschließend für 10 min bei 750 U/min zentrifugiert. Durch die Zentrifugalkraft werden die Zellen nach unten geschleudert und das Recovery Medium kann somit entsorgt werden. Damit die Hepatozyten weiter überleben können muss nun wieder Flüssigkeit zugefügt werden, hierfür wird das WME verwendet. Es wird 1 ml WME pro 1 Million Zellen zugefügt.

2.6.1.5. Zellen zählen

Für die Zellzählung müssen 100 µl der Zellsuspension mit 700 µl Medium und 200 µl Trypanblue 0,4% versetzt und anschließend durchmischt werden. Davon werden nun 10 µl entnommen und in Zählkammern, worüber sich ein Deckglas befindet, pipettiert.

Durch die Färbung mit Trypanblau können tote von lebenden Zellen unterschieden werden. Lebende Zellen werden nicht gefärbt, da sie den Farbstoff wieder aus der Zelle hinaus transportieren können. Tote Zellen hingegen nehmen den Farbstoff auf und sind daher dunkelblau unter dem Mikroskop erkennbar. [20]

Es werden auf jeder Seite 3 Quadrate gezählt und der Durchschnitt gebildet, wobei die auf den Rändern liegenden Zellen pro Quadrat nur auf zwei Seiten ausgezählt werden.

Berechnungen:

$\text{Viability} = (\text{Lebende Zellen pro Quadrat} / \text{Gesamtzahl der Zellen}) * 100$

$\text{Zellen pro ml} = \text{lebende Zellen pro Quadrat} * \text{Dilutionsfaktor } 10 * 10000$

Die Viabilität sollte dabei mindestens 80% betragen. Dann kann eine genügend hohe Anzahl lebender Zellen für ein reproduzierbares Ergebnis gewährleistet werden.

männliche Hepatozyten

3450000 Zellen/ml

Viability=89.6%

weibliche Hepatozyten

2975000 Zellen/ml

Viability=95,97%

2.6.2. Probendurchführung

2.6.2.1. Erstellung einer Eichgerade

Für die Eichgerade werden die zuvor hergestellten Verdünnungen der Stammlösung von SL 11 verwendet. Dazu werden 500 µl der jeweiligen Konzentration mit 500 µl PBS in ein Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend am Vortex durchmischt. Somit liegt eine 1:1 Verdünnung vor und man erhält drei Lösungen mit 25, 50 und 100 µmol.

2.6.2.2. Metabolische Stabilität nach Invitrogen

Bei der Versuchsdurchführung wird nach den Angaben von Invitrogen – Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) gearbeitet.

Die Prüfung der metabolischen Stabilität wird mit einer 12-well-plate durchgeführt. Es werden 500 µl der jeweiligen Konzentration von SL 11 und 500 µl Zellsuspension laut Pipettierschema zugefügt.

Für die negativ Kontrolle mit toten Zellen müssen diese zuvor in ein Eppendorfgefäß übergeführt werden und 5 min in einem mindestens 50°C heißem Wasserbad erhitzt werden. Somit werden die Zellen abgetötet und die enzymatischen Reaktionen gestoppt. Danach werden die Zellen und 500 µl WME in den vorhergesehenen Bereich pipettiert. Für die negativ Kontrolle mit lebenden Zellen werden 500 µl der Zellsuspension und 500 µl WME verwendet.

Es wurde nach folgendem Pipettierschema gearbeitet:

Tab.8: Pipettierschema für metabolische Stabilität

Hep + SL11 50 µmol 25 µmol*	Hep + SL11 50 µmol 25 µmol*		Hep + Tes 100 µmol 50 µmol*
Hep + SL11 100 µmol 50 µmol*	Hep + SL11 100 µmol 50 µmol*		Hep + Tes 200 µmol 100 µmol*
Hep + SL11 200 µmol 100 µmol*	Hep + SL11 200 µmol 100 µmol*	neg. Kontrolle lebend	neg. Kontrolle tot

* Die Hepatozytensuspension (=Hep) und die jeweilige Konzentration der gelösten Substanz (=SL 11) werden in einem Verhältnis von 1:1 zugegeben. Wodurch man davon ausgehen kann, dass die Substanz wiederum dementsprechend verdünnt wird.

Zusätzlich werden auch zwei Konzentrationen Testosteron (=Tes) mit den Hepatozyten versetzt, bei welchen dieselbe Verdünnung vorliegt.

2.6.2.3. Leerwerte

Nach demselben Pipettierschema werden auch Leerwerteproben durchgeführt. Dies bedeutet, dass anstelle der Hepatozyten 500 µl WME zugegeben werden. Somit kann der Abbau der Substanz auch ohne Zellen beurteilt werden. Daraus ergibt sich eine gewisse Instabilität von SL 11.

2.6.2.4. Probenentnahme und Proteinfällung

Zwischen den Abnahmezeitpunkten wird die Platte in einen Inkubator, der auf 37°C temperiert ist, gestellt. Dies ist wesentlich um für die Zellen Körpertemperatur zu simulieren. Vor jeder Probenentnahme muss die Platte gut geschwenkt werden, da sich die Hepatozyten unten absetzen, zudem erfolgt dadurch eine gute Durchmischung.

Die Probenentnahme wird zu folgenden Zeiten durchgeführt:

0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min und teilweise 24 h

Zu den jeweiligen Zeitpunkten werden aus jedem well 80 µl in ein Eppendorfgefäß pipettiert, dabei wird die Pipettenspitze im Gefäß abgeworfen. Nun kann man die Arbeit außerhalb der sterilen Werkbank weiterführen, da die Zellen anschließend getötet werden. In jedes Eppendorfgefäß werden 80 µl ACN zugefügt um die Reaktion zu stoppen.

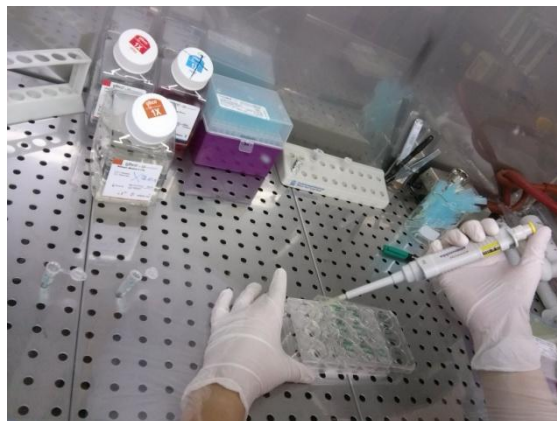


Abb.15: Probenentnahme aus 12-well-plate

2.6.2.5. Zentrifugation und Befüllung der HPLC Vials

Die Proben werden nun bei 12000 U/min für 5 min zentrifugiert. Wie bereits beim Esterasemodell erwähnt, wird auch hier der dadurch entstehende klare Überstand entnommen und in Mikroeinsätze pipettiert. Diese werden wieder in HPLC Vials übergeführt und verschlossen.

2.7. Analyseverfahren HPLC



Abb.16: HPLC 4 System: VWR Hitachi

Die Probenanalyse erfolgt mit Hilfe der High Performance Liquid Chromatographie. Durch die entstehenden Peaks können qualitative wie auch quantitative Aussagen getroffen werden. Dabei ist die Elutionszeit ein Charakteristikum für jede Substanz. Die Fläche und Höhe der Peaks spiegelt die Menge der jeweiligen Substanz wieder. Bei der verwendeten Probenanalyse handelt es sich um eine Umkehrphasen-Chromatographie. Dies bedeutet, dass mit einer apolaren stationären und mit einer polaren mobilen Phase gearbeitet wird. Somit werden apolare Substanzen später eluiert als polare. Für die Analyse der Proben wird eine Gradientenelution durchgeführt. Somit ändert sich die Zusammensetzung der mobilen Phase mit der Zeit. Dadurch verändert sich die Polarität des Eluenten und damit die Wechselwirkungen zwischen stationärer und mobiler Phase. [21] [22]

Tab.9: Parameter der HPLC 4

HPLC-Anlage	Merck VWR HITACHI Chromaster
Vorsäule	Nuklesoil LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, LiChroCART Merck Hitachi
Trennsäule	Zorbax Eclipse XDB-C8, 250 x 4,6 mm ID 5 µm, Agilent Technologies
Autosampler	5210, Temperatur 16°C
Injektionsvolumen	40 µl
Colum Oven	5310, Temperatur 36°C
Pumpe	5110
Druck	28 bar
UV Detektor	5410
Wellenlänge	235/270 nm
Analysezeit	42/45 min
Flussrate	0,5 ml/min
PC	HP Compaq LA1951g

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Auswertung

3.1.1. Allgemeine Erklärungen Michaelis-Menten-Kinetik

Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Kinetik kann V_{max} und K_m ermittelt werden. Hierfür wurde ein Versuch mit 5 Units Carboxylesterase sowie ein Versuch mit 1 Unit Enzym durchgeführt. Wobei jeder Ansatz bei zwei Wellenlängen detektiert wurde. Innerhalb eines Versuchs wird dieselbe Enzymkonzentration beibehalten während die Substratkonzentration immer weiter erhöht wird. Für die Berechnung der Konzentrationen des Metaboliten ist eine Eichgerade notwendig.

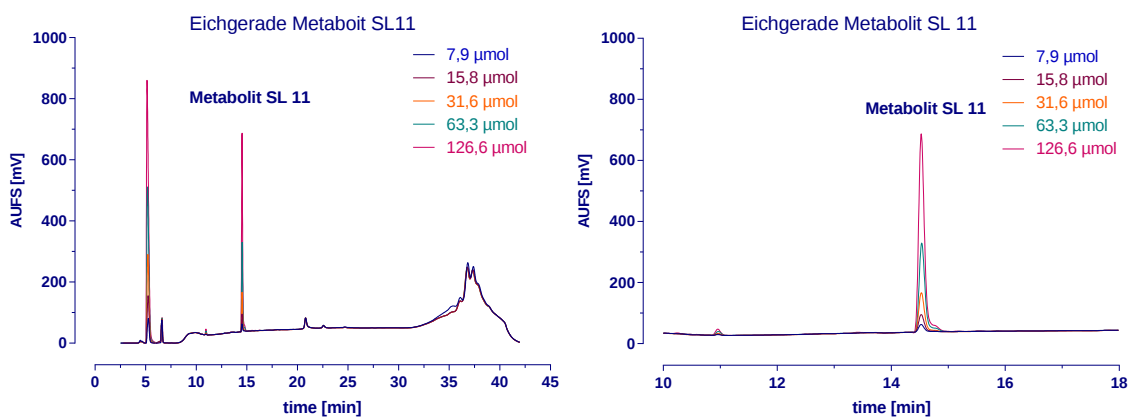


Abb.17: Chromatogramme der Eichgerade von SL 11

Die Analysezeit beträgt bei diesen Versuchen 42/45 min. Allerdings wird im Folgenden auf die Darstellung des gesamten Chromatogramms verzichtet, um eine bessere Veranschaulichung der wesentlichen Peaks zu ermöglichen.

Für die Erstellung der Eichgerade werden die eingesetzten Konzentrationen gegen die Peakflächen aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt.

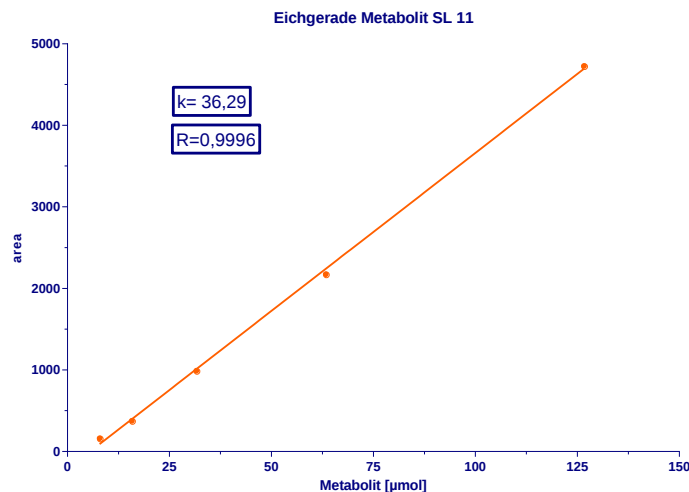


Abb.18: Eichgerade SL 11

Anschließend kann die Steigung (=k) der Gerade ermittelt werden.

Mit Hilfe der Geradengleichung können die μmol des Metaboliten berechnet werden. Für y wird die Peakfläche des Metaboliten eingesetzt und x bezieht sich auf die zu ermittelnden μmol , d ist dabei Null.

$$\text{area} = k \cdot \mu\text{mol} + 0$$

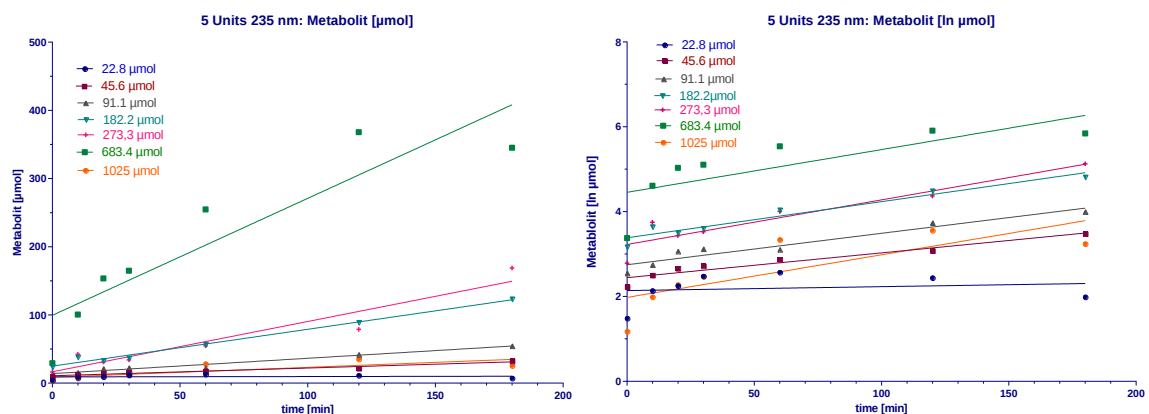
$$\mu\text{mol} = \text{area} / k$$

Die daraus errechneten Konzentrationen werden anschließend gegen die Zeit aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Hieraus sollte ein „Fächer“ resultieren, der die Geraden zu den unterschiedlichen Konzentrationen zeigt. Für die weitere Berechnung werden von den ermittelten μmol die Logarithmen und anschließend wieder eine lineare Regression berechnet. Daraus ergeben sich nun die verschiedenen k, die für die Erstellung der Michaelis-Menten-Kinetik notwendig sind. Zum Schluss werden die eingesetzten Substratkonzentrationen in μmol gegen die unterschiedlichen k-Werte aufgetragen und anschließend der Michaelis-Menten-Graph ermittelt. (siehe Ergebnisteil S 30, 31, 35, 36)

3.1.2. Erstellung der Michaelis-Menten-Kinetik

Die folgenden Graphen zeigen die Geraden der errechneten Konzentrationen und den damit resultierenden Fächer. Weiters wird die lineare Regression der Logarithmen dargestellt, aus welchen die Steigung für die Michaelis-Menten- Kinetik ermittelt wird.

5 Units



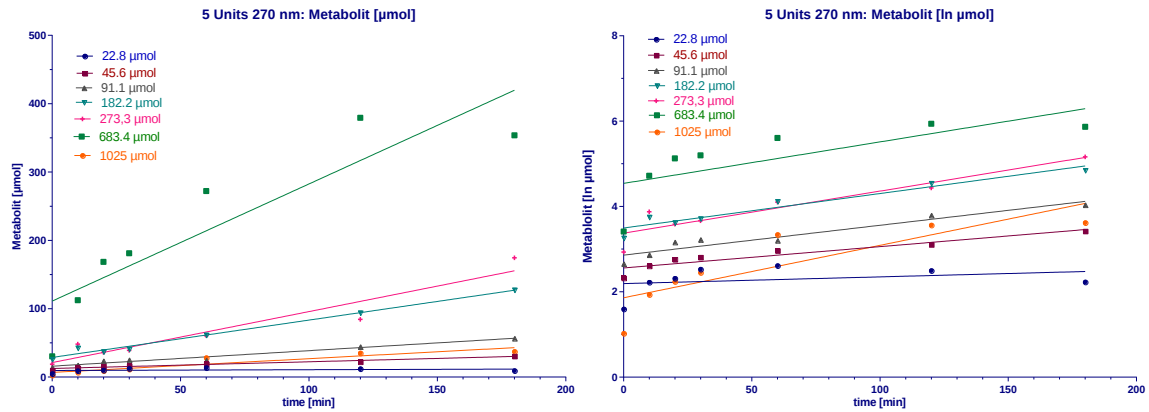


Abb.19: Lineare Regression der errechneten Konzentrationen und Logarithmen, 5 Units 235/270 nm

1 Unit

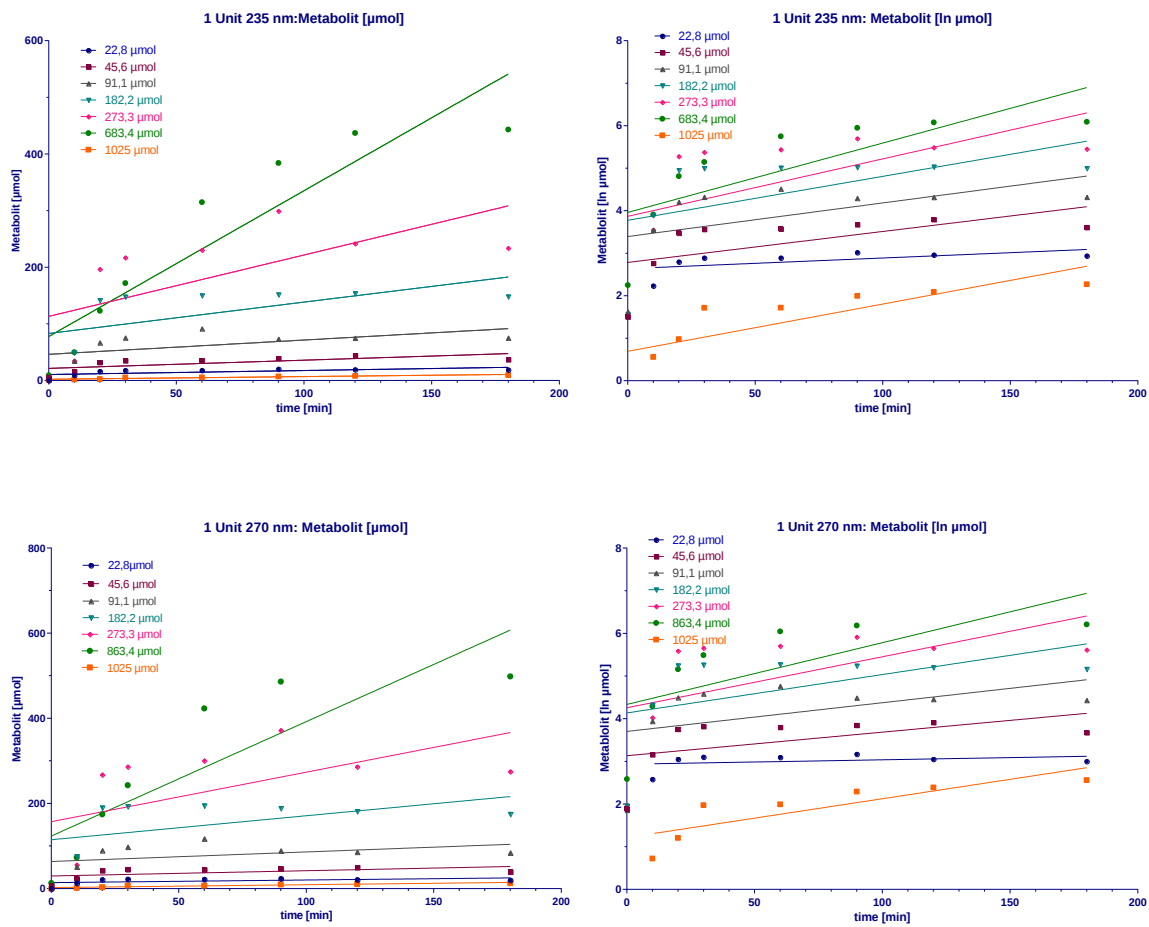


Abb.20: Lineare Regression der errechneten Konzentrationen und Logarithmen, 1 Unit 235/270 nm

3.1.3. Allgemeine Berechnungen der Hepatozytenversuche

Im Zuge der Versuchsreihe mit den Hepatozyten wurden auch Leerwertproben durchgeführt und 100% Werte ermittelt. Dadurch können die unterschiedlichen Stabilitäten bzw. Instabilitäten sowie die metabolische Umsetzung berechnet werden. (berechnete Werte siehe Ergebnisteil S38 ff.)

In jeder Konzentration von SL 11 wird mit einem Doppelansatz gearbeitet. Daher werden für die Berechnungen die Mittelwerte herangezogen.

Substanzinstabilität:

Substanzinstabilität = Peakfläche der Eichgerade – Peakfläche des Leerwerts

Danach werden mit Hilfe einer Schlussrechnung die Prozente errechnet, wobei die Peakflächen der Eichgerade die 100% Werte darstellen.

Metabolische Stabilität

Diese bezieht sich auf die Menge von SL 11, welche nach der Zugabe der Hepatozyten noch vorhanden also stabil ist.

Wiederum kann mit einer Schlussrechnung die metabolische Stabilität prozentuell ermittelt werden, wobei auch hier die Peakflächen der Eichgerade als 100%-Werte angenommen werden.

Metabolische Umsetzung

Metabolische Umsetzung = Substanzstabilität – metabolische Stabilität
oder

Metabolische Umsetzung = metabolische Instabilität – Substanzinstabilität

Diese bezieht sich nun auf die Menge von SL 11, die unter der Berücksichtigung der Substanzinstabilität, enzymatisch umgesetzt wird.

3.2. Ergebnisse Esterase

3.2.1. Metabolisierung SL 22

Die Versuche mit porciner Carboxylesterase wurden mit SL 22 durchgeführt. Bereits beim ersten Versuch zeigte sich, dass SL 22 zu SL 11 metabolisiert wird.

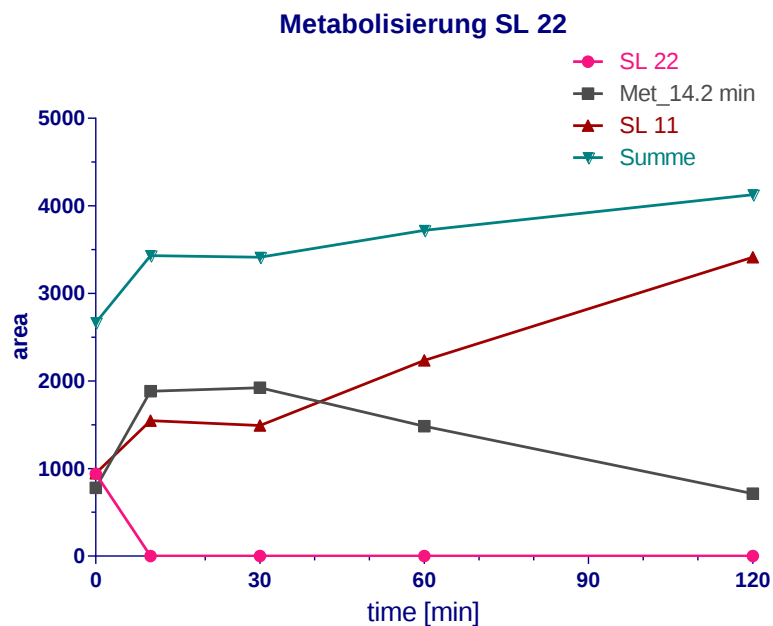
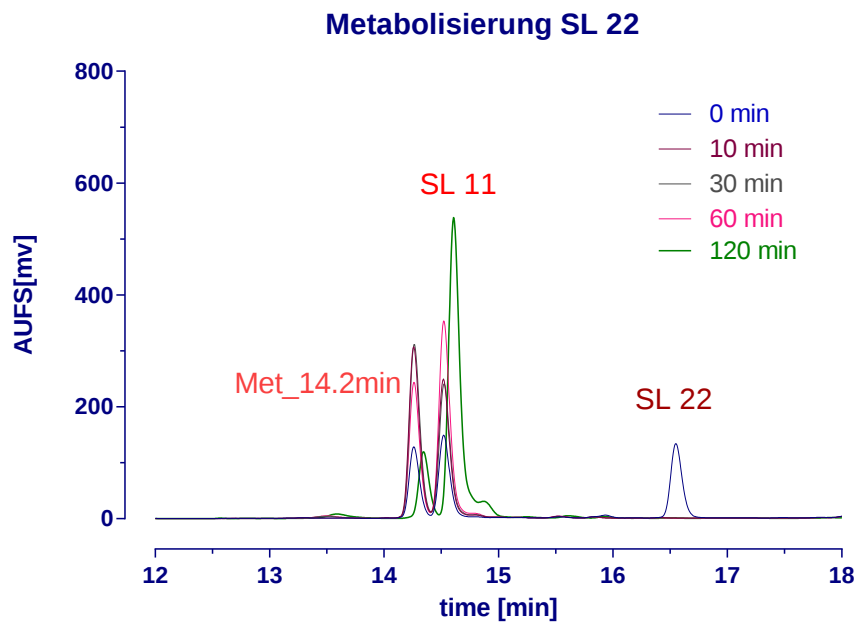


Abb.21: Darstellungen der Metabolisierung von SL 22

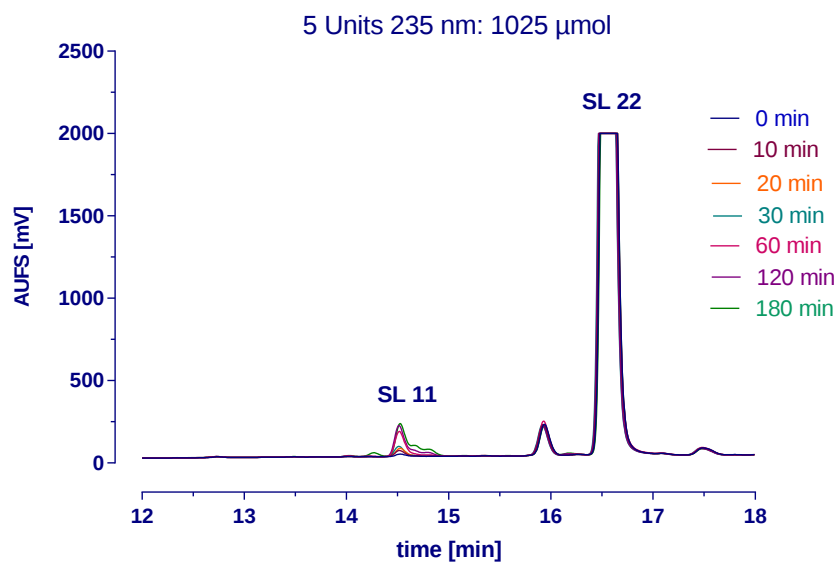
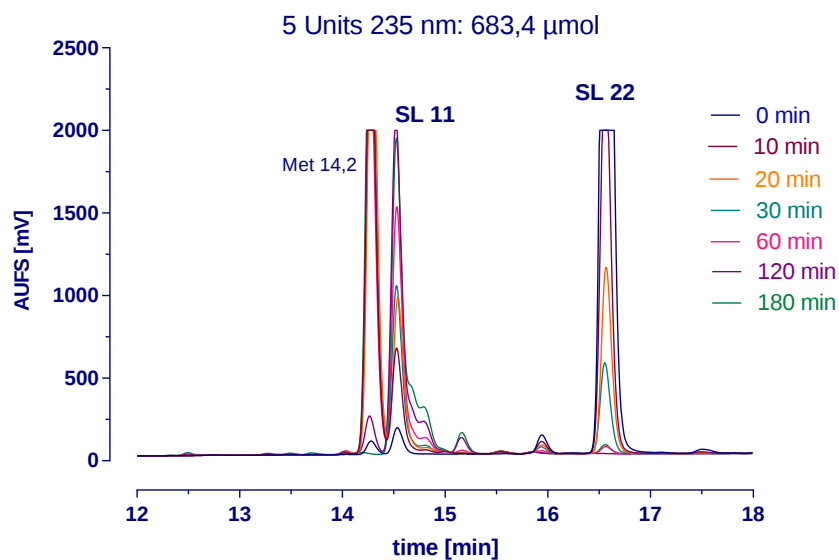
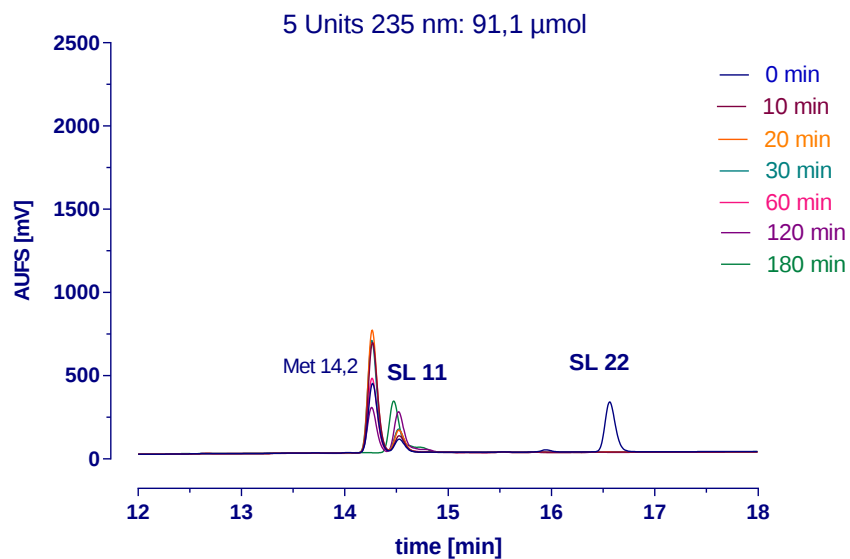


Abb.23: Chromatogramme des 5 Units Versuchs bei 235 nm bei drei Konzentrationen

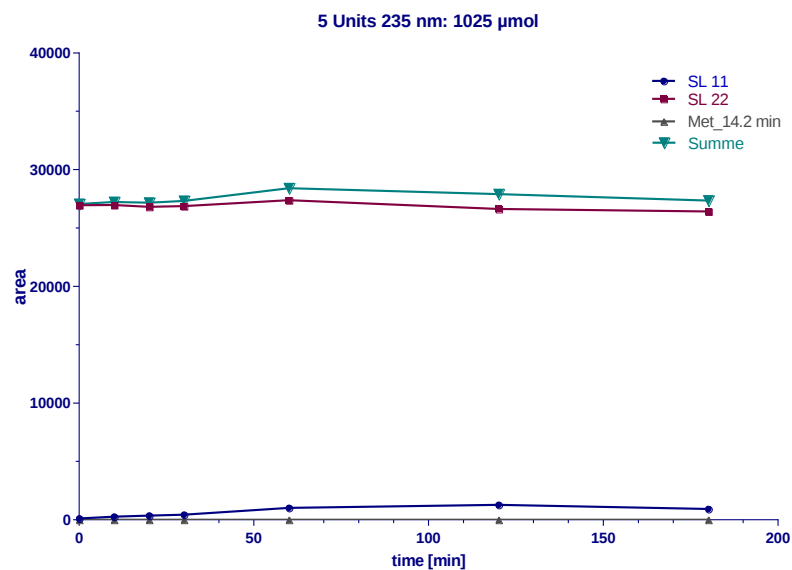
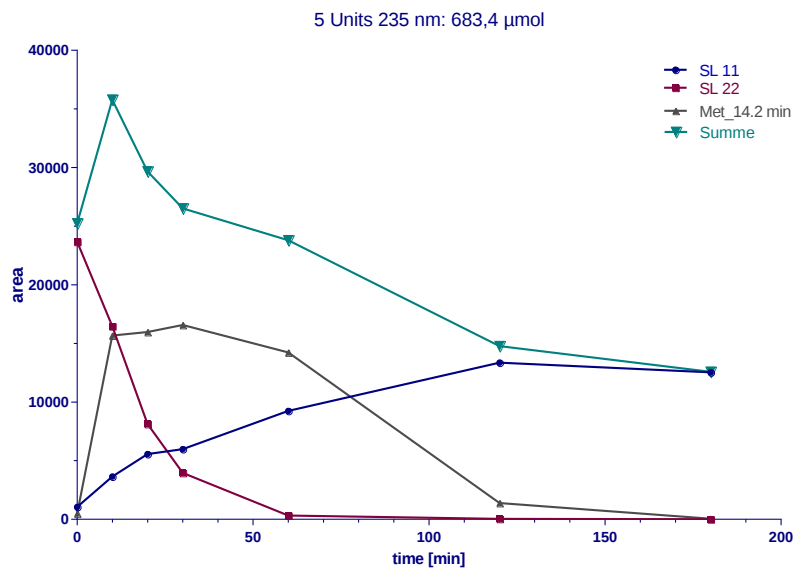
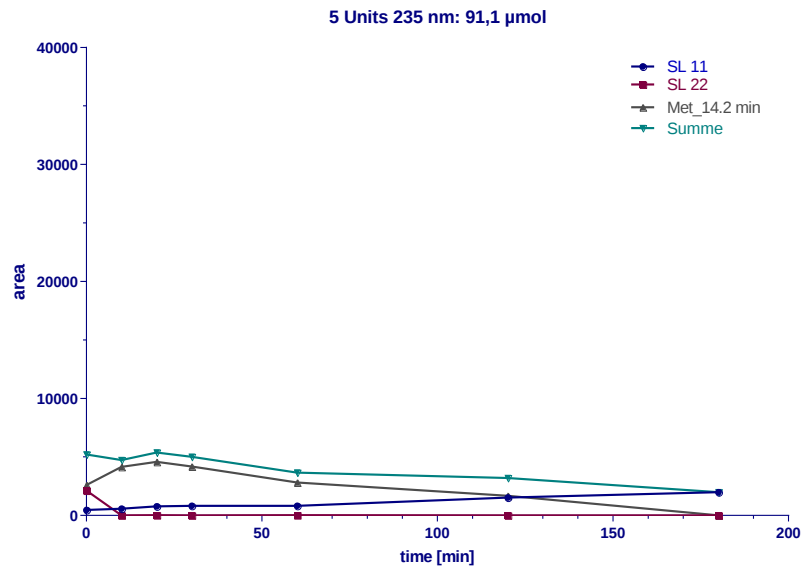


Abb.24: Graphische Darstellungen des 5 Units Versuches bei 235 nm bei drei Konzentrationen

Anhand dieser Abbildungen zeigt sich, dass bei einer niedrigen Konzentration von 91,1 μmol SL 22 bereits nach 10 min abgebaut und immer mehr SL 11 gebildet wird. Es handelt sich um eine Reaktion, die nach erster Ordnung abläuft. Betrachtet man nun die Darstellungen bei 683,4 μmol , wird eine beginnende Sättigung ersichtlich. SL 22 fällt langsamer ab, es wird also nicht mehr so schnell umgesetzt. Dadurch steigt das Produkt SL 11 mit der Zeit auch nur langsam an. Bei dieser Konzentration findet bereits eine Konkurrenz der Substratmoleküle um freie Enzymmoleküle statt. Die Konzentration von 1025 μmol führt zu einer Enzymsättigung. SL 22 wird kaum enzymatisch umgesetzt, wodurch SL 11 auch nur in sehr geringen Mengen gebildet wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit kann also nicht weiter erhöht werden, somit liegt eine Reaktion nullter Ordnung vor. Die Probendurchführung mit steigenden Substratkonzentrationen zeigt ein biphasisches System auf, wodurch eine Michaelis-Menten-Kinetik berechnet werden kann.

Detektion bei 235 nm: Michaelis-Menten-Graph

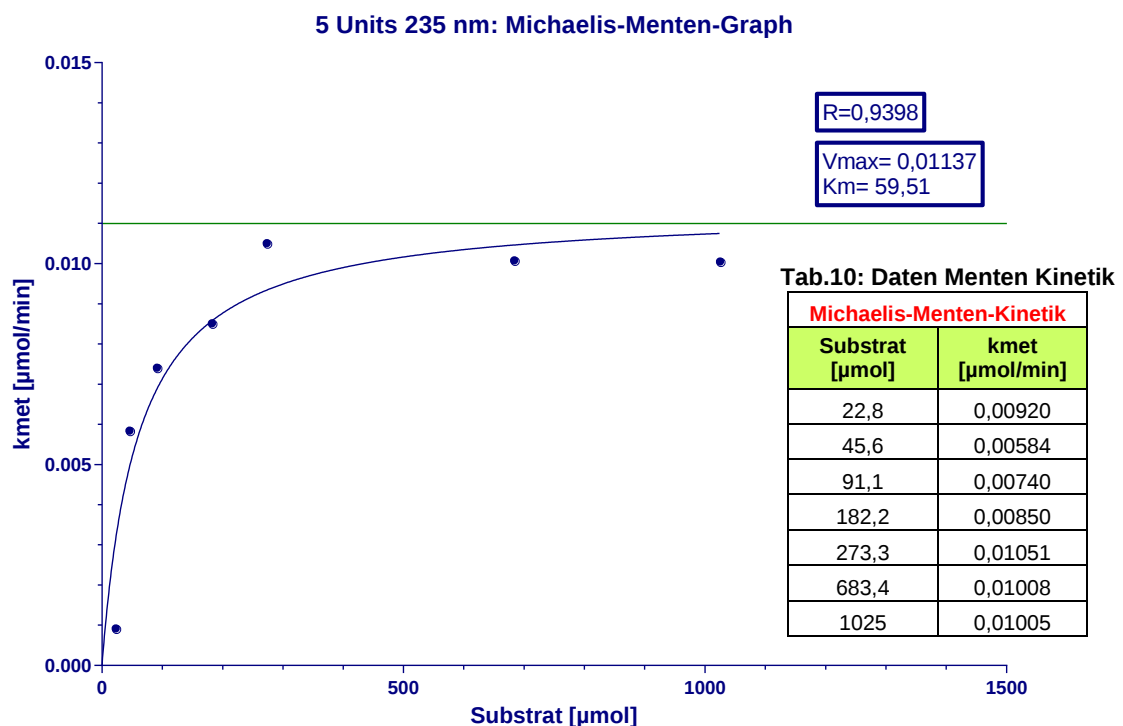


Abb.25: Michaelis-Menten-Graph 5 Units 235 nm

Tab.11: Best fit values Michaelis-Menten-Kinetik 5 Units 235 nm

Michaelis-Menten-Kinetik		
Best-fit values	Parameter	Dimension
Vmax	0,01137	$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg prot}$
Km	59,51	$\mu\text{mol}/\text{min}$
Std. Error		
Vmax	0,001037	$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg prot}$
Km	21,9	$\mu\text{mol}/\text{min}$
95% Confidence Intervals		
Vmax	0,008709 to 0,01404	$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg prot}$
Km	3,206 to 115,8	$\mu\text{mol}/\text{min}$
Goodness of Fit		
R square	0,8598	
R	0,9273	
Number of points		
Analyzed	7	

Detektion bei 270 nm: Michaelis-Menten-Graph

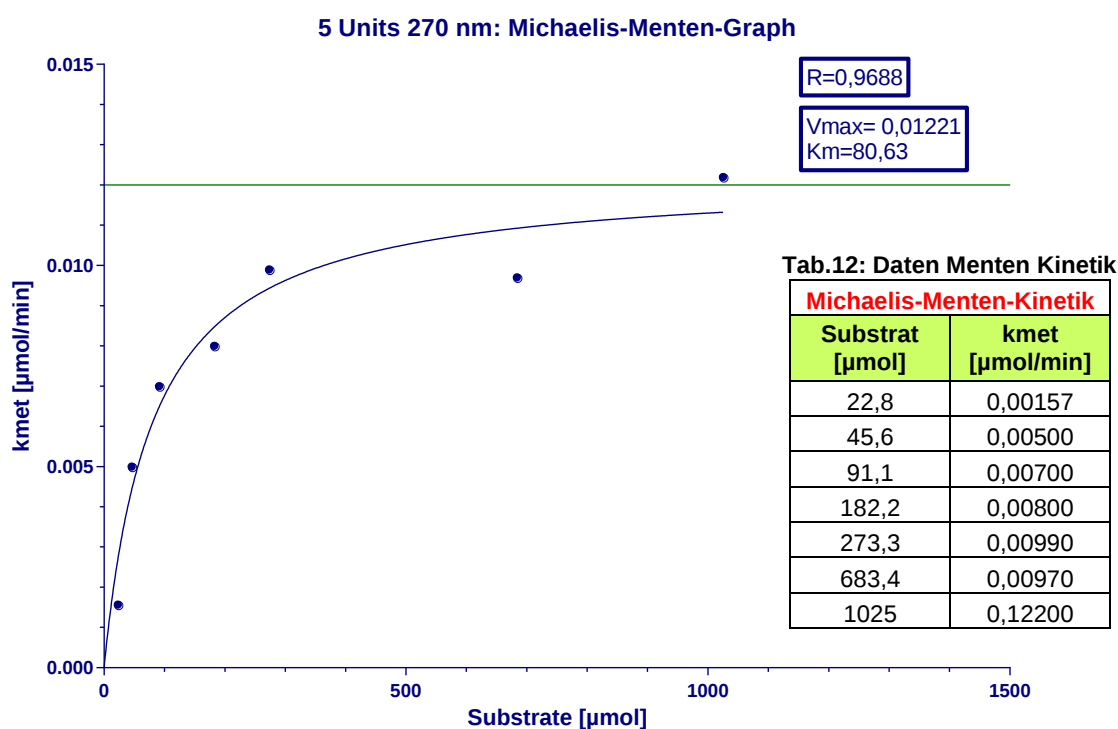


Abb.26: Michaelis-Menten-Graph 5 Units 270 nm

Tab.13: Best fit values Michaelis-Menten-Kinetik 5 Units 270 nm

Michaelis-Menten-Kinetik		
Best-fit values	Parameter	Dimension
Vmax	0,01221	$\mu\text{mol/min*mg prot}$
Km	80,63	$\mu\text{mol/min}$
Std. Error		
Vmax	0,0008729	$\mu\text{mol/min*mg prot}$
Km	21,28	$\mu\text{mol/min}$
95% Confidence Intervals		
Vmax	0,009969 to 0,01446	$\mu\text{mol/min*mg prot}$
Km	25,93 to 135,3	$\mu\text{mol/min}$
Goodness of Fit		
R square	0,9385	
R	0,9688	
Number of points		
Analyzed	7	

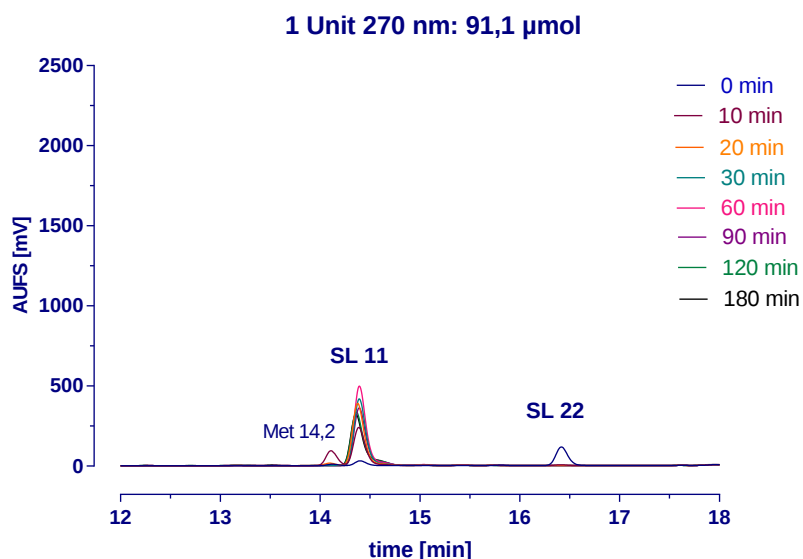
Die Michaeliskonstante bezieht sich auf jene Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit vorliegt. [18]

Der Mittelwert der beiden Detektionen ergibt ein Km von 70,07 $\mu\text{mol/min}$. Die halbmaximale Geschwindigkeit bei einer Enzymkonzentration von 5 Units liegt daher bei 70,07 $\mu\text{mol/min}$. Es zeigen sich bei beiden Detektionen ähnlichen Ergebnisse.

Wobei erwähnt werden muss, dass die Messung bei 270 nm wahrscheinlich genauere Ergebnisse liefert, da es sich dabei um die, mit einem UV-Spektrum ermittelte, Wellenlänge von SL 11 handelt.

3.2.2.2. 1 Unit

Der Versuch mit nur 1 Unit Carboxylesterase wurde mit denselben molaren Konzentrationen durchgeführt. Dementsprechend konnte auch hier eine Sättigung erzielt werden.



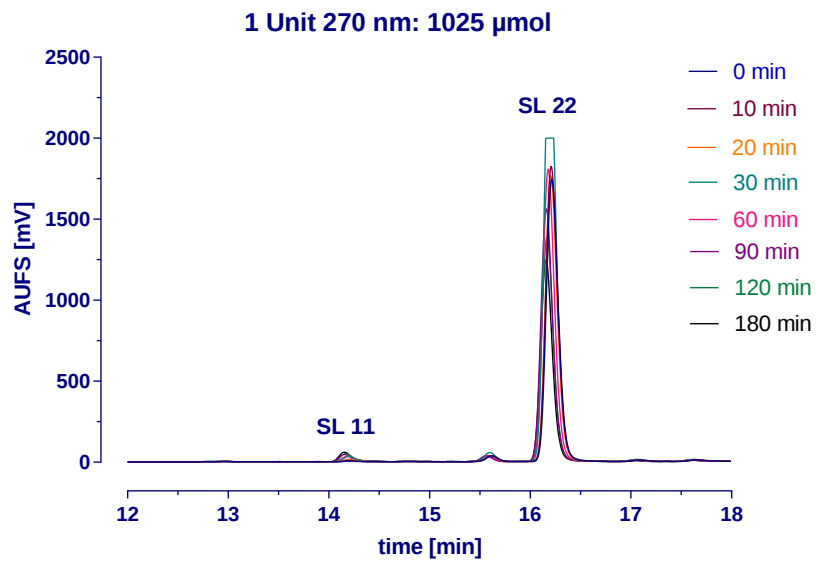
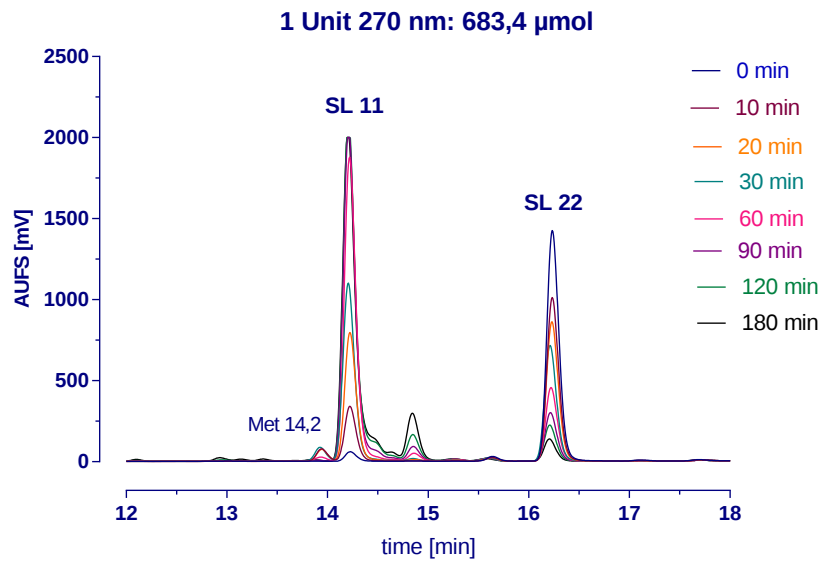


Abb.27: Chromatogramme des 1 Unit Versuches bei 270 nm bei drei Konzentrationen

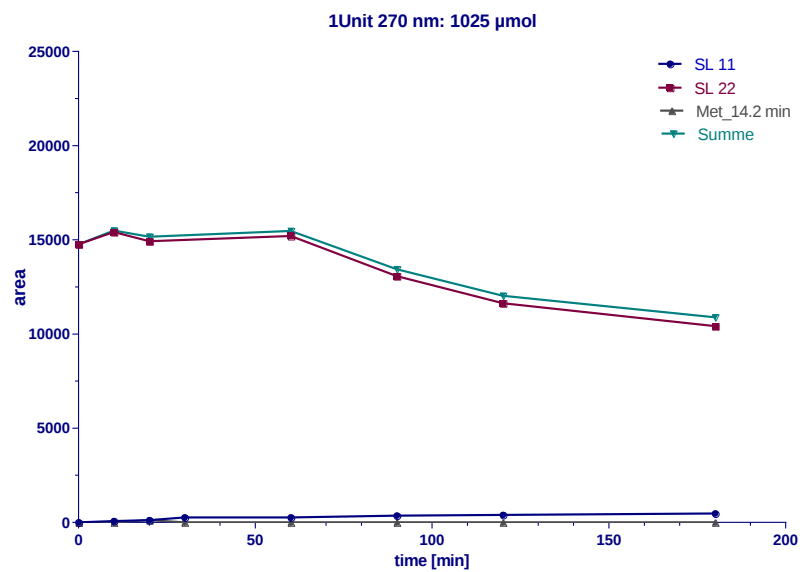
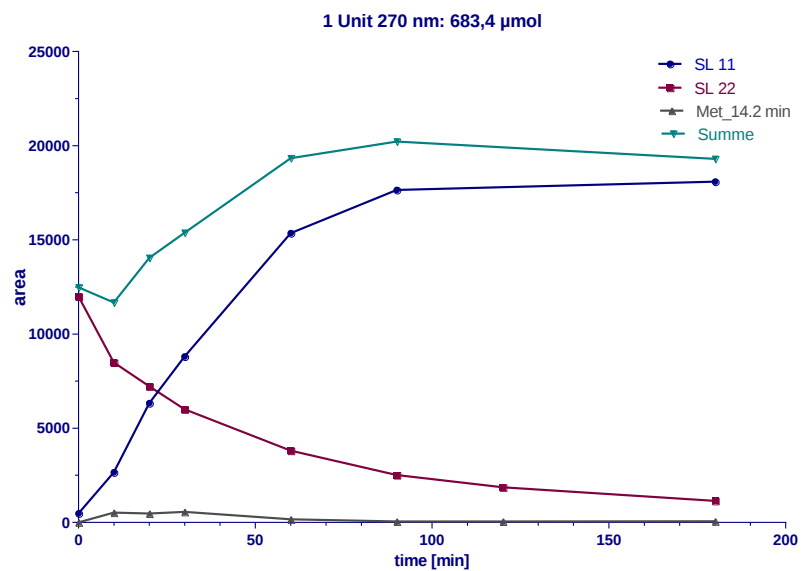
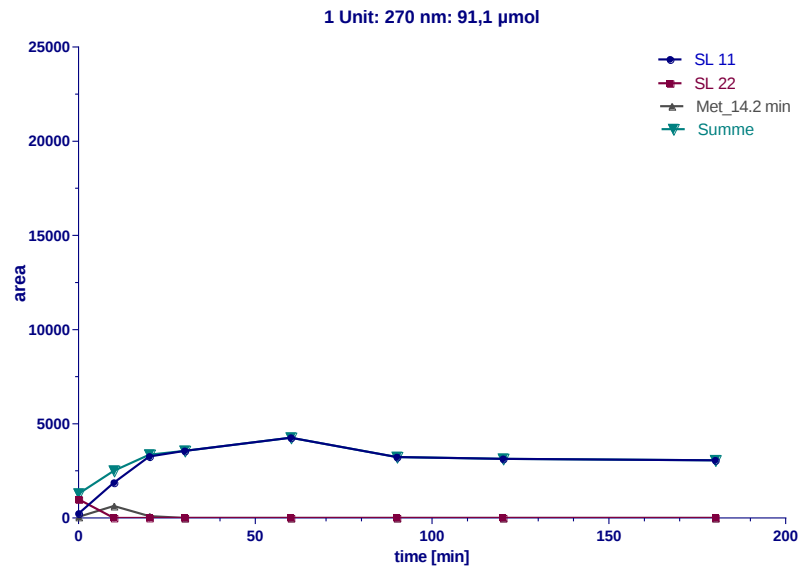


Abb.28: Graphische Darstellungen des 1 Unit Versuchs bei 270 nm bei drei Konzentrationen

Auch bei einer geringen Enzymkonzentration von nur 1 Unit, wird die Sättigung erst bei hohen molaren Konzentrationen erreicht. Es zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei dem Versuch, der mit 5 Units Carboxylesterase durchgeführt wurde. Eine beginnende Enzymsättigung wird wieder bei 683,4 μmol ersichtlich indem deutlich weniger SL 22 umgesetzt wird. Bei der höchsten Konzentration von 1025 μmol findet kaum eine metabolische Umsetzung statt. Somit liegt wiederum ein biphasisches System vor.

Detektion bei 235 nm: Michaelis-Menten-Graph

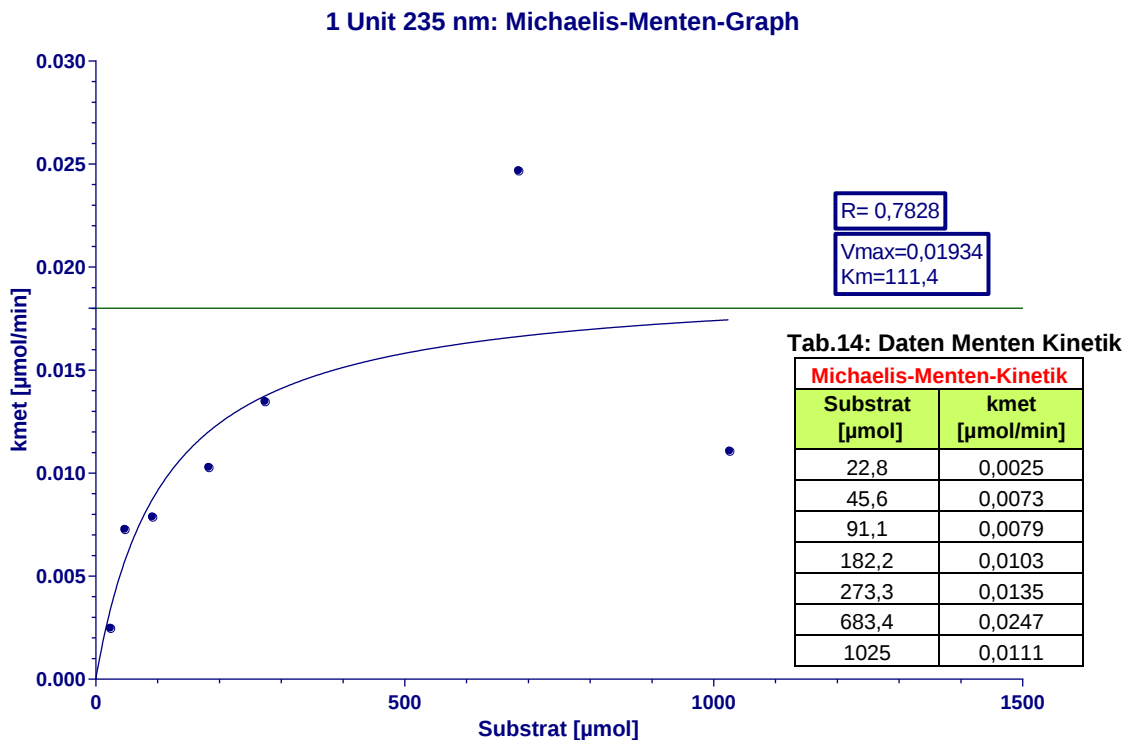


Abb.29: Michaelis-Menten-Graph 1 Unit 235 nm

Tab.15: Best fit values der Michaelis-Menten-Kinetik 1 Unit 235 nm

Michaelis-Menten-Kinetik		
Best-fit values	Parameter	Dimension
Vmax	0,01934	μmol/min*mg prot
Km	111,4	μmol/min
Std. Error		
Vmax	0,004962	μmol/min*mg prot
Km	96,12	μmol/min
95% Confidence Intervals		
Vmax	0,006580 to 0,03209	μmol/min*mg prot
Km	0,0 to 358,5	μmol/min
Goodness of Fit		
R square	0,6128	
R	0,7828	
Number of points		
Analyzed	7	

Detektion bei 270 nm: Michaelis-Menten-Graph

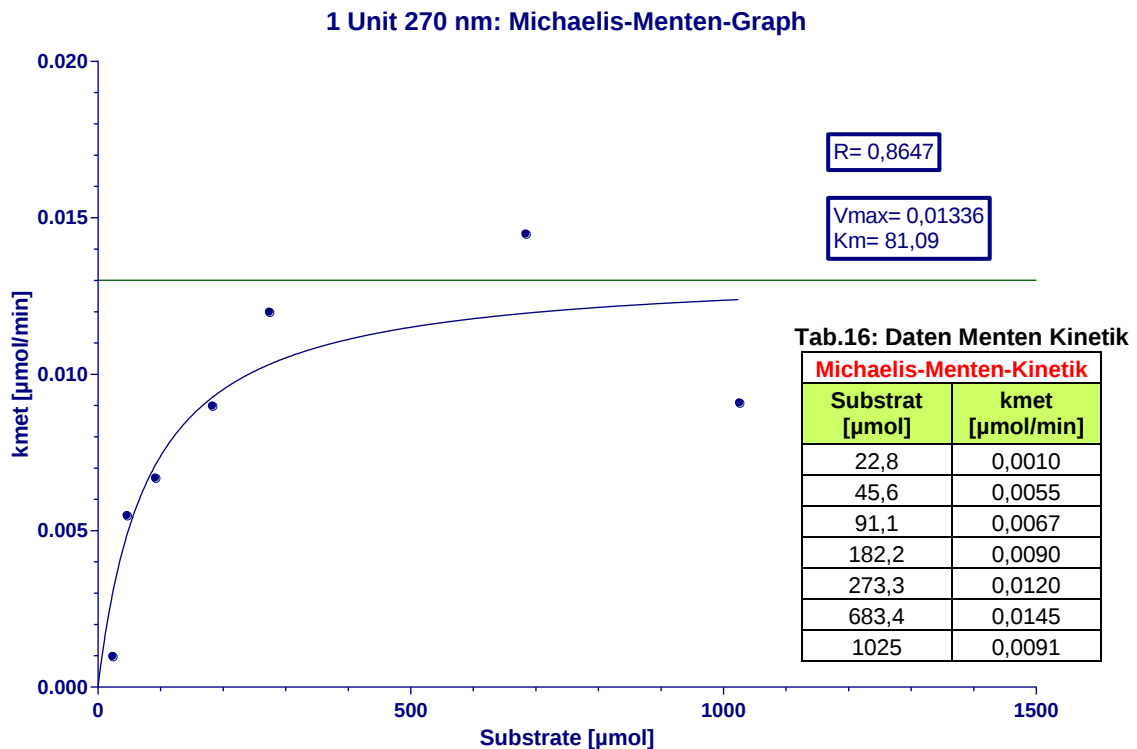


Abb.30: Michaelis-Menten-Graph 1 Unit 270 nm

Tab.17: Best fit values der Michaelis-Menten-Kinetik 1 Unit 270 nm

Michaelis-Menten-Kinetik		
Best-fit values	Parameter	Dimension
Vmax	0,01336	μmol/min*mg prot
Km	81,09	μmol/min
Std. Error		
Vmax	0,002026	μmol/min*mg prot
Km	45,32	μmol/min
95% Confidence Intervals		
Vmax	0,008156 to 0,01857	μmol/min*mg prot
Km	0,0 to 197,6	μmol/min
Goodness of Fit		
R square	0,7898	
R	0,8887	
Number of points		
Analyzed	7	

Wenn man den Mittelwert der beiden Detektionen bildet erhält man ein Km von 96,25 µmol/min. Die halbmaximale Geschwindigkeit bei einer Enzymkonzentration von 1 Unit liegt nun also bei 96,25 µmol/min.

Im vorliegenden Versuch ist die Enzymkonzentration auf ein Fünftel reduziert worden und dennoch finden sich ähnliche Ergebnisse bezüglich Vmax und Km.

Diese Ähnlichkeit beruht vor allem auf der Vermessung mit 270 nm. Hier erhält man bei 1 Unit ein K_m von 81,09 und bei 5 Units 80,63 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Die Sättigung verläuft daher bei hoher wie niedriger Enzymkonzentration annähernd gleich schnell mit einem V_{max} von 0,01221 bzw. 0,01336 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$.

Die Detektion bei 235 nm zeigt jedoch größere Unterschiede zwischen den beiden Enzymkonzentrationen auf. Bei 5 Units konnte ein K_m von 59,51 und bei 1 Unit von 111,4 $\mu\text{mol}/\text{min}$ berechnet werden. Dennoch sollte die Vermessung bei 270 nm etwas stärker gewichtet werden, da es sich hier wahrscheinlich um die genauere Detektionsmethode handelt. Auch durch die Berechnung der Mittelwerte der beiden Wellenlängen ist eine Ähnlichkeit erkennbar. Eine Enzymkonzentration von 5 Units weist ein K_m von 70,07 $\mu\text{mol}/\text{min}$ und 1 Unit von 96,25 $\mu\text{mol}/\text{min}$ auf.

3.2.2.3. Abbauprodukt bei 14,2 Minuten

Bezüglich der Bildung des möglichen Metaboliten mit einer Retentionszeit von 14,2 min zeigt sich allerdings, dass dieser vermehrt bei den 5 Units Versuch auftritt. Dies kann durch den direkten Vergleich der beiden Versuche gezeigt werden.

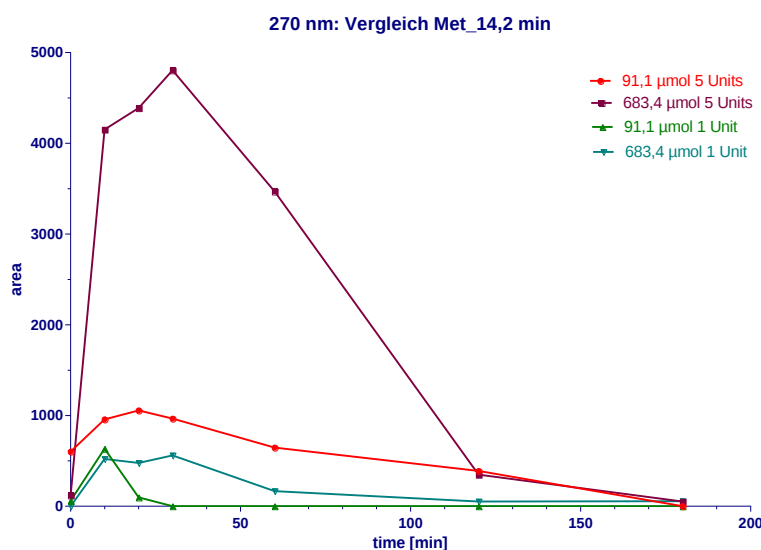


Abb.31: Vergleich der Verbindung mit RT 14,2 min bei 270 nm

Die graphische Darstellung verdeutlicht, dass bei einer Enzymkonzentration von 1 Unit der mögliche Metabolit, bei denselben Substratkonzentrationen, weniger stark ansteigt und rascher abfällt. Dies zeigt sich auch bei der Messung bei 235 nm. Somit könnte die Bildung dieser Verbindung von der Enzymkonzentration abhängig sein.

3.3. Ergebnisse Hepatozyten

Bei diesen Versuchen wurde mit SL 11 gearbeitet, dessen Phase I und II Metabolismus genauer untersucht werden soll.

3.3.1. Substanzinstabilität

Im Zuge der Versuchsreihe mit den Hepatozyten wurden auch Leerwertproben durchgeführt, bei welchen anstatt der Zellsuspension Medium zugefügt wurde. Daraus ergibt sich eine Instabilität von SL 11 unter den gegebenen Bedingungen.

Die Peakflächen, welche durch die Leerwerte ermittelt werden konnten, stellen nun jenen Substanzanteil dar, der stabil ist. Bezogen werden diese Werte auf die der Eichgerade, welche als 100%-Werte angenommen werden. Hierbei handelt es sich um Standards, die in denselben Konzentrationen und mit demselben Medium hergestellt wurden. Bei diesen erfolgte jedoch keine Behandlung in Wärme und auch der Lichteinfluss war wesentlich geringer.

Die Substanzinstabilität kann nun durch die Differenz zwischen 100%-Wert und Leerwert dargestellt werden.

Tab.18: Peakflächen der Eichgerade

area Eichgerade		
25 µmol	50 µmol	100 µmol
802,2	1745,5	3647,1

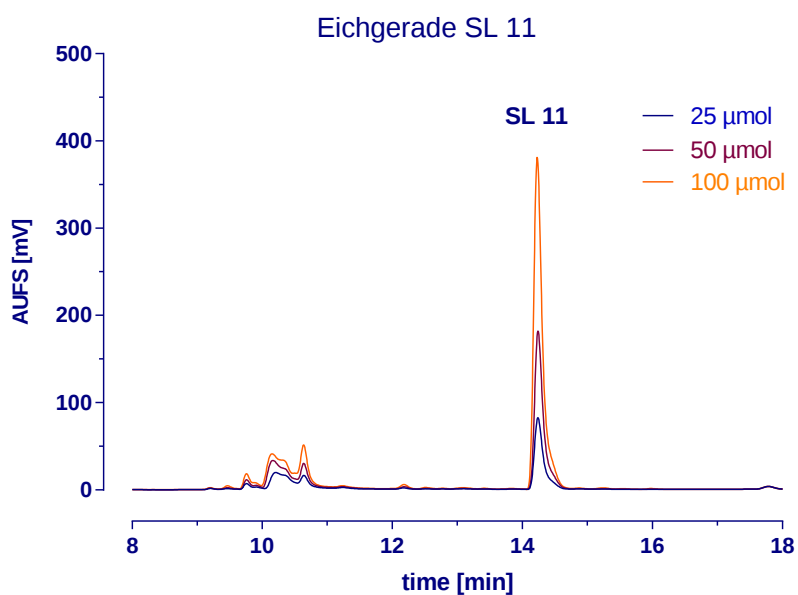


Abb.32: Chromatogramm der Eichgerade

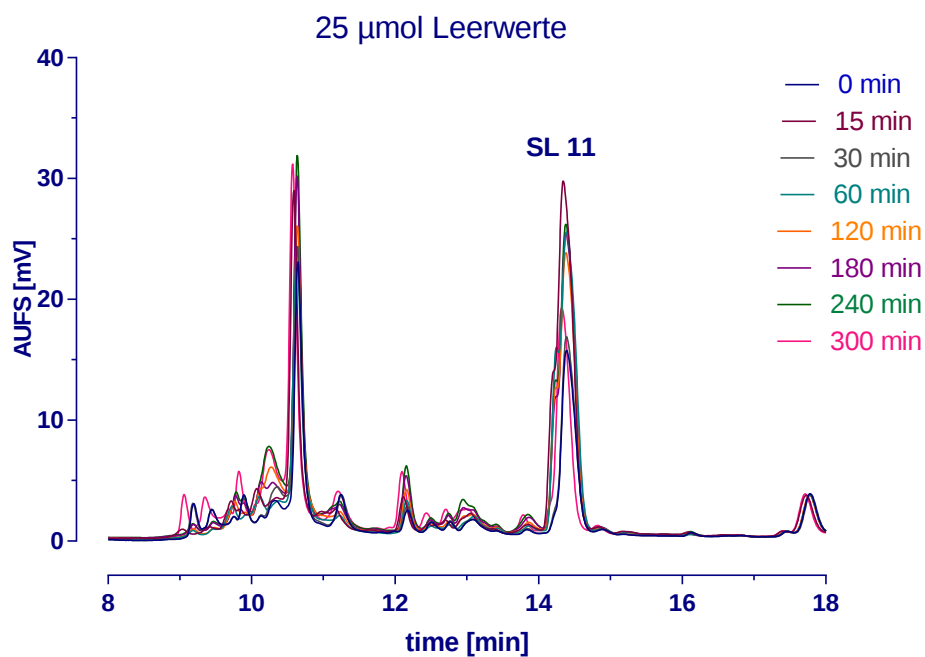


Abb.33: Chromatogramme der Leerwerte bei einer Konzentration von 25 µmol

Tab.19: Peakflächen von SL 11 der Leerwerte

Zeit [min]	area Leerwerte		
	25 µmol	50 µmol	100 µmol
0	438,6	781,4	1204,1
15	480,0	746,0	1529,6
30	446,3	792,1	1737,2
60	442,9	744,3	1445,0
120	417,3	708,7	1129,2
180	272,5	397,3	764,0
240	278,8	401,6	1029,5
300	311,1	382,4	931,7
1440	200,0	446,8	702,0

Tab.20: Substanzinstabilität von SL 11

Zeit [min]	Substanzinstabilität [%]		
	25 µmol	50 µmol	100 µmol
0	45,33	55,23	66,98
15	40,16	57,26	58,06
30	44,37	54,62	52,37
60	44,79	57,36	60,38
120	47,98	59,40	69,04
180	66,03	77,24	79,05
240	65,25	76,99	71,77
300	61,22	78,09	74,45
1440	75,07	74,40	80,75

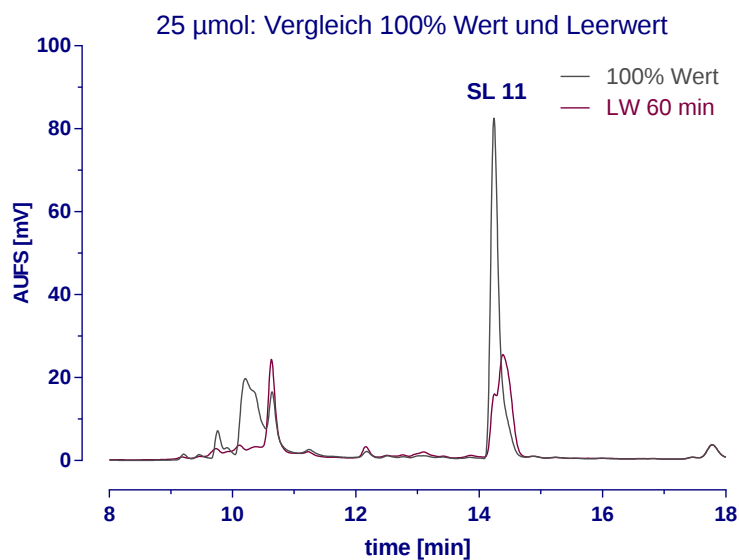


Abb.34: Vergleich von Eichgerade und Leerwert jeweils bei einer Konzentration von 25 µmol

Der Leerwertpeak ist nun deutlich kleiner als der Eichgeradenpeak, bei derselben Konzentration. Daher muss die Substanz unter den gegebenen Bedingungen instabil sein. Bekräftigt wird diese Aussage auch durch die deutliche Entfärbung der gelösten Substanz. Eine Lösung von SL 11 in DMSO 100% wird je nach Konzentration mittel- bis dunkelgelb, wobei die Substanz an sich bereits gelb ist. Nach längerem stehen lassen unter UV-Licht kommt es zur kompletten Entfärbung der Lösung, während ein Lichtschutz mit Hilfe von Alufolie die Farbe annähernd erhält.



Abb.35: Farbe mit und ohne Lichtschutz, ca. eine Stunde nach Herstellung der Lösung

Bei der Durchführung der Versuche wurde jedoch verstärkt auf den Lichtschutz geachtet, dennoch musste im Zuge der Probenvorbereitung und der Probenentnahme unter UV-Licht gearbeitet werden. Möglicherweise ist die Substanz instabil in der Wärme von 37° Grad, welche für die Inkubation benötigt wird. Ein weiterer Grund für die bestehende Instabilität könnte auch sein, dass die Substanz an sich chemisch instabil ist.

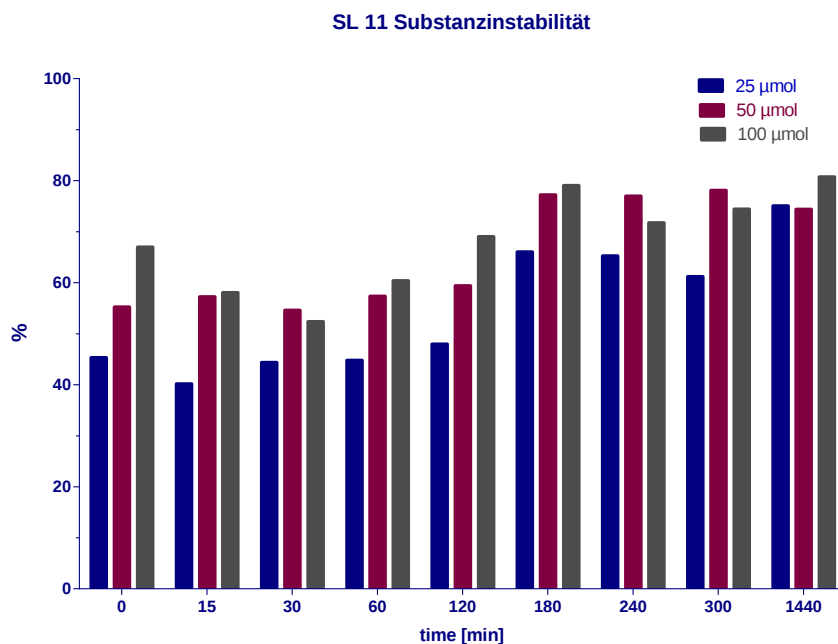


Abb.36: Instabilität von SL 11

Bereits beim ersten Abnahmezeitpunkt, welcher sofort nach der Zugabe der einzelnen Komponenten erfolgt, zeigt sich eine Instabilität. Hier weist die höchste Konzentration von

100 μmol die prozentuell größte Instabilität auf. Wobei zu späteren Abnahmezeitpunkten deutlich wird, dass sich die Werte zwischen 50 und 100 μmol annähern. Schon nach 60 min weist SL 11 in einer Konzentration von 50 μmol eine Instabilität von 57% und bei 100 μmol eine von 60% auf. Nach 24 h sind bereits 75-80% der Substanz bei allen Konzentrationen zerfallen.

3.3.2. Humane männliche Hepatozyten

Zusätzlich zu den Proben mit SL 11 wurden auch zwei molare Konzentrationen von Testosteron mit der Hepatozytensuspension versetzt. Dies dient zur Vergewisserung, dass die angegebene Arbeitsweise funktioniert und Testosteron auch tatsächlich metabolisiert wird. Zusätzlich wurden bei diesem Versuch die Leerwertproben durchgeführt, welche eine wichtige Grundlage für die Berechnung der unterschiedlichen Stabilitäten sowie der metabolischen Umsetzung darstellen.

Metabolische Stabilität Testosteron

Die metabolische Stabilität von Testosteron wird anhand der Konzentration von 50 μmol dargestellt.

Tab.21: Metabolische Stabilität Testosteron

Zeit [min]	Testosteron 50 μmol	
	area	%
0	143,9	98,23
15	104,2	71,13
30	86,2	58,84
60	86,3	58,91
120	29,8	20,34
180	0,0	0,00
240	0,0	0,00

Bei der Berechnung dient ein Testosteronstandard, welcher mit demselben Medium und denselben molaren Konzentration hergestellt wurde, als 100% Wert. Die Peakfläche beträgt 146,5.

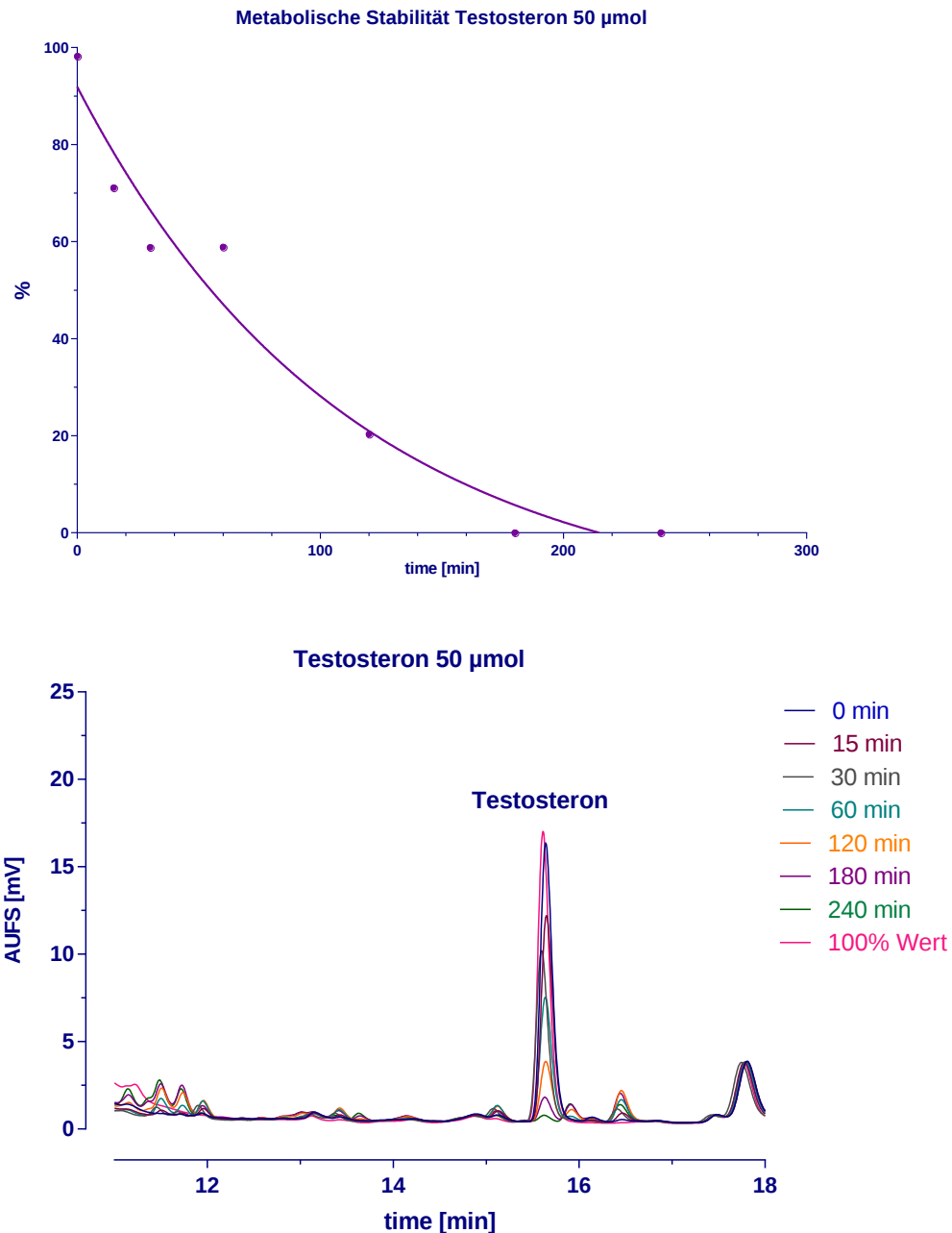


Abb.37: Enzymatischer Abbau von Testosteron in humanen männlichen Hepatozyten

Somit kann bewiesen werden, dass das durchgeführte Zellsystem funktioniert. Der Testosteronpeak wird mit der Zeit immer kleiner und bezüglich der metabolischen Stabilität findet sich eine abfallende Kurve. Also wird Testosteron nach der Zeit immer weiter enzymatisch abgebaut. Bereits nach drei Stunden wurde Testosteron vollständig durch die Hepatozyten umgesetzt. Dieses Ergebnis stimmt auch mit der bereits vorhandenen Literatur überein.

Überblick Substanzinstabilität, metabolische Stabilität und metabolische Umsetzung

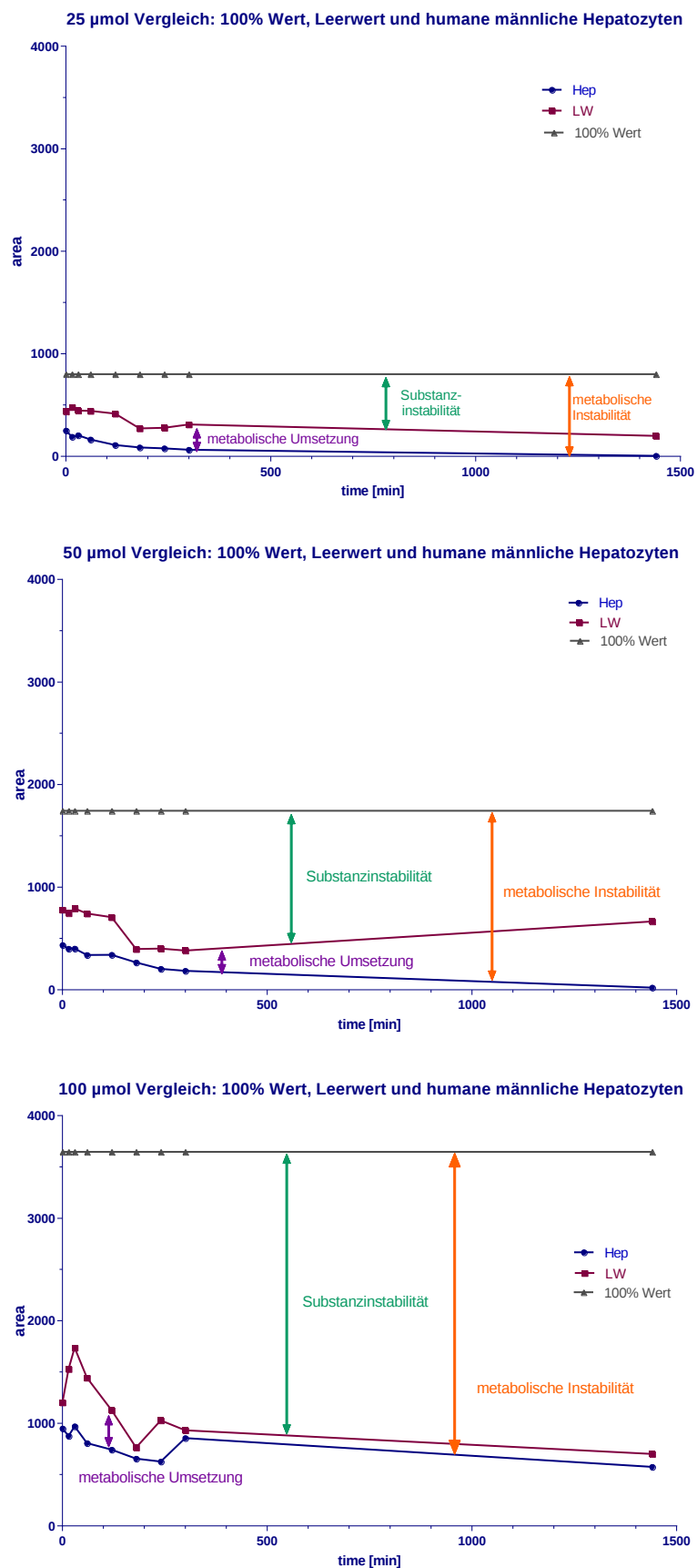


Abb.38: Vergleich SL 11: Eichgerade, Leerwerte und männlichen Hepatozyten in drei Konzentrationen

SL 11 weist eine große Instabilität auf, dennoch erfolgt eine weitere Substanzabnahme durch die Zugabe der Hepatozyten. Das kann bei allen molaren Konzentrationen beobachtet werden. Die metabolische Stabilität bezieht sich auf jene Menge der Substanz, die trotz Hepatozytenzugabe noch vorhanden ist. Die Berechnung erfolgt im Bezug auf die Eichgerade, welche als 100%-Wert dient. Dies wird hier durch die blaue Linie dargestellt.

Die metabolische Umsetzung bezieht sich auf die Differenz zwischen den Peakflächen der Leerwerte und der Hepatozyten. Das ist jener Teil der, unter Berücksichtigung der Substanzinstabilität, tatsächlich mit Hilfe von Enzymen abgebaut wird.

Metabolische Stabilität

Tab.22: Peakflächen von SL 11

Zeit [min]	area Hepatozyten		
	25 µmol	50 µmol	100 µmol
0	251,4	436,3	950,5
15	190,9	400,9	877,9
30	205,1	401,2	971,6
60	163,8	339,5	808,2
120	111,0	340,9	743,9
180	87,3	267,1	655,7
240	78,7	204,6	627,2
300	65,1	185,6	856,8
1440	5,0	21,9	576,2

Tab.23: Metabolische Stabilität von SL 11

Zeit [min]	Metabolische Stabilität [%]		
	25 µmol	50 µmol	100 µmol
0	31,34	25,00	26,06
15	23,80	22,97	24,07
30	25,57	22,98	26,64
60	20,42	19,45	22,16
120	13,84	19,53	20,40
180	10,88	15,30	17,98
240	9,81	11,72	17,20
300	8,12	10,63	23,49
1440	0,62	1,25	15,80

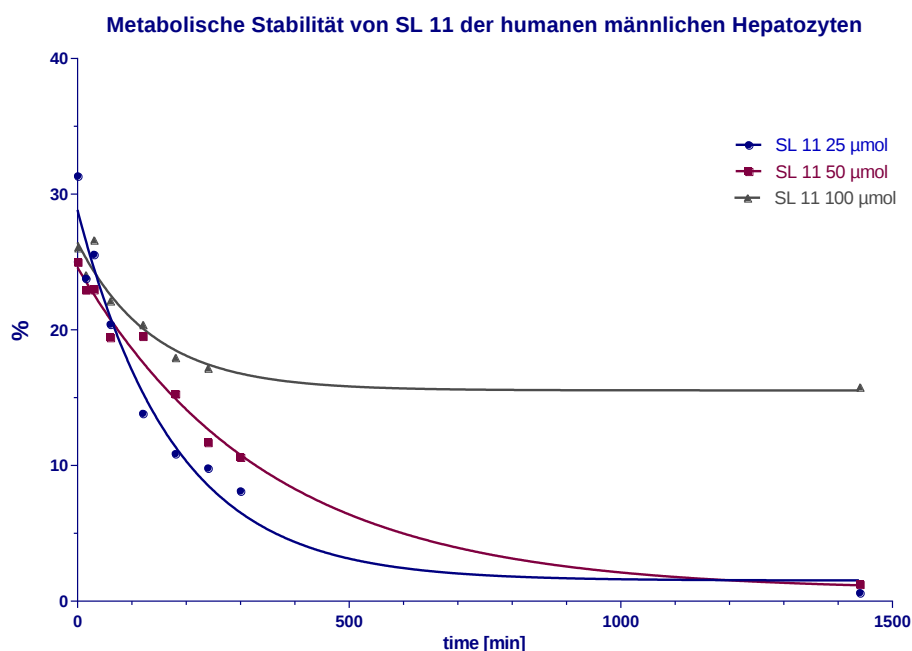


Abb.39: Metabolische Stabilität von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten

Die Metabolische Stabilität ist sehr gering und liegt bereits bei der ersten Probenentnahme nur mehr zwischen 25 und 31%. Nach fünf Stunden sind nur mehr ca. 10% der ursprünglichen Substanzmenge vorhanden.

Die größte metabolische Stabilität zeigt sich bei einer Konzentration von 100 µmol. Dies ist aber auf eine Enzymsättigung zurückzuführen. Das System verläuft also biphasisch. Die Kurve nimmt nicht mehr ab, da die Enzyme bereits gesättigt sind und somit kann kein weiterer enzymatischer Abbau von SL 11 erfolgen.

Metabolische Umsetzung

Tab.24: Metabolische Umsetzung von SL 11

Zeit [min]	Metabolische Umsetzung [%]		
	25 µmol	50 µmol	100 µmol
0	23,34	19,77	6,95
15	36,04	19,77	17,87
30	30,07	22,39	20,99
60	34,79	23,19	17,46
120	38,18	21,07	10,56
180	23,09	7,46	2,97
240	24,94	11,29	11,03
300	30,67	11,27	2,05
1440	24,31	24,34	3,45

Metabolische Umsetzung von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten

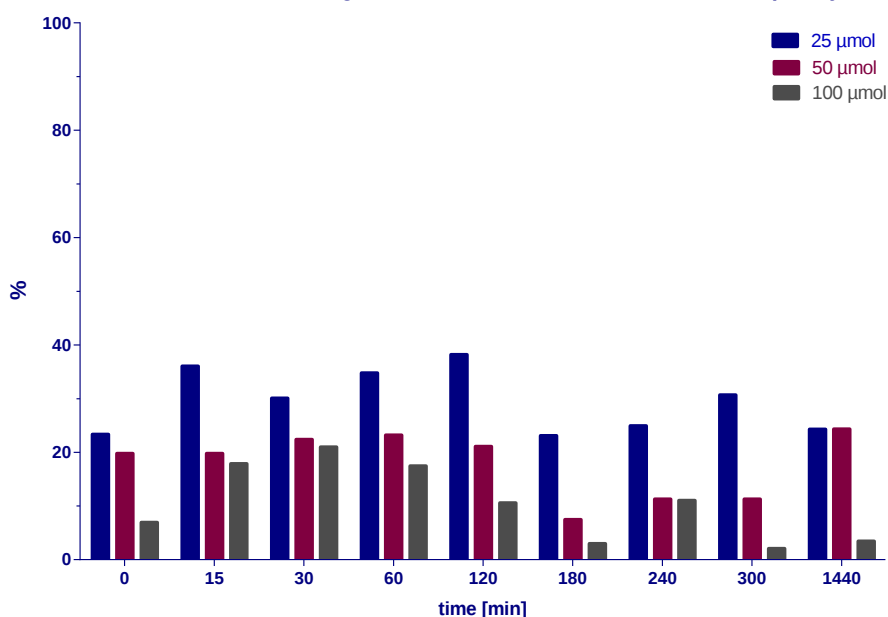


Abb.40: Metabolische Umsetzung von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten

Bei einer Konzentration von 25 μmol wird am meisten SL 11 metabolisch umgesetzt. Im Vergleich mit der 100 μmol Lösung muss aber wieder die Enzymsättigung berücksichtigt werden, wodurch die Metabolisierung natürlich geringer ist. Dennoch beträgt die metabolische Umsetzung nie mehr als 40%, da der restliche Abbau von SL 11 wahrscheinlich auf Umlagerungs- bzw. Zerfallsprozesse zurückzuführen ist.

Abbauprodukte von SL 11

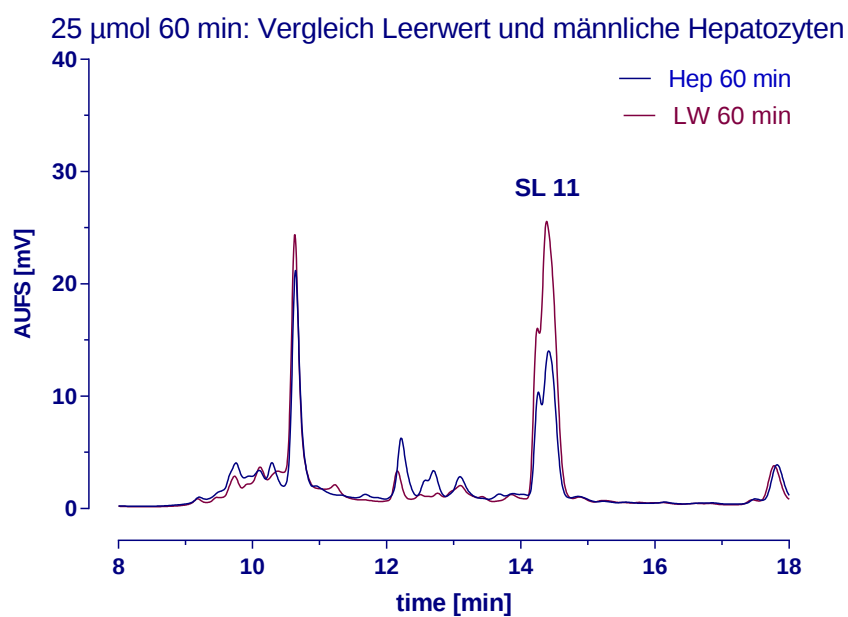
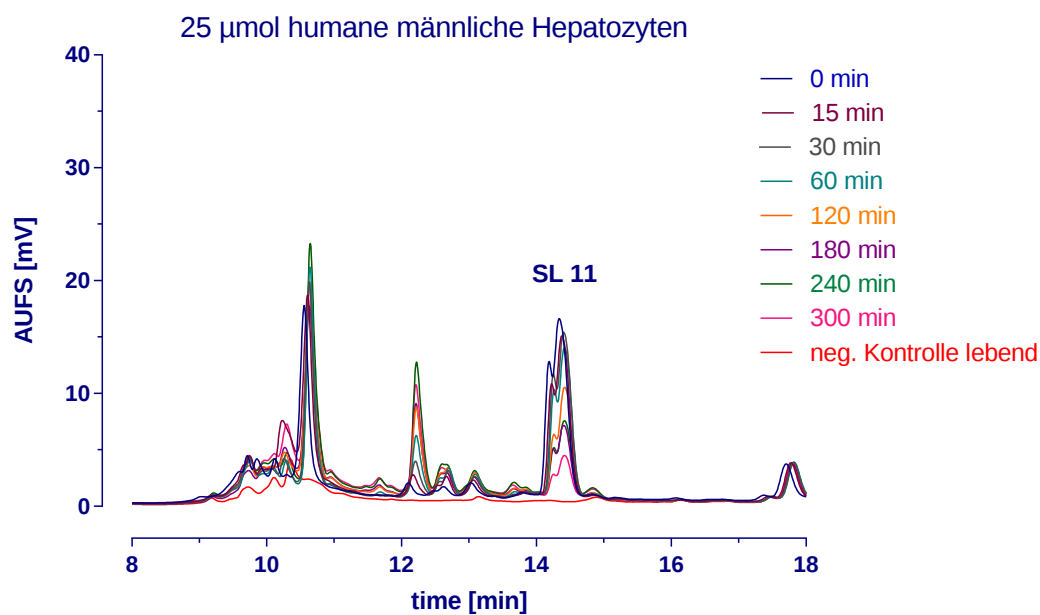


Abb.41:Entstehende Verbindungen durch den Abbau von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten

Durch den Vergleich der Chromatogramme der Leewerte und jener Proben welche mit Hepatozyten durchgeführt wurden, wird deutlich, dass diese dasselbe Peakmuster aufzeigen. Die Peaks unterscheiden sich nicht in der Retentionszeit jedoch in ihrer Höhe. Es treten also quantitative Unterschiede auf, jedoch keine qualitativen. Somit werden im Zuge der Metabolisierung keine neuen Verbindungen gebildet. Daher handelt es sich zumindest teilweise um nicht enzymatische Umlagerungs- oder Zerfallsprozesse von SL 11. Wobei enzymatische Aktivität auch vorhanden sein muss, da Unterschiede zwischen Leerwertproben und Hepatozyten vorhanden sind.

In den Proben finden sich vor allem fünf verschiedene Verbindungen, bei den Retentionszeiten von 10,6; 12,1; 12,7; 13,0; 14,2 min. SL 11 weist eine Retentionszeit von 14,4 min auf.

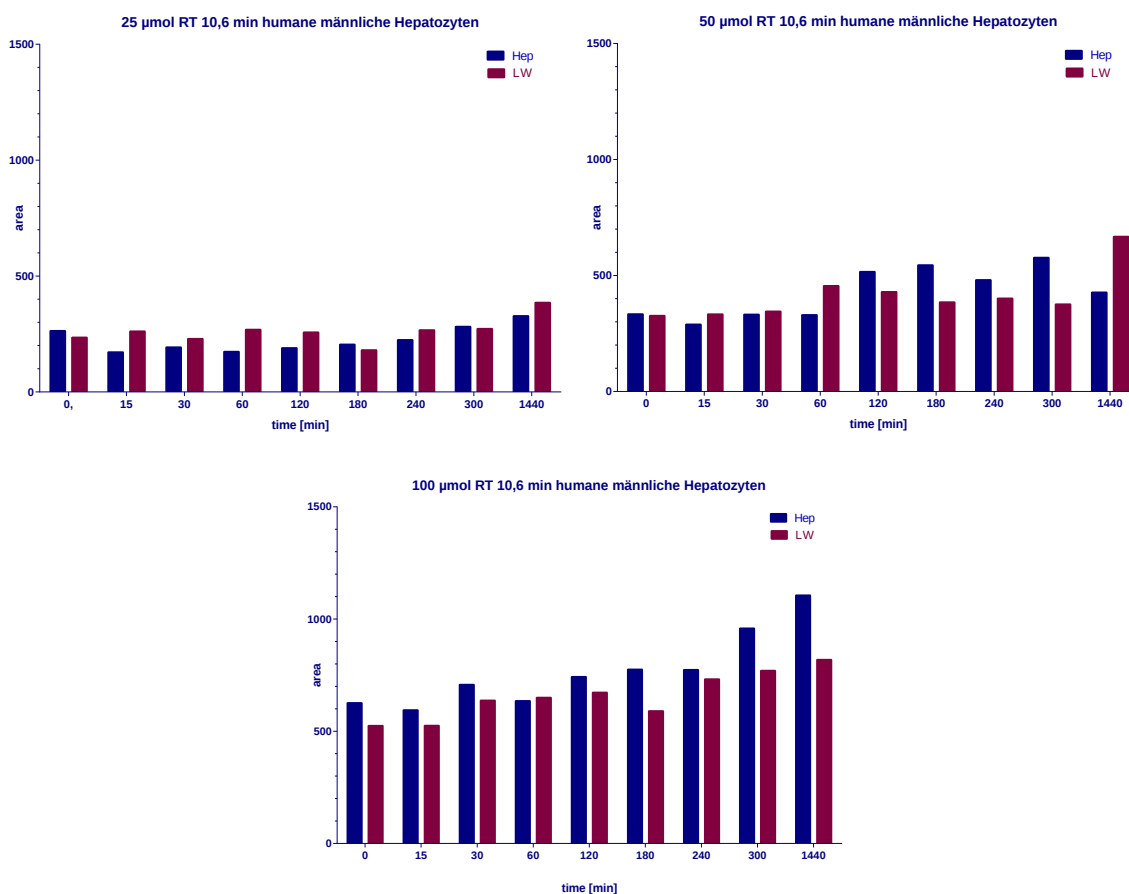


Abb.42: Retentionszeit 10,6 min bei drei Konzentrationen der humanen männlichen Hepatozyten

Die Verbindung mit einer Retentionszeit bei 10,6 min ist über einen Zeitraum von 5 h relativ konstant vorhanden. Nach 24 h zeigt sich bei 25 und 100 µmol nochmals ein weiterer Anstieg. Zwischen Leerwerten und Hepatozyten finden sich keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Mengen. Wodurch es sich hier eher um ein Umlagerungs-

oder Zerfallsprodukt von SL 11 handeln könnte, da sich auch durch Zugabe der Hepatozyten kaum eine Veränderung zeigt.

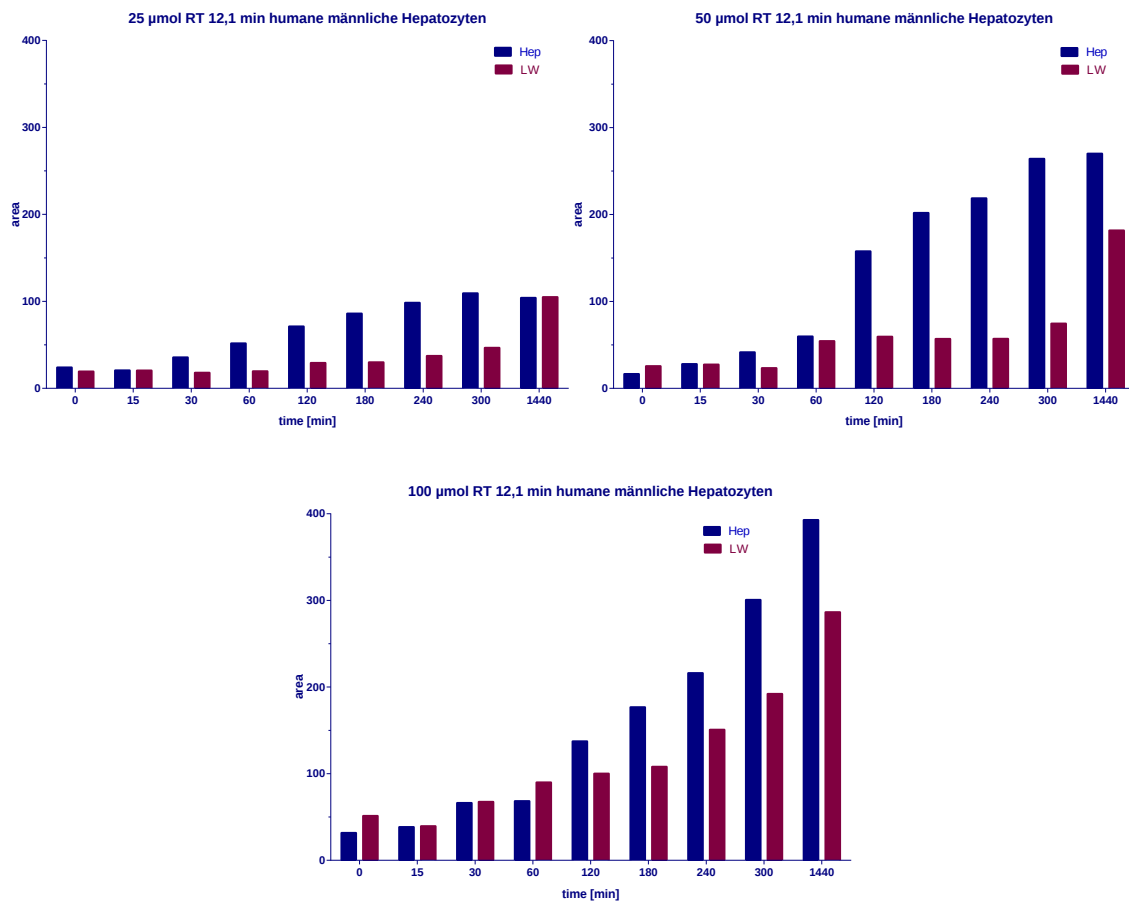


Abb.43: Retentionszeit 12,1 min bei drei Konzentrationen der humanen männlichen Hepatozyten

Eine weitere Verbindung ist jene die eine Retentionszeit von 12,1 min aufweist. Diese wird in wesentlich kleineren Mengen gebildet, als die bei 10,6 min. Hier zeigt sich allerdings bei allen drei Konzentrationen ein stetiger Anstieg über den gesamten Zeitraum. Zudem wird durch die Zugabe der Hepatozyten wesentlich mehr gebildet als bei den Leerwertproben. Somit wird im Zuge der metabolischen Aktivität diese Verbindung verstärkt gebildet.

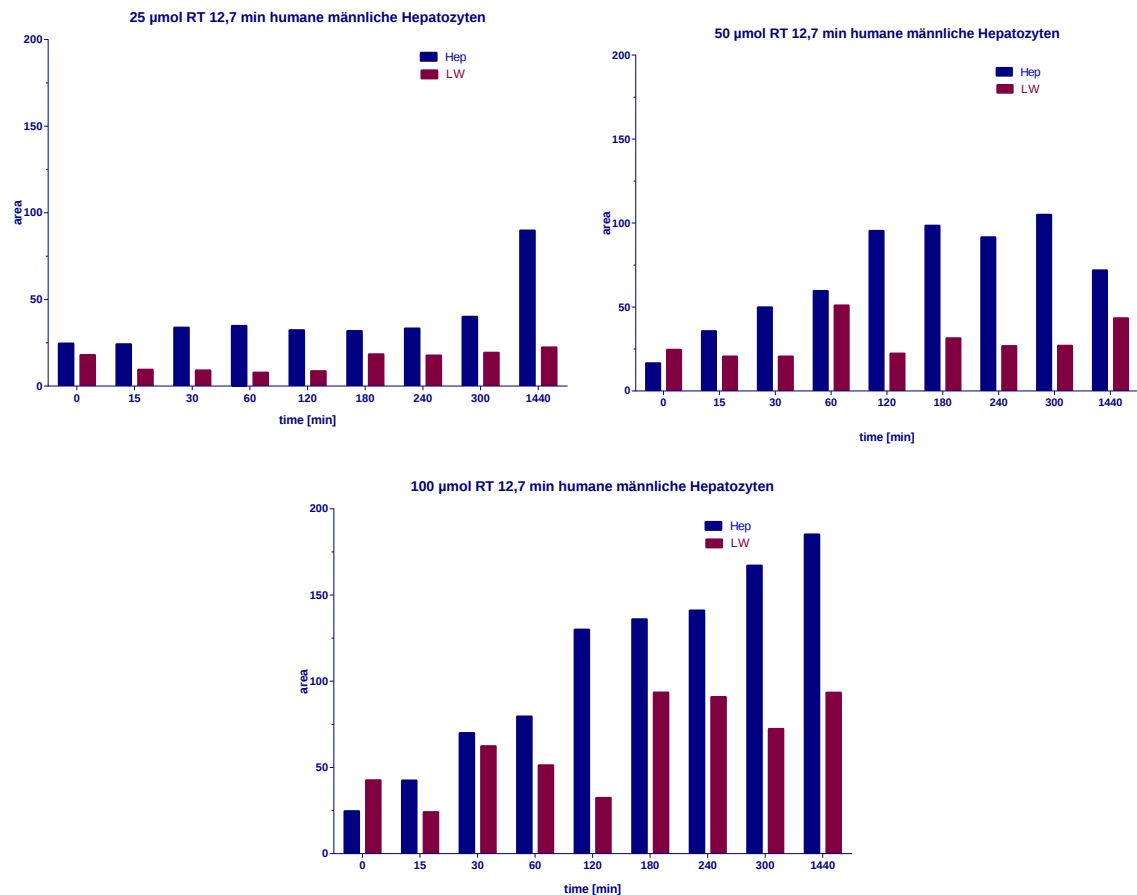
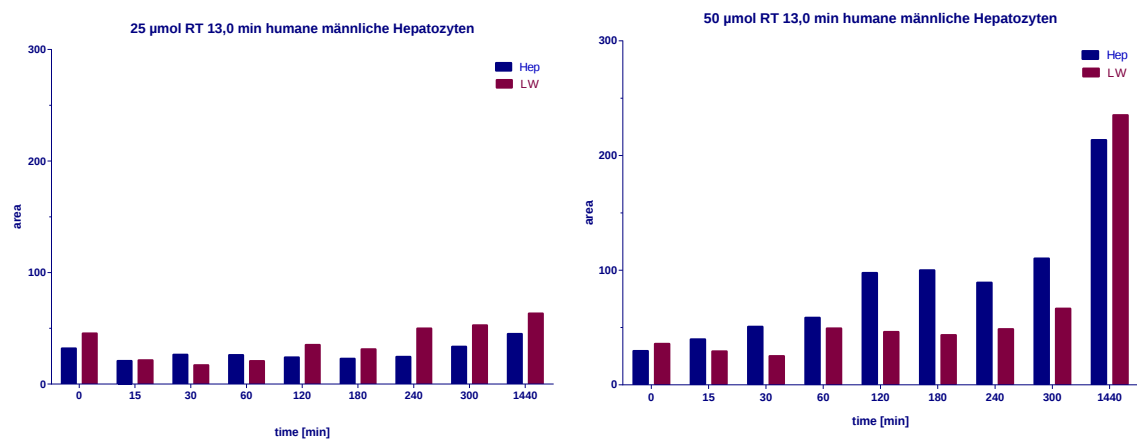


Abb.44: Retentionszeit 12,7 min bei drei Konzentrationen der humanen männlichen Hepatozyten

Ein weiterer Peak im Chromatogramm findet sich bei 12,7 min. In den ersten 120 min kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg, die darauf folgenden 180 min verhält sich die Verbindung eher konstant. Nach 24 h zeigt sich vor allem bei einer Konzentration von 25 und 100 µmol ein weiterer Anstieg. Wiederum wird durch die Hepatozyten mehr dieser Verbindung gebildet, wodurch der Einfluss der Enzyme von Bedeutung ist.



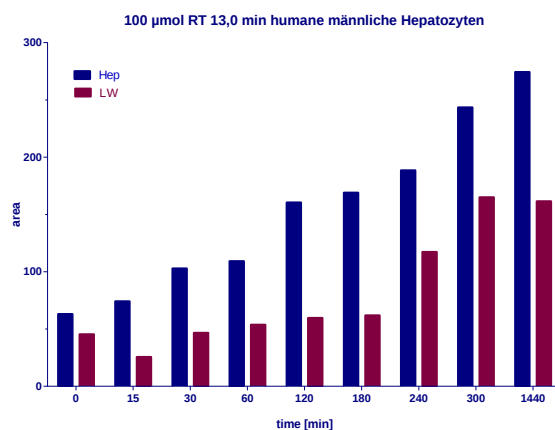


Abb.45: Retentionszeit 13,0 min bei drei Konzentrationen der humanen männlichen Hepatozyten

Auch das Abbauprodukt bei 13,0 min steigt bei allen Konzentrationen mit der Zeit an. Allerdings weisen die Leerwerte bei 25 µmol höhere Peakflächen dieser Verbindung auf. Wobei es sich dabei nur um sehr geringe Unterschiede handelt. Diese können aber auch auf die möglichen Schwankungen, welche sich durch die praktische Arbeit mit biologischen Systemen ergeben können, zurückzuführen sein. Bei den andern beiden Konzentrationen wird jedoch diese Verbindung durch die Hepatozyten wieder verstärkt gebildet. Somit wird wieder der enzymatische Einfluss ersichtlich.

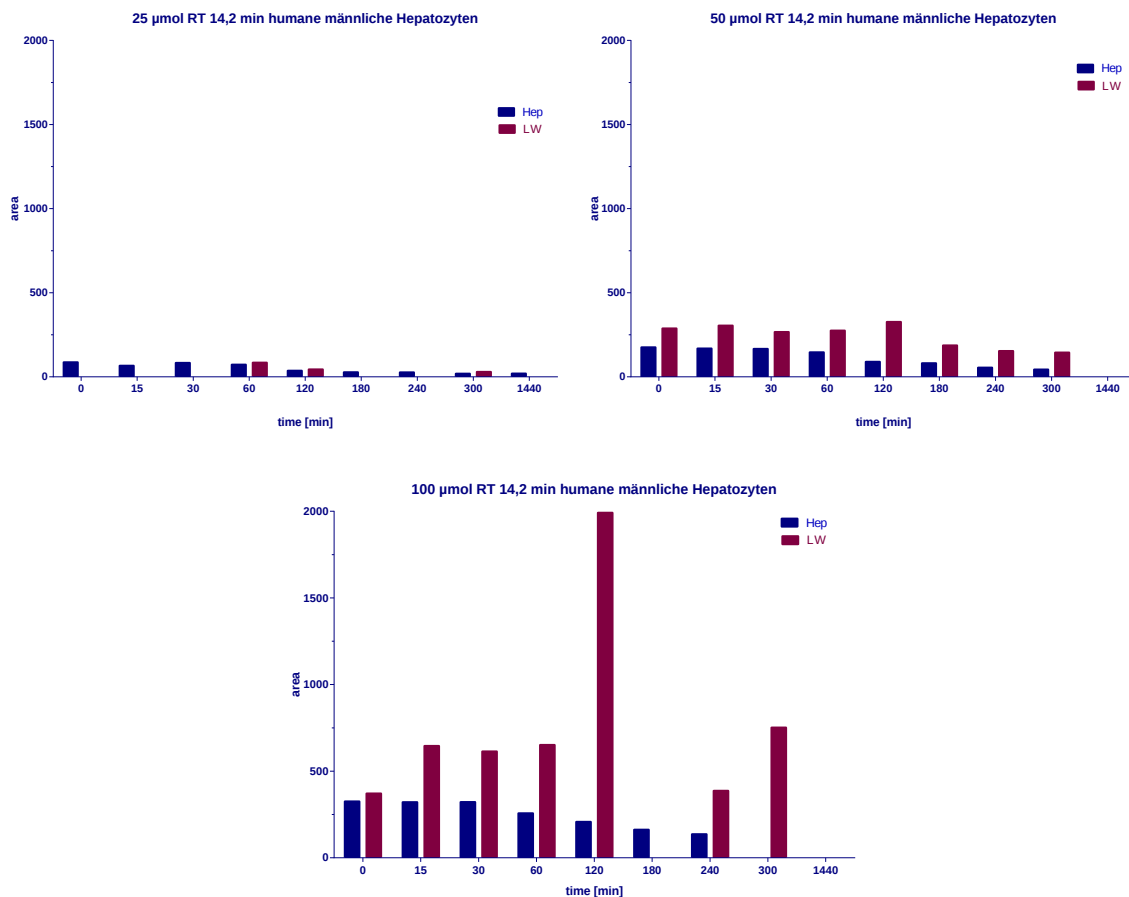


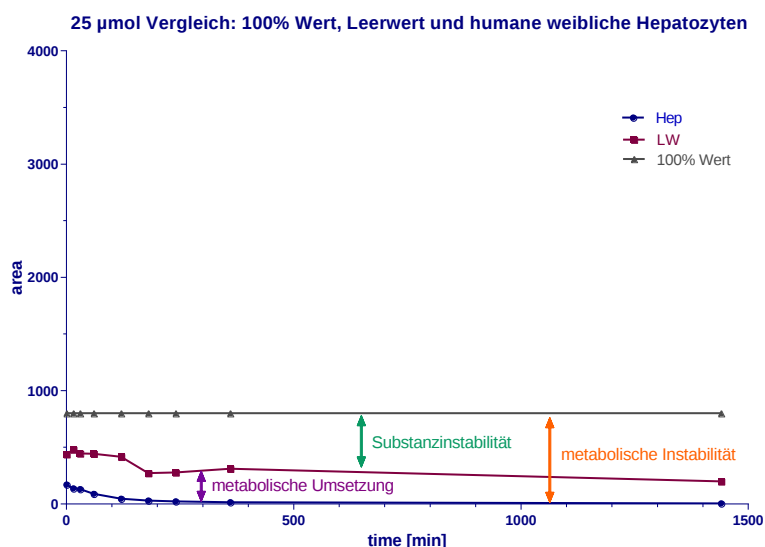
Abb.46: Retentionszeit 14,2 min bei drei Konzentrationen der humanen männlichen Hepatozyten

Die Proben mit den Hepatozyten weisen einen Doppelpeak auf. Dieser kann in eine Retentionszeit von 14,4 min, dabei handelt es sich um SL 11, und in 14,2 min unterteilt werden. Interessant ist jedoch, dass die Verbindung bei 14,2 min, bei einer Konzentration von 25 µmol, bei den Leerwerten nicht immer gebildet wird. Bei Betrachtung der beiden höheren Konzentrationen findet sich allerdings wieder ein Doppelpeak bei den Leerwerten und zudem ist dieser höher als bei den Hepatozyten. Somit könnte es sein, dass bei niedrigen Konzentrationen die Bildung dieses Umlagerungsprodukts mit Hilfe der Enzyme gefördert wird und bei den höheren Konzentrationen bereits ein verstärkter Abbau dieser Verbindung stattfindet.

3.3.3. Humane weibliche Hepatozyten

Der Versuch mit humanen weiblichen Hepatozyten wurde von meiner Kollegin Kritzinger Daniela, Division für Klinische Pharmazie und Diagnostik, im Sommersemester 2014 durchgeführt. Die Durchführung der Proben erfolgte in gleicher Weise. Es wurden dieselben Konzentrationen, Medien, Lösungsmittel, Eluenten sowie dieselbe HPLC verwendet. Allerdings wurde ein anderer Abnahmezeitpunkt gewählt. Statt eines 300 min Wertes wurde die Probenentnahme nach 360 min durchgeführt.

Überblick Substanzinstabilität, metabolische Stabilität und metabolische Umsetzung



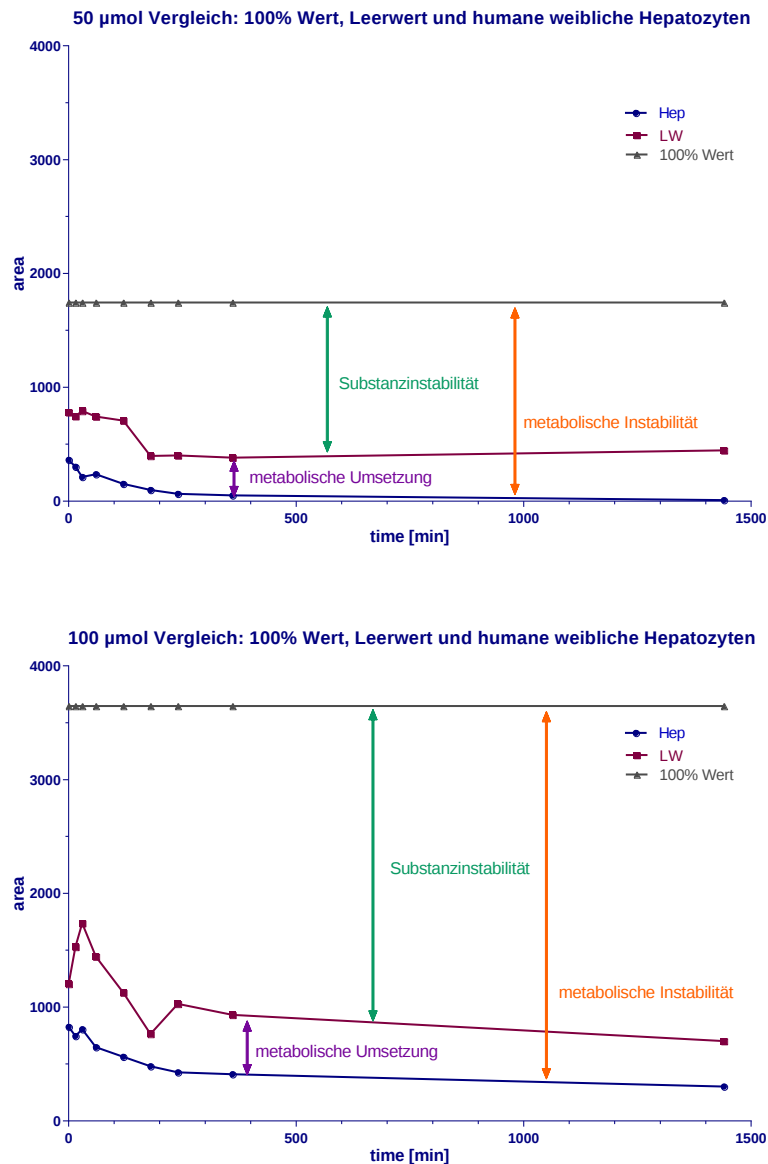


Abb.47: Vergleich SL 11: Eichgerade, Leerwerte und weibliche Hepatozyten in drei Konzentrationen

Im Vergleich mit den Leerwertproben zeigt sich auch bei den weiblichen Hepatozyten ein ähnliches Bild. Auch hier wird nur ein kleiner Teil von SL 11 metabolisch umgesetzt, der restliche Substanzabbau ist wiederum auf die Substanzinstabilität zurückzuführen. Die Berechnungen erfolgen in gleicher Weise wie bei den männlichen Hepatozyten.

Metabolische Stabilität

Tab.25: Peakflächen von SL 11

Zeit [min]	area Hepatozyten		
	25 μmol	50 μmol	100 μmol
0	171,6	362,9	827,6
15	137,5	302,7	746,1
30	132,0	213,2	806,3
60	90,5	236,4	648,6
120	46,4	151,9	563,8
180	31,1	98,9	480,3
240	23,2	65,0	426,5
360	15,1	50,9	410,4
1440	5,0	9,3	302,5

Tab.26: Metabolische Stabilität von SL 11

Zeit [min]	Metabolische Stabilität [%]		
	25 μmol	50 μmol	100 μmol
0	21,39	20,79	22,69
15	17,14	17,34	20,46
30	16,45	12,21	22,11
60	11,28	13,54	17,78
120	5,78	8,70	15,46
180	3,88	5,67	13,17
240	2,89	3,72	11,69
360	1,88	2,91	11,25
1440	0,62	0,53	8,29

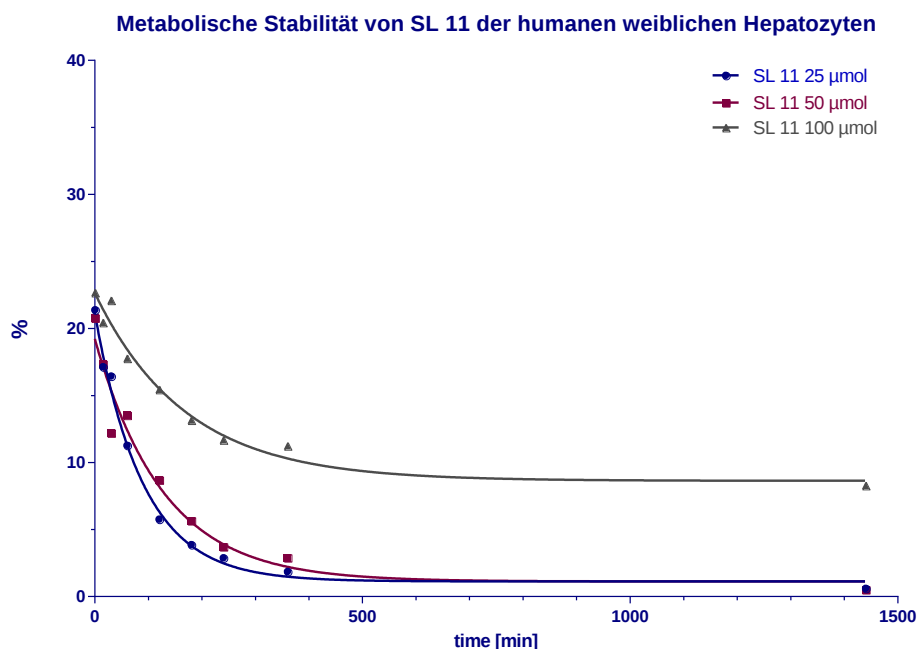


Abb.48: Metabolische Stabilität von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten

Die metabolische Stabilität beträgt bereits nach der ersten Probenentnahme nur mehr 20-23%. Bei 25 und 50 μmol fällt die metabolische Stabilität in den ersten sechs Stunden auf 2-3% weiter ab. Auch hier liegt ein biphasisches System vor. Die Konzentration mit 100 μmol zeigt keinen starken Abfall auf. Auch nach sechs Stunden sind noch 11,25% der Substanz vorhanden. Jedoch kann das wiederum durch die Enzymsättigung erklärt werden.

Metabolische Umsetzung

Tab.27: Metabolische Umsetzung von SL 11

Zeit [min]	Metabolische Umsetzung [%]		
	25 μmol	50 μmol	100 μmol
0	33,28	23,98	10,32
15	42,70	25,40	21,48
30	39,18	33,17	25,52
60	43,94	29,10	21,84
120	46,24	31,90	15,50
180	30,09	17,09	7,78
240	31,86	19,28	16,53
360	36,90	18,99	14,29
1440	24,31	25,07	10,95

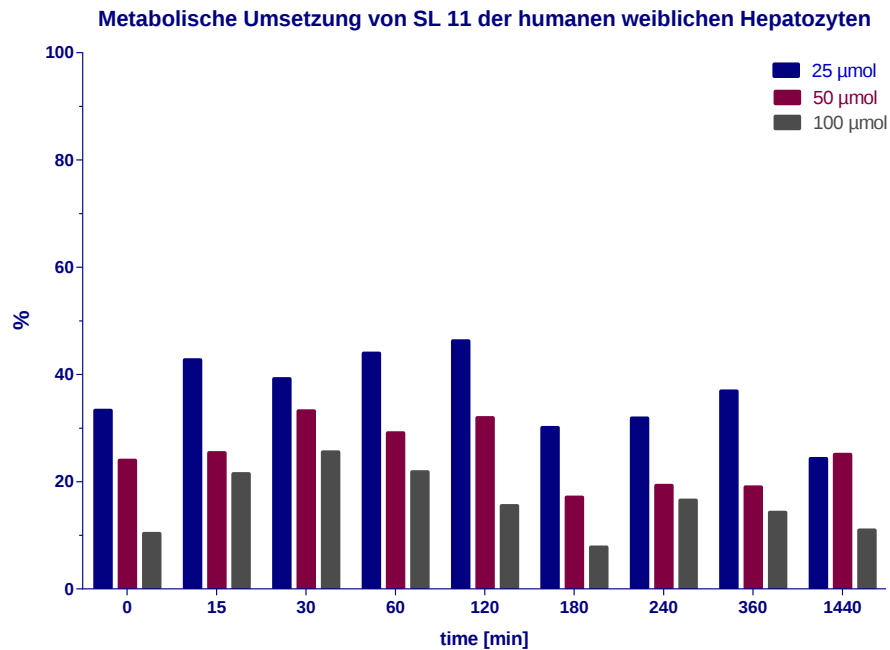


Abb.49: Metabolische Umsetzung von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten

Bei 25 μmol findet sich die höchste metabolische Umsetzung von SL 11. Allerdings muss auch hier die Sättigung der Enzyme bei hohen Konzentrationen berücksichtigt werden, so dass dementsprechend die metabolische Aktivität bei 100 μmol geringer ist. Die metabolische Umsetzung beträgt maximal 46%, wobei die Substanzinstabilität und die damit verbundenen Abbauprozesse von SL 11 berücksichtigt werden.

Abbauprodukte von SL 11

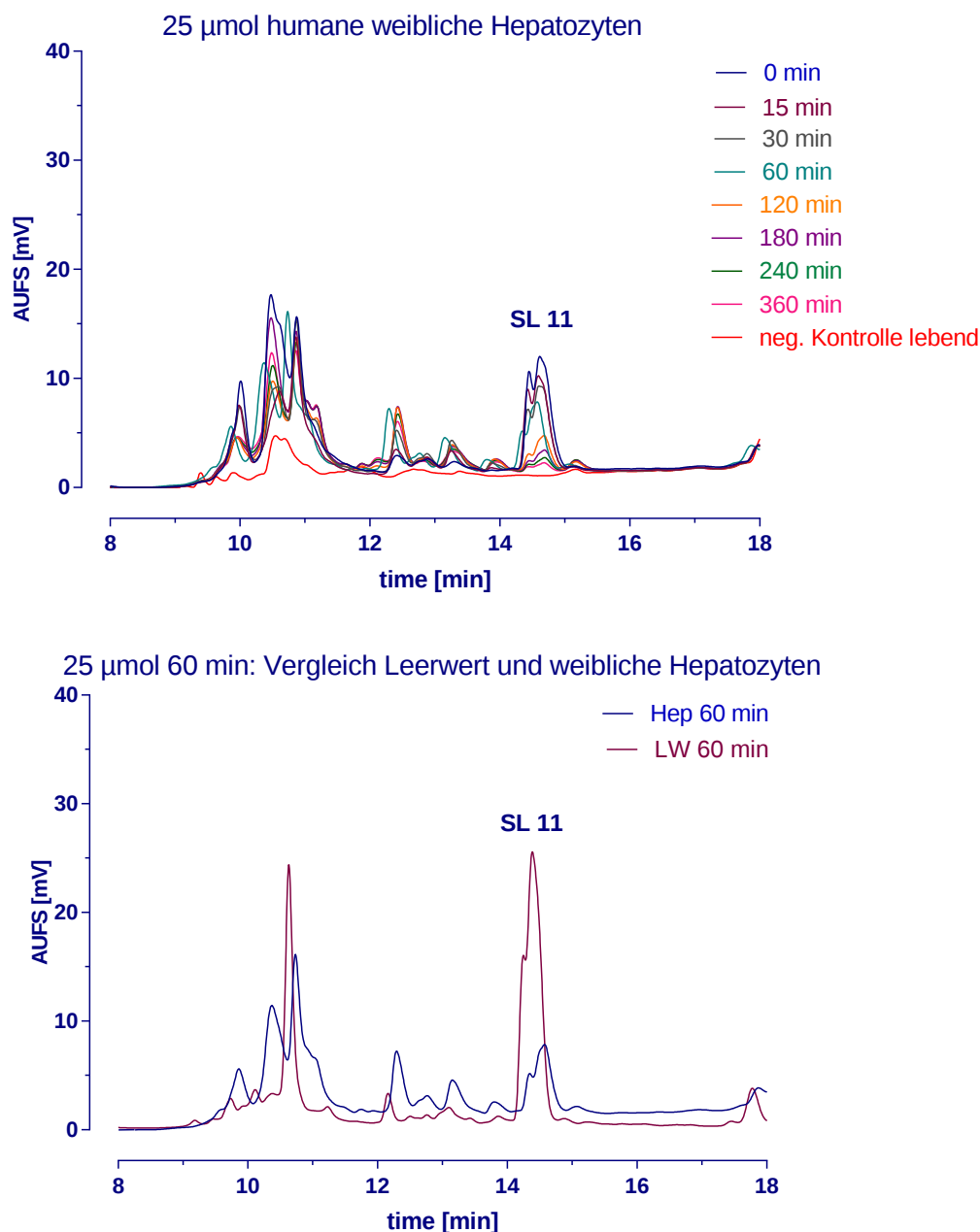


Abb.50: Entstehende Verbindungen durch den Abbau von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten

Auch bei den weiblichen Hepatozyten treten keine neuen Verbindungen im Zuge der Metabolisierung auf. Bei der Betrachtung des Chromatogramms Abb.50 muss darauf Rücksicht genommen werden, dass es zu einer kleinen Verschiebung der Peaks gekommen ist. Diese können dennoch eindeutig zugeordnet werden. Es finden sich wieder dieselben Peaks wie in den Leerwertproben. Jedoch liegen auch hier quantitative Unterschiede vor, wodurch unterschiedliche Mengen der einzelnen Verbindungen nachgewiesen werden können. Dadurch kann der Abbau von SL 11 wiederum auf Umlagerungs- und Zerfallsprozesse aber auch auf enzymatische Metabolisierung

zurückzuführen sein. Es werden nun die gleichen Abbauprodukte wie bei den männlichen Hepatozyten genauer analysiert.

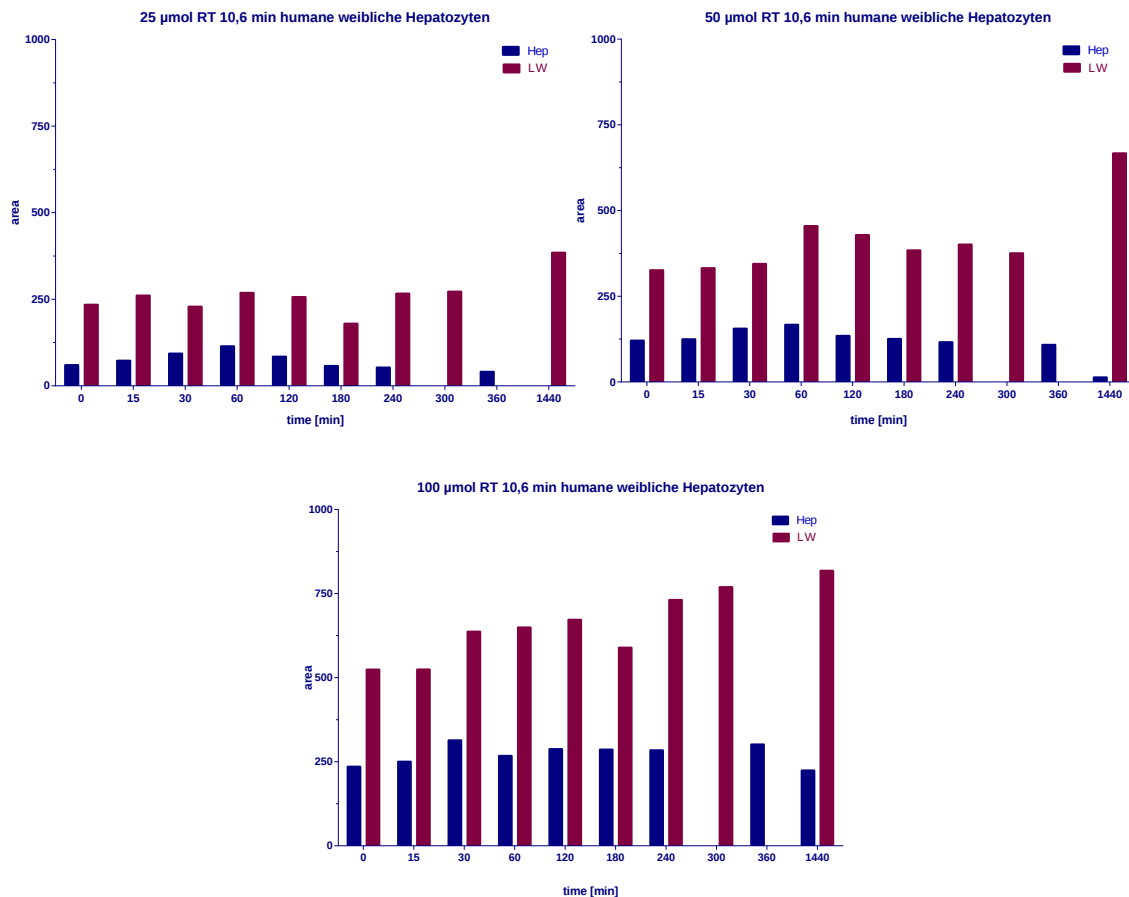


Abb.51: Retentionszeit 10,6 min bei drei Konzentrationen der humanen weiblichen Hepatozyten

Für die Betrachtung dieser und der folgenden Abbildungen muss beachtet werden, dass die Probenentnahme bei den männlichen Hepatozyten und bei den Leerwerten nach 300 min und bei den weiblichen Hepatozyten nach 360 min durchgeführt wurde.

Darum befindet sich bei diesen Zeitpunkten jeweils nur ein Balken.

Die Verbindung, welche eine Retentionszeit von 10,6 min aufweist, verhält sich in den ersten Stunden konstant und nimmt erst nach 24 h stärker ab. Bei den Leerwertproben kann nach 24 h jedoch eine Zunahme der Substanz beobachtet werden. Bei diesen wird die Verbindung zu allen Zeitpunkten und bei allen Konzentrationen in größeren Mengen gebildet als in den weiblichen Hepatozyten. Möglicherweise wird im Zuge der enzymatischen Aktivität der weiblichen Hepatozyten diese Verbindung weiter metabolisiert. Leider konnten in den Chromatogrammen keine zusätzlichen Peaks gefunden werden, die diese weitere Metabolisierung zu einer anderen Verbindung bestätigen würden.

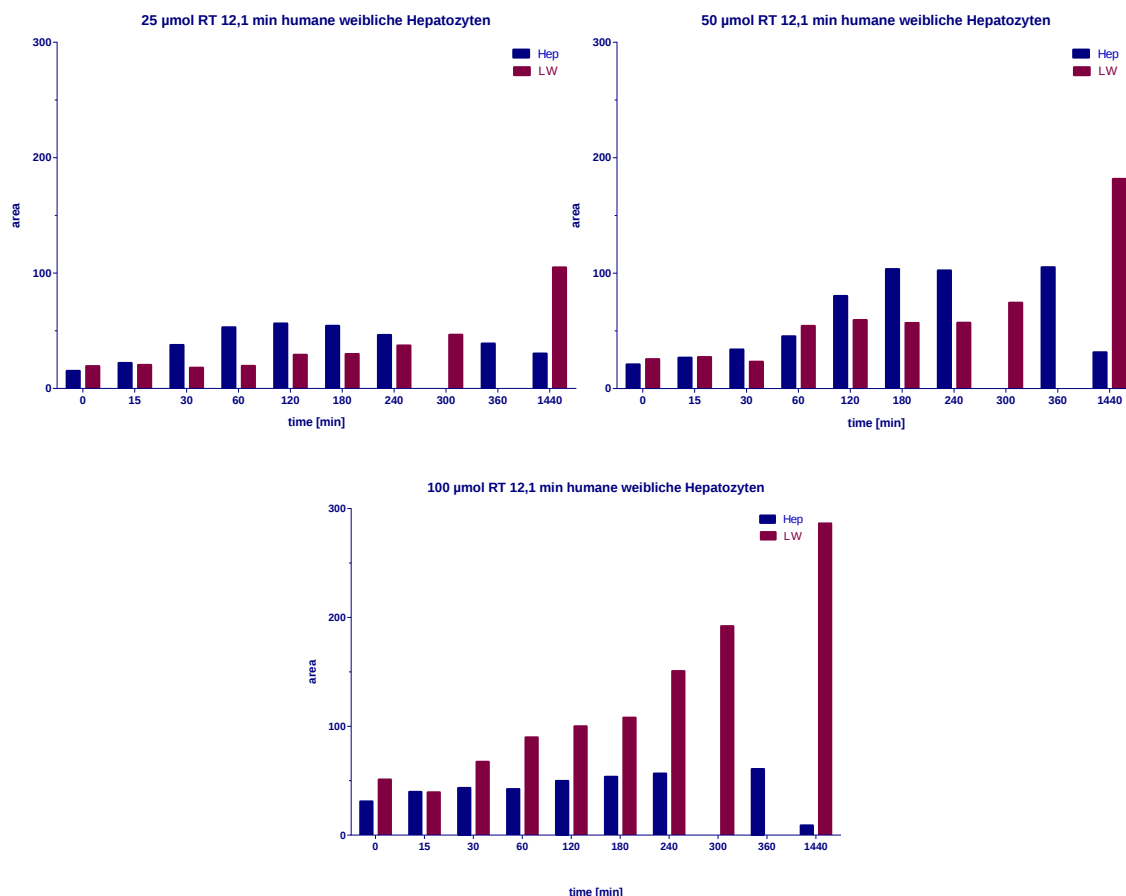
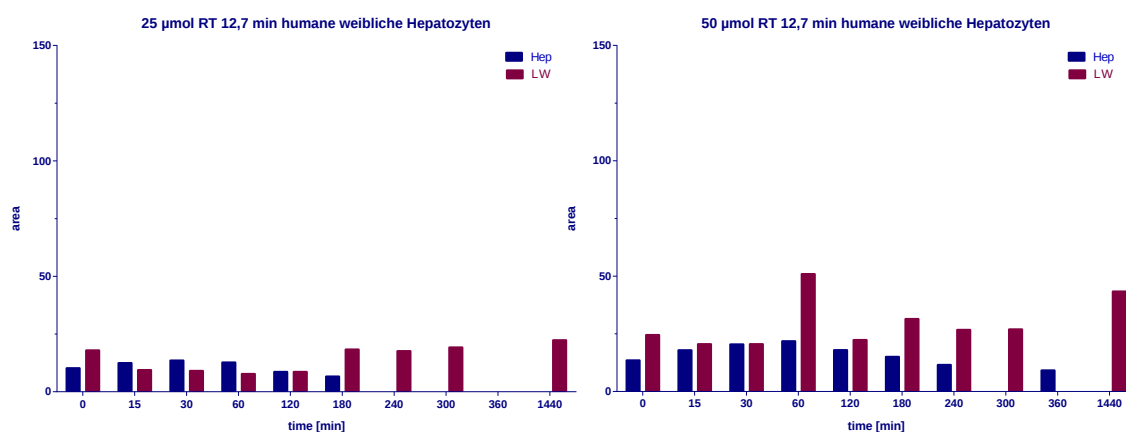


Abb.52: Retentionszeit 12,1 min bei drei Konzentrationen der humanen weiblichen Hepatozyten

Die Verbindung mit einer Retentionszeit von 12,1 min zeigt über die ersten Stunden bei allen Konzentrationen einen leichten Anstieg und fällt dann nach 24 h wieder ab. Bei den Leerwertproben hingegen findet sich ein kontinuierlicher Anstieg dieser Verbindung. Möglicherweise ist dieser verstärkte Abbau wiederum durch enzymatische Aktivität erklärbar. Lediglich bei 50 µmol findet sich in den ersten vier Stunden bei den Hepatozyten ein höherer Balken, der allerdings danach wieder unter die Leerwerte abfällt. Dies zeigt also auch einen verstärkten Abbau zu den späteren Zeitpunkten.



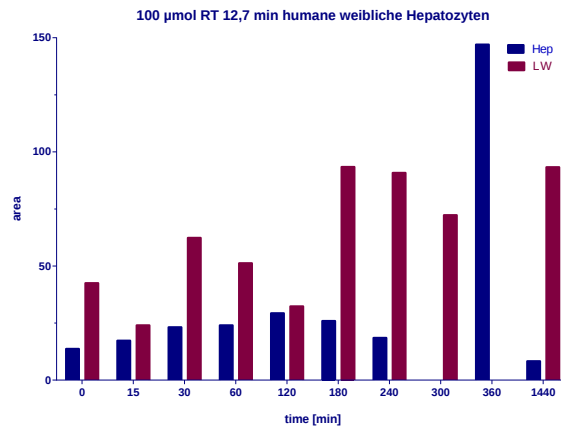


Abb.53: Retentionszeit 12,7 min bei drei Konzentrationen der humanen weiblichen Hepatozyten

Auch bei diesem Abbauprodukt, mit einer Retentionszeit von 12,7 min, zeigt sich ein ähnliches Bild wie zuvor. Die Leerwerte steigen mit der Zeit an und die Proben der Hepatozyten fallen nach den ersten Stunden wieder ab. Ein hoher Balken zeigt sich bei einer Konzentration von 100 µmol bei den Hepatozyten nach 360 min. Das sollte jedoch als Ausreißer bezeichnet werden, da nur dieser einen Wert stark von den anderen abweicht.

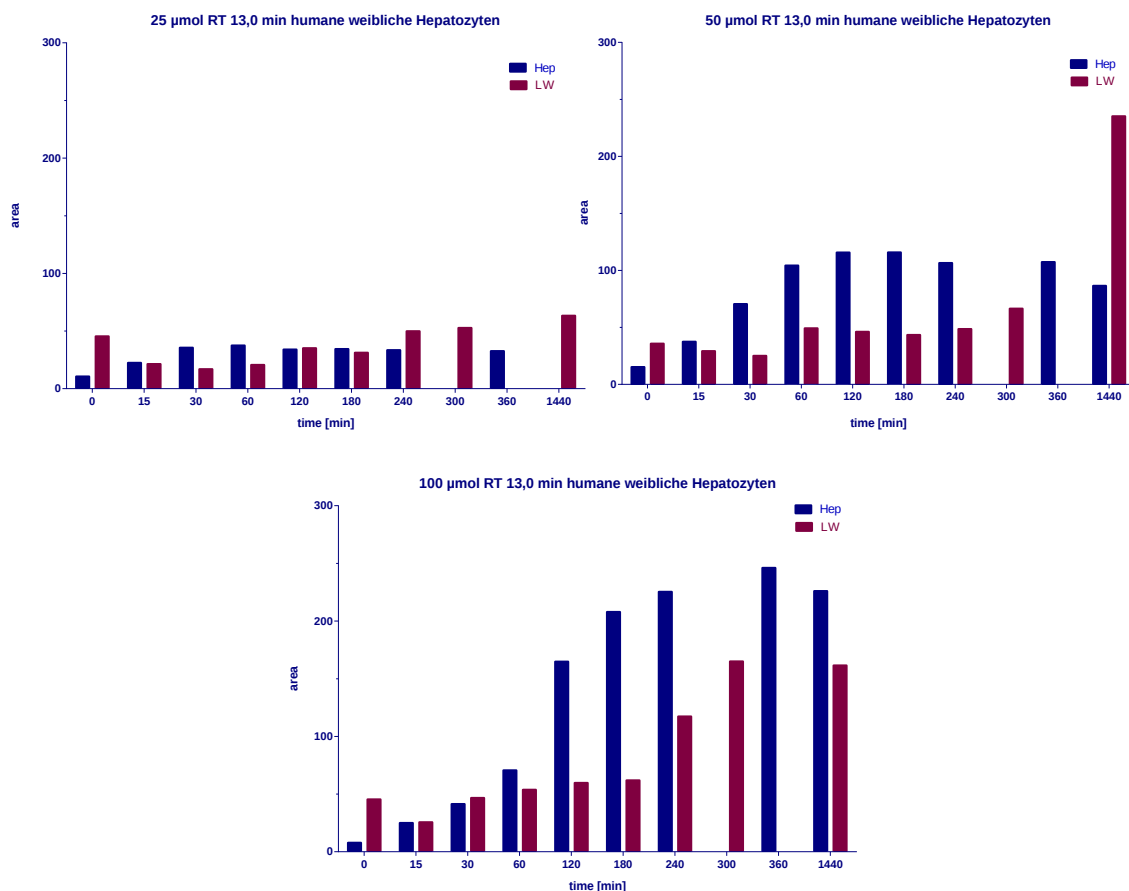


Abb.54: Retentionszeit 13,0 min bei drei Konzentrationen der humanen weiblichen Hepatozyten

Bei dem Abbauprodukt, bei 13,0 min, zeigt sich vor allem bei 50 und 100 μmol , dass durch die Zugabe der Hepatozyten wesentlich mehr dieser Verbindung gebildet wird als in den Leerwertproben. Somit wird die Bildung durch die Hepatozyten gefördert, aber nicht weiter abgebaut.

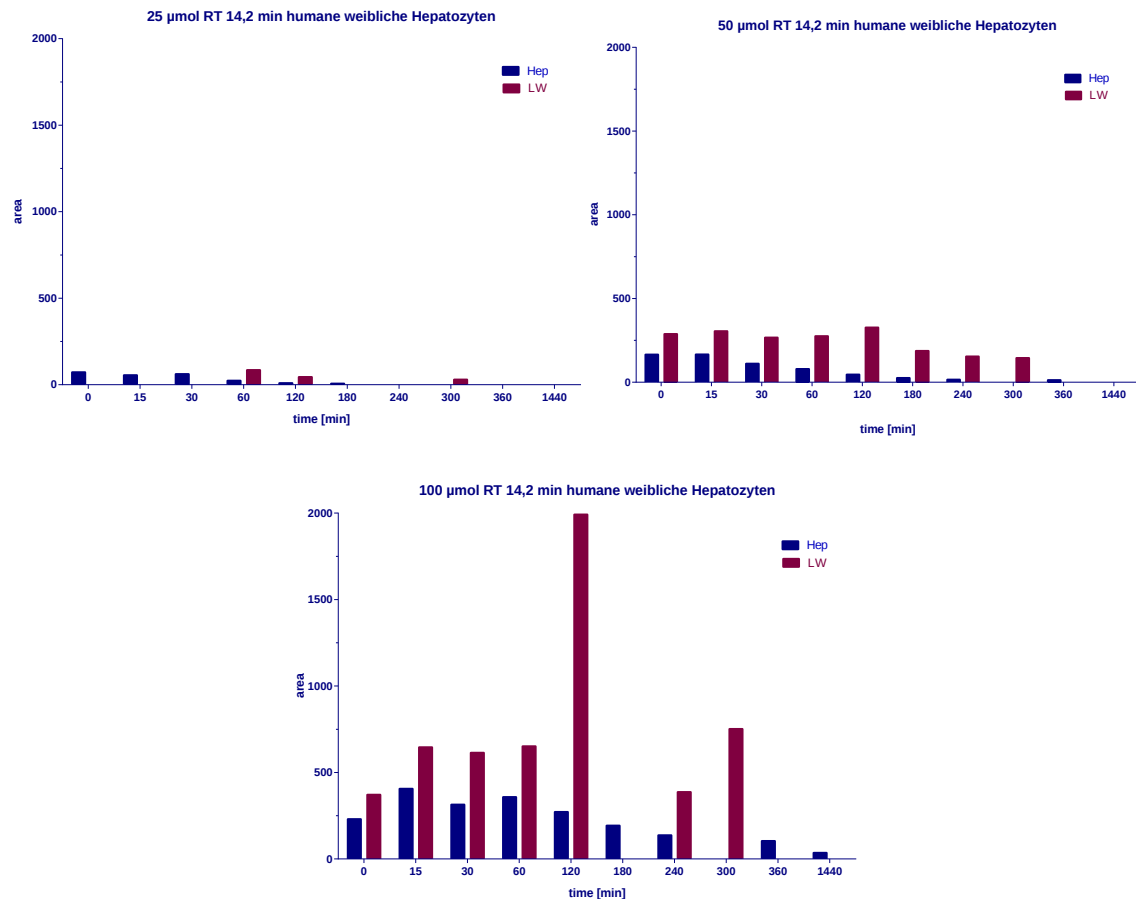


Abb.55: Retentionszeit 14,2 min bei drei Konzentrationen der humanen weiblichen Hepatozyten

Die Chromatogramme der weiblichen Hepatozyten zeigen auch Doppelpeaks auf, die wiederum in den Leerwertproben, vor allem bei der Konzentration von 25 μmol nicht immer auftreten. Grundsätzlich zeigt sich aber bei 50 und 100 μmol , dass sich in den Leerwertproben höhere Peaks finden und möglicherweise durch die Hepatozyten mehr dieser Verbindung abgebaut wird.

3.3.4. Vergleich der männlichen und weiblichen Hepatozyten

Metabolische Stabilität

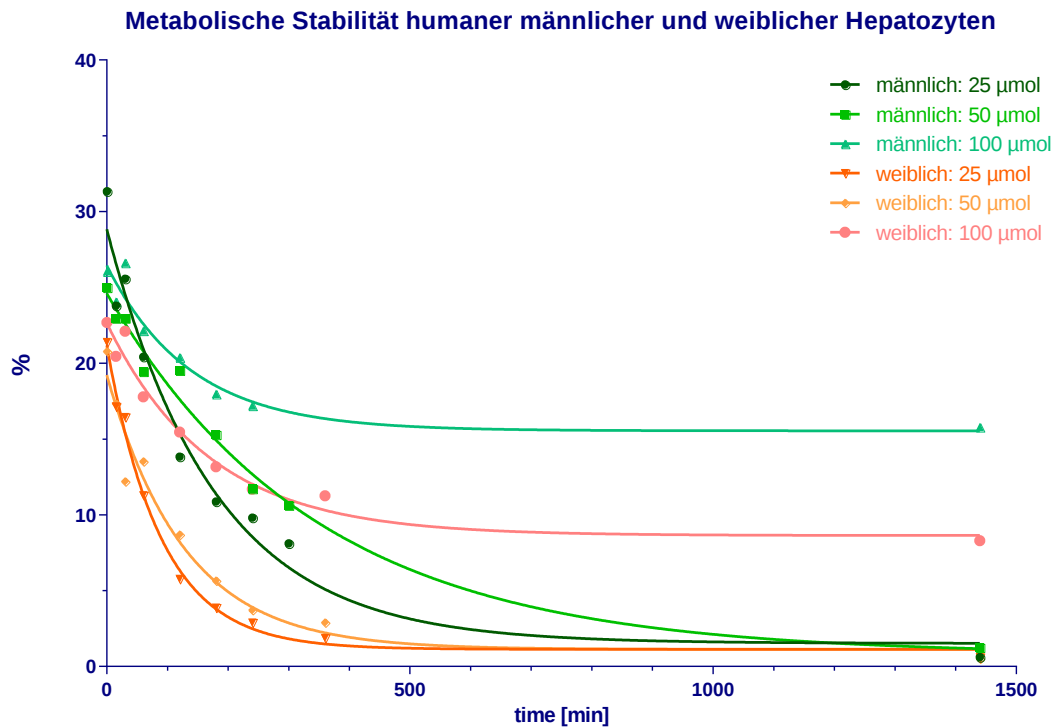


Abb.56: Vergleich der metabolischen Stabilität der männlichen und weiblichen Hepatozyten

Die männlichen Hepatozyten weisen eine etwas höhere metabolische Stabilität als die weiblichen Hepatozyten auf. Das bedeutet, dass die Peakflächen von SL 11 bei den Proben der männlichen Hepatozyten größer sind. Es wurde also weniger von der Substanz abgebaut. Wobei der Unterschied in den jeweiligen Konzentrationen und den jeweiligen Zeitpunkten maximal 10% beträgt. Die Kurven der männlichen Hepatozyten sind dadurch nach oben verschoben, dennoch verlaufen sie bei den jeweiligen Konzentrationen sehr ähnlich. Die Kurven bei 25 und 50 µmol fallen schnell und steil ab, wohingegen die bei 100 µmol nach den ersten Stunden nur mehr einen sehr schwachen Abfall aufzeigen. Somit verlaufen beide Systeme biphasisch und bei beiden tritt bei der höchsten Konzentration eine Enzymsättigung auf, wodurch kein weiterer enzymatischer Abbau von SL 11 erfolgen kann.

Mit Hilfe der logarithmischen Werte können Rückschlüsse auf die Halbwertszeit gezogen werden. Dazu wird die y-Achse in Logarithmen transferiert und danach eine lineare Regression berechnet.

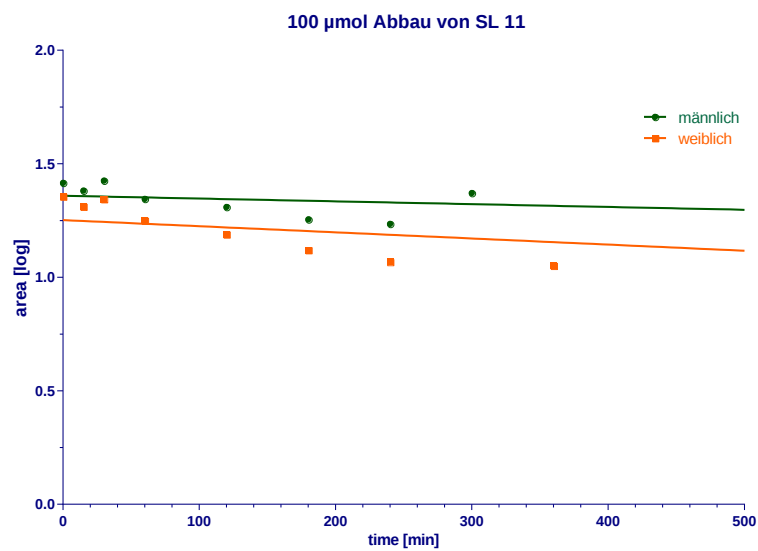
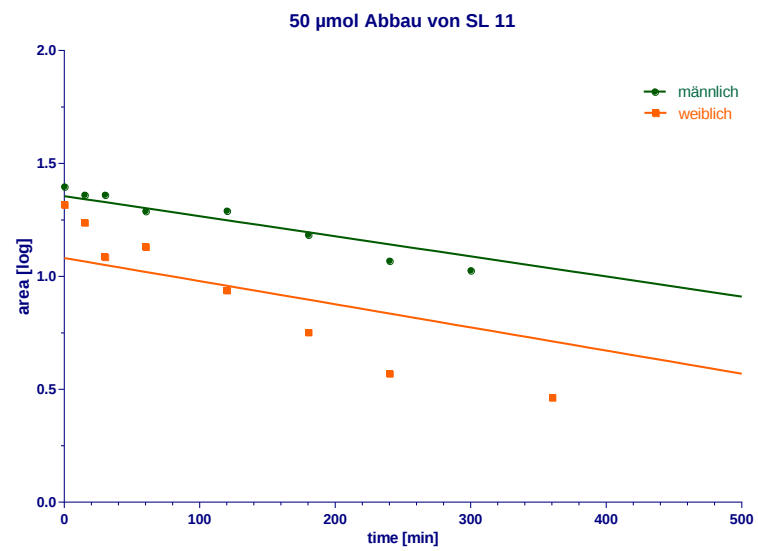
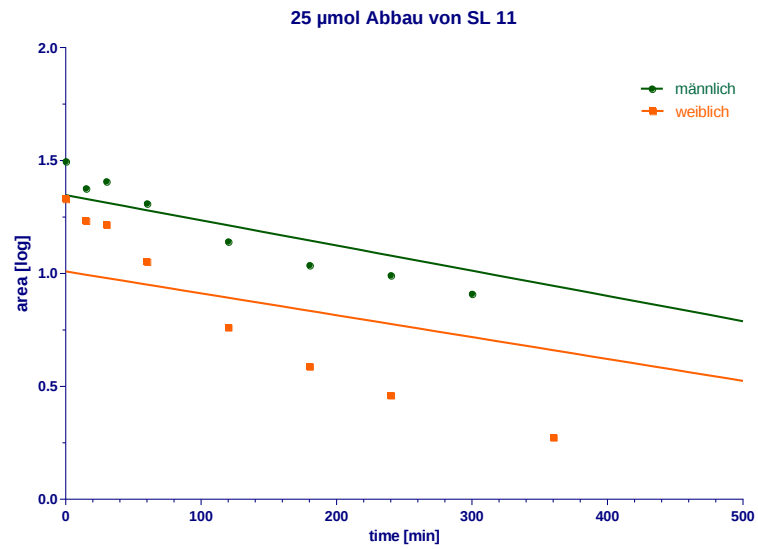
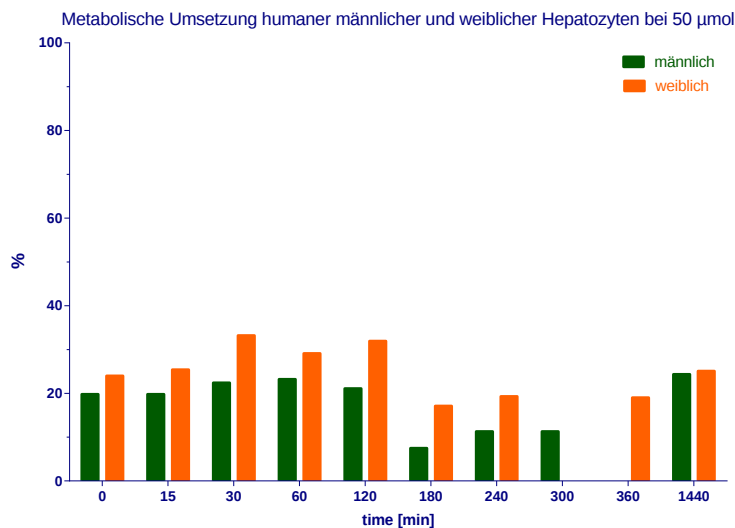
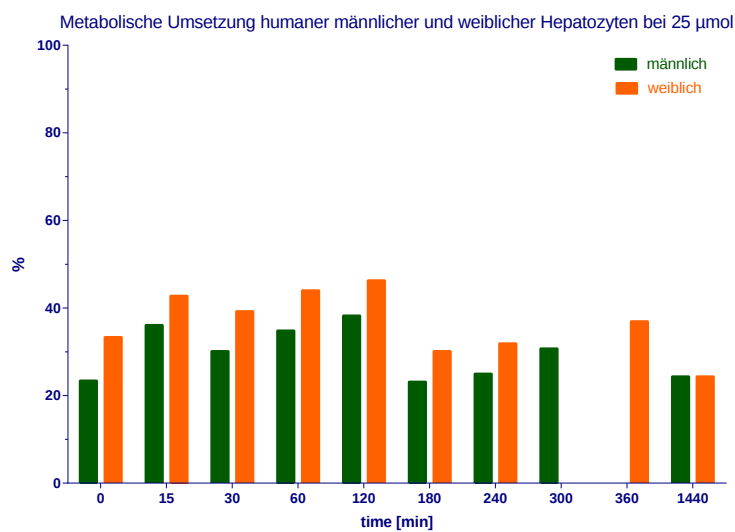


Abb.57: Logarithmische Darstellung des SL 11 Abbaus bei drei Konzentrationen

Die Geraden der männlichen und weiblichen Hepatozyten verlaufen bei allen drei Konzentrationen annähernd parallel. Das bedeutet, dass sie ungefähr dieselbe Halbwertszeit aufzeigen. Sie weisen somit eine ähnliche Pharmakokinetik auf, dementsprechend erfolgt der Abbau von SL 11 ungefähr gleich schnell. Allerdings unterscheiden sie sich in ihrer Aktivität, da SL 11 bei den weiblichen Hepatozyten stärker abgebaut wird.

Metabolische Umsetzung



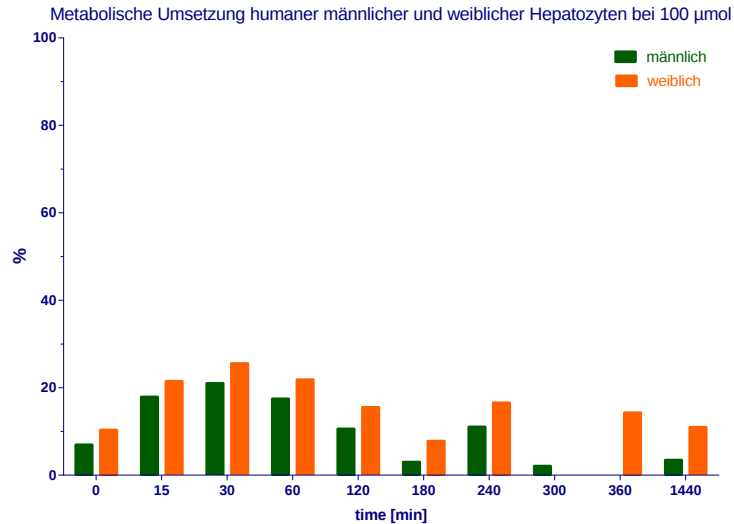


Abb.58: Vergleich der metabolischen Umsetzung der weiblichen und männlichen Hepatozyten

Die weiblichen Hepatozyten weisen eine größere metabolische Umsetzung auf. Wobei die Abweichungen zwar deutlich erkennbar aber dennoch eher gering sind. Der maximale Unterschied beträgt auch hier ca. 10%. Bei beiden zeigt sich bei der Konzentration von 25 μmol die größte metabolische Aktivität. Wobei wiederum die Enzymsättigung bei 100 μmol erwähnt werden muss, wodurch der enzymatische Abbau kaum mehr stattfinden kann.

Abbauprodukte von SL 11

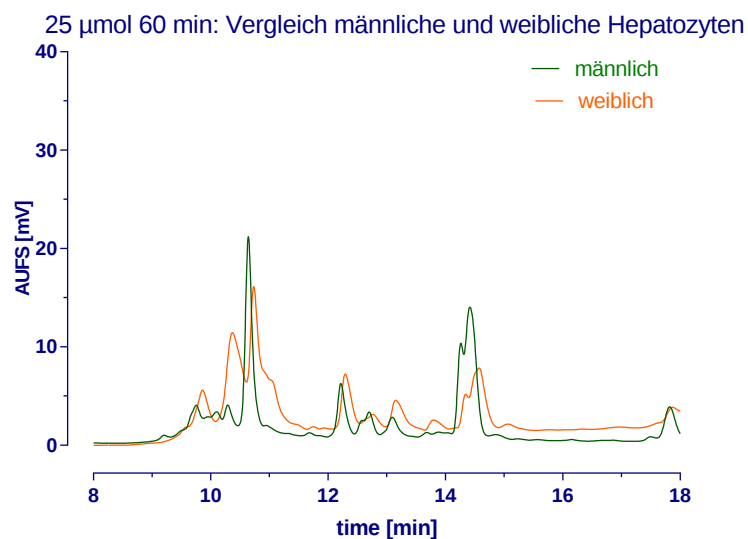


Abb.59: Vergleich der Abbauprodukte zwischen männlichen und weiblichen Hepatozyten

Es werden immer dieselben Abbauprodukte gebildet. Die Proben weisen daher dasselbe Peakmuster auf, wobei sie sich in ihrer Höhe unterscheiden. Somit sind bei männlichen und weiblichen Hepatozyten Umlagerungs- und Zerfallsprozesse am Abbau von SL 11 beteiligt. Wobei auch die Enzyme Einfluss auf den Abbau haben müssen, da beide Unterschiede zu den Leerwerten aufzeigen.

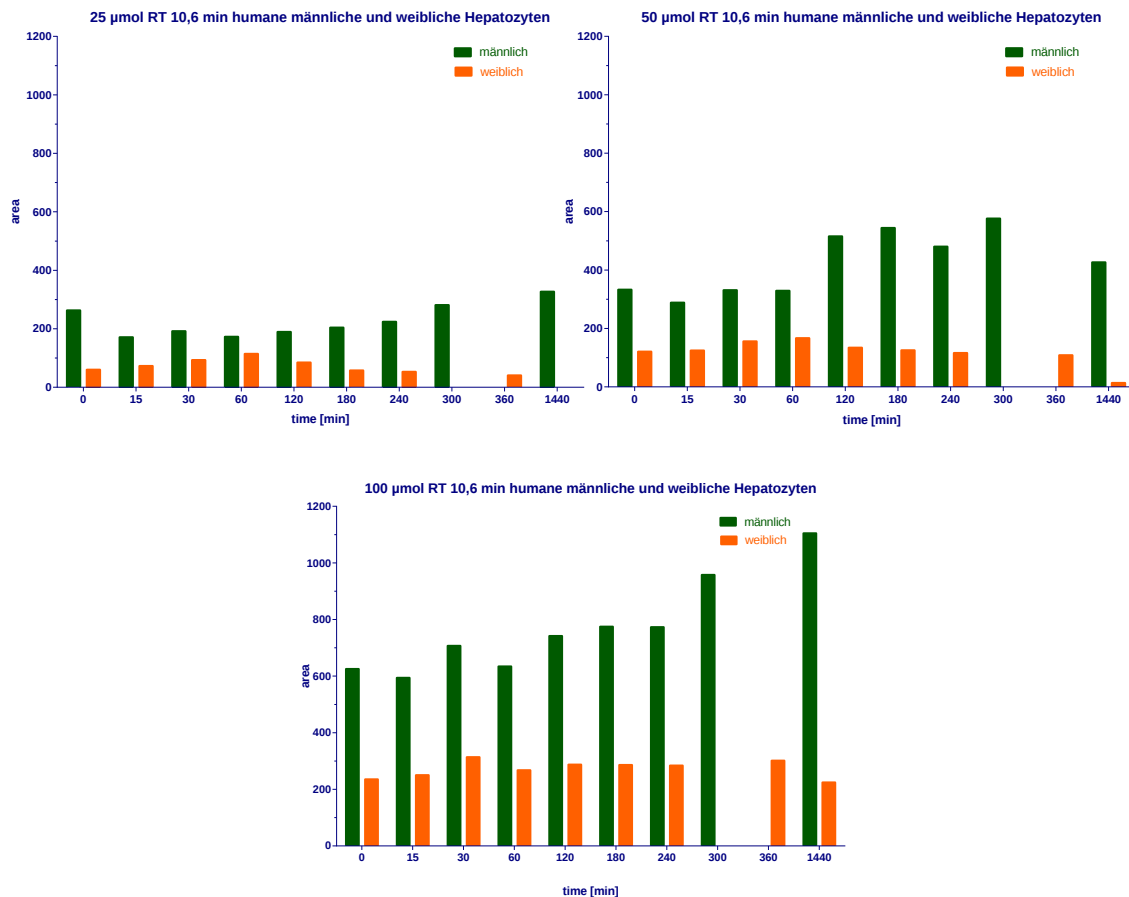


Abb.60: RT 10,6 min bei drei Konzentrationen: Vergleich männliche und weibliche Hepatozyten

Die Verbindung bei 10,6 min weist bei allen drei Konzentrationen bei den männlichen Hepatozyten höhere Peakflächen auf als bei den weiblichen Hepatozyten. Bei beiden kann allerdings beobachtet werden, dass sich die Verbindung über die Zeit relativ konstant verhält.

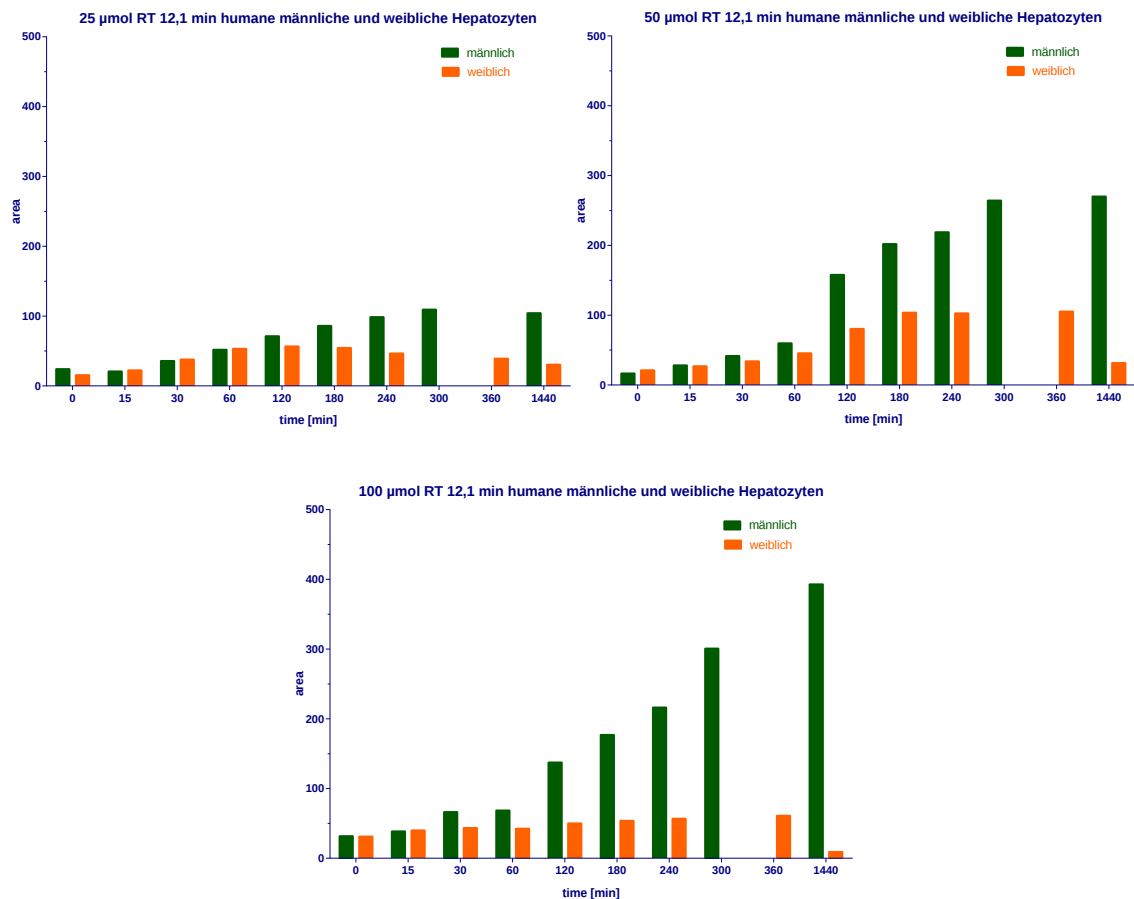


Abb.61: RT 12,1 min bei drei Konzentrationen: Vergleich männliche und weibliche Hepatozyten

Hier zeigt sich der größte Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Hepatozyten nach zwei Stunden bei 50 µmol sowie bei 100 µmol. In der ersten Stunde wird annähernd gleich viel dieser Verbindung gebildet, wobei zu späteren Zeitpunkten bei den männlichen Hepatozyten dieses Abbauprodukt wieder verstärkt auftritt. Bei den männlichen Zellen zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg dieser Verbindung während bei den weiblichen Hepatozyten ein Abfall zu den späteren Zeitpunkten beobachtet werden kann. Somit wird die Bildung dieses Abbauprodukts durch die männlichen Hepatozyten gefördert. Wobei diese möglicherweise bei den weiblichen Hepatozyten vermehrt abgebaut wird, da sich bei den Leerwerten höhere Peaks finden (siehe Kapitel weibliche Hepatozyten S.57) Wie bereits erwähnt konnten aber in den Chromatogrammen keine zusätzlichen Peaks gefunden werden.

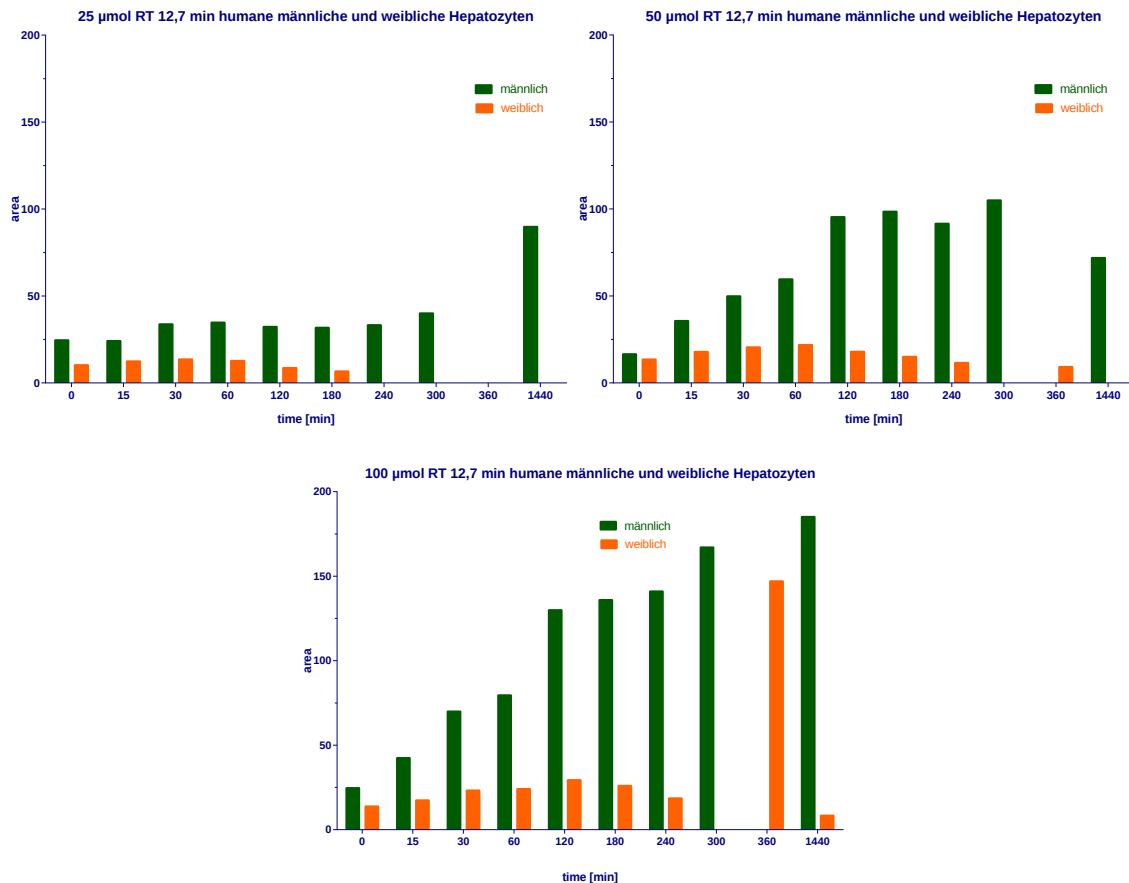
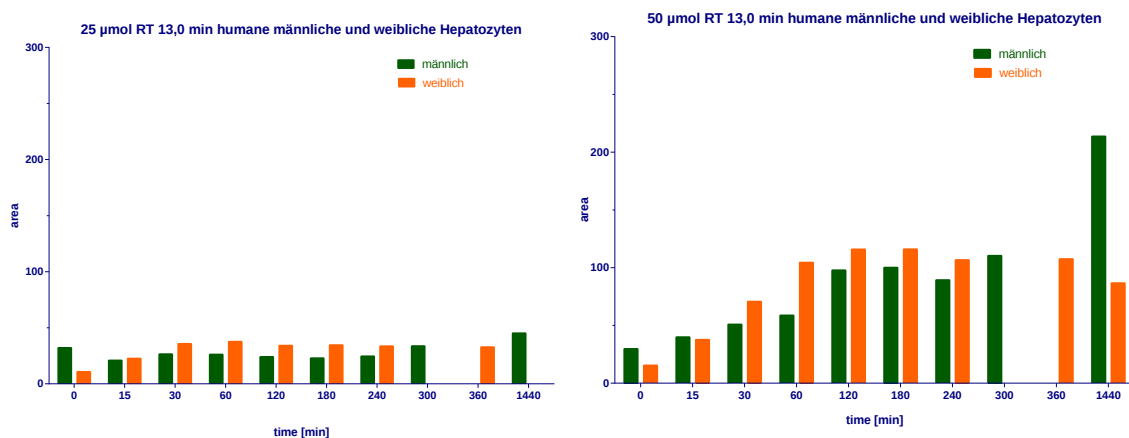


Abb.62: RT 12,7 min bei drei Konzentrationen: Vergleich männliche und weibliche Hepatozyten

Das Abbauprodukt bei einer Retentionszeit von 12,7 min wird bei allen Konzentrationen vermehrt bei den männlichen Hepatozyten nachgewiesen. Wiederum findet sich bei diesen ein kontinuierlicher Anstieg und bei den weiblichen Zellen fällt diese Verbindung nach zwei Stunden wieder ab.



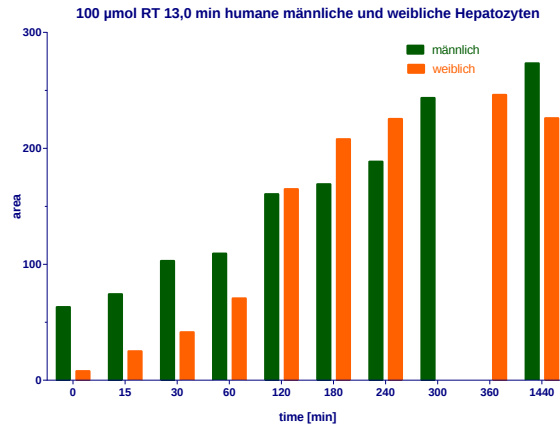


Abb.63: RT 13,0 min bei drei Konzentrationen: Vergleich männliche und weibliche Hepatozyten

Die Verbindung bei 13,0 min wird vermehrt bei den weiblichen Hepatozyten gebildet, dies kann vor allem bei 25 und 50 µmol beobachtet werden. Bei der Konzentration mit 100 µmol wird anfangs bei den männlichen Zellen mehr gebildet aber bereits nach 120 min findet sich diese Verbindung auch verstärkt bei den weiblichen Hepatozyten. Somit wird die Bildung dieses Abbauprodukts vermehrt durch die weiblichen Zellen gefördert.

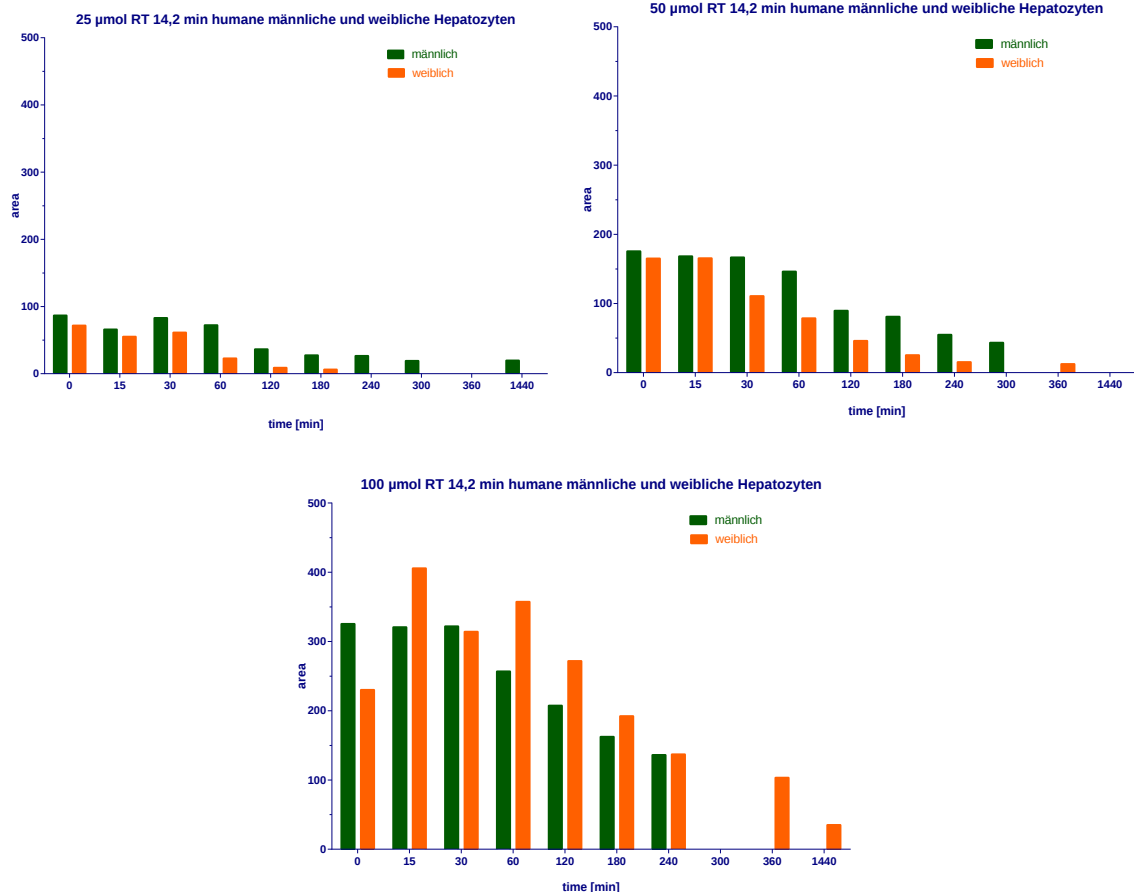


Abb.64: RT 14,2 min bei drei Konzentrationen: Vergleich männliche und weibliche Hepatozyten

Beide Geschlechter weisen meistens einen Doppelpeak auf, wodurch das Abbauprodukt bei 14,2 min aufgezeigt wird. Bei den beiden niedrigeren Konzentrationen wird zuerst annähernd gleich viel dieser Verbindung gebildet aber nach 30 min weisen die männlichen Hepatozyten einen höheren Peak auf. Bei der Konzentration von 100 μmol wird, außer beim ersten Abnahmezeitpunkt, durch die weiblichen Hepatozyten mehr dieser Verbindung gebildet.

In den Chromatogrammen zeigen sich noch zwei weitere Abbauprodukte von SL 11. Diese wurden aufgrund der sehr kleinen Peaks bei den männlichen Hepatozyten nicht genauer analysiert.

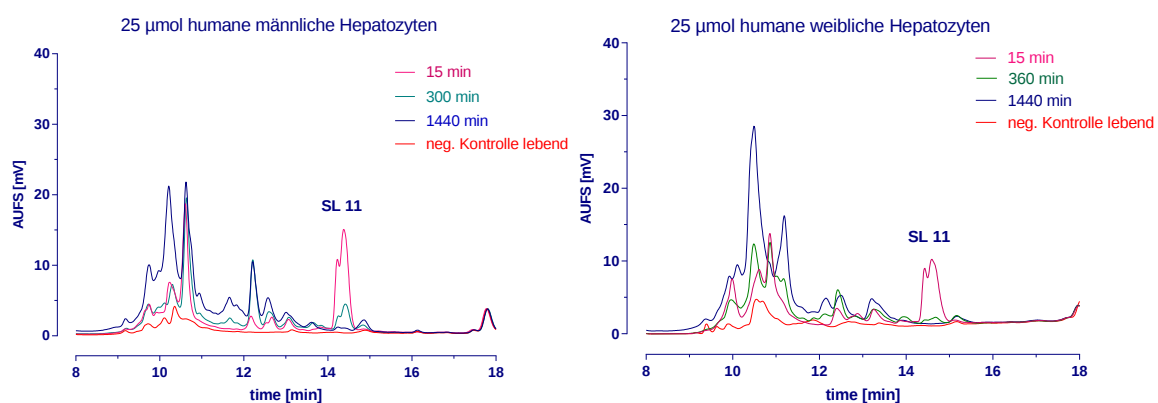


Abb.65: Vergleich männliche und weibliche Hepatozyten

Bei beiden Geschlechtern treten bei einer Retentionszeit von 10,0 und 10,3 min zwei weitere Peaks auf, wobei sich die Zeiten bei den männlichen Zellen um 0,2 min nach vorne verschieben. Dennoch handelt es sich eindeutig um die gleichen Verbindungen. Auffällig ist, dass diese Peaks bei den weiblichen Hepatozyten wesentlich höher und bereits nach 15 min deutlich erkennbar sind und mit der Zeit immer weiter ansteigen. Bei den männlichen Hepatozyten werden diese Verbindungen in wesentlich kleineren Mengen gebildet. Erst nach 24 h steigen die Peaks deutlich an. Wodurch wiederum quantitative Unterschiede zum Ausdruck kommen. Es handelt sich aber auch hier um Verbindungen die nicht allein auf die metabolische Aktivität der Zellen zurückzuführen sind, da diese auch bei den Leerwerten sowie in den negativ Kontrollen in kleinen Mengen auftreten. Allerdings kann aufgrund der quantitativen Unterschiede eine enzymatische Beteiligung nicht ausgeschlossen werden.

4. Zusammenfassung

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit dem Phase I und II Metabolismus von neuen Anthrachinonderivaten.

Im Zuge der Esteraseversuche stellte sich heraus, dass SL 22 zu SL 11 metabolisiert wird. Wodurch SL 22 als Prodrug bezeichnet werden kann, dessen aktiver Metabolit SL 11 darstellt. Zudem zeigt sich, dass mit porciner Carboxylesterase bei steigenden Substratkonzentrationen von SL 22 eine Enzymsättigung und damit eine Michaelis-Menten-Kinetik auftritt. Diese verläuft bei einer Enzymkonzentration von 1 Unit und 5 Units ähnlich.

Tab.28: Überblick Michaelis Menten Kinetik

Michaelis-Menten-Kinetik				
Wellenlänge	Km [$\mu\text{mol}/\text{min}$]		Vmax [$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg prot.}$]	
	5 Units	1 Unit	5 Units	1 Unit
235 nm	59,51	114,4	0,01137	0,01934
270 nm	80,63	81,09	0,01221	0,001336

Im Laufe der Versuchsreihe mit den Hepatozyten wurde die Metabolisierung von SL 11 untersucht. Außerdem wurden Leerwertproben durchgeführt, welche zeigen, dass SL 11 unter den gegebenen Bedingungen eine hohe Instabilität aufweist. Somit kommt es in allen hergestellten Konzentrationen von SL 11 zu einem starken nicht-enzymatischen Substanzabbau. Hauptursache dafür ist wahrscheinlich der Einfluss von Licht und Wärme bei der Bearbeitung der Proben. Dadurch liegt die metabolische Umsetzung von SL 11 bei den weiblichen wie männlichen Hepatozyten unter 50%, da der restliche Substanzabbau wahrscheinlich auf Zerfalls- und Umlagerungsprozesse zurückzuführen ist.

Im Vergleich weisen die männlichen Hepatozyten eine höhere metabolische Stabilität und somit eine geringere metabolische Umsetzung von SL 11 auf.

Tab.29: Metabolische Umsetzung männliche und weibliche Hepatozyten

Metabolische Umsetzung [%]						
Zeit [min]	25 μmol		50 μmol		100 μmol	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
0	23,34	33,28	19,77	23,98	6,95	10,32
15	36,04	42,77	19,77	25,40	17,87	21,48
30	30,07	39,18	22,39	33,17	20,99	25,52
60	34,79	43,94	23,19	29,10	17,46	21,84
120	38,18	46,24	21,07	31,90	10,56	15,50
180	23,09	30,09	7,46	17,09	2,97	7,78
240	24,94	31,86	11,29	19,28	11,03	16,53
300/360	30,67	36,90	11,27	18,99	2,05	14,29
1440	24,31	24,31	24,34	25,07	3,45	10,95

Weiters wurde ersichtlich, dass keine neuen Metaboliten, mit Hilfe der Hepatozyten, gebildet werden. Männliche sowie weibliche Hepatozyten weisen dieselben Peaks wie die Leerwerte auf. Allerdings unterscheiden sich die einzelnen Abbauprodukte quantitativ.

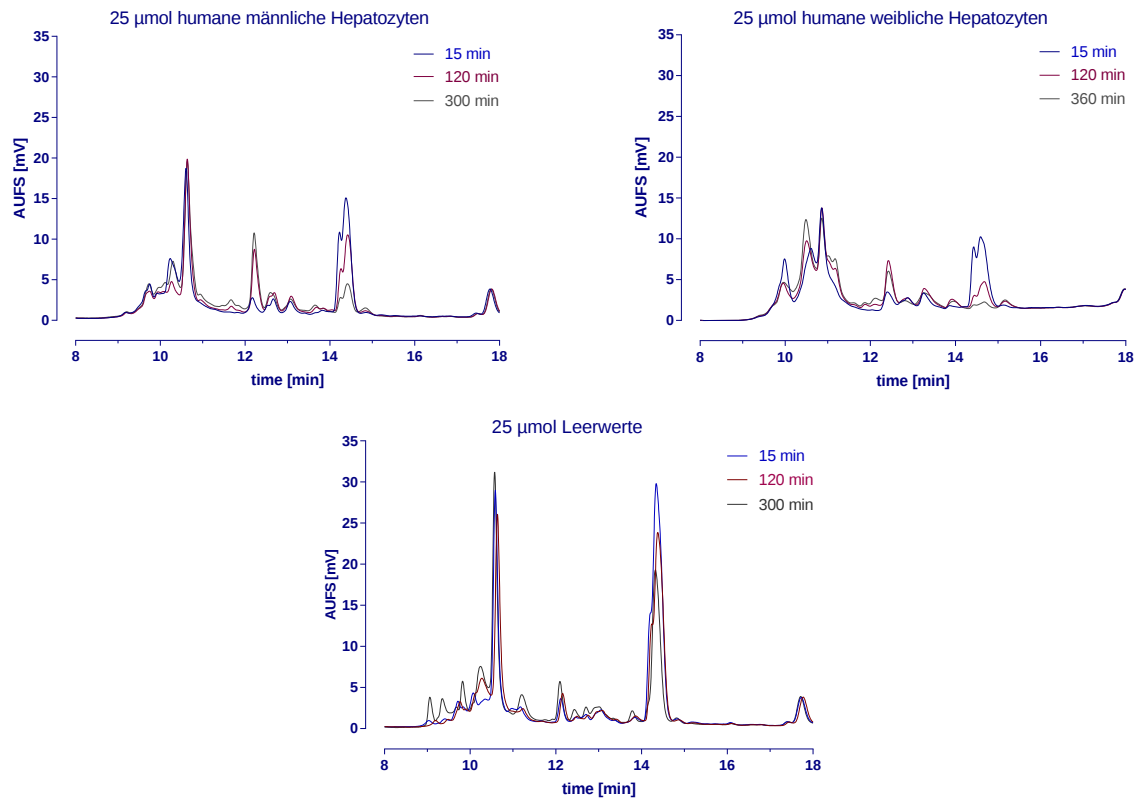


Abb.66: Vergleich von männlichen und weiblichen Hepatozyten und Leerwerten

Bei den weiblichen Hepatozyten wird vermehrt die Verbindung bei 13,0 min und teilweise jene bei 14,2 min gebildet. Zudem zeigen sich bei einer Retentionszeit von 10,0 min und 10,3 min höhere Peaks. Die restlichen Verbindungen weisen einen höheren Peak bei den männlichen Hepatozyten auf. Somit wird vor allem bei den männlichen Hepatozyten die Bildung der Umlagerungsprodukte durch die Zellen gefördert. Die weiblichen Hepatozyten weisen meist geringere Peakflächen der Abbauprodukte als die männlichen Zellen sowie die der Leerwerteproben auf. Möglicherweise werden im Zuge der erhöhten metabolischen Aktivität die einzelnen Abbauprodukte zum Teil weiter metabolisiert. Diese kann jedoch nicht bestätigt werden, da in den Chromatogrammen keine zusätzlichen Peaks gefunden wurden.

5. Summary

This thesis addresses the phase I and II metabolism of new Anthraquinone derivatives. During the esterase experiment it was revealed that SL 22 is metabolized to SL 11. As a result of this experiment, SL 22 can be identified as a prodrug, while SL 11 represents its active metabolite. Furthermore, a saturation of enzymes occurs when there is porcine carboxylesterase on increasing substrate concentration of SL 22. Hence it resembles a Michaelis-Menten-Kinetics, which proceeds similar with an enzyme concentration of 1 unit and 5 units.

Tab.30: Survey of Michaelis Menten kinetic

Michaelis-Menten-kinetic				
wavelength	Km [$\mu\text{mol}/\text{min}$]		Vmax [$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg prot.}$]	
	5 units	1 unit	5 units	1 unit
235 nm	59,51	114,4	0,01137	0,01934
270 nm	80,63	81,09	0,01221	0,001336

In 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 instability under these circumstances. Consequently, a strong non-enzymatic substance reduction is the result in all produced concentrations of SL 11. The main cause for this result is most likely the effect of light and heat during the handling with the samples. Thereby the metabolic transformation of SL 11 with female and male hepatocytes is under 50% because the remaining substance reduction can mainly be traced back to decomposition and relocation processes. By contrast, the male hepatocytes show a higher metabolic stability and therefore a lower metabolic transformation of SL 11.

Tab.31: Metabolic transformation from male and female hepatocytes

Metabolic Transformation [%]						
time [min]	25 μmol		50 μmol		100 μmol	
	male	female	male	female	male	female
0	23,34	33,28	19,77	23,98	6,95	10,32
15	36,04	42,77	19,77	25,40	17,87	21,48
30	30,07	39,18	22,39	33,17	20,99	25,52
60	34,79	43,94	23,19	29,10	17,46	21,84
120	38,18	46,24	21,07	31,90	10,56	15,50
180	23,09	30,09	7,46	17,09	2,97	7,78
240	24,94	31,86	11,29	19,28	11,03	16,53
300/360	30,67	36,90	11,27	18,99	2,05	14,29
1440	24,31	24,31	24,34	25,07	3,45	10,95

Additionally the analysis revealed that no new metabolites were formed with support of hepatocytes. Male and female hepatocytes share the same peaks like the blank samples, but the individual reduction products differ.

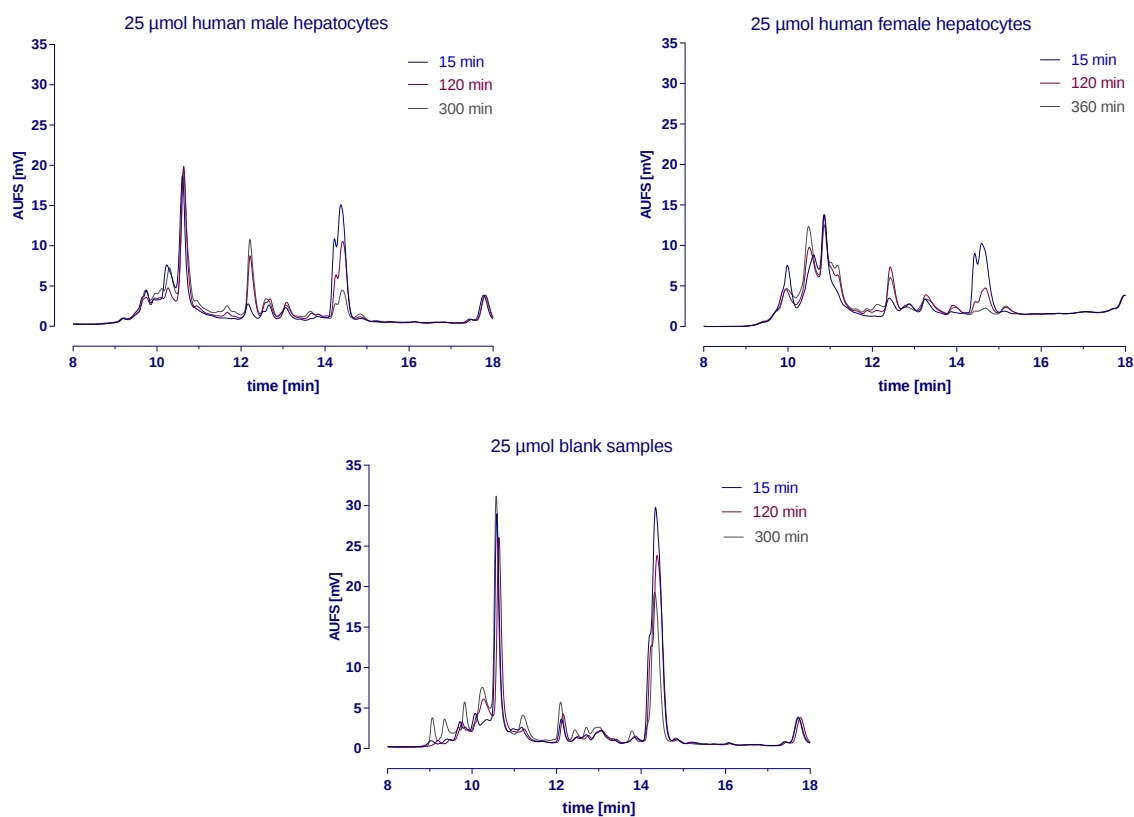


Figure 67: Comparison of male and female hepatocytes and blank values

For the most part, the female hepatocytes form this connection at 13,0 min and at 14,2 min respectively. Furthermore higher peaks occur at a detention period of 10 and 10,3 min. The remaining connections indicate higher peaks for male hepatocytes. As a conclusion, the formation of relocation products of male hepatocytes is particularly stimulated by the cells. The female hepatocytes mostly indicate lower peak areas on reduction products than the male cells and the blank samples. The reduction products can possibly be metabolized to a further extent because of the raised metabolic activities. But there is no evidence for that, because there are no further peaks in the chromatogram.

6. Conclusio

Im Zuge dieser Diplomarbeit konnten wesentliche Erkenntnisse bezüglich des Metabolismus von SL 22 und SL 11, sowie zur Substanzinstabilität von SL 11 gewonnen werden.

SL 22 stellt ein Prodrug dar, wodurch bei der Herstellung möglicher Arzneiformulierungen und anschließender Verabreichung auf die enzymatische Aktivierung geachtet werden muss.

SL 11 weist eine hohe Instabilität unter den gegebenen Bedingungen auf. Aufgrund der Instabilität der Substanz könnte die Bioverfügbarkeit und somit die Wirkung der Verbindung beeinflusst werden.

Die Metabolisierung von SL 11 liegt in diesen Versuchen unter 50%, jedoch muss die Substanzinstabilität berücksichtigt werden. Die Abbauprodukte entstehen wahrscheinlich einerseits aufgrund von Umlagerungs- und Zerfallsprozessen und andererseits durch die Enzyme der Hepatozyten.

Weitere Untersuchungen mit Enzyminhibitoren könnten Aufschluss über die enzymatische Beteiligung und der dadurch entstehenden Abbauprodukte von SL 11, liefern.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Hans Marquardt; Siegfried G. Schäfer: Lehrbuch der Toxikologie, 2.Auflage, 2003, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, p.90;114-115
- [2] Sebastian Härtter: In vitro Methoden zur Untersuchung des Phase I Metabolismus, Journal: Pharmazie in unserer Zeit, 2000, 29(6), 365-371
- [3] Thomas Efferth: Molekulare Pharmakologie und Toxikologie, 2006, Springer-Verlag, Heidelberg, p.5-6;19-21
- [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; 50-52; 63; 56-57
- [5] Ernst Beat; Alexander Vögtli: Moderne Pharmakokinetik: Transport durch Membranen, 1.Auflage, 2010, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, p.2023-2024; 2027
- [6] Georg Löffler; Petro E. Petrides: Biochemie und Pathobiochemie, 6.Auflage, 1998, Springer Verlag, Heidelberg, p.1032
- [7] Helmut Greim; Robert Snyder: Toxicology and Risk Assessment: a Comprehensive Introduction, 1. Auflage, 2008, John Wiley & Sons, Chichester, p.52; 70; 72
- [8] Shayne Cox Gad: Preclinical Development Handbook: Toxicology, 1. Auflage, 2008, John Wiley & Sons; Hobokon, p.472-473
- [9] Marianne J. Legato; John P. Bilezikian: Principles of Gender-specific Medicine, 2.Auflage, 2004, Elsevier Academic Press, London, p.826-827
- [10] Renzo Wolbold; Kathrin Klein; Oliver Burk; Andreas K. Nüssler; Peter Neuhaus; Michel Eichelbaum; Matthias Schwab; Ulrich M. Zanger: Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver, Journal: Hepatology, 2003, 38(4), 978-988
- [11] H. Wiener: Pharmakokinetische und pharmakodynamische Unterschiede zwischen den Geschlechtern, Journal für Hypertonie, 2008, 12(2), 22-25

- [12] Ian R. Phillips; Elizabeth A. Shephard: Cytochrome P450 Protocols, 2.Auflage, 2010, Humana Press, Totowa, p.21; 255-256
- [13] Alan G. E. Wilson; David E. Thurston; David Rotella: New Horizons in Predictive Toxicology: Current Status and Application, 2011, RSC Publishing, Cambridge, p.226-227
- [14] Julia Schlüter: Schutzkonzepte für menschliche Keimbahnzellen in der Fortpflanzungsmedizin, 1.Auflage, 2008, Lit Verlag, Münster, p.27
- [15] Gary Evans: A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism, 2004, CRC Press LCC, Boca Raton, p.244-245; 248
- [16] Robert Chilcott; Shirley Price: Principles and Practice of Skin Toxicology, 1.Auflage, 2008, John Wiley & Sons, Chichester, p.34-35
- [17] E. Brüsehaber, D. Böttcher, A. Musidlowaska-Persson, D. Albrecht, M. Hecker, K. Doderer, U. T. Bornscheuer: Identification of pig liver esterase variants by tandem mass spectroscopy analysis and their characterization Journal: Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(4), 853-859
- [18] Malte Folkerts, Eva Kächler, Andreas Sönnichsen: Intensivkurs Biochemie, 1.Auflage, 2005, Urban & Fischer/Elsevier GmbH, p.16-29
- [19] Pamela C. Champe; Richard A. Harvey; Denise R. Ferrier: Biochemistry (Lippincott's Illustrated Reviews Series), 3rd Edition, 2005, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, p.59
- [20] Michael Rieth: Pharmazeutische Mikrobiologie: Qualitätssicherung, Monitoring, Betriebshygiene, 1.Auflage, 2012, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, p.212
- [21] Veronika R. Meyer: Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 10.Auflage, 2009, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, p.5;8
- [22] Höll Karl, Reinhard Niessner: Wasser: Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung, 9.Auflage, 2010, De Gruyter & Co KG, Berlin, p.213

8. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Allgemeine Anthrachinon Grundstruktur	1
Abb.2: SL 11 und SL 22 Grundstruktur	1
Abb.3.: Phase I und Phase II Metabolismus	3
Abb.4: Caclulator	12
Abb.5: Vortex	14
Abb.6: Heizblock	14
Abb.7: Probenentnahme	14
Abb.8: Probenpipettierung in Eppendorfgefäß	14
Abb.9: Zentrifuge	15
Abb.10: Klarer Überstand und Mikroeingas	15
Abb.11: Beschriftete HPLC Vials	15
Abb.12: Sterilwerkbank	16
Abb.13: Wasserbad	16
Abb.14: Herstellung der Verdünnungsreihe	17
Abb.15: Probenentnahme aus 12well-plate	20
Abb.16: HPLC 4 System: VWR Hitachi	21
Abb.17: Chromatogramme der Eichgerade von SL 11	22
Abb.18: Eichgerade SL 11	22
Abb.19: Lineare Regression der errechneten Konzentrationen und Logarithmen, 5 Units 235/270 nm	24
Abb.20: Lineare Regression der errechneten Konzentrationen und Logarithmen, 1 Units 235/270 nm	24
Abb.21: Darstellungen der Metabolisierung von SL 22	26
Abb.22: Chemische Darstellung der Metabolisierung von SL 22	27
Abb.23: Chromatogramme des 5 Units Versuchs bei 235 nm bei drei Konzentrationen	28
Abb.24: Graphische Darstellungen des 5 Units Versuches bei 235 nm bei drei Konzentrationen	29
Abb.25: Michaelis-Menten-Graph 5 Units 235 nm	30
Abb.26: Michaelis-Menten-Graph 5 Units 270 nm	31
Abb.27: Chromatogramme des 1 Unit Versuches bei 270 nm bei drei Konzentrationen	33
Abb.28: Graphische Darstellungen des 1 Unit Versuches bei 270 nm bei drei Konzentrationen	34
Abb.29: Michaelis-Menten-Graph 1 Unit 235 nm	35
Abb.30: Michaelis-Menten-Graph 1 Unit 270 nm	36

Abb.31: Vergleich der Verbindung mit RT 14,2 min bei 270 nm	37
Abb.32: Chromatogramm der Eichgerade.....	38
Abb.33: Chromatogramme der Leerwerte bei einer Konzentration von 25 µmol	39
Abb.34: Vergleich von Eichgerade und Leerwert jeweils bei einer Konzentration von 25 µmol	39
Abb.35: Farbe mit und ohne Lichtschutz, ca. eine Stunde nach Herstellung der Lösung	40
Abb.36: Instabilität von SL 11	40
Abb.37: Enzymatischer Abbau von Testosteron in humanen männlichen Hepatozyten.....	42
Abb.38: Vergleich SL 11: Eichgerade, Leerwerte und männliche Hepatozyten in drei Konzentrationen	43
Abb.39: Metabolische Stabilität von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten	44
Abb.40: Metabolische Umsetzung von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten ..	45
Abb.41: Entstehende Verbindungen durch den Abbau von SL 11 der humanen männlichen Hepatozyten.....	46
Abb.42: Retentionszeit 10,6 min bei drei Konzentrationen der humanen männlichen Hepatozyten.....	47
Abb.43: Retentionszeit 12,1 min bei drei Konzentrationen der humanen männlichen Hepatozyten.....	48
Abb.44: Retentionszeit 12,7 min bei drei Konzentrationen der humanen männlichen Hepatozyten.....	49
Abb.45: Retentionszeit 13,0 min bei drei Konzentrationen der humanen männlichen Hepatozyten.....	50
Abb.46: Retentionszeit 14,2 min bei drei Konzentrationen der humanen männlichen Hepatozyten.....	50
Abb.47: Vergleich SL 11: Eichgerade, Leerwerte und weibliche Hepatozyten der drei Konzentrationen.....	52
Abb.48: Metabolische Stabilität von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten	53
Abb.49: Metabolische Umsetzung von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten....	54
Abb.50: Entstehende Verbindungen durch den Abbau von SL 11 der humanen weiblichen Hepatozyten	55
Abb.51: Retentionszeit 10,6 min bei drei Konzentrationen der humanen weiblichen Hepatozyten.....	56
Abb.52: Retentionszeit 12,1 min bei drei Konzentrationen der humanen weiblichen Hepatozyten.....	57

Abb.53: Retentionszeit 12,7 min bei drei Konzentrationen der humanen weiblichen Hepatozyten	58
Abb.55: Retentionszeit 13,0 min bei drei Konzentrationen der humanen weiblichen Hepatozyten	58
Abb.55: Retentionszeit 14,2 min bei drei Konzentrationen der humanen weiblichen Hepatozyten	59
Abb.56: Vergleich der metabolischen Stabilität der männlichen und weiblichen Hepatozyten	60
Abb.57: Logarithmische Darstellung des SL 11 Abbaus bei drei Konzentrationen	61
Abb.58: Vergleich der metabolischen Umsetzung der männlichen und weiblichen Hepatozyten	63
Abb.59: Vergleich der Abbauprodukte zwischen männlichen und weiblichen Hepatozyten	63
Abb.60: RT 10,6 min bei drei Konzentrationen: Vergleich männliche und weibliche Hepatozyten.....	64
Abb.61: RT 12,1 min bei drei Konzentrationen: Vergleich männliche und weibliche Hepatozyten.....	65
Abb.62: RT 12,7 min bei drei Konzentrationen: Vergleich männliche und weibliche Hepatozyten	66
Abb.63: RT 13,0 min bei drei Konzentrationen: Vergleich männliche und weibliche Hepatozyten	67
Abb.64: RT 14,2 min bei drei Konzentrationen: Vergleich männliche und weibliche Hepatozyten	67
Abb.65: Vergleich männliche und weibliche Hepatozyten.....	68
Abb.66: Vergleich männliche, weibliche Hepatozyten und Leerwerten	70
Fig. 67: Comparison of male and female hepatocytes and blank values.....	72

9. Tabellenverzeichnis

Tab.1: Weitere Enzyme des Phase I Metabolismus	3
Tab.2: Enzyme des Phase II Metabolismus	4
Tab.3: Beispiele für Enzyminduktoren und –inhibitoren.....	5
Tab.4: Verwendetet Materialien und Geräte	9
Tab.5: Verwendete Reagenzien und Chemikalien	10
Tab.6: Verwendetet Software.....	10
Tab.7: Menge der verwendeten Substanzen – Esteraseveruche	13
Tab.8: Pipettierschema für metabolische Stabilität.....	19
Tab.9: Parameter HPLC 4	21
Tab.10: Daten Menten-Kinetik – 5 Units, 235 nm.....	30
Tab.11: Best fit values Michaelis-Menten-Kinetik 5 Units 235 nm	31
Tab.12: Daten Menten-Kinetik – 5 Units, 270 nm.....	31
Tab.13: Best fit values Michaelis-Menten-Kinetik 5 Units 270 nm	32
Tab.14: Daten Menten-Kinetik – 1 Units, 235 nm.....	35
Tab.15: Best fit values Michaelis-Menten-Kinetik 1 Unit 235 nm	35
Tab.16: Daten Menten-Kinetik – 1 Units, 270 nm.....	36
Tab.17: Best fit values Michaelis-Menten-Kinetik 1 Unit 270 nm	36
Tab.18: Peakflächen der Eichgerade – Hepatozytenversuche	38
Tab.19: Peakflächen von SL 11 der Leerwerte	39
Tab.20: Substanzinstabilität von SL 11	39
Tab.21: Metabolische Stabilität Testosteron	41
Tab.22: Peakflächen von SL 11 – humane männliche Hepatozyten.....	44
Tab.23: Metabolische Stabilität von SL 11 – humane männliche Hepatozyten.....	44
Tab.24: Metabolische Umsetzung - humane männliche Hepatozyten	45
Tab.25: Peakflächen von SL 11 – humane weibliche Hepatozyten	53
Tab.26: Metabolische Stabilität von SL 11 – humane weibliche Hepatozyten	53
Tab.27: Metabolische Umsetzung - humane weibliche Hepatozyten.....	54
Tab.28: Überblick Michaelis-Menten-Kinetik	69
Tab.29: Metabolische Umsetzung männliche und weibliche Hepatozyten.....	70
Tab.30: Survey of Michaelis Menten kinetic	71
Tab.31: Metabolic transformation from male and female hepatocytes.....	71

10. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
CES	Carboxylesterase
CHRM	Cryopreserved Hepatocyte Recovery Medium
CYP	Cytochrom
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
g	Gramm
hCE	humane Carboxylesterase
Hep	Hepatozyten
HPLC	High-performance liquid chromatography
k	Steigung
K _m	Michaeliskonstante
k _{met}	Steigung des Metaboliten
l	Liter
ln	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
LW	Leerwert
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
neg.	negativ
PBS	Phosphatpuffer
PLE	porcine Carboxylesterase
prot	Protein
r	Korrelationskoeffizient
RT	Retentionszeit
SL	Substanzen der Firma Sealife Pharma GmbH
Tes	Testosteron
U	Unit(s)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
WME	Williams Medium E
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

11. Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Astrid Köberl
Geburtsdatum	07.12.1989 in Melk
Familienstand	Ledig
Staatsbürgerschaft	Österreich

BERUFSERFAHRUNG

WS 2014/15	Tutorin für das Labor Klinische Pharmazie und Diagnostik
03/ 2013 - 12/ 2014	Apotheke Hainfeld (geringfügig)
<u>Ferialjobs</u>	
2014	Apotheke Hainfeld
2013	Apotheke Hainfeld, Apotheke Neulengbach
2010 - 2012	Apotheke Ybbs an der Donau

AUSBILDUNG

<u>Studium</u>	
2009 - 2015	Universität Wien, Pharmazie
2008 - 2009	Universität Wien, Institut für Bildungswissenschaft
<u>Schulbildung</u>	
2004 - 2008	Oberstufenrealgymnasium Englische Fräulein Krems
2000 - 2004	Hauptschule Pöggstall
1996 - 2000	Volksschule Raxendorf

SPEZIELLE KENNTNISSE

Englisch in Wort und Schrift
Latein
sehr gute MS-Office Kenntnisse
Ausbildung zur Peer-Mentorin

INTERESSEN

Tennis , Schifahren
Literatur