

N-Vinyl-2-pyrrolidon:
Untersuchungen zum hepatokanzerogenen Mechanismus

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmakologie und Toxikologie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Daniela Fruth

geb. in Frankenthal (Pfalz)

Mainz, 2019

Datum der mündlichen Prüfung: 28.03.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 NVP: Aktueller Kenntnisstand des Toxizitätsprofils	3
1.2.1 Toxikokinetik und Metabolismus.....	3
1.2.2 Haut- und Schleimhautreizende Wirkung.....	8
1.2.3 Akute Toxizität.....	8
1.2.4 Hautsensibilisierung	10
1.2.5 Toxizität nach wiederholter Verabreichung	10
1.2.5.1 Subakute und subchronische Toxizität.....	10
1.2.5.2 Chronische Toxizität und Kanzerogenität.....	18
1.2.5.3 Reproduktionstoxizität.....	21
1.2.6 Gentoxizität und Mutagenität.....	22
1.2.7 Epidemiologie.....	23
1.2.8 Zusammenfassung des Toxizitätsprofils	24
2 Ziel der Arbeit.....	25
3 Material und Methoden.....	27
3.1 Mechanistische Untersuchungen <i>in vivo</i> : Fünftägige NVP-Inhalationsstudie an Wistar Ratten.....	27
3.1.1 Studiendesign.....	27
3.1.2 Exposition.....	28
3.1.3 Sektion	29
3.1.4 Gentoxizität	30
3.1.4.1 Mikrokern Test.....	30
3.1.4.2 Comet Assay	33
3.1.5 Oxidativer Stress	38
3.1.5.1 Nicht proteingebundene Sulfhydrylgruppen.....	38
3.1.5.2 Glutathion-Recycling-Assay	40
3.1.6 Rezeptorvermittelte Mechanismen	43
3.1.6.1 AhR, CAR und PXR (AROD-Assay).....	43
3.1.6.2 PPAR α : Laurinsäure Assay.....	47
3.1.6.3 PPAR α : Palmitoyl-CoA-Oxidase Assay.....	51
3.1.7 Histologische Untersuchungen der Leber	53
3.1.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	53
3.1.7.2 Oil-Red-O-Färbung	54
3.2 <i>in vitro</i> Untersuchungen	55
3.2.1 Abiotische Stabilität	55
3.2.2 Metabolische Stabilität.....	58
3.2.2.1 Subzelluläre Fraktionen	58

Inhaltsverzeichnis

3.2.2.2 Hepatozyten.....	60
3.2.2.3 Präzisionsleberschnitte	62
3.2.2.4 Blut	63
3.2.2.5 Zytotoxizität: MTT-Assay in Hepatozyten und PCLS	64
4 Ergebnisse	66
4.1 Mechanistische Untersuchungen <i>in vivo</i> : Fünftägige NVP-Inhalationsstudie an Wistar Ratten.....	66
4.1.1 Exposition.....	66
4.1.2 Befunde.....	67
4.1.2.1 Klinische Befunde	67
4.1.2.2 Histologische Befunde	68
4.1.3 Gentoxizität	70
4.1.3.1 Mikronukleus Test.....	70
4.1.3.2 Comet Assay	72
4.1.4 Oxidativer Stress	86
4.1.5 Rezeptorvermittelte Mechanismen	91
4.1.5.1 AhR, CAR, PXR (AROD Assay).....	91
4.1.5.2 PPAR α	97
4.2 <i>in vitro</i> Untersuchungen	104
4.2.1 Abiotische Stabilität	104
4.2.2 <i>in vitro</i> Metabolismus.....	107
4.2.2.1 Subzelluläre Fraktionen	107
4.2.2.2 Hepatozyten.....	113
4.2.2.3 Präzisionsleberschnitte	114
4.2.2.4 Blut	117
5 Diskussion.....	118
5.1 Mechanistische Untersuchungen <i>in vivo</i> : Fünftägige NVP-Inhalationsstudie mit Wistar Ratten.....	118
5.1.1 Befunde.....	118
5.1.1.1 Klinische Befunde	118
5.1.1.2 Histologische Befunde	119
5.1.2 Gentoxizität	121
5.1.2.1 Mikronukleus Test.....	121
5.1.2.2 Comet Assay	123
5.1.2.3 Abschließende Diskussion zur Gentoxizität NVPs.....	129
5.1.3 Oxidativer Stress	133
5.1.4 Rezeptorvermittelte Mechanismen	137
5.2 <i>in vitro</i> Untersuchungen	146
5.2.1 Abiotische Stabilität	146
5.2.2 <i>in vitro</i> Metabolismus.....	150
6 Zusammenfassung.....	161
7 Literaturverzeichnis	164
8 Anhang.....	176

Inhaltsverzeichnis

I Chemikalienliste.....	176
II Geräteliste	178
III Einzelwerte des AROD-Assays.....	180
IV Laurinsäure Assay: Ansatzüberprüfung der ¹⁴ C-markierten Laurinsäure zum Einsatz im Laurinsäure Assay	195
V Kalibriergeraden der (Headspace-)GC-MS-Bestimmungen von NVP, 2-Pyrrolidon und Acetaldehyd.....	196
VI Testosteronbestimmungsmethoden.....	198
VII Veröffentlichungen.....	199

Abkürzungsverzeichnis

2-OH-NMS	2-Hydroxy-N-methylsuccinimid
2-OH-NVS	2-Hydroxy-vinylsuccinimid
2-VP	2-Vinylpyridin
5-OH-NVP	5-Hydroxy-N-vinylpyrrolidon
5-SSA	5-Sulfosalicylsäure
AAALAC	Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care
ACN	Acetonitril
AhR	Arylhydrocarbonrezeptor
AI	aktive Inkubation
AROD	Alkoxyresorufindealkylase
BROD	Benzoxo-Resorufin-Dealkylase
BSA	Bovines Serum Albumin
Bq	Bequerel
CAR	konstitutiver Androstan-Rezeptor
CoA	Koenzym A
ddH ₂ O	Reinstwasser
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
EROD	Ethoxy-Resorufin-Dealkylase
FBS	fetales Kälberserum
FID	Flammenionisationsdetektor
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-glycosylase
γ-GT	γ-Glutamyltransferaseaktivität
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-6-P-DH	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
GABA	γ-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion (oxidiert)
GSSG	Glutathion (reduziert)
GST	Glutathion-S-Transferase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDK	hitzenedenaturierte Kontrolle
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGM	Hepatocyte Growth Medium
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
LMA	"low melting" Agarose

Abkürzungsverzeichnis

LOD	Nachweisgrenze („limit of detection“)
LOQ	Bestimmungsgrenze („limit of quantification“)
MNT	Mikronukleus Test/ Mikrokerntest
MS	Massenspektrometer
MTD	maximal tolerierbare Dosis
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NCE	normochromatische Erythrocyten
NEP	N-Ethylpyrrolidon
NMA	"normal melting" Agarose
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMS	N-Methylsuccinimid
NPSH	nicht proteingebundene Sulfhydrylgruppen
NVP	N-Vinyl-2-pyrrolidon
NVS	N-Vinylsuccinimid
OH-	Hydroxy-
ORO	Oil-Red-O
OT	Objektträger
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered salt solution)
PCE	polychromatische Erythrocyten
PCLS	Präzisionsleberschnitte (precision cut liver slices)
PK	Pufferkontrolle
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PROD	Pentoxy-Resorufin-Dealkylase
PXR	Pregnan-X-Rezeptors
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
TEA	Triethylamin
tGSH	Gesamtglutathion (reduziert und oxidiert)
TI	Fluoreszenzintensität im Schweif (<i>Tail Intensity</i>)
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäure
VF	Verdünnungsfaktor

1 Einleitung

1.1 Einführung

N-Vinyl-2-pyrrolidon (NVP, CAS-Nr. 88-12-0), dargestellt in Abbildung 1, ist eine bedeutende Industriechemikalie, welche jährlich in einem Maßstab von mehreren tausend Tonnen produziert wird. NVP ist eine mit Wasser vollständig mischbare, bei Raumtemperatur farblose bis gelbliche Flüssigkeit, die ohne zugesetzten Stabilisator zur exothermen Polymerisation neigt. Weitere physikochemische Eigenschaften sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Basierend auf den chemischen Eigenschaften der Vinylgruppe (radikalischen Polymerisation) wird NVP im Wesentlichen als Monomer zur Herstellung von Polyvinylpyrrolidonen (PVP) und weiteren Copolymeren eingesetzt, welche weite Verbreitung in der pharmazeutischen sowie kosmetischen Industrie und Lebensmitteltechnologie finden. UV-härtende Klebstoffe, Druckfarben, Coatings und der Zusatz bei der Herstellung von Kontaktlinsen sind weitere typische Anwendungsgebiete des NVPs.

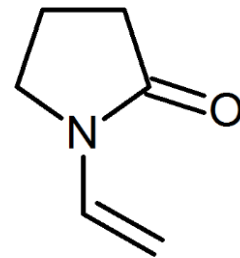


Abbildung 1: Strukturformel von NVP

Aufgrund des vielfältigen Einsatzes von NVP und dessen Polymeren ist eine Exposition von Konsumenten gegenüber NVP möglich und eine toxikologische Bewertung und Einordnung von NVP daher von besonderer Bedeutung.

Es ist bekannt, dass die Inhalation von 0,5 ppm NVP innerhalb von 28 Tagen bei einer Exposition von 6 Stunden pro Tag zu Leberzellproliferation [BASF, 2011] und ab der niedrigsten getesteten inhalativen Konzentration von 5 ppm über 2 Jahre zu Leberkarzinomen sowie ab einer Expositionskonzentration von 10 ppm zu Tumoren des oberen Atemtrakts in der Ratte führt [Klimisch *et al.*, 1997b]. Aufgrund der geringen kanzerogenen Effektkonzentrationen liegt der Verdacht nahe, dass NVP gentoxisch wirken könnte. Verschiedene Tests *in vitro* und *in vivo* lieferten in der Vergangenheit allerdings keine Hinweise auf Gentoxizität [EURAR, 2003; Klimisch *et al.*, 1997b; MAK NVP, 1991 & 2014].

1 Einleitung

NVP ist gemäß Anhang VI der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (CLP) aktuell wie folgt eingestuft:

- Akute Toxizität Kategorie 4, H302, H312, H332:
„Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt, Einatmen.“
- Schwere Augenschädigung Kategorie 1, H318: „Verursacht schwere Augenschäden.“
- Spezifische Zielorgantoxizität nach einmaliger Exposition Kategorie 3, H335:
„Kann die Atemwege reizen.“
- Spezifische Zielorgantoxizität nach wiederholter Exposition Kategorie 2, H373:
„Kann die Organe (Leber) schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.“
- Kanzerogen der Kategorie 2, H351: „Kann vermutlich Krebs erzeugen.“

Tabelle 1: Physikochemische Eigenschaften von NVP [EURAR, 2003; REACh Dossier NVP]

Molekulargewicht	111,14 g/mol
Dichte	1,045 g/cm ³ (20°C)
Schmelzpunkt	13-14°C
Siedepunkt	90-92°C (13 hPa)
Verteilungskoeffizient (log P _{ow})	0,4 (nach OECD 107)
Löslichkeit	mischbar mit Wasser >10 g/L, löslich in Aceton, Diethylether, Ethanol, Toluol, Benzol
Henry-Konstante	0,0056 Pa·m ³ ·mol ⁻¹
Dampfdruck	12 Pa (20°C)

Der Mechanismus der NVP-vermittelten Kanzerogenese ist aktuell noch nicht abschließend geklärt. Trotz vorliegender einheitlich negativer Ergebnisse von *in vitro* und *in vivo* Gentoxizitäts- und Mutagenitätstests, bleiben aufgrund der niedrigen kanzerogenen Effektdosis letzte Zweifel an einem nicht gentoxischen Wirkmechanismus. Der Ausschluss bzw. der Nachweis eines gentoxischen Wirkmechanismus ist regulatorisch von Bedeutung, da die Risikobewertung aufgrund der sehr niedrigen zu erwartenden Effektdosis gentoxischer Kanzerogene um Größenordnungen geringeren Grenzwerten unterliegt.

Ein weiterer relevanter Aspekt zur Aufklärung des hepatokanzerogenen Wirkmechanismus ist die Humanrelevanz der in der Ratte beobachteten Effekte. Hierbei wäre zum einen die Humanrelevanz des Wirkmechanismus selbst von Bedeutung, welcher nagerspezifisch sein könnte, wie beispielsweise eine Aktivierung des CAR oder die Peroxisomenproliferation [Corton *et al.*, 2014; Elcombe *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2013]. Zum anderen könnte die Toxizität in Metaboliten begründet sein, wobei zu klären wäre, ob diese auch im Menschen gebildet werden.

1.2 NVP: Aktueller Kenntnisstand des Toxizitätsprofils

1.2.1 Toxikokinetik und Metabolismus

Absorption

Untersuchungen zur Toxikokinetik von NVP in Ratten und Hunden bestätigten die orale, dermale und inhalative Bioverfügbarkeit.

Die orale Bioverfügbarkeit NVPs wurde in Ratten und Hunden untersucht. Nüchterne und nicht nüchterne Ratten wurden mit einer Einzeldosis von 0,5 und 5 mg/kg KG bzw. 5 mg/kg KG NVP per Schlundsonde dosiert. Zudem wurden nicht nüchterne Ratten über 6 Tage mit 0,5 mg/kg KG/Tag NVP appliziert. In nüchternen und nicht nüchternen Ratten wurde die maximale NVP-Plasmakonzentration nach 0,5 – 3 Stunden gemessen. Die Bioverfügbarkeit in nüchternen Ratten betrug etwa 80%, während in den gefütterten Ratten nur etwa 26% der applizierten Dosis ins Plasma aufgenommen wurden. Die Kinetik in gefütterten Ratten, die an 6 aufeinander folgenden Tagen mit NVP dosiert wurden, zeigte keine Unterschiede zu einmalig dosierten Tieren. Daher ist kein Hinweis auf bioakkumulierendes Potential von NVP in der Ratte gegeben.

Im Hund wurden nach oraler Dosierung (nüchtern) von 5, 10, und 20 mg/kg KG dosisabhängige Bioverfügbarkeiten von 29, 69 und 89% ermittelt, wobei die maximale NVP Plasmakonzentration nach etwa 15 - 45 Minuten erreicht wurde. Die geringere Bioverfügbarkeit der kleineren Dosen wurde in Zusammenhang mit der Säurelabilität von NVP gebracht. Es wurde angenommen, dass bei geringeren oralen Dosen ein höherer Prozentsatz applizierten NVPs hydrolisiert. Hierzu passt auch, dass eine Abhängigkeit der Bioverfügbarkeit von der Verweildauer im Magen festgestellt wurde: Je länger die Magenleerungszeit, desto geringer war die beobachtete Bioverfügbarkeit. Die orale Bioverfügbarkeit NVPs wurde somit in 2 Spezies nachgewiesen [Digenis, 1990; EURAR, 2003].

Die Bioverfügbarkeit nach NVP-Inhalation wurde in 2 Beagle Hunden untersucht, welche nacheinander jeweils 6 Stunden gegen 0,69, 5,5, 24 und 62 mg/m³ NVP exponiert wurden. Die interindividuellen Unterschiede der beobachteten Plasmakonzentrationen nach NVP-Exposition waren hoch und stiegen in Abhängigkeit der Expositionskonzentrationen an. Aufgrund der geringen Gruppengröße konnte die inhalative Bioverfügbarkeit nicht quantifiziert werden, jedoch zeigen die Ergebnisse, dass NVP über den Atemtrakt aufgenommen wird [BASF, 1992b; EURAR, 2003].

Zur dermalen Penetration NVPs liegen *in vivo* und *ex vivo* Daten in der Ratte, sowie humane *ex vivo* Daten vor. Zur Untersuchung der dermalen Penetration *in vivo* wurde reines NVP, sowie eine wässrige Verdünnung (50%) auf den geschorenen Rücken von Sprague-Dawley Ratten aufgetragen (0,5 und 5,55 mg/kg) und die Ratten bis zur Tötung nach 0,5 – 8 Stunden in Metabolismuskäfigen gehalten. Der absorbierte Teil der dermalen Dosis betrug maximal

1 Einleitung

7,6% nach 8 Stunden für reines NVP und 42,9% nach 6 Stunden für die Verdünnung. Die berechneten Penetrations- und Absorptionsraten betragen 0,54 und 0,43 mg/cm²/h für reines NVP und 1,48 und 1,55 mg/cm²/h für die Verdünnung und waren somit für die Verdünnung um etwa den Faktor 3 erhöht.

In Ratten- und Humanhaut wurden wässrige Verdünnungen von NVP (10 - 100%) *ex vivo* getestet. Hierbei ergaben sich 3 Phasen für die dermale Absorption: In der ersten Phase stieg die dermale Absorption (10 - 25% der applizierten Dosis), in der zweiten blieb diese konstant (Ratte: 25 - 50% und human: 25 - 75% der applizierten Dosis) und in der letzten Phase wurde eine Abnahme der dermalen Absorption beobachtet. Die in diesem Fall um den Faktor 2 erhöhte dermale Absorption der Verdünnung (50% NVP) *ex vivo* spiegelt den Trend *in vivo* wider. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass auch die *ex vivo* ermittelte humane dermale Absorption der *in vivo* Situation nahe kommen und NVP auch im Menschen nach dermalen Exposition systemisch verfügbar ist [Marquet *et al.*, 2015].

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Bioverfügbarkeit NVPs über die orale, dermale, sowie inhalative Expositionsrouten gegeben ist.

Proteinbindung

Potentielle proteinbindende Eigenschaften NVPs wurden *in vivo* und *in vitro* untersucht. *In vitro* Untersuchungen in Plasma von Ratten und Hunden ergaben Proteinbindungen von 7 - 9%, während die Werte *in vivo* zwischen 9% und 13% lagen [Digenis, 1990]. Untersuchungen mit Rattenlebermikrosomen zeigten bei einer Proteinkonzentration von 0,24 g/mL eine maximale Proteinbindung von 12% [McClanahan *et al.*, 1983]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das proteinbindende Potential NVPs als gering eingeschätzt.

Verteilung und Elimination

Die Verteilung und Elimination NVPs im Organismus wurde in verschiedener Ausführlichkeit nach oraler, dermalen sowie intravenöser (*i.v.*) Applikation untersucht.

Nach oraler Applikation von Sprague-Dawley Ratten per Schlundsonde mit ¹⁴C-markiertem NVP (5 µCi, etwa 1 mg/(kg KG)) wurde eine Halbwertszeit der Radioaktivität im Plasma von etwa 3 – 4 Stunden berechnet und die Aktivitäten in 17 analysierten Organen untersucht. Urin, Faeces und abgeatmete Luft waren nicht Teil der Untersuchungen. In allen 17 untersuchten Organen wurden nach 2, 5 und 7 Stunden Aktivitäten beobachtet, wobei diese in den meisten Organen unter 1% der applizierten Aktivität lagen und über den Zeitraum konstant waren. Hiervon wichen die Beobachtungen in der Leber ab, in welcher ein zeitabhängiger Anstieg radioaktiver Rückstände von 3,4% (2 Stunden) auf 10,4% (7 Stunden) der applizierten Dosis beobachtet wurde. Gehalte über 1% wurden zudem in den Nieren, dem Pankreas, Blut und

1 Einleitung

Plasma, sowie dem Dünndarm mit Inhalt analysiert. Somit wurde gezeigt, dass bioverfügbares NVP nach oraler Applikation im Körper verteilt wird. Anhand dieser Studie ist eine Unterscheidung zwischen NVP-Metaboliten und NVP selbst nicht möglich, da die Aktivität im Gewebe analysiert wurde [Digenis, 1990; EURAR, 2003].

Nach dermalen Applikation NVPs an Sprague-Dawley Ratten (wässrige Verdünnung 50% und 100%) wurden die Rückstände der Aktivität in Urin und Kadaver analysiert. Hierbei zeigte sich, dass 6 Stunden nach Applikation der NVP-Lösung (50%) etwa ein Drittel und 8 Stunden nach Applikation des reinen NVPs etwa die Hälfte der absorbierten Dosis über den Urin ausgeschieden wurden [Marquet *et al.*, 2015].

Zur Untersuchung der Verteilung und Elimination nach *i.v.* Applikation von NVP liegen mehrere Studien vor. Bei der Dosierung von Sprague-Dawley Ratten mit 0,55 und 5,55 mg/kg KG ^{14}C -vinylmarkiertem NVP, wurde der Hauptteil der applizierten Dosis renal ausgeschieden. Hierbei war die nach 3 Tagen über den Urin ausgeschiedene ^{14}C -Aktivität für beide Dosisgruppen in einem vergleichbaren Bereich von $> 90\%$. Lediglich die Kinetik der Elimination unterschied sich: Während in der Niedrigdosis nach 4 Stunden etwa 71% ausgeschieden wurden, wurde ein ähnlicher Wert in der Hochdosisgruppe erst nach etwa 8 Stunden erreicht. Diese Beobachtung könnte auf eine zeitweilige Sättigung der Elimination bei höheren Dosen hindeuten. Anhand der renalen Elimination wurden Halbwertszeiten von etwa 2 und 3 Stunden für die Niedrig- und die Hochdosisgruppe berechnet. Der Gehalt in den Faeces war nach 3 Tagen in beiden Dosierungen mit $< 1,5\%$ gering, wobei der Hauptteil innerhalb von 24 Stunden eliminiert wurde. Im Kadaver befanden sich in beiden Dosisgruppen $< 2\%$ der applizierten Dosis. In Urin, Faeces und Kadaver wurde die ^{14}C -Aktivität analysiert, die Aufklärung möglicher Metabolite war nicht Teil der Studie [Marquet *et al.*, 2015].

Zudem sind weitere Studien nach *i.v.* Dosierung von NVP bekannt, innerhalb derer männliche Sprague-Dawley Ratten zur Untersuchung der Toxikokinetik von NVP herangezogen wurden [Digenis & McClanahan, 1982; McClanahan *et al.*, 1983, 1984, 1987].

Nach *i.v.* Applikation von etwa 1 mg/kg KG ^{14}C -markiertem NVP wurde eine Halbwertszeit von 1,9 Stunden berechnet, wobei die Elimination aus dem Plasma biphasisch verlief. Es wurden 17 Kompartimente in einem Zeitraum von 15 Minuten bis 6 Stunden nach Applikation untersucht, wobei die höchsten ^{14}C -Aktivitäten in der Leber, dem Dünndarm und dessen Inhalt, sowie in den Nieren beobachtet wurden. Innerhalb von 12 Stunden wurden etwa 75% der applizierten Dosis renal ausgeschieden, während nach 6 Stunden etwa 19% in die Gallenflüssigkeit sezerniert wurden. Hierbei betrug der Anteil an intaktem NVP in Urin und Galle $< 1\%$. Nach 24 Stunden wurden etwa 1% und 0,4% der ^{14}C -Aktivität bei Dosen von etwa 1 mg/kg KG und 0,4 mg/kg KG über die Faeces ausgeschieden. Aufgrund der Diskrepanz zwischen der in der Gallenflüssigkeit analysierten und der final über die Faeces ausgeschiedenen ^{14}C -Aktivität wurde abgeleitet, dass gebildete NVP-Metabolite in den

1 Einleitung

enterohepatischen Kreislauf eintreten. Hinweise auf eine Akkumulation im Fettgewebe wurden nicht beobachtet, die Aktivität im Fettgewebe lag unter 0,1% der applizierten Dosis [McClanahan *et al.*, 1983 & 1984].

In weiteren Untersuchungen wurde ¹⁴C- und ³H-markiertes NVP in einem Verhältnis von 2:1 eingesetzt, um auch Metabolite zu erfassen, welche die Vinylgruppe nicht mehr enthalten. Die Ergebnisse der NVP-Elimination waren ähnlich zu den vorausgegangenen Studien. Nach 12 Stunden wurden etwa 68% der Aktivität beider Markierungen im Urin analysiert, wobei weniger als 0,3% NVP zugeordnet wurden. Nach 28 Stunden wurden insgesamt etwa 90% der Aktivität renal ausgeschieden und nach 6 Tagen wurden insgesamt maximal 8% über die Faeces eliminiert. Untersuchungen der Gallenflüssigkeit nach 6 Stunden zeigten Aktivitäten von bis zu 24% der Dosis, wovon lediglich 0,9% NVP zugeordnet wurden. Das enterohepatische Zirkulieren der NVP-Metabolite wird daher durch die Ergebnisse dieser Studie bestätigt. Insgesamt wurde kein Unterschied zu den Untersuchungen mit der alleinigen ¹⁴C-Vinylmarkierung beobachtet [McClanahan *et al.*, 1987].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass NVP im Organismus schnell verteilt und eliminiert wird. Hierbei steht die renale Elimination im Vordergrund. Aufgrund der viel höheren Aktivitäten in der Gallenflüssigkeit gegenüber den Faeces nach der Applikation von radioaktiv markiertem NVP kann davon ausgegangen werden, dass Metabolite NVPs rückresorbiert werden und in den enterohepatischen Kreislauf eintreten.

Metabolismus

McClanahan *et al.* formulierten das in Abbildung 2 dargestellte Metabolismusschema und führten verschiedene Untersuchungen zur Aufklärung der Metaboliten in Rattenurin durch [McClanahan *et al.*, 1983, 1984, 1987].

Erste Untersuchungen zum Metabolismus NVPs wurden im Urin von mit ¹⁴C-NVP (N-[¹⁴C-Vinyl]-2-pyrrolidon) applizierten (*i.v.*) Ratten durchgeführt. 1,7 % der applizierten Dosis wurde basischen und über 90% sauren Metaboliten zugeordnet. Eine Extraktion der Metabolite mit Chloroform war nicht möglich, sodass deren Wasserlöslichkeit als sehr hoch bewertet wurde. Zudem wurden 12% der applizierten Dosis als Acetat im Urin wiedergefunden [McClanahan *et al.*, 1983].

Zu weiteren Untersuchungen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten *i.v.* mit radioaktiv markiertem NVP (4-³H-NVP und N-¹⁴C-Vinylpyrrolidon im Verhältnis 2:1) dosiert. 6 Stunden nach Dosierung wurde der Urin zur Metabolitenidentifizierung und -quantifizierung per HPLC eingesetzt. Hierbei wurden Referenzlösungen für folgende Substanzen mitgeführt, welche innerhalb eines Metabolismusschemas abgebildet wurden (Abbildung 2): γ -Aminobuttersäure (GABA) (3), N-Acetyl-GABA (10), Acetamid (11), Bernsteinsäure (7), Essigsäure (3a), 2-Pyrrolidon (2), N-Vinylsuccinimid (9) und Succinimid (6).

1 Einleitung

Es wurden 2 Hauptmetabolite identifiziert, welchen 50% und 33% der applizierten Aktivität zugeordnet werden konnten und welche beide Radiomarkierungen aufwiesen. Da die Retentionszeiten der zugehörigen Peaks dieser Metaboliten nicht mit den Retentionszeiten der mitgeführten Referenzsubstanzen übereinstimmten, konnte die Struktur der beiden Hauptmetabolite nicht aufgeklärt werden. Jedoch wurde geschlussfolgert, dass die C₂-Gruppe am Stickstoff des NVP innerhalb des Hauptmetabolismuswegs *in vivo* intakt bleibt und 2-Pyrrolidon (Abbildung 2: (2)) als Hauptmetabolit ausgeschlossen werden kann.

Ein Metabolitenpeak mit etwa 5% der Aktivität beider Markierungen wurde N-Vinylsuccinimid (Abbildung 2: (9)) zugeordnet. Ein weiterer Peak, welcher ein ungleichmäßiges Verhältnis an ¹⁴C- und ³H-Markierung enthielt, wurde als Überlagerung von 2-Pyrrolidon (Abbildung 2: (2)) und N-Acetyl-GABA (Abbildung 2: (3)) gedeutet, wobei 5,6% der ³H-Aktivität 2-Pyrrolidon und etwa 6% der ¹⁴C- und ³H-Aktivität N-Acetyl-GABA zugeordnet wurden. Zwei weitere Nebenmetabolite, welche 4,8% der ¹⁴C- bzw 2,2% der ³H-Aktivität ausmachten, konnten nicht identifiziert werden. Im Gegensatz zur vorangegangenen Studie wurde Acetat im Urin nicht als Metabolit nachgewiesen [McClanahan *et al.*, 1987].

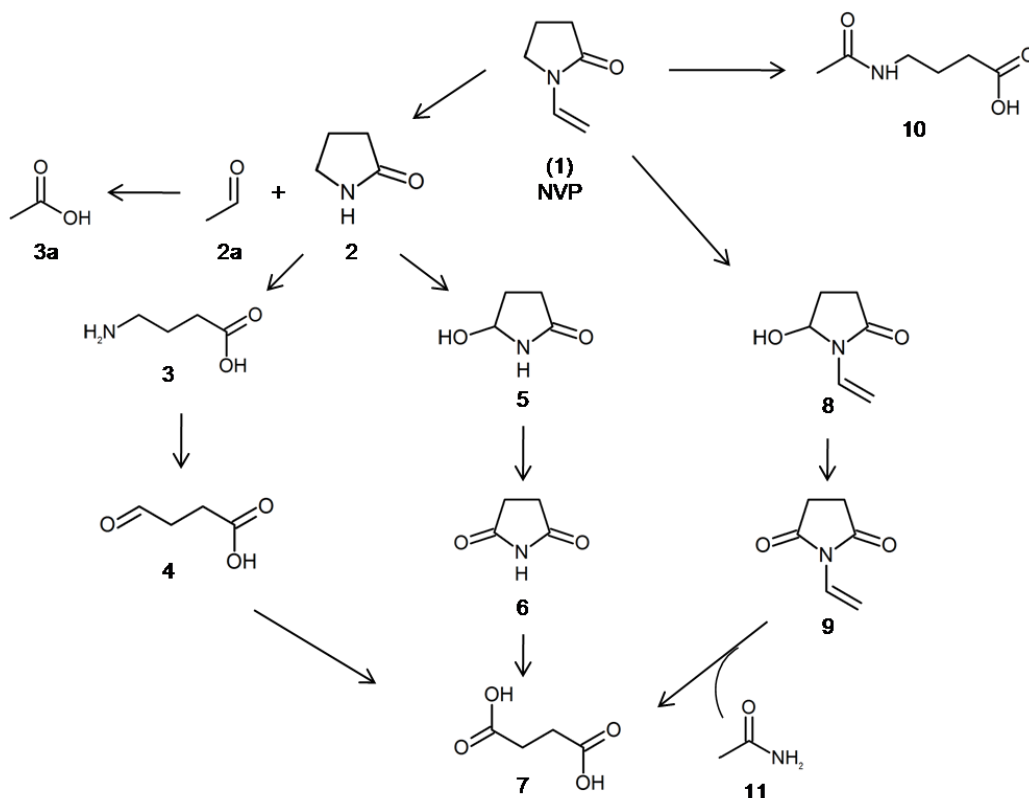


Abbildung 2: Metabolismusschema nach McClanahan *et al.* [McClanahan *et al.*, 1983, 1984, 1987]

Innerhalb der Studien zur Untersuchung des NVP-Metabolismus *in vivo* konnten demnach 2 Hauptmetabolite ausgemacht werden, welche beide Radiomarkierungen enthielten, sodass eine Dealkylierung nicht den Hauptmetabolismusweg für NVP darstellt. Drei weitere Nebenmetabolite wurden 2-Pyrrolidon, N-Vinylsuccinimid und N-Acetyl-GABA wurden

1 Einleitung

zugeordnet. Die Aufklärung von Metaboliten in der Gallenflüssigkeit wurde bisher nicht adressiert.

1.2.2 Haut- und Schleimhautreizende Wirkung

Haut

In einer Hautirritationsstudie, welche nach der Methode von Draize durchgeführt wurde, wurden nach 24 Stunden okklusiver NVP-Behandlung leichte Erytheme, jedoch keine Ödeme beobachtet [BASF, 1978a]. Innerhalb einer dermalen akuten Toxizitätsuntersuchung traten bei einem der 8 eingesetzten Kaninchen leichte Erytheme und Hautschuppung an der exponierten Hautoberfläche auf [BASF, 1963]. In der Ratte wurde innerhalb einer akuten Toxizitätsuntersuchung bei einer Dosis von 1043 mg/kg KG keine Hautreizung beobachtet [EURAR, 2003; HRC, 1978a].

Auge

Das augenreizende Potential NVPs wurde in verschiedenen Studien untersucht. In der neuesten Untersuchung nach Draize-Methode, wurde jeweils ein Auge der 6 zur Testung eingesetzten Kaninchen gegen unverdünntes NVP exponiert. 1 – 3 Tage nach Exposition wurden Trübungen der Hornhaut, sowie Läsionen der Konjunktiva und Iris festgestellt, welche keine Reversibilität über die folgende Nachbeobachtungszeit von 7 Tagen zeigten [BASF, 1978a]. Eine weitere Studie an 2 Kaninchen bestätigt diese Ergebnisse [BASF, 1963].

Zusammenfassung

Basierend auf den Ergebnissen der beschriebenen Studien wirkt NVP nicht hautreizend jedoch wurden innerhalb der Studiendauer nicht reversible Augenschäden festgestellt. Daher ist NVP gemäß Annex VI der CLP Verordnung als Eye Dam. 1; H318 „Verursacht schwere Augenschäden.“ eingestuft.

1.2.3 Akute Toxizität

Oral

Für Ratten wurden LD₅₀ Werte zwischen 834 und 1700 mg/kg KG nach oraler Gabe berichtet [BASF, 1963; EURAR, 2003; HRC, 1978b; MAK NVP, 2014; REACH Dossier NVP]. Der orale LD₅₀ Wert für Mäuse liegt innerhalb des beobachteten Bereiches für Ratten bei 940 mg/kg KG [EURAR, 2003]. Bei weiteren oralen Toxizitätsuntersuchungen in Kaninchen, Meerschweinchen und Katzen wurden keine LD₅₀ Werte bestimmt, jedoch Mortalitäten für Meerschweinchen (1/4) und Katzen (1/2) bei jeweils 520 mg/kg KG beobachtet [BASF, 1964a]. Untersuchungen im Kaninchen zeigten keine Mortalität nach Dosierungen von 417 und 1043

1 Einleitung

mg/kg KG, jedoch wurde eine vorübergehende Funktionsstörung der Leber beobachtet [BASF, 1964; BASF 1953; EURAR, 2003; MAK NVP, 1991]. Die folgenden systemisch toxischen Effekte wurden nach akut oraler NVP-Dosierung beobachtet: Aufhellungen der Leber, Milz und Niere, vereinzelte hämorrhagische Enteritis, sowie narkotische Wirkung und Gleichgewichtsstörungen [EURAR, 2003; MAK NVP, 1991].

Alle oralen LD₅₀ Werte liegen im Bereich von 300 – 2000 mg/kg KG, welcher nach CLP Verordnung zu einer harmonisierten Einstufung NVPs mit Akut oral Kategorie 4; H302 „Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.“ führte.

Dermal

Die akute dermale Toxizität von NVP wurde in Ratten und Kaninchen untersucht. Hierbei lag die ermittelte LD₅₀ für die Ratte zwischen 1043 und 4127 mg/kg KG. In einer vorangegangenen Studie betrug die Mortalität in Ratten 100% (3 Tiere) bei einer dermalen Dosis von 2000 mg über 4 Stunden [BASF, 1953; EURAR, 2003; HRC, 1978a; MAK NVP, 1991]. Ein LD₅₀ von 560 mg/kg KG wurde anhand einer Studie an Kaninchen abgeschätzt, eine weitere Studie zeigte einen LD₅₀ > 400 mg/kg KG. Innerhalb vorangegangener Hautreizungsstudien wurden Mortalitäten bei Dosen zwischen 1200 und 3000 mg/kg KG bei einhergehender Irritation der Haut (Ödeme, Nekrosen) beobachtet [EURAR, 2003; MAK NVP, 1991]. Neben lokalen Effekten an den exponierten Hautflächen wurden nach dermalen Applikation Effekte auf Leber, Niere und Milz, sowie Apathie und Atemnot beobachtet [MAK NVP, 1991].

Basierend auf den Daten in der Ratte, ist die harmonisierte Einstufung nach CLP von NVP mit Akut dermal Kategorie 4; H312 „Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.“ abzuleiten.

Inhalation

Inhalationsstudien zur Untersuchung der akuten Toxizität NVPs wurden mittels Aerosol- oder Dampf-Exposition in Ratte, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen und Katze durchgeführt. Ein LC₅₀ Wert von 3,07 mg/L wurde basierend auf einer Aerosolstudie an der Ratten abgeleitet [BASF, 1964; BASF, 1979; EURAR, 2003]. Innerhalb einer akuten Inhalationsstudie an Ratten und Mäusen, welche an 2 aufeinanderfolgenden Tagen gegen 0,023, 0,069 und 0,207 mg/L NVP-Dampf exponiert waren, wurde keine Mortalität, jedoch Veränderungen der Fettspeicherung, sowie zentrolobulär erhöhte Mitoseraten in der Leber beobachtet [EURAR, 2003].

Versuche an Ratten, Mäusen, Katzen, Kaninchen und Meerschweinchen, in welchen die Tiere gegen gesättigten NVP-Dampf exponiert waren (etwa 0,6 – 0,7 mg/L), zeigten keine Mortalität [BASF, 1964b; EURAR, 2003].

Neben den lokalen Effekten wie Schleimhautreizungen, Nasensekretion, sowie Speichelfluss, wurden zudem Effekte auf die Leber und Niere festgestellt. Außerdem kam es in der Ratte zu

1 Einleitung

vereinzelt Ödemen der Lunge und mehrfachen blutigen Ulzerationen im Magen [MAK NVP, 1991].

Gemäß dem LC₅₀-Wert der Ratte, ist die harmonisierte Einstufung nach CLP von NVP mit Akut inhalativ Kategorie 4; H332 „Gesundheitsschädlich beim Einatmen.“ abzuleiten. Aufgrund der beobachteten Atemwegsreizung wurde zudem eine Einstufung mit STOT SE 3; H335 „Kann die Atemwege reizen.“ vorgenommen.

Zusammenfassung

NVP weist sowohl nach oraler, inhalativer als auch nach einmaliger dermalen Exposition eine moderate akute Toxizität auf. Ungeachtet der Applikationsart wurden neben Narkose und Gleichgewichtsstörungen, Reizwirkungen auf exponierte Haut- und Schleimhäute beobachtet. Zudem wurden vor allem Leberschädigungen, aber auch Effekte auf Niere und Milz beobachtet [EURAR, 2003; MAK NVP, 1991].

1.2.4 Hautsensibilisierung

Zur Untersuchung einer möglichen sensibilisierenden Wirkung NVPs, wurde ein Bühler-Test am Meerschweinchen nach OECD 406 durchgeführt. Hierbei wurden die Meerschweinchen dreimal pro Woche einer okklusiven Induktionsbehandlung und nach 2 Wochen der Auslösebehandlung mit unverdünntem NVP ausgesetzt. NVP führte dabei zu keiner Hautreaktion und wurde als nicht sensibilisierend bewertet [BASF, 1996; MAK NVP, 2014].

1.2.5 Toxizität nach wiederholter Verabreichung

1.2.5.1 Subakute und subchronische Toxizität

Oral

Zur Untersuchung der oralen Toxizität NVPs nach wiederholter Gabe wurden vornehmlich Ratten, aber auch Kaninchen, Katzen und Hamster in entsprechenden Studien eingesetzt.

In einer *Range-Finding*-Studie zur Ermittlung der Dosen für subchronische Studien wurden Wistar Ratten (5 pro Geschlecht und Dosisgruppe) über 8, 21 und 28 Tage jeweils gegen 1600 und 6400 ppm (etwa 15 - 25 und 35 - 44 mg/kg KG/Tag), 200 und 700 ppm (etwa 22 und 31 mg/kg KG/Tag), sowie 400 ppm (etwa 12 mg/kg KG/Tag) im Trinkwasser exponiert. Die Tiere der beiden hohen Dosierungen mussten nach 8 Tagen moribund getötet werden, hierbei wurde bei 3 männlichen Tieren der Hochdosisgruppe eine Gastritis beobachtet. Bei 2 männlichen Tieren der 700 ppm Gruppe wurde eine Verfettung des Leberparenchyms vermutet, jedoch nicht mikroskopisch untersucht. Zudem war die Nahrungs- und Trinkwasseraufnahme in beiden Geschlechtern dosisabhängig reduziert. Ein LOAEL von etwa 12 mg/kg KG/Tag, basierend auf der verringerten Nahrungs- und Trinkwasseraufnahme sowie

1 Einleitung

der verringerten Gewichtszunahme, wurde abgeleitet. In einer weiteren Trinkwasserstudie an Ratten über 21 Tage mit Dosierungen von 50, 100, 200 ppm (etwa 5,5, 11, 21 mg/kg KG/Tag) wurde ein NOAEL von 5,5 mg/kg KG/Tag auf Basis der Veränderungen der Plasmaproteinzusammensetzung, sowie der Reduktion des Glucosespiegels und erhöhtem Kreatinin in männlichen Tieren bei höheren Dosierungen abgeleitet. Substanzbedingte histologische Veränderungen wurden bis 200 ppm nicht beobachtet [BASF, 1986a; REACh Dossier NVP].

In einer subchronischen Studie mit Wistar Ratten beider Geschlechter (10 pro Dosisgruppe) wurden diese kontinuierlich gegen 5, 12, 30 oder 75 ppm NVP (etwa 0,5, 1,2, 3 oder 7,5 mg/kg KG/Tag) über das Trinkwasser exponiert. Innerhalb dieser Studie kam es weder zu Mortalität noch wurden klinische Symptome beobachtet; lediglich die Trinkwasseraufnahme war in der Hochdosisgruppe vorübergehend verringert. Innerhalb der 75 ppm Dosisgruppe waren der totale Proteingehalt und die Globulin-Gehalte im Plasma beider Geschlechter, sowie der Albumingehalt in weiblichen Tieren erniedrigt. Zudem zeigte sich eine Erhöhung des mittleren Nierengewichts in den männlichen Tieren, was jedoch nicht mit makroskopischen oder histologischen Auffälligkeiten einherging. Daher wurde ein NOAEL von 30 ppm (etwa 3 mg/kg KG/Tag) abgeleitet [BASF, 1986b; EURAR, 2003; Klimisch *et al.*, 1997a].

In einer weiteren subchronischen Studie wurden Wistar Ratten (5 pro Geschlecht und Dosis) mit 40, 60 oder 100 mg/kg KG/Tag per Schlundsonde mit einer wässrigen NVP-Lösung appliziert. Die Körpergewichte der Tiere der Hochdosisgruppe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe geringfügig erniedrigt. Ab einer Dosierung von 60 mg/kg KG/Tag wurde ein Anstieg der Thrombozyten in beiden Geschlechtern beobachtet. Als Zielorgan der Toxizität wurde die Leber identifiziert, deren relatives Gewicht dosisabhängig (40 mg/kg KG/Tag ♀, 60 mg/kg KG/Tag ♂) erhöht war. Des Weiteren wurde im Leberhomogenat der behandelten weiblichen Tiere ein signifikanter Anstieg der γ -Glutamyltransferaseaktivität (γ -GT) beobachtet, was auch in männlichen Tieren als nicht signifikanter Trend zu beobachten war. Zudem wurden in beiden Geschlechtern der Hochdosisgruppe Foci (Parenchymveränderungen) in der Leber festgestellt (1/5 ♂, 4/5 ♀), welche weder für Glycogen, noch für γ -GT spezifisch angefärbt werden konnten. Aufgrund der Effekte, welche bereits bei der Niedrigdosisgruppe beobachtet wurden, wurde ein LOAEL von 40 mg/kg KG/Tag abgeleitet [BASF, 1986a; Klimisch *et al.*, 1997a; REACh Dossier NVP].

Auch in Kaninchen und Katzen wurde die Toxizität NVPs nach wiederholter oraler Gabe untersucht. Hierzu wurden Kaninchen 3 – 6 Mal mit 1 mL/(kg KG), bzw. 35 Mal mit 0,4 mL/kg KG per Schlundsonde dosiert. Alle Tiere der hohen Dosisgruppe starben, während bei der Niedrigdosisgruppe keine Mortalität verzeichnet wurde. In den Behandlungsgruppen wurde Apathie, Inappetenz und Atonie, sowie Schädigungen der Leber und Niere in der

1 Einleitung

Hochdosisgruppe nach histologischer Untersuchung beobachtet. Eine Schädigung der Leber konnte in der Niedrigdosisgruppe nicht ausgeschlossen werden [BASF, 1964a]. Auch in Katzen wurde eine Leberschädigung nach wiederholter NVP-Gabe (0,02 mL/kg KG/Tag, 5 Wochen) durch verringerte Bromsulphthaleinausscheidung, sowie einen Anstieg der Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase gezeigt. Des Weiteren wurden Speichelfluss, Erbrechen, Atonie und teilweise Koordinationsverlust beobachtet [BASF, 1964a; MAK NVP, 1991].

Inhalation

Zur Untersuchung der toxikologischen Wirkung NVPs nach Inhalation liegen Studien unterschiedlicher Expositionsdauer in mehreren Spezies (Ratte, Maus, Hamster) vor. Eine Übersicht der Studien mit wiederholter NVP-Inhalationsexposition ist in Tabelle 2 dargestellt. Nach wiederholter Exposition von Ratten und Mäusen gegen NVP wurden pathologische Veränderungen in der Leber, der Nasenhöhle und dem Kehlkopf beobachtet. Außerdem wurde von Disproteinämie sowie hämatologischen Veränderungen, welche auf eine Anämie hindeuten, berichtet [EURAR, 2003; Klimisch *et al.*, 1997a; MAK NVP, 1991, 2014].

Bereits nach einwöchiger Exposition gegen 45 ppm NVP wurden Effekte auf die Leber, wie zentrolobuläre Einzelzellnekrosen und Fetteinlagerungen in Ratten und Mäusen, sowie zentrolobuläre Hypertrophie in Mäusen berichtet (Tabelle 2, Nr. 1-2) [Klimisch *et al.*, 1997a]. Nach siebenwöchiger Exposition wurden Anstiege der relativen Lebergewichte (Ratte und Maus: 45 ppm), des GSH-Gehalts (Ratte und Maus: 15 ppm), sowie der γ -GT (Ratte) beobachtet. Zudem wurden polymorphe Mitosen in Ratte und Maus sowie Foci in der Leber von Mäusen identifiziert (Tabelle 2, Nr. 3-4) [Klimisch *et al.*, 1997a]. Foci und zentrolobuläre Hypertrophie in der Leber wurden auch nach dreimonatiger Exposition von Ratten gegen 5, 15 und 45 ppm beobachtet (Tabelle 2, Nr. 7, 10). Untersuchungen zur Hepatozytenproliferation nach inhalativer Exposition in Wistar Ratten zeigten nach einwöchiger Inhalation einen LOAEC von 1 ppm, der nach Ende der 28-Tagesstudie auf 0,5 ppm reduziert wurde. Ein nicht konzentrationsabhängiger Anstieg von Apoptosen wurde innerhalb dieser Studie erst ab einer Konzentration von 1 ppm festgestellt, sodass die zellproliferierende Wirkung NVPs im Vordergrund steht (Tabelle 2, Nr. 5) [BASF, 2011; MAK NVP, 2014].

Neben der beschriebenen Lebertoxizität, begründet in histologischen Veränderungen und Organgewichten, wurden zudem Effekte auf klinische und hämatologische Parameter nach NVP-Inhalation beobachtet, die auch Indikatoren für Hepatotoxizität sind: Verringerung des Gesamtproteingehalts, sowie von Albumin und Globulin (Ratte und Maus, 7 Wochen (15 ppm), 3, 6, 12 Monate (10 ppm), Tabelle 2, Nr. 3, 4, 8-11), Anstieg der Alanin- und Aspartat-Aminotransferase sowie der alkalischen Phosphatase (Ratte, 7 Wochen, 6 Monate, Tabelle 2, Nr. 3, 8). Als Veränderungen von hämatologischen Parametern nach wiederholter NVP-Exposition sind Erniedrigung von Haemoglobin, Hämatokrit und Erythrozyten (Maus und Ratte,

1 Einleitung

ab 7 Wochen (15 ppm), Tabelle 2, Nr. 3, 4, 8, 9, 11) und das Auftreten von Polychromasie (Ratte, 7 Wochen (45 ppm), Tabelle 2, Nr. 3) zu nennen [EURAR, 2003; Klimisch *et al.*, 1997a; MAK NVP, 1991, 2014].

Zu den beschriebenen systemisch toxischen Effekten nach NVP-Inhalationsexposition traten weiterhin lokale Effekte in der Nasenhöhle auf. Beschrieben wurden Entzündungen und Atrophien des olfaktorischen Epithels, sowie Hyperplasien des olfaktorischen und respiratorischen Epithels (Maus 1 Woche (5 ppm), Ratte 1 Woche (15 ppm), 3 Monate (5 ppm), Tabelle 2, Nr. 3, 4, 7, 10, 11) [Klimisch *et al.*, 1997a].

Im Vergleich zu Ratten und Mäusen zeigten sich Hamster unempfindlicher gegenüber der toxischen Wirkung von NVP. Nach dreimonatiger Exposition gegen 45 ppm NVP wurde eine Glycogenakkumulation in der Leber, sowie eine verzögerte Körpergewichtsentwicklung berichtet. Weitere Effekte, z.B. auf Parameter der klinischen Chemie, wurden nicht beobachtet [EURAR, 2003; Klimisch *et al.*, 1997a; MAK NVP, 1991, 2014].

Zusammenfassung

Die Toxizität NVPs nach wiederholter Gabe wurde nach oraler und inhalativer Exposition untersucht, wobei die Leber als Zielorgan beider Applikationsrouten identifiziert wurde. Eine ausgeprägtere Hepatotoxizität zeigte sich nach Inhalationsexposition und zusätzlich zu dieser wurden Effekte auf hämatologische und klinische Parameter sowie lokale Effekte auf das respiratorische und olfaktorische Epithel in Ratte und Maus beobachtet.

Bemerkenswert ist die innerhalb einer subakuten Inhalationsstudie beobachtete, potente Proliferationswirkung in der Leber ab einer Expositionskonzentration von 0,5 ppm NVP. Zudem wurden sowohl nach subchronischer inhalativer (15 ppm), als auch oraler (Gavage, 100 mg/kg KG/Tag) Exposition Foci in der Leber der Ratte beobachtet. Der Hamster zeigte sich wesentlich weniger empfindlich: Nach subchronischer Inhalationsexposition wurde eine erhöhte Akkumulation von Glycogen als einziger Effekt auf die Leber beobachtet.

1 Einleitung

Tabelle 2: Wirkung von NVP nach wiederholter Inhalationsexposition (Ganzkörperexposition)

Nr.	Spezies, Stamm, Anzahl pro Gruppe, Geschlecht	Exposition	Beobachtungen
1	Ratte F344 6 m	0, 45 ppm 1 Woche	<u>Leber:</u> Fettinfiltration, zentrolobuläre Einzelzellnekrose
2	Maus C57Bl 6 w	0, 45 ppm 1 Woche	<u>Leber:</u> Fettinfiltration, zentrolobuläre Einzelzellnekrose, zentrolobulär vergrößerte Hepatozyten
3	Ratte F344 20 m + w (7 Wochen: 10, Satelliten- gruppen: 5)	0, 5, 15, 45 ppm 7 Wochen (Satelliten- gruppen: 1, 3 Wochen)	<p>ab 15 ppm <u>Leber:</u> GSH ↑, γ-GT ↑ <u>Nase:</u> Atrophie des olfaktorischen Epithels (1, 3, 7 Wochen) <u>Hämatologie:</u> Haemoglobin ↓, Erythrozyten ↓, Hämatokrit ↓ (7 Wochen) <u>Klinische Chemie:</u> Gesamtprotein ↓, Albumin und Globulin ↓</p> <p>45 ppm <u>Leber:</u> relatives Gewicht ↑ (w), GSH ↑, γ-GT ↑, polymorphe Mitosen (bereits nach 1 Woche), zentrolobuläre Einzelzellnekrosen, Degeneration (1, 3, 7 Wochen), Foci (7 Wochen) <u>Hämatologie:</u> Polychromasie (m, 7 Wochen) <u>Klinische Chemie:</u> Alanin- und Aspartat-Aminotransferase ↑, alkalische Phosphatase ↑</p>
4	Maus C57Bl 20 m + w (7 Wochen: 10, Satelliten- gruppen: 5)	0, 5, 15, 45 ppm 7 Wochen (Satelliten- gruppen: 1, 3 Wochen)	<p>ab 5 ppm <u>Nase:</u> Atrophie des olfaktorischen Epithels (1, 3, 7 Wochen), Hyperplasie des respiratorischen Epithels (7 Wochen) <u>Lunge:</u> Proliferation ↑ des bronchialen Epithels (7 Wochen)</p> <p>ab 15 ppm <u>Leber:</u> GSH ↑ <u>Nase:</u> Hyperplasie des respiratorischen Epithels (1, 3, 7 Wochen) <u>Lunge:</u> Proliferation ↑ des bronchialen Epithels (3, 7 Wochen) <u>Hämatologie:</u> Haemoglobin ↓, Erythrozyten ↓, Hämatokrit ↓ (7 Wochen) <u>Klinische Chemie:</u> Gesamtprotein ↓, Albumin und Globulin ↓</p> <p>45 ppm <u>Leber:</u> Gewicht (relativ) ↑ (w), zentrolobuläre Einzelzellnekrosen und vergrößerte Hepatozyten (1, 3, 7 Wochen), Foci (7 Wochen) <u>Lunge:</u> Proliferation ↑ des bronchialen Epithels (1, 3, 7 Wochen) <u>Trachea:</u> Proliferation ↑ des Epithels, Einzelzellnekrosen (1, 3, 7 Wochen)</p>

1 Einleitung

Nr.	Spezies, Stamm, Anzahl pro Gruppe, Geschlecht	Exposition	Beobachtungen
5	Ratte Wistar 8 m	0, 0,2, 0,5, 1, 5, 10 ppm 28 Tage	ab 0,5 ppm <u>Leber:</u> Proliferation ↑ (Zone 2 und 3, 28 Tage; Zone 2, 7 Tage),
		0, 0,5, 1, 5, 10 ppm Satelliten- gruppe 7 Tage	ab 1 ppm <u>Leber:</u> Proliferation ↑ (Zone 3; 7 und 28 Tage, konzentrationsabhängig), Apoptose (Zone 1 und 2, nicht konzentrationsabhängig) 10 ppm <u>Körpergewicht:</u> Körpergewichtsveränderung ↓ (ab Tag 7)
6	Hamster syrischer Hamster 40 m + w	0, 45 ppm 7 Wochen 3 Monate	<u>Leber:</u> Glycogenakkumulation nach 7 Wochen und 3 Monaten <u>Körpergewicht:</u> verzögerte Körpergewichtsentwicklung
7	Ratte Sprague- Dawley 10 m + w	0, 1, 5, 15, 45, 120 ppm 3 Monate	NOAEL = 1 ppm ab 5 ppm <u>Nase:</u> Atrophie des olfaktorischen Epithels, Entzündung
			15 und 45 ppm <u>Leber:</u> Gewicht (relativ und absolut) ↑, zentrolobuläre Hypertrophie, Foci <u>Nase:</u> Atrophie des olfaktorischen Epithels, Entzündung
			120 ppm 16/20 Tieren starben nach 3 – 5 Expositionen, weitere wurden nach 5. Exposition moribund getötet. <u>Symptome:</u> Schleimhautreizung, Atonie, Hämaturie, Hinweis auf hämorrhagische Diathese der Schleimhäute (vor allem Magen und Vormagen) <u>Leber:</u> regressive Verfettung <u>Nase:</u> Nekrosen im olfaktorischen Epithel
8	Ratte F344 10 m + w	0, 10 ppm 6 Monate	10 ppm <u>Leber:</u> γ-GT ↑, GSH ↑ <u>Hämatologie:</u> Thrombozyten ↑, Hämatokrit ↓ <u>Klinische Chemie:</u> Gesamtprotein ↓ (w), Albumin ↓ (w), Globulin ↓ (m)
9	Maus C57Bl 10 m + w	0, 10 ppm 6 Monate	10 ppm <u>Leber:</u> GSH ↑ <u>Klinische Chemie:</u> Gesamtprotein ↓, Globulin ↓

Nr.	Spezies, Stamm, Anzahl pro Gruppe, Geschlecht	Exposition	Beobachtungen
10	Ratte Sprague-Dawley 20 m + w 10 m + w (Kontrolle)	0, 5, 10, 20 ppm 3 Monate	<p>ab 5 ppm <u>Leber:</u> Gesamt-Plasmaprotein ↓, Leberfoci <u>Nase:</u> fokale Hyperplasie, Atrophie des olfaktorischen Epithels, Entzündungen <u>Körpergewicht:</u> m ↓ (ab 2. Woche), w ↓ (vereinzelt ab 3. Woche)</p> <p>ab 10 ppm <u>Leber:</u> Gewicht (relativ und absolut) ↑, GSH (m) ↑ <u>Nase:</u> fokale Hyperplasie, Atrophie des olfaktorischen Epithels, Entzündungen <u>Körpergewicht:</u> m ↓ (ab 1. Woche), w ↓ (ab 1. Woche) <u>Hämatologie:</u> konzentrationsabhängig Thrombozyten ↑, weiße Blutzellen ↑ <u>Klinische Chemie:</u> Gesamtprotein ↓</p> <p>20 ppm <u>Leber:</u> γ-GT ↑ (w), GSH (m, w) ↑, Foci</p>
11	Ratte Sprague-Dawley 10 m + w	0, 5, 10, 20 ppm 12 Monate	<p>ab 5 ppm <u>Leber:</u> Gewicht ↑ (m), Spongiosis hepatis, fokale Hyperplasie, Foci <u>Nase:</u> fokale Hyperplasie in respiratorischem und olfaktorischen Epithel, Atrophie olfaktorisches Epithel, Entzündungen <u>Körpergewicht:</u> ↓ (m ab 2. Woche, w vereinzelt ab 3. Woche)</p> <p>ab 10 ppm <u>Leber:</u> Gewicht (absolut) ↑ (w) <u>Klinische Chemie:</u> Gesamtprotein ↓, Alanin-Aminotransferase ↓</p> <p>20 ppm <u>Leber:</u> GSH ↑, γ-GT ↑, Gewicht (relativ und absolut) ↑, hepatozelluläres Adenom (1 m) <u>Hämatologie (w):</u> Anzahl weißer Blutzellen ↑, Erythrozyten ↓, Hämatokrit ↓, Retikulozyten ↑ <u>Klinische Chemie:</u> Gesamtprotein ↓, Alanin-Aminotransferase ↓, Cholesterin ↑</p>
12	Ratte Sprague-Dawley 10 m + w	0, 5, 10, 20 ppm 18 Monate und 6 Monate Nachbeobachtung	<p>ab 5 ppm <u>Leber:</u> Spongiosis hepatis, fokale Hyperplasie, Foci, hepatozelluläres Karzinom (2 m) <u>Nase:</u> fokale Hyperplasie in respiratorischem und olfaktorischen Epithel, Atrophie olfaktorisches Epithel, Entzündungen</p> <p>10 ppm and 20 ppm <u>Leber:</u> γ-GT ↑, hepatozelluläres Karzinom (20 ppm: 1 m, 2 w) <u>Nase:</u> Adenom (10 ppm: 1 m, 20 ppm: 2 m, 2 w)</p>

Nr.	Spezies, Stamm, Anzahl pro Gruppe, Geschlecht	Exposition	Beobachtungen
13	Ratte Sprague- Dawley 60 m + w	0, 5, 10, 20 ppm 2 Jahre	<p>ab 5 ppm <u>Leber:</u> Spongiosis hepatis, fokale Hyperplasie, Foci, Leberzellkarzinome <u>Nase:</u> fokale Hyperplasie in respiratorischem und olfaktorischen Epithel, Athrophie olfaktorisches Epithel, Entzündungen, Adenome</p> <p>10 ppm <u>Nase:</u> Adenokarzinome <u>Hämatologie:</u> Erythrozyten (Anisozytose, Mikrozytose, Makrozytose) ↑ <u>Larynx:</u> fokale Hyperplasie des Epithels</p> <p>20 ppm <u>Leber:</u> Gewicht (relativ und absolut) ↑ <u>Larynx:</u> Plattenepithelkarzinom</p>
14	Ratte Sprague- Dawley 40 w (7 Wochen: 5 w, 3 Monate: 10 w, 12 Monate: 10, 24 Monate: 15)	0, 45 ppm 7 Wochen, 3 Monate mit 9 und 21 Monaten Nachbeobachtung	<p>45 ppm <u>Leber:</u> γ-GT ↑, GSH ↑, zentrolobuläre Hypertrophie (7 Wochen, 3 Monate, 12 Monate), <u>Neoplasien:</u> neoplastische Noduli in der Leber (2/6 Überlebende), Hepatokarzinome (2/6 Überlebende)</p>
15	Ratte Wistar 25 w	0, 1, 5, 20 ppm 6. – 19. Trächtigkeits- tag	<p>1 ppm: <u>maternal:</u> NOAEC</p> <p>5 ppm <u>maternal:</u> Körpergewichtsentwicklung ↓ (31% verringertes korrigiertes KG) <u>Nachkommen:</u> NOAEC</p> <p>20 ppm <u>maternal:</u> Körpergewichtsentwicklung ↓ (68% verringertes korrigiertes KG), Salivation</p> <p><u>Nachkommen:</u> Körpergewicht ↓_Variationen ↑ (gewellte Rippen, verzögerten Ossifikationen von Zungenbein und Hinterhaupt, Inzidenz innerhalb der historischen Kontrollen), keine Zunahme an Missbildungen</p>

γ -GT : Gamma-Glutamyltransferase-Aktivität, GSH: Glutathion, m: männlich, w: weiblich

Referenzen zur Erstellung von Tabelle 2: [BASF, 1992; BASF, 2001; BASF, 2011; EURAR, 2003; Klimisch *et al.*, 1997a, Klimisch *et al.* 1997b; MAK NVP, 1991, 2014]

1.2.5.2 Chronische Toxizität und Kanzerogenität

Zur Untersuchung der chronischen Toxizität NVPs liegen 2 Langzeitstudien in Sprague-Dawley Ratten nach Inhalationsexposition vor [Klimisch *et al.*, 1997b]:

- (1) In einem Stopp-Experiment wurde die Reversibilität der Hepatotoxizität nach subchronischer Exposition nach 9 und 21 Monaten Nachbeobachtungszeit untersucht (Tabelle 2, Nr. 14).
- (2) Das kanzerogene Potential NVPs wurde in einer Inhalationsstudie (ähnlich OECD 451) nach lebenslanger bzw. nach achtzehnmonatiger Inhalationsexposition und sechsmonatiger Nachbeobachtungszeit untersucht (Tabelle 2, Nr. 12-13).

Innerhalb des Stopp-Experiments wurden weibliche Sprague-Dawley Ratten 3 Monate gegen 45 ppm NVP exponiert (Ganzkörperexposition). Die 15 Tiere der Hauptgruppe wurden weitere 18 Monate beobachtet und nach zweijähriger Studiendauer getötet. Zwei weitere mitgeführte Satellitengruppen (10 w) wurden direkt nach der Exposition bzw. nach 9 Monaten Nachbeobachtung untersucht. Während der Expositionsperiode trat keine Mortalität auf und die Mortalitäten im Nachbeobachtungszeitraum zeigten keinen Unterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe. Innerhalb dieser Studie wurden erhöhte γ -GT- und GSH-Gehalte in Leberhomogenat beobachtet. Histologische Untersuchungen wurden in der Leber durchgeführt und zeigten in den nach 3 Monaten getöteten Tieren zentrolobuläre Zellvergrößerungen, zudem wurden Foci beobachtet. Auch nach der neunmonatigen Nachbeobachtung wurden Foci in der Leber der NVP-exponierten Tiere beobachtet. Die Tiere, die zwischen 12 und 24 Monaten Studiendauer verstarben oder terminal getötet (6 Tiere) wurden, zeigten NVP-abhängig erhöhte Inzidenzen an neoplastischen und nicht-neoplastischen Veränderungen in der Leber. Als nicht-neoplastische Leberveränderungen wurde hepatozelluläre Hypertrophie berichtet. Neoplasien wurden in 4 terminal getöteten Ratten beobachtet und bestanden aus neoplastischen Herden/Knötchen sowie differenzierten Hepatokarzinomen in je 2 Tieren. Somit wurde gezeigt, dass die während der dreimonatigen NVP-Expositionsperiode induzierten Leberschäden persistieren und sich zu Neoplasien entwickeln können (Tabelle 2, Nr. 14) [Klimisch *et al.*, 1997b].

Zur Untersuchung der chronischen Toxizität und Kanzerogenität NVPs wurde eine Ganzkörperinhalationsstudie in Sprague-Dawley Ratten beider Geschlechter über 2 Jahre durchgeführt. Hierbei wurden die Tiere (60 pro Geschlecht und NVP-Dosisgruppe, 70 pro Geschlecht für die Kontrollgruppen) an 5 Tagen pro Woche über 6 Stunden gegen 0, 5, 10 und 20 ppm (0, 23, 46, 92 mg/m³) NVP-Dampf exponiert. Zusätzlich wurden Satellitengruppen mitgeführt, welche nach 3 (je 20 Tiere pro Geschlecht und Dosisgruppe, 10 Tiere pro Kontrollgruppe) und 12 Monaten oder 18 Monaten mit weiteren 6 Monaten Nachbeobachtungszeit (je 10 Tiere pro Geschlecht und Dosisgruppe) getötet wurden.

1 Einleitung

Als unspezifisches Symptom systemischer Toxizität wurde eine verzögerte Körpergewichtszunahme in beiden Geschlechtern bzw. eine Abnahme des Körpergewichts in der 5 und 10 ppm Gruppe, bzw. in der Hochdosisgruppe beobachtet. Effekte auf das Körpergewicht waren nach 3 Monaten noch sichtbar, nach weiterer Studiendauer näherten sich die Körpergewichte der NVP-Expositionsgruppen den Kontrollgruppen an. Es wurde keine erhöhte NVP-abhängige Mortalität über die Studienperiode beobachtet.

Wie schon in subchronischen Studien beschrieben, wurden auch in der chronischen Studie NVP-vermittelte Effekte auf Leber und Nase, sowie auf hämatologische und klinisch-chemische Parameter verzeichnet. Zudem wurde der Larynx nach zweijähriger Exposition als Zielorgan der Kanzerogenese identifiziert.

Die beobachteten Effekte auf klinisch-chemische Parameter wie reduzierte Plasmaproteinkonzentrationen und Erhöhungen der γ -GT im Leberhomogenat NVP-exponierter Tiere, welche vor allem in weiblichen Tieren auftraten, belegten die schon in Studien kürzerer Expositionsdauer beobachtete Hepatotoxizität NVPs. Zudem wurden ab einer Expositionsperiode von 12 Monaten Effekte auf rote Blutzellen, wie ein Anstieg in der Retikulozytenzahl und Verringerungen des Hämoglobins sowie Hämatokrits, in weiblichen Tieren beobachtet, welche auf einen anämischen Prozess hindeuten (Tabelle 2, Nr. 10-13).

Die Leber wurde nach zweijähriger Exposition gegen NVP-Dampf als empfindlichstes Zielorgan in beiden Geschlechtern der exponierten Sprague-Dawley Ratten identifiziert. Bereits ab der niedrigsten getesteten Expositionskonzentration von 5 ppm war die Inzidenz an Hepatokarzinomen in Männchen statistisch signifikant erhöht. Ab der mittleren Konzentration von 10 ppm war der konzentrationsabhängige Anstieg der Hepatokarzinom-inzidenz auch in weiblichen Ratten signifikant (Tabelle 3). Benigne Tumore wurden hierbei in der Leber nicht festgestellt. Neben dem konzentrationsabhängigen Anstieg an neoplastischen Veränderungen wurden auch nicht-neoplastische Veränderungen in der Leber beobachtet: Hyperplasien (signifikant erhöht ab 5 ppm), Foci (signifikant erhöht ab 10 ppm) und Spongiosis hepatis (signifikant erhöht ab 10 ppm). Nach zwölfmonatiger Exposition wurde ein hepatozelluläres Adenom in einer männlichen Ratte der Hochdosisgruppe beobachtet, jedoch keine Karzinome. Nach achtzehnmonatiger Exposition und Tötung nach 2 Jahren, wurden hepatozelluläre Karzinome in 2 Tieren der männlichen 5 ppm Gruppe, sowie jeweils einem männlichen Tier der Kontrollgruppe und der 20 ppm Gruppe beobachtet. In den weiblichen Tieren wurden nur in der 20 ppm Gruppe 2 Tiere mit hepatozellulären Karzinomen diagnostiziert. Somit wurde nach achtzehnmonatiger Exposition kein konzentrationsabhängiger Anstieg der Leberzellkarzinome festgestellt.

Neoplasien wurden zudem in der Nasenhöhle beobachtet, wobei hier zwischen Adenomen und Adenokarzinomen zu unterscheiden ist. Die exponierten männlichen Ratten zeigten sich im Vergleich zu den weiblichen Tieren etwas empfindlicher gegenüber der Effekte in der Nase:

1 Einleitung

Während ein signifikanter Anstieg der Adenominzidenz in weiblichen Tieren erst ab einer NVP-Konzentration von 10 ppm beobachtet wurde, war dieser Effekt in den männlichen Ratten bereits ab der niedrigsten getesteten Konzentration von 5 ppm nach zweijähriger Exposition statistisch signifikant. Zudem wurden Adenome, jedoch in geringerer Inzidenz, bereits nach zwölfmonatiger Exposition beobachtet.

Die höhere Sensitivität der männlichen Tiere gegenüber den Effekten in der Nase wurde auch in der Inzidenz der Adenokarzinome beobachtet, welche ausschließlich nach zweijähriger Exposition auftraten. Deren Inzidenz war in weiblichen Tieren lediglich in der Hochdosisgruppe, in männlichen Tieren auch in der mittleren Dosierung statistisch signifikant erhöht. Die Adenome und Adenokarzinome in der Nase wiesen verschiedene Morphologien auf: Adenome wurden aus respiratorischen Epithel und darunterliegenden submukösen Drüsen gebildet, während Adenokarzinome das olfaktorische Epithel und die dort befindlichen submukösen Drüsen betrafen. Aufgrund der unterschiedlichen Morphologie und Lokalisation wurden die Adenokarzinome und Adenome als 2 verschiedene Arten von durch NVP hervorgerufenen Neoplasmen betrachtet, d.h. die Adenome wurden nicht als Vorläufer der Adenokarzinome beurteilt. Beim überwiegenden Teil der Tiere, in denen Adenome oder Adenokarzinome beobachtet wurden, wurden gleichzeitig Entzündungen im Gewebe beobachtet. Dies trifft auch auf die Tiere der Hochdosisgruppe zu, bei welchen ebenfalls Entzündungen bei gleichzeitiger Diagnose von Plattenepithelkarzinomen des Kehlkopfes beobachtet wurden. Zudem wurde im Larynx der Hochdosisgruppen eine epitheliale Hyperplasie in beiden Geschlechtern, sowie in den männlichen Tieren der 10 ppm Gruppe beobachtet. Daher wurde die These aufgestellt, dass andauernde Entzündungsreaktionen eine Rolle bei der NVP-induzierten Kanzerogenese in der Nasenhöhle sowie des Kehlkopfs in Ratten spielen [BASF, 1992; EURAR, 2003; Klimisch *et al.*, 1997b; MAK, 1991 & 2014].

Anhand der bestehenden Datenlage wurde gezeigt, dass NVP kanzerogen in der Ratte wirkt und nach chronischer Inhalationsexposition Hepatokarzinome, sowie Adenome und Adenokarzinome in der Nasenhöhle induziert. Daher ist NVP nach Annex VI der CLP-Verordnung mit Carc. 2; H351 „Kann vermutlich Krebs erzeugen.“ eingestuft.

1 Einleitung

Tabelle 3: Neoplasien nach chronischer Inhalationsexposition gegen NVP [MAK NVP, 2014; Klimisch, 1997b]

	Ge- schlecht	Expositionskonzentration [ppm]			
		0	5	10	20
Überlebende (2 Jahre)	m	39/70 (56%)	36/60 (60%)	29/60 (48%)	33/60 (55%)
	w	29/70 (41%)	25/60 (42%)	26/60 (43%)	24/60 (40%)
Hepatokarzinome	m	1/70 (1%)	6/60 (10%)*	5/60 (8%)*	17/60 (28%)*
	w	1/70 (1%)	3/60 (2%)	6/60 (10%)*	26/60 (43%)*
Adenome (Nasenhöhle)	m	0/70 (0%)	9/60 (15%)*	10/60 (17%)*	13/60 (22%)*
	w	0/70 (0%)	2/60 (3%)	8/60 (13%)*	25/60 (20%)*
Adenokarzinome (Nasenhöhle)	m	0/70 (0%)	0/60 (0%)	4/60 (7%)*	6/60 (10%)*
	w	0/70 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	4/60 (7%)*
Plattenepithel- karzinome (Larynx)	m	0/70 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	4/60 (7%)*
	w	0/70 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	4/60 (7%)*

m: männlich, w: weiblich; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$

1.2.5.3 Reproduktionstoxizität

Fertilität

Spezifische Untersuchungen zur Fertilitätstoxizität von NVP wurden nicht durchgeführt. Allerdings wurden innerhalb von Toxizitätsstudien mit wiederholter Verabreichung NVPs, wie der chronischen Toxizitätsstudie an der Ratte, pathologische Untersuchungen der Geschlechtsorgane durchgeführt, jedoch keine Hinweise auf Fertilitätstoxizität beobachtet [BASF, 1992; EURAR, 2003; MAK NVP, 2014].

Entwicklungstoxizität

Zur Untersuchung der Entwicklungstoxizität wurde eine Ganzkörperinhalationsstudie mit NVP-Konzentrationen von 0, 1, 5 und 20 ppm nach OECD 414 durchgeführt (Tabelle 2, Nr. 15). Effekte in den Nachkommen wurden lediglich in Expositionskonzentrationen mit klarer maternaler Toxizität beobachtet, wobei keine substanzspezifischen Malformationen identifiziert wurden. Unterschiede der Geschlechterverteilung, sowie der Plazentagewichte zwischen Vehikel- und Expositionsgruppen wurden nicht festgestellt. Skelletale Variationen in den Nachkommen, wie z.B. die verzögerte Ossifikation, traten erst bei maternaler Toxizität auf. Der abgeleitete maternale NOAEC von 1 ppm liegt unter dem NOAEC für die Nachkommen von 5 ppm, sodass keine Entwicklungstoxizität von NVP bei nicht maternal toxischen Dosen zu erwarten ist [BASF, 2001; EURAR, 2003; MAK NVP, 2014].

1.2.6 Gentoxizität und Mutagenität

Zur Einstufung von Chemikalien bezüglich ihrer Gentoxizität bzw. Mutagenität wird generell eine Testbatterie, die aus reversen Mutationstests in bakteriellen Systemen (Ames Test), Untersuchungen zur DNA-Schädigung (Chromosomenabberationen, Genmutationen am TK- oder HPRT-Lokus) in Säugerzellen *in vitro* und einem *in vivo* Test zur Untersuchung chromosomaler Schädigung (Mikronukleus Test) besteht, eingesetzt.

Zur Beurteilung des gentoxischen bzw. mutagenen Potentials von NVP wurden bereits die im Folgenden beschriebenen Studien durchgeführt:

Der auf der Rückmutation Histidin auxotropher Stämme von *Salmonella typhimurium* beruhende Ames Test wurde in den Stämmen TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 durchgeführt. Die Ergebnisse waren jeweils mit und ohne metabolisches System (Aroclor 1254 induzierter Rattenleber-S9) im Konzentrationsbereich von 3,1 – 10.000 µg/Platte negativ [HRC, 1978c; BASF, 1978b].

Die verwendeten Stämme zeigen Punkt- (TA 100, TA 1535) und Leserastermutationen (TA 98, TA 1537) an und enthalten das pKM101-Plasmid (z.B. TA 98 und TA 100), welches Gene für das besonders fehleranfällige „SOS-Reparatursystem“ enthält und so die Sensitivität der Stämme gegenüber Mutagenen erhöht.

In weiteren Untersuchungen wurden TA 98 Kulturen, die neben Leber-S9 männlicher Ratten (Aroclor 1254-induziert) auch den Glutathion-Depletor und Epoxidhydrolase-Inhibitor 1,1,1-Trichloropropen-2,3-oxid enthielten, gegen NVP exponiert. In diesem Fall ist die Bakterienkultur besonders anfällig gegen oxidative Schäden. Auch unter diesen Testbedingungen wurde keine Mutagenität von NVP beobachtet [BASF, 1978b]. Zu allen Tests sind valide Positiv- und Negativkontrollen vorhanden.

Auch in Säugerzellen wurden verschiedene Untersuchungen zur Gentoxizität und Mutagenität von NVP durchgeführt. Genmutationstests in L5178Y (Mauslymphomazellen) am TK-Lokus (0,39 - 10 µL/mL, 4 Stunden) [Litton Bionetics, 1980a] und HPRT-Lokus [Knaap, 1985] erwiesen sich mit und ohne metabolisierendes System (Rattenleber-S9) als negativ. In humanen Lymphozyten wurden zur Prüfung auf zytogenetische Effekte, Studien mit Testkonzentrationen zwischen 20 - 900 µg/mL durchgeführt. In diesen Prüfungen, die mit und ohne metabolisierendes System durchgeführt wurden (+/- Rattenleber-S9), zeigte sich weder eine Erhöhung der Chromosomenabberationen (CA) noch eine Änderung des mitotischen Indexes [BASF, 1987].

Als weiterer *in vitro* Test, wurde an primären Rattenhepatozyten im Konzentrationsbereich von 0,3 – 9,09 µL/mL der UDS-Test (*unscheduled DNA-synthesis test*) durchgeführt. Der Test lieferte bei validen Positiv- und Negativkontrollen keinen Hinweis auf NVP-induzierte DNA-Schäden, bzw. auf die daraus resultierende DNA-Reparatur [Litton Bionetics, 1980b].

1 Einleitung

In vivo wurde NVP mittels MNT in NMRI-Mäusen (*p.o.*) und einer DNA-Bindungsstudie an männlichen CD-Ratten (*i.p.*) auf DNA-schädigende bzw. interagierende Wirkung geprüft.

Mit Hilfe des MNTs können schädigende Effekte einer Testsubstanz auf den Spindelapparat und chromosomenschädigende Wirkung unterschieden werden. Während Spindelgifte (Aneugene) wie Vincristin große Mikrokerne induzieren, die komplette Chromosomen enthalten, resultieren aus Chromosomenschäden, z.B. durch Ethylmethansulfonat (Klastogen) kleine Mikrokerne, welche Chromosomenbruchstücke enthalten.

Die mit 150, 300, 600 mg/kg KG (*p.o.*) NVP behandelten Tiere wurden nach 16, 24 und 48 Stunden getötet und Knochenmarksausstriche angefertigt. NVP induzierte in den behandelten Tieren keine Erhöhung der Mikrokernanzahl im Vergleich zur Vehikelkontrolle [BASF, 1993].

Zur Testung auf mögliche DNA-Bindung von NVP wurden männliche CD-Ratten mit der Testsubstanz dosiert (*i.p.*). Die Dosen betragen 150 und 300 mg NVP/kg KG. Die spezifischen Aktivitäten der Niedrigdosierung betragen 350,834 MBq/g N-Vinyl[α,β - ^{14}C]-2-pyrrolidon und 268,472 MBq/g N-Vinyl-2-pyrrolidone[5- ^{14}C]. Die Hochdosierung wies eine spezifische Aktivität von 175,380 MBq/g N-Vinyl[α,β - ^{14}C]-2-pyrrolidon und 138,824 MBq/g N-Vinyl-2-pyrrolidone[5- ^{14}C] auf. Die Applikation erfolgte entweder einmalig oder an 5 aufeinander folgenden Tagen. Die Tötung der Tiere zur Leberentnahme fand bei der Einzeldosis 1 und 5 Stunden nach Substanzgabe statt und bei der fünfmaligen Verabreichung 1 Stunde nach der letzten Dosierung. Es konnte keine Bindung von markierter Testsubstanz oder ihrer Metabolite an die DNA nachgewiesen werden. Erhöhte Aktivität wurde an einem Polymer festgestellt, bei dem angenommen wurde, dass es sich um Glycogen handelt [IRI, 1986]. Basierend auf den beschriebenen Befunden bewertet die MAK-Kommission NVP mit Hinblick auf DNA-Bindungspotential als negativ. Ergänzend wurde vermerkt, dass eine 8-OH-Guanosinbildung durch Hydroxylradikale oder ein bei der Nucleosidanalyse labiles Addukt mit Acetaldehyd möglicherweise nicht detektiert worden wäre [MAK NVP, 2014].

1.2.7 Epidemiologie

Epidemiologische Daten zu NVP sind nicht bekannt. Nach einer einmaligen Exposition von Arbeitern gegenüber einer unbekanntem NVP-Dampfkonzentration wurde über Benommenheit und Müdigkeit berichtet [BASF, 1941; EURAR, 2003].

Eine Querschnittsuntersuchung zur Morbidität von NVP-Produktionsarbeitern einer deutschen Herstellungsstätte zeigte keine Hinweise auf Gesundheitseffekte aufgrund der NVP-Exposition. Hierbei wurde berücksichtigt, dass die Arbeiter bei Tätigkeiten, bei denen eine Exposition gegen NVP erwartete wurde, Atemmasken trugen. Informationen zu Expositionskonzentrationen, denen die Arbeiter ausgesetzt waren, sind nicht bekannt. Aufgrund dieser Limitierung ist die Studie nicht geeignet um sie zur humanen Risikoabschätzung einzusetzen [EURAR, 2003].

1 Einleitung

1.2.8 Zusammenfassung des Toxizitätsprofils

NVP wird oral, dermal und inhalativ absorbiert, unterliegt einem umfassenden Metabolismus und wird überwiegend renal eliminiert. Zudem gibt es basierend auf den Daten einer Kinetikstudie Grund zu der Annahme, dass NVP in den enterohepatischen Kreislauf eintritt, da der über die Gallenflüssigkeit eliminierte Dosisanteil höher ist, als der Teil, der über die Faeces tatsächlich ausgeschieden wird [McClanahan *et al.*, 1983]. In Untersuchungen nach *i.v.* und oraler NVP-Applikation wurde gezeigt, dass der höchste Teil der applizierten Dosis in der Leber, der Niere, sowie im Dünndarm und dessen Inhalt zu finden ist. Eine Akkumulation im Fettgewebe wurde nicht beobachtet. NVP wird in der Ratte zu 2 wasserlöslichen Hauptmetaboliten metabolisiert, welche bisher nicht identifiziert wurden [McClanahan *et al.*, 1983, 1984, 1987].

Die akute Toxizität NVPs ist gemäß der Datenlage (siehe Kapitel 1.2.3) und der harmonisierten Einstufung in die Kategorie 4 gemäß CLP Verordnung nach oraler, dermalen und inhalativer Aufnahme moderat.

Nach wiederholter Gabe wirkt NVP vornehmlich toxisch auf die Leber, wobei auch Effekte auf hämatologische Parameter und nach inhalativer Exposition zudem lokale Effekte in der Nasenhöhle beobachtet wurden. Hierbei induzierte NVP bei chronischer Exposition in Ratten dosisabhängig Leberzellkarzinome (5 ppm), Adenome (5 ppm) und Adenokarzinome (10 ppm) in der Nasenhöhle, sowie Plattenepithelkarzinome des Kehlkopfes (20 ppm) [Klimisch, 1997a & 1997b]. Alle durchgeführten Gentoxizitäts- und Mutagenitätstests *in vitro* und *in vivo* waren negativ, sodass kein Hinweis auf einen gentoxischen Wirkmechanismus der NVP-induzierten Kanzerogenese vorliegt (siehe Kapitel 1.2.6). Aufgrund der erstmalig nach einer Woche Inhalationsexposition beobachteten Zellproliferation in der Leber (1 ppm NVP) [BASF, 2011], wurde postuliert, dass ein zellproliferierender Wirkmechanismus im Vordergrund der Kanzerogenese steht [EURAR, 2003; MAK NVP, 2014].

2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es den hepatokanzerogenen Wirkmechanismus NVPs zu untersuchen. Hierzu wurden verschiedene bekannte Mechanismen der Hepatokanzerogenese, wie (1) Genotoxizität, (2) oxidativer Stress und (3) Rezeptor-vermittelte Wirkmechanismen innerhalb einer fünftägigen NVP-Inhalationsstudie an Ratten adressiert.

Bisherige Studien zur Genotoxizität und Mutagenität lieferten sowohl *in vitro* (Ames-, HPRT-, Chromosomenabberations- und UDS-Test, Zelltransformationsassay) als auch *in vivo* (Mikrokern Test im Knochenmark der Maus) negative Ergebnisse (siehe Kapitel 1.2.6). Um Genotoxizität als möglichen kanzerogenen Wirkmechanismus unter den zur Tumorbildung führenden Expositionskonzentrationen zu untersuchen, wurden Wistar Ratten beider Geschlechter an 5 aufeinanderfolgenden Tagen inhalativ gegen 0, 5, 10 und 20 ppm NVP-Dampf exponiert. Zur Erfassung einer möglichen chromosomenschädigenden Wirkung durch NVP wurde das Knochenmark zum Mikrokern Test (MNT) nach OECD 474 eingesetzt.

DNA-Strangbrüche stellen genotoxische Ereignisse dar. Um diese im empfindlichsten Zielorgan der Kanzerogenese zu testen, wurden die Lebern zum Comet Assay eingesetzt. Da die Lunge bei inhalativer Exposition das Organ des ersten Substanzkontaktes darstellt und hier besonders hohe NVP-Konzentrationen zu erwarten sind, wurden zudem mögliche DNA-Schädigungen in Lungenzellen mittels Comet Assay analysiert.

Oxidativer Stress als kanzerogener Mechanismus NVPs wurde in den bisherigen Toxizitätsstudien zu NVP nicht adressiert. Dieser kann durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zur Schädigung endogener Moleküle, wie DNA, Lipiden oder Proteinen, führen. Zur Untersuchung oxidativer DNA-Schäden wurde daher der Comet Assay mit Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (FPG) Modifikation in Lebern und Lungen der Ratten der NVP-Inhalationsstudie durchgeführt. FPG spaltet die DNA an Stellen oxidativer Schäden und erhöht somit die Anzahl der Strangbrüche, welche im Comet Assay detektiert werden. Um oxidativem Stress entgegenzuwirken, verfügen Zellen über bestimmte Mechanismen. Eine zentrale Rolle spielt hierbei das Glutathion-System. Um einen möglichen Einfluss auf dieses System durch NVP zu überprüfen, wurden reduzierte (GSH) und oxidierte (GSSG) Glutathiongehalte in Leberhomogenaten der Ratten der NVP-Inhalationsstudie mittels Glutathion-Recycling-Assay und Bestimmung der nicht proteingebundenen Sulfhydrylgruppen analysiert.

Rezeptoraktivierungen, welche unter anderem zellproliferierende Prozesse auslösen, sind mögliche nicht genotoxische Wirkmechanismen einer substanzinduzierten Hepatokanzerogenese. Um einen möglichen Einfluss einer Aktivierung des Arylhydrocarbon Rezeptors (AhR), des konstitutiven Androstan Rezeptors (CAR), des Pregnan-X Rezeptors (PXR) und des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors (PPAR α) auf die NVP-vermittelte

2 Ziel der Arbeit

Hepatokanzerogenese zu untersuchen, wurden die Aktivitäten verschiedener Markerenzyme analysiert, deren Expression unter der Regulierung der genannten Rezeptoren steht. Hierzu wurde der Alkoxyresorufindealkylase-Assay (AROD-Assay) in Leber- und Lungenmikrosomen der NVP-Inhalationsstudie eingesetzt, welcher eine potentielle Aktivierung des AhR, CAR und PXR durch eine Erhöhung der Enzymaktivitäten von CYP1A, CYP2B und CYP3A anzeigt. Um eine Aktivierung des PPAR α in der Leber der NVP-Inhalationsstudie zu überprüfen, wurden die Enzymaktivitäten von CYP4A und der Palmitoyl-CoA-Oxidase bestimmt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht in der Untersuchung der abiotischen und metabolischen Stabilität NVPs *in vitro*. NVP ist verschiedenen Kompartimenten des Organismus unterschiedlichen pH-Werts ausgesetzt, daher wurde die abiotische Stabilität in verschiedenen Simulationsmedien mit variierenden pH-Werten adressiert. Der Metabolismus einer Substanz kann eine erhebliche Rolle in deren toxischem Wirkmechanismus spielen. Die Leber ist das Hauptzielorgan der NVP-vermittelten Kanzerogenese, daher wurden verschiedene *in vitro* Systeme zur Untersuchung des hepatischen Metabolismus herangezogen (subzelluläre Fraktionen, Hepatozyten, Präzisionsleberschnitte). Ziel ist es, die metabolische Stabilität in diesen *in vitro* Systemen zu untersuchen und die gebildeten Metabolite zu identifizieren.

3 Material und Methoden

3.1 Mechanistische Untersuchungen *in vivo*: Fünftägige NVP-Inhalationsstudie an Wistar Ratten

3.1.1 Studiendesign

Die in dieser Arbeit beschriebene Tierstudie wurde in einer AAALAC zertifizierten Prüfeinrichtung nach Genehmigung der zuständigen Behörde (Landesuntersuchungsamt Koblenz, Genehmigungsnummer G 13-3-042) durchgeführt.

Es handelt sich um eine Inhalationsstudie, bei der 6 Wistar Ratten (Crl:WI (Han)) pro Geschlecht und Dosisgruppe an 5 aufeinander folgenden Tagen gegenüber NVP exponiert wurden. Die Exposition erfolgte mit Konzentrationen von 0, 5, 10 und 20 ppm in Ganzkörperexpositionskammern. Die Expositionsart, sowie die Expositionskonzentrationen wurden analog zur von Klimisch beschriebenen Kanzerogenitätsstudie gewählt [Klimisch *et al.*, 1997b].

Die Tiere wurden von Charles River (Charles River Laboratories, Sulzfeld) im Alter von 8 Wochen bezogen und nach einer zehntägigen Akklimatisierungsphase für den Versuch eingesetzt. Außerhalb der Expositionsphasen wurden die Ratten in Polysulfonkäfigen (TECNI-PLAST) in klimatisierten Räumen (20-24°C, relative Luftfeuchte: 30-70%) in Gruppen von 6 Tieren gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Futter (10 mm Pellets, Provimi Kliba SA, Kaiseraugst).

Bevor die NVP-Exposition startete, wurden die Ratten einer zweitägigen Vorströmung ohne Testsubstanz ausgesetzt, um Sie an die Expositions-kammer zu gewöhnen.

Zur NVP-Inhalationsstudie wurden die Ratten randomisiert in 5 Gruppen (0-4) zu je 6 Tieren pro Geschlecht eingeteilt. Die NVP-Inhalation erfolgte an 5 aufeinander folgenden Tagen für jeweils 6 Stunden mit Konzentrationen von 0 ppm (Kontrolle), 5 ppm / 23 mg/m³ (Gruppe 1), 10 ppm / 46 mg/m³ (Gruppe 2) und 20 ppm / 92 mg/m³ (Gruppe 3). Als Positivkontrolle (Gruppe 4) wurden Tiere einmalig mit Ethylmethylsulfonat (200 mg/kg KG) in physiologischer Kochsalzlösung per Schlundsonde dosiert und nach 24 Stunden getötet.

Zur Bestimmung des Einflusses der Testsubstanz auf die Körpergewichte der Inhalationsgruppen (0-3) wurden diese vor der Präexposition, sowie vor und nach der NVP-Expositionsphase bestimmt. Nach dem fünften Inhalationstag wurden die Tiere über Nacht zur Urinsammlung in Metabolismuskäfigen gehalten. Der Urin wurde bei -80°C für eine spätere Analyse auf NVP und dessen Metaboliten gelagert. Am Morgen nach der letzten Exposition wurden die Tiere getötet und die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Untersuchungen durchgeführt.

3 Material und Methoden

Die Auswertung der Gentoxizitätsparameter erfolgte kodiert, weshalb ab dem Zeitpunkt der Betäubung der Tiere Code-Nummern anstatt der Tiernummern verwendet wurden.

3.1.2 Exposition

Die Ganzkörperexposition gegenüber NVP-Konzentrationen von 0, 5, 10 und 20 ppm (0, 23, 46, 92 mg/m³) wurde vom Laborteam für Inhalationstoxikologie der BASF SE durchgeführt. Die Ratten wurden hierzu über die Inhalationszeit von 6 Stunden pro Tag in Gruppen von 2 Tieren pro Drahtkäfig (DK III, Becker & CO., Castrop-Rauxel) in den Glas-Stahl-Inhalationskammern (V ≈ 200 L) ohne Zugang zu Wasser und Futter gehalten.

Die Erzeugung der NVP-Dampf-Atmosphäre erfolgte kontinuierlich (Abbildung 3). Hierzu wurde für jede Testkonzentration eine konstante Menge NVP mittels einer Pumpe (Continuous infusion pumps PHD Ultra, Havard Apparatus Inc., Holliston) zum temperierten Verdampfer (Glasverdampfer BASF SE, Ludwigshafen; Thermostat Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) gepumpt und der so generierte Dampf mit dem Zuluftstrom in die Inhalationskammer geleitet.

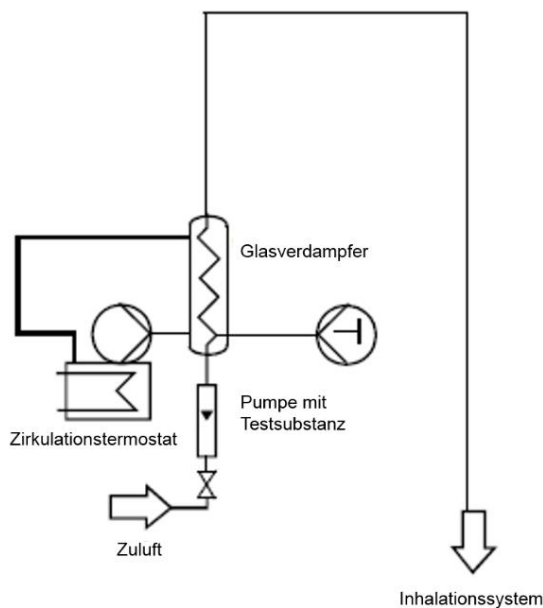


Abbildung 3: Erzeugung der NVP-Atmosphäre

Die Inhalationsatmosphäre verlässt die Kammer über das Abluftsystem, wobei durch einen im Vergleich zum Luftzustrom erhöhten Abluftstrom gewährleistet wird, dass bei einem eventuellen Leck des Inhalationssystems die Laborluft nicht kontaminiert wird.

Die Überprüfung der Konzentration der Inhalationsatmosphäre erfolgte durch das Laborteam Analytische Chemie der experimentellen Toxikologie und Ökologie der BASF SE. Hierzu wurde das in einem definierten Volumen der Inhalationsatmosphäre enthaltene NVP in Isopropanol gelöst und mittels GC/FID vermessen (Parameter siehe Tabelle 4). Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer externen Kalibrierreihe in Isopropanol (0,5 – 10 mg/100 mL).

3 Material und Methoden

Tabelle 4: GC-Parameter zur NVP-Konzentrationsbestimmung

System	Agilent 6890 mit Autosampler, FID, Dionex Chromeleon Software
Säule	ZB-WAXplus, Zebron, Länge: 30 m, innerer Durchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm
Injektion	1,0 µL (Split 1:20)
Injektortemperatur	250°C
Fluss	1 mL/min
Isotherm	160°C
Trägergas	Helium
Detektor	FID (300°C)
R _t	ca. 4 min

3.1.3 Sektion

Die Ratten wurden mittels Isofluran betäubt (ca. 3 min bei 3,5 %, Narkosemittelverdunster: Dräger Vapor 19.3) und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Zunächst wurde die Ratte auf dem Rücken liegend mit abgespreizten Extremitäten auf einem Korkbrett befestigt. Nach Besprühen mit Ethanol (70%) wurde die Felldecke mit einem Knopflochschnitt geöffnet und so weit abgetrennt, dass bei anschließender Öffnung der Bauchhöhle gute Sicht vorlag. Die Bauchhöhle wurde so weit geöffnet dass die Leber frei lag und entnommen werden konnte. Der linke laterale Leberlappen wurde für den Comet Assay eingesetzt, der restliche Teil der Leber wurde zunächst in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend in 2 Aliquots in Flüssigstickstoff für weitere Untersuchungen (Enzymaktivitäten, Glutathiongehalt) schockgefroren und bei -80°C gelagert. Anschließend wurde der Brustkorb geöffnet und die Lunge entnommen. Der linke Lungenlappen wurde zum Comet Assay eingesetzt und das restliche Organ analog zur Leber behandelt und asserviert. Als nächster Arbeitsschritt erfolgte die Freilegung und Entnahme beider Oberschenkelknochen zur Knochenmarkspräparation (Kapitel 3.1.4.1).

3.1.4 Gentoxizität

3.1.4.1 Mikrokern Test

Prinzip der Methode

Der *in vivo* Mikronukleus/Mikrokern Test (MNT) wurde 1970 erstmals von Boller und Schmid beschrieben und ist seit vielen Jahren in der OECD Guideline 474 (Erstversion 1983) als Test zur Untersuchung des gentoxischen Potenzials einer Substanz verankert [OECD 474, 2014]. Der MNT kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt werden. Mikrokerne entstehen während der Anaphase der Zellteilung und bestehen aus ganzen Chromosomen (große Mikrokerne) oder Chromosomenbruchstücken (kleine Mikrokerne), die von einer Kernmembran umgeben sind [Boller & Schmid, 1970; Heddle, 1973]. Anhand der Größe der Mikrokerne lassen sich Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus einer Substanz ziehen. Chromosomenschädigende Agentien/Klastogene, erzeugen vorwiegend kleine ($< 1/4$ des Zelldurchmessers), Spindelgifte/Aneugene vorwiegend große Mikrokerne ($\geq 1/4$ des Zelldurchmessers) [Yamamoto & Kikuchi, 1980].

Wird mit Ratten gearbeitet, müssen die im Knochenmark enthaltenen Mastzellen vor Objektträgerpräparation mittels Zellosesäulen abgetrennt werden.

Tabelle 5: Lösungen MNT

Lösung	Herstellung
Fetales Kälberserum	gebrauchsfertig; Biochrom AG, Berlin
Giemsa-Lösung-Stamm	gebrauchsfertig; Merck KGaA, Darmstadt
Giemsa-Lösung	7,5%ige Färbelösung aus Stammlösung mit ddH ₂ O
HBSS	gebrauchsfertig; Biochrom AG, Berlin (mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺)
May-Grünwald-Lösung 1	gebrauchsfertig; Merck KGaA, Darmstadt
May-Grünwald-Lösung 2	1 Volumen May-Grünwald-Lösung 1 + 1 Volumen ddH ₂ O

Zellosesäulenherstellung

Zur Herstellung der zur Aufreinigung des Knochenmarks erforderlichen Zellosesäulen wurden 13 mm Filterscheiben mit einer Porengröße von 8 μ m am Boden von 5 mL-Plastikspritzen platziert. Hierauf wurden ca. 500 mg eines Gemisches mit gleichen Massenanteilen von mikrokristalliner Cellulose (Sigmacell[®], Typ 50) und α -Zellulosefasern gegeben und so lange auf einer harten Fläche aufgeklopft, bis die 2 mL-Marke der Spritze erreicht war.

Knochenmarkspräparation

Das Knochenmark wurde nach den beschriebenen Methoden von Salamone *et al.* und Romagna und Staniforth präpariert [Romagna & Staniforth, 1989, Salamone *et al.*, 1980]. Hierzu wurde das weiche Gewebe von den Oberschenkelknochen (Femora) entfernt und die Epiphysen abgeschnitten. Das Knochenmark wurde aus der Diaphyse in Zentrifugenröhrchen

3 Material und Methoden

mit auf 37°C temperiertem fetalem Kälberserum (FCS) herausgespült, wobei ca. 3 mL pro Femur eingesetzt wurden. Nach kurzem vorsichtigem Mischen der Knochenmarksuspension wurde diese auf die Zellose säule überführt und nach vollkommenem Einziehen der Suspension in die Säule mit 3 mL HBSS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺) 10-15 Minuten eluiert. Das Eluat, welches die verschiedenen Reifungsstadien der Erythrozyten enthält, wurde zentrifugiert (300 g, 5 Minuten) und das Pellet in 50 µL frischem FCS aufgenommen. Aus dieser Suspension wurden pro Oberschenkelknochen 3 Ausstriche angefertigt, die zunächst an der Luft getrocknet und anschließend angefärbt wurden.

Färbung

Die Färbung der Objektträger erfolgte zunächst für 4 Minuten in May-Grünwald-Lösung 1, gefolgt von weiteren 4 Minuten in May-Grünwald-Lösung 2. Hiernach wurden die Objektträger 2 Mal mit Reinstwasser gespült und anschließend mit Giemsa-Lösung (Tabelle 5) für 15 Minuten gefärbt. Nach einem erneuten zweimaligen Waschen mit Reinstwasser wurden die Objektträger getrocknet, in Xylol geklärt und anschließend mit Corbit-Balsam eingedeckt.

Auswertung

Bei der mikroskopischen Auswertung der Objektträger mit dem Programm MUKERN (BASF SE, Ludwigshafen) wurden 2000 polychromatische Erythrocyten (PCE) pro Tier gezählt, wobei auch alle im Sichtfeld befindlichen PCEs mit einem oder mehreren Mikrokernen (MN), sowie normochromatische Erythrozyten (NCE) mit und ohne Mikrokern erfasst wurden. Die PCEs und NCEs sind an ihrer Färbung unterscheidbar: während die PCEs blau bis grau erscheinen, sind die NCEs eher gelb- bis orangefarben (aufgrund des niedrigen RNA-Gehalts). Des Weiteren wird zwischen großen und kleinen Mikrokernen unterschieden. Große Mikrokerne sind größer als oder gleich einem Viertel des Zelldurchmessers, während kleine Mikrokerne diese Größe nicht erreichen. Generell sind Mikrokerne aufgrund ihres DNA-Gehaltes violett bis rot gefärbt.

Die Auswertung der Objektträger erfolgte mit Immersionsöl bei tausendfacher Vergrößerung. Pro Tier wurden 2000 PCEs (je 1000 Zellen auf 2 Objektträgern) gezählt. Somit ergab sich eine Anzahl von 12000 PCEs pro Dosisgruppe.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm MUKERN, welches einen einseitigen Wilcoxon Test durchführt, um auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen substanzbehandelten Gruppen und Vehikelkontrolle zu untersuchen.

Ein weiterer Parameter ist der Anteil der PCEs an der Gesamterthrozytenanzahl einer Behandlungsgruppe, welcher zur Bewertung einer möglichen Substanzwirkung auf die Erythropoese im Knochenmark herangezogen wurde.

3 Material und Methoden

Bewertungskriterien

Das Ergebnis des Mikrokerntests wird als positiv bewertet, sobald die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- (1) Die Anzahl der PCE mit Mikrokern ist statistisch signifikant und dosisabhängig erhöht.
- (2) Die Anzahl der PCE mit Mikrokern übersteigt sowohl die mitgeführte, wie auch den Bereich der historischen Negativkontrolle.

Das Ergebnis des Mikrokerntests wird als negativ bewertet, sobald die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- (1) Die Anzahl der Zellen mit Mikrokern der Dosisgruppe ist statistisch nicht signifikant im Vergleich zur mitgeführten Negativkontrolle erhöht und liegt innerhalb der historischen Daten der Negativkontrolle.

3.1.4.2 Comet Assay

Prinzip der Methode

Der Comet Assay, auch als Einzelzellgelelektrophorese bezeichnet, ist eine Methode zur Untersuchung von DNA-Strangbrüchen auf der Ebene einzelner Zellen. Erstmals unter neutralen Bedingungen von Östling und Johanson 1984 beschrieben [Ostling & Johanson, 1984], wird er heute vor allem unter alkalischen Bedingungen nach der Methode von Singh *et al.* eingesetzt [Singh *et al.*, 1988]. Hierbei wird zunächst die DNA der Zellen durch Lyse zugänglich gemacht und nach anschließender Entwindung elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wandern die kleineren DNA-Bruchstücke im elektrischen Feld weiter in Richtung Anode als intakte DNA, wodurch nach Behandlung mit interkalierenden Farbstoffen das Bild eines Kometen entsteht, nachdem der Assay benannt ist. Je nach pH-Wert bei Entwindung und Elektrophorese können verschiedene DNA-Schäden detektiert werden. Während bei neutralem pH vor allem Doppelstrangbrüche sichtbar werden, können bei alkalischem (pH=12,1) auch Einzelstrangbrüche und bei stark alkalischem pH (pH>13) des Weiteren auch alkalilabile Stellen als Strangbrüche detektiert werden [Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000].

Eine Variation des klassischen Comet Assays ist das zusätzliche Inkubieren der Zellen auf den Objektträgern mit der Endonuklease Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) aus *E.coli*. Substrate von FPG sind modifizierte Purine, wie 8-Hydroxyguanin, 8-Hydroxyadenin und Formamidopyrimidine (Fapy-Gua, Fapy-Ade) [Boiteux *et al.*, 1992]. Diese werden in der DNA erkannt und entfernt, sodass diese Läsionen als Strangbrüche sichtbar werden. Da 8-Hydroxyguanin als Marker für oxidative DNA-Schäden genutzt wird, wird die FPG-Behandlung häufig als Nachweismethode für oxidative DNA-Schäden angewendet.

Tabelle 6: Lösungen Comet Assay

Lösung	Herstellung
<i>Normal melting Agarose</i> (NMA)	0,6%ige (w/w) Lösung in PBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)
<i>Low Melting Agarose</i> (LMA)	0,7%ige (w/w) Lösung in PBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)
<i>Mincing-Puffer</i>	7,44 g EDTA-Na ₂ in ca. 400 mL HBSS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺) lösen, mit 2 M NaOH auf pH 7,5 einstellen, kurz vor Gebrauch 50 mL DMSO zugeben, auf 500 mL mit HBSS auffüllen, Lagerung 4°C
Lyse-Puffer 1 (LP1)	146,4 g NaCl; 1,2 g Tris in 500 mL ddH ₂ O lösen
Lyse-Puffer 2 (LP2)	5 g NaOH; 37,2 g EDTA in 200 mL ddH ₂ O lösen
Lyse-Puffer	LP1 und LP2 mischen, pH mit 2 M NaOH auf pH 10 einstellen und mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen, vor Gebrauch 1% TritonX und 10% DMSO zufügen, Lagerung 4°C
Stammlösung EDTA (0,2 M)	74,4 g EDTA in 900 mL PBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺) lösen, pH 10 einstellen, mit PBS auf 1 L auffüllen, Lagerung 4°C

3 Material und Methoden

Lösung	Herstellung
Stammlösung NaOH (10 M)	400 g NaOH in 1 L ddH ₂ O lösen, Lagerung 4°C
Elektrophoresepuffer	150 mL Stammlösung NaOH, 25 mL Stammlösung EDTA auf 5 L mit ddH ₂ O auffüllen, 1 Tag vor Gebrauch, Lagerung 4°C
Neutralisationspuffer	48,5 g Tris in ca. 900 mL ddH ₂ O lösen, mit 37%iger HCl auf pH 7,5 einstellen, auf 1 L auffüllen mit ddH ₂ O, Lagerung 4°C
Stammlösung BSA (100x)	200 mg BSA in 10 mL FPG-Puffer, Lagerung -20°C
FPG-Puffer	47,7 g HEPES, 0,9306 g EDTA-Dinatriumsalz, 37,275 g KCl in 4,5 L ddH ₂ O lösen, mit KOH auf pH 8 einstellen, mit ddH ₂ O auf 5 L auffüllen, kurz vor Gebrauch 50 mL Stammlösung BSA zugeben, Lagerung 4°C
FPG-Enzym-Stammlösung	7 µL FPG-Enzym (14 U), 70 µL Glycerin in 623 µL FPG-Puffer geben, Lagerung -80°C
FPG-Enzym-Puffer	FPG-Enzym-Stammlösung 1:30 mit FPG-Puffer verdünnen, frische Herstellung
Ethidiumbromid-Lösung (0,05%)	7,5 µL Ethidiumbromid (1% (w/v)) mit 15 mL ddH ₂ O verdünnen, steril filtrieren, Lagerung RT im Dunkeln

Beschichtung der Objektträger

Mindestens einen Tag vor Gebrauch der Objektträger (OT) wurden diese mit *Normal-melting-Agarose* (NMA, 0,6%) beschichtet. Hierzu wurde die Agarose mit PBS in der Mikrowelle bis zum Schmelzen erhitzt und dann auf einer Heizplatte bei ca. 70°C flüssig gehalten. Die OTs wurden in das mit Agaroselösung befüllte 50 mL Becherglas eingetaucht und die Agarose gleichmäßig auf diesen verteilt. Die OTs wurden zum Trocknen ausgelegt und konnten nach 24 Stunden verwendet oder staubfrei bei Raumtemperatur bis zur Auswertung gelagert werden.

Zellisolation und Elektrophorese

Die Gewinnung der Leber- und Lungenzellen erfolgte mittels mechanischer Zerkleinerung (*Mincing*), nach den beschriebenen Methoden von Hartmann *et al.* und des *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods* [Hartmann *et al.*, 2004; JaCVAM, 2009], wobei die Einzelzellisolation innerhalb einer Stunde nach Tötung erfolgte, um die Höhe der DNA-Hintergrundschädigung so gering wie möglich zu halten.

Die entnommenen Organteile (linker lateraler Leberlappen, linker Lungenflügel) wurden zunächst in 10 mL *Mincing*-Puffer gewaschen um Blut aus diesen zu entfernen. Anschließend wurden Leber und Lunge in 10 mL-Gefäße verbracht, in denen jeweils 6 mL, bzw. 2 mL eiskalter *Mincing*-Puffer vorgelegt war. In diesem Puffer wurden die Organe mithilfe von Scheren in ca. 1-2 mm kleine Stücke zerkleinert, um die Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen. Die Zellsuspensionen wurden anschließend zur Zellvereinzlung vorsichtig durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) gegeben.

3 Material und Methoden

Die Viabilität der Zellen der Suspension wurde mittels Trypan-Blau-Assay (Versuchsbeschreibung im folgenden Abschnitt) bestimmt. Der Comet Assay wurde gemäß dem Prinzip nach Singh *et al.* und Tice *et al.* unter alkalischen Bedingungen durchgeführt [Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000]. Hierzu wurden 100 µL Zellsuspension mit 900 µL *Low-melting-Agarose-Lösung* (LMA) bei 37°C vermischt. Je 100 µL dieser Mischung wurden auf mit NMA beschichtete, mit Tiercodes beschriftete OT (6 pro Organ) aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt. Nach Aushärten der Agarose durch Platzieren der OT auf einem Kühlakku (etwa 4°C) wurden die Deckgläser entfernt und die OT über Nacht zur Lyse der Zell- und Kernmembran und Entfernung der Histone in Lyse-Puffer (pH 10) bei 4°C belassen.

Die OT 1-3 wurden zum konventionellen, die OT mit den Nummern 4-6 zum Comet Assay mit FPG-Modifikation eingesetzt. Alle folgenden Prozesse wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, um UV-induzierte DNA-Schäden zu vermeiden.

Die OT 4-6 bei welchen eine FPG-Behandlung erfolgte, wurden nach der Lyse dreimalig für 5 Minuten mit FPG-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 50 µL FPG-Enzym-Puffer auf jeden OT pipettiert, dieser mit einem Deckglas bedeckt und 30 Minuten auf einem feuchten Filterpapier im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Agarose auf den OT durch Kühlung gehärtet und die Deckgläser entfernt.

Vor der Elektrophorese wurden alle OT zur Entfernung von FPG- bzw. Lyse-Puffer-Resten in PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen (einmaliges Eintauchen).

Die Objektträger (1-3 nach der Lyse, 4-6 nach FPG-Behandlung) wurden in zufälliger Anordnung mit der beschrifteten Seite Richtung Kathode in die vor Licht geschützte und gekühlte Elektrophoresekammer platziert und mit Elektrophorese-Puffer (pH>13) bedeckt. Dabei wurde darauf geachtet keine Luftblasen am Kammerboden einzuschließen. Nach 20 Minuten, die zur Entwindung der DNA dienen, wurde die Elektrophorese (25 V, 300 mA, 0,85 V/cm², 30 min) gestartet. Hierbei wurde die Spannung am Gerät eingestellt und die Stromstärke durch Volumenvariation des Elektrophoresepuffers reguliert. Nach beendeter Elektrophorese wurden die OT in Neutralisationspuffer gewaschen (2 mal 5 Minuten), anschließend 1 Minute in reinem Ethanol entwässert und fixiert und bei Raumtemperatur über Nacht auf Filterpapier getrocknet. Die fixierten und getrockneten OT wurden staubfrei bei Raumtemperatur bis zur Auswertung gelagert.

Auswertung

Die Auswertung des Comet Assays erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie, nach DNA-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid.

Hierzu wurden 40 µL einer Ethidiumbromidlösung (Tabelle 6) auf den OT pipettiert, mit einem Deckglas bedeckt und Immersionsöl aufgegeben. Das Zählen und Evaluieren der Zellen bzw. Kometen erfolgte semiautomatisch mit einem Bildanalysesystem direkt nach der Färbung

3 Material und Methoden

(Programm: Comet Assay IV™, Perceptive Instruments Ltd., Bury St Edmunds; Intensitätsstufe 2 des Fluoreszenzmikroskops, Objektiv 40x).

Pro Tier und pro Organ wurden 100 Zellen auf 2 OT gezählt (50 Zellen/OT). Die Auswertung erfolgte kodiert, wobei nur ein OT pro Organ und Codenummer von der gleichen Person ausgewertet wurde. Auf diese Weise lässt sich der subjektive Einfluss des Experimentators auf das Ergebnis minimieren. Beim Auswerten wurde darauf geachtet, dass die Kriterien des standardisierten Comet Assay Auswerteatlas erfüllt wurden [Nakajima *et al.*, 2009]. Danach soll z.B. vermieden werden, Zellen am Rand des Objektträgers auszuwerten, weiterhin sollen die gezählten Zellen zufällig ausgewählt und sogenannte *Hedgehogs* (diffuse Zellen ohne erkennbaren Kopf) nicht berücksichtigt werden. *Hedgehogs* wurden in einer separaten Zählung erfasst; hierbei wurden all jene gezählt, die bei der regulären Zählung im Gesichtsfeld zu sehen waren.

Zur Bewertung des DNA-Schadens wurde die sogenannte (relative) *Tail-Intensity* (TI) in Prozent bestimmt. Dieser Parameter ist ein Maß für die relative Fluoreszenzintensität im Schweif (*Tail*) des Kometen und demnach gleichzeitig ein Maß für die Menge an DNA in diesem. Die Zahlenwerte der TI liegen zwischen 0% und 100% und sind von den Einstellungen des Auswerteprogramms unabhängig. Die TI wird aufgrund der Eindeutigkeit des Begriffs und der Linearität zu DNA-Strangbrüchen als Parameter empfohlen [Colins *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2003; Lovell & Omori, 2008]. In dieser Studie wurde deshalb die TI als Bewertungsparameter gewählt, wobei zu ihrer Berechnung im jeweiligen Organ die Mittelwerte der Mediane der pro Tier ausgewerteten Objektträger (2 Stück mit je 50 Zellen) berechnet und hieraus der Mittelwert einer Dosisgruppe bzw. der Kontrollgruppen (je 6 Tiere) bestimmt wurde (600 Zellen pro Organ).

Bewertungskriterien

Eine Testsubstanz wird als positiv im Comet Assay bewertet, wenn der Mittelwert der TI dosisabhängig erhöht und die mittlere TI einer Dosisgruppe gegenüber der mitgeführten Kontrollgruppe um den Faktor 2 erhöht ist. Wird bei einzelnen Tieren eine leichte Erhöhung der TI beobachtet, welche über der mitgeführten Vehikelkontrollgruppe liegt, wird dies von Fall zu Fall bewertet. Eine statistische Auswertung wurde berücksichtigt, hierzu wurde der zweiseitige t-Test angewendet.

Viabilitätsbestimmung mittels Trypanblau-Assay

Bei Gentoxizitätsstudien ist es von großer Bedeutung die Qualität der Zellen nach Zellisolierung und die Zytotoxizität einer Substanz zu berücksichtigen. Daher wird die Viabilität der eingesetzten Zellen der Kontrollen und Behandlungsgruppen bestimmt. Die Zytotoxizität der zu untersuchenden Substanz könnte zum einen zu vermehrten *Hedgehogs* (nicht auswertbare Zellen), zum anderen zu weniger DNA-Migration im Comet Assay führen, da stark

3 Material und Methoden

geschädigte Zellen bei der Aufarbeitung und der Elektrophorese häufiger verloren gehen [Burlinson *et al.*, 2007]. Auch die Zellgewinnung aus den Organen kann die Viabilität der Zellen negativ beeinflussen. Mechanischer Stress und/oder Hypoxie bei der Aufarbeitung können zu DNA-Strangbrüchen in den Zellen führen. Daher sollten die Zellen eine Viabilität von mindestens 70% aufweisen.

Prinzip der Methode

Das Prinzip des Trypanblau-Assays beruht darauf, dass lebende Zellen eine intakte Zellmembran aufweisen, durch die der Farbstoff Trypanblau nicht in die Zelle gelangen kann, während er die Zellmembran toter Zellen durchdringt. Tote Zellen werden daher im Vergleich zu lebenden Zellen durch den Farbstoff dunkelblau gefärbt [Strober, 2001]. Die Zellzählung erfolgte innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe von Trypanblau zur Zellsuspension, da Trypanblau zytotoxisch wirkt [Jones & Senft, 1985].

Durchführung

Zur Bestimmung der Viabilität der Leber- und Lungenzellen wurden 10 µL der Zellsuspension zunächst mit 1000 µL bzw. 500 µL *Mincing*-Puffer verdünnt. 10 µL der jeweiligen Verdünnung wurden mit 10 µL einer Trypanblaulösung (0,4%ig in Reinstwasser, sterilfiltriert) vermischt und zum Zählen in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden lebendige und tote Zellen in allen 4 Großquadraten gezählt.

Auswertung

Der Prozentsatz der lebenden Zellen (die Viabilität) wird wie folgt berechnet:

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{Anzahl ungefärbter Zellen}}{\text{Anzahl ungefärbter Zellen} + \text{Anzahl gefärbter Zellen}} \cdot 100 \quad \text{Formel 1}$$

3.1.5 Oxidativer Stress

3.1.5.1 Nicht proteingebundene Sulfhydrylgruppen

Prinzip der Methode

Die Bestimmung der nicht proteingebundenen Sulfhydrylgruppen (NPSH) wurde nach dem Prinzip von Ellman [Ellman, 1958; Ellman, 1959] durchgeführt. Hierbei wird ausgenutzt, dass Thiolgruppen im alkalischen Milieu anionisch vorliegen. Damit sind sie in der Lage, die Disulfidbrücke des Substrats DTNB/Ellman's Reagenz zu spalten, sodass sich ein gemischtes Disulfid (TNB-SR) und das Chromophor TNB bilden (Abbildung 4), welches photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm detektiert werden kann [Sedlak & Lindsay, 1968].

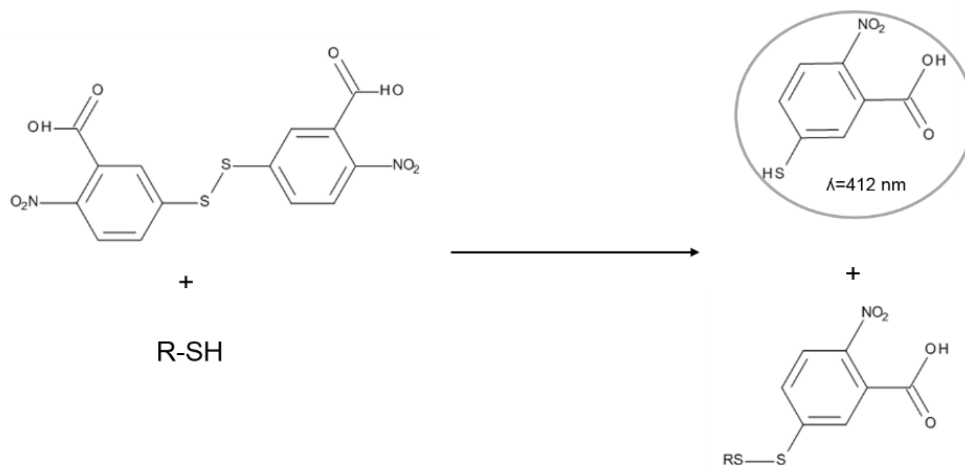


Abbildung 2: NPSH-Bestimmung -Reaktion zum Chromophor TNB

Tabelle 7: Lösungen NPSH-Bestimmung

Lösung	Herstellung
Ellman's-Reagenz [10 mM]	39,6 mg DTNB in 10 mL Methanol lösen, täglich frisch
GSH-Stammlösung [32 mM]	49,2 mg in 5 mL 5%iger 5-SSA lösen, Lagerung: -80°C
5-Sulfosalicylsäure (5-SSA) [5%, m/v]	14,56 g 5-SSA*2H ₂ O in 250 mL ddH ₂ O lösen, Lagerung: 6 Monate, 4°C
Tris/EDTA-Puffer [1 M/5 mM]	12,114 g Tris, 186,1 mg EDTA in etwa 90 mL ddH ₂ O lösen, pH=8,9 einstellen, auf 100 mL auffüllen, Lagerung: 6 Monate 4°C

Durchführung

Die Bestimmung der NPSH-Gruppen erfolgte in Leberhomogenat der mit NVP exponierten männlichen Wistar Ratten, sowie der Kontrollgruppe. Hierzu wurde 1 g Leber in 9 mL 5-Sulfosalicylsäure (5-SSA) mithilfe eines Potters unter Eiskühlung homogenisiert und anschließend die gefällten Proteine durch Zentrifugation (14000 g, 10 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Zur Quantifizierung der NPSH wurde eine GSH-Kalibrationsreihe im Konzentrationsbereich von 30 μM (10 μM im Well) bis 240 μM (80 μM im Well) in 5-SSA hergestellt. Zur Überprüfung

3 Material und Methoden

der Methode wurde eine Kontrolle (480 μM GSH) mitgeführt. Sowohl die Kontrolle (480 μM GSH) als auch die Leberproben wurden vor Einsatz im Assay in 5-SSA verdünnt (VF 5 bzw. VF 4). Zum Assay wurden 100 μL der verdünnten Probe, Standard, bzw. Kontrolle oder Blank (5-SSA, 5%) in Triplikaten vorgelegt und 200 μL Tris/EDTA-Puffer zugegeben. Zum Starten der Reaktion wurden 5 μL Ellman's Reagenz (DTNB) mithilfe des Injektorsystems des Photometers (Infinite 200, Tecan) zugegeben. Die Messung erfolgte 5 Minuten nach DTNB-Zugabe bei einer Wellenlänge von $\lambda=412$ nm in einer klaren 96-Well-Platte.

Berechnung des NPSH-Gehalts

Die Quantifizierung des NPSH-Gehalts erfolgte mittels der mitgeführten Kalibrationsreihe, wobei der Absorptionswert der Blankprobe von Proben- und Standardabsorptionswerten subtrahiert wurde (Formel 2). Der NPSH-Gehalt, berechnet als GSH, wurde dann auf das eingesetzte Lebergewicht bezogen (Formel 3).

$$c(\text{NPSH})[\mu\text{mol/L}] = \frac{(A(\text{Probe})-A(\text{Blank}))-a}{m} \cdot \text{VF}(\text{well}) \cdot \text{VF}(\text{Probe}) \quad \text{Formel 2}$$

$$\text{NPSH-Gehalt} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Leber}} \right] = c(\text{NPSH}) \cdot 0,009 \frac{\text{L}}{\text{g Leber}} \quad \text{Formel 3}$$

Die Nachweisgrenze (LOD) des Assays berechnet sich aus der dreimaligen Standardabweichung der Blankproben ($n=6-12$) (Formel 4), die Bestimmungsgrenze (LOQ) ist die zweimalige LOD.

$$\text{LOD} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right] = \frac{3 \cdot \text{SD}(\text{Blank})-a}{m} \quad \text{Formel 4}$$

A: Absorption a: y-Achsenabschnitt der Kalibriergerade; m: Steigung der Kalibriergeraden; SD: Standardabweichung

3.1.5.2 Glutathion-Recycling-Assay

Prinzip der Methode

Glutathion (GSH) oder γ -Glutamylcysteinylglycin ist ein Tripeptid welches aus Glutamin, Cystein und Glycin in zwei enzymkatalysierten Reaktionen von γ -Glutamyl-Cysteinsynthase und Glutathionsynthase gebildet wird. GSH kommt in allen Zellen des Körpers vor und wird vor allem in der Leber gebildet. GSH, die Hauptthiolkomponente in Tier- und Pflanzenzellen [Pastore *et al.*, 2003; Sies, 1999], spielt eine zentrale Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress, sowie im Fremdstoffmetabolismus bei der Entgiftung von Elektrophilen. Des Weiteren ist GSH im Signalweg der Apoptose involviert und dient als Speicher von Cystein [Franco & Cidlowski, 2009; Pastore *et al.*, 2003].

In biologischen Proben ist Glutathion in reduzierter (GSH) und oxidiertes (GSSG) Form enthalten. Diese beiden Parameter lassen sich photometrisch nicht innerhalb einer Probenmessung analysieren, weshalb zur Analyse beider Komponenten zwei separate Bestimmungen durchgeführt wurden. Beide Bestimmungen erfolgten nach dem von Gallagher beschriebenen *Glutathion-Recycling-Assay* [Gallagher *et al.*, 1994], dessen Prinzip auf die Arbeit von Tietze zurückgeht [Tietze, 1969]. Zunächst wird hierbei das Gesamt-GSH (tGSH) bestimmt, welches GSH und GSSG beinhaltet. In einer zweiten Analyse wird GSH durch 2-Vinylpyridin (2-VP) maskiert (Abbildung 5) und GSSG bestimmt.

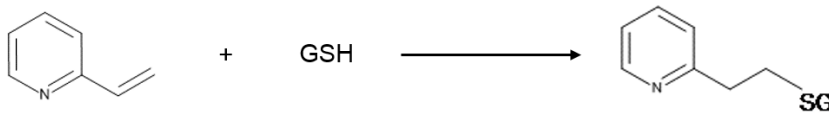


Abbildung 3: GSH-Derivatisierung mittels 2-Vinylpyridin (2-VP)

Bei der tGSH-Bestimmung werden GSH und GSSG als Summenparameter in Form von GSH bestimmt. Dies erfolgt durch Reduktion mithilfe zugesetzter Glutathion-Reduktase (GR) und zugehörigem Kofaktor NADPH. GSH reagiert mit Ellman's Reagenz (DTNB) zu einem GSH-Konjugat (GSTNB) und dem gelben TNB. Das entstandene GSTNB wird entweder abiotisch durch GSH oder mittels GR und NADPH zu GSH und TNB umgewandelt (Abbildung 6). Über die Reaktionszeit stellt sich somit eine konstante TNB-Bildungsrate abhängig von der tGSH-Konzentration der Probe ein.

Dies ist möglich, da die anderen Reaktionspartner (NADPH, DTNB, GR) im Überschuss vorliegen. Quantifiziert wird der tGSH-Gehalt anhand der Absorption des entstehenden TNB ($\lambda=412$ nm) innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls durch mitgeführte GSH-Standards. Die GSSG-Bestimmung erfolgt nach Derivatisierung des GSH analog der des tGSH. Das Prinzip der Methode, die TNB-Absorptionsmessung, ist demnach ähnlich der NPSH-Bestimmung, allerdings wird beim GSH-Recycling-Assay durch die GR spezifisch GSH analysiert.

3 Material und Methoden

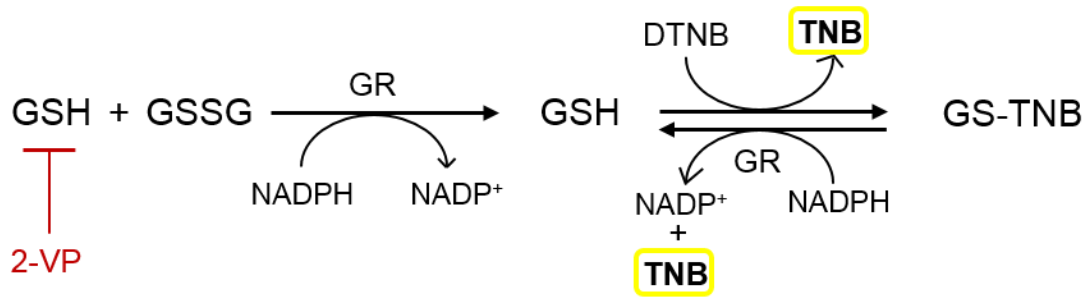


Abbildung 4: Prinzip des GSH-Recycling-Assays

Tabelle 8: Lösungen GSH-Recycling-Assay

Lösung	Herstellung
Ellman's-Reagenz [24 mM]	95,1 mg DTNB in 10 mL Methanol lösen, täglich frisch
Glutathion-Reduktase (GSR) [50 U/mL]	36,8 µL Glutathion-Reduktase zu 463 µL Phosphat-Puffer geben, frische Herstellung
GSH-Stammlösung [32 mM]	49,2 mg GSH in 5 mL 5%iger 5-SSA lösen, Lagerung: -80°C
GSSG-Stammlösung [16 mM]	98,0 mg GSSG in 10 mL 5%iger 5-SSA lösen, Lagerung: -80°C
NADPH-Lösung [20 mM]	16,7 mg NADPH in NaHCO ₃ -Lösung lösen, frische Herstellung
NaHCO ₃	0,125 g NaHCO ₃ in 25 mL ddH ₂ O lösen Lagerung: 6 Monate, 4°C
Phosphat/EDTA-Lösung A [125 mM/ 7 mM]	3,40 g KH ₂ PO ₄ , 0,5174 g EDTA in 200 mL ddH ₂ O lösen, Lagerung: 6 Monate, 4°C
Phosphat/EDTA-Lösung B [125 mM/ 7 mM]	10,88 g K ₂ HPO ₄ , 1,2935 g EDTA in 500 mL ddH ₂ O lösen, Lagerung: 6 Monate, 4°C
Phosphat-Puffer	Phosphat/EDTA-Lösung B vorlegen und mit Phosphat/EDTA-Lösung A auf pH 7,5 einstellen, Lagerung: 6 Wochen, 4°C
5-Sulfosalicylsäure (5-SSA)	14,56 g 5-SSA*2H ₂ O in 250 mL ddH ₂ O lösen, Lagerung: 6 Monate, 4°C
Triethylamin (TEA)	0,75 g TEA einwiegen, 750 µL ddH ₂ O zugeben, frische Herstellung

Tabelle 9: Mastermixzusammensetzung GSH-Recycling-Assay

Lösung	c(Lösung)	tGSH V(Well) [µL]	GSSG V(Well) [µL]	c(Well)
Phosphat/EDTA-Puffer	125/7 mM	184	179	125/7 mM
NADPH	20 mM	4	4	0,4 mM
GR	50 U/mL	2	2	0,5 U/L

Durchführung

Der GSH-Recycling-Assay wurde mit dem Überstand aus in 5-SSA homogenisierter Leber (Herstellung siehe Kap. 3.1.5.1) der männlichen Ratten der NVP-Inhalationsstudie, adaptiert nach der von Gallagher beschriebenen Methode, durchgeführt [Gallagher *et al.*, 1994].

Zur tGSH-Messung wurden GSH-Standardlösungen von 10 µM (0,25 µM im Well) bis 320 µM (8 µM im Well) in 5-SSA hergestellt. Die Proben, eine GSH-Kontrolllösung (640 µM GSH), sowie eine Kontrolllösung mit einer tGSH-Konzentration von 200 µM (10% GSSG) wurden gegebenenfalls in 5-SSA verdünnt (Verdünnungsfaktoren: 4 für GSH-Kontrolle, 5 für Leberproben). 5 µL Probe, Standard bzw. Kontrolle wurden in Triplikaten pro Well vorgelegt und 190 µL tGSH-Mastermix zugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 µL DTNB-Lösung mittels Injektor des Photometers bei Raumtemperatur gestartet. Die Absorption wurde für 5 Minuten alle 60 Sekunden bei einer Wellenlänge von $\lambda=412$ nm gemessen.

Zur Bestimmung des GSSG-Gehalts wurde eine GSSG-Kalibrationsreihe im Konzentrationsbereich von 2,5 µM bis 80 µM (0,125 µM bis 4 µM im Well) aus der GSSG-Stammlösung in 5-SSA hergestellt. Bei der GSSG-Bestimmung wurde eine Kontrolle mitgeführt (20 µM GSSG, 160 µM GSH), welche analog zu den Proben behandelt wurde.

125 µL Probe, Standard, Kontrolle, bzw. Blank wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und 5 µL 2-Vinylpyridin zur Derivatisierung zugegeben. Anschließend wurden 20 µL TEA-Lösung an den Rand des Reaktionsgefäßes pipettiert, sodass nach Durchmischen ein pH-Wert von 7-7,5 vorlag. Die Derivatisierung des in der Probe enthaltenen GSH erfolgte über 1 Stunde im Thermomixer (26°C, 600 rpm).

Die Messung des GSSG im Photometer erfolgte analog zur Bestimmung des tGSH in einer klaren 96-Well-Platte. Dabei wurde der Mastermix zur GSSG-Bestimmung (Tabelle 9) eingesetzt und die Absorptionsmessung fand für 10 Minuten statt.

Berechnungen zum GSH-Recycling-Assay

$$c(\text{tGSH bzw. GSSG})[\mu\text{mol/L}] = \frac{[\Delta A(\text{Probe}) - \Delta A(\text{Blank})] - a}{m} \cdot VF(\text{well}) \cdot VF(\text{Probe}) \quad \text{Formel 5}$$

$$c(\text{GSH}) \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right] = c(\text{tGSH}) - 2 \cdot c(\text{GSSG}) \quad \text{Formel 6}$$

$$\text{tGSH/GSH/GSSG -Gehalt} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Leber}} \right] = c(\text{tGSH/GSH/GSSG}) \cdot 0,009 \frac{\text{L}}{\text{g Leber}} \quad \text{Formel 7}$$

A: Absorption a: y-Achsenabschnitt der Kalibriergerade; m: Steigung der Kalibriergeraden

Die Nachweisgrenze (LOD) des Assays berechnet sich, analog zum NPSH-Assay, aus der dreimaligen Standardabweichung der Blankproben (n=6) (Formel 4). Die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde als zweimalige LOD festgelegt.

3.1.6 Rezeptorvermittelte Mechanismen

3.1.6.1 AhR, CAR und PXR (AROD-Assay)

Prinzip der Methode

Die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP) sind als membranständige Enzyme am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und dort mit der Cytochrom-P450-Reduktase zu einem Komplex assoziiert. Hauptaufgabe der CYP-Isoenzyme ist die Übertragung von einem Sauerstoffatom auf lipophile Substanzen um ihre Hydrophilie durch Funktionalisierung zu steigern. Demnach spielt diese Enzymklasse eine tragende Rolle im Fremdstoffmetabolismus der Phase I [Marquardt & Schäfer, 2004]. Verschiedene Isoenzyme sind über die Aktivierung definierter Rezeptoren induzierbar. Die bestimmten Aktivitäten der Enzymgruppen CYP1A, 2B und 3A werden durch die Aktivierung der Rezeptoren AhR, CAR und PXR induziert [Tompkins & Wallace, 2007]. Der die Enzymaktivitäten erfassende Alkoxy-Resorufin-Dealkylase-Assay (AROD-Assay) kann daher als indirekter Nachweis einer testsubstanzvermittelten Rezeptoraktivierung eingesetzt werden.

Das Prinzip des AROD-Assays beruht auf der Oxidation verschiedener definierter Alkoxyresorufinether durch Cytochrom-P450-Isoenzyme [Burke *et al.*, 1994]. Bei der Reaktion entstehen der entsprechende Aldehyd und Resorufin, dessen Fluoreszenzintensität zur Quantifizierung der Enzymaktivität gemessen wird (Abbildung 7). Um die Messung auf die oxidative Desalkylierung zu fokussieren, wird dem Reaktionsgemisch Dicumarol zugesetzt, welches die weitere Metabolisierung von Resorufin durch Hemmung der DT-Diaphorase verhindert.

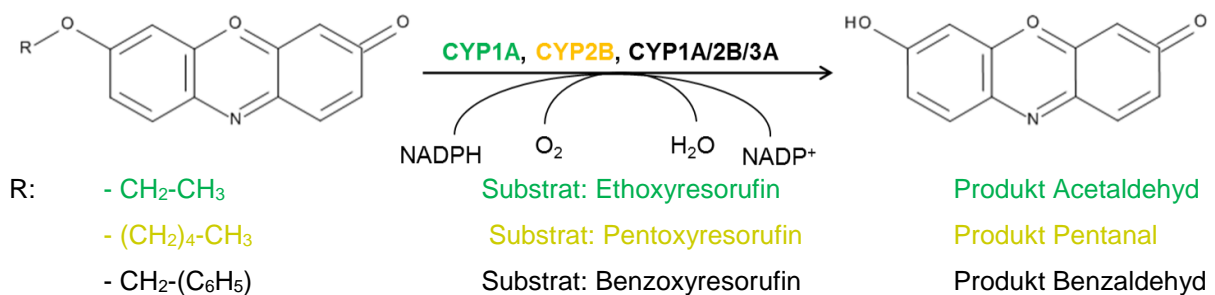


Abbildung 7: Prinzip des AROD-Assays

Zur Bestimmung von CYP-Aktivitäten im AROD-Assay wird das Gewebe homogenisiert, durch Zentrifugation die subzellulären Fraktionen getrennt und der Proteingehalt der zum Assay eingesetzten Mikrosomenfraktion bestimmt. Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt. Diese ist eine Methode zur quantitativen Proteinbestimmung, welche auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums (von 465 nach 595 nm) des Triarylfarbstoffs *Coomassie Brilliant Blue-G250* in saurer Lösung beruht. Diese Absorptionsverschiebung kommt durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein zustande, wobei der Farbstoff von seinem kationischen Zustand in die anionische Sulfonatform überführt wird.

3 Material und Methoden

Coomassie Brilliant Blue-G250 reagiert hauptsächlich mit basischen und aromatischen Aminosäuren. Aus diesem Grund muss der mit der Bradford Methode ermittelte Proteingehalt immer auf ein definiertes Protein bezogen werden; hierzu wurde BSA (bovines Serum Albumin) als Standard verwendet [Bradford, 1976].

In der vorliegenden Arbeit wurden Lungen- und Lebermikrosomen der männlichen Kontrolltiere, sowie der NVP-exponierten männlichen Tiere hergestellt, auf ihren Proteingehalt untersucht und Enzymaktivitäten (CYP) ermittelt.

Tabelle 10: Lösungen AROD-Assay

Lösung	Herstellung
5'-AMP-Na ₂ *6H ₂ O [200 mM]	170,9 mg in 2 mL TrisHCl lösen Lagerung: 6 Wochen, 4°C
Benzoxoresorufin (BROD) [500 µM]	1,5 mg in 5 mL DMSO lösen Lagerung: 1 Woche, -20°C
Bradford Reagenz	gebrauchsfertig (Sigma)
BSA [2 mg/mL]	10,0 mg bovines Serumalbumin (Roche) in 5 mL Resuspensionspuffer lösen
Dicumarol [1 mM]	3,4 mg in 2 mL 0,1 M NaOH lösen und mit TrisHCl [100 mM], pH 7,5 auf 10 mL auffüllen
Ethoxyresorufin (EROD) [200 µM]	1,2 mg in 25 mL DMSO lösen, Lagerung: 1 Woche, -20°C
Glucose-6-phosphat (G-6-P) [500 mM]	282,1 mg G-6-P in 2 mL TrisHCl lösen Lagerung: 1 Woche, -20°C
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) [0,7 U/µL]	Herstellung durch geeignetes Lösen der gelieferten G-6-P-DH (Sigma) mit ddH ₂ O Lagerung: 3 Monate, -20°C
Glycerin [20%ig]	11,5 mL 87%iges Glycerin zu 38,5 mL ddH ₂ O geben und mischen
Homogenisationsmedium	372,0 mg EDTA-Na ₂ *2H ₂ O und 85,58 g Saccharose in ca. 900 mL ddH ₂ O lösen auf pH 7,5 einstellen und mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen
MgCl ₂ *6H ₂ O [200 mM]	813,2 mg MgCl ₂ *6H ₂ O in 20 mL TrisHCl lösen Lagerung: 6 Wochen, 4°C
NADPH [2 mM] (täglich frisch)	1,67 mg/mL in TrisHCl lösen
Pentoxoresorufin (PROD) [1 mM]	1,7 mg in 6 mL DMSO lösen Lagerung: 1 Woche, -20°C
Resorufin-Stammlösung [1 mM]	4,7 mg in 20 mL DMSO lösen Lagerung: 1 Woche, -20°C
Resorufin-Lösung [10 µM]	10 µL Resorufin-Stammlösung [1mM] in 990 µL TrisHCl

3 Material und Methoden

Lösung	Herstellung
Resuspensionspuffer	77,0 mg Glutathion, 93,0 mg EDTA, 204,0 mg MgCl [*] 6 H ₂ O, 3,40 g KH ₂ PO ₄ , 50 mL 20 %iges Glycerin in 200 mL ddH ₂ O lösen, auf pH 7,5 einstellen und auf 250 mL auffüllen
TrisHCl [100 mM] pH 7,5	12,11 g Tris in ca. 900 mL ddH ₂ O lösen, mit HCl auf pH 7,5 einstellen und auf 1000 mL auffüllen Lagerung: 6 Monate, 4°C
Waschlösung	11,19 g KCl [150 mM] in 1 L ddH ₂ O lösen

Tabelle 11: Mastermix AROD-Assay

V [μL]	Lösung	c (Lösung) [mM]	c (Well) [μM]
75,5	TrisHCl	100	100
1	5'AMP	200	2000
1	G-6-P	500	5000
1,5	G-6-P-DH	0,7 U/μL	10 U
1	Dicumarol	1	100
1	EROD/ PROD /BROD	0,2/ 1/ 0,5	2/ 10/ 5
5	MgCl ₂	200	10000

Durchführung

Zur Herstellung der subzellulären Fraktionen wurden die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen und bei -80°C gelagerten Lebern und Lungen der männlichen Ratten der in dieser Arbeit beschriebenen NVP-Studie eingesetzt. Diese wurden nach dem Auftauen mit isotonomischer NaCl-Lösung (0,9%) gewaschen. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter Eiskühlung. Zur Herstellung der S9-Fraktion wurden die Lebern und die Lungen in Homogenisationsmedium (Gewebe: 1 g; Homogenisationsmedium: 3 mL) gepottert. Anschließend wurde das Homogenat zur Abtrennung von Zellmembranfragmenten, Zellkernen und Mitochondrien zentrifugiert (9000 g, 15 min, 4°C). Die Herstellung der Mikrosomen erfolgte durch Ultrazentrifugation der S9-Fraktion (100000 g, 60 min, 4°C). Nach dieser ersten Zentrifugation wurde der Überstand (das Zytosol) abgenommen, das Pellet in Waschlösung aufgenommen, resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das erneut entstandene Pellet wurde in Resuspensionspuffer (1mL/g Leber; 0,5 mL/g Lunge) aufgenommen und Aliquots im Biofreezer (-80°C) bis zur Verwendung gelagert. Zur Proteinbestimmung wurden zunächst BSA-Standards im Konzentrationsbereich von 10 – 2000 μg/mL in Resuspensionspuffer durch geeignete Verdünnungsschritte aus der BSA-Stammlösung hergestellt. Anschließend wurden 5 μL der eventuell verdünnten Probe bzw. Standardlösung in ein Well vorgelegt und 250 μL Bradford Reagenz zugegeben. Nach zehnmütiger Inkubation (Schütteln im Dunkeln) erfolgte die photometrische Vermessung bei 595 nm. Die Bestimmung des Proteingehaltes der Mikrosomen erfolgte in Triplikaten, wobei der Proteingehalt mittels Kalibriergeraden der BSA-Standards [10 μg/mL – 2000 μg/mL]

3 Material und Methoden

berechnet wurde. Als Blindwert wurde die Absorption des entsprechenden Puffers der subzellulären Fraktion von den Absorptionswerten der Proben subtrahiert.

Die Resorufinstandardreihe wurde in zehnfacher Konzentration in DMSO angesetzt, mit Tris-Puffer verdünnt, sodass jeder Standard die gleiche Menge (10%) DMSO enthielt. Die Standards (1 nM – 1000 nM) wurden in Triplikaten zu je 100 µL pro Well eingesetzt. Zur Aktivitätsbestimmung wurden je 10 µL Mikrosomen (1 mg/mL) in Triplikaten bzw. Puffer vorgelegt und 85 µL Mastermix zugegeben. Die Zugabe von 5 µL NADPH zu Proben und Puffer erfolgte durch den Injektor des Photometers worin 16 min bei 37°C inkubiert wurde. Gemessen wurde die Fluoreszenzsteigerung der Proben durch Resorufinbildung als Funktion der Zeit. Die Fluoreszenz der Standardreihe wurde zu Beginn der Messung einmalig vermessen (Excitationswellenlänge: 550 nm, Emissionswellenlänge: 585 nm, Verstärkung (gerätespezifisch): 90, Messintervall (für Proben): 60 s).

Zusätzlich zur Untersuchung der Leber- und Lungenmikrosomen der NVP-Inhalationsstudie wurde der AROD-Assay analog mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (Wistar Ratte, männlich, 500 mg/kg bw, *i.p.*, 5 Tage) durchgeführt. Hierbei wurde zusätzlich NVP in der Konzentration 1 µM, 10 µM und 100 µM zum Assay eingesetzt, um eine direkte Interaktion von NVP und dem Substratumsatz der Enzyme CYP1A, CYP2B und CYP3A zu untersuchen.

Berechnung der CYP-Aktivität

Die gemessenen Fluoreszenzeinheiten (FU) wurden für jede Probe gegen die Reaktionszeit aufgetragen und die Zeitpunkte t_0 (Beginn des linearen Anstiegs) und t_{linear} (Ende des linearen Anstiegs) graphisch bestimmt. Die zugehörigen FU-Werte wurden zur Berechnung der Stoffmenge des gebildeten Resorufins anhand der Kalibrationsreihe eingesetzt, welche zur Aktivitätsberechnung benötigt wird.

$$n(\text{Resorufin})[\text{pmol}] = \frac{\text{FU}_{t(\text{linear})} - a}{m} - \frac{\text{FU}_{t_0 - a}}{m} \quad \text{Formel 8}$$

$$\text{CYP-Aktivität} \left[\frac{\text{pmol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right] = \frac{n_{\text{Resorufin}} [\text{pmol}]}{t[\text{min}] \cdot \text{Protein}[\text{mg}]} \quad \text{Formel 9}$$

a: y-Achsenabschnitt der Kalibriergerade; m: Steigung der Kalibriergeraden

Die mitgeführten Pufferkontrollen (PK) dienen der Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ). Die LOD wurde aus der Summe des Mittelwerts der Aktivitäten der Pufferkontrollen und ihrer dreifachen Standardabweichung (SD) berechnet. Die LOQ wurde als zweifache LOD definiert

$$\text{LOD} = \text{Mittelwert}(\text{CYP-Aktivität}[\text{PK}]) + 3 \cdot \text{SD} \quad \text{Formel 10}$$

3 Material und Methoden

3.1.6.2 PPAR α : Laurinsäure Assay

Prinzip der Methode

Die Bestimmung der CYP4A-Aktivität adressiert die Fragestellung nach einer peroxisomenproliferierenden Substanzwirkung, da die CYP4A-Aktivität durch PPAR α -Bindung induziert wird [Hedli *et al.*, 1998; Tompkins & Wallace, 2007]. Prinzip hierbei ist, dass in Lebermikrosomen das ¹⁴C-markierte Substrat Laurinsäure, eine kurzkettige Fettsäure, zu 12-OH-Laurinsäure hydroxyliert wird. Diese Reaktion wird durch das Enzym CYP4A1 katalysiert. Eine weitere katalysierte Reaktion ist die Hydroxylierung der Laurinsäure an Position 11 durch CYP2E1 (Abbildung 8). Die Metaboliten wurden chromatographisch getrennt und die Aktivitäten von CYP4A1 und CYP2E1 in Peakfläche pro Minute und Milligramm Protein angegeben.

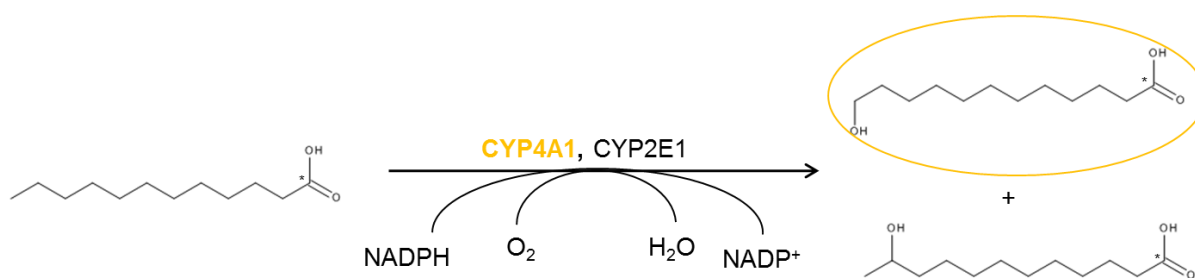


Abbildung 5: Metabolismus der Laurinsäure, umkreist: CYP4A-Metabolit

Tabelle 12: Lösungen Laurinsäure Assay

Lösung	Herstellung
5'-AMP-Na ₂ [200 mM]	156,5 mg in 2 mL TrisHCl lösen, Lagerung: 6 Wochen, 4°C
Glucose-6-phosphatmononatriumsalz (G-6-P) [500 mM]	282,1 mg G-6-P in 2 mL TrisHCl lösen Lagerung: 1 Woche, -20°C
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) [0,7 U/μL]	Herstellung durch Lösen der gelieferten G-6-P-DH (Sigma) mit ddH ₂ O Lagerung: -20°C
MgCl ₂ *6H ₂ O [200 mM]	203,3 mg MgCl ₂ *6H ₂ O in 5 mL TrisHCl lösen Lagerung: 6 Wochen, 4°C
NADPH-Na ₄ -Salz [2 mM]	1,67 mg/mL in TrisHCl lösen, täglich frisch
TrisHCl [100 mM] pH 7,5	12,11 g Tris in ca. 900 mL ddH ₂ O lösen, mit HCl auf pH 7,5 einstellen und auf 1000 mL auffüllen Lagerung: 6 Monate, 4°C

Tabelle 13: Mastermix Laurinsäure Assay

V [μL]	Lösung	c (Lösung)	c (Ansatz)
138	TrisHCl	100 mM	100 mM
10	MgCl ₂ *6H ₂ O	200 mM	10 mM
2	5'-AMP-Na ₂	200mM	2 mM
2	G-6-P	500 mM	5 mM
3	G-6-P-DH	0,7 U/μL	10 U/mL

3 Material und Methoden

Tabelle 14: HPLC-Parameter zur (Hydroxy-)Laurinsäure-Bestimmung mittels Radiodetektion

System	Agilent 1260 infinity		
Eluent A	Methanol/Essigsäure/HPLC-Wasser (600/5/400 mL)		
Eluent B	Methanol		
Injektionsvolumen	50 µL		
Detektor	Radiodetektor Berthold, FlowStar LB 513		
Gradient	Testmethode	finale Methode	
	0-15 min 100% Eluent A	0-10 min 100% Eluent A	
	15,1 – 25 min 100% Eluent B	10,1-20 min 0-100% Eluent B	
	25,1 – 35 min 100% Eluent A	20,1-30 min 100% Eluent B	
		30,1-40 min 100% EluentA	
Säule	EC250/4 Nucleosil, 120-5 C18		
Fluss	0,8 mL/min		
R _t [min]	Substanz	Testmethode	finale Methode
	Laurinsäure	20,5	22,6
	12-OH-Laurinsäure	19,1	17,4
	11-OH-Laurinsäure	17,8	16,6

¹⁴C-markierten Laurinsäure: Stammlösung

Die ¹⁴C-markierte Laurinsäure wurde von *American Radiolabeled Chemicals* in Ethanol bezogen. Die spezifische Aktivität betrug 55 mCi/mmol (10 MBq/mg) bei einer Konzentration von 0,1 mCi/mL (37 MBq/mL) und 2,5 mL Gesamtvolumen. Diese Laurinsäurelösung wurde verdünnt (10 µL ethanolische Laurinsäurelösung auf 2 mL Methanol) und mittels Radio-HPLC auf ihre Reinheit überprüft (Injektionsvolumen 40 µL entspricht ca. 44.400 dpm).

Für die Inkubationen zur Enzymaktivitätsbestimmung wurden 1,21 mL (1,007 g) ethanolische Laurinsäurelösung entnommen und bei 40°C (300 rpm) im Thermomixer belassen, bis das Ethanol vollständig abgedampft war. Der Rückstand wurde in 550 µL DMSO aufgenommen und sowohl per HPLC-Radiodetektion, als auch per LSC an den Inkubationstagen überprüft. Hierzu wurde die DMSO-Stammlösung um den Faktor 100 mit Methanol verdünnt, 50 µL zur HPLC- und 100 µL zur LSC-Analyse eingesetzt. Die nominale Aktivität der DMSO-Stammlösung betrug 8,14 MBq/mL (488.400 dpm in 100 µL der methanolischen Lösung).

Durchführung

Vorversuch

Zur Bestimmung der CYP4A-Aktivität wurde zunächst ein Vorversuch mit Lebermikrosomensuspension einer männlichen Wistar Ratte durchgeführt (Proteingehalt: 16,5 mg/mL). Hierzu wurden 4 aktive Inkubate und 6 Negativkontrollen eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten 2 Inkubate mit hitzedenaturiertem Protein (HDK), 2 Proben, deren Protein sofort nach Substratzusatz gefällt wurde (t₀), sowie 2 Pufferkontrollen (PK), deren Leberhomogenatanteil durch Puffer ersetzt wurde. Ein Replikat der Pufferkontrollen wurde

3 Material und Methoden

parallel zur aktiven Inkubation inkubiert, ein weiteres wurde sofort mit eiskaltem Aceton versetzt. Der Vorversuch diente der Optimierung der HPLC-Methode zur Bestimmung der CYP4A-Aktivität.

Hauptversuch

Die Bestimmung der CYP4A-Aktivität erfolgte mit den Lebermikrosomen der mit NVP exponierten männlichen Wistar Ratten und Kontrolltieren, welche zuvor mit TrisHCl auf einen Proteingehalt von 20 mg/mL eingestellt wurden.

Eingesetzte Proben und zugehörige Kontrollen: Von jedem Tier wurden mindestens 2 aktive Inkubate, sowie eine hitzedenaturierte Kontrolle (HDK) und eine sofort nach Substratzugabe gestoppte Kontrolle (t_0) angefertigt. Es wurden somit 4 Proben pro Tier inkubiert. Zusätzlich wurden pro Inkubationsexperiment 2 Pufferkontrollen (PK) mitgeführt, welche an Stelle der proteinhaltigen Probe TrisHCl enthielten.

Nach Herstellung der HDK durch Erhitzen der Mikrosomenproben im Thermomixer (15 min, 99°C, 450 rpm) wurde der Mastermix nach Tabelle 13 hergestellt. Zur Inkubation wurden 155 µL Mastermix in eisgekühlten Reaktionsgefäßen (2 mL) vorgelegt, 30 µL Probe (20 mg/mL) oder TrisHCl zugegeben und 3 Minuten bei 37°C zur Temperierung vorinkubiert. Anschließend wurden 10 µL NADPH-Lösung und 5 µL ^{14}C -Laurinsäure (8,14 MBq/mL) zugegeben, was einer Aktivität von ca. 203,5 kBq/mL und einer Konzentration von 100 µM im Inkubat entspricht. Die Reaktion fand über 20 Minuten bei 37°C im Thermomixer (450 rpm) statt und wurde durch Zugabe eines Volumens (200 µL) eiskalten Acetons gestoppt. Zur Abtrennung der Proteine wurden die Proben einer zehnmütigen Zentrifugation unterzogen (6000 g, 4°C) und der Überstand zur HPLC eingesetzt (Bedingungen Tabelle 14).

Berechnung der CYP-Aktivität

Die Berechnung der CYP4A1-Aktivität erfolgte aus der Peakfläche der 12-OH-Laurinsäure pro Zeitintervall und mg Protein. Hierzu wurde die Peakfläche durch den Proteingehalt des Injektionsvolumens (0,075 mg) und die Inkubationszeit von 20 Minuten dividiert:

$$\text{Laurinsäure-Hydroxylierungsaktivität} \left[\frac{\text{Peakfläche}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right] = \frac{\text{Peakfläche}}{t[\text{min}] \cdot \text{Protein im Injektionsvolumen} [\text{mg}]} \quad \text{Formel 11}$$

Zuordnung des 12-OH-Laurinsäurepeaks

Da die Peaks der beiden Hydroxysäuren mittels Radio- und UV-Detektion nicht zweifelsfrei der 11- und 12-OH-Laurinsäure zugeordnet werden konnten, wurden exemplarische Inkubate der Laurinsäureinkubation und eine Lösung des 12-OH-1- ^{12}C -Laurinsäurestandards per HPLC-QTOF/MS analysiert (Tabelle 15). Die Zuordnung des 12-OH-Laurinsäuremetaboliten erfolgte anhand des Vergleichs der Retentionszeiten und der Massenspektren.

3 Material und Methoden

Tabelle 15:HPLC-Parameter zur (Hydroxy-) Laurinsäure-Bestimmung via QTOF-MS

System	(U)HPLC: Agilent 1200 und 1290 MS Instrument: MS324 / Agilent / S/N US10318001 Radiodetektor: Raytest / Mirastar (Range: 100 CPS = 1V) Mass Hunter Data Acquisition B.06.01	
Ionisationsmodus	ESI, Negativmodus	
Eluent A	Methanol/Essigsäure/HPLC-Wasser (600/5/400 mL)	
Eluent B	Methanol	
Injektionsvolumen	20 µL	
Gradient	0-10 min 100% Eluent A 10,1-20 min 0-100% Eluent B 20,1-30 min 100% Eluent B 30,1-40 min 100% Eluent A	
Säule	EC250/4 Nucleosil, 120-5 C18	
Fluss	0,8 mL/min	
R _t [min]	Laurinsäure	21,6
	12-OH-Laurinsäure	16,1
	11-OH-Laurinsäure	15,3

3.1.6.3 PPAR α : Palmitoyl-CoA-Oxidase Assay*Prinzip der Methode*

Wesentliche Reaktionen des Fettsäuremetabolismus finden in den Mitochondrien statt, aber auch in Peroxisomen können langkettige, gesättigte Fettsäuren mittels β -Oxidation abgebaut werden. Der Palmitoyl-CoA-Oxidase Assay macht sich das von Lazarow beschriebene Prinzip zunutze: Hierbei wird das Koenzym-A(CoA)-Derivat der Fettsäure, in diesem Fall Palmitoyl-CoA, um zwei Kohlenstoffatome verkürzt, welche als Acetyl-CoA abgespalten werden. Diese Reaktion wiederholt sich, bis der Fettsäurerest weniger als acht Kohlenstoffatome aufweist. Bei dieser Fettsäureoxidation wird NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert (Abbildung 9), was photometrisch durch eine Zunahme der Extinktion bei $\lambda=334$ nm beobachtet werden kann. Die Re-Oxidation des NADH zu NAD^+ wird durch Zugabe von Cyanid verhindert. Des Weiteren hemmt das zugesetzte Cyanid zusammen mit Triton X die mitochondriale β -Oxidation [Lazarow, 1981].

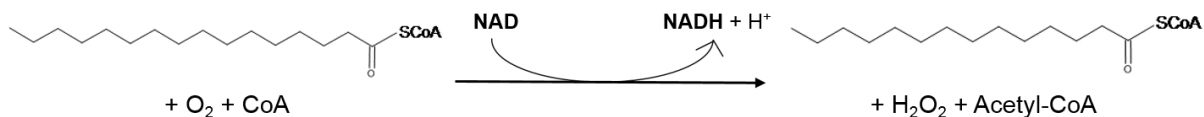


Abbildung 9: Fettsäureoxidation in den Peroxisomen

Um die ermittelte Enzymaktivität der Palmitoyl-CoA-Oxidase/Acyl-CoA-Oxidase auf den Proteingehalt zu normieren, wurde die Proteinbestimmung nach Biuret durchgeführt. Hierbei bilden zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) in alkalischem Milieu mit Peptidbindungen der in einer Probe enthaltenen Proteine den sogenannten Biuret-Komplex purpurner Farbe.

Die Farbintensität ist hierbei proportional zur Proteinkonzentration und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=546$ nm vermessen werden. Zugabe von Kalium-Natrium-Tartrat zum Reaktionsgemisch verhindert die Ausfällung des Kupferhydroxids, Kaliumiodid die Autoxidation des Kupfers [Gornall *et al.*, 1949].

Tabelle 16: Lösungen zu Bestimmung der Cyanid-insensitiven Palmitoyl-CoA-Oxidase

Lösung	Zusammensetzung
Tris-Puffer [50 mM]	1,54 g Tris-HCl und 1,85 g Tris-Base in ca. 450 mL ddH ₂ O lösen, auf pH 8,01 einstellen, mit ddH ₂ O auf 0,5 L auffüllen
NAD [20 mM]	379 mg NAD in 25 mL ddH ₂ O lösen
FAD [1 mM]	8,75 mg in 10 mL ddH ₂ O lösen
CoA [10 mM]	87,25 mg in 10 mL ddH ₂ O lösen
Dithiothreitol [0,33 mM]	1,27 g in 25 mL ddH ₂ O lösen
BSA	0,75 g BSA in 50 mL ddH ₂ O lösen
Triton-X-100	2 g Triton-X-100 in 100 mL ddH ₂ O lösen
Palmitoyl-CoA [5,03 mM]	5 mg Palmitoyl-CoA in 1,5 mL ddH ₂ O lösen
KCN [100 mM]	65,1 mg KCN in 10 mL ddH ₂ O lösen
Reagenz 1	NaOH: 400 mmol/L; K-Na-Tartrat: 89 mmol/L
Reagenz 2	NaOH (400 mM); K-Na-Tartrat (89 mM); KI (61 mM); CuSO ₄ (24,3 mM)

3 Material und Methoden

Lösung	Zusammensetzung
Reaktionslösung	28,2 mL Tris Puffer 150 µL Triton-X-100 300 µL FAD 300 µL CoA 150 µL BSA 90 µL Dithiothreitol 300 µL NAD nach Homogenisierung: 300 µL KCN

Durchführung

Die Bestimmung der Cyanid-insensitiven Palmitoyl-CoA-Oxidase erfolgte am Zentrifugalanalysator Cobas Fara II (Hoffmann La Roche GmbH). Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden 200 µL des Zytosols der Lebern der NVP-exponierten männlichen Ratten und Kontrolltieren (Herstellung Kapitel 3.1.6.1) in ein Probengefäß pipettiert und in das Analysegerät gestellt. 5 µL Zytosol und 250 µL Reaktionsgemisch wurden vom Cobas Fara II mit der Reaktionslösung vermischt und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 5 µL Palmitoyl-CoA-Lösung (Tabelle 16) gestartet. Gemessen wurde die Zunahme der Absorption bei $\lambda=334$ nm womit die Aktivität des Enzyms in U/L über die Software des Cobas Fara II berechnet und ausgegeben wurde.

Die Bestimmung des Gesamtproteins nach Biuret wurde in einem Cobas c501-Analysensystem (Firma Roche) durchgeführt, wozu 200 µL Probe (Einzelwertbestimmung) in Proben-Gefäße pipettiert wurden. Mithilfe des gebrauchsfertigen Kits zur Bestimmung des Gesamtproteins (Roche) wurde der Proteingehalt in g/L photometrisch bestimmt. Hierzu wurde im Cobas c501-Analysensystem 2 µL Probenlösung mit 90 µL Reagenz 1 und 32 µL Reagenz 2 vermischt (Tabelle 16) und bei einer Wellenlänge von $\lambda=546$ nm (Nebenwellenlänge $\lambda=700$ nm) analysiert.

3.1.7 Histologische Untersuchungen der Leber

3.1.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Prinzip

Um mögliche Effekte einer Substanz auf histologischer Ebene sichtbar zu machen, stehen verschiedenste Färbemethoden zur Verfügung. Die Standardmethode zur Übersichtsfärbung ist die sogenannte Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Hämatoxylin ist ein Naturfarbstoff, der durch Oxidation zum eigentlich färbenden Hämatein mit chinoider Struktur reagiert, welches nach Zusatz eines Alaunsalzes zur Färbung dient. Hämalaun färbt saure (basophile) Strukturen, wie z.B. DNA, blau. Der saure Farbstoff Eosin färbt alle basischen (azidophilen) Zellbestandteile, wie z.B. Zytoplasma und Kollagen, rot. Durch diesen Farbkontrast lassen sich die Zellstrukturen unter dem Mikroskop abgrenzen und auf Veränderungen analysieren [Romeis, 2010].

Tabelle 17: Lösungen zur HE-Färbung

Lösung	Zusammensetzung
Formalin (Formaldehyd 4%)	86,6 L ddH ₂ O, 13,4 L Formaldehyd (30%), 400 g NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O, 800 g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O, pH=7; Lagerung bei RT

Durchführung

Zu histologischen Untersuchungen wurde ein Teil der bei -80°C gelagerten Lebern (Tiercodes der Expositionsgruppen 0 ppm: 1, 10, 35, 40, 41; 5 ppm: 8, 9, 11; 10 ppm: 12, 13, 14; 20 ppm: 3, 7, 17, 19, 23, 28, 39, 44, 49) in Formalin aufgetaut und für mindestens 7 Tage fixiert. Anschließend wurden die Lebern in ca. 4 mm dicke Scheiben getrimmt und nach einem Standardprogramm des Paraffinierungsautomaten in Paraffin eingebettet (Einbettung durch das Labor Histologie). Hierbei wurde das Gewebe durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70 - 100%) entwässert, in Xylol gewaschen um Ethanolreste zu entfernen und anschließend in Flüssigparaffin belassen. Um die Lebern in Kassetten einzubetten (blocken), wurde Paraplast (Schmelzpunkt: 58 - 62°C) verwendet; hierzu wurden die Lebern mit der späteren Schnittfläche nach unten in die Kassette gelegt, mit Paraplast aufgefüllt und ausgehärtet.

Aus den in Paraffin eingebetteten Lebern wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms ca. 3 - 6 µm dicke Schnitte angefertigt, die im Wasserbad (45°C) gestreckt, anschließend auf Objektträger überführt und über Nacht im Inkubator (50°C) getrocknet wurden. Anschließend erfolgte die automatisierte HE-Färbung und das Eindecken der Objektträger mit Pertex durch das Laborteam Histologie der BASF SE. Nach Färbung und Aushärtung, erfolgte die Begutachtung der gefärbten Schnitte am Mikroskop, wobei Veränderungen in die folgenden Schweregrade eingestuft wurden: keine, Grad 1, Grad 2, Grad 3.

3.1.7.2 Oil-Red-O-Färbung

Prinzip

Die Färbemethode Oil-Red-O (ORO) wurde 1944 von Lillie zum Nachweis von eingelagertem Fett in histologischen Schnitten eingeführt. Hierbei wird der lipophile Azofarbstoff in den im Zytoplasma eingelagerten, lipidgefüllten Vakuolen angereichert. Rot angefärbt werden durch ORO: Triacylglyceride und Cholesterinester [Lillie & Ashburn, 1943].

Tabelle 18: Lösungen zur ORO-Färbung

Lösung	Zusammensetzung
Hämatoxylin nach Mayer	2 g Hämatoxylin, 100 g $KAl(SO_4)_2$, 100 g Chloralhydrat, 2 g Zitronensäure in 2 L ddH ₂ O lösen, zur Reifung 0,4 g NaIO ₃
60%iges Isopropanol	600 mL Isopropanol (p.A.) mit 400 mL ddH ₂ O mischen
Oil-Red-O nach Lillie (Stammlösung)	5 g Oil-Red-O in 1 L Isopropanol (p.A.) lösen
Oil-Red-O nach Lillie (Gebrauchslösung)	600 mL Stammlösung mit 400 mL ddH ₂ O mischen, 24 h bei RT belassen und anschließend filtrieren

Durchführung

Zur ORO-Färbung wurde ein Teil der gemäß Kapitel 3.1.7.1 aufgetauten Lebern eingesetzt. Von den männlichen Tieren wurden mindestens 3 Lebern pro Dosisgruppe, von den weiblichen Tieren wurden je 3 Organe der Hochdosisgruppe und der Kontrollgruppe eingesetzt (0 ppm: 1, 10, 30; 5 ppm: 8, 9, 11; 10 ppm: 12, 13, 14; 20 ppm: 3, 7, 17, 19, 23, 28). Diese wurden zunächst mit Leitungswasser gewässert und anschließend auf dem Objektisch vollständig gefroren (bis -40°C). Das Schneiden erfolgte bei -10 bis -15°C mit einer Schnittdicke von etwa 12 - 20 µm. Die Schnitte wurden in mit Wasser befüllten Schälchen bis zur Färbung zwischengelagert.

Zur Färbung wurden die Schnitte in die Färbekörbchen übertragen und diese für ca. 5 Minuten in Isopropanol (60%) belassen. Anschließend wurden die Schnitte für 10 - 12 Minuten in ORO-Gebrauchslösung gefärbt und durch 2 - 3 maliges Eintauchen in Isopropanol (60%) differenziert, woraufhin sie in Wasser belassen wurden, bis sie ruhig auf der Oberfläche lagen. Abschließend wurden die Schnitte nach dreiminütiger Färbung in Hämatoxylin-Lösung nach Mayer für mindestens 10 Minuten in Wasser belassen. Zur mikroskopischen Auswerten der Schnitte wurden diese auf einen Objektträger aufgezogen und mit Kaisers Glyceringelatine (40 - 60°C) eingedeckt.

3.2 *in vitro* Untersuchungen

3.2.1 Abiotische Stabilität

Prinzip

Neben der möglichen Metabolisierung ist bezüglich der Stabilität einer Substanz von Interesse, ob und unter welchen Bedingungen diese auch abiotisch abgebaut wird. Da NVP in der Literatur als säurelabil beschrieben wurde [Hawi *et al.*, 1987; Senogles & Thomas, 1980] und in den Kompartimenten der Zelle und des Körpers unterschiedliche pH-Werte herrschen, wurde NVP in verschiedenen Simulanzien unterschiedlichen pH-Wertes auf dessen Stabilität geprüft. Untersucht wurde die Stabilität in den folgenden Systemen: Magensaftsimulanzien (pH 1,1 - 3), Lysosomensimulanz (pH 4,5), Lungenflüssigkeits-simulanz (pH 7,4) und Phosphatpuffer als neutrale Komponente (pH 7,4).

NVP wurde über verschiedene Zeitperioden mit den Simulanzien inkubiert, anschließend dessen Restkonzentration bestimmt und die Halbwertszeiten in Abhängigkeit der untersuchten pH-Werte berechnet.

Tabelle 19: Herstellung der Lösungen zur Überprüfung der abiotischen Stabilität von NVP

Lösung	Zusammensetzung
Glycin-Lösung [0,1 M]	0,75 g Glycin in 100 mL ddH ₂ O
HCl-Lösung [0,1 M]	12,5 mL 4 M HCl in 500 mL ddH ₂ O
KCl-Lösung [0,1 M]	1,86 g KCl in 250 mL ddH ₂ O
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ [100 mM], pH 7,4	6,804 g KH ₂ PO ₄ und 8,709 g K ₂ HPO ₄ in je 500mL ddH ₂ O lösen, K ₂ HPO ₄ -Lösungvorlegen, mit KH ₂ PO ₄ auf pH 7,4 einstellen; Lagerung: 4°C, 6 Monate
Lysosomensimulanz pH 4,5	0,0265 g MgCl ₂ *6H ₂ O, 0,803 g NaCl, 0,0185 g Na ₂ HPO ₄ , 0,0105 g Na ₂ SO ₄ , 0,032 g CaCl ₂ *2H ₂ O, 0,0195 g Na ₃ -Citrat*2H ₂ O, 1,505 NaOH, 5,687 g Citronensäure*H ₂ O, 0,015 g Glycin, 0,0225 g Na-Tartrat*2H ₂ O, 0,0215 g Na-Lactat, 0,0215 Na-Pyruvat in 250 mL ddH ₂ O lösen, pH 4,5 mit 1 M NaOH einstellen
Lungenflüssigkeitssimulanz pH 7,4	0,061 g MgCl ₂ *6H ₂ O, 1,505 g NaCl, 0,075 g KCl, 0,0315 g Na ₂ HPO ₄ , 0,016 g Na ₂ SO ₄ , 0,0925 g CaCl ₂ *2H ₂ O, 0,0145 g Na ₃ -Citrat*2H ₂ O, 0,1435 g Na-Acetat, 0,6505 g NaHCO ₃ in 250 mL ddH ₂ O lösen, pH 7,4 mit 4 M HCl einstellen
Magensaftsimulanz pH 1,2	64,5 mL HCl-Lösung vorlegen, mit KCl-Lösung pH 1,2 einstellen
Magensaftsimulanz pH 2,0	50 mL KCl-Lösung vorlegen, mit HCl-Lösung pH 2 einstellen
Magensaftsimulanz pH 3,0	50 mL Glycin-Lösung vorlegen, mit HCl-Lösung pH 3 einstellen

3 Material und Methoden

Durchführung

Zur NVP-Inkubation (0,1 mM und 100 mM, 37°C) in den verschiedenen Simulanzien/Puffern wurden zunächst 9,75 mL des jeweiligen Puffers für 5 Minuten bei 37°C temperiert und anschließend 250 µL der entsprechenden NVP Stammlösung (4 M bzw. 4 mM in Phosphatpuffer) zugegeben. Je nach Pufferlösung wurden die Inkubationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tabelle 20) durch Neutralisierung des pH-Wertes gestoppt, wozu 1 mL Inkubat entnommen und mit 3 mL Phosphat-Puffer versetzt wurde. Dieses Volumenverhältnis wurde eingesetzt, da ein Vorversuch gezeigt hatte, dass die Simulanzien in diesem Volumenverhältnis neutralisiert wurden und NVP unter diesen Bedingungen bis zur Messung stabil blieb.

Tabelle 20: Abiotische Inkubation

Simulanz	pH	c(NVP) [mM]	Inkubationsperiode
Magensaftsimulanz	pH 1,2	0,1; 100	0; 1; 2; 5; 10; 20; 30; 60; 120 min
Magensaftsimulanz	pH 2,0	0,1; 100	0; 5; 10; 20; 30; 60; 120 min
Magensaftsimulanz	pH 3,0	0,1; 100	0; 1; 2; 4; 6; 8 h
Lysosomensimulanz	pH 4,5	0,1	0; 2; 6; 8, 24 h
Lungenflüssigkeitssimulanz	pH 7,4	0,1	0; 4; 8; 24 h
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ [100 mM]	pH 7,4	0,1; 100	0; 24; 72 h

Die neutralisierten Inkubationslösungen wurden für die analytischen Messungen mit einem entsprechenden Volumen Phosphatpuffer verdünnt (0,1 mM: VF 20, 100 mM: VF 20 000), sodass die nominalen Konzentrationen ohne potentiellen Abbau um 555,7 µg NVP/L und somit innerhalb der Kalibrierreihe lagen. Die Quantifizierung von NVP und des erwarteten Abbauprodukts 2-Pyrrolidon in den verdünnten Inkubaten und der mitgeführten Qualitätskontrolle erfolgte mittels GC/MS nach Flüssiginjektion. Das zweite erwartete Abbauprodukt Acetaldehyd wurde aufgrund des hohen Dampfdrucks mittels Headspace (HS)-GC/MS im Inkubat analysiert. Die Probenaufarbeitung erfolgte wie im Folgenden beschrieben: Zum Nachweis des Acetaldehyds aus der gasförmigen Phase der Probe wurde 1 mL Probe mit 4 mL Wasser, 100 µL D5-Anilin/Pyridin (interner Standard) und ca. 6 g Kaliumcarbonat versetzt und das Vial schnell verschlossen. Ein exakt abgemessenes Volumen aus der Gasphase wurde vom Injektor entnommen und über diesen auf die GC-Säule überführt (Methode: Tabelle 21).

Tabelle 21: HS-GC/MS-Parameter zu Bestimmung von Acetaldehyd

GC-System	Agilent: 6890 mit CTC CombiPAL-Probengeber inklusive HS-Einheit
Injektionsvolumen	2 µL (Split 1:5)
Injektortemperatur	250°C
Säule	HP5-MS, Agilent, Länge: 30 m, innerer Durchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 1,00 µm

3 Material und Methoden

Fluss	1,3 mL/min (Helium)
Ofenparameter	Anfangstemperatur 40°C (1,5 min) Temperaturgradient: 30 °C/min auf 280°C Endtemperatur 280°C (2,5 min)
MS-System	Agilent: MSD 5973
SIM/Scan	Aufnahmemodus SIM/Scan nach 1,3 min Scan: Massenbereich 28,3-250 amu
SIM Zeitfenster	SIM: Zeitfenster (<u>Quantifizierungsmasse</u> , Qualifier) Zeitfenster 1 für Acetaldehyd (<u>44,43,42</u>) amu Zeitfenster 2 für Pyridin-D5 (<u>84,56,54</u>) amu und Anilin-D5 (98,71)amu Zeitfenster 3 für Anilin-D5 (<u>98,71,42</u>) amu Zeitfenster 4 für NVP (<u>111,82,56</u>) amu Aufnahmezeiten <u>Quantifizierungsmasse 50 ms</u> , Qualifier 20 ms
Temperatur	Überleitung GC-MS: 280°C, Quelle: 230°C, Quadrupol: 150°C
LOQ	Acetaldehyd 25 µg/L

Zur Quantifizierung von NVP und 2-Pyrrolidon nach Flüssiginjektion per GC/MS wurden die beiden Stoffe zunächst aus der wässrigen Phase extrahiert. Hierfür wurde 1 mL Probe (bzw. Qualitätsstandard) mit 9 mL Wasser, 100 µL D5-Anilin (Interner Standard), 1 mL Aceton und etwa 10 g Kaliumcarbonat versetzt. Durch Zugabe dieses Salzes trennte sich die Probe nach etwa fünfminütigem Schütteln in eine wässrige und eine organische Phase. Die NVP und 2-Pyrrolidon beinhaltende Acetonphase wurde zur GC-Analyse injiziert (Methode: Tabelle 22).

Tabelle 22: GC/MS-Parameter zur Bestimmung von NVP und 2-Pyrrolidon

GC-System	Agilent: 7890A mit CTC CombiPAL-Probengeber
Injektionsvolumen	2 µL (Split 1:5)
Injektortemperatur	250°C
Säule	ZB-WAXplus, Zebron, Länge: 30 m, innerer Durchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm
Fluss	1,5 mL/min (Helium)
Ofenparameter	Anfangstemperatur 60°C Temperaturgradient 1: 30 °C/min auf 150°C Temperaturgradient 2: 10 °C/min auf 190°C Temperaturgradient 3: 20 °C/min auf 250°C Endtemperatur 250°C (10 min)
MS-System	Agilent: MSD 5975C
SIM/Scan	Aufnahmemodus SIM/Scan nach 1,8 min Solventdelay Scan: Massenbereich 29-250 amu
SIM Zeitfenster	SIM: Zeitfenster (<u>Quantifizierungsmasse</u> , Qualifier) Zeitfenster 1 für Morpholin-D8 (<u>63,93,95</u>) amu Zeitfenster 2 für NVP (<u>111,82,56</u>) amu und Anilin-D5 (IS) (98,71)amu Zeitfenster 3 für 2-Pyrrolidon (<u>85,56,41</u>) amu
Temperatur	Überleitung GC-MS: 250°C, Quelle: 230°C, Quadrupol: 150°C
LOQ	NVP: 10 µg/L; 2-Pyrrolidon: 50 µg/L

3.2.2 Metabolische Stabilität

3.2.2.1 Subzelluläre Fraktionen

Prinzip

Subzelluläre Fraktionen können aus unterschiedlichen Organen, wie Leber, Niere, Haut, usw., gewonnen werden. Zur Untersuchung der metabolischen Stabilität werden meist subzelluläre Fraktionen der Leber herangezogen. Während in der S9-Fraktion Zellmembranfragmente, Zellkerne und Mitochondrien durch Zentrifugation entfernt sind, ist in der Mikrosomenfraktion auch das Zytosol abgetrennt. Demnach enthalten S9- und Mikrosomen-Fraktionen unterschiedliche Enzymausstattungen mit unterschiedlicher Aktivität. CYP-Isoenzyme sind in beiden Fraktionen enthalten, allerdings weisen Mikrosomen höhere Aktivitäten auf, da diese Fraktion das endoplasmatische Retikulum im Vergleich zur S9-Fraktion in konzentrierterem Maß enthält. Prinzipiell ist bei der Inkubation subzellulärer Fraktionen zu beachten, dass mögliche Metabolismusreaktionen auch durch die Kofaktoren der enthaltenen Enzyme bestimmt sind. Zytosolische Enzyme, wie z.B. Isoformen der GST, sind aufgrund ihrer zellulären Lokalisation kaum in Mikrosomen, jedoch in der Zytosol enthaltendem S9-Fraktion vorhanden. Aus diesem Grund wurde zur S9-Inkubation GSH als Kofaktor zugesetzt. In beiden eingesetzten subzellulären Fraktionen wurde NADPH generierendes System zugegeben, um CYP-vermittelte Funktionalisierungsreaktionen (Phase I) des Fremdstoffmetabolismus zu untersuchen.

Tabelle 23: Lösungen zur Inkubation mit subzellulären Fraktionen

Lösung	Zusammensetzung
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ [100 mM], pH 7,4	6,804 g KH ₂ PO ₄ und 8,709 g K ₂ HPO ₄ in je 500mL ddH ₂ O lösen, K ₂ HPO ₄ -Lösung vorlegen, mit KH ₂ PO ₄ auf pH 7,4 einstellen; Lagerung: 4°C, 6 Monate
MgCl ₂ *6H ₂ O [1 M]	2,033 g MgCl ₂ *6H ₂ O in 10 mL KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ [100 mM], pH 7,4 lösen; Lagerung: 4°C, 6 Monate
GSH [40 mM]	122,9 mg GSH in 10 mL Phosphatpuffer lösen; Lagerung: 4°C, 6 Monate
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) [0,7 U/mL]	Herstellung durch Lösen der gelieferten G-6-P-DH (Sigma) in ddH ₂ O, Lagerung: -20°C, 3 Monate
NADPH generierendes System	131 mg G-6-P, 33,3 mg NADPH, 143 µL MgCl ₂ *6H ₂ O [1 M], 657 µL ddH ₂ O, 200 µL G-6-P-DH, Lagerung: täglicher Ansatz
NVP-Gebrauchslösung	Herstellung einer NVP-Lösung in Phosphatpuffer mit vierzigfacher Inkubatskonzentration, täglicher Ansatz

Durchführung

Zunächst erfolgte die Herstellung der subzellulären Fraktionen der Leber und Lunge gemäß Kapitel 3.1.6.1. Dabei ist zu erwähnen, dass die Organe nach Entnahme nicht in Stickstoff schockgefroren, sondern entweder sofort zur Homogenisierung eingesetzt oder bei -80°C gelagert wurden. Des Weiteren wurden zusätzlich Mikrosomen zur Inkubation eingesetzt, die

3 Material und Methoden

aus den Lebern Aroclor 1254 behandelte männliche Wistar Ratten (4 - 5 Tage, 500 mg/kg KG *i.p.*) gewonnen wurden.

Um die Abhängigkeit der metabolischen Reaktion von der Substratkonzentration und dem eingesetzten Kofaktor zu untersuchen, wurden verschiedene Substratkonzentrationen eingesetzt und mit und ohne NADPH-generierendes System (Kofaktor) inkubiert.

Zur NVP Inkubation mit S9-Fraktion wurden zunächst 670 μL Phosphatpuffer und 250 μL S9-Fraktion 5 Minuten vorinkubiert (37°C, 450 rpm Thermomixer). Anschließend wurden 25 μL GSH-Lösung, 30 μL NADPH-generierendes System und 25 μL NVP-Gebrauchslösung zupipettiert und maximal über 2 Stunden bei gleichbleibenden Bedingungen inkubiert (aktive Inkubation (AI)). Die Reaktion wurde mittels Proteinfällung durch Zugabe von einem Volumenteil (1 mL) eiskaltem Aceton gestoppt, 15 Minuten im Ultraschallbad belassen und der Überstand nach Zentrifugation (6000 g, 15 min, 4°C) zur Probenaufarbeitung eingesetzt.

Bei jeder Versuchsreihe wurden 5 Kontrollen mitgeführt: t0: Zugabe von eiskaltem Lösemittel unmittelbar nach Zugabe von NVP; HDK: Einsatz von hitzeinaktiviertem S9 (99°C, 20 min); Matrix: ohne NVP, keine Inkubation; Pufferkontrolle (PK): kein biologisches System, keine Inkubation. Die Überprüfung des eingesetzten Systems wurde mit einer Testosteroninkubation (200 μM , HDK, AI, 2 h) unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

Die Inkubation mit Mikrosomen erfolgte prinzipiell analog zum S9-Verfahren, allerdings richtete sich das eingesetzte Mikrosomenvolumen nach dem Proteingehalt der Mikrosomensuspension; pro Milliliter Inkubat wurden 500 bzw. 1000 μg mikrosomales Protein eingesetzt. Der Volumenunterschied wurde durch Anpassung des eingesetzten Puffervolumens ausgeglichen.

Das Lösemittel zur Stoppung der Reaktion durch Proteinfällung richtete sich nach den eingesetzten Analyseverfahren: Zur GC/FID wurde das Inkubat mit Ethylacetat extrahiert (5 min Schütteln) und der Überstand zur Analyse eingesetzt (Tabelle 24).

Tabelle 24: Parameter zur NVP-Bestimmung mittels GC/FID

System	Shimadzu GC-2010 plus mit Autosampler AOC-20s Shimadzu, FID, Dionex Chromeleon Software	
Säule	Optima-delta 3, Länge: 30 m, innerer Durchmesser: 0,32 mm, Filmdicke: 0,25 μm	
Injektion	1,0 μL (Split 1:20)	
Injektortemperatur	250°C	
Fluss	1,4 mL/min (Helium)	
Ofenparameter	Anfangstemperatur:	120°C (2 min)
	Temperaturgradient 1:	10°C/min auf 190°C
	Temperaturgradient 2:	7°C/min auf 320°C
	Endtemperatur:	320°C (5 min)
Detektor	FID (300°C)	
R _t	ca. 4 min	

Folgte eine GC/MS Analyse wurde analog zur S9-Inkubation ein Volumen Aceton zum Abstoppen der Reaktion eingesetzt und zur GC/MS-Analyse aufgearbeitet (siehe 3.2.1 Abiotische Stabilität, Methode Tabelle 22).

Als Positivkontrolle wurde Testosteron in 200 µM Konzentration über 2 Stunden inkubiert, die Proteine mit einem Volumenteil Aceton gefällt und per Zentrifugation (6000 g, 15 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde zur HPLC-UV eingesetzt (Methode siehe Anhang VI).

3.2.2.2 Hepatozyten

Prinzip

Um den *in vitro* Metabolismus von NVP in Hepatozyten zu untersuchen, wurden kryokonservierte Rattenhepatozyten eingesetzt. Ein Vorteil von Hepatozyten gegenüber subzellulären Fraktionen besteht darin, dass die Zelle intakt ist und Kofaktoren möglicher metabolischer Reaktionen unter physiologischen Bedingungen vorliegen. Hepatozyten sind damit zu Funktionalisierungs- und Konjugationsreaktionen fähig, was die Beobachtung von Phase I und II Reaktionen ermöglicht.

Tabelle 25: Lösungen zur Rattenhepatozyteninkubation

Lösung	Zusammensetzung
Puffer zum Auftauen der Zellen (enthält Puffer A und B)	Ratte: „Rodent Hepatocyte Isolation Kit“ gebrauchsfertig von XenoTech: Lagerung: 4°C, 6 Monate
Inkubationsmedium	Williams Medium E ohne Glycerin, 10%FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
Trypanblau	0,4 %iges Trypanblau sterilfiltriert, Lagerung: RT, 6 Monate
NVP-Gebrauchslösung [200 µM]	Herstellung durch geeignete Verdünnung von NVP mit Inkubationsmedium

Durchführung

Die kryokonservierten Rattenhepatozyten (XenoTech, Kansas City) wurden zunächst ca. 30-60 Sekunden in einem auf 37°C temperierten Wasserbad angetaut, bis sich das Zellpellet gerade vom Kryogefäßrand löste. Die Zellen wurden dann in Puffer A (20 mL/ Kryogefäß) überführt, wobei 1,5 mL Puffer B zum Nachspülen verwendet wurde. Nach vollständigem Schmelzen der Zellsuspension wurde diese zentrifugiert (100 g, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Zellpellet im restlichen Puffer B resuspendiert. Darauf folgte eine erneute Zentrifugation (60 g, 3 min, 4°C) nach der der Überstand verworfen und das Zellpellet in Inkubationsmedium resuspendiert wurde. Die Viabilität der Zellen wurde mithilfe des Trypanblau-Assays (siehe Kapitel 3.1.4.2) bestimmt (1 Volumen Zellsuspension + 1 Volumen Trypanblaulösung) und die Zellzahl mit Inkubationsmedium auf eine Million Zellen/mL eingestellt.

3 Material und Methoden

Zur Inkubation wurden 500 µL Zellsuspension bzw. Inkubationsmedium (Mediumkontrolle) pro Well (24-Well-Platte) vorgelegt und 500 µL NVP-Gebrauchslösung zugegeben, sodass eine Zelldichte von 500.000 Zellen/mL und eine NVP-Konzentration von 100 µM vorlag. Die Inkubation erfolgte über 0, 1, 2, 4 und 6 Stunden im Brutschrank (37°C, gesättigte Luftfeuchte, 5% CO₂). Zum Stoppen der Inkubation wurden nach 1, 2 und 4 Stunden je 50 µL Inkubatsuspension aus einem Well entnommen und mit dem gleichen Volumen Aceton zur Proteinfällung versetzt. Nach fünfminütiger Ultraschallbadbehandlung und anschließender Zentrifugation (6000 g, 10 min, 4°C) wurden die Überstände bei -20°C bis zur Analyse mittels HPLC/MS gelagert. Die Aufarbeitung nach Inkubationsende (nach 6 Stunden) erfolgte analog zu den vorherigen Zeitpunkten, allerdings wurden 400 µL Inkubat nach kräftigem Durchmischen mit 400 µL Aceton versetzt.

Der Umsatz von NVP in den Hepatozyteninkubaten zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde durch den Vergleich der Peakflächen mit den jeweiligen Mediumkontrollen (ohne Hepatozyten) berechnet (HPLC/MS-Methode Tabelle 26). Als Positivkontrolle wurde Testosteron in 200 µM Konzentration über 6 Stunden mit Hepatozyten inkubiert, analog aufgearbeitet und zur HPLC-UV eingesetzt (Methode siehe Anhang VI).

Tabelle 26: Parameter zur NVP-Bestimmung mittels HPLC/MS

System	Waters: 2695 Separationsmodul, 2487 dualer Absorptionsdetektor MS: Quattro micro™ API micromass
Ionisationsmodus	ESI, Positivmodus
Eluent A	ACN
Eluent B	Ammoniumformiat [20 mM]
Einspritzvolumen	130 µL
Gradient	0 - 5 min 10% Eluent A 5,1 - 10 min auf 90% Eluent A
Säule	TSKgel Amide-80 Tosoh Bioscience
Fluss	1 mL/min
R _t	ca. 3 min

3.2.2.3 Präzisionsleberschnitte

Prinzip

Präzisionsleberschnitte (PCLS) stellen ein *in vitro* System zur Untersuchung des Metabolismus von Testsubstanzen dar. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass alle Zelltypen der Leber sowie Gallenkanälchen in ihrer histologischen Anordnung, entsprechend dem *in vivo*-Umfeld vorliegen. Zu Metabolismusreaktionen benötigte Kofaktoren liegen im System vor, sodass in PCLS das komplette Spektrum an Phase I und II Metabolismus möglich ist. Die PCLS wurden aus frischem Lebermaterial *ex vivo* hergestellt und sind, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, das der *in vivo* Situation morphologisch am nächsten liegende *in vitro* Metabolismus-System.

Tabelle 27: Lösungen zur PCLS-Inkubation

Lösung	Zusammensetzung
Krebs-Henseleit-Puffer-Mix	Substanzmischung (Sigma)
Krebs-Henseleit Puffer (KHP)	1 KHP-Mix, 0,373 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,1 g Na HCO_3 in ca. 800 mL ddH ₂ O lösen, pH auf 7,4 einstellen, auf 1L mit ddH ₂ O auffüllen
Williams Medium E (WME) ohne Glycerin	50 mL FBS, 5 mL Penicillin/Streptomycin zu 500 mL WME
NVP-WME [50 mM]	26,7 μL NVP mit WME auf 5 mL auffüllen

Durchführung

Nach Isofluranbetäubung, anschließender zervikaler Dislokation und Entblutung einer männlichen Wistar Ratte wurde die Leber entnommen und in eiskaltem, carbogengesättigtem Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis unter keimreduzierten Bedingungen (Sterilbank). Zur Herstellung der zylinderförmigen Leberpräparate (*Cores*) wurde die Leber in einer mit KHP befüllten Petrischale in ihre Lappen zerlegt, aus welchen mit einem Akkustanzer auf einem Wachsstreifen die *Cores* (\varnothing 8 mm) präpariert wurden. Die erhaltenen *Cores* wurden in den zuvor mit Ethanol (70%) desinfizierten, gekühlten (4°C) und mit KHP befüllten *Tissue Slicer* (Krumdieck *Tissue Slicer*) gelegt, welcher bei konstanter Geschwindigkeit (40 - 50 Zyklen/min) ca. 200-250 μm dicke Präparate schnitt. Diese wurden zunächst in der Glasfalle des Krumdieck *Tissue Slicers* gesammelt und dann zur Qualitätskontrolle in eine Petrischale überführt. PCLS, die sich aufrollten, einen ungleichmäßigen Rand oder Löcher aufwiesen, wurden verworfen.

Die Inkubation der PCLS erfolgte in 6-Well-Platten (5 mL WME/Well), welche zur WME-Temperierung und -Carbogenisierung vor Zugabe der PCLS bis zu einer Stunde im Brutschrank (37°C, gesättigte Luftfeuchte, Carbogenbegasung) belassen wurden. Nach Überführung von 2 PCLS pro Well und dreißigminütiger Vorinkubation wurden 10 μL NVP-WME-Gebrauchslösung ins Well pipettiert (NVP-Inkubatkonzentrationen: 1, 10, 100 μM).

3 Material und Methoden

Die NVP-Inkubation erfolgte über 0, 4, 6, 8 und 24 Stunden, wobei Mediumkontrollen (ohne PCLS), sowie hitzedenaturierte Kontrollen (HDK: PCLS 20 min bei 99°C denaturiert) und Matrixkontrollen (PCLS-Inkubation ohne NVP) zu jedem Zeitpunkt mitgeführt wurden. Zu den genannten Zeitpunkten wurde die Inkubation durch Entfernen der Leberschnitte gestoppt und das Medium bis zur weiteren Aufarbeitung zur GC/MS-Messung bei -20°C gelagert. Die Aufarbeitung zur GC/MS erfolgte analog zur in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methode. Hierbei wurden gemessene 2-Pyrrolidon- und NVP-Gehalte der Matrixproben von den Gehalten der aktiven Inkubationen subtrahiert.

Als Positivkontrolle wurde Testosteron in 200 µM Konzentration über 24 Stunden inkubiert, die Proteine mit einem Volumenteil Aceton gefällt und per Zentrifugation (6000 g, 15 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde zur HPLC-UV eingesetzt (Methode siehe Anhang VI).

3.2.2.4 Blut

Prinzip

Da NVP bei systemischer Bioverfügbarkeit im Blut zirkuliert, könnten enthaltene Enzyme wie Amidasen und Esterasen zum metabolischen Abbau von NVP beitragen. Aus diesem Grund wurde Vollblut als weiteres *in vitro* System zur Untersuchung der Metabolisierung von NVP eingesetzt [Furihata *et al.*, 2005; Tsujita & Okuda, 1983].

Tabelle 28: Lösungen zur Blutinkubation

Lösung	Zusammensetzung
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ [100 mM], pH 7,4	6,804 g KH ₂ PO ₄ und 8,709 g K ₂ HPO ₄ in je 500mL ddH ₂ O lösen, K ₂ HPO ₄ -Lösungvorlegen, mit KH ₂ PO ₄ auf pH 7,4 einstellen; Lagerung: 4°C, 6 Monate
NVP-Stammlösung [0,4 M]	21,4 µL NVP zu 479 µL Puffer pipettieren
NVP-Gebrauchslösung [4 mM]	10 µL NVP-Stammlösung zu 990 µL Puffer pipettieren

Durchführung

Zur Inkubation wurde frisches Blut mit EDTA als Gerinnungshemmer eingesetzt. Hierzu wurden 2 männliche Wistar Ratten nach Isofluranbetäubung durch zervikale Dislokation getötet und vollständig in ein EDTA-Gefäß entblutet. Zur Inkubation wurden je 975 µL Blut mit 25 µL NVP-Gebrauchslösung (aktive Inkubation) bzw. Phosphatpuffer (Matrix) versetzt und 0, 1, 2, bzw. 4 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Hierbei wurden Duplikate für die vierstündige Inkubation der aktiven Inkubation und der Matrix angefertigt. Alle anderen Inkubate erfolgten als Einzelmessung. Zum Stoppen der Inkubation zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden 50 µL des Inkubats zu einem eiskalten Gemisch aus 950 µL Phosphatpuffer und 1 mL Aceton gegeben. Zur Abtrennung der Proteine wurden die Proben zentrifugiert (6000 g, 15 min, 4°C) und bis zur weiteren Aufarbeitung und Analyse mittels GC/MS (Kapitel 3.2.1) bei -20°C gelagert.

3.2.2.5 Zytotoxizität: MTT-Assay in Hepatozyten und PCLS

Prinzip

Der erstmals 1983 beschriebene Zytotoxizitätsassay von Mosman beruht auf dem NADH-abhängigen Umsatz des wasserlöslichen, membrangängigen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen in das wasserunlösliche, blau-violette Formazansalz. Demnach zeigt eine blau-violett-Färbung der Zellen metabolische Aktivität an und wird als Maß für deren Vitalität herangezogen [Mosman, 1983].

Tabelle 29: Lösungen des MTT-Assays

Lösung	Zusammensetzung
Auftaukits	Ratte: Rodent Hepatocyte Isolation Kit Kaninchen: Hepatocyte Isolation Kit Mensch: Hapatosure Optimization Kit
Lyselösung	10 g SDS; 0,6 mL Eisessig mit DMSO auf 100 mL auffüllen
Medium	Williams Medium E ohne Glycerin, 10%FBS, 1% Penicillin/Streptomycin
MTT-Stammlösung	0,5 g in 100 mL PBS/TrisHCl lösen (5 mg/mL)
NADH-Lösung	0,0037 g in 5 mL TrisHCl lösen (1 mM)
NVP-Stammlösung	27 µL NVP zu 223 µL Medium pipettieren
NVP-Gebrauchslösung	10 µL NVP-Stammlösung zu 990 µL Medium pipettieren
TrisHCl [100 mM] pH 7,5	12,11 g Tris in ca. 900 mL ddH ₂ O lösen, mit HCl auf pH 7,5 einstellen und auf 1000 mL auffüllen Lagerung: 6 Monate, 4°C
TritonX-Lösung	2 g TritonX in 100 mL Medium lösen

Durchführung in Hepatozyten

Nachdem die kryokonservierten Hepatozyten von Ratte und Mensch (XenoTech, Kansas City) wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben aufgetaut wurden, wurde die Zelldichte und -vitalität mittels Trypanblau Assay bestimmt (Kapitel 3.1.4.2). Die Zellsuspension wurde mit Inkubationsmedium verdünnt, sodass die Zelldichte 10^6 Zellen/mL betrug. Zur Inkubation wurden 50 µL dieser Zellsuspension und 50 µL der entsprechenden NVP-Lösung in einer 96-Well-Platte inkubiert (37°C, 5% CO₂, ≥ 90% Luftfeuchtigkeit). Demnach betrug die Zelldichte während der siebenstündigen Inkubation $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/mL mit NVP Konzentrationen von 0, 10, 50, 100, 250, 500 und 1000 µM, welche durch geeignete Verdünnung der NVP-Gebrauchslösung hergestellt wurden. Mit der Positivkontrolle TritonX (1%ig in der Inkubation) wurde analog verfahren. Alle Bestimmungen erfolgten mindestens in Duplikaten.

Nach der Inkubationszeit wurden 10 µL MTT-Stammlösung in PBS pro Well pipettiert und weitere 2 – 3 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der MTT-Inkubation wurden die Platten zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, RT) um restliche nicht angewachsene Zellen abzutrennen und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit je 100 µL Lyselösung

3 Material und Methoden

versetzt und unter Schütteln lysiert (30 min, RT). Die Vermessung der Proben erfolgte photometrisch ($\lambda_{\text{Messung}}=570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Referenz}}=690 \text{ nm}$, Sunrise Infnit200, Tecan).

Durchführung in Präzisionsleberschnitten (PCLS)

Nach Inkubation der PCLS mit NVP-Konzentrationen von 25, 50, 100 und 250 μM über 24 Stunden (Herstellung und Inkubation siehe Kapitel 3.2.2.3) wurden PCLS-Homogenate zum MTT-Assay herangezogen. Hierzu wurden 790 μL Tris-Puffer und 100 μL NADH-Lösung vorgelegt, 10 μL PCLS-Homogenat zugegeben und nach Zugabe von 100 μL MTT-Reagenz in Tris-Puffer über 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 μL Isopropanol zugegeben und jeweils 200 μL Probe zur Dreifachbestimmung mittels photometrischer Vermessung eingesetzt ($\lambda_{\text{Messung}}=570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Referenz}}=690 \text{ nm}$, Infnit200, Tecan).

Auswertung

Die Vitalität wird in Prozent angegeben und errechnet sich aus dem Quotienten der Extinktionswerte der mit Substanz inkubierten Probe und der Mediumkontrolle (nicht NVP-inkubiert). Eine Vitalität unter 80% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wird als zytotoxisch bewertet.

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Absorption (Probe)}}{\text{Absorption Mediumkontrolle}} \cdot 100$$

Formel 12

4 Ergebnisse

4.1 Mechanistische Untersuchungen *in vivo*: Fünftägige NVP-Inhalationsstudie an Wistar Ratten

4.1.1 Exposition

Die Ganzkörperinhalationsexposition der Wistar Ratten gegenüber NVP-Dampf wurde vom Laborteam Inhalationstoxikologie der BASF SE durchgeführt. Die im Folgenden geschilderten Ergebnisse der Überprüfung der Inhalationsatmosphäre wurden vom Team des Analytiklabors der BASF SE übernommen (Tabelle 30).

Tabelle 30: Analytierte NVP-Konzentrationen der Inhalationsatmosphäre

Expositionstag	Geschlecht	NVP-Atmosphärenkonzentration		
		5 ppm (Gruppe 1)	10 ppm (Gruppe 2)	20 ppm (Gruppe 3)
0	m	4,40 ± 0,3	9,10 ± 1,1	17,90 ± 0,8
1	m w	2,90 ± 1,3	6,40 ± 1,6	16,30 ± 2,3
2	m w	4,30 ± 0,2	7,60 ± 0,7	15,60 ± 1,8
3	m w	5,80 ± 0,1	11,70 ± 0,6	21,30 ± 0,1
4	m w	5,80 ± 0,2	12,10 ± 0,6	20,50 ± 2,4
5	w	5,30 ± 1,3	11,30 ± 1,7	22,20 ± 0,7

m: männlich, w: weiblich

Die berechnete durchschnittliche Konzentration der NVP-Atmosphäre über die Inhalationsperiode ergab $4,6 \pm 1,2$ ppm (Gruppe 1, m), $9,4 \pm 2,5$ ppm (Gruppe 2, m), $18,3 \pm 2,5$ ppm (Gruppe 3, m) und $4,8 \pm 1,2$ ppm (Gruppe 1, w), $9,8 \pm 2,6$ ppm (Gruppe 2, w), $19,2 \pm 3,0$ ppm (Gruppe 3, w). Demnach wurden in jeder Expositionsgruppe $\geq 92\%$ der Sollkonzentration erreicht.

4 Ergebnisse

4.1.2 Befunde

4.1.2.1 Klinische Befunde

Innerhalb der in dieser Arbeit beschriebenen NVP-Inhalationsstudie wurden die eingesetzten Wistar Ratten 5 Tage gegen eine Dosis von 0, 5, 10 und 20 ppm NVP-Dampf exponiert um potentielle Gentoxizität und weitere Mechanismen der Hepatokanzerogenese unter kanzerogenen Dosen zu untersuchen.

Alle eingesetzten Ratten (6 pro Dosis und Geschlecht) überlebten die fünftägige Ganzkörperexposition gegenüber NVP, demnach war über die Studienperiode keine Mortalität zu verzeichnen. Alle Tiere wurden planmäßig am sechsten Tag und somit am Morgen nach der letzten Expositionsphase getötet. Klinische Befunde traten nur bei einzelnen Ratten der NVP exponierten Gruppen auf und beschränkten sich auf roten Nasenausfluss (5 Tiere) und leichten Speichelfluss (Tabelle 31). Roter Nasenausfluss wurde in einzelnen Tieren jeder Dosisgruppe der weiblichen Ratten und bei einem männlichen Tier der mittleren Dosierung festgestellt.

Tabelle 31: Tierbefunde während des NVP-Expositionszeitraums

NVP				
Dosisgruppe	Tiernummer	Geschlecht	Befund	Expositionstag
10 ppm	17	m	roter Nasenausfluss	5
5 ppm	36	w	roter Nasenausfluss	4
10 ppm	37	w	roter Nasenausfluss	4
10 ppm	40	w	roter Nasenausfluss	4
20 ppm	46	w	roter Nasenausfluss	4
20 ppm	47	w	leichter Speichelfluss	2

m: männlich, w: weiblich

Das Körpergewicht der Tiere wurde vor und nach der NVP-Expositionsperiode bestimmt die Körpergewichtsveränderung (*body weight change*) berechnet (Tabelle 32). In der Niedrigdosierung von 5 ppm war in beiden Geschlechtern kein Effekt auf das Körpergewicht zu beobachten. In der mittleren Dosierung (10 ppm) wurde in den männlichen Tieren eine statistisch signifikant reduzierte Körpergewichtszunahme verzeichnet. Dieser Trend, jedoch ohne statistische Signifikanz, war auch in den weiblichen Tieren zu beobachten. In der Hochdosisgruppe von 20 ppm wurde für beide Geschlechter eine NVP-abhängige Gewichtsreduktion mit statistischer Signifikanz im Vergleich zu Kontrollgruppe verzeichnet ($p \leq 0,01$). Demnach wurde in der höchsten Dosisgruppe (20 ppm) ein substanzinduzierter Effekt auf das Gewicht beider Geschlechter nachgewiesen.

4 Ergebnisse

Tabelle 32: Körpergewichtsänderungen über den NVP-Expositionszeitraum

NVP Dosisgruppe	Körpergewichtsänderungen			
	m		w	
	[g]	[%]	[g]	[%]
0 ppm	10,7 ± 2,3	4,0 ± 0,9	7,9 ± 2,2	4,2 ± 1,2
5 ppm	11,3 ± 3,2	4,1 ± 1,2	6,6 ± 3,5	3,5 ± 1,8
10 ppm	4,6 ± 2,5*	1,7 ± 0,9*	4,1 ± 3,1	2,2 ± 1,7
20 ppm	-7,1 ± 6,7**	-2,6 ± 2,5**	-6,1 ± 4,9**	-3,2 ± 2,6**

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ verglichen zur 0 ppm Kontrolle (zweiseitiger Dunnett-Test), m: männlich, w: weiblich

4.1.2.2 Histologische Befunde

Eine histologische Untersuchung der NVP-exponierten Lebern war gemäß dem ursprünglichen Studiendesign nicht vorgesehen. Da bei den Lebern der männlichen Hochdosisgruppe makroskopisch punktförmige Aufhellungen zu erkennen waren, wurden mindestens 3 Lebern pro Dosisgruppe der männlichen und je 3 Lebern der Vehikelkontrollgruppe sowie der Hochdosisgruppe der weiblichen Tiere einer Hämatoxylin-Eosin- (HE-) und einer *Oil-Red-O*- (ORO)-Färbung unterzogen um die makroskopischen Veränderungen histologisch zu untersuchen.

Während die meisten Lebern der NVP-exponierten Tiere zentrolobuläre Vakuolen aufwiesen, wurde dies in den Lebern der Vehikelkontrollen beider Geschlechter nicht festgestellt. In je einem Tier beider Geschlechter der Vehikelkontrollgruppe wurden Vakuolen mit diffusem Verteilungsmuster, d.h. ohne spezifische Lokalisation innerhalb des Lebergewebes, beobachtet. Das vereinzelte Auftreten dieser diffusen Vakuolen in Kontrolltieren ist nicht ungewöhnlich.

In allen untersuchten Lebern der NVP-exponierten männlichen Ratten, mit Ausnahme zweier Lebern der 5 ppm Expositionsgruppe, wurden zentrolobuläre Vakuolen festgestellt. Während in nur einer Leber der drei analysierten Tiere der Niedrigdosisgruppe vereinzelte zentrolobuläre Vakuolen auftraten, wurden die in der mittleren Dosisgruppe in 2 von 3 Tieren beobachteten zentrolobuläre Vakuolen mit einem Grad 1 und zwei Drittel der zentrolobulären Vakuolen der Hochdosisgruppe mit dem höchsten Grad (3) bewertet (Tabelle 33, Abbildung 10 a). Somit zeigten die histologischen Untersuchungen der Leber sowohl einen dosisabhängigen Anstieg der Anzahl zentrolobulärer Vakuolen als auch deren Schweregrads in NVP-exponierten männlichen Ratten.

Um einen ähnlichen Trend auch in weiblichen Tieren zu untersuchen, wurden die Lebern von je 3 Tieren der Vehikelkontrollgruppe und der Hochdosisgruppe histologisch untersucht. Die Vakuolenbildung in der Leber war in den weiblichen im Vergleich zu den männlichen Ratten

4 Ergebnisse

geringer ausgeprägt; je ein Tier zeigte in der Hochdosisgruppe zentrolobuläre Vakuolen in vereinzelter Form, vom Grad 1 bzw. vom Grad 2 (Tabelle 33).

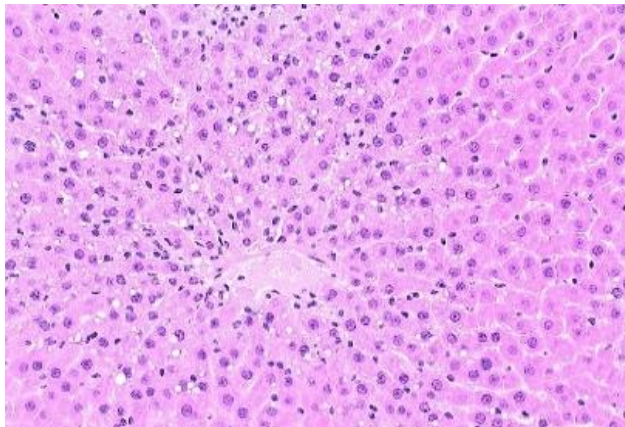
Tabelle 33: Histologische Untersuchung der Leber

NVP	Schweregrade zentrolobulärer Vakuolen					
	Dosisgruppe	keine	vereinzelt	Grad 1	Grad 2	Grad 3
m	0 ppm	2/3	1/3*	-	-	-
	5 ppm	1/3	1/3 (1/3*)	-	-	-
	10 ppm	-	1/3	2/3	-	-
	20 ppm	-	-	1/6	1/6	4/6
w	0 ppm	2/3	-	1/3*	-	-
	20 ppm	-	1/3	1/3	1/3	-

* diffuse Vakuolen, m: männlich, w: weiblich

Die zentrolobulären Vakuolen könnten auf eingelagerte Lipide hindeuten, was mittels ORO-Färbung, einer Lipid-Färbemethode, untersucht wurde. Die beobachteten zentrolobulären Vakuolen ließen sich lediglich in einem Tier der männlichen und der weiblichen Hochdosisgruppe mittels ORO-Färbung als eingelagerte Lipide identifizieren (Abbildung 10b). Somit kann keine abschließende Aussage zur Identität des Inhalts der Vakuolen getroffen werden. Allerdings wurden die zentrolobulär auftretenden Vakuolen als NVP-induziert bewertet, was durch den dosisabhängigen Anstieg des Schweregrads sowie der Häufigkeit in den männlichen Tieren gezeigt wurde.

a)



b)

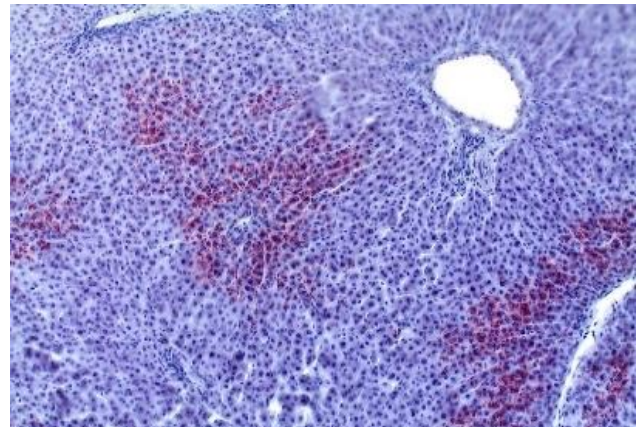


Abbildung 10: Zentrolobuläre Vakuolenbildung (a: H/E-Färbung, b: ORO-Färbung)

4.1.3 Gentoxizität

4.1.3.1 Mikronukleus Test

Der Mikronukleus/Mikrokern Test (MNT), ein Testsystem zur Detektion von strukturellen Chromosomenschädigungen und numerischen Chromosomenveränderungen, ist ein weit verbreiteter, regulatorisch anerkannter *in vivo* Gentoxizitätstest in Nagern (OECD 474). Dieser wurde in reifenden Erythrozyten durchgeführt, welche aus den Femora der zuvor über 5 Tage inhalativ gegen NVP exponierten Ratten, oder der mit Ethylmethansulfonat (EMS, 200 mg/kg KG, *p.o.*) behandelten Positivkontrollgruppe isoliert wurden. Analysiert wurden 2000 polychromatischen Erythrozyten (PCE) pro Tier und die darin auftretenden Mikrokerne (MN), welche auf 1000 PCE (‰) normiert wurden.

Die Anzahl der Mikrokerne in den PCE der Vehikelkontrolle betrug $1,8 \pm 1,1\%$ (♂) und $2,3 \pm 0,6\%$ (♀), was gemittelt $2,1 \pm 0,9\%$ für beide Geschlechter ergab. Diese Werte liegen innerhalb der historischen Kontrolldaten des Labors Gentoxikologie der BASF SE (n=28 Gruppen mit 5 - 6 Tieren/Gruppe) von 0,7 - 3,6‰ und wurden somit als valide bewertet. Die historischen Kontrolldaten (n=28) wurden vorwiegend in Studien mit oraler Applikation erzeugt (n=22), aber auch Daten aus Inhalationsstudien wurden berücksichtigt (n=6). Die Mikrokernanzahl, welche für die Vehikelkontrolle nach Inhalationsexposition in der NVP-Inhalationsstudie beobachtet wurde, lag im selben Bereich wie die vorwiegend aus oralen Studien erhaltenen Vehikelkontrolldaten der historischen Kontrollen. Somit konnte anhand der Daten der Vehikelkontrollgruppe der NVP-Inhalationsstudie erneut bestätigt werden, dass die Mikrokernanzahl dieser unabhängig des Vehikelzufuhrwegs ist.

Die Mikrokernanzahl der EMS-Positivkontrollgruppe (200 mg/kg KG) war in beiden Geschlechtern erwartungsgemäß biologisch relevant erhöht. Der Anstieg der Mikrokerne war sowohl in den weiblichen Ratten mit $11,8 \pm 2,3\%$ (Range: 9 - 14,5‰) als auch in den männlichen Ratten mit $14,5 \pm 6,0\%$ (Range: 3 - 20‰) statistisch signifikant (Wilcoxon-Test, $p \leq 0,01$). Der Mittelwert der Positivkontrollen beider Geschlechter betrug $13,2 \pm 4,6\%$. Die beobachteten Mikrokernraten lagen im Bereich der historischen Positivkontrolldaten innerhalb des Labors Gentoxikologie der BASF SE (6,1 – 21,9‰, 200 - 300 mg/kg KG EMS, n = 11 Gruppen mit 5 – 6 Tieren/Gruppe). Demnach erfüllt der durchgeführte Mikrokernentest im Knochenmark nach fünftägiger NVP-Inhalation der Ratte die in der OECD Testguideline 474 beschriebenen Validitätskriterien für Vehikel- und Positivkontrolle.

In PCEs der NVP-exponierten männlichen Ratten war ein nicht signifikanter Anstieg der Mikrokernanzahl gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen, welcher jedoch keine Dosisabhängigkeit zeigte. Die Mikrokernanzahl in den PCEs der NVP exponierten weiblichen Ratten war von 5 – 20 ppm dosisabhängig erhöht, allerdings lagen alle Zahlenwerte unter den Mikrokernanzahlen der Vehikelkontrollgruppe (Abbildung 11). Die gemittelte Mikrokernanzahl in PCEs der NVP-exponierten Gruppen beider Geschlechter, wobei lediglich kleine Mikrokerne

4 Ergebnisse

(< ¼ des Zelldurchmessers) beobachtet wurden, lag im Bereich von 1,4 – 2,9‰ (Tabelle 34), was sowohl innerhalb des Bereiches der Vehikelkontrolle der aktuellen Studie als auch dessen der historischen Kontrolle liegt.

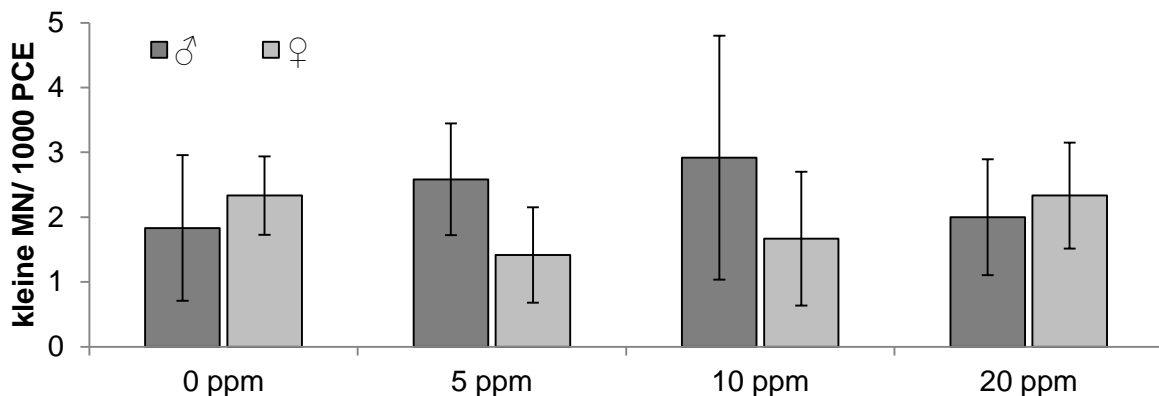


Abbildung 11: MNT im Knochenmark in Abhängigkeit der NVP Dosisgruppe, Werte als MW ±SD, gezählte PCE/Tier: 2000

Die Ergebnisse der MNT Studie belegen eindeutig, dass inhalative NVP-Exposition bei kanzerogenen Konzentrationen, weder in weiblichen noch in männlichen Wistar Ratten zu einer signifikanten Erhöhung der Mikrokernanzahl in PCEs führt. Demnach wurde unter den angewendeten Versuchsbedingungen des MNT im Knochenmark der Ratte kein Hinweis auf gentoxisches (aneugenes oder klastogenes) Potential von NVP verzeichnet.

Tabelle 34: Ergebnisse des MNT

NVP Dosisgruppe	MN/ 1000 PCE		PCE/1000 Erythrozyten MW ± SD	relative Toxizität (PCE/NCE Quotient) [%]
	MW ± SD	Bereich		
0 ppm	m	1,8 ± 1,1	609 ± 29	100
	w	2,3 ± 0,6	636 ± 48	100
5 ppm	m	2,6 ± 0,9	609 ± 40	100
	w	1,4 ± 0,7	629 ± 18	99
10 ppm	m	2,9 ± 1,9	622 ± 33	102
	w	1,7 ± 1,0	612 ± 44	96
20 ppm	m	2,0 ± 0,9	553 ± 57	90
	w	2,3 ± 0,8	615 ± 48	97
EMS	m	14,5 ± 6,0	616 ± 50	101
	w	11,8 ± 12,3	563 ± 29	89

m: männlich; w: weiblich

Bei der Auswertung des MNT wurden nicht nur die PCEs sondern auch die bei der Zählung der 2000 PCEs auftretenden normochromatischen Erythrozyten (NCE) berücksichtigt. Da die Exposition von NVP über 5 aufeinanderfolgende Tage stattfand, können auch substanzinduzierte Mikrokerne in NCEs auftreten, da diese nach mehr als 24 Stunden aus PCEs heranreifen. Innerhalb der NVP-Inhalationsstudie wurden weder in der Vehikelkontrollgruppe, noch in den NVP-Expositionsgruppen Mikrokerne in NCEs beobachtet.

4 Ergebnisse

Auch dieser Wert liegt innerhalb der Daten der historischen Vehikelkontrollen, in denen maximal 1 Mikrokern pro 10.000 NCEs ermittelt wurde.

Ein weiterer wichtiger toxikologischer Parameter ist der PCE-Anteil an der Gesamtzahl der gezählten Erythrozyten (PCE und NCE). Dieser Parameter gibt einen Hinweis darauf, ob die Testsubstanz toxisch auf die Erythropoese wirkt und kann somit beweisen, dass die Testsubstanz und/oder ihre Metabolite das Knochenmark erreicht hat. Bei den NVP-exponierten Tieren zeigte die männliche Hochdosisgruppe (20 ppm) eine relative Toxizität von 90%, d.h. die Anzahl der PCE dieser Gruppe war relativ zur Vehikelkontrolle um 10% erniedrigt (Tabelle 34). Diese leichte Abnahme der PCEs kann als Hinweis gedeutet werden, dass NVP und/oder dessen Metabolite das Knochenmark erreicht haben, ist aber nicht ausreichend um dies zu postulieren.

4.1.3.2 Comet Assay

Mit Hilfe des alkalischen Comet Assays lassen sich DNA-Strangbrüche aber auch alkalilabile Stellen auf dem Niveau einer einzelnen Zelle analysieren. Er ist für die Verwendung in verschiedenen Geweben beschrieben und seit September 2014 regulatorisch durch die OECD Guideline 489 eingebunden. Innerhalb des in dieser Arbeit beschriebenen Projekts wurde der Comet Assay im Hauptzielorgan der NVP-vermittelten Kanzerogenese, der Leber, und in der Lunge, als Organ des Erstkontakts nach Inhalationsexposition, durchgeführt. Die Durchführung erfolgte mit und ohne das DNA-Reparaturenzym FPG. Als Parameter der DNA-Schädigung wurde die *Tail Intensity* (TI) gewählt, da die Angabe des prozentualen DNA-Anteils im Schweif aufgrund der Geräte- und Softwareunabhängigkeit in der Literatur [Burlinson *et al.*, 2007] und von der OECD Guideline 489 als Kennzahl favorisiert wird.

Im Comet Assay, wie auch bei anderen Gentoxizitätstests, ist darauf zu achten, dass die getesteten Dosen nicht zytotoxisch wirken, da Zytotoxizität die Interpretation des Testresultats beeinflussen könnte. Auch eine schonende Zellisolierung ohne Erzeugung von zusätzlichen zellulären Schädigungen ist von besonderer Relevanz. Aus diesem Grund wurde parallel zur Durchführung des Comet Assays die Viabilität der eingesetzten Zellen mittels Trypanblau-Assay bestimmt.

Die ermittelten Viabilitäten der Vehikelkontrollgruppen lagen bei $94 \pm 2\%$ und $95 \pm 3\%$ für Leberzellen und von $98 \pm 1\%$ und $99 \pm 1\%$ für Lungenzellen in männlichen und weiblichen Tieren. Die Viabilitätswerte der Leber- und Lungenzellen der gegen NVP exponierten Ratten aller Dosisgruppen waren im Mittel gleich oder größer verglichen mit der korrespondierenden Vehikelkontrollgruppe. Die Viabilitätswerte der Einzeltiere der Kontrollgruppe lagen im Bereich von 91 - 100% für Leber- und zwischen 97 - 100% für Lungenzellen.

4 Ergebnisse

Die Einzeltierwerte für Leber- und Lungenzellen der NVP-exponierten Ratten lagen ebenfalls in diesen Bereichen: 90 - 99% für Leber- und 93 - 100% für Lungenzellen (Tabelle 36, Tabelle 37, Tabelle 38, Tabelle 39).

Ein geschlechtsspezifischer Effekt auf die Viabilität der Leber- und Lungenzellen nach NVP-Exposition war nicht zu beobachten. Demnach ist weder auf das Zielorgan der Kanzerogenese, die Leber, noch auf das Organ des Erstkontaktes nach Inhalationsexposition, die Lunge, ein NVP-vermittelter zytotoxischer Effekt zu erkennen. Auch die Zellisolierung hatte keinen relevanten Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Des Weiteren wurde auch in den Positivkontrollgruppen bei beiden Geschlechtern sowohl in Leber- als auch in Lungengewebe keine relevante Abnahme der Zellviabilität ermittelt (Leber: 91 – 99%; Lunge: 97 – 100%).

Hedgehog-Zellen (Abbildung 12d), welche im Comet Assay als Kometen mit kleinem oder nicht existentem Kopf und langem diffusem Schweif zu erkennen sind, werden in der Literatur als möglicher Hinweis auf Zytotoxizität, extreme Genotoxizität oder einsetzende DNA-Reparatur diskutiert und sollen gemäß OECD TG 489 getrennt von der Ermittlung der TI erfasst werden. In der vorliegenden Studie wurden alle beim Zählvorgang ersichtlichen *Hedgehogs* erfasst.

Die Anzahl der erfassten *Hedgehogs* in den NVP-Behandlungsgruppen zeigte sich weder in der Leber noch in der Lunge mit und ohne FPG-Modifikation im Vergleich zur Vehikelkontrolle relevant erhöht. Die erfassten *Hedgehogs* der Vehikel- und NVP-Expositionsgruppen beider Geschlechter lagen in der Leber gemittelt zwischen 1% und 5% und in der Lunge zwischen 1% und 7% der im Gesamten erfassten Zellen, wobei zwischen der Durchführung mit FPG-Modifikation und dem konventionellen Comet Assay kein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten war.

Lediglich in der Positivkontrolle des konventionell durchgeführten Comet Assays wurden Anstiege der dokumentierten Hedgehog-Zellen verzeichnet. Die pro 100 gezählter Zellen erfassten *Hedgehogs*, gemittelt für beide Geschlechter, wurden in der Leber etwa um den Faktor 2, von 3,5 auf 7,5 *Hedgehogs* pro 100 Zellen, erhöht. In der Lunge wurde die Anzahl der *Hedgehogs* von gemittelten 4,5 *Hedgehogs* pro 100 Zellen, ebenfalls etwa um den Faktor 2, auf 9 *Hedgehogs* pro 100 gezählter Zellen angehoben (Tabelle 36, Tabelle 37, Tabelle 38, Tabelle 39). Ein Vergleich der Hedgehog-Anzahl der Positivkontrolle ist nach FPG-Behandlung nicht möglich, da ausschließlich *Hedgehogs* verzeichnet wurden. Ein Einfluss der NVP-Behandlung auf das Vorkommen von *Hedgehogs* wurde demnach weder in der Leber noch in der Lunge verzeichnet, sodass kein Hinweis auf Zytotoxizität oder erhebliche DNA-Schädigung durch NVP vorliegt.

4 Ergebnisse

Als Positivkontrolle wurde die genotoxische Substanz Ethylmethansulfonat (EMS) in einer Dosierung von 200 mg/kg KG eingesetzt. Die TI der EMS-Positivkontrollen der konventionellen Durchführung waren in beiden Geschlechtern sowohl in der Leber (Faktor 27 und 26 für männliche bzw. weibliche Tiere) als auch in der Lunge (Faktor 17 und 21 für männliche bzw. weibliche Tiere) statistisch signifikant gegenüber der zugehörigen Vehikelkontrolle erhöht. Die TI der männlichen Ratten lag hierbei bei 18,6% in der Leber und bei 19,3% in der Lunge; die TI der weiblichen Ratten lag bei 16,3% und 16,7% für Leber bzw. Lunge (Tabelle 35). Aufgrund der statistisch signifikanten Erhöhung der TI ($p \leq 0,01$) der EMS-Positivkontrollgruppe in Leber und Lunge, wurde diese als valide bewertet.

In den EMS-Kontrollen mit FPG-Behandlung war eine quantitative Aussage zur TI nicht möglich, da aufgrund der starken DNA-Schädigung ausschließlich *Hedgehogs* (TI > 70%) vorlagen. Eine qualitative Aussage konnte dennoch getroffen werden: Die EMS-Kontrollen zeigten nach FPG-Behandlung eine erhöhte DNA-Schädigung und damit eine Steigerung des DNA-strangbrechenden Effekts (Abbildung 12d). Aufgrund des qualitativen Nachweises der Erhöhung der TI nach FPG-Behandlung der EMS-Kontrolle per Bildanalyse, wurde auch diese als valide eingestuft (Abbildung 12, Tabelle 35).

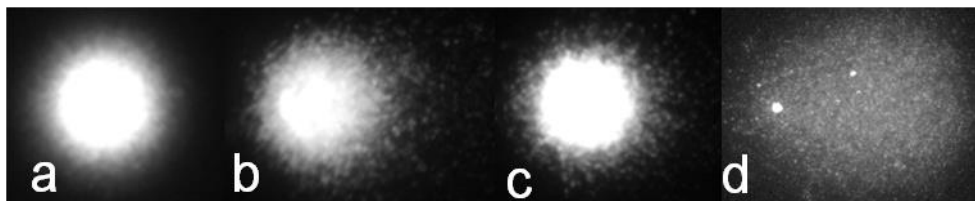


Abbildung 12: Zellen im Comet Assay (Vehikelkontrolle: a, c; EMS: b, d; +FPG: c, d)

Tabelle 35: TI der Kontrolltiere im Comet-Assay (** $p \leq 0,01$)

Organ		TI [%] ohne FPG		TI [%] mit FPG	
		0 ppm	EMS	0 ppm	EMS
Leber	m	0,7 ± 0,3	18,6 ± 6,0 **	6,2 ± 2,3	> 70%
	w	0,6 ± 0,3	16,3 ± 4,5 **	7,5 ± 1,1	> 70%
Lunge	m	1,2 ± 0,5	19,3 ± 5,1 **	9,4 ± 2,0	> 70%
	w	0,9 ± 0,3	16,7 ± 2,8 **	8,7 ± 1,8	> 70%

m: männlich, w: weiblich

Nach konventioneller Durchführung des Comet Assays zeigten die analysierten Zellen der Leber und Lunge in beiden Geschlechtern eine geringe DNA-Basalschädigung mit einer TI < 1% in der Leber und < 1,2% in der Lunge (Tabelle 35). Die TI der Leberzellen der gegen NVP exponierten Ratten beider Geschlechter lag zwischen 0,7% und 1,0%, wobei keine dosisabhängige Veränderung der TI zu verzeichnen war (Abbildung 13, Tabelle 36, Tabelle 37). Demnach wurde in der Leber in beiden Geschlechtern kein Hinweis auf eine Erhöhung von DNA-Strangbrüchen nach Inhalationsexposition gegen NVP bei hepatokanzerogenen Expositionskonzentrationen gefunden. Die Untersuchungen der TI der Lunge ergaben ein ähnliches Bild: Die ermittelten TI beider Geschlechter lagen zwischen 0,6% und 1,8% (Tabelle

4 Ergebnisse

38, Tabelle 39) und ein dosisabhängiger Anstieg der TI im Vergleich zur Vehikelkontrollgruppe wurde nicht beobachtet. Demnach war auch in Lungenzellen kein erhöhter DNA-strangbrechender Effekt in beiden Geschlechtern nach NVP-Exposition ersichtlich (Abbildung 13).

Eine unerwartete Beobachtung ist die statistisch signifikante Erniedrigung der TI ($p \leq 0,05$) der DNA männlicher Lungenzellen der 20 ppm Gruppe auf $0,6 \pm 0,3\%$ im Vergleich zur Vehikelkontrolle von $1,2 \pm 0,5\%$. Da das verwendete Protokoll des Comet Assays nur zur Detektion einer Erhöhung des strangbrechenden Potentials dient, wird die ermittelte TI-Erniedrigung als statistisch signifikant, jedoch nicht biologisch relevant eingestuft, was in Kapitel 5.1.2.2 näher diskutiert wird.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die fünftägige Inhalationsexposition von Wistar Ratten beider Geschlechter gegen hepatokanzerogene NVP-Konzentrationen von 5, 10 und 20 ppm weder in Lungen- noch in Leberzellen zu einem Anstieg der TI und damit einem Anstieg von DNA-Strangbrüchen führte.

Demnach wurde der Comet Assay nach konventioneller Durchführung in Leber- und Lungenzellen als negativ bewertet und eine DNA-strangbrechende Wirkung als Mechanismus der Hepatokanzerogenese ausgeschlossen.

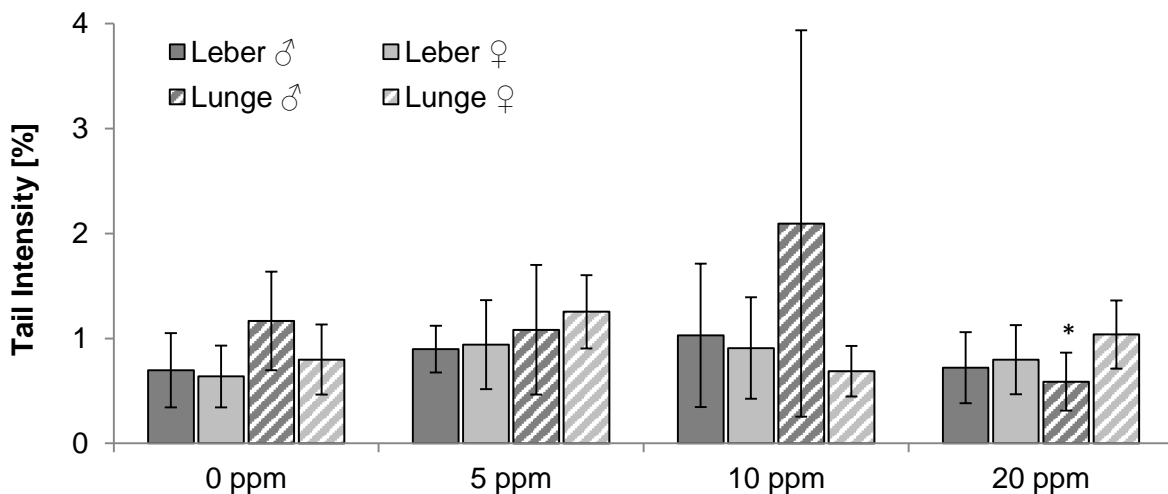


Abbildung 13: Comet Assay in Leber und Lunge in Abhängigkeit der NVP Dosisgruppe, Werte als MW \pm SD (n=6), ausgewertete Zellen/Tier: 100, * $p \leq 0,05$

4 Ergebnisse

Tabelle 36: Resultate des konventionellen Comet Assays in der Leber der männlichen Wistar Ratten (Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung)

NVP Dosis- gruppe	Tier- Nr.	Viabilität [%]	Viabilität [%] (MW \pm SD)	Hedgehogs/ 100 Zellen (MW \pm SD)	TI [%] \diamond	TI [%] (MW \pm SD)
0 ppm	1	91	94 \pm 2	3 \pm 2	0,3	0,7 \pm 0,34
	2	96			1,1	
	3	96			0,6	
	4	94			1,1	
	5	96			0,7	
	6	93			0,5	
5 ppm	7	90	95 \pm 3	3 \pm 2	1,1	0,9 \pm 0,22
	8	92			1,2	
	9	96			0,9	
	10	96			0,6	
	11	98			0,7	
	12	96			0,9	
10 ppm	13	96	96 \pm 1	3 \pm 1	0,7	1,0 \pm 0,68
	14	97			2,4	
	15	96			0,7	
	16	98			1,0	
	17	96			0,6	
	18	94			0,7	
20 ppm	19	98	97 \pm 1	3 \pm 1	1,2	0,7 \pm 0,34
	20	95			0,8	
	21	99			0,5	
	22	95			0,5	
	23	98			1,0	
	24	96			0,3	
EMS- Positiv- kontrolle	49	91	95 \pm 3	8 \pm 2	18,9	18,6 \pm 5,97
	50	94			17,5	
	51	95			29,0	
	52	96			10,6	
	53	99			19,3	
	54	94			16,4	

\diamond Mittelwert aus den Medianen von 2 Objektträgern mit jeweils 50 ausgewerteten Zellen

4 Ergebnisse

Tabelle 37: Resultate des konventionellen Comet Assays in der Leber der weiblichen Wistar Ratten (Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung)

NVP	Tier-	Viabilität	Viabilität	Hedgehogs/	TI [%] \diamond	TI [%]
Dosis-	Nr.	[%]	[%]	100 Zellen		(MW \pm SD)
gruppe			(MW \pm SD)	(MW \pm SD)		
0 ppm	25	91	95 \pm 3	4 \pm 2	1,0	0,6 \pm 0,30
	26	100			0,7	
	27	98			0,4	
	28	96			0,9	
	29	93			0,6	
	30	94			0,2	
5 ppm	31	98	97 \pm 1	3 \pm 3	0,6	1,0 \pm 0,40
	32	98			0,9	
	33	96			1,1	
	34	99			1,7	
	35	97			0,8	
	36	95			0,8	
10 ppm	37	96	96 \pm 1	4 \pm 4	1,3	0,9 \pm 0,48
	38	99			0,6	
	39	95			0,5	
	40	97			1,4	
	41	94			1,3	
	42	96			0,3	
20 ppm	43	96	97 \pm 1	3 \pm 2	0,7	0,7 \pm 0,34
	44	97			1,3	
	45	97			0,5	
	46	98			0,5	
	47	96			1,0	
	48	95			0,4	
EMS- Positiv- kontrolle	55	99	96 \pm 2	7 \pm 4	9,1	16,3 \pm 4,49
	56	95			13,6	
	57	96			17,5	
	58	95			22,4	
	59	97			17,8	
	60	97			17,3	

\diamond Mittelwert aus den Medianen von 2 Objektträgern mit jeweils 50 ausgewerteten Zellen

4 Ergebnisse

Tabelle 38: Resultate des konventionellen Comet Assays in der Lunge der männlichen Wistar Ratten (Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung)

NVP Dosis- gruppe	Tier- Nr.	Viabilität [%]	Viabilität [%] (MW \pm SD)	Hedgehogs/ 100 Zellen (MW \pm SD)	TI [%] \diamond	TI [%] (MW \pm SD)
0 ppm	1	97	98 \pm 1	6 \pm 3	1,2	1,2 \pm 0,47
	2	99			1,0	
	3	99			2,1	
	4	99			0,8	
	5	98			1,0	
	6	98			0,9	
5 ppm	7	98	98 \pm 1	4 \pm 3	1,9	1,1 \pm 0,61
	8	97			1,8	
	9	99			0,6	
	10	99			0,7	
	11	97			0,7	
	12	100			0,8	
10 ppm	13	99	98 \pm 2	7 \pm 5	5,7	1,8 \pm 1,94
	14	99			1,3	
	15	98			1,2	
	16	99			0,7	
	17	93			1,0	
	18	99			1,1	
20 ppm	19	100	99 \pm 1	3 \pm 1	0,4	0,6 \pm 0,28
	20	100			0,9	
	21	98			0,9	
	22	97			0,6	
	23	99			0,3	
	24	100			0,4	
EMS- Positiv- kontrolle	49	99	99 \pm 1	9 \pm 4	20,7	19,3 \pm 5,15
	50	99			14,6	
	51	99			26,5	
	52	100			13,1	
	53	99			23,3	
	54	98			17,8	

\diamond Mittelwert aus den Medianen von 2 Objektträgern mit jeweils 50 ausgewerteten Zellen

4 Ergebnisse

Tabelle 39: Resultate des konventionellen Comet Assays in der Lunge der weiblichen Wistar Ratten (Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung)

NVP Dosis- gruppe	Tier- Nr.	Viabilität [%]	Viabilität [%] (MW \pm SD)	Hedgehogs/ 100 Zellen (MW \pm SD)	TI [%] \diamond	TI [%] (MW \pm SD)
0 ppm	25	99	99 \pm 1	3 \pm 2	0,5	0,9 \pm 0,30
	26	100			1,1	
	27	100			1,2	
	28	100			0,6	
	29	100			1,3	
	30	97			1,0	
5 ppm	31	99	99 \pm 1	2 \pm 1	1,3	1,2 \pm 0,34
	32	99			0,7	
	33	98			1,2	
	34	99			1,5	
	35	98			1,6	
	36	98			1,2	
10 ppm	37	98	98 \pm 1	2 \pm 2	0,4	0,7 \pm 0,24
	38	97			0,9	
	39	99			0,9	
	40	97			0,9	
	41	99			0,5	
	42	100			0,6	
20 ppm	43	98	98 \pm 1	2 \pm 3	0,7	1,0 \pm 0,32
	44	98			0,9	
	45	99			0,7	
	46	96			1,2	
	47	98			1,0	
	48	98			1,6	
EMS- Positiv- kontrolle	55	99	99 \pm 1	9 \pm 5	13,2	16,7 \pm 2,83
	56	99			13,0	
	57	99			18,7	
	58	97			18,8	
	59	100			18,7	
	60	98			17,8	

\diamond Mittelwert aus den Medianen von 2 Objektträgern mit jeweils 50 ausgewerteten Zellen

4 Ergebnisse

Zusätzlich zum konventionellen alkalischen Comet Assay wurde dieser als Modifikation mit der bakteriellen Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) durchgeführt. Diese Variante wird vor allem zur Untersuchung oxidativer DNA-Schäden eingesetzt, aber auch weitere DNA-Läsionen, wie N7-Alkylguaninaddukte können detektiert werden. Die bakterielle Endonuklease schneidet den DNA-Strang an durch Schädigung modifizierten Stellen, wodurch per se die DNA-Strangbruchrate gesteigert wird. Dies bildet sich bereits durch eine basal erhöhte TI der Vehikelkontrollen ab.

Die detektierten DNA-Basalschäden (ausgedrückt als TI) der Vehikelkontrolle wurden durch die FPG-Behandlung in der Leber von $0,7 \pm 0,31\%$ auf $6,9 \pm 1,84\%$ und in der Lunge von $1,0 \pm 0,43\%$ auf $9,0 \pm 1,88\%$ (Mittelwert beider Geschlechter) erhöht, was einem Faktor von 10 für die Leber und 9 für die Lunge entspricht.

Die gemittelten TI der Leberzellen der NVP-Expositionsgruppen beider Geschlechter lagen zwischen 5,0% und 7,9%, wobei weder eine dosisabhängige Veränderung der TI, noch ein statistisch signifikanter Unterschied zur Vehikelkontrollgruppe zu verzeichnen war (Tabelle 40, Tabelle 41, Abbildung 14). Für beide Geschlechter lag demnach kein Hinweis auf einen NVP-induzierten Anstieg von DNA-Strangbrüchen unter FPG-Behandlung nach Inhalationsexposition gegen kanzerogene Konzentrationen in Leberzellen vor.

Auch die Untersuchungen in Lungenzellen zeigten keinen dosisabhängigen Anstieg der TI und somit der DNA-Schädigung. Die ermittelten TI der Lungenzellen beider Geschlechter lagen zwischen 3,9% und 7,9% (Abbildung 14, Tabelle 42, Tabelle 43). Alle TI-Werte der Lungenzellen der weiblichen Tiere lagen geringfügig unterhalb der Kontrollgruppe (etwa 1%). In der männlichen 5 ppm und 20 ppm Expositionsgruppe war die TI in der Lunge statistisch signifikant gegenüber der entsprechenden Vehikelkontrollgruppe reduziert (einseitiger t-Test, $p \leq 0,05$), jedoch war keine Dosisabhängigkeit auszumachen. Weiterhin trat die TI-Erniedrigung nur in einem Geschlecht und nicht im Zielorgan der Kanzerogenese auf und wurde folglich als biologisch nicht relevant beurteilt (siehe auch Kapitel 5.1.2.2).

Abschließend ist der Comet Assay mit FPG-Modifikation nach fünftägiger NVP Inhalationsexposition als negativ zu bewerten, da in keiner Dosisgruppe eine biologisch relevante Erhöhung der DNA-Strangbrüche beobachtet wurde. Demnach ist eine von NVP induzierte oxidative Schädigung der DNA, die Entstehung von apurinischen Stellen, sowie eine N7-Alkylierung des Guanins als negativ zu bewerten, da diese DNA-Läsionen durch FPG detektiert werden.

4 Ergebnisse

NVP wurde in Lungen- und Leberzellen abschließend als nicht genotoxisch im Comet Assay mit und ohne FPG-Modifikation bewertet.

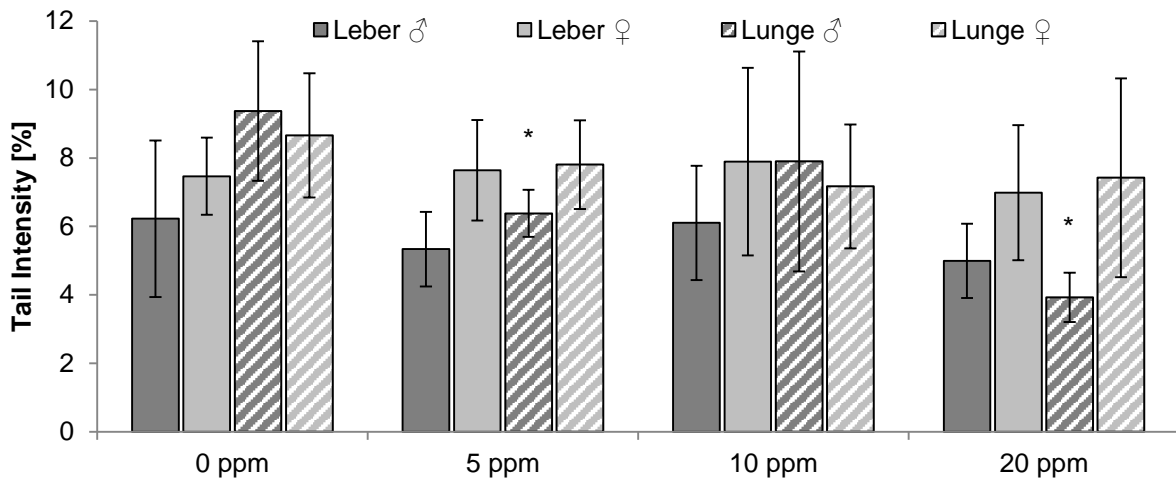


Abbildung 14: Comet Assay (+ FPG) in Leber und Lunge in Abhängigkeit der NVP Dosisgruppe, Werte als MW \pm SD (n=6), ausgewertete Zellen/Tier: 100, *p \leq 0,05

4 Ergebnisse

Tabelle 40: Resultate des Comet Assays mit FPG-Modifikation in der Leber männlicher Wistar Ratten (Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung, TI-Werte der EMS-Positivkontrolle nicht angegeben, da Quantifizierung nicht möglich war)

NVP	Tier-	Viabilität	Viabilität	Hedgehogs/	TI \diamond	TI
Dosis-	Nr.	[%]	[%]	100 Zellen	[%]	[%]
gruppe			(MW \pm SD)	(MW \pm SD)		(MW \pm SD)
0 ppm	1	97	98 \pm 1	1 \pm 1	9,8	6,2 \pm 2,29
	2	99			6,0	
	3	99			5,4	
	4	99			5,4	
	5	98			7,7	
	6	98			3,1	
5 ppm	7	98	98 \pm 1	1 \pm 1	5,7	5,3 \pm 1,09
	8	97			4,3	
	9	99			5,8	
	10	99			5,2	
	11	97			4,0	
	12	100			7,0	
10 ppm	13	99	98 \pm 2	2 \pm 1	8,3	6,1 \pm 1,67
	14	99			7,5	
	15	98			3,7	
	16	99			4,9	
	17	93			6,5	
	18	99			5,8	
20 ppm	19	100	99 \pm 1	2 \pm 1	6,8	5,0 \pm 1,09
	20	100			4,4	
	21	98			5,0	
	22	97			4,7	
	23	99			3,6	
	24	100			5,6	

\diamond Mittelwert aus den Medianen von 2 Objektträgern mit jeweils 50 ausgewerteten Zellen

4 Ergebnisse

Tabelle 41: Resultate des Comet Assays mit FPG-Modifikation in der Leber weiblicher Wistar Ratten (Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung, TI-Werte der EMS-Positivkontrolle nicht angegeben, da Quantifizierung nicht möglich war)

NVP	Tier-	Viabilität	Viabilität	Hedgehogs/	TI \diamond	TI
Dosis-	Nr.	[%]	[%]	100 Zellen	[%]	[%]
gruppe			(MW \pm SD)	(MW \pm SD)		(MW \pm SD)
0 ppm	25	99	99 \pm 1	5 \pm 3	7,4	7,5 \pm 1,13
	26	100			7,8	
	27	100			7,2	
	28	100			8,3	
	29	100			8,7	
	30	97			5,5	
5 ppm	31	99	99 \pm 1	4 \pm 2	7,1	7,6 \pm 1,47
	32	99			6,5	
	33	99			8,4	
	34	99			9,0	
	35	98			9,3	
	36	98			5,6	
10 ppm	37	98	98 \pm 1	3 \pm 2	5,5	7,9 \pm 2,74
	38	97			10,7	
	39	99			5,6	
	40	97			5,3	
	41	99			9,4	
	42	100			11,0	
20 ppm	43	98	98 \pm 1	4 \pm 2	9,2	7,0 \pm 1,97
	44	98			5,2	
	45	99			8,3	
	46	95			6,3	
	47	98			8,6	
	48	98			4,4	

\diamond Mittelwert aus den Medianen von 2 Objektträgern mit jeweils 50 ausgewerteten Zellen

4 Ergebnisse

Tabelle 42: Resultate des Comet Assays mit FPG-Modifikation in der Lunge männlicher Wistar Ratten (Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung, TI-Werte der EMS-Positivkontrolle nicht angegeben, da Quantifizierung nicht möglich war)

NVP	Tier-	Viabilität	Viabilität	Hedgehogs/	TI [♦]	TI
Dosis-	Nr.	[%]	[%]	100 Zellen	[%]	[%]
gruppe			(MW \pm SD)	(MW \pm SD)		(MW \pm SD)
0 ppm	1	97	98 \pm 1	3 \pm 2	9,6	9,4 \pm 2,04
	2	99			12,1	
	3	99			8,5	
	4	99			8,5	
	5	98			11,2	
	6	98			6,4	
5 ppm	7	98	98 \pm 1	2 \pm 2	6,5	6,4 \pm 0,69
	8	97			6,1	
	9	99			7,5	
	10	99			6,1	
	11	97			6,6	
	12	100			5,5	
10 ppm	13	99	98 \pm 2	4 \pm 4	12,0	7,9 \pm 3,21
	14	99			3,6	
	15	98			6,0	
	16	99			7,3	
	17	93			7,2	
	18	99			11,4	
20 ppm	19	100	99 \pm 1	1 \pm 1	3,8	3,9 \pm 0,72
	20	100			3,5	
	21	98			5,2	
	22	97			3,6	
	23	99			3,3	
	24	100			4,2	

[♦] Mittelwert aus den Medianen von 2 Objektträgern mit jeweils 50 ausgewerteten Zellen

4 Ergebnisse

Tabelle 43: Resultate des Comet Assays mit FPG-Modifikation in der Lunge weiblicher Wistar Ratten (Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung, TI-Werte der EMS-Positivkontrolle nicht angegeben, da Quantifizierung nicht möglich war)

NVP	Tier-	Viabilität	Viabilität	Hedgehogs/	TI [♦]	TI
Dosis-	Nr.	[%]	[%]	100 Zellen	[%]	[%]
gruppe			(MW \pm SD)	(MW \pm SD)		(MW \pm SD)
0 ppm	25	99	99 \pm 1	3 \pm 2	8,8	8,7 \pm 1,81
	26	100			10,7	
	27	100			7,9	
	28	100			8,0	
	29	100			10,6	
	30	97			5,9	
5 ppm	31	99	99 \pm 1	3 \pm 2	7,3	7,8 \pm 1,30
	32	99			8,6	
	33	99			7,0	
	34	99			6,8	
	35	98			10,1	
	36	98			7,1	
10 ppm	37	98	98 \pm 1	1 \pm 1	8,7	7,2 \pm 1,81
	38	97			8,1	
	39	99			7,9	
	40	97			8,4	
	41	99			6,0	
	42	100			4,0	
20 ppm	43	98	98 \pm 1	3 \pm 1	6,2	7,4 \pm 2,90
	44	98			8,6	
	45	99			10,2	
	46	95			2,3	
	47	98			7,7	
	48	98			9,7	

[♦] Mittelwert aus den Medianen von 2 Objektträgern mit jeweils 50 ausgewerteten Zellen

4.1.4 Oxidativer Stress

Als oxidativer Stress wird der Zustand einer Zelle oder eines Gewebes bezeichnet, wenn ein Ungleichgewicht zwischen Pro- und Antioxidantien vorliegt, welches oxidative Schäden an Makromolekülen wie DNA, Lipiden und Proteinen begünstigt. Zellen verfügen über Mechanismen, wie das Glutathion-Redox-System, um diesem Ungleichgewicht entgegenzuwirken. Da oxidativer Stress einen möglichen, bisher nicht untersuchten Wirkmechanismus der NVP-vermittelten Kanzerogenese darstellt, wurde der Gehalt des als Antioxidans wirkenden Tripeptids Glutathion in reduzierter (GSH) und oxidiertes (GSSG) Form im Leberhomogenat der männlichen Tiere der NVP-Inhalationsstudie bestimmt. Hierzu wurde der GSH-Recycling-Assay etabliert, mit welchem sowohl das Gesamtglutathion (tGSH, die Summe aus GSH und GSSG) wie auch GSSG bestimmt werden. Zudem wurde ein Test zur Bestimmung der nicht proteingebundenen Sulfhydrylgruppen (NPSH) eingesetzt, welche in den deproteinierten Leberhomogenaten hauptsächlich GSH darstellen.

Die NVP-Inhalationsstudie wurde vorrangig zur Untersuchung eines gentoxischen Wirkmechanismus geplant; daher wurden keine *in vivo* Positivkontrollen zur Adressierung oxidativen Stresses mitgeführt.

Zum Nachweis einer geeigneten Sensitivität des Testsystems zur Quantifizierung der in den Leberhomogenaten enthaltenen tGSH-, GSH- und GSSG-Gehalte, wurden zunächst die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) der Analysemethoden ermittelt (Tabelle 44). Die angegebene LOQ, welche den zweifachen Wert der LOD darstellt, bezieht sich jeweils auf die gerade noch zu quantifizierende Konzentration im Well. Für die oxidierte Form des Glutathions (GSSG) wurde eine LOQ von 144 nmol/L bestimmt, was unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors im Assay (20) und des eingesetzten Lebergewichts (0,111 g/mL) einer Konzentration von etwa 26 nmol/g Leber entspricht. Die Bestimmung des tGSH kann bis zu einer Konzentration von 98 nM im Well erfolgen, was unter Berücksichtigung der in diesem Versuch angewendeten Verdünnungsfaktoren der Proben (Assay: 40, Probenverdünnung: 4) und des Gewichts des eingesetzten Lebergewebes einen Nachweis von 0,14 µmol GSH/g Leber ermöglicht.

Die LOQ des NPSH-Assays von 2,1 µM (im Well) oder etwa 0,23 µmol GSH/g Leber lag etwas oberhalb der LOQ des GSH-Recycling-Assays. Daher ist der NPSH-Assay verglichen mit dem GSH-Recycling-Assay als geringfügig weniger sensitiv einzustufen. Allerdings lagen die LOQ beider GSH-Bestimmungsmethoden im dreistelligen Nanomol-Bereich und demnach in derselben Größenordnung und waren zur Quantifizierung des GSH-Gehalts der Leberhomogenate geeignet.

Um neben der Sensitivität der Testsysteme auch deren Präzision zu prüfen, wurden für jedes Testsystem Qualitätskontrolllösungen gemessen. Hierbei wurden für den NPSH-Assay und zur tGSH-Bestimmung Lösungen einer bekannten GSH-Konzentration eingesetzt.

4 Ergebnisse

Um im GSH-Recycling-Assay zu gewährleisten, dass vorhandenes GSH und GSSG die Bestimmung des jeweiligen Gehaltes nicht beeinflussen, wurde eine Kontrolllösung analysiert, die bei einem tGSH-Gehalt von 200 μM 10% GSSG enthielt, da in etwa dieses Verhältnis in den Leberproben erwartet wurde.

Die gemittelte Wiederfindung der eingesetzten reinen GSH-Kontrolllösung lag bei 104% im Glutathion-Recycling-Assay und bei rund 98% im NPSH-Assay. Für die im Glutathion-Recycling-Assay eingesetzten Kontrolllösungen, welche GSH und GSSG enthielten, wurden gemittelte Wiederfindungen von 99% für tGSH und 106% für GSSG berechnet (Tabelle 44). Somit wurde gezeigt, dass GSSG- und GSH-Gehalt mit Hilfe des GSH-Recycling-Assays präzise bestimmt werden können, wenn diese gemeinsam in einer Probe vorliegen.

Tabelle 44: Qualitätsstandards der GSH- und GSSG-Gehaltsbestimmung sowie LOD und LOQ

Testsystem		LOD [nM]	LOQ [nM]	C_{nominal} [μM]	$C_{\text{berechnet}}$ [μM]	Wiederfindung [%]
Glutathion Recycling Assay	tGSH	49 (n=12)	98	640	659 – 680 (n=3)	103 – 106 (n=3)
	GSSG	72 (n=12)	144	20	18,9 – 24,1 (n=8)	94 – 120 (n=8)
NPSH	GSH	1041 (n=27)	2082	480	470,0 \pm 28,3 (n=3)	91 – 102 (n=3)

c: Konzentration

Zur tGSH-, GSH-, GSSG- und NPSH-Bestimmung wurden deproteinierte Leberhomogenate der männlichen Ratten der NVP-Inhalationsstudie eingesetzt. Die ermittelten Gehalte des reduzierten und oxidierten Glutathions lagen für alle eingesetzten Proben oberhalb der Bestimmungsgrenzen der zugehörigen Testsysteme (Tabelle 45). Die Glutathion-Gehalte der Leberproben sind somit, auch unter Berücksichtigung der im vorigen Abschnitt beschriebenen Kontrolllösungen, valide.

Zur Untermauerung der Validität der angewendeten Testmethoden und bestimmten Glutathiongehalte kann weiterhin angeführt werden, dass diese mit Hilfe zweier voneinander unabhängiger Methoden bestimmt wurden. Während der NPSH-Assay nicht proteingebundene Sulfhydrylgruppen nach einer rein chemischen Reaktion bestimmt, wird der Glutathion-Gehalt im Glutathion-Recycling-Assay spezifisch durch eine Glutathion Reduktase katalysierte Reaktion analysiert. Der ermittelte NPSH-Gehalt, welcher in deproteinierten Proben fast ausschließlich GSH darstellt, sowie der indirekt bestimmte GSH-Gehalt der Leberhomogenate sind für alle eingesetzten Leberhomogenate nahezu gleich. Auch der Trend der GSH-Gehalte der Lebern einzelner Tiere konnte durch beide Testsysteme fast identisch abgebildet werden, wie z.B die Werte der Tiere 7 bis 12 zeigen (Tabelle 45). Die Differenzen der gemittelten NPSH- und GSH-Gehalte innerhalb aller Dosisgruppen liegen zwischen 0,04

4 Ergebnisse

und 0,40 $\mu\text{mol/g}$ Leber, was etwa 1% bzw. 10% des bestimmten GSH-Gehalts der Dosisgruppen entspricht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die ermittelten Glutathiongehalte in Leberhomogenaten reproduzierbar sind, da zwei unterschiedliche Bestimmungsmethoden nahezu gleiche Ergebnisse lieferten.

Die GSH-Gehalte der Leberhomogenate der Vehikelkontrollgruppe lagen zwischen 3,76 und 5,10 $\mu\text{mol/g}$ Leber bzw. zwischen 3,32 und 5,01 $\mu\text{mol/g}$ Leber bei Bestimmung mittels NPSH- bzw. GSH-Recycling-Assay. Die Gehalte der NVP-exponierten Tiere lagen zwischen 3,72 und 5,23 $\mu\text{mol/g}$ Leber (NPSH-Bestimmung) und zwischen 3,06 und 5,48 $\mu\text{mol/g}$ Leber (GSH-Recycling-Assay). Somit waren alle GSH-Einzeltierwerte der NVP-exponierten Tiere innerhalb bzw. nahe dem Bereich der Vehikelkontrolle (Tabelle 45). Die mittels GSH-Recycling-Assay bestimmten GSH-Gehalte zeigten einen nicht signifikanten, dosisabhängigen, abnehmenden Trend (Abbildung 15a). Die Abnahme des GSH-Gehalts zwischen der Vehikelkontrollgruppe und der Testgruppe 20 ppm lag bei 0,38 $\mu\text{mol/g}$ Leber was einer Reduzierung um etwa 9% entspricht. Die Standardabweichung innerhalb der 4 Testgruppen lag mit 0,61 bis 0,70 $\mu\text{mol/g}$ Leber in einem ähnlichen Bereich. Die GSH-Abnahme weist weder statistische Signifikanz auf, noch wurde sie durch die Bestimmung der GSH-Gehalte nach NPSH-Methode bestätigt, daher wurde diese Beobachtung als biologisch nicht relevant eingestuft.

Ein signifikanter Einfluss auf den GSH-Gehalt der Leberhomogenate männlicher NVP exponierter Ratten war daher, ungeachtet der Bestimmungsmethode, nicht zu erkennen.

Die GSSG-Konzentrationen der Vehikelkontrollgruppe lagen zwischen 108 und 163 nmol/g Leber, was gemittelt einem Wert von 137 ± 21 nmol/g Leber entspricht. Für Leberhomogenate der NVP exponierten Gruppen ergaben sich gemittelte GSSG-Gehalte von 116 ± 32 nmol/g Leber (5 ppm), 135 ± 12 nmol/g Leber (10 ppm) und 136 ± 22 nmol/g Leber (20 ppm). Somit war kein Anstieg des gemittelten GSSG-Gehalts in Leberhomogenaten der NVP exponierten männlichen Ratten gegenüber der Vehikelkontrolle zu verzeichnen.

Unter Berücksichtigung der ermittelten GSH-Gehalte nach NPSH- und GSH-Recycling-Methode, sowie der GSSG-Konzentrationen in den deproteinierten Leberhomogenaten der männlichen Tiere der Inhalationsstudie, ergab sich kein Hinweis auf NVP-vermittelten oxidativen Stress in der Leber.

4 Ergebnisse

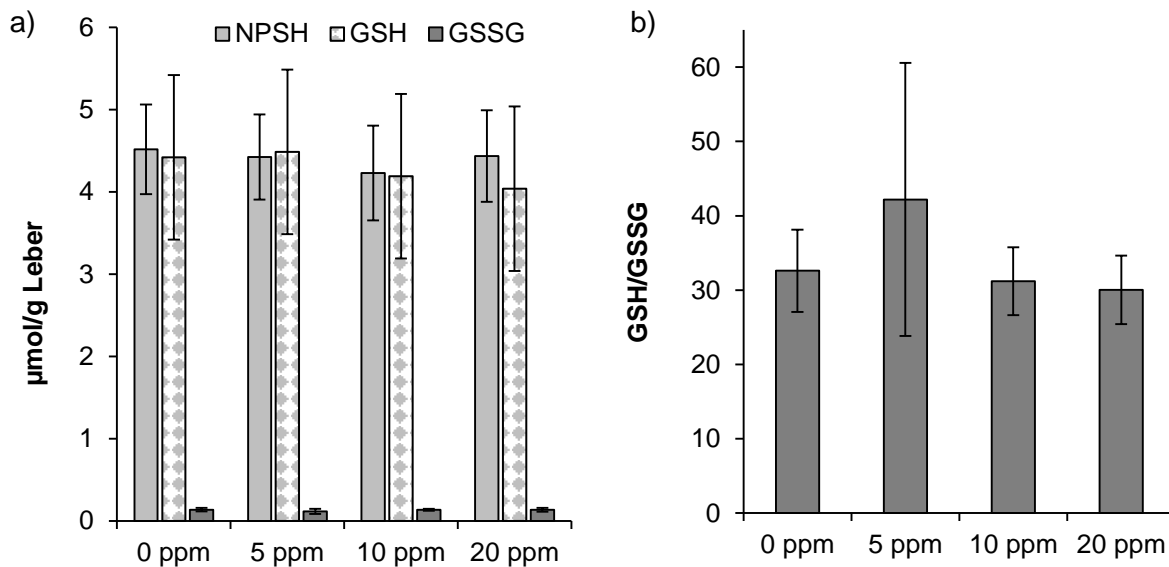


Abbildung 15: a) NPSH-, GSH-, GSSG-Level männlicher Rattenlebern in Abhängigkeit der NVP Dosisgruppe, Werte als MW ± SD (n=6) b) GSH/GSSG-Quotient männlicher Rattenlebern in Abhängigkeit der NVP Dosisgruppe, Werte als MW ± SD (n=6)

Weiterhin wurden der GSH-Status, welcher als Anteil des reduzierten Glutathions am Gesamtglutathiongehalt (tGSH) definiert ist, sowie der GSH/GSSG-Quotient (*GSH/GSSG-Ratio*), welcher sich aus dem Quotienten des reduzierten und oxidierten Glutathions berechnet, als Parameter oxidativen Stresses aus den Ergebnissen des Glutathion-Recycling-Assays bestimmt. Innerhalb der NVP-Inhalationsstudie wurden für die Vehikelkontrollgruppe, sowie die gegen 5, 10 und 20 ppm NVP exponierten Gruppen GSH-Status-Werte von jeweils $94,1\% \pm 0,9\%$, $95,0\% \pm 1,4\%$, $93,9\% \pm 0,8\%$ und $93,6\% \pm 0,9\%$ berechnet. Somit war keine dosisabhängige Abnahme des GSH-Status nach NVP-Exposition zu beobachten. Ein Hinweis auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen oxidiertem und reduziertem Glutathion hin zur oxidierten Form war demnach anhand des GSH-Status nicht zu erkennen.

GSH/GSSG-Quotienten von $32,6 \pm 5,5$, $42,2 \pm 18,4$, $31,2 \pm 4,6$ und $30,0 \pm 4,6$ wurden für Vehikelkontrollgruppe, 5, 10 und 20 ppm NVP-Expositionsgruppe berechnet (Abbildung 15b). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den ermittelten GSH/GSSG-Quotienten der Vehikelkontrollgruppe und den gegen NVP exponierten Gruppen oder eine dosisabhängige Veränderung der GSH/GSSG-Quotienten wurden nicht festgestellt. Somit lieferte auch der GSH/GSSG-Quotient keinen Hinweis auf NVP vermittelten oxidativen Stress.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass anhand der analysierten Parameter kein Hinweis auf NVP-induzierten oxidativen Stress vorliegt. Weder der Gesamtglutathiongehalt noch die Gehalte an oxidiertem und reduziertem Glutathion, der Glutathionstatus oder der GSH/GSSG-Quotient in Leberhomogenaten der männlichen NVP-Expositionsgruppen waren gegenüber der Vehikelkontrollgruppe relevant verändert.

4 Ergebnisse

Tabelle 45: Ergebnisse der untersuchten Parameter zum oxidativen Stress (Gruppenwerte als Mittelwert \pm Standardabweichung)

NVP Dosis- gruppe	Tier-Nr.	tGSH [$\mu\text{mol/g}$ Leber]		GSSG [nmol/g Leber]		GSH [$\mu\text{mol/g}$ Leber]		NPSH [$\mu\text{mol/g}$ Leber]	
		Einzeltier	Gruppe	Einzeltier	Gruppe	Einzeltier	Gruppe	Einzeltier	Gruppe
0 ppm	1	4,80	4,69 \pm 0,71	145	137 \pm 21	4,51	4,42 \pm 0,70	4,82	4,52 \pm 0,55
	2	5,32		154		5,01		5,02	
	3	4,47		163		4,15		4,11	
	4	3,54		108		3,32		3,76	
	5	5,54		125		5,29		5,10	
	6	4,50		127		4,25		4,30	
5 ppm	7	4,10	4,72 \pm 0,67	133	116 \pm 32	3,84	4,49 \pm 0,68	3,86	4,42 \pm 0,52
	8	5,63		71		5,48		5,13	
	9	4,92		144		4,63		4,59	
	10	4,16		114		3,93		4,10	
	11	5,33		149		5,04		4,86	
	12	4,17		87		4,00		3,99	
10 ppm	13	3,70	4,46 \pm 0,62	132	135 \pm 12	3,44	4,19 \pm 0,61	3,39	4,23 \pm 0,58
	14	4,21		132		3,95		4,11	
	15	4,94		120		4,70		4,72	
	16	5,28		151		4,98		4,83	
	17	4,70		147		4,41		4,57	
	18	3,91		126		3,65		3,76	
20 ppm	19	4,75	4,20 \pm 0,65	151	136 \pm 22	4,45	4,04 \pm 0,62	4,47	4,44 \pm 0,55
	20	4,83		130		4,57		5,23	
	21	3,27		106		3,06		3,72	
	22	3,77		142		3,48		3,88	
	23	4,55		121		4,31		4,67	
	24	4,68		167		4,35		4,64	

4.1.5 Rezeptorvermittelte Mechanismen

4.1.5.1 AhR, CAR, PXR (AROD Assay)

Die Aktivierung bestimmter zellulärer Rezeptoren, wie des Arylhydrocarbon- (AhR), des konstitutiven Androstan- (CAR) und des Pregnan-X-Rezeptors (PXR), sind Beispiele für nicht-gentoxische Mechanismen einer substanzvermittelten Hepatokanzerogenese. Die Aktivierung dieser Rezeptoren geht mit der Aktivitätserhöhung bestimmter Enzyme einher, deren Expression durch die entsprechenden Rezeptoren reguliert wird. Somit kann die substanzvermittelte Aktivierung eines Rezeptors stellvertretend durch die Enzymaktivitätsmessung nachgewiesen werden. Zur Untersuchung einer potentiellen, durch NVP vermittelten rezeptoraktivierungsbasierten Hepatokanzerogenese, wurden Leber- und Lungenhomogenate (Mikrosomenfraktionen) der männlichen Tiere der NVP-Inhalationsstudie eingesetzt und deren Enzymaktivitäten mittels Alkoxyresorufin-Dealkylase-Assay (AROD) untersucht. Innerhalb des AROD-Assays wurden die Enzymaktivitäten von CYP1A, CYP2B und CYP3A analysiert, deren Induktion eine Aktivierung des AhR, des CAR und des PXR anzeigen. Hierbei wurden die Enzymsubstrate Ethoxyresorufin, Pentoxyresorufin und Benzoxyresorufin eingesetzt, deren Umsetzung vornehmlich durch CYP1A, CYP2B und CYP1A/2B/3A katalysiert werden.

Zunächst wurden die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) des EROD-, PROD- und BROD-Assays für die eingesetzten Enzymsubstrate Ethoxyresorufin, Pentoxyresorufin und Benzoxyresorufin für jede Assayreihe bestimmt, da diese von der Charge des Substrats abhängig sein können (Tabelle 46). Zudem wurde ein weniger als einen Monat gelagertes Leberhomogenat einer männlichen Wistar Ratte zur AROD-Messung eingesetzt, um mögliche Lagereffekte auf die Enzymaktivitäten abzuschätzen. Weiterhin wurden Lebermikrosomen von Aroclor-1254 induzierten Ratten von verschiedener Lagerungsdauer bei -80°C (< 1 Monat und etwa 18 Monate) zum AROD-Assay eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Enzyminduktion mittels Aroclor 1254 auch nach etwa 18 Monaten Lagerung bei -80°C noch eindeutig nachweisbar war (Tabelle 47). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass auch potentielle durch NVP-vermittelte Enzyminduktionen nach einer zwölfmonatigen Lagerung der Lebern und Lungen der NVP-Inhalationsstudie im AROD-Assay detektierbar wären.

4 Ergebnisse

Tabelle 46: LOD und LOQ der verschiedenen CYP-Enzymaktivitäten mittels AROD Assay

Assay	Organ	LOD [pmol/min/mg Protein]	LOQ [pmol/min/mg Protein]
EROD	Leber	1,0	2,0
	Lunge	1,6	3,1
PROD	Leber	3,1	6,2
	Lunge	9,6	19,1
BROD	Leber	0,5	1,1
	Lunge	1,8	3,6

Die 7-Ethylresorufin-O-deethylase (EROD) Aktivität der eingesetzten Leberproben betrug $19,3 \pm 6,2$ pmol/min/mg Protein, $20,5 \pm 3,6$ pmol/min/mg Protein, $22,0 \pm 5,8$ pmol/min/mg Protein und $16,9 \pm 6,4$ pmol/min/mg Protein für die Vehikelkontrollgruppe und die gegen 5, 10 und 20 ppm NVP-exponierten männlichen Ratten (Abbildung 16). Die berechneten Enzymaktivitäten der Leberhomogenate lagen etwa um den Faktor 10 über der LOQ von 2,0 pmol/min/mg Protein und waren somit eindeutig quantifizierbar. Die gemessenen EROD-Aktivitäten der Leberhomogenate der NVP-Inhalationsstudie lagen knapp unterhalb des Bereichs der laborinternen historischen Daten für nicht induzierte Wistar Rattenlebermikrosomen von 22 - 41 pmol/min/mg Protein (n = 7). Die ermittelten Enzymaktivitäten der Lebermikrosome der NVP-Studie lagen etwa um den Faktor 2 unter der simultan bestimmten EROD-Aktivität eines nur kurzzeitig gelagerten Leberhomogenats, welches mit $40,6 \pm 0,3$ pmol/min/mg Protein am oberen Rand der historischen Kontrolldaten einzuordnen ist (Tabelle 47).

Die EROD-Aktivitäten der Leberhomogenate der gegen NVP exponierten Tiere zeigten im Vergleich zur Vehikelkontrolle weder eine Enzymaktivitätserhöhung, noch -erniedrigung; auch ein dosisabhängiger Trend der gemessenen Enzymaktivität war nicht zu erkennen (Abbildung 16). Demnach übte die NVP-Exposition keinen Einfluss auf die CYP1A-Aktivität in der Leber der Ratten der NVP-Inhalationsstudie aus.

EROD-Aktivität wurde weder im Lungenhomogenat der Ratten der Vehikelkontrollgruppe noch der gegen NVP exponierten Tiere festgestellt. Alle analysierten Werte lagen unter der LOD von 1,6 pmol/min/mg Protein.

Die 7-Pentylresorufin-O-depentylase (PROD) Aktivität der eingesetzten Leberproben betrug $12,8 \pm 3,0$ pmol/min/mg Protein, $12,4 \pm 1,9$ pmol/min/mg Protein, $16,5 \pm 4,3$ pmol/min/mg Protein und $10,0 \pm 2,8$ pmol/min/mg Protein für die Vehikelkontrollgruppe und für die gegen 5, 10 und 20 ppm NVP exponierten männlichen Ratten (Abbildung 16). Alle berechneten Enzymaktivitäten der Leberhomogenate lagen oberhalb der LOQ von 6,2 pmol/min/mg Protein und waren somit eindeutig quantifizierbar.

4 Ergebnisse

Die gemessenen PROD-Aktivitäten der Leberhomogenate der NVP-Inhalationsstudie lagen im Vergleich zu den laborinternen historischen Kontrolldaten in derselben Größenordnung, allerdings etwas unter deren Bereich von 18 bis 23 pmol/min/mg Protein (Tabelle 47). Gegenüber der simultan bestimmten PROD-Aktivität eines nur kurz gelagerten Leberhomogenats ($21,1 \pm 0,7$ pmol/min/mg Protein) waren die PROD-Aktivitäten der Leberhomogenate der Tiere der NVP-Inhalationsstudie etwa um den Faktor 2 geringer.

Im Vergleich zur Vehikelkontrollgruppe zeigten die PROD-Aktivitäten der Leberhomogenate der gegen NVP exponierten Tiere keine dosisabhängige Veränderung; weder eine Enzyminduktion, noch ein hemmender Effekt auf die PROD-Aktivität war zu erkennen (Abbildung 16). Demnach war weder eine Induktion noch eine Hemmung der CYP2B-Aktivität in der Leber NVP-exponierter Ratten zu beobachten.

Eine Bestimmung der PROD-Aktivitäten in Lungenhomogenaten war für 14 von 24 Tieren nicht möglich, da diese unterhalb der LOD von 9,6 pmol/min/mg Protein lagen. Aus diesem Grund konnte für die 5 und 10 ppm NVP-Expositionsgruppe keine gemittelte PROD-Aktivität berechnet werden. Weiterhin schwankten die Enzymaktivitäten der Individuen unabhängig der Konzentrationsgruppe stark. Die höchste bestimmte PROD-Aktivität in der Vehikelkontrollgruppe lag etwa bei der fünffachen LOD und die niedrigsten gemessenen Werte unterhalb dieser. Abschließend kann festgehalten werden, dass auch in der Lunge kein Hinweis auf eine Induktion der CYP2B-Aktivität, stellvertretend durch Bestimmung der PROD-Aktivität, beobachtet wurde, da in der Lungenmikrosomenfraktion der Hochdosisgruppe im Vergleich zur Vehikelkontrollgruppe keine signifikante Enzymaktivitäts-erhöhung vorlag.

Die 7-Benzyloxyresorufin-O-depentyrase (BROD) Aktivitätsbestimmungen in Leberhomogenaten der Vehikelkontrollgruppe und der gegen NVP-exponierten 5, 10 und 20 ppm Gruppe ergaben Aktivitäten von $48,1 \pm 17,5$ pmol/min/mg Protein, $54,5 \pm 11,3$ pmol/min/mg Protein, $61,7 \pm 16,1$ pmol/min/mg Protein und $42,1 \pm 16,5$ pmol/min/mg Protein (Abbildung 16). Alle berechneten Enzymaktivitäten der Leberhomogenate lagen etwa um den Faktor 40 - 55 oberhalb der bestimmten LOQ von 1,1 pmol/min/mg Protein und waren somit eindeutig quantifizierbar. Die gemessenen BROD-Aktivitäten der Leberhomogenate der NVP-Inhalationsstudie lagen im Vergleich zu den historischen Kontrolldaten in derselben Größenordnung, allerdings, wie bereits für EROD und PROD beschrieben, leicht unter deren Bereich von 63 bis 141 pmol/min/mg Protein (Tabelle 47). Die BROD-Aktivität des simultan mitgeführten, nur kurzzeitig gelagerten, Leberhomogenats lag mit $126,7 \pm 35,3$ pmol/min/mg Protein im Vergleich zu den gelagerten Proben der NVP-Inhalationsstudie etwa um den Faktor 2 - 3 höher.

4 Ergebnisse

Eine dosisabhängige Veränderung der BROD-Aktivitäten in Leberhomogenaten der NVP-exponierten Tiere im Vergleich zur Vehikelkontrollgruppe wurde nicht festgestellt (Abbildung 16). Demnach ist weder eine Induktion noch eine Hemmung der CYP3A-Aktivität in der Leber NVP-exponierter Ratten zu beobachten.

In den Lungenhomogenaten wurden BROD-Aktivitäten von $60,7 \pm 50,3$ pmol/min/mg Protein, $22,9 \pm 11,0$ pmol/min/mg Protein, $25,5 \pm 19,8$ pmol/min/mg Protein und $82,1 \pm 76,8$ pmol/min/mg Protein für die Vehikelkontrollgruppe, die 5, 10 und 20 ppm Gruppe bestimmt, welche somit alle über der LOQ von $3,6$ pmol/min/mg Protein lagen. Ein dosisabhängiger Trend der BROD-Aktivität in Lungenhomogenaten wurde analog zu den Leberhomogenaten nicht festgestellt. Weiterhin waren die interindividuellen Unterschiede der BROD-Aktivität in der Lunge mit Standardabweichungen von bis zu 93% sehr hoch. Diese interindividuellen Unterschiede sind biologischer Variabilität und nicht Schwankungen des Testsystems zuzuordnen, da die maximale Varianz der Leberproben, welche mit der gleichen Methode gemessen wurde bei 39% lag. Abschließend wurde auch in der Lunge kein Hinweis auf eine NVP-vermittelte Induktion oder Hemmung der CYP3A-Aktivität, stellvertretend durch Bestimmung der BROD-Aktivität, beobachtet.

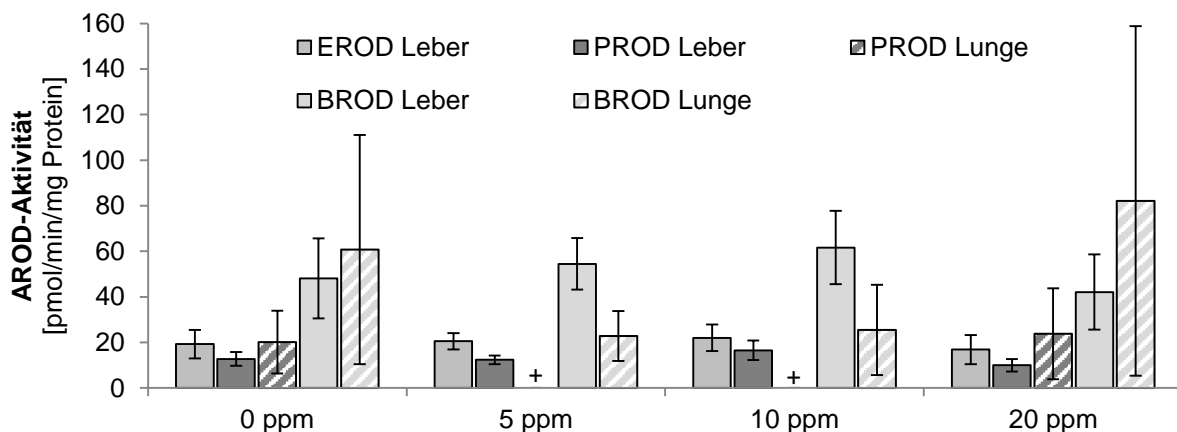


Abbildung 16: CYP-Enzymaktivitäten in Abhängigkeit der NVP Dosisgruppe, Werte als MW \pm SD (n=6), + < LOD

4 Ergebnisse

Tabelle 47: CYP-Aktivitäten der Vehikelkontrollgruppe und historischen Kontrolldaten der Leber

Gruppe	Substrat	Aktivität [pmol/min/mg Protein]
Vehikelkontrolle der NVP-Inhalationsstudie (n=6)	EROD	19 ± 6
	PROD	13 ± 4
	BROD	48 ± 18
historische Kontrolle (n=7)	EROD	22 – 41
	PROD	18 – 29
	BROD	63 – 141
Aroclor 1254-induzierte Kontrolle (Lagerung <1 Monat)	EROD	1070 ± 72
	PROD	195 ± 6
	BROD	892 ± 36
Aroclor 1254-induzierte Kontrolle (Lagerung etwa 18 Monate)	EROD	1155 ± 91
	PROD	126 ± 8
	BROD	772 ± 51

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass EROD-, PROD-, sowie BROD-Aktivitäten in den Leberhomogenaten aller männlichen Tiere der NVP-Inhalationsstudie quantifiziert wurden. Eine Induktion oder Hemmung der Enzymaktivität war in keiner NVP-Dosisgruppe zu verzeichnen. Verglichen mit den historischen Kontrolldaten (n=7) wurden etwa um den Faktor 2 geringere EROD-, PROD- und BROD-Aktivitäten in Leberhomogenaten der Vehikelkontrollgruppe der aktuellen Studie beobachtet (Tabelle 47). Dies ist vermutlich durch die zwölfmonatige Lagerung der Organe zu begründen, da die simultane Messung der Enzymaktivitäten von unter einem Monat gelagertem Leberhomogenat innerhalb der historischen Kontrollen lag.

Lungenmikrosomen zeigten quantifizierbare BROD-Aktivitäten in allen Versuchsgruppen, jedoch keine EROD-Aktivität und nur in etwa einem Drittel der Tiere quantifizierbare PROD-Aktivität.

Weder in der Leber noch in der Lunge der NVP-exponierten Ratten war eine dosisabhängige Veränderung der Enzymaktivitäten für CYP1A, CYP2B und CYP3A zu verzeichnen; somit lieferte die fünftägige Inhalationsstudie keinen Hinweis auf eine NVP-vermittelte Rezeptoraktivierung von AhR, CAR oder PXR.

4 Ergebnisse

Prinzipiell wäre es möglich, dass die Enzymaktivität von CYP1A, CYP2B, CYP3A trotz der Aktivierung des entsprechenden Rezeptors AhR, CAR, PXR nicht messbar induziert wurde. Ein Grund hierfür kann eine Suizid-Inhibition des entsprechenden Enzyms sein, welches durch die Bindung des Substrats inaktiviert wird. Um einen solchen potentiellen Effekt NVPs zu untersuchen, wurde der AROD-Assay mit Aroclor 1254-induzierten Rattenleber-mikrosomen unter simultaner Inkubation von NVP verschiedener Konzentrationen (ein Zehntel, einfache und zehnfache Substratkonzentration) durchgeführt.

Eine Inhibition der Enzymaktivitäten wurde weder für CYP1A, CYP2B, noch CYP3A beobachtet, zu deren Bestimmung der EROD-, PROD- bzw. BROD-Assay eingesetzt wurde. Bei allen Enzymaktivitätsbestimmungen lagen die Enzymaktivitäten über der LOQ (Tabelle 48). Demnach liegen keine Hinweise auf eine Suizid-Inhibition NVPs auf Enzymaktivitäten von CYP1A, CYP2B und CYP3A vor.

Tabelle 48: Untersuchungen zur direkten Inhibition von NVP auf die Enzymaktivitätsbestimmung mittels AROD Assay

Substrat	Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]				
	LOQ (n=9)	NVP-Konzentration [μ M]			
		0	1	10	100
EROD	1,70	821,5 \pm 54,9	859,9 \pm 14,1	827,9 \pm 13,6	858,9 \pm 33,9
PROD	4,84	78,9 \pm 3,2	88,6 \pm 3,3	92,1 \pm 6,0	94,6 \pm 2,3
BROD	6,46	445,1 \pm 9,1	470,1 \pm 29,7	445,1 \pm 20,9	456,5 \pm 30,9

4.1.5.2 PPAR α

4.1.5.2.1 Laurinsäure Assay

Die Aktivierung des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten-Rezeptors (PPAR α) und die damit in der Leber induzierte Peroxisomenproliferation stellt einen weiteren rezeptorabhängigen Mechanismus einer substanzvermittelten nicht gentoxischen Hepatokanzerogenese im Nager dar.

Um eine potentielle Aktivierung des PPAR α durch NVP zu untersuchen, wurden Enzymaktivitätsmessungen des von PPAR α regulierten Markerenzym CYP4A durchgeführt. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte durch die Umsetzung des Modellsubstrats Laurinsäure zu 12-Hydroxylaurinsäure (12-OH-Laurinsäure) in der Mikrosomenfraktion der Leberhomogenate der Vehikelkontroll- und Hochdosisgruppe (20 ppm NVP) der männlichen Wistar Ratten der NVP-Inhalationsstudie.

Der Laurinsäure Assay ermöglicht zudem die parallele Bestimmung der Enzymaktivität von CYP2E1, da dieses Enzym das eingesetzte Substrat Laurinsäure zur 11-Hydroxylaurinsäure (11-OH-Laurinsäure) umsetzt. CYP2E1 wird nicht über den PPAR α reguliert, ist jedoch an der metabolischen Aktivierung zahlreicher Xenobiotika beteiligt. Um einen potentiellen Einfluss NVPs auf die CYP2E1-Aktivität zu untersuchen, wurde diese innerhalb des Assays ebenfalls bestimmt.

Zum Ausschluss von Matrixeffekten und abiotischer Oxidation auf die Enzymaktivitätsmessung wurden für jedes Tier zwei Negativkontrollen mitgeführt. Als Negativkontrollen wurden Proben eingesetzt, welche entweder kein Protein enthielten, deren Protein vor Substratzugabe hitzeinaktiviert, oder sofort nach Substratzugabe denaturiert wurde. In keiner der eingesetzten Negativkontrollen wurde ein Umsatz des Modellsubstrats Laurinsäure beobachtet. Matrixeffekte auf die Bestimmung der Laurinsäuremetabolite konnten demnach ausgeschlossen werden. LOD und LOQ wurden für die Laurinsäuremetabolitenbestimmung nicht berechnet, da die Chromatogramme jedes einzelnen Tiers mit den jeweiligen Negativkontrollen verglichen wurden und der Umsatz durch einen Peak zur relevanten Retentionszeit eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Vor der Verwendung der Lebermikrosomen der NVP-Inhalationsstudie wurde die vorhandene HPLC-Methode zur Analyse der Laurinsäure und deren Metabolite mit Hinblick auf deren Peak-Form und -Trennung optimiert. Hierzu wurden Lebermikrosomen unbehandelter Wistar Ratten inkubiert und anschließend per Radio-HPLC analysiert. Durch den Einsatz einer Gradientenmethode konnten die sich in der ursprünglichen Methode überlagernden Peaks der Laurinsäuremetaboliten getrennt und somit die Aktivität der für deren Bildung verantwortlichen Isoenzyme einzeln berechnet werden (Abbildung 17).

4 Ergebnisse

Am Inkubationstag der Lebermikrosomen der NVP-Inhalationsstudie wurde eine Überprüfung der Aktivität des ^{14}C -Laurinsäuresubstratansatzes via LSC durchgeführt. Dieser ergab eine Wiederfindung von 100,4% bezogen auf die berechnete Aktivität. Die Analyse des Substratansatzes per Radio-HPLC bestätigte die radiochemische Reinheit und Lagerstabilität über einen Monat (Anhang IV). Der Laurinsäureansatz wurde somit als valide eingestuft und zum Versuch eingesetzt.

In allen aktiven Inkubationen (AI), d.h. unter Einsatz der Mikrosomenfraktion mit intaktem Protein, wurden 3 Peaks mit Retentionszeiten von etwa 16,6 min, 17,4 min und 22,6 min per Radio-HPLC detektiert. Der Peak bei einer Retentionszeit von 22,6 min wurde hierbei anhand der Referenzsubstanz als Laurinsäure identifiziert (Abbildung 17). Die beiden zeitlich früher eluierenden Peaks stellen die ω - und ω -1-Metaboliten der Laurinsäure dar. Welcher hierbei den an Position 11 bzw. 12 hydroxylierten Metaboliten darstellt, konnte mittels Radio-HPLC nicht eindeutig zugeordnet werden, da keine ^{14}C -markierten Referenzen zur Verfügung standen.

Aus diesem Grund wurden exemplarisch Leberhomogenatinkubate zur HPLC-QTOF/MS eingesetzt und die Retentionszeiten der detektierten Peaks mit Referenzlösungen von 12-OH-Laurinsäure und Laurinsäure verglichen. Die Retentionszeit der 12-OH-Laurinsäure-Referenz und der inkubierten Probe von 16,1 Minuten stimmten exakt überein, sodass der Peak im Inkubat mit dieser Retentionszeit eindeutig der 12-OH-Laurinsäure zugeordnet werden konnte (Abbildung 17). Der zweite Peak mit einer Retentionszeit von 15,3 Minuten wies ein Fragmentierungsmuster ähnlich zur 12-OH-Laurinsäure auf. Daher wurde postuliert, dass dieser Peak der 11-OH-Laurinsäure, dem zweiten bekannten Metaboliten der Laurinsäure, entspricht. Da jedoch keine Referenzsubstanz zu 11-OH-Laurinsäure vorlag, konnte diese abschließend nicht eindeutig identifiziert werden.

4 Ergebnisse

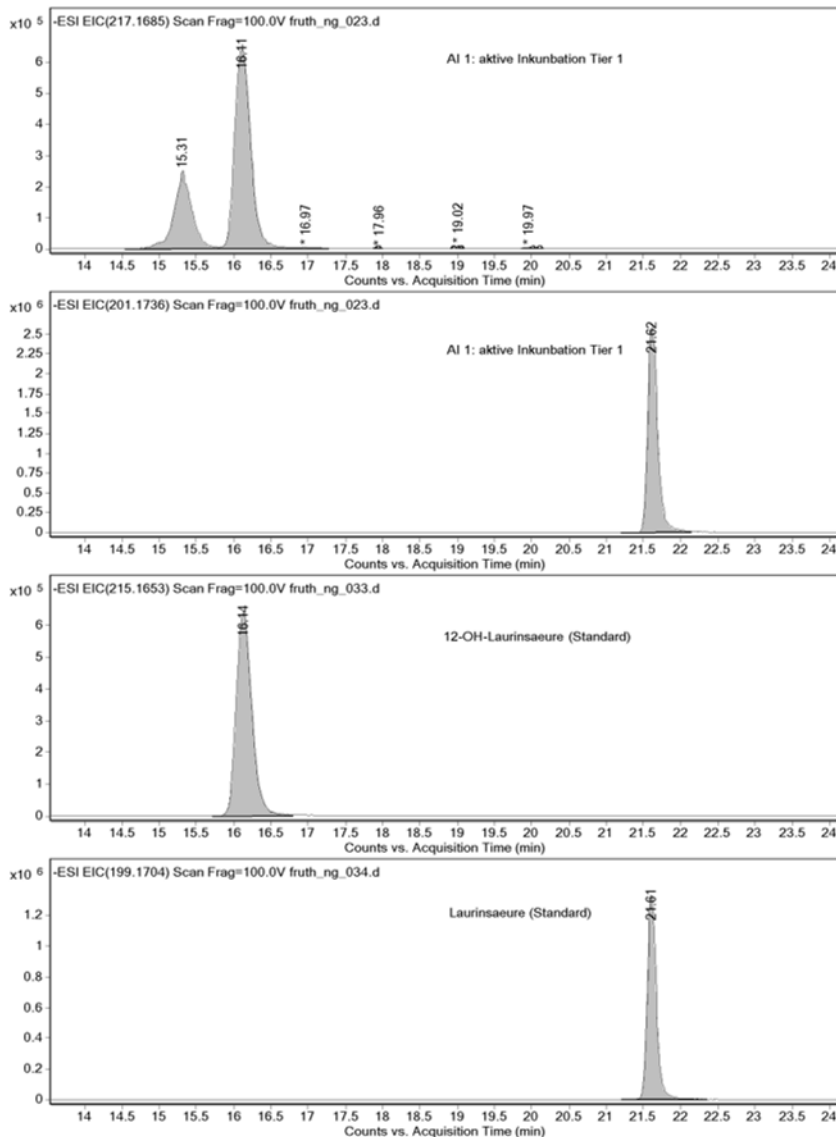


Abbildung 17: Zuordnung des 12-OH-Laurinsäurepeaks in CYP4A-Aktivitätsbestimmungsinkubaten

Wie im vorangegangenen Abschnitt erläutert, lieferten ausschließlich aktive Inkubate der eingesetzten Lebermikrosomenfraktionen der NVP-exponierten männlichen Ratten einen Umsatz der Laurinsäure zu deren ω - und ω -1-OH-Metaboliten. Somit konnten mögliche Matrixeffekte und eine abiotische Oxidation des Substrats ausgeschlossen werden.

Die CYP4A-Aktivität, welche für die ω -Hydroxylierung der Laurinsäure verantwortlich ist, wurde aus der Peakfläche der 12-OH-Laurinsäure, dividiert durch die zwanzigminütige Inkubationszeit, sowie die im Injektionsvolumen enthaltene Proteinmenge berechnet. Die gemittelte CYP4A-Aktivität der Vehikelkontrollgruppe der NVP-Inhalationsstudie betrug 10983 ± 2236 Peakfläche/min/mg Protein (Tabelle 49). Für diese Methode lagen keine laborinternen historischen Kontrollendaten vor. Die Enzymaktivitäten der Vehikelkontrollgruppe sind allerdings mit der ermittelten Aktivität der Lebermikrosomen einer unbehandelten Wistar Ratte von 11609 Peakfläche/min/mg vergleichbar, welche zur Methodenentwicklung eingesetzt wurde.

4 Ergebnisse

Die CYP4A-Aktivität der Hochdosisgruppe der NVP-Inhalationsstudie (20 ppm) von 14727 ± 5456 Peakfläche/min/mg Protein war im Vergleich zur Vehikelkontrollgruppe etwa um den Faktor 1,3 erhöht (Tabelle 49). Dieser leichte Anstieg war statistisch nicht signifikant. Bei Betrachtung der Einzeltierwerte der 20 ppm NVP Expositionsgruppe fällt auf, dass der nicht signifikante Aktivitätsanstieg vermutlich auf die CYP4A-Aktivitäten von 2 Einzeltieren (Tiere 19 und 20) zurückgeführt werden kann, welche im Vergleich zur Vehikelkontrolle eine um etwa den Faktor 2 erhöhte Aktivität aufwiesen. Aufgrund des nur geringen und statistisch nicht signifikanten Anstiegs der Aktivität des Markerenzym CYP4A liegt basierend auf den Ergebnisse des Laurinsäure Assays kein Hinweis auf eine peroxisomenproliferierende Wirkung NVPs oder dessen Metaboliten vor. Ein Einfluss des Rezeptors PPAR α an der NVP-induzierten Hepatokarzinogenese kann anhand der Ergebnisse daher nicht abgeleitet werden. Da allerdings einzelne Tiere eine leicht erhöhte CYP4A-Aktivität aufwiesen, wurde mit der im nächsten Kapitel beschriebenen Palmitoyl-CoA-Oxidase die Aktivität eines weiteren Markerenzym der Peroxisomenproliferation bestimmt.

Mit dem Laurinsäure Assay ist es weiterhin möglich die Aktivität des PPAR α -unabhängigen Enzyms CYP2E1 zu bestimmen, welches die Hydroxylierung der Laurinsäure in ω -1-Position katalysiert. Da CYP2E1 auch bei der metabolischen Aktivierung einiger Xenobiotika eine Rolle spielt und im Nager den Umsatz des strukturverwandten N-Methylpyrrolidon (NMP) katalysiert, wurde auch ein potentieller Einfluss NVPs auf die Aktivität dieses Enzyms bestimmt. Die CYP2E1-Aktivität der Vehikelkontrollgruppe lag bei 4512 ± 1050 Peakfläche/min/mg Protein und die der Hochdosisgruppe bei 5149 ± 2010 Peakfläche/min/mg Protein (Tabelle 49). Dies entspricht einer statistisch nicht signifikanten Aktivitätserhöhung um 14% (Faktor 1,14). Demnach wurde in diesem Assay kein Hinweis auf eine NVP-vermittelte Induktion oder Hemmung von CYP2E1 erhalten.

4 Ergebnisse

Tabelle 49: Resultate des Laurinsäure Assays (Gruppenwerte als Mittelwert ± Standardabweichung)

NVP Dosisgruppe	Tiernr.	ω-Hydroxylase- / CYP4A-Aktivität			ω-1-Hydroxylase- / CYP2E1-Aktivität		
		Peakfläche	Enzymaktivität Einzel tier*	Enzymaktivität Gruppe*	Peakfläche	Enzymaktivität Einzel tier*	Enzymaktivität Gruppe*
0 ppm	1	16449	10966	10983 ± 2236	6737	4491	4512 ± 1050
	2	10791	7194		4325	2883	
	3	17564	11709		6828	4552	
	4	15737	10491		6957	4638	
	5	21137	14091		9280	6187	
	6	17170	11447		6482	4321	
20 ppm	19	27314	20495	14727 ± 5456	9940	7458	5149 ± 2010
	20	28341	20593		10040	7295	
	21	15814	10543		5283	3522	
	22	21818	14545		7513	5008	
	23	23109	15406		7824	5216	
	24	11088	6779		3996	2393	

* Enzymaktivität als Peakfläche/min/mg Protein welches zur HPLC eingesetzt wurde (0,075 mg)

4 Ergebnisse

4.1.5.2.2 Palmitoyl-CoA-Oxidase Assay

Wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, stellt die PPAR α -Aktivierung und die damit einhergehende Peroxisomenproliferation einen nicht genotoxischen Mechanismus der Hepatokarzinogenese im Nagetier dar. Ein weiterer Marker zur Untersuchung der Aktivierung des PPAR α ist die Aktivität der Cyanid-insensitiven Palmitoyl-CoA-Oxidase/Acyl-CoA-Oxidase (PalCoA), welche das erste Enzym der peroxisomalen β -Oxidation darstellt.

Die Aktivität der PalCoA wurde im Zytosol der Lebern der männlichen Ratten der NVP-Inhalationsstudie unter Einsatz des Modells substrats Palmitoyl-CoA bestimmt. Hierbei wurde eine PalCoA-Aktivität von $6,02 \pm 0,49$ nmol/min/mg Protein für die Vehikelkontrollgruppe berechnet. Die Enzymaktivitäten im Leberhomogenat der NVP-exponierten Tiere lagen mit $5,43 \pm 0,71$ (5 ppm), $5,47 \pm 0,71$ (10 ppm) und $4,68 \pm 0,71$ (20 ppm) nmol/min/mg Protein unterhalb der PalCoA-Aktivität der Vehikelkontrollgruppe (Tabelle 50, Abbildung 18). Diese Abnahme ist allerdings nur in der Hochdosisgruppe statistisch signifikant ($p < 0,05$), was ein Hinweis auf eine NVP vermittelte Aktivitätsabnahme der PalCoA-Oxidase sein könnte.

Eine Aktivierung des PPAR α kann anhand der Ergebnisse ausgeschlossen werden, da hierbei eine Induktion der PalCoA, also eine Enzymaktivitätserhöhung zu erwarten wäre. Demnach sprechen sowohl die Ergebnisse der CYP4A- wie auch der PalCoA-Oxidase-Aktivität gegen einen durch Peroxisomenproliferation begründeten hepatokarzinogenen Mechanismus NVPs.

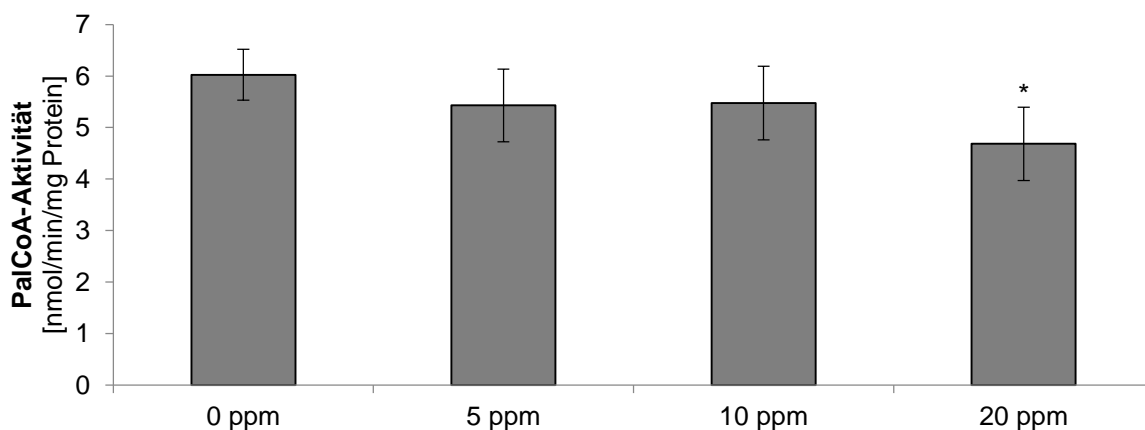


Abbildung 6: Aktivität der cyanid-insensitiven PalmitoylCoA-Oxidase in Abhängigkeit der NVP Dosisgruppe, Werte als MW \pm SD (n=6, * $p < 0,05$)

4 Ergebnisse

Tabelle 50: Resultate der Enzymaktivitätsbestimmung der Cyanid-insensitiven PalmitoylCoA-Oxidase

NVP Dosisgruppe	Tier-Nr.	PalCoA-Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$]	Proteingehalt [mg/mL]	spezifische PalCoA-Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Protein}$]	
				Einzeltier	Gruppe
0 ppm	1	136	24,98	5,44	6,02 \pm 0,49
	2	154	26,16	5,89	
	3	171	26,18	6,53	
	4	152	27,49	5,53	
	5	175	26,46	6,61	
	6	172	28,00	6,14	
5 ppm	7	119	24,49	4,86	5,43 \pm 0,71
	8	143	22,39	6,39	
	9	134	21,80	6,15	
	10	107	23,05	4,64	
	11	117	23,06	5,07	
	12	117	21,40	5,47	
10 ppm	13	86	18,56	4,63	5,47 \pm 0,71
	14	104	22,00	4,73	
	15	121	21,32	5,68	
	16	132	21,60	6,11	
	17	112	21,07	5,32	
	18	148	23,18	6,38	
20 ppm	19	88	19,29	4,56	4,68 \pm 0,71*
	20	120	20,21	5,94	
	21	83	19,82	4,19	
	22	95	22,49	4,22	
	23	87	21,23	4,10	
	24	111	21,82	5,09	

* $p < 0,05$

4.2 *in vitro* Untersuchungen

4.2.1 Abiotische Stabilität

Die biologischen Kompartimente, welche eine Substanz je nach Aufnahmeweg in den Organismus durchquert, weisen verschiedene pH-Werte auf und können die Bioverfügbarkeit, sowie die Stabilität einer Substanz beeinflussen. Um die Stabilität NVPs bei unterschiedlichen pH-Werten zu testen und mögliche Hydrolyse-/Zerfallsprodukte zu identifizieren, wurde NVP in verschiedenen Simulationslösungen inkubiert. Hierbei wurden Simulanzen eingesetzt, die die physiologisch biochemischen Eigenschaften der einzelnen Kompartimente modellhaft repräsentieren. Eingesetzt wurden: Magensaftsimulanz (pH 1,2; 2; 3), Lysosomensimulanz (pH 4,5), Lungenflüssigkeitssimulanz (pH 7,4) und Phosphatpuffer (Kontrolle, pH 7,4).

Untersuchungen in Magensaftsimulanz unterschiedlichen pH-Werts sind zur prä- oder postprandialen Stabilitätsprüfung in verschiedenen Spezies relevant. Da viele Xenobiotika im Zellkompartiment der Lysosomen abgebaut werden, ist auch dieser pH-Wert für die NVP-Stabilität von Interesse. Zudem wurde mittels Lungenflüssigkeitssimulanz untersucht, ob NVP in der Lunge stabil ist, da NVP nach inhalativer Exposition kanzerogen wirkt.

Um die NVP-Hydrolyse zu untersuchen, wurde NVP in 0,1 mM und 100 mM Konzentration in den verschiedenen Systemen inkubiert. Gemessen wurde die zeitabhängige NVP-, 2-Pyrrolidon- und Acetaldehydkonzentration im Inkubator mittels (Headspace-)GC/MS. Anschließend wurden die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von NVP in den einzelnen Simulanzen berechnet.

Als Hydrolyseprodukte von NVP konnten eindeutig 2-Pyrrolidon und Acetaldehyd identifiziert werden, welche proportional zu den NVP-Umsätzen in stöchiometrischen Mengen gebildet wurden und somit die Bildung weiterer Zerfallsprodukte ausschließen.

Der Reaktionsverlauf einer NVP-Inkubation in Magensaftsimulanz (100 μ M, pH 2) wurde exemplarisch dargestellt um den zeitlichen Abbau NVPs, sowie die davon abhängige Bildung der Hydrolyseprodukte Acetaldehyd und 2-Pyrrolidon abzubilden (Abbildung 19).

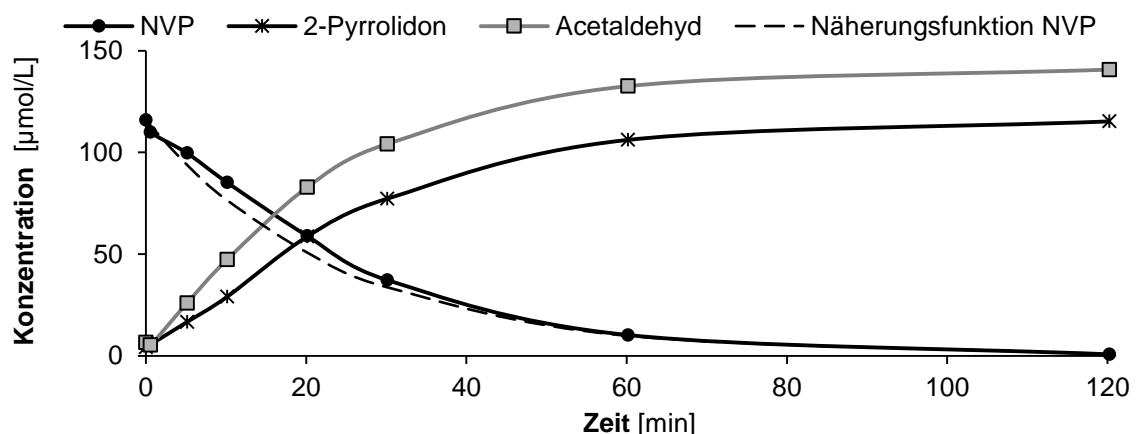


Abbildung 19: Reaktionsverlauf des abiotischen NVP-Abbaus (100 μ M) in Magensaftsimulanz (pH 2)

4 Ergebnisse

Für die NVP-Hydrolyse kann eine Reaktion pseudo-erster Ordnung angenommen werden, da der Reaktionspartner Wasser aufgrund der eingesetzten wässrigen Simulationslösungen in erheblichem Überschuss vorliegt und dessen Konzentration daher nahezu konstant ist. Die in Abbildung 19, exemplarisch für pH 2, dargestellte zeitliche Abnahme der NVP-Konzentration wird durch Formel 13 beschrieben, mit welcher die Geschwindigkeitskonstante k für jeden pH-Wert der Simulanzien berechnet wurde. Eine Näherungsfunktion mit der berechneten Geschwindigkeitskonstante k wurde exemplarisch für pH 2 dargestellt, wobei sich diese den gemessenen NVP-Konzentrationen sehr gut annähert (Abbildung 19).

Somit ergibt sich für die Halbwertszeit $t_{1/2}$ der in Formel 14 beschriebene Zusammenhang, welche für jeden pH-Wert anhand der zugehörigen Geschwindigkeitskonstante berechnet wurde (Tabelle 51).

$$c_t = c_0 \cdot e^{-kt} \quad \text{Formel 13}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln \frac{c_0}{\frac{c_0}{2}}}{k} = \frac{\ln(2)}{k} \quad \text{Formel 14}$$

c_t : Konzentration von NVP zum Zeitpunkt t ; c_0 : Anfangskonzentration von NVP;
 k : Geschwindigkeitskonstante; t : Zeit

Ein Abbau von NVP in den Inkubationssystemen wurde im Rahmen der Versuchsbedingungen bei pH 1,2, pH 2, pH 3 (Magensaftsimulanz), sowie pH 4,5 (Lysosomensimulanz) beobachtet. Während NVP bei pH-Werten von 1,2 und 2 vollständig hydrolysierte, wurde bei pH 3 und 4,5 ein NVP-Abbau von etwa 85 – 90%, bezogen auf die Ausgangskonzentration gezeigt. Bei neutralem pH-Wert, in Lungenflüssigkeitssimulanz und Phosphatpuffer, war NVP über mindestens 24 Stunden bzw. 3 Tage stabil. Halbwertszeiten wurden daher nur für die Hydrolysen in sauren Simulationsmedien berechnet.

4 Ergebnisse

Die Halbwertszeiten für NVP in den Simulanzen mit stark sauren pH-Werten 1,2 und 2 lagen bei etwa 3 bzw. 20 Minuten. Bei einem pH-Wert von 3 betrug die Halbwertszeit 2 bis 3 Stunden und bei pH 4,5 in Lungenflüssigkeitssimulanz bis zu 7,5 Stunden. Dabei war die Halbwertszeit unabhängig der NVP-Ausgangskonzentration, was für eine Reaktion erster Ordnung typisch ist (Tabelle 51).

Anhand der Hydrolysestudien in verschiedenen Simulationslösungen unterschiedlichen pH-Werts wurde unabhängig der NVP-Ausgangskonzentration folgender Zusammenhang festgestellt: Je höher die Protonenkonzentration des Simulationsmediums physiologischer Kompartimente ist, desto größer ist die Reaktionsgeschwindigkeit und desto kürzer die Halbwertszeit. Als Hydrolyseprodukte von NVP wurden 2-Pyrrolidon und Acetaldehyd identifiziert.

Tabelle 51: Halbwertszeiten von NVP in verschiedenen Simulationsmedien

Simulanz		c(NVP) = 0,1 mM		c(NVP) = 100 mM	
		t _{1/2}	k	t _{1/2}	k
Magensaft	pH 1,2	3 min	0,237 min ⁻¹	3 min	0,216 min ⁻¹
	pH 2	18	0,034 min ⁻¹	20 min	0,039 min ⁻¹
	pH 3	2,7 h	0,258 h ⁻¹	2,1 h	0,335 h ⁻¹
Lysosomen	pH 4,5	6,7 h	0,104 h ⁻¹	7,5 h	0,093 h ⁻¹
Lungenflüssigkeit	pH 7,4	> 24 h	n.a.	-	-
Phosphatpuffer	pH 7,4	> 3 d	n.a.	> 3 d	n.a.

4.2.2 *in vitro* Metabolismus

4.2.2.1 Subzelluläre Fraktionen

Zur Untersuchung des *in vitro* Metabolismus von NVP wurden Inkubationen mit Leber-S9-Fractionen, sowie mit Lebermikrosomen männlicher Wistar Ratten durchgeführt. Da inhalative chronische NVP-Exposition zu Hepatokarzinomen in der Ratte führte, wurde NVP zusätzlich in Lungen-S9 Fraktion inkubiert, um mögliche in der Lunge gebildeten Metabolite zu erfassen. Zur Überprüfung der biotischen Stabilität NVPs unter den gewählten Versuchsbedingungen wurden bei jeder Testreihe 3 Negativkontrollen mitgeführt, welche entweder direkt nach NVP-Zugabe deproteiniert wurden (t_0) oder kein (PK), bzw. hitzeinaktiviertes Protein (HDK) enthielten. Zur Berechnung des prozentualen Umsatzes der eingesetzten NVP-Konzentration in der aktiven Inkubation wurde die HDK eingesetzt. Die Probenmatrix, sowie die Probenbehandlung dieser Negativkontrolle sind der aktiven Inkubation sehr ähnlich, da die HDK über denselben Zeitraum inkubiert wurde und (hitzeinaktiviertes) Protein enthält.

Zur Überprüfung der metabolischen Aktivität der eingesetzten Testsysteme wurde Testosteron (200 μM) als Positivkontrolle eingesetzt. Der Umsatz des Testosterons betrug sowohl in den Mikrosomen, als auch in der S9-Fraktion über 99% bezogen auf die mitgeführten Kontrollen (t_0 , HDK, PK). Die Testosteronumsätze bestätigten somit die metabolische Kompetenz der Inkubationssysteme unter den gewählten Inkubationsbedingungen.

In den eingesetzten Negativkontrollen der Inkubationen in subzellulären Fraktionen wurde kein NVP-Umsatz beobachtet (Tabelle 52). Daher wurden die im Folgenden beschriebenen ermittelten NVP-Umsätze der aktiven Inkubationen der jeweiligen subzellulären Fraktionen auf den biotischen Metabolismus von NVP zurückgeführt.

Zunächst wurde untersucht, ob ein biotischer Abbau von NVP bei Inkubation mit subzellulären Fraktionen stattfindet, indem die NVP-Konzentration nach zweistündiger Inkubation mittels GC/FID analysiert wurde. Hierzu wurden Lebermikrosomen von Aroclor 1254-induzierten und unbehandelten Wistar Ratten eingesetzt, da die Aktivität der maßgeblich am Phase I Metabolismus (Funktionalisierungsreaktionen) beteiligten CYP-Enzyme pro enthaltener Proteinmenge in Mikrosomen verglichen mit der S9-Fraktion höher ist. Der NVP-Umsatz der aktiven Inkubation in Aroclor 1254-induzierten Lebermikrosomen, bezogen auf die HDK, betrug bei einer nominalen Inkubationskonzentration von 40, 100 und 250 μM : $24 \pm 3\%$, $24 \pm 6\%$ und $20 \pm 6\%$ (Tabelle 52). Folglich wurde metabolischer NVP-Umsatz nach Inkubation in Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen nachgewiesen, welcher jedoch keine Konzentrationsabhängigkeit zeigte.

Weiterhin wurde der *in vitro* Metabolismus von NVP in nicht induzierten Rattenlebermikrosomen untersucht. Nach zweistündiger Inkubation zeigte sich in der aktiven Inkubation ein NVP-Umsatz von $45 \pm 3\%$ und $49 \pm 3\%$, bei einer nominalen

4 Ergebnisse

Inkubationskonzentration von 100 und 250 μM . Bei einer Verdopplung der Proteinkonzentration im Inkubat von 0,5 mg Protein/mL auf 1 mg Protein/mL, wurden bei gleichbleibender Inkubationskonzentration NVP-Umsätze von $27 \pm 2\%$ (100 μM) und $29 \pm 2\%$ (250 μM) beobachtet (Tabelle 52).

Analog zu den Resultaten in Aroclor 1254-induzierten Mikrosomen, wurde somit auch in nicht induzierten Rattenlebermikrosomen ein konzentrationsunabhängiger Metabolismus von NVP gezeigt. Weiterhin wurde bei erhöhter Proteinkonzentration im Inkubat ein erniedrigter NVP-Umsatz beobachtet, was auf einen inversen Zusammenhang zwischen Proteingehalt und NVP-Metabolismus hinweisen könnte. In einer weiteren zweistündigen NVP-Inkubation (10 μM NVP, 0,5 mg Protein/mL) wurde ein NVP-Umsatz von etwa 22% beobachtet, welcher ähnlich den ermittelten Umsätzen bei Inkubationen mit doppelter Proteinkonzentration von 27 - 29% war (Tabelle 52). Somit wurde ein möglicher Zusammenhang der Proteinkonzentration und der NVP-Konzentration nicht bestätigt.

Zusammenfassend wurde aus den Untersuchungen zum *in vitro* Metabolismus von NVP in Lebermikrosomen abgeleitet, dass dieser unabhängig von der eingesetzten NVP-, sowie Proteinkonzentration ist und Aroclor 1254-induzierte Rattenlebermikrosomen im Vergleich zu nicht induzierten keinen erhöhten metabolischen Umsatz von NVP zeigten.

Um neben NVP auch gebildete Metabolite analytisch zu erfassen, sowie einen GSH-abhängigen Metabolismus zu untersuchen, wurde NVP (100 μM) mit Leber-S9-Fraktion und GSH inkubiert und anschließend zur HS-GC/MS und GC/MS eingesetzt. Um potentielle Metaboliten im Massenscan von Matrixeffekten zu unterscheiden, wurde der Massenscan der aktiven Inkubation mit denen der Negativkontrollen verglichen. Mittels HS-GC/MS wurde die Abnahme der NVP-Konzentration nach ein- und zweistündiger Inkubation quantifiziert; Metabolite wurden mit dieser Methode allerdings nicht detektiert. Im Gegensatz hierzu konnte 2-Pyrrolidon als Metabolit mittels GC/MS identifiziert werden; weitere Metaboliten wurden nicht beobachtet.

Zur weiteren Untersuchung des *in vitro* Metabolismus von NVP wurden Leber-S9-Fraktionen mit NVP in 1, 10 und 100 μM Konzentration inkubiert und anschließend sowohl die NVP- wie auch die 2-Pyrrolidon-Konzentration bestimmt. Bei Inkubationen von 1 μM NVP wurde ein zeitabhängiger Abbau von NVP und die Bildung von 2-Pyrrolidon beobachtet. Die NVP-Umsätze betragen 10, 25 und 31% nach dreißigminütiger, ein- und zweistündiger Inkubation mit S9-Fraktion unter GSH-Zusatz. Während das nach 30 und 60 Minuten Inkubation gebildete 2-Pyrrolidon unter der Bestimmungsgrenze lag, wurde nach zweistündiger Inkubation eine Konzentration von 0,30 μM bestimmt. Die Summe der Konzentrationen von NVP und 2-Pyrrolidon nach 2 Stunden Inkubationsperiode ergab mit 0,97 μM 97% der nominalen Ausgangskonzentration, was relativ zur HDK 99% entspricht.

4 Ergebnisse

Inkubationen von 10 μM NVP über 1 und 2 Stunden in Rattenleber-S9 zeigten eine zeitabhängige Konzentrationsabnahme von NVP bei gleichzeitiger Bildung von 2-Pyrrolidon über den Inkubationszeitraum. Dabei betrug der NVP-Umsatz nach einer Stunde etwa 16% und nach 2 Stunden 19 – 30%. Die Summe der Konzentrationen von NVP und 2-Pyrrolidon betrug nach einer Stunde etwa 97% und nach zweistündiger Inkubation 94 – 100% der eingesetzten NVP-Konzentration. Demnach wurde 2-Pyrrolidon, ungeachtet der NVP-Inkubationskonzentration, möglicherweise als einziger, in jedem Fall aber als Hauptmetabolit des *in vitro*-Metabolismus in Rattenleber-S9 identifiziert. NVP-Konjugate mit GSH wären mittels der gewählten Analysemethode GC-MS möglicherweise nicht detektiert worden, allerdings lässt sich die GSH-Konjugation als quantitativ relevanten Metabolisierungsweg aufgrund des nahezu quantitativen Umsatzes zu 2-Pyrrolidon ausschließen.

Nach zweistündiger Inkubation mit Rattenlebermikrosomen (10 μM NVP) wurde ein NVP-Umsatz von 22% beobachtet, wovon 19% auf gebildetes 2-Pyrrolidon zurückgeführt wurden. Schlussfolgernd ist 2-Pyrrolidon auch der Hauptmetabolit NVPs nach Inkubation in Lebermikrosomen.

Die beschriebene Unabhängigkeit des NVP-Umsatzes von der Protein- sowie NVP Konzentration ist für Phase-I-Metabolismus-Reaktionen, welche vornehmlich durch CYP-Isoenzyme katalysiert werden, ungewöhnlich. Um den biotischen NVP-Umsatz zu bestätigen, wurden weitere Negativkontrollen in Mikrosomen und S9-Fraktion eingesetzt, welche den für CYP-Isoenzym katalysierte Reaktionen notwendigen Kofaktor NADPH nicht enthielten. Hierzu wurde NVP (10 μM) sowohl mit S9-Fraktion, wie auch mit Mikrosomen über 2 Stunden ohne NADPH-generierendes System inkubiert. Weder in Mikrosomen, noch in S9-Fraktion wurde ein signifikanter NVP-Abbau oder die Bildung von 2-Pyrrolidon beobachtet. Diese Ergebnisse bestätigen, dass der Umsatz von NVP zu 2-Pyrrolidon biotisch und NADPH-abhängig erfolgt.

Aufgrund der kanzerogenen Wirkung von NVP nach inhalativer Exposition, wurde NVP auch in Lungen-S9-Fraktion inkubiert, um mögliche lungenspezifische Metabolite zu erfassen.

Nach zweistündiger NVP-Inkubation (10 μM) in Rattenlungen-S9-Fraktion wurde ein NADPH-abhängiger NVP-Umsatz von etwa 4% in Bezug auf die HDK ermittelt. Die Summe der Konzentrationen von NVP und 2-Pyrrolidon betrug hierbei etwa 9,45 μM , was 99% der NVP-Konzentration der HDK entspricht (Tabelle 52). Demnach wurde 2-Pyrrolidon analog zur Inkubation in subzellulären Fraktionen der Rattenleber als Hauptmetabolit von NVP identifiziert, allerdings ist der Umsatz von NVP zu 2-Pyrrolidon in Lungen-S9 wesentlich geringer.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass NVP in Mikrosomen, sowie S9-Fraktion der Rattenleber unabhängig der NVP-Ausgangskonzentration, jedoch NADPH-abhängig zum Hauptmetaboliten 2-Pyrrolidon metabolisiert wird. Zudem wurde in Mikrosomen weder durch den Einsatz von Aroclor 1254-induzierten Mikrosomen, noch durch Verdopplung der

4 Ergebnisse

Proteinkonzentration eine Steigerung des NVP-Umsatzes erreicht. Weiterhin wurde 2-Pyrrolidon nach Inkubation mit Lungen-S9 als Hauptmetabolit identifiziert. Hinweise auf einen lungenspezifisch gebildeten, toxischen Metaboliten von NVP ergaben sich aus den Untersuchungen nicht.

4 Ergebnisse

Tabelle 52: Ergebnisse der NVP-Inkubationen mit subzellulären Fraktionen ((HS-)GC/MS-Messungen als Einzelwerte, Resultate der GC/FID-Messungen als Mittelwert ± Standardabweichung)

Organ- fraktion	NVP- Inkubati- ons- konzent- ration [µM]	Inku- ba- tions- dauer [min]	aktive Inkubation				HDK	t ₀ ⁺	PK ⁺
			c(NVP) [µM]	c(2- Pyrrolidon) [µM]	Σ{c(NVP)+ c(2- Pyrrolidon)} [µM]	NVP- Umsatz bezogen auf HDK [%]	c(NVP) [µM]	c(NVP) [µM]	c(NVP) [µM]
Leber-S9	1 (GC/MS)	30	0,81	< LOQ	0,81	10	0,90		
		60	0,75	< LOQ	0,75	25	1,00	0,98	1,01
		120	0,67	0,30	0,97	31	0,98		
	10 (GC/MS)	60	8,49	1,34	9,83	16	10,14		
		120	7,16	2,80	9,96	29	10,11	10,62	11,06
		120	6,60	2,28	8,87	30	9,44	9,74	10,17
		120	8,04	1,96	10,01	19	9,97	10,64	10,38
		120*	9,18*	< LOQ*	9,18*	2*	9,37*	10,07*	10,17*
		120*	10,27*	< LOQ*	10,27*	-	10,09*	10,42*	10,31*
100 (HS- GC/MS)	60	77,21	n.a.	n.a.	18	93,91			
	120	65,25	n.a.	n.a.	28	90,91	82,12	75,49	
Lungen- S9	10 (GC/MS)	120	9,10	0,34	9,45	4	9,51	9,58	10,13
		120*	9,65*	< LOQ*	9,65*	-	9,11*	9,10*	10,13*
Leber- mikro- somen	10 (GC/MS)	120	8,17	1,99	10,16	22	10,51	10,93	10,55
		120*	10,80*	< LOQ*	10,80*	-	10,52*	10,42*	10,43*
	100 (n=3, GC/FID)	120	44,83 ± 2,75	n.a.	n.a.	45 ± 3	81,59 ± 1,61	87,62 ± 3,62	81,76 ± 4,08
		60#♦	2814 ± 26#♦	n.a.	n.a.	14 ± 1#♦	3276 ± 56#♦	3344 ± 144#♦	3229 ± 75♦
	250 (n=3, GC/FID)	120#♦	2407 ± 60#♦	n.a.	n.a.	27 ± 2#♦	3313 ± 111#♦		
		120	111,33 ± 6,17	n.a.	n.a.	49 ± 3	220,39 ± 4,70	217,90 ± 11,53	209,80 ± 3,71
	120#♦	222,75 ± 5,62#♦	n.a.	n.a.	29 ± 2#♦	314,89 ± 10,86#♦	299,30 ± 12,98#♦	286,06 ± 2,54♦	

4 Ergebnisse

Organ- fraktion	NVP- Inkubations- konzentration [μM]	Inku- ba- tions- dauer [min]	aktive Inkubation				HDK	t_0^+	PK ⁺
			c(NVP) [μM]	c(2- Pyrrolidon) [μM]	$\Sigma\{c(\text{NVP})+$ c(2- Pyrrolidon)} [μM]	NVP- Umsatz bezogen auf HDK [%]	c(NVP) [μM]	c(NVP) [μM]	c(NVP) [μM]
Leber- mikro- somen (Aroclor 1254- induziert)	40 (n=3, GC/FID)	120	28,53 \pm 1,15	n.a.	n.a.	24 \pm 3	37,48 \pm 4,73	37,43 \pm 0,90	34,67 \pm 1,52
	100 (n=3, GC/FID)	120	69,15 \pm 5,10	n.a.	n.a.	24 \pm 6	91,10 \pm 10,27	89,71 \pm 8,63	101,68 \pm 22,58
	250 (n=3, GC/FID)	120	181,77 \pm 13,27	n.a.	n.a.	20 \pm 6	227,96 \pm 12,93	229,49 \pm 19,74	207,95 \pm 12,61

⁺ Zeitpunkt 0 min; ^{*} ohne NADPH-generierendes System, [#] doppelte Proteinkonzentration (1 mg/mL), [♦] Bestimmung des NVP-Umsatzes über die Peakfläche

4 Ergebnisse

4.2.2.2 Hepatozyten

Um den Metabolismus von NVP in intakten Zellen zu untersuchen, wurden kryokonservierte Rattenhepatozyten mit NVP (100 μM) inkubiert und die Abnahme der NVP-Konzentration analysiert.

Zur Überprüfung der metabolischen Aktivität der eingesetzten Hepatozyten unter den gewählten Inkubationsbedingungen wurde Testosteron (200 μM) als Positivkontrolle eingesetzt. Nach sechsständiger Inkubation wurde ein Testosteronumsatz von etwa 73% verglichen mit der Mediumkontrolle beobachtet, was die metabolische Aktivität des eingesetzten Testsystems unter den gewählten Versuchsbedingungen bestätigte.

Weiterhin wurde untersucht, ob NVP zytotoxisch auf die eingesetzten Hepatozyten wirkt, um einen Einfluss potentieller Zytotoxizität auf das Ergebnis der Metabolismusuntersuchungen auszuschließen. Hierzu wurden Rattenhepatozyten mit NVP-Konzentrationen in einem Bereich von 10 – 1000 μM über 7 Stunden inkubiert und zum MTT Assay eingesetzt. Zudem wurden humane Hepatozyten unter gleichen Bedingungen inkubiert um einen möglichen Speziesunterschied zu untersuchen.

Die Positivkontrolle TritonX vermittelte bei einer Konzentration von 1% einen Abfall der Vitalität auf etwa 1% und 4% in Rattenhepatozyten und humanen Hepatozyten und demonstrierte somit die Anwendbarkeit des Assays unter den gewählten Versuchsbedingungen. Die Vitalität der behandelten Hepatozyten zeigte bei keiner NVP-Konzentration einen Abfall unter 80% verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Daher ist NVP unter den vorliegenden Versuchsbedingungen bis zu einer Konzentration von 1000 μM weder in humanen noch in Rattenhepatozyten zytotoxisch (Abbildung 20). Somit stellen Hepatozyten ein geeignetes System zur Untersuchung des *in vitro* Metabolismus von NVP dar.

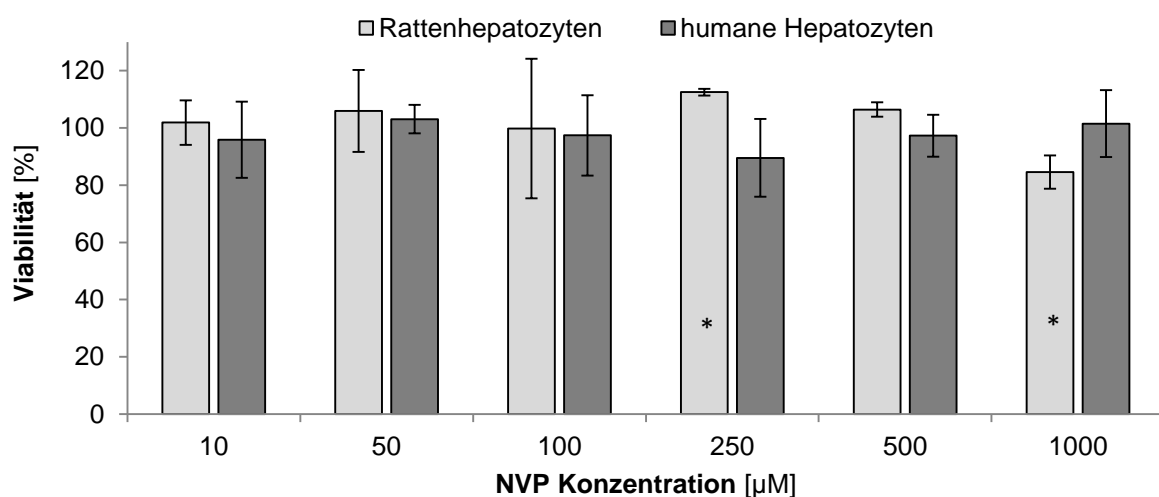


Abbildung 20: Viabilität von Hepatozyten nach siebenständiger NVP Inkubation bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (dargestellt als MW \pm SD/ * Range)

4 Ergebnisse

Zur Prüfung der metabolischen Stabilität von NVP in Rattenhepatozyten wurden diese für maximal 6 Stunden mit NVP (100 μM) inkubiert. Der NVP-Umsatz wurde nach 1, 2, 4 und 6 Stunden im Vergleich zur Mediumkontrolle (ohne Hepatozyten) bestimmt und lag nach 1, 2, 4 und 6 Stunden bei etwa 2%, 5%, 6% und 4%. Die Varianz der Mediumkontrollen, bezogen auf den Mittelwert der Peakflächen zu jedem Messzeitpunkt (0, 1, 2, 4, 6 Stunden), betrug 3%. Somit war innerhalb der Inkubationszeit kein zeitabhängiger, relevanter Umsatz von NVP zu beobachten.

NVP zeigte sich somit stabil in Rattenhepatozyten unter den getesteten Inkubationsbedingungen unter Abwesenheit von Zytotoxizität.

4.2.2.3 Präzisionsleberschnitte

Um den Metabolismus NVPs in einer kompletten Leberfunktionseinheit inklusive Transportproteinen, Kofaktoren, sowie Gallenkanälchen und weiteren Leberzellarten abzubilden, wurden Präzisionsleberschnitte (PCLS) der Ratte über 24 Stunden mit NVP inkubiert.

Zur Überprüfung der metabolischen Aktivität der PCLS unter den gewählten Inkubationsbedingungen wurde Testosteron (200 μM) als Positivkontrolle eingesetzt. Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation war in der aktiven Inkubation kein Testosteron nachweisbar. Somit wurde gezeigt, dass die zum Test eingesetzten PCLS unter den Testbedingungen metabolisch aktiv waren.

Weiterhin wurde zum Ausschluss eines Einflusses auf das Ergebnis der Metabolismusuntersuchungen eine potentielle Zytotoxizität NVPs in PCLS untersucht. Hierzu wurden PCLS mit NVP-Konzentrationen von 25, 50, 100 und 250 μM über 24 Stunden inkubiert und zum MTT Assay eingesetzt. Die Vitalität der mit 25 und 250 μM NVP inkubierten PCLS betrug im Vergleich zur analog inkubierten Mediumkontrolle etwa 96%. Bei einer NVP Inkubationskonzentration von 50 und 100 μM war kein Unterschied der Vitalität der PCLS im Vergleich zur Mediumkontrolle zu beobachten. Weiterhin wurden die Proteingehalte der PCLS mittels der Methode nach Bradford bestimmt. Für die Mediumkontrolle wurde ein Proteingehalt von etwa 2,3 mg/mL ermittelt. Die Proteingehalte der NVP-behandelten PCLS lagen ungeachtet der NVP-Konzentration in einem Bereich von 2,1 – 2,7 mg/mL. Eine Verringerung des Proteingehalts gegenüber der Mediumkontrolle wurde demnach nicht beobachtet. Weder der MTT-Assay noch die Bestimmung des Proteingehalts lieferten Hinweise auf NVP-vermittelte Zytotoxizität in PCLS bei Inkubationskonzentrationen von bis zu 250 μM . PCLS können daher zur Untersuchung des *in vitro* Metabolismus von NVP herangezogen werden.

Zur Prüfung der metabolischen Stabilität von NVP in PCLS einer männlichen Wistar Ratte wurden diese für maximal 24 Stunden mit 1, 10 und 100 μM NVP inkubiert. Der NVP-Umsatz und die Bildung von 2-Pyrrolidon wurde nach 4, 6, 8 und 24 Stunden im Vergleich zur

4 Ergebnisse

Negativkontrolle mit hitzeinaktivierten PCLS (HDK) bestimmt. Innerhalb der Versuchsreihe wurde eine Bestimmungsgrenze von 5 µg/L für NVP und 50 µg/L für 2-Pyrrolidon festgelegt, da die zugehörigen Peaks bei diesen Konzentrationen noch eindeutig von der Matrix abgrenzbar waren.

In den Matrixproben wurden Hintergrundkonzentrationen bzw. Peaks mit vergleichbaren analytischen Signalen zu NVP und 2-Pyrrolidon identifiziert. Diese Hintergrundkonzentrationen wurden quantifiziert und von den analysierten Konzentrationen der aktiven Inkubationen subtrahiert, sodass der NVP-Umsatz sowie die 2-Pyrrolidon-Bildung eindeutig dem Metabolismus durch die PCLS zugeordnet werden konnten.

In beiden Negativkontrollen, der Mediumkontrolle ohne PCLS, sowie den hitzeinaktivierten PCLS, wurde über 24 Stunden, ungeachtet der NVP-Ausgangskonzentration, kein Umsatz von NVP beobachtet. Die NVP-Wiederfindungen bezogen auf die Nominalkonzentration betragen stets > 99% (Tabelle 53). Ein abiotischer Abbau von NVP, sowie die abiotische Bildung von 2-Pyrrolidon unter den gegebenen Versuchsbedingungen wurden daher ausgeschlossen.

In den aktiven PCLS-Inkubationen der eingesetzten NVP-Konzentrationen von 1, 10, und 100 µM, war eine zeit- und konzentrationsabhängige Metabolisierung von NVP zu 2-Pyrrolidon zu beobachten. Nach 8 Stunden betrug der NVP-Umsatz bezogen auf die HDK etwa 42%, 30% und 19% für die 1, 10 und 100 µM Konzentration. Nach 24 Stunden wurde ein Umsatz von 48%, 39% und 22% bei NVP-Inkubationskonzentrationen von 1, 10 und 100 µM beobachtet (Tabelle 53). Die Metabolisierung von NVP in PCLS erfolgte demnach hauptsächlich innerhalb der ersten 8 Stunden der Inkubation. Die 2-Pyrrolidon-Bildung erfolgte zeitabhängig und nahezu quantitativ bezogen auf die nominale NVP-Konzentration.

Die Summe der Konzentrationen von NVP und 2-Pyrrolidon lag, bezogen auf die eingesetzte NVP-Nominalkonzentration, bei etwa 100% (4, 6, 8, 24 Stunden) innerhalb der 1 µM Inkubation, bei > 97% (4, 6, 24 Stunden) bzw. etwa 90% (8 Stunden) innerhalb der 10 µM Inkubation und bei > 90% (4, 6, 8, 24 Stunden) der PCLS innerhalb der 100 µM Inkubation (Tabelle 53).

Der Metabolismus von NVP zu 2-Pyrrolidon verlief somit nahezu quantitativ, sodass 2-Pyrrolidon als Hauptmetabolit NVPs nach Inkubation in PCLS identifiziert wurde. Die Bildung weiterer, nicht flüchtiger Metabolite, welche nicht mittels GC-MS erfasst werden können, wäre innerhalb der 100 µM Inkubation möglich. Der potentielle Anteil dieser kann aufgrund der ermittelten 2-Pyrrolidon-Konzentrationen maximal 10% der zur Inkubation eingesetzten NVP-Nominalkonzentration, bzw. 15% bezogen auf die mitgeführten Negativkontrollen, betragen.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass 2-Pyrrolidon den Hauptmetaboliten NVPs nach Inkubation in PCLS darstellt.

4 Ergebnisse

Tabelle 53: Ergebnisse der NVP- und 2-Pyrrolidon-Quantifizierung der PCLS-Inkubationen (Ergebnisse als Mittelwert und Range aus Duplikaten nach Subtraktion der Matrixwerte, Umsatz relativ zum Mittelwert der HDK aller Messzeitpunkte)

NVP- Inkubations- konzentration [μM]	Inkubat- ionsdauer [h]	aktive Inkubation			NVP- Umsatz bezogen auf HDK [%]	HDK	Mediumkontrolle
		c(NVP) [μM]	c(2-Pyrrolidon) [μM]	$\Sigma(\text{c(NVP)+c(2-Pyrrolidon)}$ [μM]		c(NVP) [μM]	c(NVP) [μM]
1	0	1,15 \pm 0,03	-	1,15 \pm 0,03	-	1,15 \pm 0,04	1,13 \pm 0,05
	4	0,92 \pm 0,04	0,09 \pm 0,06	1,01 \pm 0,02	17	1,10 \pm 0,03	1,10 \pm 0,04
	6	0,75 \pm 0,02	0,27 \pm 0,13	1,02 \pm 0,11	32	1,12 \pm 0,02	1,13 \pm 0,04
	8	0,65 \pm 0,01	0,38 \pm 0,06	1,02 \pm 0,05	42	1,03 \pm 0,03	1,09 \pm 0,06
	24	0,58 \pm 0,10	0,60 \pm 0,33	1,18 \pm 0,23	48	1,15 \pm 0,06	1,20 \pm 0,05
10	0	10,96 \pm 0,22	-	10,96 \pm 0,22	-	11,28 \pm 0,17	11,13 \pm 0,30
	4	9,50 \pm 0,06	1,05 \pm 0,06	10,55 \pm 0,12	13	11,29 \pm 0,22	10,53 \pm 1,55
	6	8,36 \pm 0,47	1,40 \pm 0,06	9,76 \pm 0,42	24	11,03 \pm 0,09	11,39 \pm 0,44
	8	7,63 \pm 0,28	1,34 \pm 0,25	8,99 \pm 0,03	30	9,96 \pm 0,25	10,04 \pm 0,05
	24	6,65 \pm 0,84	3,46 \pm 0,99	10,11 \pm 0,14	39	11,24 \pm 0,44	11,32 \pm 0,07
100	0	105,47 \pm 4,27	-	105,47 \pm 4,27	-	105,56 \pm 41,02	111,34 \pm 6,43
	4	97,29 \pm 1,68	3,63 \pm 7,27	100,92 \pm 5,14	10	106,97 \pm 0,73	103,59 \pm 0,75
	6	91,14 \pm 1,89	1,46 \pm 0,33	92,60 \pm 2,22	16	113,02 \pm 2,11	115,77 \pm 12,65
	8	87,18 \pm 5,76	3,25 \pm 0,62	90,42 \pm 2,97	19	108,04 \pm 0,26	105,76 \pm 7,61
	24	84,48 \pm 1,69	8,69 \pm 1,28	93,17 \pm 2,97	22	106,52 \pm 3,58	110,96 \pm 4,00

4 Ergebnisse

4.2.2.4 Blut

Bei inhalativer Exposition zirkuliert NVP nach Resorption im Blutkreislauf. Um eine mögliche Metabolisierung im Blut zu untersuchen, wurde NVP (100 µM) in Vollblut weiblicher Wistar Ratten inkubiert und anschließend die Konzentrationen von NVP und 2-Pyrrolidon mittels GC-MS bestimmt.

Die analysierten Konzentrationen von NVP und 2-Pyrrolidon der Matrixproben, welche nicht mit NVP inkubiert wurden, lagen zu allen Zeitpunkten unterhalb der LOQ (NVP: 0,1 µmol/L; 2-Pyrrolidon: 0,6 µmol/L) der Messreihe. Die NVP-Konzentrationen der mitgeführten Qualitätsstandards (n=3), welche eine definierte Menge NVP enthielten, lagen einheitlich etwa 20 - 25% über der Nominalkonzentration. Aus diesem Grund wurden die NVP-Konzentrationen der Inkubate um diesen Faktor korrigiert.

Nach ein-, zwei- und vierstündiger NVP-Inkubation bzw. nach direkter Beendigung der Inkubation nach NVP-Zugabe (Negativkontrolle) wurden die folgenden NVP-Konzentrationen ermittelt: 111,5 µmol/L, 74,2 µmol/L und 109,5 µmol/L bzw. 101,7 µmol/L (Tabelle 54). Verglichen mit der Negativkontrolle war somit lediglich nach zweistündiger Inkubation eine Verringerung der NVP-Konzentration um etwa 27% festzustellen, während dies nach ein- und vierstündiger Inkubation nicht zu beobachten war. Die verringerte NVP-Konzentration nach zweistündiger Inkubation wird daher als Artefakt bewertet.

Diese These wird durch die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von 2-Pyrrolidon gestützt. Die analysierten Konzentrationen von 2-Pyrrolidon lagen in allen Inkubaten unterhalb der LOQ von 0,6 µmol/L. Demnach kann eine Hydrolyse von NVP zu 2-Pyrrolidon unter den gewählten Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden.

NVP wurde abschließend unter den gegebenen Versuchsbedingungen über 4 Stunden als stabil in Rattenblut bewertet. Somit liegt kein Hinweis auf die Bildung eines Metaboliten in Blut vor, welcher für die NVP-vermittelte Hepatokarzinogenese relevant sein könnte.

Tabelle 54: Ergebnisse der NVP-Inkubation in Rattenvollblut

Proben- bezeichnung	Zeitpunkt [h]	c(NVP) [µmol/L]	c(NVP)_{korrigiert} [µmol/L]
aktive Inkubation	0	124,95	101,73
	1	136,96	111,50
	2	91,14	74,20
	4	134,47	109,47

5 Diskussion

5.1 Mechanistische Untersuchungen *in vivo*: Fünftägige NVP-Inhalationsstudie mit Wistar Ratten

5.1.1 Befunde

5.1.1.1 Klinische Befunde

Die Auswahl valider Dosierungen ist ein wesentlicher Punkt jeder *in vivo* Studie. Als höchste Dosis in Gentoxizitätsstudien wie dem MNT sollte prinzipiell die maximal tolerierbare Dosis (MTD) gewählt werden, während in der niedrigsten Dosierung möglichst keine Toxizität auftreten sollte. Die MTD ist definiert als die Dosis, welche relativ zur Studiendauer eine nicht studienlimitierende Toxizität im Tier induziert, z.B. eine tolerable Reduktion des Körpergewichts oder geringe Zytotoxizität auf das zu untersuchende Zielorgan. Ein Effekt auf das hämatopoetische System im MNT, ist als Zeichen der systemischen Verfügbarkeit der Testsubstanz zulässig, während Mortalität oder Anzeichen von starken Schmerzen im Tier unerwünscht sind [OECD, 2000; OECD, 474, 2016; OECD 489, 2014].

Für die in dieser Arbeit beschriebene fünftägigen NVP-Inhalationsstudie wurden die Dosisgruppen anhand der Expositionskonzentrationen (5, 10, 20 ppm) der kombinierten chronischen Toxizitäts- und Kanzerogenitätsstudie (OECD 451) [Klimisch *et al.*, 1997b] gewählt, um potentielle Gentoxizität und weitere Mechanismen der Hepatokanzerogenese unter kanzerogenen Dosen zu untersuchen.

Klinische Symptome, welche bei NVP exponierten Ratten beobachtet wurden, beschränkten sich auf roten Nasenausfluss und erhöhten Speichelfluss in einzelnen Tieren sowie eine statistisch signifikante Verzögerung der Körpergewichtsentwicklung in der Mittel- und Hochdosisgruppe der männlichen Tiere und der Hochdosisgruppe der weiblichen Tiere.

Die beobachteten klinischen Symptome (roter Nasenausfluss, erhöhter Speichelfluss) einzelner exponierter Tiere lassen auf eine Reizwirkung von NVP schließen. Dies wird durch die Einstufung NVPs gemäß Annex VI der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (CLP) als STOT SE 3, H335 „Kann die Atemwege reizen.“ [CLP, 2008] und die bereits beschriebene Reizwirkung in der Nasenhöhle nach subchronischer Inhalationsexposition gegenüber 5 ppm bestätigt [Klimisch *et al.*, 1997a; MAK, 1991 & 2014].

Die in den NVP exponierten Ratten beobachtete systemische Toxizität beschränkte sich auf dosisabhängige Effekte auf das Körpergewicht. Das Körpergewicht der gegen 20 ppm NVP exponierten Tiere der Inhalationsstudie beider Geschlechter zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. In der mittleren Dosisgruppe (10 ppm) beider Geschlechter war eine verzögerte Körpergewichtsentwicklung zu erkennen, allerdings wies

dieser Befund nur bei den männlichen Ratten statistische Signifikanz auf. Die Körpergewichte der Niedrigdosisgruppe blieben gegenüber der Vehikelkontrollgruppe unverändert.

Klimisch *et al.* [Klimisch *et al.*, 1997b] stellte während der Kanzerogenitätsstudie vergleichbare Auswirkungen auf das Körpergewicht fest. Die in der vorliegenden Studie beobachtete Körpergewichtsabnahme in beiden Geschlechtern der gegen 20 ppm NVP exponierten Tiere, wurde auch in der Kanzerogenitätsstudie nach einwöchiger NVP-Exposition beobachtet. Die mittlere Expositionskonzentration (10 ppm) führte während der Kanzerogenitätsstudie nach einer Woche in den männlichen und nach 2 Wochen in den weiblichen Ratten zu einer reduzierten Körpergewichtszunahme verglichen mit der Kontrollgruppe. Dieser Effekt auf das Körpergewicht der männlichen 10 ppm Expositionsgruppe, konnte auch in der fünftägigen Inhalationsstudie beobachtet werden. Eine konkrete Aussage zum weiteren Gewichtsverlauf der weiblichen Tiere kann aufgrund der Studiendauer von nur fünf Tagen nicht getroffen werden. Innerhalb der in dieser Arbeit beschriebenen Inhalationsstudie wurden nach der Expositionsperiode keine Effekte auf das Körpergewicht der Niedrigdosisgruppe (5 ppm) im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Auch dies wird durch die Daten der Kanzerogenitätsstudie bestätigt, in welcher nach einer Woche Expositionsperiode ebenfalls keine Effekte auf das Körpergewicht verzeichnet wurden. Im weiteren Verlauf der Kanzerogenitätsstudie glichen sich die Körpergewichte der Dosis- und Kontrollgruppen an.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die bereits beschriebenen Effekte der Testsubstanz NVP auf das Körpergewicht der exponierten Tiere, sowie dessen bekannte Reizwirkung auf den Atemtrakt, in der fünftägigen Inhalationsstudie reproduziert wurden. Die eingesetzten Expositionskonzentrationen, welche aus der Kanzerogenitätsstudie abgeleitet wurden, zeigten systemische Effekte in der mittleren und der Hochdosisgruppe, jedoch nicht in der Niedrigdosisgruppe.

5.1.1.2 Histologische Befunde

Die histologische Untersuchung der Leber war nicht im Fokus der in dieser Arbeit beschriebenen NVP-Inhalationsstudie. Aufgrund der makroskopisch beobachteten Effekte auf die Leber in der männlichen Hochdosisgruppe (punktuelle Aufhellungen), wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurde vornehmlich in den Lebern männlicher Tiere ein dosisabhängiger Anstieg der Inzidenz und des Schweregrads zentrolobulärer Vakuolenbildung gezeigt.

5 Diskussion

Aufgrund des charakteristischen Erscheinungsbilds wurde die Hypothese einer Lipideinlagerung in den zentrolobulär auftretenden Vakuolen aufgestellt. Die Hypothese einer möglichen Lipideinlagerung in den Vakuolen konnte mittels ORO-Färbung nur in einem männlichen und einem weiblichen Tier der Hochdosisgruppe (20 ppm) bestätigt werden. Mögliche Erklärungen, warum der Inhalt der Vakuolen nicht in allen Tieren als Lipid identifiziert wurde sind: (1) Es handelt sich nicht um Lipid. (2) Das Lebergewebe war durch die beanspruchende Vorbehandlung (Einfrieren, Auftauen, Formalinbehandlung, Wässern, Einfrieren) und die damit möglicherweise verbundene Eiskristallbildung bereits so geschädigt, dass die Lipide während des Färbeprozesses ausgewaschen wurden. (3) Die Vakuolen enthalten nicht verestertes Cholesterin, welches durch ORO nicht angefärbt wird [Fowler & Greenspan, 1985; Kruth, 1984].

Auch in männlichen F344-Ratten und C57Bl-Mäusen wurden bereits nach siebentägiger NVP-Exposition (45 ppm) zentrolobulär vergrößerte Hepatozyten mit leerem oder granulärem Zytoplasma beobachtet. Die Vakuolen wurden als Lipidansammlungen interpretiert, eine lipidspezifische Färbung wurde allerdings nicht durchgeführt [Klimisch *et al.*, 1997a]. Die Ergebnisse der fünftägigen NVP-Inhalationsstudie geben eindeutige Hinweise, dass die zentrolobuläre Vakuolenbildung bereits bei geringeren NVP-Konzentrationen (20 ppm) vor allem in männlichen Tieren auftritt. Die zentrolobulären Vakuolen zeigten das typische Erscheinungsbild von in Hepatozyten eingelagertem Lipid. Um den Inhalt der beobachteten Vakuolen allerdings eindeutig als Lipid zu identifizieren, wären weitere Untersuchungen mit spezifisch zur Färbung aufgearbeitetem Material, sowie eine spezielle Färbetechnik von Vorteil, die auch nicht verestertes Cholesterin erfasst.

Ob die beobachteten zentrolobulären Vakuolen mit der NVP-vermittelten Hepatokarzinogenese in Zusammenhang stehen, kann anhand der bestehenden Daten nicht beantwortet werden. Weiterhin zeigten sich die weiblichen Tiere bezogen auf die zentrolobuläre Vakuolenbildung als tendenziell weniger empfindlich im Vergleich zu den männlichen Ratten, die hepatokarzinogene Potenz NVPs ist jedoch in beiden Geschlechtern vergleichbar [Klimisch *et al.*, 1997b].

5.1.2 Gentoxizität

5.1.2.1 Mikronukleus Test

Der Mikronukleus/Mikrokern Test (MNT) ist eine regulatorisch anerkannte und in der OECD Prüfvorschrift 474 beschriebene Methode zur Untersuchung des chromosomen-schädigenden Potentials von Substanzen. Im Rahmen der NVP-Inhalationsstudie wurde die Induktion von Mikrokernen in Vorläuferzellen von Erythrozyten analysiert, welche aus den Femora von Ratten nach fünftägiger NVP-Exposition gewonnen wurden.

Da das Knochenmark, bzw. die unreifen polychromatischen Erythrozyten (PCE) im Knochenmark, die Untersuchungsgrundlage dieses Testsystems darstellen, sollte untersucht werden, ob NVP und/oder dessen Metabolite das Zielgewebe erreicht. Zytotoxische Effekte auf das blutbildende System geben einen Hinweis, dass die Testsubstanz oder einer ihrer Metaboliten nach inhalativer Gabe das Knochenmark erreicht hat. Ein leicht toxischer Effekt auf die Erythropoese wurde in männlichen Tieren der Hochdosisgruppe (20 ppm) beobachtet. In dieser Gruppe war der Anteil an polychromatischen Erythrozyten (PCE) im Vergleich zur Vehikelkontrollgruppe um 10% erniedrigt, was als Hinweis auf das Erreichen des Knochenmarks durch die Testsubstanz gewertet wurde.

Ergebnisse zu hämatologischen Parametern einiger vorangegangener NVP-Inhalationsstudien stützen diese These. Nach einer Inhalationsexpositionszeit von mindestens sechs Wochen zeigte sich sowohl in CD57BI Mäusen, als auch in Sprague-Dawley und F344 Ratten ab einer NVP-Expositionskonzentration von 15 ppm eine Erniedrigungen des Hämoglobins, des Hämatokrits und der roten Blutzellen [Klimisch *et al.*, 1997a]. Die beobachtete Anämie könnte in einer geringeren Hämoglobinsynthese begründet sein und liefert einen Hinweis, dass NVP, unabhängig der Nagerspezies im Knochenmark verfügbar und toxikologisch aktiv ist.

Mit Blick auf die Anzahl der Mikrokerne als Gentoxizitätsparameter, wurde weder in den männlichen noch in den weiblichen Wistar Ratten eine Erhöhung der Mikrokernanzahl in PCE oder NCE gegenüber der mitgeführten oder der historischen Vehikelkontrollgruppe festgestellt. NVP zeigte sich demnach in der durchgeführten *in vivo* Inhalations-gentoxizitätsstudie bei valider Positivkontrolle als nicht gentoxisch im MNT.

Zur Untersuchung der Gentoxizität NVPs *in vivo* wurde bereits 1993 ein MNT im Knochenmark von NMRI Mäusen beider Geschlechter nach einmaliger oraler NVP-Gabe per Schlundsonde durchgeführt. Neben den NVP-Dosisgruppen (150, 300, 600 mg/kg KG) wurde parallel eine Vehikelkontrollgruppe, sowie je eine Positivkontrollgruppe für aneugenes (0,15 mg Vincristin/kg KG) und klastogenes (20 mg Cyclophosphamid/kg KG) Potential mitgeführt. Weder die Inzidenz an kleinen ($< \frac{1}{4}$ des Zelldurchmessers) noch an großen ($> \frac{1}{4}$ des Zelldurchmessers) Mikrokernen war in den NVP-dosierten Mäusen dieser Studie erhöht.

5 Diskussion

Demnach zeigte der MNT nach oraler Applikation, analog zur aktuellen Inhalationsstudie, ebenfalls keinen Hinweis auf klastogenes oder aneugenes Potential von NVP [BASF, 1993]. Der aktuelle MNT nach fünftägiger NVP-Inhalationsexposition ist aufgrund des Studiendesigns, verglichen mit dem 1993 abgeschlossenen MNT nach oraler Applikation, hinsichtlich einer Aussage zur Genotoxizität NVPs als zuverlässiger einzustufen. Die folgenden Argumente können für die höhere Zuverlässigkeit der Inhalationsstudie angeführt werden: (1) Der MNT der vorangegangenen Studie wurde in der Maus durchgeführt, die kanzerogene Wirkung ist allerdings in der Ratte beschrieben. Die Spezies Ratte, ist demnach der Maus zur Untersuchung der Genotoxizität vorzuziehen. (2) Die chromosomenschädigende Wirkung wurde in der MNT Studie von 1993 nach oraler Applikation untersucht, Kanzerogenität wurde aber nach inhalativer NVP-Exposition beobachtet. Die Exposition über die Inhalationsroute zur Untersuchung des kanzerogenen Mechanismus von NVP, wie in der aktuellen MNT Studie durchgeführt, ist demnach zu bevorzugen. (3) Der orale Zufuhrweg birgt den Nachteil, dass NVP aufgrund seiner Säurelabilität im Magen der Tiere zumindest teilweise zu 2-Pyrrolidon und Acetaldehyd hydrolysiert, was in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde (siehe Kapitel 4.2.1). Somit ist anzunehmen, dass innerhalb der oralen MNT Studie nur eine unbestimmte NVP Teildosis das Knochenmark erreichte, was mit einem potentiell falsch negativen Ergebnis dieses MNT einhergehen könnte. Im aktuellen MNT wurden exakt die Expositionskonzentrationen eingesetzt, die in der chronischen Studie zu Tumoren in Ratten führten, weshalb die fünftägige Inhalationsstudie auch mit Hinblick auf die NVP-Expositionskonzentrationen als aussagekräftiger einzustufen ist.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass das negative Ergebnis des 1993 [BASF, 1993] durchgeführten oralen MNT an der Maus innerhalb des MNT nach fünftägiger Inhalationsexposition bestätigt wurde. Zudem ist die Zuverlässigkeit des MNT nach fünftägiger NVP-Inhalation höher zu bewerten, da dieser unter Berücksichtigung der relevanten Spezies, sowie der relevanten Expositionsrouten bei kanzerogenen Testkonzentrationen keinen Hinweis auf Genotoxizität lieferte.

5.1.2.2 Comet Assay

Der alkalische Comet Assay stellt DNA-Strangbrüche und alkalilabile Stellen auf dem Niveau einer einzelnen Zelle dar und ist seit September 2014 regulatorisch durch die OECD Prüfvorschrift 489 eingebunden [OECD 489, 2016].

In der fünftägigen NVP-Inhalationsstudie wurde der Comet Assay in der Leber, dem Hauptzielorgan der NVP-vermittelten Kanzerogenese, und in der Lunge, dem Organ des Erstkontakts bei Inhalationsexposition, durchgeführt. Die Durchführung erfolgte zum einen nach der konventionellen alkalischen Methode und zum anderen mit Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (FPG), welche in der Literatur vornehmlich zur Detektion von oxidativen DNA-Schäden beschrieben ist. Als Parameter der DNA-Schädigung wurde gemäß den Empfehlungen in der Literatur und der OECD Prüfvorschrift 489 die Tail Intensity (TI) gewählt, da diese geräte- und softwareunabhängig ist [Burlinson *et al.*, 2007; OECD 489, 2016].

Prinzipiell sollte bei der Testung auf Gentoxizität die mögliche zytotoxische Wirkung der Testsubstanz berücksichtigt werden, da primäre DNA-Schädigung auch durch Zytotoxine ausgelöst werden kann. Dies ist in der DNA-Fragmentierung begründet, die während der Apoptose einsetzt und eine DNA-Migration während des Comet Assays bedingen könnte, was fälschlicherweise als Gentoxizität identifiziert werden könnte [Burlinson *et al.*, 2007].

Daher wurde Zytotoxizität in der Literatur bereits als Störvariable für die Durchführung des Comet Assays *in vitro* beschrieben [Henderson *et al.*, 1998; OECD 489, 2016; Olive & Banath, 1995]. Es liegen allerdings Hinweise vor, die vermuten lassen, dass der Einfluss möglicher Zytotoxizität und demnach eines falsch positiven Ergebnisses des Comet Assays *in vivo*, verglichen mit der Durchführung *in vitro*, geringer ist [Burlinson *et al.*, 2007; OECD 489, 2016]. Nesslany *et al.* untersuchten verschiedene gentoxisch und nicht gentoxisch wirkende, für den Nager bekannte Nephrokanzerogene, sowie zwei nephrotoxische Substanzen (Streptomycin, Indomethacin) im Comet Assay. Dieser lieferte lediglich im Falle der getesteten gentoxisch wirkenden Substanzen ein positives Ergebnis und demnach keine Erhöhung der DNA-Migration beim Einsatz der getesteten Nephrotoxine [Nesslany *et al.*, 2007]. Einen weiteren Hinweis, dass der *in vivo* Comet Assay nicht sehr empfindlich gegenüber zytotoxischen Einflüssen ist, konnten Hartmann *et al.*, sowie Rothfuss *et al.* in der Leber zeigen. Auch hier war die DNA-Migration gegenüber der Kontrolle in der Leber nach Dosierung von nicht gentoxischen Hepatotoxinen nicht erhöht [Hartmann *et al.*, 2004; Rothfuss *et al.*, 2011].

Da ein Einfluss der Zytotoxizität auf den *in vivo* Comet Assay aber nach derzeitigem Kenntnisstand nicht ausgeschlossen werden kann, wird laut OECD 489 [OECD 489, 2016] in Anlehnung an die Ergebnisse der Validierungsstudie des *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods* (JaCVAM) und der Arbeitsgruppe „Gentoxizität“ [Burlinson *et al.*, 2007] empfohlen, Zytotoxizität im Zielorgan, vor allem im Fall einer beobachteten erhöhten DNA-Migration, zu untersuchen. Ein Goldstandard bzw. eine zu bevorzugende Methode zur

5 Diskussion

Untersuchung der Zytotoxizität in diesem Testsystem wurde bisher nicht festgelegt [OECD 489, 2016]. Als mögliche Untersuchungsmethoden werden histologische Untersuchungen der im Comet Assay eingesetzten Organe, sowie kolorimetrische zytotoxikologische Nachweismethoden auf Zellebene wie Farbekklusionstests genannt [Burlinson *et al.*, 2007; OECD 489, 2014].

Innerhalb der fünftägigen NVP-Inhalationsstudie wurde die Membranintegrität von Leber- und Lungenzellen mittels eines Farbekklusionstests zur Zytotoxizitätsprüfung herangezogen, welcher direkt nach Entnahme der Organe erfolgte. Alle für den Comet Assay eingesetzten Organe wiesen hierbei eine Viabilität von > 90% auf, sodass kein Hinweis auf einen Einfluss potentieller Zytotoxizität der Testsubstanz NVP auf die DNA-Migration in Leber und Lunge während des Comet Assays besteht.

Weiterhin wurden nachträglich histopathologische Untersuchungen der Leber vorgenommen, welche nach HE-Färbung keinen Hinweis auf eine erhöhte Anzahl nekrotischer oder apoptotischer Leberzellen in den NVP-Dosisgruppen im Vergleich zur Vehikelkontrollgruppe zeigten, sodass auch histologische Untersuchungen keinen Hinweis auf Zytotoxizität in der Leber lieferten. Jedoch sollten die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen vorsichtig bewertet werden, da das Gewebe vor diesen bereits eingefroren war und aufgrund des Einfrier- und Auftauvorgangs Artefakte durch die prozessbedingte Schädigung des Gewebes nicht ausgeschlossen werden können.

Als weiterer Marker der Zytotoxizität einer Testsubstanz wird in der Literatur das vermehrte Auftreten sogenannter Hedgehog-Zellen diskutiert, welche sich durch einen sehr kleinen oder nicht vorhandenen Kopf und einen langen diffusen Schweif auszeichnen. Da die Ursache ihrer Entstehung bisher nicht abschließend geklärt ist, wurden diese in der NVP-Inhalationsstudie, wie laut OECD TG 489 empfohlen, getrennt von der Bildanalyse erfasst [OECD 489, 2016]. Die DNA von *Hedgehogs* ist stark geschädigt, weshalb sie in der Literatur als Marker für Zytotoxizität beschrieben wurden, da Apoptose und Nekrose zu DNA-Doppelstrangbrüchen führt und demnach im Comet Assay detektiert werden könnte [Bowen *et al.*, 2011; Henderson *et al.*, 1998; Olive & Banath, 1995]. Allerdings sind mittlerweile zahlreiche Publikationen erschienen, welche der Annahme der Zytotoxizität als alleinigen verantwortlichen Parameter für das Auftreten von *Hedgehogs* widersprechen und deren Anzahl demnach als Parameter zur Zytotoxizitätsuntersuchung nicht empfehlen. Es konnte gezeigt werden, dass *Hedgehogs* auch nach Inkubation von nukleärer DNA anstelle von Zellen detektiert werden konnten, was eine Zytotoxizität als Ursache für deren Entstehung ausschließt [Vasquez, 2012]. Meintières *et al.* verzeichnete im *in vitro* Comet Assay bei bestehender Zytotoxizität keine erhöhte Inzidenz von *Hedgehogs* [Meintières *et al.*, 2013]. Weiterhin konnte im *in vitro* Comet Assay gezeigt werden, dass die Anzahl von direkt nach Exposition gemessenen Wasserstoffperoxid-induzierten *Hedgehogs*, nach weiterer Inkubation der Zellen in Wasserstoffperoxid-freiem Medium

reduziert wird [Lorenzo *et al.*, 2013]. Eine Hypothese zur Erklärung der Hedgehog-Reduktion ist, dass die DNA apoptotischer Zellen zu Oligonucleotiden abgebaut wird und deshalb im Comet Assay nicht mehr detektiert werden kann. Lorenzo *et al.* konnten diese These widerlegen, da die Zelldichte zum späteren Messzeitpunkt nicht verringert war [Lorenzo *et al.*, 2013]. Apoptotische Zellen können nicht repariert werden, daher spricht diese Untersuchung gegen das Vorliegen von Zytotoxizität und für eine Reparatur des gesetzten genotoxischen Schadens; d.h. *Hedgehogs* könnten auch Anzeichen für einen gerade ablaufenden DNA-Reparaturprozess sein. Diese Vermutung wird durch die Untersuchungen von Rundell *et al.* unterstützt, welche eine Verringerung der Hedgehog-Anzahl nach Nachinkubation ohne Nucleotidverlust nachwies [Rundell *et al.*, 2003]. Allerdings sind *Hedgehogs* nicht diagnostisch für einen verlaufenden DNA-Reparaturprozess. Lorenzo *et al.* zeigten, dass *Hedgehogs* durchaus auch nach bestimmten Inkubationszeiträumen mit der zytotoxischen Substanz Natriumdodecylsulfat im Comet Assay auftraten, das heißt, dass erste Stadien der Apoptose im Comet Assay als *Hedgehogs* erkannt werden können [Lorenzo *et al.*, 2013]. Ein weiterer Parameter, welcher vor allem *in vivo* eine wichtige Rolle bei der DNA-Migration und der Häufigkeit an *Hedgehogs* spielt, ist der Lagerungszeitraum, sowie die Lagerungstemperatur der Einzelzellsuspension während der Aufarbeitung der Organe zum Comet Assay. Guerard *et al.* beschrieben, dass die Anzahl der *Hedgehogs*, sowie die mittlere DNA-Migration nach Lagerung der Einzelzellsuspension bei Raumtemperatur schon nach einer Stunde signifikant anstieg, wobei eine Lagerung von bis zu 8 Stunden auf Eis die DNA-Migration nicht nennenswert beeinflusste [Guerard *et al.*, 2014].

Nach Bewertung der Datenlage zur Entstehungsursache von *Hedgehogs* sollten diese nicht als Diagnoseparameter der Zytotoxizität aufgefasst werden, da neben der Zytotoxizität auch extreme genotoxische Schäden, einsetzende DNA-Reparatur, oder auch eine unsachgemäße Lagerung bei der Probenaufarbeitung ursächlich sein können. Jedoch können Informationen zum prozentualen Anteil von *Hedgehogs* innerhalb eines Comet Assays hilfreich sein um toxikologische Beobachtungen in einer Comet Assay Studie zu interpretieren.

In der NVP-Inhalationsstudie wurde weder eine dosisabhängige Erhöhung der Anzahl an Hedgehog-Zellen, noch ein signifikanter Unterschied der Expositionsgruppen zur Vehikelgruppe festgestellt.

Dies gilt sowohl für den Comet Assay in der Leber, als auch in der Lunge mit und ohne FPG-Modifikation der NVP exponierten Gruppen. Demnach ist weder ein Hinweis auf NVP-induzierte Zytotoxizität, noch auf einsetzende DNA-Reparatur gegeben. Die Anzahl der *Hedgehogs* der EMS-Kontrollen war sowohl in der Leber, als auch in der Lunge mit und ohne FPG-Modifikation im Vergleich zur Vehikelkontrolle erhöht. Während die Hedgehog-Häufigkeit der EMS-Kontrollen nach konventioneller Comet Assay Durchführung von etwa 3 - 4% auf 7 - 8%, d.h. um einen Faktor 2 erhöht war, wurden nach FPG-Modifikation ausschließlich

Hedgehogs in den EMS-Kontrollen detektiert. Guerard *et al.* beschrieben *Hedgehog*-Anteile von bis zu 6,2% im Comet-Assay, durchgeführt in der Leber EMS-behandelter Positivkontrollen [Guerard *et al.*, 2014]. Weiterhin beschrieben Stankowski *et al.* eine Erhöhung der *Hedgehog*-Anzahl nach EMS-Applikation um einen Faktor 2 bis 4 in der Lunge und bis zu 8 in der Leber [Stankowski *et al.*, 2015]. Der Anstieg der *Hedgehogs* in der EMS-behandelten Positivkontrollgruppe innerhalb der in dieser Arbeit beschriebenen Studie liegt demnach nahe an den in der Literatur berichteten Daten.

Der Anstieg der *Hedgehog*-Anzahl im konventionellen Comet Assay nach EMS-Dosierung, sowie die ausschließliche Detektion von *Hedgehogs* in der EMS-Gruppe nach FPG-Modifikation, sprechen zudem gegen die Theorie, dass *Hedgehogs* indikativ für Zytotoxizität sind. Die *Hedgehogs* der Positivkontrolle wurden in der beschriebenen Studie eindeutig durch genotoxische Schäden induziert, denn eine Erhöhung der *Hedgehog*-Anzahl wurde durch die Behandlung mit FPG hervorgerufen, welche spezifische DNA-Schäden als Strangbruch im Comet Assay sichtbar macht. Die erhaltenen Ergebnisse der EMS-Positivkontrolle dieser Studie unterstützen demnach die neueren Erkenntnisse [Burlinson *et al.*, 2007, Guerard *et al.*, 2014; Lorenzo *et al.*, 2013; OECD 489, 2016; Rundell *et al.*, 2003; Vasquez, 2012], dass *Hedgehogs* nicht automatisch einer zytotoxischen Wirkung der Testsubstanz zugeordnet werden sollten, sondern auch das Ergebnis einer erheblichen genotoxischen Schädigung, bzw. von DNA-Reparatur sein können.

Ein weiterer relevanter Parameter zur Sicherstellung der Validität der Ergebnisse des Comet Assays sind Positivkontrollen, welche bei jeder Durchführung mitgeführt werden sollten. Wie in Kapitel 4.1.3.2 beschrieben, wurden im konventionellen Comet Assay in den untersuchten Organen Leber und Lunge der EMS behandelten Tiere statistisch signifikante Erhöhungen der DNA-Strangbrüche, gemessen als TI, festgestellt und der Assay demnach als valide eingestuft. Laut OECD Prüfrichtlinie 489 [OECD 489, 2016] sollten die erhobenen Positivkontrolldaten weiterhin mit den historischen Kontrolldaten des Testlabors verglichen werden. Für das Testorgan Lunge lagen historische Kontrolldaten des Labors vor, deren TI mit $55 \pm 17,5\%$ (n=34) um einen Faktor 2 - 3 höher liegt als die ermittelte TI der aktuellen Studie von $17,8 \pm 3,9\%$. Dieser Unterschied kann in der unterschiedlichen EMS-Dosierung begründet sein: In den Studien, die den historischen Daten zugrunde lagen, wurden die Tiere mit 300 mg/kg KG EMS appliziert, in der aktuellen Studie wurden 200 mg/kg KG EMS eingesetzt.

Historische Kontrolldaten zum Zielorgan Leber lagen zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie im Testlabor nicht vor. Die in der Fachliteratur publizierten TI-Werte der Leber nach EMS-Dosierung mit 200 mg/kg KG von 14% [O'Donovan & Burlinson, 2013] bis 20% [Guerard *et al.*, 2014; McNamee & Bellier, 2015] bestätigten die Validität der ermittelten TI-Werte der Leber im aktuellen Comet Assay, da diese mit 17% bis 19% innerhalb des in der Literatur

beschriebenen Bereichs lagen. Demnach wurden die EMS-Positivkontrollen in Leber und Lunge nach konventioneller Durchführung des Comet Assays abschließend als valide eingestuft.

EMS, welches als direktes DNA-Alkylans der N7-Position des Guanins agiert [Doerjer *et al.*, 1984], wurde auch als Positivkontrolle im Comet Assay mit FPG-Modifikation eingesetzt. Die bakterielle Endonuklease FPG wird in der Literatur vor allem zur Erkennung von oxidativen DNA-Schäden wie 8-OH-Guanin beschrieben [Albertini *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000], ist aber auch in der Lage N7-Alkylierungen des Guanins zu erkennen, wie sie von EMS hervorgerufen werden [Azqueta *et al.*, 2013; Azqueta & Collins, 2013; Speit *et al.*, 2004]. Speit *et al.* konnten zeigen, dass FPG die DNA-Migration nach EMS-Inkubation *in vitro* sogar in stärkerem Maß erhöht als nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid. Demnach ist FPG nach *in vitro* EMS-Inkubation in der Lage, N7-Alkylguaninaddukte sensitiv zu erkennen [Speit *et al.*, 2004]. Die Ergebnisse der NVP-Inhalationsstudie bestätigen, dass die durch EMS gesetzten DNA-Schäden durch FPG erkannt werden, da die TI und somit die DNA-Migration im zugehörigen Comet Assay nach FPG-Behandlung stark erhöht war. Zudem konnte mit der in dieser Arbeit beschriebenen Studie gezeigt werden, dass die Detektion der von EMS induzierten N7-Alkylguaninaddukte auch *in vivo* mit FPG möglich ist.

Weiterhin wurden die FPG-behandelten EMS-Positivkontrollen, wie bereits unter Kapitel 4.1.3.2 beschrieben, qualitativ bewertet, da eine statistische Auswertung aufgrund des alleinigen Auftretens von *Hedgehogs*, nicht möglich war. Eine eindeutige Erhöhung der DNA-Strangbrüche verglichen mit der FPG-behandelten Vehikelkontrolle, wie auch der EMS-Gruppe nach konventioneller Durchführung war dennoch eindeutig zu erkennen, weshalb die FPG-behandelte EMS-Kontrollgruppe als positiv eingestuft wurde.

Zusammenfassend ist der in dieser Arbeit beschriebene Comet Assay aufgrund der validen Positiv- und Vehikelkontrollgruppen bei Abwesenheit von Zytotoxizität in den untersuchten Organen Leber und Lunge als belastbar einzustufen.

Die Untersuchungen des Comet Assays zeigten weder in der Leber noch in der Lunge mit und ohne FPG-Modifikation Hinweise auf ein DNA-schädigendes Potential von NVP. Der konventionell durchgeführte alkalische Comet Assay detektiert DNA-Strangbrüche, wie auch alkalilabile Stellen (ALS). Mittels FPG-Modifikation werden weitere DNA-Läsionen als Strangbruch sichtbar, da FPG die folgenden Läsionen erkennt und in DNA-Strangbrüche übersetzt: 8-Hydroxyguanosin (8-OH-Guanin), 2,4-Diamino-6-hydroxy-5-formylamino-pyrimidine (Fapy-Guanin), 2,6-Diamino-5-formylamino-pyrimidine (Fapy-Adenin), sowie reguläre und 4'-oxidierte abasische Stellen (*AP sites*) [Epe *et al.*, 1993]. Letztere werden aufgrund der in FPG enthaltenen Lyase-Einheit in DNA-Strangbrüche umgewandelt, was die Sensitivität gegenüber nicht direkt DNA-strangbrechenden Substanzen erhöht [Azqueta *et al.*,

2013a]. Weitere Studien konnten zeigen, dass FPG außerdem zur Reparatur von N7-Alkylierungsprodukten des Guanins fähig ist [Gill *et al.*, 1996; He *et al.*, 2002; Li *et al.*, 1997] und weiterhin N7-Alkylierungen des Guanins mittels FPG im Comet Assay anhand verstärkter DNA-Migration detektiert werden [Azqueta *et al.*, 2013a; Speit *et al.*, 2004]. Aus diesem Grund sollte ein positives Resultat eines FPG Comet Assay bei unbekanntem Wirkmechanismus der Testsubstanz nicht automatisch oxidativen DNA-Schäden zugeordnet werden. Darüber hinaus konnten Azqueta *et al.* zeigen, dass FPG den *in vitro* Comet Assay in seiner Sensitivität erhöht ohne dabei die Spezifität zu verringern. Während bekannte, direkt wirkende gentoxische Stoffe wie MMS die DNA-Migration durch FPG erhöhten, zeigten Zytotoxine und Etoposid, ein Topoisomeraseinhibitor, diesen Effekt aufgrund ihres Wirkmechanismus nicht [Azqueta *et al.*, 2013a].

Im Fall der NVP-Inhalationsstudie bedeutet dies, dass eine potentielle Gentoxizität der Testsubstanz NVP nicht nur mit Hinblick auf die direkte Induktion von DNA-Strangbrüchen und alkalilabilen Stellen (konventioneller Comet Assay), sondern auch spezifisch auf oxidative und alkylierende DNA-Läsionen untersucht und als negativ bewertet wurde. Demnach ist der NVP-Inhalationsstudie kein Hinweis auf eine direkt DNA-strangbrechende Wirkung, eine oxidative Schädigung der DNA, eine Induktion abasischer Stellen durch Zuckerphosphatrückgrat destabilisierende DNA-Addukte, oder eine Alkylierung des N7-Guanins durch NVP zu entnehmen. Ein mit diesen DNA-Läsionen zusammenhängender Mechanismus der NVP-induzierten Hepatokanzerogenese kann daher ausgeschlossen werden.

Eine Steigerung der DNA-Migration nach NVP-Exposition war im Comet Assay, wie zuvor beschrieben, nicht zu beobachten. Allerdings wurde unerwarteterweise eine statistisch signifikante Erniedrigung der TI in Lungenzellen der männlichen Hochdosisgruppe (20 ppm) im konventionellen Comet Assay, sowie in der 5 ppm und 20 ppm Gruppe der FPG-Modifikation im Vergleich zur jeweiligen Vehikelkontrolle beobachtet. Eine Erniedrigung der TI im Comet Assay kann auf eine DNA-Quervernetzung durch die Testsubstanz hinweisen, da quervernetzte DNA weniger entfaltet ist und im elektrischen Feld deshalb weniger weit wandert. Soll eine Testsubstanz zielgerichtet auf DNA-quervernetzende Wirkung untersucht werden, muss das Studiendesign so gewählt sein, dass die DNA-Basalschädigung gesteigert wird, um eine Erniedrigung der TI der Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe eindeutig nachzuweisen. Möglichkeiten zur Erhöhung der DNA-Migration sind z.B. die Steigerung der Elektrophoresezeit oder die Behandlung der zu untersuchenden Zellen mit einer festgelegten Strahlendosis zusätzlich zur Testsubstanzapplikation [Merk & Speit, 1999; Singh, 2000]. Der Comet Assay in der beschriebenen NVP-Inhalationsstudie wurde konventionell durchgeführt und die Basalschädigung wurde möglichst gering gehalten um die Sensitivität des Comet Assays mit FPG-Modifikation zu gewährleisten, da hierbei eine Steigerung der DNA-Migration erwartet wurde. Die aktuelle Studie war somit nicht zur

Detektion einer potentiellen DNA-Quervernetzung durch NVP geeignet. Eine positive Aussage zu einer potentiell NVP-induzierten DNA-Quervernetzung aufgrund der statistisch signifikanten Erniedrigung der TI in der Lunge ist, begründet auf dem Studiendesign, nicht möglich. Ferner wurde die Verringerung der DNA-Migration ausschließlich in der Lunge der männlichen Ratten festgestellt. Da NVP in beiden Geschlechtern hepatokanzerogen wirkt und die Lunge kein Zielorgan der Kanzerogenese darstellt [Klimisch *et al.*, 1997b], wurde der beobachtete Effekt als statistisch signifikant aber nicht biologisch relevant bewertet und eine DNA-quervernetzende Eigenschaft von NVP als unwahrscheinlich erachtet.

Diese These wird durch eine DNA-Bindungsstudie (*i.p.*) mit ¹⁴C-markiertem NVP (N-Vinyl[α,β -¹⁴C]-2-pyrrolidon und N-Vinyl-2-pyrrolidone[5-¹⁴C]) in männlichen CD Ratten unterstützt. Die innerhalb dieser Studie getesteten Dosen betragen 150 und 300 mg NVP/kg KG und wurden entweder einmalig oder an 5 aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht. Die Lebern wurden 5 Stunden nach Einzelsubstanzgabe und bei fünfmaliger Applikation eine Stunde nach der letzten Dosierung entnommen. Eine Bindung von ¹⁴C-markiertem NVP oder seiner Metabolite an die DNA wurde zu keinem Zeitpunkt festgestellt [IRI, 1986]. Daher liegen keine Hinweise auf DNA-quervernetzende Eigenschaften NVPs vor, da in diesem Fall DNA-Addukte von NVP oder dessen Metaboliten zu erwarten gewesen wären.

Abschließend wurde der Comet Assay in Leber und Lunge nach fünftägiger Ganzkörperinhalationsexposition gegen kanzerogene NVP-Konzentrationen mit und ohne FPG als negativ bewertet. Hinweise auf eine durch NVP bedingte DNA-strangbrechende Wirkung, eine Alkylierung an der N7-Position des Guanins oder oxidative DNA-Schäden wurden unter den in dieser Arbeit beschriebenen experimentellen Bedingungen nicht beobachtet.

5.1.2.3 Abschließende Diskussion zur Gentoxizität NVPs

Das in dieser Arbeit beschriebene Projekt hat zum Ziel den hepatokanzerogenen Wirkmechanismus NVPs zu untersuchen, wobei eine mögliche Gentoxizität im Fokus stand. Ein Argument, welches einen gentoxischen Wirkmechanismus NVPs befürwortet, ist die von Klimisch *et al.* beschriebene niedrige kanzerogene Effektkonzentration in Ratten von 5 ppm nach Inhalationsexposition [Klimisch *et al.*, 1997b].

Mögliche Mechanismen einer NVP-vermittelten Gentoxizität sind unter anderem (1) DNA-Adduktbildung, z.B. nach Epoxidbildung an der Vinylstruktur, (2) die Induktion von DNA-Strangbrüchen, z.B. nach Adduktbildung und Destabilisierung des Zuckerphosphatrückgrates, aber auch (3) zytogenetische Schädigungen. Aus all diesen gentoxischen Ereignissen können Mutationen entstehen falls diese nicht vor der Zellteilung repariert werden. Zahlreiche bereits durchgeführte *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Gentoxizität und Mutagenität NVPs, welche alle ein negatives Ergebnis lieferten, sprechen gegen einen gentoxischen Mechanismus.

5 Diskussion

Mehrere Ames Tests in den *Salmonella typhimurium* Stämmen TA 100, TA98, TA1537 und TA1535, welche mit und ohne metabolisch aktivierendes System (S9-Mix) von Aroclor 1254-induzierten Ratten durchgeführt wurden, zeigten kein mutagenes Potential von NVP in Bakterienzellen bei Konzentrationen von bis zu 10.000 µg/Platte [BASF, 1978b; HRC, 1978c; Knaap, 1985; Simmon & Baden, 1980]. Auch die durchgeführten Mutagenitätstests in Säugerzellen, welche empfindlich für Mutationen im TK- und HPRT-Lokus sind, lieferten ein negatives Ergebnis nach NVP-Inkubation [Knaap, 1985; Litton Bionetics, 1980a]. Demnach konnte sowohl mit als auch ohne metabolisches System (S9-Mix) kein Potential NVPs zur Induktion von Leseraster- oder Punktmutationen festgestellt werden. Weiterhin wurde keine erhöhte Mutationsrate nach Inkubation des Salmonellenstammes TA98 mit NVP und dem Glutathion (GSH)-Depletor und Epoxidhydratasehemmer 1,1,1-Trichloropropene-2,3-oxid (TCPO) festgestellt [BASF, 1978b]. TCPO erhöht die Empfindlichkeit des Testsystems vor allem gegenüber Epoxiden, welche durch die Epoxidhydratase und GSH entgiftet werden, aber auch gegen weitere potentielle Metabolite, welche eine Entgiftung durch GSH benötigen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass ein möglicherweise gebildetes Epoxid, sowie weitere, durch GSH entgiftete Metabolite, für eine potentielle mutagene Wirkung von NVP *in vitro* keine Rolle spielen. Demnach sind alle durchgeführten Mutagenitätstests in Säuger-, wie in Bakterienzellen als negativ zu bewerten.

An den durchgeführten Mutagenitätstests zu NVP könnte kritisiert werden, dass der Ames Test entgegen der aktuellen OECD TG Prüfrichtlinie 471 in 4 und nicht in 5 Bakterienstämmen durchgeführt wurde. Ames Tests in den Stämmen *E. coli* WP2 oder *S. typhimurium* TA102, welche aus DNA-Quervernetzungen resultierende Mutationen besser erkennen können [Mortelmans & Zeiger, 2000; OECD 471, 1997], liegen für NVP nicht vor. Da keiner dieser beiden Bakterienstämme in den Mutagenitätstests eingesetzt wurde, lässt sich anhand dieser keine definitive Aussage zur Mutagenität NVPs aufgrund von DNA-Quervernetzung in Bakterienzellen treffen. Die strukturell sehr ähnliche Substanz N-Vinylcaprolactam (NVC), welche wie NVP hepatotoxisch wirkt und sich strukturell gegenüber NVP lediglich durch die Ringgröße von 6 gegenüber 4 Kohlenstoffatomen unterscheidet, wurde unter REACH gemäß aktueller OECD Prüfrichtlinie 471 auch im Bakterienstamm *E. coli* WP2 *uvrA* getestet [REACH Dossier NVC]. Das negative Testergebnis von NVC legt nahe, dass NVP, aufgrund der ähnlichen Struktur und toxischen Wirkung (gleiches Zielorgan), ebenso ein negatives Ergebnis liefern würde. Diese These wird durch die *in vivo* an CD Ratten durchgeführte DNA-Bindungsstudie unterstützt, in welcher kein Bindungspotential von NVP und dessen Metaboliten an DNA, RNA und Proteine im Zielorgan Leber festgestellt wurde [IRI, 1986]. Diese Studie hat gegenüber einem *in vitro* Mutationstest an Bakterienzellen die folgenden Vorteile: (1) Der Test wurde mit Ratten durchgeführt, der Spezies in der Kanzerogenese beobachtet wurde. (2) Der Test untersuchte DNA-Addukte in der Leber, dem Zielorgan der

Kanzerogenese. (3) Innerhalb der DNA-Bindungsstudie konnten nicht nur potentielle DNA-Bindungen NVPs sondern auch dessen Metaboliten erfasst werden, deren Bandbreite sich *in vivo* und *in vitro* zu unterscheiden scheinen (siehe Kapitel 5.2.2).

Der MNT nach fünftägiger NVP-Inhalation eignet sich bedingt zur Diskussion einer DNA-quervernetzenden Wirkung. Dieser Test untersucht nicht direkt den Endpunkt der DNA-Quervernetzung, jedoch können die im MNT untersuchten Chromosomenschäden durch DNA-Quervernetzungen induziert werden. Das negative Ergebnis des MNT bekräftigt daher die Abwesenheit eines DNA-quervernetzenden Potentials von NVP.

Der Comet Assay eignet sich aufgrund des Studiendesigns in diesem Fall nicht zur Diskussion einer DNA-Quervernetzung, da die Basalschädigung im Comet Assay zur Untersuchung dieses Endpunkts erhöht sein muss, um eine Reduktion der TI in den Behandlungsgruppen eindeutig zu detektieren. Dies war nicht Teil dieses Projekts, da die Basalschädigung zur Durchführung des Comet Assays mit FPG gering gehalten wurde.

Bezüglich der Untersuchung einer potentiellen, durch NVP-induzierten, DNA-Quervernetzung ist daher die DNA-Bindungsstudie als Schlüsselstudie zu bewerten, da diese den Effekt in der relevanten Spezies, sowie im Zielorgan der Kanzerogenese adressierte.

Abschließend liegt nach Diskussion der vorliegenden Daten kein Hinweis auf ein DNA-quervernetzendes Potential von NVP vor.

Eine weitere Studie, welche die potentielle DNA-Schädigung von NVP indirekt durch die Untersuchung der einsetzenden DNA-Reparatur nach NVP-Exposition *in vitro* an primären Rattenhepatozyten adressiert, ist der UDS Test. Dieses Testsystem, welches den Metabolismus, verglichen mit einem S9-Mix, der *in vivo* Situation näher darstellt, lieferte ein negatives Ergebnis [Litton Bionetics, 1980b]. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Sensitivität dieses Testsystems verglichen mit neueren Testmethoden geringer ist, weshalb der *in vitro* UDS Test (OECD TG 482) im Jahr 2013 aus dem Katalog der OECD Prüfvorschriften entfernt wurde. Allerdings bestätigt das negative Ergebnis des Comet Assays der NVP-Inhalationsstudie das Ergebnis des UDS-Tests, da kein Hinweis auf eine DNA-Schädigung durch NVP gefunden wurde.

Eine mögliche durch NVP vermittelte zytogenetische Schädigung wurde bereits *in vitro* mittels eines Chromosomenabberationstests an humanen Lymphozyten [BASF, 1987], sowie *in vivo* im Knochenmark der Maus nach oraler Dosierung untersucht [BASF, 1993]. Beide Testsysteme lieferten ein negatives Ergebnis, was durch den in dieser Arbeit beschriebenen MNT nach NVP-Inhalationsexposition bestätigt wird. Wie unter Kapitel 5.1.2.1 erläutert, ist der MNT der Inhalationsstudie im Hinblick auf eine zytogenetische Wirkung von NVP verglichen mit den beiden vorangehenden Studien als verlässlicher einzustufen, da kanzerogene Konzentrationen eingesetzt und mögliche Chromosomenschäden in der Spezies untersucht wurden, in welcher der hepatokanzerogene Effekt beschrieben wurde.

5 Diskussion

Keine der 3 beschriebenen Studien lieferte Hinweise auf eine chromosomenschädigende Wirkung NVPs. Auch NVP-strukturähnliche Substanzen wie NVC und N-Vinylformamid (NVF) zeigen keinen Hinweis auf eine zytogenetische Wirkung. Das bereits im vorigen Abschnitt genannte NVC lieferte ein negatives Ergebnis in einem *in vitro* Chromosomenabberationstest in V79-Zellen [REACH Dossier NVC]. NVF weist im Gegensatz zu NVP keine Ringstruktur auf, besitzt aber analog zu NVP eine Vinylgruppe am Stickstoffatom, sowie eine Oxo-Gruppe in α -Position zu diesem. Zudem ist das toxikologische Profil von NVF ähnlich dem des NVPs, da auch NVF nach subchronischer Inhalationsexposition Hepatotoxizität in Form von erhöhten Lebergewichten und zentrolobulärer Hypertrophie zeigt. Zu NVF liegt ein *in vivo* MNT im Knochenmark der Maus vor, welcher keine chromosomenschädigende Wirkung NVFs zeigte [REACH Dossier NVF].

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass NVP weder in *in vitro* Untersuchungen, noch im MNT *in vivo* nach oraler oder inhalativer Exposition chromosomenschädigende Wirkung zeigte. Weiterhin wird diese These durch die negativen *in vitro* und *in vivo* Studien der NVP-ähnlichen Substanzen NVC und NVF unterstützt. Folglich wurde ein chromosomenschädigender Wirkmechanismus der NVP-vermittelten Hepatokanzerogenese ausgeschlossen.

Weitere mögliche Mechanismen einer gentoxisch vermittelten Kanzerogenese sind DNA-strangbrechende Wirkung, sowie oxidativer Stress, welcher zu oxidativen DNA-Schäden führen kann. Beide Mechanismen wurden vor der in dieser Arbeit beschriebenen Inhalationsstudie nicht gezielt adressiert. Mittels des Comet Assays war es möglich diese beiden Mechanismen im Zielorgan der Hepatokanzerogenese zu untersuchen. Hierbei wurde in einem validen, konventionellen Comet Assay weder für NVP noch für dessen Metabolite, deren Entstehung *in vivo* erfasst würde, ein DNA-strangbrechendes Potential beobachtet. Zur sensitiven Darstellung möglicher oxidativer DNA-Schäden, wie 8-OH-Guanin, aber auch von DNA-Addukten, wie N7-Alkylierungen des Guanins, wurde der Comet Assay mit FPG durchgeführt. Auch mit dieser Modifikation zeigte sich keine erhöhte Inzidenz an DNA-Strangbrüchen, sodass ein Einfluss oxidativer DNA-Schäden auf den hepatokanzerogenen Wirkmechanismus NVPs ausgeschlossen wurde. Diese These wird durch die Untersuchung des GSH-Status der Leber der behandelten männlichen Tiere bestätigt, welcher sich verglichen mit der Vehikelkontrollgruppe nicht veränderte und somit keinen Hinweis auf oxidativen Stress lieferte (siehe 5.1.3).

Nach abschließender Berücksichtigung der verfügbaren Daten bezüglich der Gentoxizität NVPs, liegt kein Hinweis auf mutagene, DNA-strangbrechende oder chromosomenschädigende Wirkung von NVP vor. Folglich liegt kein Hinweis auf einen gentoxischen Wirkmechanismus der NVP-vermittelten Kanzerogenese vor.

5.1.3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress bezeichnet den Zustand eines biologischen Systems während dessen ein Ungleichgewicht zwischen Pro- und Antioxidantien vorliegt. Dieses Ungleichgewicht erhöht die Wahrscheinlichkeit der Schädigung endogener Moleküle, wie Lipiden, Proteinen oder DNA durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Erfolgt keine Reparatur der oxidativ geschädigten DNA vor der Zellreplikation können persistente Mutationen entstehen. Werden Lipide oxidiert, kann dies zu Schäden der Zellmembranen führen und die Oxidation von Proteinen kann zu deren Funktionsverlust führen. Weiterhin kann oxidativer Stress die Depletion von zelleigenen Antioxidantien wie Glutathion (GSH) bedingen, was wiederum eine erhöhte Sensitivität der Zelle gegenüber oxidativen Noxen hervorruft [Fernandez-Panchon *et al.*, 2008; Halliwell, 2007; Perez-Matute *et al.*, 2009].

Im Hinblick auf die NVP-induzierte Kanzerogenese ist oxidativer Stress, ausgelöst durch NVP selbst oder dessen Metabolite, ein möglicher Wirkmechanismus, dessen Plausibilität im folgenden Abschnitt diskutiert wird. Zur Untersuchung des Beitrags oxidativen Stresses zum hepatokanzerogenen Wirkmechanismus von NVP wurden der Glutathiongehalt in reduzierter (GSH) sowie oxidiertes (GSSG) Form als Parameter gewählt, welche in Leberhomogenaten der männlichen Ratten der NVP-Inhalationsstudie bestimmt wurden. Als weiterer Parameter wurde der Gehalt an nicht proteingebundenen Sulfhydrylgruppen (NPSH) analysiert, welche innerhalb der Zellen hauptsächlich GSH repräsentieren. Dieses Tripeptid ist das am häufigsten vorkommende, nicht enzymatische Antioxidans der eukaryotischen Zelle und spielt auch im Fremdstoffmetabolismus (Konjugationsreaktionen) eine wichtige Rolle [Franco & Cidlowski, 2009; Meister & Anderson, 1983].

Bei einer oxidativen Wirkung von NVP wäre ein Abfall der NPSH- bzw. GSH-Level durch den Verbrauch von Reduktionsäquivalenten und ein gleichzeitiger Anstieg des GSSG-Gehalts in Expositionsgruppen im Vergleich zur Vehikelkontrollgruppe zu erwarten. In keiner der gegen NVP exponierten Dosisgruppen wurde eine relevante Verringerung der GSH- bzw. NPSH-Konzentration beobachtet.

Die innerhalb der NVP-Inhalationsstudie bestimmten GSH-Gehalte der Leber lagen ungeachtet der Expositionsgruppe zwischen 4,0 und 4,5 $\mu\text{mol/g}$ Leber. In der Literatur beschriebene Rattenleber-GSH-Gehalte sind Schwankungen je nach verwendeter Bestimmungsmethode und Probenaufarbeitung unterworfen und reichen von 2,59 [Yilmaz *et al.*, 2009] über etwa 6,5 [Tietze, 1969; Davies *et al.*, 1984] und 7,9 [Guan *et al.*, 2003] bis zu 8,2 [Giustarini *et al.*, 2011] $\mu\text{mol/g}$ Leber. Zudem ist der GSH-Gehalt der Leber vom Fütterungszustand der Tiere abhängig: Während in nüchternen Ratten GSH-Gehalte von 4,4 $\mu\text{mol/g}$ Leber bestimmt wurden, wurden in postprandialen Ratten je nach Aufarbeitungsmethode 5,5 – 7,0 $\mu\text{mol GSH/g}$ Leber ermittelt [Akerboom & Sies, 1981].

5 Diskussion

Die ermittelten GSH-Gehalte der Lebern der NVP-Inhalationsstudie liegen somit im unteren Mittelfeld des in der Literatur beschriebenen Bereichs. Die Unterschiede zu teils höheren Literaturwerten können folgende Ursachen haben: (1) Während die Lebern in den in der Literatur beschriebenen Methoden meist sofort nach Entnahme zur GSH-Bestimmung eingesetzt wurden, wurden die Lebern der aktuellen Studie ein Jahr bei -80°C gelagert. Daher könnte es zu einer Autoxidation des GSH gekommen sein. (2) Die Ratten der NVP-Inhalationsstudie hatten in der Nacht vor Studientermination keinen Zugang zu Futter, sodass sie bei der Tötung nüchtern waren. Informationen zum Fütterungszustand der Ratten sind bei GSH-Gehaltsbestimmungen in der Literatur meist nicht angegeben. Akerboom und Sies [Akerboom & Sies, 1981] beschrieben jedoch GSH-Gehalte im Leberhomogenat nüchternen Ratten, welche mit $4,4 \mu\text{mol/g}$ Leber im Bereich der in der NVP-Inhalationsstudie analysierten GSH-Konzentrationen von $4,0 - 4,4 \mu\text{mol/g}$ Leber liegen.

Auch in vorangegangenen Studien zur Toxizitätsprüfung NVPs wurden Angaben zu GSH-Gehalten im Leberhomogenat gemacht, wobei GSH nicht spezifisch, sondern über die NPSH-Methode bestimmt wurde. Nach dreimonatiger inhalativer NVP-Exposition gegen 10 ppm zeigte sich in Sprague-Dawley Ratten ein Anstieg des GSH-Spiegels. Die gleiche Beobachtung wurde nach sechsmonatiger NVP-Exposition in C57Bl Mäusen und in F344 Ratten gemacht. In einer weiteren Studie wurden Anstiege des GSH-Gehalts schon nach einwöchiger NVP-Exposition (15 ppm) in männlichen F344 Ratten beobachtet [Klimisch *et al.*, 1997a]. Der GSH-Gehalt kann unter oxidativem Stress in 2 Richtungen reagieren: Kurzfristig würde als Reaktion eine GSH-Abnahme im betroffenen Gewebe erwartet. Langfristig kann es jedoch, bedingt durch eine Kompensationsreaktion, auch zu einer GSH-Gehaltszunahme kommen, worauf der Anstieg des GSH-Gehalts in den von Klimisch *et al.* beschriebenen Studien hinweisen könnte.

Ein Anstieg der GSH-Gehalte wurde in der fünftägigen NVP-Inhalationsstudie nicht bestätigt.

GSH liegt in Leberhomogenat in mikromolarer Konzentration und daher in großem Überschuss zu GSSG vor, welches in nanomolarer Konzentration in Leberhomogenat enthalten ist. Aus diesem Grund kann die Bestimmung des GSSG-Gehalts als sensitiverer Parameter zur Untersuchung von oxidativem Stress herangezogen werden, da bereits geringe Veränderungen sichtbar sind. In der Literatur wurden Leber-GSSG-Gehalte von 18 [Akerboom & Sies, 1981] über 43,3 [Giustarini *et al.*, 2013], 127 [Tietze, 1969], 150 [Akerboom & Sies, 1981], 190 [Yilmaz *et al.*, 2009] und 240 [Davies *et al.*, 1984] bis 348 [Guan *et al.*, 2003] nmol/g Leber beschrieben. Die ermittelten GSSG-Gehalte der fünftägigen Inhalationsstudie lagen zwischen 116 und 137 nmol/g Leber und somit ungeachtet der Expositionsgruppe im Mittelfeld der in der Literatur beschriebenen Werte. Ein Anstieg der GSSG-Gehalte der gegen NVP exponierten Tiere gegenüber der Vehikelkontrollgruppe wurde nicht beobachtet.

Somit ergab auch die Analyse der GSSG-Konzentration im Leberhomogenat NVP-exponierter Ratten keinen Hinweis auf substanzinduzierten oxidativen Stress.

Zur Beurteilung oxidativen Stresses kann zudem der GSH-Status herangezogen werden, welcher den prozentualen Anteil von GSH am Gesamtglutathion (tGSH) darstellt. Der tGSH-Gehalt berechnet sich aus der Summe von GSH und GSSG. In Zellen mit ausgeglichenem Redox-Status liegt der GSH-Status zwischen 90% und 98% [Kelly *et al.*, 1998; Owen & Butterfield, 2010]. Der innerhalb der fünftägigen Inhalationsstudie ermittelte GSH-Status lag ungeachtet der NVP-Expositionskonzentration zwischen 94 und 95%. Somit liefert auch dieser Parameter, unter Berücksichtigung der in der Literatur veröffentlichten Referenzwerte, keinen Hinweis auf NVP-vermittelten oxidativen Stress in der Leber.

Als weiterer empfindlicher Biomarker oxidativen Stresses eignet sich der GSH/GSSG-Quotient. Ein gestörtes Verhältnis von GSH zu GSSG wurde bereits mit neurogenerativen Erkrankungen, Nierenversagen, Morbus Crohn, der Beeinflussung der Glukosehomeostase und Hepatotoxizität in Verbindung gebracht [Giustarini *et al.*, 2016; Owen & Butterfield, 2010; Paolisso *et al.*, 1992; Pastore *et al.*, 2003; Sentellas *et al.*, 2014; Yuan & Kaplowitz, 2009]. Der Vorteil dieses Biomarkers liegt darin, dass auch geringe Änderungen des Redox-Status anhand des Verhältnisses von GSH zu GSSG innerhalb einer Probe zu detektieren sind. In der NVP-Inhalationsstudie wurden GSH/GSSG-Quotienten zwischen 30 und 42 bestimmt, wobei der GSH/GSSG-Quotient der Vehikelkontrollgruppe bei 33 lag und kein dosisabhängiger Trend in den 3 Expositionsgruppen zu beobachten war.

In der Literatur beschriebene GSH/GSSG-Quotienten der Rattenleber variieren stark. Giustarini und Kollegen ermittelten einen GSH/GSSG-Quotienten von 190 [Giustarini *et al.*, 2011], anhand der veröffentlichten GSH- und GSSG-Konzentrationen anderer Arbeitsgruppen errechnen sich deutlich niedrigere Gehalte von 65 [Tietze, 1969], 28 [Davies *et al.*, 1984], 26 [Griffith, 1980], oder 23 [Guan *et al.*, 2003]. Demnach liegen die innerhalb der NVP-Inhalationsstudie bestimmten GSH/GSSG-Quotienten im Bereich der Literaturwerte. Im Vergleich zu dem von Giustarini *et al.* veröffentlichten GSH/GSSG-Quotient von 190 ist der Wert der aktuellen Studie etwa um den Faktor fünf niedriger, was durch den Unterschied der bestimmten GSH- und GSSG-Konzentrationen begründet ist. Der GSH-Gehalt der NVP-Inhalationsstudie ist im Vergleich zu Giustarini *et al.* um den Faktor 2 erniedrigt und der GSSG-Gehalt um den Faktor 3 erhöht [Giustarini *et al.*, 2013]. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Lagerung der Lebern vor der Bestimmung der GSH- und GSSG-Gehalte sein. Weiterhin sind die GSH- und GSSG-Konzentrationen, wie bereits beschrieben, von der eingesetzten Bestimmungsmethode abhängig. Obwohl GSH- und GSSG-Gehalte schon seit den 1950er Jahren bestimmt werden, wurde bisher keine einheitliche Methode festgelegt und die Werte zwischen verschiedenen Laboren sind daher nur schwer vergleichbar [Giustarini *et al.*, 2016; Monostori *et al.*, 2009].

5 Diskussion

Verschiedene Parameter können einen Einfluss auf eine mögliche Oxidation des in der Probe vorhandenen GSH ausüben, welches in Konsequenz eine artifizielle Erhöhung des GSSG-Gehalts und somit eine Erniedrigung des GSH/GSSG-Quotienten bedingen kann. Als Einflüsse sind zwei essentielle Schritte der GSH- bzw. GSSG-Bestimmung zu nennen: (1) Die Probenaufarbeitung mit der zur Proteinfällung genutzten Substanz, (2) die zur Derivatisierung des GSH eingesetzte Substanz.

Da die Analysen der Kontrolllösungen innerhalb der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente belegen, dass GSH und GSSG in derselben Lösung korrekt quantifiziert wurden, kann eine artifizielle Erhöhung des GSSG-Gehalts während des Derivatisierung-schrittes innerhalb des GSH-Recycling-Assays ausgeschlossen werden.

Unter Berücksichtigung der bereits genannten Argumente, sollte der Vergleich der ermittelten GSH- und GSSG-Gehalte, sowie des GSH/GSSG-Quotienten mit Literaturdaten kritisch erfolgen. Die abschließende Interpretation der Ergebnisse sollte immer unter Berücksichtigung der Bestimmungsmethode und vorrangig im Vergleich zur internen Vehikelkontrolle erfolgen.

Zusammenfassend zeigten weder die gemessenen GSH- und GSSG-Gehalte noch die berechneten Marker oxidativen Stresses, GSH-Status und GSH/GSSG-Quotient, einen Hinweis auf NVP-vermittelten oxidativen Stress in der Leber. Dieses Ergebnis wird durch den Comet Assay mit FPG zur Detektion oxidativer DNA-Schäden gestützt, welcher keinen Hinweis auf NVP-induzierte DNA-Strangbrüche ergab. Abschließend zeigte die fünftägige Inhalationsstudie nach Exposition gegenüber kanzerogenen Konzentrationen keinen Hinweis auf oxidativen Stress im Hauptzielorgan der NVP-vermittelten Kanzerogenese. Oxidativer Stress ist demnach als Wirkmechanismus der NVP-vermittelten Hepatokanzerogenese auszuschließen.

5.1.4 Rezeptorvermittelte Mechanismen

Die nicht-gentoxische Hepatokarzinogenese kann durch die Aktivierung spezifischer Rezeptoren erfolgen, welche eine erhöhte Transkription bestimmter Gene sowie Zellproliferation bedingen. Als Marker der Rezeptoraktivierung kann die Induktion bestimmter Enzyme herangezogen werden, deren Gene in Abhängigkeit der Rezeptoraktivierung vermehrt abgelesen werden. Um eine mögliche Aktivierung des Arylhydrocarbonrezeptors (AhR), des konstitutiven Androstan Rezeptors (CAR), des Pregnan-X-Rezeptors (PXR), und des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten-Rezeptors (PPAR α) durch eine Testsubstanz zu untersuchen, kann die Aktivität der mikrosomalen Markerenzyme CYP1A, CYP2B, CYP3A, sowie CYP4A und Palmitoyl-CoA-Oxidase (PalCoA-Oxidase) herangezogen werden, da deren Expression durch die entsprechenden Rezeptoren induziert wird [Elcombe *et al.*, 2014, Pelkonen *et al.*, 2008]. Ein möglicher rezeptorvermittelter, nicht gentoxischer Wirkmechanismus NVPs wurde bisher nicht untersucht, könnte aber, aufgrund der beschriebenen negativen Daten zur Gentoxizität, relevant sein. Daher wurden die Aktivitäten der genannten Markerenzyme CYP1A, CYP2B und CYP3A (in Leber und Lunge), sowie CYP4A und PalCoA-Oxidase (in Leber) im Gewebematerial der männlichen Ratten der fünftägigen NVP-Inhalationsstudie bestimmt.

AhR

Der AhR gehört zur Per-ARNT-Sim (PAS) Familie der Transkriptionsfaktoren. Nach direkter Rezeptoraktivierung, z.B. durch polychlorierte Biphenyle (PCB), Dioxine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), oder indirekte Rezeptoraktivierung, z.B. durch Omeprazol, transloziert AhR vom Zytosol in den Nukleus. Dort bindet AhR nach Dimerisierung mit dem *Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) an das responsive Element innerhalb der Promotorregion der Zielgene [Melnick *et al.*, 1996; Tolson & Wang, 2010]. Die Genexpressionsregulation der Zielgene von AhR kann zum Einen klassisch über die Transkription erfolgen, zum Anderen können epigenetische Mechanismen, wie (De-)Methylierungen von Promotorregionen oder (De-)Acetylierungen von Histonen ursächlich sein [Mulero-Navarro & Fernandez-Salguero, 2016; Oesch-Bartlomowicz & Oesch, 2009].

Der AhR weist eine tumorpromovierende Wirkung auf, was z.B. in einer Studie an Mäusen gezeigt wurde: Mäuse mit einem konstitutiv aktiven AhR zeigten in einem Promotionsexperiment verglichen mit dem Wildtyp vermehrt Lebertumore und eine Herabregulierung von Genen, die *heatshock* Proteine kodieren, welche für Proteinfaltung und -qualitätskontrolle verantwortlich sind [Moennikes *et al.*, 2004].

Da die Expression der Enzyme der CYP1A-Familie durch den AhR gesteuert wird, kann diese durch AhR-aktivierende Xenobiotika wie polychlorierte Biphenyle (z.B. Aroclor 1254), polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (z.B. Benzo[a]pyren) oder Dioxine (z.B. TCDD) gesteigert werden. Diese Substanzen induzieren somit Enzymaktivitäten, die an der eigenen Metabolisierung beteiligt sein können [Ma & Lu, 2007; Moennikes *et al.*, 2004; Tompkins & Wallace, 2007].

Zum Nachweis einer Aktivierung des AhRs kann der EROD-Assay herangezogen werden, da das eingesetzte Substrat Ethoxyresourfin vornehmlich durch CYP1A umgesetzt wird und eine Enzymaktivitätssteigerung somit indirekt Rückschlüsse auf eine AhR-Aktivierung zulässt.

Innerhalb der NVP-Inhalationsstudie wurde die EROD-Aktivität in Lebern und Lungen der männlichen Tiere untersucht. Hierbei wurde in der Lunge keine Enzymaktivität oberhalb der LOD (1,57 pmol/min/mg Protein) nachgewiesen. Im Vergleich hierzu wurden in der Literatur EROD-Aktivitäten in Rattenlungenmikrosomen [Wardlaw *et al.*, 1998], sowie mRNA Gehalte von CYP1A1 in humanen Lungenzellen [Castell *et al.*, 2005] beschrieben. Die von Wardlaw *et al.* beschriebene EROD-Aktivität in Lungenmikrosomen von $0,1 \pm 0,2$ pmol/min/mg Protein ist sehr gering und liegt unterhalb der LOD, welche im Rahmen der NVP-Inhalationsstudie abgeleitet wurde. Wardlaw *et al.* beschrieben keine LOD für ihr Testsystem [Wardlaw *et al.*, 1998]. CYP1A ist in Lungenzellen von Ratten durch Exposition gegenüber AhR-aktivierenden Substanzen wie z.B. PAKs in Zigarettenrauch [Wardlaw *et al.*, 1998], oder Benzo[a]pyren [Pushparajah *et al.*, 2008; Pushparajah *et al.*, 2017], sowie α - und β -Naphthoflavon [Sinal *et al.*, 1999] um Faktoren von bis zu 280 induzierbar [Elovaara *et al.*, 2007]. Eine NVP-vermittelte Aktivierung des AhR und die damit verbundene Enzyminduktion in dieser Größenordnung von CYP1A in der Lunge wäre demnach mit dem verwendeten Testsystem messbar gewesen.

Im Gegensatz zu den EROD-Aktivitäten der Lungen, wurden für alle männlichen Tiere der NVP-Inhalationsstudie in Lebermikrosomen Werte oberhalb der LOQ beobachtet. Die gemessenen EROD-Aktivitäten der Leber lagen mit 17 – 22 pmol/min/mg Protein ungeachtet der Dosisgruppe etwas unterhalb der laborinternen historischen Kontrolldaten von 22 – 41 pmol/min/mg Protein, jedoch innerhalb des in der Literatur beschriebenen Bereiches der EROD-Aktivitäten von 47 ± 39 pmol/min/mg Protein [Tabrez & Ahmad, 2010; Wardlaw *et al.*, 1998]. Für AhR-aktivierende Substanzen sind Steigerungen der EROD-Aktivität in der Leber um Faktoren von etwa 28 für Benzo[a]pyren [Elovaara *et al.*, 2007], sowie von etwa 40 für Aroclor 1254 beschrieben [Fabian *et al.*, 2013]. Innerhalb der NVP-Inhalationsstudie wurde kein dosisabhängiger Unterschied zwischen NVP-Behandlungsgruppen und der Vehikelkontrolle beobachtet.

Aufgrund der fehlenden Induktion der EROD-Aktivität, ist eine Aktivierung des AhRs durch NVP und/oder dessen Metabolite und eine daraus resultierende erhöhte Enzymexpression

von CYP1A unwahrscheinlich. Zudem ist NVP ein heterozyklischer Fünfring und weist nicht die für AhR-Liganden typische planare, polyaromatische Struktur auf.

Vollends ausgeschlossen werden, kann eine Aktivierung des AhR allein basierend auf der Messung der CYP1A-Aktivität allerdings nicht. Denkbar wäre eine Maskierung der Enzyminduktion *in vivo* durch Suizidhemmung von CYP1A, vermittelt durch einen NVP-Metaboliten. Eine Suizidhemmung durch NVP selbst, wurde innerhalb eines EROD-Assays mit gleichzeitiger NVP-Inkubation experimentell ausgeschlossen. Des Weiteren werden zunehmend epigenetische Signalkaskaden des AhR diskutiert, welche in Zusammenhang mit der Suppression von Tumorsuppressorgenen, sowie der Hemmung des *p53*-Signalwegs stehen. Zudem spielt der AhR unter anderem eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation, dem Zellzyklus, der Zellmorphologie, was gegenwärtig von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht wird [Mulero-Navarro & Fernandez-Salguero, 2016; Oesch-Bartlomowicz & Oesch, 2009; Weiss *et al.*, 2008]. Ein epigenetischer Effekt, ausgelöst durch NVP, wäre möglicherweise nicht als CYP1A-Induktion als Folge einer typischen AhR-Aktivierung sichtbar.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass innerhalb der NVP-Inhalationsstudie kein Hinweis auf eine Induktion von CYP1A und demnach auf eine Aktivierung des AhR durch NVP beobachtet wurde. Ein mit einer Aktivierung des AhR in Zusammenhang stehender Wirkmechanismus der NVP-vermittelten Hepatokarzinogenese ist, basierend auf den Ergebnissen der NVP-Inhalationsstudie, nicht abzuleiten.

CAR und PXR

Sowohl der CAR wie auch der PXR gehören zu den nukleären Rezeptoren, die in inaktiver Form im Zytoplasma lokalisiert sind. Nach Aktivierung migrieren CAR und PXR in den Nukleus und binden nach Dimerisierung mit dem Retinoidrezeptor X (RXR) an die responsiven DNA-Elemente zur Transkription der Zielgene [Hewitt *et al.*, 2007; Ihunna *et al.*, 2011; Squires *et al.*, 2004; Tompkins & Wallace, 2007]. Während die Aktivierung des PXR ausschließlich durch Ligandenbindung erfolgt, ist dies bei der Aktivierung des CAR nicht notwendig. Die Aktivierung des CAR kann auch, wie z.B. bei Phenobarbital (PB), durch einen indirekten Mechanismus erfolgen, wobei die Translokalisierung in den Zellkern an eine vorausgehende Dephosphorylierung geknüpft ist [Elcombe *et al.*, 2014; Hewitt *et al.*, 2007; Pelconen *et al.*, 2008].

Sowohl die Aktivierung des PXR als auch des CAR resultieren aufgrund überlappender Genspezifitäten, bezogen auf den Phase I Metabolismus, in einer Induktion von CYP3A und CYP2B. Eine CYP3A-Induktion wird dabei jedoch hauptsächlich durch PXR- und eine CYP2B-Induktion vornehmlich durch CAR-Aktivierung bewirkt, was in der unterschiedlichen Selektivität gegenüber den zugehörigen Promotorregionen begründet ist [Tolson & Wang,

2010; Wang *et al.*, 2012]. Aus diesem Grund können CYP2B- und CYP3A-Aktivitätsinduktionen als Indikator für eine Aktivierung des CAR, bzw. des PXR herangezogen werden.

Bekannte Liganden des PXR, die zur Induktion von CYP3A im Nager führen, sind unter anderem Pregnenalone-16 α -carbonitril (PCN) oder auch Clotrimazol [Elcombe *et al.*, 2014]. Quantifizierbare BROD-Aktivitäten, welche Mischaktivitäten von CYP1A, CYP2B und vor allem CYP3A darstellen und somit zum Nachweis einer PXR-Aktivierung herangezogen werden können, wurden sowohl in Leber- als auch in Lungenmikrosomen der NVP-Inhalationsstudie gemessen. Weder in Leber- noch in Lungenmikrosomen wurde ein dosisabhängiger Trend der NVP-exponierten Tiere verglichen mit der Vehikelkontrolle beobachtet. Demnach liegt kein Hinweis auf eine Aktivierung des PXR durch NVP und/oder dessen Metaboliten vor.

Innerhalb der NVP-Inhalationsstudie wurden in den Lebermikrosomenfraktionen aller männlichen Tiere quantifizierbare CYP2B-Aktivitäten mittels des Substratumsatzes von Pentoxyresorufin gemessen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Lebermikrosomen der Vehikelkontrollgruppe und den NVP-Dosisgruppen, unabhängig der Expositionskonzentration, war nicht festzustellen. In der Lunge wurden quantifizierbare CYP2B-Aktivitäten lediglich in der Vehikelkontrollgruppe und der Hochdosisgruppe beobachtet; analog zu den Ergebnissen in den Lebermikrosomen wurde keine NVP-expositionsabhängige Änderung der CYP2B-Aktivität beobachtet.

In der Arbeit von Castell *et al.* [Castell *et al.*, 2005] wurde in humanen Lungenzellen CYP2B auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Weiterhin wurden PROD-Aktivitäten in der Lunge von Ratten von $23 \pm 2,5$ pmol/min/mg beschrieben [Wardlaw *et al.*, 1998]. Die innerhalb der NVP-Inhalationsstudie quantifizierten PROD-Aktivitäten der Vehikelkontrollgruppe und der Hochdosisgruppe von etwa $20 \pm 13,8$ pmol/min/mg bzw. $24 \pm 19,9$ pmol/min/mg, liegen im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte. Eine Induktion von CYP2B in der Lunge der NVP-exponierten Tiere wurde nicht nachgewiesen.

Basierend auf den Ergebnissen des PROD-Assays, mit welchem die CYP2B-Aktivität bestimmt wurde, liegt kein Hinweis auf eine Aktivierung des CAR durch NVP oder dessen Metabolite vor. CAR-aktivierende Substanzen führen zu einer erheblichen Induktion der CYP2B-Aktivität, sodass ein Effekt im PROD-Assay sowohl in der Leber als auch in der Lunge sichtbar gewesen wäre. Ein bekanntes Beispiel eines CAR-aktivierenden Tumorpromotors im Nager ist Phenobarbital (PB). In der Leber konnte durch die PB bedingte Aktivierung des CAR eine CYP2B-Enzymaktivitätserhöhung um Faktoren von 50 – 140 gezeigt werden [Lubet *et al.*, 1985; Tompkins & Wallace, 2007; Waxmann, 1999], des Weiteren wurde eine Genexpressionserhöhung von Cyp2b10 um den Faktor 500 beobachtet [LeBaron *et al.*, 2014]. Der Ausschluss einer CAR-Aktivierung durch NVP einzig auf Basis einer nicht nachweisbaren CYP2B-Enzymaktivitätserhöhung im PROD-Assay ist nicht möglich, da z.B. induziertes

5 Diskussion

Protein nicht aktiv sein könnte oder eine CYP2B-Induktion durch Suizidinhibition maskiert werden könnte. Eine solche Suizidinhibition wurde z.B. für das Pflanzenschutzmittel Pronamid gezeigt, welches eine Erhöhung von CYP2B auf mRNA- Ebene induzierte, aber keine Enzymaktivitätserhöhung im PROD-Assay zur Folge hatte. Bei Co-Inkubationen von Pronamid (100 µM) oder dem CYP2B-Inhibitor Curcumin (40 µM) im PROD-Assay wurden Inhibitionen von etwa 33% bzw. 63% im Vergleich zur Kontrolle beobachtet [LeBaron *et al.*, 2014].

Ein solcher Mechanismus der Suizidinhibition wurde *in vitro* auch für NVP untersucht, da zyklische tertiäre Amine diesen vermitteln können [Hollenberg *et al.*, 2008]. Die Ergebnisse einer NVP-Co-Inkubation (1, 10, 100 µM) im PROD Assay zeigten keine Reduktion der CYP2B-Enzymaktivität und sprechen gegen eine Suizidinhibition, da bei ähnlichen Konzentrationen bei Pronamid und Curcumin bereits eine Enzyminhibition beobachtet wurde. Innerhalb des beschriebenen Testsystems wäre eine Inhibition von CYP2B *in vivo*, ausgelöst durch einen NVP-Metaboliten, nicht erfasst worden. Eine CAR-Aktivierung durch NVP oder dessen Metaboliten wurde aufgrund der beschriebenen Datenlage als negativ bewertet, kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Ein Befund, der auf einen CAR-abhängigen Mechanismus der NVP-vermittelten Hepatokanzerogenese hindeuten könnte, ist die beobachtete vorwiegend zentrolobulär auftretende, dosisabhängige Zellproliferation nach NVP-Inhalation innerhalb einer 28 Tage Studie in Wistar Ratten [BASF, 2011], da eine CAR-Aktivierung mit einer Zellproliferationsinduktion in der Leber einhergehen kann [Elcombe *et al.*, 2014]. Nach siebentägiger Exposition gegen 1 ppm wurde bereits ein statistisch signifikanter Anstieg der Zellproliferation (Zone 2) beobachtet, was sich dosisabhängig in Zone 2 und 3 bei Expositionen gegen 5 ppm und 10 ppm fortsetzte. Nach 28-tägiger Exposition wurde bereits ab einer Expositionskonzentration von 0,5 ppm NVP ein signifikanter Anstieg der Proliferation in Zone 2 und 3 beobachtet, welcher nur in Zone 3 (zentrolobulär) Dosisabhängigkeit zeigte. Ein statistisch signifikanter Anstieg der Apoptose wurde im Gegensatz zur erhöhten Proliferation nicht in Zone 2 und 3 beobachtet, sondern in Zone 1 (periportal) und 2 und zeigte keine Dosisabhängigkeit. Weiterhin war ein Anstieg der Apoptose erst ab einer Expositionskonzentration von 1 ppm zu verzeichnen, während die Proliferation bereits ab einer Expositionskonzentration von 0,5 ppm erhöht war [BASF, 2011].

Die Ergebnisse belegen, dass der zugrunde liegende Mechanismus der NVP-vermittelten Zellproliferation auf einer direkt mitogenen Wirkung und nicht auf einer durch Zytotoxizität induzierten regenerativen Hyperplasie beruht, da ein Anstieg der Apoptose erst in höheren Konzentrationen und anderen Zonen der Leber im Vergleich zum Zellproliferationsanstieg beobachtet wurde. Dies wird durch die Ergebnisse von subchronischen Studien in Ratten und Mäusen unterstützt, welche erst bei höheren Konzentrationen (45 ppm) zentrolobuläre Einzelzellnekrosen zeigten [Klimisch *et al.*, 1997a].

Prinzipiell weisen die zonalen Unterschiede der Toxizität und der mitogenen Wirkung daraufhin, dass ein Metabolit von NVP für dessen Hepatotoxizität verantwortlich sein könnte, da Enzyme des Fremdstoffmetabolismus, wie CYP-Isoenzyme, vor allem zentrolobulär lokalisiert sind [Cederbaum, 2015].

Ein indirektes Indiz für eine NVP-vermittelte CAR-Aktivierung könnte die geringere Hepatotoxizität NVPs im Hamster sein, der nach dreimonatiger Exposition (45 ppm) lediglich vermehrte Glycogeneinlagerungen, aber im Gegensatz zu Ratte und Maus keine Foci in der Leber zeigte [EURAR, 2003; Klimisch *et al.*, 1997a]. Der in dieser Studie gezeigte Speziesunterschied der Hepatotoxizität von NVP könnte mit einem CAR-aktivierenden Mechanismus zusammenhängen; denn der Hamster zeigte sich im Gegensatz zu Ratten und Mäusen unempfindlich gegenüber der zellproliferierenden und Foci-induzierenden Wirkung der CAR-aktivierenden Substanz PB [Elcombe *et al.*, 2014].

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass die innerhalb dieser Arbeit generierten Daten keinen Hinweis auf eine Aktivierung des CAR durch NVP bzw. dessen Metabolite lieferten. Allerdings lässt sich eine CAR-Aktivierung unter Berücksichtigung aller Daten nicht vollständig ausschließen. Zur weiteren Untersuchung wären z.B. eine Transkriptomanalyse nach NVP Exposition oder eine Zellproliferationsstudie in *CAR-knock-out* Tieren denkbar. Weitere Untersuchungen zur Bestätigung oder zum Ausschluss eines CAR-vermittelten Mechanismus wären vor allem aus regulatorischer Sicht relevant, da eine CAR-vermittelte Hepatokanzerogenese, aufgrund der fehlenden induzierten replikativen DNA-Synthese in humanen Hepatozyten, als nicht humanrelevant diskutiert wird [Elcombe *et al.*, 2014; Lake *et al.*, 2015].

PPAR α

Die Aktivierung des PPAR α stellt einen weiteren rezeptorvermittelten nicht genotoxischen Wirkmechanismus der Hepatokanzerogenese im Nager dar. Die Aktivierung erfolgt über eine Ligandenbindung und nachfolgende Translokation des aktivierten PPAR α -Komplexes in den Zellkern, wo dieser mit RXR dimerisiert und an responsive Elemente der DNA bindet.

Eine Aktivierung des PPAR α induziert Peroxisomenproliferation und Zellproliferation in Nagern, was zur Hepatokanzerogenese führt. Ein entscheidender Faktor der PPAR α vermittelten Hepatokanzerogenese ist die induzierte Zellproliferation im Nager, die durch die Herabregulierung eines Proliferationsinhibitors gesteigert wird.

Die Herabregulierung dieses Faktors wurde in Mäusen mit humanisiertem PPAR α nicht beobachtet [Gonzales & Shah, 2008]. Weiterhin enthalten humane Leberzellen etwa um den Faktor 10 geringere PPAR α -Gehalte verglichen mit Ratten- oder Maushepatozyten, was als weiterer Faktor der höheren Sensitivität der Nager gilt [Gonzales *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2002]. Für den Menschen sind auch epidemiologisch keine Hinweise auf vermehrt auftretende Lebertumore oder Peroxisomenproliferation nach Einnahme von Lipidsenkern wie Fibraten

gegeben, welche den PPAR α im Nager aktivieren. Humanrelevanz der durch PPAR α -Aktivierung vermittelten Hepatokanzerogenese einer Substanz im Nager ist demnach nicht gegeben [Corton *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2013].

Zur Untersuchung einer PPAR α -Aktivierung kann die Anzahl und Größe der Peroxisomen in der Leber elektronenmikroskopisch ermittelt und mit der Vehikelkontrolle verglichen werden. Organe, die zur Elektronenmikroskopie eingesetzt werden, müssen sofort nach Entnahme in Formalin fixiert werden, da die Qualität der Bilder andernfalls ungenügend ist. Dies war in der fünftägigen NVP-Inhalationsstudie nicht möglich, da die Lebern aufgrund ihres Einsatzes zur Enzym- und GSH-Bestimmung sofort nach Entnahme in Stickstoff schockgefroren wurden.

Zur Untersuchung einer PPAR α -Aktivierung innerhalb der NVP-Inhalationsstudie wurden die Aktivitäten der Markerenzyme CYP4A und PalCoA bestimmt, welche bei einer PPAR α -Aktivierung induziert werden [Kim *et al.*, 2013; Klaunig *et al.*, 2003; Suga, 2004]. Während die PalCoA-Oxidase das erste Enzym der peroxisomalen Fettsäure- β -Oxidation darstellt, katalysiert CYP4A die ω -Oxidation von Fettsäuren, welche anschließend als Dicarbonsäuren zur peroxisomalen β -Oxidation eingesetzt werden [Reddy & Hashimoto, 2001; Reubsaet *et al.*, 1988; Yelandi *et al.*, 2000].

Die mittels ω -Oxidation ermittelte CYP4A-Aktivität der Hochdosisgruppe (20 ppm) der NVP-Inhalationsstudie war im Vergleich zur Vehikelkontrollgruppe um einen Faktor von 1,3 leicht, jedoch statistisch nicht signifikant erhöht. In der Literatur sind bei einer Aktivierung des PPAR α höhere Anstiege beschrieben: Nach Behandlung von Ratten mit dem potenten Peroxisomenproliferator Clofibrat wurden Steigerungen der ω -Oxidation um den Faktor 13 beobachtet [Nilsson *et al.*, 1986]. Weitere Studien zu Peroxisomenproliferatoren zeigten Anstiege der CYP4A-Aktivität um Faktoren von etwa 8-10 durch Dehydroepiandrosteron und Clofibrat, sowie 13 durch Benzofibrat [Suga, 2004].

Demnach ist basierend auf den Ergebnissen des Laurinsäure Assays zur CYP4A-Aktivitätsbestimmung kein Hinweis auf eine PPAR α -Aktivierung durch NVP oder einen seiner Metaboliten gegeben. Um diese These zu bekräftigen, wurde die Aktivität der PalCoA-Oxidase bestimmt. Verglichen mit der Vehikelkontrollgruppe wurde in keiner Dosisgruppe der NVP-Inhalationsstudie ein Anstieg der Aktivität der PalCoA-Oxidase in der Leber beobachtet.

Bei substanzinduzierter Peroxisomenproliferation durch PPAR α -Agonisten wurden Faktoren der Enzymaktivitätssteigerung von <10 (schwache Wirkung) bis >300 (sehr starke Wirkung) in der Literatur beschrieben, wobei ab einem Faktor von 4 - 7 vermehrt Lebertumore in Ratten und Mäusen beschrieben wurden [Gonzales *et al.*, 1998; Klaunig *et al.*, 2003; Suga, 2004]. Somit lieferte auch der PalCoA-Oxidase Assay keinen Hinweis für eine agonistische Wirkung von NVP oder einem NVP-Metaboliten auf PPAR α .

Weiterhin wurde die Induktion von oxidativem Stress durch PPAR α -Aktivierung beschrieben, dessen Ursache in dem gesteigerten Fettsäuremetabolismus und der damit einhergehenden Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der Leber begründet ist. Vor allem durch die Induktion der PalCoA-Oxidase entsteht vermehrt Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt der enzymkatalysierten Fettsäureoxidation, welches oxidativen Stress induziert und so z.B. die DNA oxidativ schädigen und den Glutathionhaushalt der Zelle verändern kann [Klaunig *et al.*, 2003; Melnick *et al.*, 1996; Misra & Reddy, 2014; Yeldani *et al.*, 2000]. Innerhalb der NVP-Inhalationsstudie wurden, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, weder Hinweise auf eine erhöhte oxidative DNA-Schädigung, noch auf eine GSH-Depletion, bzw. Erhöhung des GSSG-Spiegels beobachtet. Ein weiteres Argument, das eine mögliche NVP-vermittelte Aktivierung des PPAR α entkräftet, sind demnach die fehlenden Hinweise auf oxidativen Stress im Zielorgan Leber nach NVP-Exposition.

Innerhalb der NVP-Inhalationsstudie wurde kein Hinweis auf eine Aktivierung des PPAR α beobachtet. Weder für das Markerenzym CYP4A noch für die PalCoA-Oxidase wurde für die NVP-Behandlungsgruppen ein signifikanter Enzymaktivitätsanstieg in der Leber beobachtet. Daher liegen keinerlei Hinweise auf eine NVP-vermittelte Aktivierung des PPAR α und eine damit in Zusammenhang stehende Hepatokanzerogenese vor.

CYP2E1

Das Isoenzym CYP2E1 wird nicht wie die zuvor beschriebenen CYP-Enzyme über einen Rezeptorvermittelten Mechanismus induziert. Die Enzymaktivitätserhöhung wird durch posttranskriptionale Stabilisierung von CYP2E1 bedingt [Hewitt *et al.*, 2007; Tompkins & Wallace, 2007].

Dieses durch Ethanol oder Isoniazid induzierbare Enzym ist für die metabolische Aktivierung zahlreicher Xenobiotika wie Acetaminophen verantwortlich, welches eine zentrolobuläre Schädigung der Leber induziert [Tompkins & Wallace, 2007]. Die dem NVP strukturell sehr ähnliche Substanz N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) wird in der Ratte vornehmlich durch CYP2E1 metabolisiert [Ligocka *et al.*, 2003]. Aus diesen Gründen wurde die Aktivität des CYP2E1 innerhalb der NVP-Inhalationsstudie parallel zur CYP4A-Aktivitätsbestimmung untersucht. Hierzu wurde ebenfalls das Substrat Laurinsäure eingesetzt, welches durch CYP2E1 zu 11-OH-Laurinsäure metabolisiert wird [Clarke *et al.*, 1994; Laethem *et al.*, 1993]. Die Hochdosisgruppe zeigte gegenüber der Vehikelkontrollgruppe lediglich eine nicht statistisch signifikante CYP2E1-Aktivitätserhöhung um 10%. Somit liegt kein Hinweis auf eine NVP-vermittelte Induktion von CYP2E1 in Ratten nach fünftägiger NVP-Inhalationsexposition vor.

5 Diskussion

Abschließend bleibt festzuhalten, dass innerhalb der NVP-Inhalationsstudie keine Hinweise auf eine Rezeptoraktivierung von AhR, CAR, PXR und PPAR α , bestimmt durch die Markerenzyme CYP1A, CYP2B, CYP3A, sowie CYP4A und PalCoA-Oxidase, beobachtet wurden. Demnach wurde eine mögliche NVP-vermittelte Aktivierung der genannten Rezeptoren basierend auf den Resultaten der fünftägigen NVP-Inhalationsstudie als negativ bewertet. Eine Aktivierung des AhR und CAR kann allein basierend auf der bestehenden Datenlage allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden.

5.2 *in vitro* Untersuchungen

5.2.1 Abiotische Stabilität

Die Bioverfügbarkeit einer Substanz kann durch den pH-Wert der biologischen Kompartimente, die sie während der Aufnahme in den Organismus durchquert, beeinflusst werden. Da NVP in der Literatur als säurelabil beschrieben ist [Hawi *et al.*, 1987; Senogles & Thomas, 1980], wurden Inkubationen in Simulationsmedien durchgeführt, welche die physiologisch, biochemischen Eigenschaften einzelner Kompartimente eines Organismus modellhaft repräsentieren. Zur Untersuchung der NVP-Stabilität und der Identifikation der Zerfallsprodukte wurden die folgenden Simulanzien eingesetzt: Magensaftsimulanz (pH 1,2; 2; 3), Lysosomensimulanz (pH 4,5), Lungenflüssigkeitssimulanz (pH 7,4) und Phosphatpuffer (Kontrolle, pH 7,4).

Die Ergebnisse der NVP-Inkubationen in den verschiedenen Simulanzien zeigten ausschließlich in saurem Milieu eine Hydrolyse von NVP zu 2-Pyrrolidon und Acetaldehyd. Bei neutralem pH-Wert war NVP über mehrere Tage stabil. Die berechneten Halbwertszeiten in sauren Simulationsmedien reichten in Abhängigkeit des pH-Wertes von wenigen Minuten bis zu mehreren Stunden und waren ausschließlich von diesem abhängig. Eine Abhängigkeit der Halbwertszeit von der NVP-Ausgangskonzentration wurde nicht festgestellt.

Die berechneten Halbwertszeiten von etwa 3 und 18 - 20 Minuten für pH-Werte von 1,2 und 2 sind mit den von Hawi *et al.* beschriebenen Halbwertszeiten von etwa 1,5 und 21 Minuten bei pH-Werten von 1,2 und 2,2 (37°C) vergleichbar [Hawi *et al.*, 1987]. Bei einem pH-Wert von 3 wurde in der aktuellen Studie eine Halbwertszeit von etwa 2 - 3 Stunden berechnet. Innerhalb der von Hawi *et al.* beschriebenen Studie wurde die Halbwertszeit nicht für einen pH-Wert von 3, sondern für die pH-Werte 2,5 und 3,5 zu etwa 40 Minuten und etwa 6 Stunden bestimmt [Hawi *et al.*, 1987]. Auf Basis der Daten der Literatur und der aktuellen Studie ist zwischen einem pH-Wert von 2,5 und 3,5 ein enormer Anstieg der Halbwertszeiten und somit ein starker Abfall der Hydrolysegeschwindigkeit gegeben.

Die in der beschriebenen Studie gezeigte Stabilität von NVP bei neutralem pH-Wert (pH 7,4) in Phosphatpuffer und Lungenflüssigkeitssimulanz wird durch weitere Studien bestätigt. Hawi *et al.* zeigte eine Stabilität von NVP über mindestens 24 Stunden bei einem pH-Wert von 7,2 und einer Temperatur von 37°C [Hawi *et al.*, 1987]. In einer weiteren Studie gemäß OECD Prüfrichtlinie 111 war nach 5 Tagen keine Hydrolyse von NVP bei einer Temperatur von 50°C und einem pH-Wert von 7 zu erkennen [Allessa GmbH, 2013]. Darüber hinaus wurde die Stabilität von NVP in Trinkwasser, im Rahmen einer Trinkwasserstudie, über 4 Tage bestätigt [BASF, 1986b]. Somit konnte basierend auf der aktuellen sowie vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass NVP in wässriger Lösung ab einem pH-Wert von 7 für mindestens 5 Tage stabil ist. Dabei hat die Temperatur keinen Einfluss auf die Stabilität, da weder bei

5 Diskussion

Raumtemperatur (etwa 20°C), noch Körpertemperatur (37°C) oder 50°C eine Hydrolyse von NVP beobachtet wurde.

Prinzipiell ist davon auszugehen, dass die säurekatalysierte Hydrolyse von NVP nach folgendem Mechanismus verläuft (Abbildung 21): Geschwindigkeitsbestimmender erster Schritt ist die Addition des Protons an die Vinylgruppe von NVP (1) unter Bildung eines Carbokations (2). Im nächsten Schritt wird unter der Addition von Wasser und der Abspaltung eines Protons das Zwischenprodukt (1-Hydroxyethyl)-2-pyrrolidon (3) gebildet, welches in 2-Pyrrolidon (4) und Acetaldehyd (5) zerfällt.

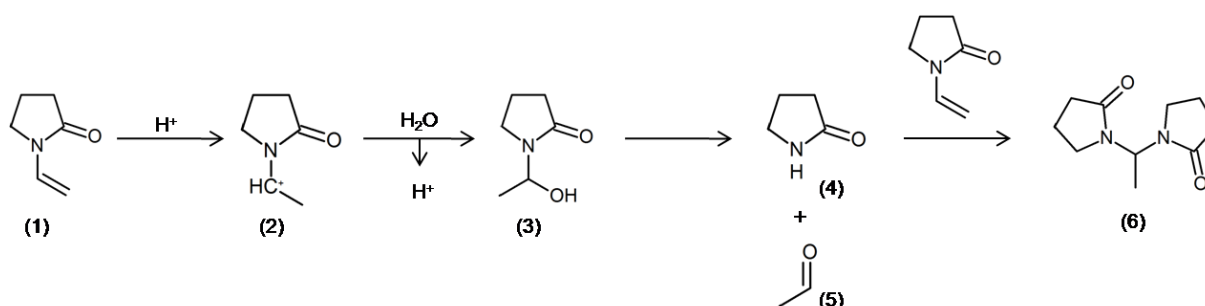


Abbildung 21: Reaktionsschema der säurekatalysierten NVP-Hydrolyse und deren Produkte nach [Senogles & Thomas, 1980]

Die Bildung der Hydrolyseprodukte 2-Pyrrolidon (4) und Acetaldehyd (5) verlief in der aktuellen Studie proportional zu den NVP-Umsätzen in stöchiometrischen Mengen, sodass die Bildung weiterer Zerfallsprodukte unter den vorliegenden Versuchsbedingungen ausgeschlossen wurde. In der Literatur wurde die reversible Bildung des Aminals 1,1-Bis-(N-2-oxopyrrolidinyl)ethan (6) bei pH-Werten < 2 und 20°C [Breitenbach *et al.*, 1956] sowie pH-Werten > 2,5 und 30°C [Senogles & Thomas, 1980] beschrieben. Dieses Produkt (6) aus 2-Pyrrolidon und NVP wurde innerhalb der aktuellen Untersuchungen nicht beobachtet. Auch in der Studie von Hawi *et al.*, welche unter vergleichbaren Versuchsbedingungen (37°C) zur aktuellen Studie durchgeführt wurde, wurde das Aminal (6) ebenfalls nicht nachgewiesen [Hawi *et al.*, 1987].

Weiterhin wurde (1-Hydroxyethyl)-2-pyrrolidon (3) als Hydrolyseprodukt identifiziert, welches temperaturabhängig als einziges Hydrolyseprodukt (0°C) oder zusammen mit Acetaldehyd (5) und 1,1-Bis-(N-2-oxopyrrolidinyl)ethan (6) beschrieben wurde (30°C) [Senogles, 1980]. 2-Pyrrolidon konnte innerhalb der Studie von Senogles *et al.* nicht identifiziert werden, da dieses austauschbare Wasserstoffatome besitzt und somit im verwendeten ¹H-NMR nicht spezifisch nachweisbar war. In einer Hydrolysestudie nach OECD 111, wurde (1-Hydroxyethyl)-2-pyrrolidon (3) als Zwischenprodukt und 2-Pyrrolidon als Endprodukt identifiziert. Acetaldehyd konnte aufgrund der verwendeten Analysemethode (HPLC/MS) nicht nachgewiesen werden [Allessa GmbH, 2013].

5 Diskussion

Dass das Zwischenprodukt (3) in der aktuellen Studie nicht nachgewiesen wurde, könnte in der Analysenmethode oder dem vollständigen Umsatz zu den Hydrolyseprodukten begründet sein.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die aktuelle Studie die Entstehung der in der Literatur beschriebenen Hydrolyseprodukte 2-Pyrrolidon und Acetaldehyd bestätigte. Ein Additionsprodukt von 2-Pyrrolidon und NVP wurde unter den eingesetzten Versuchsbedingungen nicht beobachtet.

Im Hinblick auf die biologische Relevanz dieser Untersuchungen ist zu beachten, dass die eingesetzten Puffersysteme Simulationen der physiologischen Kompartimente darstellen und keine Enzyme, die vor allem in den Lysosomen eine wesentliche Rolle spielen, enthalten sind. Trotz dieser Einschränkungen ist es möglich eine Aussage über die abiotische Stabilität in den verschiedenen physiologischen Kompartimenten abzuleiten und in der Risikobewertung von NVP zu berücksichtigen.

NVP erwies sich in Lungenflüssigkeitssimulanz als stabil über den Inkubationszeitraum von 24 Stunden. Daher ist nicht zu erwarten, dass NVP nach inhalativer Exposition bereits in Lungenflüssigkeit abiotisch hydrolysiert. In Lysosomensimulanz wurde eine Halbwertszeit von NVP von mehreren Stunden ermittelt. Daher könnte Acetaldehyd intrazellulär innerhalb der Lysosomen kontinuierlich durch abiotische Hydrolyse entstehen, sofern NVP in diesem Zeitraum nicht bereits durch Enzyme metabolisiert wurde. Das natürlich endogen vorkommende Acetaldehyd wirkt in hohen Dosen zytotoxisch und gentoxisch [MAK Acetaldehyd, 2008] und wird durch die Aldehyddehydrogenase effektiv zu Essigsäure abgebaut. Allerdings wurden weder *in vivo* noch *in vitro* Hinweise auf eine Gentoxizität NVPs beobachtet, sodass die abiotisch gebildete Acetaldehydmenge vermutlich nicht ausreicht um die kanzerogene Wirkung von NVP zu erklären [MAK NVP, 2014]. Weiterhin kann die mögliche abiotische Bildung von Acetaldehyd in Lysosomen die leberspezifische Toxizität von NVP nicht erklären.

Die Halbwertszeiten von NVP im Magensaftsimulanz liegen zwischen etwa 3 Minuten (pH 1,2) und 2 – 3 Stunden (pH 3). Somit ist zu erwarten, dass die Bioverfügbarkeit von NVP stark vom pH-Wert des Magens, sowie der Verweildauer in diesem abhängig ist. Die Ratte besitzt zusätzlich zum Drüsenmagen einen Vormagen, dessen pH-Wert unabhängig des Fütterungszustands etwa 4 – 5 beträgt [Ward & Coates, 1987]. Der pH-Wert des Drüsenmagens, welcher für die Sekretion der Verdauungsenzyme verantwortlich ist, ist abhängig vom Fütterungszustand der Ratte. Während im Drüsenmagen von nüchternen Ratten etwa ein pH-Wert von 4 beobachtet wurde, ist dieser in gefütterten Ratten mit etwa 2 – 3,5 niedriger [McConnell *et al.*, 2008; Ramamoorthy, 2010; Ward & Coates, 1987]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass NVP im Magen gefütterter Ratten schneller

hydrolysiert und dessen Verweildauer aufgrund des Magenfüllstandes gegenüber nüchternen Ratten erhöht ist. Somit ist zu erwarten, dass die orale Bioverfügbarkeit von NVP in gefütterten Ratten aufgrund des geringeren pH-Werts des Drüsenmagens sowie der längeren Verweildauer in diesem gegenüber nüchternen Ratten erniedrigt ist. Diese Hypothese wird durch eine Studie mit Ratten gestützt, in der gezeigt wurde, dass die orale Bioverfügbarkeit NVPs in gefütterten Ratten von 26% um mehr als den Faktor 3 gegenüber nüchternen Ratten (81%) erniedrigt war [Digenis, 1990]. Einen weiteren negativen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit gefütterter Tiere könnte zudem die Bindung NVPs an Futtermatrix darstellen.

Polyvinylpyrrolidon (PVP) wird z.B. als Trägerstoff in Pharmazeutika eingesetzt, somit ist eine orale Exposition des Verbrauchers mit dem Restmonomer NVP möglich. Um die Bioverfügbarkeit von NVP für den Menschen abzuschätzen, ist auch hier der pH-Wert des Magens zu berücksichtigen. Im präprandialen Zustand liegt dieser zwischen 1,0 und 2,5 [Dressman *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 1988], postprandial steigt er zunächst auf etwa 4,5 - 6,1 [Dressman *et al.*, 1990; Malagelada *et al.*, 1976] an und fällt innerhalb von 1 - 2 Stunden wieder in den präprandialen pH-Bereich zurück. Demnach sind basierend auf den Daten der aktuellen Studie, sowie von Hawi *et al.* eine Halbwertszeit im präprandialen Magen von etwa 2 – 40 Minuten zu erwarten [Hawi *et al.*, 1987]. Im postprandialen Magen würden Halbwertszeiten von mehreren Stunden erwartet. Da der pH-Wert nach 1 – 2 Stunden jedoch wieder in den präprandialen pH-Bereich sinkt, ist dieser für die Abschätzung der Bioverfügbarkeit von NVP relevant. Es wird daher angenommen, dass die orale Bioverfügbarkeit von NVP im Menschen, verglichen mit der Ratte aufgrund des niedrigeren pH-Werts im humanen Magen geringer ist.

Basierend auf den Ergebnissen der aktuellen Studie sowie vorangegangener Studien ist die Inhalationsexposition zur Untersuchung der toxikologischen Eigenschaften von NVP gegenüber der oralen Gabe aufgrund der Magen-pH-abhängigen internen Dosis aufgrund möglicher Hydrolyse zu bevorzugen. Bei der Bewertung von Studien mit oraler NVP-Gabe ist der Fütterungszustand der Tiere und der hiermit verbundene pH-Wert des Magens zu berücksichtigen. Weiterhin kann aufgrund des niedrigeren pH-Wertes des humanen Magens im Vergleich zur Ratte davon ausgegangen werden, dass die orale Bioverfügbarkeit im Menschen geringer ist.

5.2.2 *in vitro* Metabolismus

NVP wirkt als Hepatokanzerogen im inhalativen Langzeitversuch in der Ratte. Für die kanzerogene Wirkung muss jedoch nicht NVP selbst verantwortlich sein, es könnte auch durch Enzyme des Fremdstoffwechsels giftig/metabolisch aktiviert werden. Um mögliche reaktive Metabolite des NVPs zu identifizieren, wurden *in vitro* Inkubationen in verschiedenen Testsystemen der Ratte (subzelluläre Fraktionen der Leber und Lunge, Hepatozyten, Präzisionsleberschnitte (PCLS)) mit NVP durchgeführt.

Inkubationen in subzellulären Fraktionen werden vornehmlich eingesetzt, um Funktionalisierungsreaktionen (Phase I Reaktionen) des Metabolismus zu untersuchen. Diese werden hauptsächlich durch Enzyme der CYP450-Familie katalysiert, welche im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und daher in Mikrosomen und S9-Fraktion enthalten sind. Die CYP-Aktivität hängt von der Verdünnung des Proteingehalts der subzellulären Fraktion ab und beträgt in der S9-Fraktion etwa 20 - 25% der mikrosomalen Fraktion [Jia & Liu, 2007]. Aus diesem Grund wurde der Metabolismus von NVP zunächst in Rattenlebermikrosomen untersucht, um eine möglichst hohe CYP-Aktivität zu gewährleisten. Der beobachtete NVP-Umsatz, welcher weder durch die Erhöhung der Proteinkonzentration, noch durch den Einsatz von Mikrosomen Aroclor 1254-induzierter Ratten gesteigert wurde, betrug unabhängig der eingesetzten NVP-Konzentration nach 2 Stunden etwa 20 - 30%. Aufgrund dieses untypischen Musters einer enzymkatalysierten Reaktion wurde die Abhängigkeit des NVP-Abbaus vom Kofaktor NADPH untersucht. Da ohne Kofaktor-Zugabe kein NVP-Umsatz stattfand, wurde ein enzymkatalysierter NVP-Metabolismus in Mikrosomen bestätigt.

Studien zum *in vitro* Metabolismus von NVP wurden in der Fachliteratur bisher nicht beschrieben, allerdings liegt BASF eine *in vitro* Studie zum Abbau von NVP in Lebermikrosomen der Ratte vor, die zur Bestimmung der hepatischen *Clearance* durchgeführt wurde [BASF, 2015]. Innerhalb dieser Studie wurde bei einer NVP-Inkubationskonzentration von 3 µM ein Umsatz von rund 4% nach 45 Minuten berechnet. Die Wiederfindung, bezogen auf die NVP-Konzentration zu Beginn der Inkubation, betrug nach 5 und 15 Minuten jeweils 95% und 101%, sodass die Wiederfindung von 96% nach 45 Minuten innerhalb der Schwankungsbreite der Analysenmethode liegt und ein metabolischer Umsatz von NVP anhand der *Clearance*-Studie nicht zu belegen ist.

Der Unterschied des nicht nachweisbaren NVP-Umsatzes der *Clearance*-Studie [BASF, 2015] verglichen mit dem beobachteten NVP-Umsatz in den *in vitro* Experimenten der vorliegenden Arbeit, könnte zum Einen in der Aufarbeitung der Mikrosomenfraktion, welche für die *Clearance*-Studie nicht bekannt ist, und zum Anderen in der Durchführung der Inkubation begründet sein.

5 Diskussion

Die Inkubation der *Clearance*-Studie fand über einen Zeitraum von nur 45 Minuten statt, was weniger als der Hälfte der Inkubationszeit von 2 Stunden entspricht. Zudem wurde DMSO (0,25%) als Lösemittel eingesetzt, während innerhalb der vorliegenden Arbeit aufgrund der Wasserlöslichkeit von NVP auf Lösemittel verzichtet wurde. Des Weiteren wurde der Kofaktor NADPH in der *Clearance*-Studie als Lösung zugesetzt, während die *in vitro* Experimente dieser Arbeit mit NADPH-generierendem System durchgeführt wurden, welches neben NADPH zudem Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase enthielt.

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete metabolische Umsatz NVPs in Inkubaten mit Mikrosomen wird durch die Ergebnisse der Untersuchungen in Rattenleber-S9-Fraktion gestützt. Analog zum Umsatz in Inkubaten mit Mikrosomen, wurde auch in Inkubaten mit S9-Fraktion ein NADPH-abhängiger und NVP-konzentrationsunabhängiger Umsatz von etwa 20 - 30% bei Inkubationskonzentrationen von 1 - 100 μM beobachtet. Dies weist darauf hin, dass NVP mittels eines Enzyms metabolisiert wird, welches sowohl in Mikrosomen, als auch in der S9-Fraktion enthalten ist. Daher scheinen zytosolische Enzyme nicht maßgeblich am beobachteten *in vitro* Metabolismus von NVP beteiligt, da diese in der subzellulären Fraktion der Mikrosomen nicht enthalten sind.

Ferner wurde der Metabolismus von NVP in Inkubationen mit Rattenlungen-S9 untersucht, da NVP nach inhalativer Exposition zu Lebertumoren in der Ratte führte. In Rattenlungen-S9 wurde ein maximaler NVP-Umsatz von 4% beobachtet, was etwa einem Fünftel des Umsatzes in subzellulären Fraktionen der Rattenleber entspricht. Somit konnte gezeigt werden, dass der NVP-Metabolismus hauptsächlich in der Leber stattfindet.

Um den Metabolismus von NVP in Hepatozyten zu untersuchen, wurden kryokonservierte Rattenhepatozyten eingesetzt und über 6 Stunden mit einer nicht zytotoxischen NVP-Konzentration von 100 μM inkubiert. Hierbei wurde kein relevanter Umsatz von NVP bezogen auf die Mediumkontrolle beobachtet. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse der schon erwähnten *Clearance*-Studie [BASF, 2015] bestätigt, welche keinen Abbau von NVP nach 60 Minuten Inkubationszeit bei 3 μM Inkubationskonzentration in Hepatozyten zeigte.

Somit konnte der in subzellulären Fraktionen nachgewiesene Umsatz von NVP in Hepatozyten in beiden Experimenten nicht beobachtet werden. Eine mögliche Begründung hierfür sind die unterschiedlichen Eigenschaften der Testsysteme. Während subzelluläre Fraktionen ausgewählte Zellkompartimente enthalten, stellen Hepatozyten intakte Zellen dar. Daher müssen Xenobiotika zur Metabolisierung zunächst in die Zelle aufgenommen werden, was durch Diffusion, häufiger aber durch Membrantransporter erfolgen kann.

Informationen zum Mechanismus der Aufnahme NVPs in Hepatozyten sind nicht bekannt. Allerdings wurde in zahlreichen Studien an Ratte und Maus durch die NVP-vermittelte Hepatotoxizität, sowie die Sekretion von NVP-Metaboliten in die Gallenflüssigkeit

nachgewiesen, dass NVP *in vivo* in Hepatozyten aufgenommen wird. Dennoch wäre denkbar, dass NVP im eingesetzten *in vitro* System der kryokonservierten Hepatozyten nicht in die Zelle aufgenommen und folglich auch nicht metabolisiert wurde, da die Expression einiger Transporter in kryokonservierten Hepatozyten verringert ist. Lundquist *et al.* beschrieben, dass einige organischen Aniontransporter (OAT), organische Kationtransporter (OCT), Monocarboxylattransporter (MCT), sowie organische Anionen transportierende Polypeptide (OATP) in kryokonservierten Hepatozyten geringer exprimiert werden und auch eine geringere Aktivität aufweisen. Für den MCT wurde hierbei eine um 50% verringerte Expression und für OATP eine um > 90% verringerte Aktivität ermittelt [Lundquist *et al.* 2014]. Sollte die NVP-Aufnahme in die Zelle durch einen Membrantransporter erfolgen und dieser in kryokonservierten Hepatozyten eine geringere oder keine Aktivität aufweisen, wäre dies eine mögliche Erklärung für die metabolische Stabilität von NVP in Hepatozytensuspensionskultur. Um diese These zu bestätigen, wären Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus von NVP in Hepatozyten notwendig, um beteiligte Membrantransporter zu identifizieren.

Zur Untersuchung des *in vitro* NVP-Metabolismus im intakten Zellverband wurden PCLS der Ratte eingesetzt. Dieses *ex vivo* System stellt eine komplette Funktionseinheit der Leber dar. Diese enthält Transportproteine, Enzyme sowie Kofaktoren, Gallenkanälchen und weitere Leberzellarten, welche miteinander interagieren können. Somit ist dieses *in vitro* System der *in vivo* Situation, verglichen mit den bereits beschriebenen *in vitro* Systemen, morphologisch am nächsten. Zudem sind PCLS in der Lage Xenobiotika über den Phase I und II Metabolismus zu funktionalisieren bzw. zu konjugieren, ohne dass die entsprechenden Co-Faktoren der Enzyme zugesetzt werden müssen [de Graaf *et al.*, 2007; Soldatow *et al.*, 2013; Starkhotzko *et al.*, 2017; Vickers *et al.* 2004; Vickers *et al.*, 2011]. Allerdings kann der Einfluss von Glucuronidierungsreaktionen unterschätzt werden, da diese in PCLS aufgrund des über den Inkubationszeitraum entstehenden Glycogenmangels vermindert ablaufen können, wie es für Acetaminophen beschrieben wurde [Evdokimova *et al.*, 2001].

In den innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Inkubationen von NVP und PCLS bei nicht zytotoxischen Konzentrationen von 1, 10 und 100 μM über 4, 6, 8 und 24 Stunden, wurde ein konzentrations- und zeitabhängiger, enzymatischer NVP-Abbau beobachtet. Demnach stellen PCLS das einzige untersuchte *in vitro* System dar, welches unter den gegebenen Bedingungen einen konzentrationsabhängigen NVP-Abbau von bis zu 48% und somit etwa 20 - 30% mehr Umsatz im Vergleich zu Inkubationen mit subzellulären Fraktionen der Leber zeigte.

Die Ergebnisse in PCLS bestätigen den enzymatischen NVP-Abbau, der auch in Inkubationen mit subzellulären Fraktionen beobachtet wurde und zeigt, dass PCLS in der Lage sind NVP ins Zelllumen zu transportieren und dort zu metabolisieren.

5 Diskussion

Zudem wurde NVP mit Rattenvollblut inkubiert um auszuschließen, dass Metabolite in Blut gebildet werden, die für die kanzerogene Wirkung in der Leber verantwortlich sein könnten. NVP weist die chemische Struktur eines Amids bzw. Lactams auf, daher wäre denkbar, dass NVP durch Esterasen oder Aryl-Acylamidasen metabolisiert wird, welche in Blut enthalten sind [Furihata *et al.*, 2005; Tsujita & Okuda, 1983]. NVP wurde unter den eingesetzten Inkubationsbedingungen als stabil in Rattenvollblut bewertet, sodass in Blut kein Metabolit gebildet wird, der für die Hepatotoxizität von NVP verantwortlich sein könnte.

Metabolischer Umsatz von NVP *in vitro* wurde in subzellulären Fraktionen sowie PCLS nachgewiesen. Untersuchungen zu gebildeten Metaboliten in diesen *in vitro* Systemen wurden durchgeführt und werden im Folgenden im Zusammenhang mit bestehenden Daten diskutiert. Hierzu wurde zunächst ein Metabolismusschema für NVP postuliert (Abbildung 22), welches unter anderem auf den veröffentlichten *in vivo* Kinetikdaten zu NVP [Digenis & McClanahan, 1982; McClanahan *et al.*, 1983, 1984, 1987] und dessen strukturverwandten Substanzen N-Methylpyrrolidon (NMP) und N-Ethylpyrrolidon (NEP) [Åkesson & Jönsson, 1997; Koch *et al.*, 2014; MAK on NEP, 2016; MAK on NMP, 2006; RAC opinion on NMP, 2014; Wells & Digenis, 1988; Wells *et al.*, 1988], sowie auf vorläufigen *in vivo* Daten zu NVP [BASF, 2016] und auf den innerhalb dieser Arbeit erhobenen *in vitro* Metabolismusdaten basiert.

Für die zu NVP strukturverwandten Substanzen N-Ethylpyrrolidon (NEP) und N-Methylpyrrolidon (NMP), welche auch eine Lactamstruktur, sowie einen Alkylrest am Stickstoff beinhalten, ist der *in vivo* Metabolismus bekannt. Die Substanzen werden zunächst zum Hauptmetaboliten 5-Hydroxy-NEP bzw. 5-Hydroxy-NMP hydroxyliert. Anschließend erfolgt die Oxidation zum jeweiligen Succinimid und in einem weiteren Schritt zum jeweiligen 2-Hydroxysuccinimid [Åkesson & Jönsson, 1997; Koch *et al.*, 2014; MAK on NEP, 2016; MAK on NMP, 2006; RAC opinion on NMP, 2014; Wells & Digenis, 1988; Wells *et al.*, 1988]. In der Ratte ist das Enzym CYP2E1 maßgeblich am NMP-Metabolismus beteiligt, während es im humanen Metabolismus von NMP nur eine untergeordnete Rolle spielt [Ligoocka *et al.*, 2003; MAK on NMP, 2006].

Ein weiterer Nebenmetabolit, welcher für NMP in humanem Urin, wie auch im Urin der Ratte identifiziert wurde, ist 2-Pyrrolidon [Carnerup *et al.*, 2005; Carnerup *et al.*, 2006]. Der Metabolismus 2-Pyrrolidons kann über Hydrolyse zur γ -Aminobuttersäure (GABA, Abbildung 22, k), sowie über das 5-OH-2-Pyrrolidon (Abbildung 22, l) zum Succinimid (Abbildung 22, m) erfolgen [Callery *et al.*, 1979; Lundgren & Fales, 1980; Midgley *et al.*, 1992; REACH Dossier 2-Pyrrolidon].

Aufgrund der Struktur analogie der beiden Substanzen wurde der für NMP und NEP beschriebene Metabolismusweg auch für NVP postuliert, wobei dieses über 5-OH-NVP und N-Vinylsuccinimid zu 2-OH-N-Vinylsuccinimid (Abbildung 22, d, e, f) oxidiert, oder ebenfalls

5 Diskussion

zum 2-Pyrrolidon dealkyliert werden kann (Abbildung 22, j). Während der Dealkylierungsreaktion zu 2-Pyrrolidon ist die Abspaltung von Acetaldehyd (Abbildung 22, n) analog zur sauren Hydrolyse denkbar, welches weiter zu Acetat (Abbildung 22, o) umgesetzt wird.

Der Metabolismus NVPs wurde innerhalb von Kinetikstudien nach *i.v.* Applikation in männlichen Sprague-Dawley Ratten untersucht [Digenis & McClanahan, 1982; McClanahan *et al.*, 1983, 1984, 1987]. In ersten Studien mit N-¹⁴C-Vinylpyrrolidon wurden 12% der applizierten Aktivität als Acetat (Abbildung 22, o) im Urin nachgewiesen; alle weiteren Metabolite zeigten sich wasserlöslich, wobei 90% als azide und etwa 1,8% als basische Fraktion bestimmt wurden [McClanahan *et al.*, 1983]. Um zudem mögliche dealkylierte Metabolite (ohne Vinylgruppe) zu erfassen, wurden weitere Untersuchungen in Sprague-Dawley Ratten mit simultaner Applikation (*i.v.*) von N-Vinyl-4-³H-pyrrolidon und N-¹⁴C-Vinylpyrrolidon durchgeführt (³H : ¹⁴C = 2:1). Anhand der Radiochromatogramme des nach 6 Stunden post Applikation vermessenen Urins wurden 2 Hauptmetabolite beobachtet, die sowohl das ³H-, als auch das ¹⁴C-Label enthielten (³H : ¹⁴C=2:1). Die Identität dieser beiden Hauptmetabolite, welche keiner Dealkylierung unterworfen waren, blieb unaufgeklärt [McClanahan *et al.*, 1987].

Etwa 4%, 5,6% und 6,1% der applizierten Aktivität wurde mittels Retentionszeitvergleichs mit Standardlösungen den Nebenmetaboliten N-Vinylsuccinimid (Abbildung 22, e), N-Acetyl-γ-aminobuttersäure (N-Acetyl-GABA, Abbildung 22, i) und 2-Pyrrolidon (Abbildung 22, j) zugeordnet. Zudem wurden zwei weitere Nebenmetabolite beobachtet, welche 4,8% der applizierten ¹⁴C-Aktivität bzw. 2,2% der ³H-Aktivität entsprachen [McClanahan *et al.*, 1987]. Die Struktur dieser Metabolite blieb unaufgeklärt, jedoch ist anhand der Radiomarkierungen determiniert, dass der zu 4,8% enthaltene Metabolit aus der Vinylgruppe entstanden sein muss, der tritiummarkierte Metabolit hingegen aus der Ringstruktur abgeleitet wurde.

Anhand der von McClanahan *et al.* [McClanahan *et al.*, 1983, 1987] erhobenen Daten, kann angenommen werden, dass NVP *in vivo* vornehmlich zu sauren, nicht dealkylierten Spezies metabolisiert wird, die hauptsächlich renal eliminiert werden. Zudem können die Nebenmetabolismuswege zu 2-Pyrrolidon (Abbildung 22, j), sowie zu N-Vinylsuccinimid (Abbildung 22, e) und N-Acetyl-GABA (Abbildung 22, i) postuliert werden.

Die Metabolismusdaten der Strukturanaloga NMP und NEP unterstützen die Existenz des von McClanahan *et al.* zugeordneten NVP-Nebenmetaboliten 2-Pyrrolidon [McClanahan *et al.*, 1987]. Eine metabolische Dealkylierung der beschriebenen Alkylpyrrolidone spielt im *in vivo* Metabolismus demnach lediglich eine untergeordnete Rolle.

Zudem gibt es, aufgrund der Zuordnung N-Vinylsuccinimids [McClanahan *et al.*, 1987] und des im NEP und NMP Metabolismus identifizierten Analogs, Hinweise darauf, dass der Phase I Metabolismus NVPs zumindest teilweise ähnlich zu NMP verläuft. Ein Abbau von NVP über 5-

OH-NVP (Abbildung 22, d) zu N-Vinylsuccinimid (Abbildung 22, e) und weiterer Oxidation zum 2-OH-N-Vinylsuccinimid (Abbildung 22, f) wurde daher postuliert.

Nach den beschriebenen Gemeinsamkeiten der Metabolismuswege der Alkylpyrrolidone, sind auch Unterschiede auszumachen. Während im NMP- und NEP-Metabolismus keine Hinweise auf eine Ringöffnung zu verzeichnen sind, könnte dies, basierend auf dem von McClanahan *et al.* postulierten NVP-Nebenmetaboliten N-Acetyl-GABA (Abbildung 22, i), eine Rolle im NVP-Metabolismus spielen. Hierbei ist der Zwischenmetabolit N-Acetylpyrrolidon denkbar (Abbildung 22, h), wobei die metabolische Oxygenierung einer Vinylgruppe ungewöhnlich ist. Ein weiterer möglicher Metabolit nach Hydrolyse der Lactonstruktur ist N-Vinyl-GABA (Abbildung 22, q).

Zudem sind aufgrund der Vinylgruppe weitere Metabolite NVPs denkbar, die sowohl für NEP, wie NMP aufgrund der nicht vorhandenen Doppelbindung keine Rolle spielen. Die Doppelbindung NVPs stellt eine reaktive Gruppe im Molekül dar, welche zum Epoxid (Abbildung 22, a) aktiviert oder durch direkte Konjugation mit GSH (Abbildung 22, p) entgiftet werden kann. Eine analoge Reaktion ist auch für den postulierten Metaboliten N-Vinyl-GABA (Abbildung 22, q) möglich. Wird ein Epoxid aus einer Vinylgruppe gebildet (Abbildung 22, a, s), kann dieses zum Einen durch die Konjugation mit GSH (Abbildung 22, b) entgiftet werden, zum Anderen ist ein Umsatz durch die Epoxidhydrolase zum α,β -Diol möglich (Abbildung 22, c).

Ein weiterer Unterschied im Metabolismus von NMP und NVP liegt möglicherweise in der Bedeutung des Phase II Metabolismus: Für NMP wurden keine Konjugationsreaktionen wie Glucuronidierung oder Sulfatierung beobachtet [Åkesson & Jönsson, 1997; RAC opinion on NMP, 2014]. Die Eliminierung von NMP und dessen Metaboliten erfolgt vor allem renal, nur ein geringer Teil wird via Faeces ausgeschieden (max. 9% in der Ratte); Hinweise auf Bioakkumulation oder den Eintritt in den enterohepatischen Kreislauf wurden nicht beobachtet [MAK NMP, 2006; Wells & Digenis, 1988; Wells *et al.*, 1988]. Demgegenüber weisen die von McClanahan *et al.* erhobenen Kinetikdaten nach *i.v.* Applikation darauf hin, dass NVP-Metabolite in den enterohepatischen Kreislauf eintreten. Sechs Stunden nach Applikation wurde etwa 17 - 25% der applizierten Aktivität in der Gallenflüssigkeit detektiert, wobei weniger als 1% auf NVP selbst entfiel, und nach 24 Stunden wurden maximal etwa 5% der Aktivität über die Faeces ausgeschieden [McClanahan *et al.*, 1983, 1984, 1987]. Da mögliche Phase-I-Metabolite eine geringe Masse aufweisen, ist deren Elimination über die Galle unwahrscheinlich, sodass eine vorherige Konjugationsreaktion (Phase II Metabolismus), z.B. mit UDP-Glucuronsäure, anzunehmen ist.

5 Diskussion

Zur weiteren Diskussion der Plausibilität der postulierten NVP-Metabolite wurden Metaboliten-Screening Untersuchungen im Urin der Ratten der fünftägigen Inhalationsstudie herangezogen. Der Urin wurde hierbei nach Geschlecht und Expositionsgruppe getrennt analysiert [BASF, 2016]. Die ermittelten Massen potentieller NVP-Metaboliten wurden angegeben, sofern deren relative Häufigkeit sich mit steigender NVP-Expositionskonzentration erhöhte. Da keine Standards zur eindeutigen Metaboliten-identifizierung zur Verfügung standen, sind die ermittelten Daten lediglich als Hinweis auf mögliche Metabolite einzuordnen.

Potentielle Metaboliten mit folgenden Massen wurden innerhalb dieses Metaboliten-Screenings im Urin der NVP exponierten Ratten ermittelt: 85, 111, 125, 127, 129, 145, 303, 305 g/mol [BASF, 2016].

Die Masse 85 g/mol entspricht der Masse von 2-Pyrrolidon und ist zu geringem Anteil auch im Urin der Kontrollgruppe enthalten, wobei deren Häufigkeit in Abhängigkeit der NVP-Expositionskonzentration stark ansteigt. Das Vorkommen im Urin der unbehandelten Kontrollgruppe kann mit der endogenen Bildung von 2-Pyrrolidon erklärt werden [Bandle *et al.*, 1984]. Auf Basis der Ergebnisse der bereits zitierten Metabolismusstudien, kann davon ausgegangen werden, dass die Masse 85 g/mol im Urin der fünftägigen NVP-Inhalationsstudie dem Metaboliten 2-Pyrrolidon zugeordnet werden kann.

Die Masse 111 g/mol wurde ausschließlich im Urin der gegen NVP exponierten Tiere beobachtet und entspricht der Masse NVPs.

Die postulierten Metabolite 5-OH-NVP, N-Epoxyrrolidon, und N-Acetylpyrrolidon (Abbildung 22, a, d, h) mit der Summenformel $C_6H_9NO_2$ weisen die im Urin beobachtete Masse 127 g/mol auf. Diese beobachtete Masse kann keiner dieser potentiellen Metaboliten eindeutig zugeordnet werden, da keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen. Zudem sind im Massenchromatogramm mehrere Peaks zu beobachten, sodass mehrere Metabolite dieser Masse entstanden sind. Argumente, die für die Bildung des 5-OH-NVPs sprechen, sind: Der entsprechende Metabolit wurde auch für die Strukturanaloge NMP und NEP identifiziert. Der Folgemetabolit N-Vinylsuccinimid wurde von McClanahan *et al.* [McClanahan *et al.*, 1987] im Urin zugeordnet und dessen Masse von 125 g/mol wurde im Metabolitenscreening des Urins der 10 ppm und 20 ppm Expositionsgruppe der Inhalationsstudie beobachtet [BASF, 2016]. Weiterhin wurde die Masse 303 g/mol der NVP exponierten Tiere der Inhalationsstudie beobachtet, welches ein Hinweis auf den möglichen aus 5-OH-NVP gebildeten Phase-II-Metaboliten NVP-5-O-Glucuronid sein könnte.

Die Detektion der unter anderem N-Acetyl-GABA entsprechenden Masse 145 g/mol im Urin des Screening-Versuch [BASF, 2016] sowie dessen Zuordnung im Urin durch McClanahan *et al.* [McClanahan *et al.*, 1987] unterstützen die Hypothese des Zwischenmetaboliten N-

5 Diskussion

Acetylpyrrolidon (Abbildung 22, h). Allerdings wäre die Oxygenierung einer Vinylgruppe eine ungewöhnliche metabolische Umsetzung.

Die Bildung des Epoxids (Abbildung 22, a) ausgehend von NVP, welches auch die Masse 127 g/mol aufweist, ist basierend auf der vorhandenen Vinylgruppe auf struktureller Ebene plausibel. Dessen Entgiftung könnte über die Epoxidhydrolase zum Diol (Abbildung 22, c), sowie über eine Konjugation mit GSH (Abbildung 22, b) erfolgen. Ein Argument für die Bildung des Epoxids und dessen Entgiftung zum Diol ist die Detektion der Masse 145 g/mol in Screeninguntersuchungen im Urin der inhalativ exponierten Ratten, welche unter anderem dem Diol zugeordnet werden könnte [BASF, 2016].

Gegen die Bildung eines reaktiven Epoxids aus NVP, welches gentoxisch agieren und als ultimales Kanzerogen wirken könnte, sprechen die *in vivo* Untersuchungen zur Gentoxizität von NVP. Weder in den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur Gentoxizität nach inhalativer Exposition gegen kanzerogene NVP Konzentrationen, noch in einer *in vivo* DNA-Bindungsstudie (Radiolabel: N-Vinyl[α,β - ^{14}C]-2-pyrrolidon, N-Vinyl-2-pyrrolidone[5- ^{14}C]) [IRI, 1986] wurden Hinweise auf eine gentoxische Wirkung von NVP beobachtet.

Eine weitere im Metabolitenscreening beobachtete Masse im Urin der NVP exponierten Ratten der Gentoxizitätsstudie ist 129 g/mol, was einer Summenformel von $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$ entspricht [BASF, 2016]. Diese Masse und Summenformel ist ein Hinweis auf den möglichen Metaboliten N-Vinyl-GABA im Urin. Zudem wurde die Masse 305 g/mol im Metabolitenscreening [BASF, 2016] detektiert, was einen Hinweis auf das N-Glucuronid N-Vinyl-GABA sein könnte.

Die im Metabolitenscreening beobachtete Masse 145 g/mol mit zugehöriger Summenformel $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_3$ [BASF, 2016] entspricht der Masse und Summenformel der folgenden postulierten Metabolite: N-(1,2-dihydroxy-ethyl)-2-pyrrolidon, N-(epoxyethyl)-GABA und N-Acetyl-GABA (Abbildung 22, c, s, i). Da keine Referenzsubstanzen verfügbar waren, kann diese Masse keinem einzelnen Metaboliten eindeutig zugeordnet werden. Einen Hinweis, dass es sich um N-Acetyl-GABA handeln könnte, liefert die Zuordnung dieses Metaboliten in Urin NVP-dosierter Ratten durch McClanahan *et al.* [McClanahan *et al.*, 1987].

Basierend auf den bereits diskutierten *in vivo* Daten, wurde anhand des beobachteten NVP-Umsatzes in subzellulären Fraktionen und PCLS die Bildung verschiedener Metabolite des Phase I und II Metabolismus *in vitro* erwartet. Dies konnte anhand der *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da 2-Pyrrolidon (Abbildung 22, j) den Hauptmetaboliten und möglicherweise auch den einzigen Metaboliten in den eingesetzten *in vitro* Systemen darstellt.

Prinzipiell wäre es denkbar, dass vor allem stark polare, nicht flüchtige *in vitro* Metaboliten mit der angewendeten Analysemethode (GC-MS) nicht detektiert wurden. Hierzu zählen z.B. polare Phase-II-Metaboliten, wie Glutathionkonjugate (z.B. Abbildung 22, b, p), deren Bildung

in S9-Inkubaten durch GSH-Zusatz, sowie in PCLS möglich wäre. Die Bildung weiterer Phase-II-Konjugate, wie Glucuronide (z.B. Abbildung 22, g, r), wäre ausschließlich in PCLS-Inkubationen möglich, da in Inkubationen mit subzellulären Fraktionen neben NADPH keine weiteren Kofaktoren zugesetzt wurden. Der prozentuale NVP-Umsatz in S9-Fraktionen, sowie Mikrosomen war nahezu identisch, sodass GSH keine Rolle bei der Metabolisierung von NVP *in vitro* zu spielen scheint. Diese Hypothese ist anhand der NVP-Struktur zwar ungewöhnlich, wird allerdings *in vivo* durch die unveränderten GSH-Gehalte und GSH/GSSG-Quotienten der Leberhomogenate der inhalativ gegen NVP exponierten Ratten unterstützt.

Zudem wurde 2-Pyrrolidon sowohl in subzellulären Fraktionen der Leber und Lunge, als auch in PCLS eindeutig als Hauptmetabolit NVPs identifiziert, da der beobachtete NVP-Umsatz zu $\geq 94\%$ bzw. $\geq 90\%$ für subzelluläre Fraktionen und PCLS auf die Bildung von 2-Pyrrolidon zurückgeführt wurde. Demnach können maximal 6% bzw. 10% der eingesetzten Konzentration zu weiteren, nicht identifizierten Metaboliten von NVP in subzellulären Fraktionen der Leber bzw. PCLS umgesetzt worden sein.

Es wurde gezeigt, dass NVP in subzellulären Fraktionen, sowie PCLS zum Hauptmetaboliten 2-Pyrrolidon umgesetzt wird, sodass der Phase II Metabolismus *in vitro* lediglich eine untergeordnete Rolle spielen kann.

Während der Dealkylierung NVPs könnte neben 2-Pyrrolidon auch Acetaldehyd (Abbildung 22, n) entstanden sein, wie es bei der abiotischen sauren Hydrolyse gezeigt wurde. Acetaldehyd wurde innerhalb der Analyse der *in vitro* Inkubate nicht nachgewiesen, was einerseits in einer weiteren Oxidation zu Acetat (Abbildung 22, o) oder der Reaktion des Acetaldehyds mit Matrixbestandteilen begründet werden könnte. Zudem wäre möglich, dass, wenn der Metabolismus über eine Oxygenierung zum N-Acetyl-2-pyrrolidon (Abbildung 22, h) erfolgt, Acetat und 2-Pyrrolidon aus dessen Hydrolyse entstehen und kein Acetaldehyd gebildet wird. Sollte Acetaldehyd entstehen, welcher sowohl zytotoxisch, wie auch gentoxisch wirkt, ist dessen Menge wahrscheinlich nicht ausreichend, um die kanzerogene Wirkung von NVP zu erklären [MAK NVP, 2014]. Hinweise hierauf liefern Gentoxizitätstests, wie z.B. der Mutationstest am TK-Lokus, oder der Chromosomenabberationstest, welche für Acetaldehyd im Gegensatz zu NVP positiv ausfielen [RAC Acetaldehyd, 2016]. Zudem sind keine Hinweise auf eine zytotoxische Wirkung NVPs bekannt: In der in dieser Arbeit beschriebenen Gentoxizitätsstudie wurde keine Zytotoxizität in der Leber beobachtet. Auch in der Zellproliferationsstudie wurden vermehrte Apoptosen erst bei höheren NVP-Konzentrationen verglichen mit der Induktion der Hepatozytenproliferation detektiert. Zudem wurden die Apoptosen in anderen Zonen der Leber als die Zellproliferation beobachtet [BASF, 2011].

Beim Vergleich der beschriebenen *in vivo* Daten und der in dieser Arbeit ermittelten *in vitro* Ergebnisse bleibt festzuhalten, dass der ohne Dealkylierung verlaufende Hauptmetabolismusweg, wie er für NVP, NMP und NEP *in vivo* beschrieben ist, durch die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. In den untersuchten *in vitro* Systemen wurde 2-Pyrrolidon als Hauptmetabolit bzw. möglicherweise als einziger Metabolit nach NVP-Inkubation in subzellulären Fraktionen und PCLS identifiziert. Es ist demnach davon auszugehen, dass der *in vivo* Metabolismus NVPs mit den gängigen *in vitro* Metabolismussystemen nicht nachgestellt werden kann.

Um den Metabolismus NVPs weiter zu untersuchen, wäre daher eine *in vivo* Kinetikstudie in der Ratte sinnvoll. Hierbei sollte, wie in den bereits beschriebenen Studien mit radioaktiv markiertem NVP gearbeitet werden, da sowohl NVP, wie auch dessen Metabolite eine geringe Masse aufweisen und daher ohne Markierung analytisch schwer von biologischer Matrix zu unterscheiden sind. Um dealkylierte von nicht dealkylierten Metaboliten zu unterscheiden, wäre eine Radiomarkierung am Lactonring, sowie an der Vinylstruktur hilfreich. Neben der Analyse von NVP und dessen Metaboliten in Plasma und Urin sollten zudem die Metabolite in der Gallenflüssigkeit adressiert werden. Die Sekretion der NVP-Metabolite von bis zu 25% der applizierten Dosis in die Gallenflüssigkeit und den Eintritt in den enterohepatischen Kreislauf [McClanahan *et al.*, 1987], könnte die erhöhte Hepatotoxizität von NVP gegenüber der Strukturanaloga NMP und NEP begründen, da die Leber toxischen NVP-Metaboliten so über einen längeren Zeitraum ausgesetzt sein könnte. Für NMP und NEP liegen hingegen keine Hinweise auf enterohepatische Zirkulation vor.

Zur analytischen Auswertung einer solchen Studie wäre eine Analyse per Radio-HPLC-MS mit anschließendem gezieltem Vergleich der Metabolite mit Referenzsubstanzen wünschenswert, um gebildete Metabolite eindeutig identifizieren zu können.

Eine Aufklärung des Metabolismus von NVP und die Identifikation der für die Toxizität verantwortlichen Struktur(en), sowie das Aufstellen einer möglichen Metabolismus-Toxizitätskorrelation wäre auch für weitere N-Vinyl-Verbindungen mit hepatotoxischer Wirkung, wie N-Vinylcaprolactam oder N-Methyl-N-vinyl-acetamid hilfreich, da auch für diese Substanzen keine Informationen zum Metabolismus vorliegen.

5 Diskussion

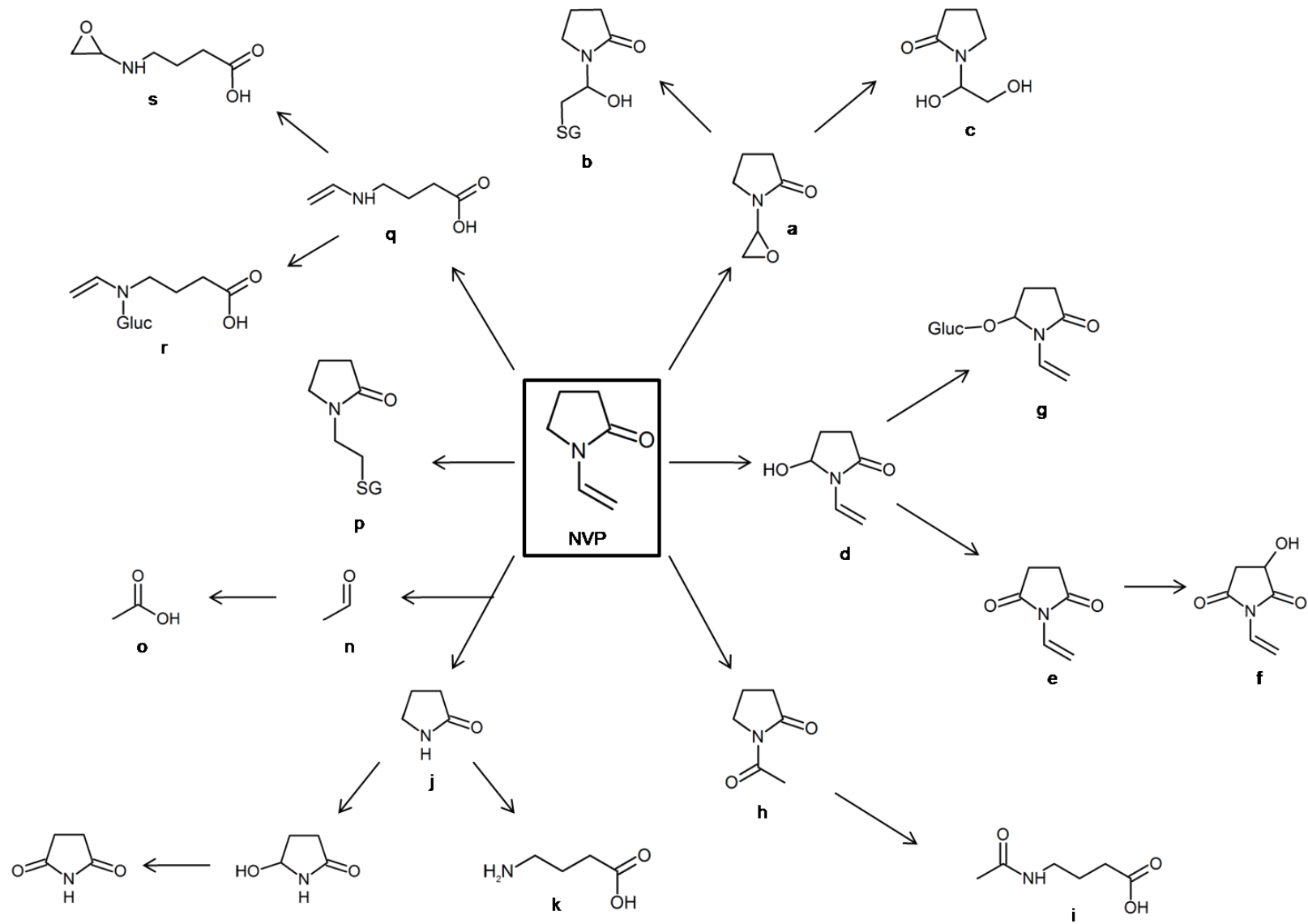


Abbildung 22: Postuliertes Metabolismusschema für NVP

6 Zusammenfassung

N-Vinyl-2-pyrrolidon (NVP) ist eine Industriechemikalie, von welcher jährlich mehrere tausend Tonnen produziert werden. NVP wird vornehmlich als Monomer in Kunststoffen zur hauptsächlichen Anwendung in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie sowie der Lebensmitteltechnologie verwendet. Außerdem wird NVP in UV-härtenden Klebstoffen, Druckfarben und Beschichtungen eingesetzt.

NVP wirkt in der Ratte nach inhalativer Exposition kanzerogen, wobei Expositionen von ≥ 5 ppm zu Hepatokarzinomen, ≥ 10 ppm zu Adenokarzinomen der Nase und ≥ 20 ppm zu Karzinomen im Larynx führen. Die Leber zeigt sich daher als empfindlichstes Zielorgan der Kanzerogenese, deren genauer Mechanismus nicht geklärt ist. Basierend auf den zur Verfügung stehenden Daten (z.B. *in vitro*: Ames, Chromosomenabberations- und UDS-Test; *in vivo*: MNT in der Maus *p.o.*, DNA-Bindungsstudie in der Ratte *i.p.*) liegt kein Hinweis auf einen gentoxischen kanzerogenen Mechanismus vor. Einziger Anhaltspunkt für einen gentoxischen Mechanismus ist die sehr geringe kanzerogene Effektkonzentration.

Im Rahmen der in dieser Arbeit beschriebenen Inhalationsstudie an der Ratte sollte der Mechanismus der NVP-vermittelten Hepatokanzerogenese untersucht werden. Der Fokus lag dabei auf der Untersuchung möglicher Gentoxizität, hepatischer Rezeptoraktivierung, sowie der Induktion von oxidativem Stress.

Zur Untersuchung der Gentoxizität wurde nach einer fünftägigen Inhalationsexposition von Wistar Ratten gegenüber kanzerogenen NVP-Konzentrationen (5, 10, 20 ppm, 6 Tiere/Geschlecht und Dosis) der Mikrokerntest (MNT) im Knochenmark (OECD 474) und der Comet Assay in Leber und Lunge durchgeführt. Leber und Lunge wurden zur Untersuchung gewählt, da sie das Hauptzielorgan der Kanzerogenese bzw. das Organ erster Exposition (*site of first contact*) darstellen. Der Comet Assay wurde mit und ohne Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (FPG) Modifikation durchgeführt, um die Sensitivität des Testsystems gegenüber oxidativen DNA-Schäden, sowie N7-Alkylguaninaddukten zu erhöhen.

Der MNT zeigte keine chromosomenschädigende Wirkung im Knochenmark nach Inhalation kanzerogener NVP-Konzentrationen. Weiterhin wurde im Comet Assay mit und ohne FPG-Modifikation in Leber- und Lungenzellen der NVP-exponierten Tiere keine Erhöhung der DNA-Strangbrüche verglichen mit der Vehikelkontrollgruppe beobachtet. Die negativen Ergebnisse der umfassenden Untersuchungen zur Gentoxizität in verschiedenen Organen innerhalb der NVP-Inhalationsstudie bestätigen die bereits vorliegenden *in vitro* und *in vivo* Studien, welche ebenfalls keine durch NVP induzierte Gentoxizität oder Mutagenität zeigten. Demnach liegen keine Hinweise auf einen gentoxischen Mechanismus der NVP-induzierten Hepatokanzerogenese vor.

6 Zusammenfassung

Oxidativer Stress, induziert durch NVP oder dessen Metabolite, als möglicher Wirkmechanismus der Kanzerogenese wurde in der beschriebenen Studie in Leberhomogenaten der männlichen Ratten der NVP-Inhalationsstudie mithilfe der Bestimmung der nicht proteingebundenen Sulfhydrylgruppen (NPSH) und des GSH-Recycling-Assays zur Analyse des reduzierten (GSH) und oxidierten (GSSG) Glutathiongehalts untersucht. NPSH-, GSH und GSSG-Gehalte in Leberhomogenaten der NVP exponierten Tiere zeigten sich unbeeinflusst im Vergleich zur Vehikelkontrolle. Zudem wurde innerhalb des Comet Assays mit FPG-Modifikation kein Hinweis auf oxidative DNA-Schäden beobachtet. Daher wurde oxidativer Stress als möglicher Wirkmechanismus der NVP vermittelten Hepatokanzerogenese ausgeschlossen.

Zur Untersuchung der Aktivierung der folgenden Rezeptoren - Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR), konstitutiver Androstan Rezeptor (CAR) und Pregnan-X-Rezeptor (PXR) - welche am kanzerogenen Mechanismus NVPs beteiligt sein könnten, wurden Markerenzymaktivitäten (CYP1A, CYP2B, CYP3A) mittels Alkoxyresorufin-Dealkylase-Assay analysiert. In Leber- und Lungenmikrosomen der männlichen Ratten der NVP-Inhalationsstudie wurde keine Erhöhung der genannten Enzymaktivitäten beobachtet. Somit lieferte die NVP-Inhalationsstudie keine Hinweise auf eine Aktivierung und Beteiligung von AhR, CAR und PXR an der NVP-vermittelten Hepatokanzerogenese.

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses des Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptors (PPAR α) auf den hepatokanzerogenen Mechanismus NVPs, wurden Enzymaktivitätsbestimmungen der beiden Markerenzyme CYP4A und PalmitoylCoA-Oxidase eingesetzt. Eine statistisch signifikante NVP-abhängige Enzymaktivitätserhöhung wurde für keines der beiden Enzyme festgestellt, sodass kein Hinweis auf Peroxisomenproliferation als nagerspezifischen, hepatokanzerogenen Wirkmechanismus von NVP vorliegt.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit waren Untersuchungen zur abiotischen und metabolischen Stabilität NVPs *in vitro*. Die bereits in vorangegangenen Studien beschriebene Säurelabilität NVPs wurde durch die Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit bestätigt, wobei ein steiler Anstieg der Halbwertszeit zwischen pH 2 und 3 zu verzeichnen war. Als Hydrolyseprodukte wurden 2-Pyrrolidon und Acetaldehyd identifiziert. Untersuchungen des NVP-Metabolismus wurden anhand von NVP-Inkubationen in unterschiedlichen *in vitro* Systemen wie subzellulären Fraktionen (Leber und Lunge), Hepatozyten und Präzisionsleberschnitten (PCLS) durchgeführt. Ein metabolischer Abbau wurde in subzellulären Fraktionen der Leber sowie PCLS beobachtet, wobei der metabolische Umsatz in subzellulären Fraktionen keine Abhängigkeit zur eingesetzten NVP-Konzentration zeigte.

6 Zusammenfassung

2-Pyrrolidon wurde als Hauptmetabolit in den *in vitro* Systemen (PCLS und subzellulären Fraktionen) identifiziert und stellt in subzellulären Fraktionen den einzigen Metaboliten von NVP dar. Innerhalb bereits beschriebener Untersuchungen des *in vivo* NVP-Metabolismus wurden 2 renal eliminierte, nicht dealkylierte Hauptmetabolite beobachtet, jedoch nicht identifiziert. Drei weitere Nebenmetabolite im Urin wurden folgenden Substanzen zugeordnet: N-Acetyl- γ -aminobuttersäure, 2-Pyrrolidon, N-Vinylsuccinimid [McClanahan *et al.*, 1983, 1984, 1987]. Die eingesetzten *in vitro* Systeme sind demnach nicht geeignet den *in vivo* Metabolismus von NVP abzubilden, da 2-Pyrrolidon *in vitro* als Hauptmetabolit identifiziert wurde, *in vivo* jedoch einen Nebenmetaboliten darstellt.

Zur weiteren Untersuchung und Aufklärung des NVP-Metabolismus wäre eine *in vivo* Kinetikstudie in der Ratte mit radioaktiv markiertem NVP hilfreich, innerhalb derer sowohl die Metabolite im Urin wie auch im Plasma und der Gallenflüssigkeit adressiert werden könnten. Da NVP bzw. dessen Metabolite im Gegensatz zu den Strukturanaloga NMP und NEP in den enterohepatischen Kreislauf eintreten, wären in die Gallenflüssigkeit sezernierten Metabolite von besonderem Interesse bezüglich der Hepatotoxizität NVPs, da diese über einen längeren Zeitraum auf die Leber wirken könnten.

Die NVP-abhängige Zellproliferation, welche vornehmlich in Arealen des Leberläppchens beobachtet wurde in denen vermehrt Fremdstoffmetabolismus stattfindet (Zone 2, 3) [BASF, 2011], ist ein Indiz für die Beteiligung eines oder mehrerer Metaboliten an der Hepatotoxizität NVPs. Die Aufklärung des NVP-Metabolismus und die Identifikation der für die Toxizität verantwortlichen Struktur(en) könnten demnach hilfreich sein, um dies auf weitere hepatotoxische N-Vinyl-Verbindungen zu übertragen, zu welchen keine Metabolismusdaten vorliegen.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass basierend auf den Untersuchungen dieser Arbeit, die bereits beschriebenen negativen Ergebnisse vorangegangener Gentoxizitätstests ergänzt und bestätigt wurden und ein gentoxischer Wirkmechanismus NVPs auszuschließen ist. Im Vordergrund der NVP-vermittelten Hepatokanzerogenese steht ein zellproliferierender Wirkmechanismus [BASF SE, 2011]. Der zelluläre Mechanismus, welcher die Proliferation auslöst, bleibt zu klären, jedoch wurden innerhalb der fünftägigen Inhalationsstudie keine Hinweise auf eine Aktivierung der Rezeptoren AhR, CAR, PXR und PPAR α durch NVP beobachtet.

7 Literaturverzeichnis

Akerboom, T.P.M. & Sies, H. (1981) Assay of Glutathione Disulfide and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods in Enzymology*, 77: 373-382

Åkesson & Jönsson (1997) Short Communication Major Metabolic Pathway for N-Methyl-2-Pyrrolidone in Humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 267-269

Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shunker, E., Tice, R.R., Waters, M.D., Aitio, A. (2000) IPCS Guidelines for the Monitoring of Genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, 463: 111-172

Allessa GmbH (2013) N-Vinyl-2-Pyrrolidone: Abiotic Degradation – Hydrolysis as a Function of pH (OECD 111). Sponsor BASF SE, Ludwigshafen, unveröffentlicht

Azqueta, A. & Collins, A. (2013) The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87 (6): 949-968

Azqueta, A., Arbillaga, L., Lopez de Cerain, A., Collins, A. (2013) Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis*, 28 (3): 271-277

Bandle, E.F., Wendt, G., Ranalder, U.B., Trautmann, K.-H. (1984) 2-Pyrrolidone and Succinimide endogenously present in several mammalian species. *Life Sciences*, 35: 2205-2212

BASF/IG Farben AG (1941) Bericht über eine physiologische Prüfung von N-Vinyl- α -Pyrrolidon. IG Farben AG, Gewerbehygienisches IG-Laboratorium, unveröffentlicht

BASF AG (1953) Bericht über die orientierende biologische Pruefung von 2-Pyrrolidon und N-Vinyl-2-pyrrolidon. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht

BASF AG (1963) Ergebnis der gewerbetoxikologische Vorpruefung; Vinylpyrrolidon, besonders gereinigt. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht

BASF AG (1964) Bericht über die akute und subakute perorale Toxizität von Vinylpyrrolidon für Meerschweinchen, Kaninchen und Katzen. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht

BASF AG (1964) Bericht über die Prüfung der Inhalationtoxizität von Vinylpyrrolidon. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht

BASF AG (1978) Primary Skin and Eye Irritation Tests with N-Vinylpyrrolidone in Albino Rabbits. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht

BASF AG (1978) Ames test for Vinylpyrrolidone, Tox-Nr.77/241. Pharmakologisches Institut der Universität Mainz (Sponsor BASF AG), unveröffentlicht

BASF AG (1979) Bericht über die Bestimmung der akuten Inhalationstoxizitaet, LC50, von Vinylpyrrolidon bei 4-stuendiger Exposition an Sprague-Dawley-Ratten. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht

BASF AG (1986) Bericht über Testversuche zur Prüfung der Toxizität von N-Vinylpyrrolidon-2 an Wistar Ratten nach Gabe im Trinkwasser über 3 bzw. 4 Wochen und nach Sondierung über 13 Wochen. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht

BASF AG (1986) Bericht über die Prüfung der Toxizität von N-Vinylpyrrolidon-2 an Ratten nach 3-monatiger Gabe über das Trinkwasser. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht

BASF AG (1987) In vitro Cytogenetic Investigations of N-vinylpyrrolidone-2 in Human Lymphocytes. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht

7 Literaturverzeichnis

- BASF AG (1992) Two year inhalation study on N-Vinylpyrrolidone-2 (NVP). BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht
- BASF AG (1992) Study of the Quantitative Correlation of the Serum Concentration after Exposure to Defined Concentrations of N-Vinylpyrrolidone-2 as Vapour as well as Single Oral or Dermal Applications of 5 mg/kg Body Weight to Dogs. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht
- BASF AG (1993) Cytogenetic Study In Vivo of N-Vinylpyrrolidone-2 (NVP) in Mice Micronucleus Test Single Oral Administration. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht
- BASF AG (1996) Vinylpyrrolidone – Buehler Test in guinea pigs. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht
- BASF SE (2001) N-Vinyl-2-pyrrolidone - Prenatal developmental inhalation toxicity study in Wistar rats vapor exposure. BASF SE, Department of Toxicology, unveröffentlicht
- BASF SE (2011) N-Vinyl-2-pyrrolidone, subacute 28 day inhalation study in Wistar rats, vapor exposure. 40I0572/07038, BASF SE, Department of Toxicology, unveröffentlicht
- BASF SE (2015) Screening studies for the stability of N-Vinyl-2-pyrrolidone in in vitro systems. Cyprotex Discovery Ltd. Beauftragt von BASF SE, Department of Toxicology, unveröffentlicht
- BASF SE (2016) Interner Bericht zur MS-Screening-Analyse des Urins NVP-exponierter Wistar Ratten. BASF SE, unveröffentlicht
- Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J., Dizdaroglu, M. (1992) Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry*, 31 (1): 106-110
- Boller, K. & Schmid, W. (1970) Chemische Mutagenese beim Saeuger, das Knochenmark des chinesischen Hamsters als in vivo Testsystem. *Haematologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon*. *Humangenetik*, 11: 34-54
- Bowen, D.E., Whitwell, J.H., Lillford, L., Henderson, D., Kidd, D., McGarry, S., Pearce, G., Beevers, C., Kirkland, D.J. (2011) Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. *Mutation Research*, 722 (1): 7-19
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248-254
- Breitenbach, J.W., Galinowsky, F., Nesvadba, H., Wolf, E. (1956) Polymerization and polymers of N-vinylpyrrolidone. *Monatsh.*, 87: 580
- Burke, M. D., Thompson, S., Weaver, R.J., Wolf, C.R., Mayer, R.T. (1994) Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 48 (5): 923-936
- Burlinson, B., Tice, R.R., Speith, G. Agurell, E., Brendler-Schwab, S., Collins, A.R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T.S., Nakajima, M., Sasaki, Y.F., Thybaud, V., Uno, Y. Vasquez, M., Hartmann, A. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research*, 627 (1): 31-35
- Callery, P.S., Stogniew, M., Geelhaar, L.A. (1979) Detection of the in vivo conversion of 2-pyrrolidinone to gamma-aminobutyric acid in mouse brain. *Biomedical Mass Spectrometry*, 6 (1): 23-26

- Carnerup, M.A., Saillenfait, A.M., Jonsson, B.A. (2005) Concentrations of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and its metabolites in plasma and urine following oral administration of NMP to rats. *Food and Chemical Toxicology*, 43 (9): 1441-1447
- Carnerup, M.A., Spanne, M., Jonsson, B.A. (2006) Levels of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and its metabolites in plasma and urine from volunteers after experimental exposure to NMP in dry and humid air. *Toxicological Letters*, 162 (2-3): 139-145
- Castell, J.V., Donato, M.T., Gomez-Lechon, M.J. (2005) Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Experimental and toxicologic pathology*, 57: 189-204
- Cederbaum, A.I. (2015) Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox Biology*, 4: 60-73
- Clarke, S.E., Baldwin, S.J., Bloomer, J.C., Ayrton, A.D., Sozio, R.S., Chenery, R.J. (1994) Lauric Acid as a Model Substrate for the Simultaneous Determination of Cytochrome P250 2E1 and 4A in Hepatic Microsomes. *Chemical Research in Toxicology*, 7: 836-842
- EU (2008), Regulation (EC) No 1272/2008 on the classification, labelling and packaging of substances and mixtures (CLP Regulation)
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Stetina, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23 (3): 143-151
- Corton, J. C., Cunningham, M. L., Hummer, B. T., Lau, C., Meek, B., Peters, J. M., Popp, J. A., Rhomberg, L, Seed, J., Klaunig, J. E. (2014) Mode of action framework analysis for receptor-mediated toxicity: The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) as a case study. *Critical Reviews in Toxicology*, 44 (1), 1-49
- Davies, M.H., Birt, D.F., Schnell, R.C. (1984) Direct Enzymatic Assay for Reduced and Oxidized Glutathione. *Journoaf of Pharmacological Methods*, 12: 191-194
- de Graaf, I.A.M., Groothuis, G.M.M., Olinga, P. (2007) Precision-cut tissue slices as a tool to predict metabolism of novel drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 3:879–89
- Digenis, G.A. (1990) Disposition and pharmacokinetics of N-VP. BASF AG, Department of Toxicology, unveröffentlicht
- Digenis, G.A. & McClanahan, J. (1982) N-Vinyl-2-pyrrolidone: Disposition and metabolism studies. *The Toxicologist (Abstract for the annual conference)*, 1: 165
- Digenis, G.A. (1990) Disposition and Pharmacokinetics of NVP. University of Kentucky, unveröffentlicht
- Doerj G., Bedell M.A., Oesch F. (1984) DNA adducts and their biological relevance. *Mutations in Man*, 20-34, Springer, Berlin
- Dressman, J.B., Berardi, R.R., Dermentzoglou, L.C., Russell, T.L., Schmaltz, S.P., Barnett, J.L., Jarvenpaa, K.M. (1990) Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharmaceutical Research*, 7 (7): 756-761
- Elcombe, C.R., Pepper, R.C., Wolf, D.C., Bailey, J., Bars, R., Bell, D., Cattley, R.C., Ferguson, S.S., Geter, D., Goetz, A., Goodman, J.I., Hester, S., Jacobs, A., Omiecinski, C. J., Schoeny, R., Xie, W., Lake, B.G. (2014) Mode of action and human relevance analysis for nuclear receptor-mediated liver toxicity: A case study with phenobarbital as a model constitutive androstane receptor (CAR) activator. *Critical Reviews in Toxicology*, 44 (1): 64-82
- Ellman, G.L. (1958) A Colorimetric Method for Determining Low Concentrations of Mercaptanes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 74: 443-450
- Ellman, G.L. (1959) Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82: 70-77

- Elovaara, E., Mikkola, J., Stockmann-Juvala, H., Luukkanen, L., Keski-Hynnala, H., Kostianen, R., Pasanen, M., Pelkonen, O., Vainio, H. (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolizing enzyme activities in human lung, and their inducibility by exposure to naphthalene, phenanthrene, pyrene, chrysene, and benzo(a)pyrene as shown in the rat lung and liver. *Archives of Toxicology*, 81 (3): 169-182
- Epe, B., Pflaum, M., Häring, M., Hegler, J., Rüdiger, H. (1993) Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems. *Toxicology Letters*, 67: 57-72
- EU (Europäische Union) (2003) Risk Assessment Report on 1-vinyl-2-pyrrolidone. 2nd Priority List, Vol 39, https://echa.europa.eu/de/information-on-chemicals/information-from-existing-substances-regulation/-/substance-rev/2487/term?_viewsubstances_WAR_echarevsubstanceportlet_SEARCH_CRITERIA_EC_NUMBER=201-800-4&_viewsubstances_WAR_echarevsubstanceportlet DISS=true
- Evans, D.F., Pye, G., Bramley, R., Clark, A.G., Dyson, T.J., Hardcastle, J.D. (1988) Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut*, 29 (8):1035-1041
- Evdokimova, E., Taper, H., Buc Calderon, P. (2001) Role of ATP and glycogen reserves in both paracetamol sulfation and glucuronidation by cultured precision-cut rat liver slices. *Toxicology In Vitro*, 15 (6): 683-690
- Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013) Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Archives of Toxicology*, 87 (9): 1683-1696
- Fernandez-Panchon, M., Villano, D., Troncoso, A., Garcia-Parrilla, M. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48 (7): 649-671
- Fowler, S.D. & Greenspan, P. (1985) Application of Nile Red, a Fluorescent Hydrophobic Probe, for the Detection of Neutral Lipid Deposits in Tissue Sections: Comparison with Oil Red O. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33 (8): 833-836
- Franco, R. & Cidlowski, J.A. (2009) Apoptosis and Glutathione: Beyond an Antioxidant. *Cell Death and Differentiation*, 16: 1303-1314
- Furihata, T., Hosokawa, M., Fujii, A., Derbel, M., Satoh, T., Chiba, K. (2005) Dexamethasone-induced methylprednisolone hemisuccinate hydrolase: its identification as a member of the rat carboxylesterase 2 family and its unique existence in plasma. *Biochemical Pharmacology*, 69 (8): 1287-97
- Gallagher, E.P., Kavanagh, T.J., Eaton, D.L. (1994) Glutathione, Oxidized Glutathione, and Mixed Disulfides in Biological Samples, *Methods in Toxicology*, 1B: 349-365
- Gill, R.D., Cussac, C., Souhami, R.L., Laval, F. (1996) Increased resistance to N,N',N'-triethylenethiophosphoramidate (thiotepa) in cells expressing the Escherichia coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Cancer Research*, 56: 3721-3724
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Milzani, A., Rossi, R. (2011) Low molecular mass thiols, disulfides and protein mixed disulfides in rat tissues: influence of sample manipulation, oxidative stress and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132 (4): 141-148
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Milzani, A., Fanti, P., Rossi, R. (2011) Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nature Protocols*, 8 (9): 1660-1669
- Giustarini, D., Tsikas, D., Colombo, G., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Fanti, P., Rossi, R. (2016) Pitfalls in the analysis of the physiological antioxidant glutathione (GSH) and its disulfide (GSSG) in biological samples: An elephant in the room. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1019: 21-28

- Gonzales, F.J. & Shah, Y. M. (2008) PPARalpha: mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Toxicology*, 246 (1):2-8
- Gonzales, F.J., Jeffrey, M.P., Cattley, R.C. (1998) Mechanism of Action of the Nongenotoxic Peroxisome Proliferators: Role of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha. *Journal of the National Cancer Institute*, 90: 1702-1709
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177 (2): 751-766
- Griffith, O.W. (1980) Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106: 207-212
- Guan, X., Hoffman, B., Dwivedi, C., Matthees, D.P. (2003) A Simultaneous Liquid Chromatography/ Mass Spectrometric assay of Glutathione, Cysteine, Homocysteine and Their Disulfides in Biological Samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31: 251-261
- Guerard, M., Marchand, C., Plappert-Helbig, U. (2014) Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55:114-121
- Halliwell, B. (2007). *Biochemistry of oxidative stress*. *Biochemical Society Transactions*, 35: 1147-1150.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R. R. (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18 (1): 45-51
- Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe, P., Suter, W., Mueller, L. (2004) Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*, 19 (1): 51-59
- Hawi, A., Wells, D., Digenis, G.A. (1987) Mechanistic Studies on the Acid Hydrolysis of N-Vinyl-2-Pyrrolidone at pH < 2.5. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Povidone*
- He, Y.H., Xu, Y., Kobune, M., Wu, M., Kelley, M.R., Martin, W.J. (2002) Escherichia coli FPG and human OGG1 reduce DNA damage and cytotoxicity by BCNU in human lung cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 282: L50-L55.
- Heddle, J.A. (1973) A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*, 18 (2): 187-190
- Hedli, C.C., Snyder, R., Kinoshita, F.K., Steinberg, M. (1998) Investigation of hepatic cytochrome P-450 enzyme induction and DNA adduct formation in male CD/1 mice following oral administration of toxaphene. *Journal of Applied Toxicology*, 18 (3): 173-178
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S. (1998) The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13 (1): 89-94
- Hewitt, N.J., Lecluyse, E.L., Ferguson, S.S. (2007) Induction of Hepatic Cytochrome P450 Enzymes: Methods, Mechanisms, Recommendations, and in vitro-in vivo correlations. *Xenobiotica*, 37 (10-11): 1196-1224
- Hollenberg, P.F., Kent, U.M., Bumpus, N.N. (2008) Mechanism-based inactivation of human cytochromes p450s: experimental characterization, reactive intermediates, and clinical implications. *Chemical Research in Toxicology*, 21 (1): 189-205
- Huntingdon Research Centre (HRC) (1978) Acute Percutaneous Toxicity to Rats of N-Vinyl Pyrrolidone. Huntingdon Research Center, unveröffentlicht
- Huntingdon Research Centre (HRC) (1978) Acute Oral Toxicity to Rats of N-Vinyl Pyrrolidone. Huntingdon Research Center, unveröffentlicht

- Huntingdon Research Centre (HRC) (1978) Ames metabolic activation test to assess the potential mutagenic effect of N-vinyl pyrrolidone. Huntingdon Research Center, unveröffentlicht
- Ihunnah, C.A., Jiang, M., Xie, W. (2011) Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochimica Biophysica Acta*, 1812 (8): 956-963
- Inveresk Research International (IRI) (1986) N-vinyl-2-pyrrolidone: Association of 14 C-labelled chemical with rat liver DNA, Inveresk Research International (Sponsor BASF AG), unveröffentlicht
- JaCVAM (2009) International Validation of the In Vivo Rodent Alkaline Comet Assay for the Detection of Genotoxic Carcinogens. Version 14.2
- Jia, L. & Liu, X. (2007) The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): in vitro experiments. *Current Drug Metabolism*, 8 (8): 822-829
- Johnson, E.F., Hsu, M.H., Savas, U., Griffin, K.J. (2002) Regulation of P450 4A expression by peroxisome proliferator activated receptors. *Toxicology*, 181-182: 203-206
- Jones, K.H. & Senft, J.A. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 33 (1): 77-79
- Kelly, K.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D. (1998) Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*, 106: 375-384
- Kim, S., Kiyosawa, N., Burgoon, L.D., Chang, C.C., Zacharewski, T.R. (2013) PPAR α -mediated responses in human adult liver stem cells: In vivo / in vitro and cross-species comparisons. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 138: 236-247
- Klaunig, J.E., Babich, M.A., Baetcke, K.P., Cook, J.C., Corton, J.C., David, R.M., DeLuca, J.G., Lai, D.Y., McKee, R.H., Peters, J.M., Roberts, R.A., Fenner-Crisp, P.A. (2003) PPAR α Agonist-Induced Rodent Tumors: Modes of Action and Human Relevance. *Critical Reviews in Toxicology*, 33 (6): 655-780
- Klimisch, H.J., Deckardt, K., Gembardt, C., Hildebrand, B., Kuettler, K., Roe, F.J.C. (1997) Subchronic inhalation and oral toxicity of N-vinylpyrrolidone-2. *Studies in rodents. Food and Chemical Toxicology*, 35: 1061-1074
- Klimisch, H.J., Deckardt, K., Gembardt, C., Hildebrand, B., Kuettler, K., Roe, F.J.C. (1997) Long-term inhalation toxicity of N-vinylpyrrolidone-2 vapours. *Studies in rats. Food and Chemical Toxicology*, 35: 1041-1060
- Knaap, A.G.A., Voogd, C.E., Kramers, P.G.N. (1985) Mutagenicity of vinyl compounds. *Mutation Research*, 147 (5): 303
- Koch, H.M., Bader, M., Weiss, T., Koslitz, S., Schütze, A., Käfferlein, H.-U., Brüning, T. (2014) Metabolism and elimination of N-ethyl-2-pyrrolidone (NEP) in human males after oral dosage. *Archives of Toxicology*, 88: 893-899
- Kruth, H.S. (1984) Localization of unesterified cholesterol in human atherosclerotic lesions. Demonstration of filipin-positive, oil-red-O-negative particles. *American Journal of Pathology*, 114 (2): 201-208
- Laethem, R.M., Balazy, M., Falck, J.R., Laethem, C.L., Koop, D.R. (1993) Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-Hydroxyeicosatetraenoic Acids by Alcohol-inducible Cytochrome P450 2E1*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (17): 12912-12918
- Lake, B.G., Price, R.J., Osimitz, T.G. (2015) Mode of action analysis for pesticide-induced rodent liver tumours involving activation of the constitutive androstane receptor: relevance to human cancer risk. *Pest Management Science*, 71 (6): 829-834

- Lazarow, P.B. (1981) Assay of Peroxisomal ω -Oxidation of fatty acids. *Methods in Enzymology*, 72: 315-319
- LeBaron, M.J., Rasoulpour, R.J., Gollapudi, B.B., Sura, R., Kan, H.L., Schisler, M.R., Pottenger, L.H., Papineni, S., Eisenbrandt, D.L. (2014) Characterization of nuclear receptor-mediated murine hepatocarcinogenesis of the herbicide pronamide and its human relevance. *Toxicological Science*, 142 (1): 74-92
- Li, Q., Laval, J. and Ludlum, D.B. (1997) Fpg protein releases a ringopened N-7 guanine adduct from DNA that has been modified by sulfur mustard. *Carcinogenesis*, 18: 1035–1038
- Ligocka, D., Lison, D., Haufroid, V. (2003) Contribution of CYP2E1 to N-methyl-2-pyrrolidone Metabolism. *Archives of Toxicology*, 77: 261-266
- Lillie, R.D. & Ashburn, L.L. (1943) Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimer's technique. *Archives of Pathology*, 36: 432
- Litton Bionetics (1980) Mutagenicity Evaluation of V-Pyrol (N-Vinyl-2-Pyrrolidone) in the Mouse Lymphoma Forward Mutation Assay. Litton Bionetics, unveröffentlicht
- Litton Bionetics (1980) Evaluation of V-Pyrol (n-vinyl-2-pyrrolidone) in the primary rat hepatocyte unscheduled DNA synthesis assay. Litton Bionetics, unveröffentlicht
- Lorenzo, Y., Costa, S., Collins, A.R., Azqueta, A. (2013) The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*, 28 (4): 427-432
- Lovell, D.P. & Omori, T. (2008) Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*, 23 (3): 171-182
- Lubet, R.A., Mayer, R.T., Cameron, J.W., Nims, R. W., Burke, M.D., Wolff, T., Guengerich, F. P. (1985) Dealkylation of pentoxyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238 (1):43-48
- Lundgren, D.W. & Fales, H.M. (1980) Metabolism of putrescine to 5-hydroxy-2-pyrrolidone via 2- pyrrolidone. *Journal of Biological Chemistry*, 255: 4481-4486
- Lundquist, P., Loof, J., Sohlenius-Sternbeck, A.K., Floby, E., Johansson, J., Bylund, J., Hoogstraate, J., Afzelius, L., Andersson, T.B. (2014) The impact of solute carrier (SLC) drug uptake transporter loss in human and rat cryopreserved hepatocytes on clearance predictions. *Drug Metabolism and Disposition*, 42 (3): 469-480
- Ma, Q. & Lu, A.Y.H. (2007) Perspective CYP1A Induction and Human Risk Assessment: An Evolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies. *Drug Metabolism and Disposition*, 35: 1009-1016
- MAK Kommission (2008) MAK Wert Dokumentation zu Acetaldehyd. Nachtrag 2008, The MAK Collection for Occupational Health and Safety, 1-50
- MAK Kommission (2014) MAK Wert Dokumentation zu N-Ethyl-2-pyrrolidon. The MAK Collection for Occupational Health and Safety, 1-20
- Lohmann, R.D., Meischner, V., Leibold, E., Schriever-Schwemmer, G., Hartwig, A., MAK Kommission (2016) MAK Wert Dokumentation zu N-Ethyl-2-pyrrolidon. Nachtrag 2016, The MAK Collection for Occupational Health and Safety, 1:209-218
- MAK Kommission (2006) MAK Wert Dokumentation zu N-Methyl-2-pyrrolidon. Nachtrag 2006, The MAK Collection for Occupational Health and Safety, 1-25
- MAK Kommission (1991) MAK Wert Dokumentation zu N-Vinyl-2-pyrrolidon. The MAK Collection for Occupational Health and Safety, 250-261
- MAK Kommission (2014) MAK Wert Dokumentation zu N-Vinyl-2-pyrrolidon. Nachtrag 2014, The MAK Collection for Occupational Health and Safety, 1-17

- Malagelada, J.R., Longstreth, G.F., Summerskill, W.H., Go, V.L. (1976) Measurement of gastric functions during digestion of ordinary solid meals in man. *Gastroenterology*, 10: 203-210
- Marquardt, H. & Schäfer, S.G. (2004) *Lehrbuch der Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Marquet, F., Payan, J.-P., Beydon, D., Wathier, L., Ferrari, E., Grandclaude, M.C. (2015) Influence of water dilution on percutaneous absorption of N-vinyl-2-pyrrolidone in vivo and ex vivo in rats and ex vivo in humans. *Archives of Toxicology*, 89: 2007-2014
- McClanahan, J., Chaney, J., Blecher, L., Digenis, G.A. (1983) Disposition of N-Vinylpyrrolidinone in the rat. *Proceedings of the 1st international Symposium on Povidone*, 250-268
- McClanahan, J., Lin, Y.C., Digenis, G.A. (1984) Disposition of N-Vinylpyrrolidinone in the rat. *Drug and Chemical Toxicology*, 7 (2): 129-148
- McClanahan, J., Hawi, A.A., Digenis, G.A. (1987) Disposition and Metabolism of N-vinyl-2-pyrrolidinone in the rat. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Povidone*, 318-329
- McConnell, E.L., Basit, A.W., Murdan, S. (2008) Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60: 63-70
- McNamee, J.P. & Bellier, P.V. (2015) Use of a standardized JaCVAM in vivo rat comet assay protocol to assess the genotoxicity of three coded test compounds; ampicillin trihydrate, 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride, and N-nitrosodimethylamine. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 786-788: 158-164
- Meintières, S., Nessler, F., Pallardy, M., Marzin, D. (2003) Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 41 (4): 260–269.
- Meister, A. & Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52: 711-760
- Melnick, R.L., Kohn, M.C., Portier, C.J. (1996) Implications for risk assessment of suggested nongenotoxic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Environment Health Perspect*, 104 (1): 123-134
- Merk, O. & Speit, G. (1999) Detection of Crosslinks With the Comet Assay in Relationship to Genotoxicity and Cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33: 167-172
- Midgley, I., Hood, A.J., Chasseaud, L.F., Brindley, C.J., Baughman, S., Allan, G. (1992) Percutaneous absorption of co-administered N-methyl-2-[14C]pyrrolidinone and 2-[14C]pyrrolidinone in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 30 (1): 57-64
- Misra, P. & Reddy, J.K. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation and excess energy burning in hepatocarcinogenesis. *Biochimie*, 98: 63-74
- Misra, P., Viswakarma, N., Reddy, J.K. (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha signaling in hepatocarcinogenesis. *Subcellular Biochemistry*, 69: 77-99
- Moennikes, O., Loeppen, S., Buchmann, A., Andersson, P., Itrich, C., Poellinger, L., Schwarz, M. (2004) A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Research*, 64 (14): 4707-4710
- Monostori, P., Wittmann, G., Karg, E., Turi, S. (2009) Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological samples: An in-depth Review. *Journal of Chromatography B*, 877: 3331-3346

- Mortelmans, K. & Zeiger, E. (2000) The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455 (1-2): 29-60
- Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2): 55-63
- Mulero-Navarro, S. & Fernandez-Salguero, P.M. (2016) New Trends in Aryl Hydrocarbon Receptor Biology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4: 45
- Nakajima, M., Masumori, S., Tanaka, J., Hayashi, M., Uno, Y., Kojima, H., Tice, R.R. (2009) An atlas of comet images: JaCVAM initiative international validation trial for the in vivo Comet Assay, 8th International Comet Assay Workshop
- Nesslany, F., Zennouche, N., Simar-Meintieres, S., Talahari, I., Nkili-Mboui, E.N., Marzin, D. (2007) In vivo Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. *Mutation Research*, 630 (1-2): 28-41
- Nilsson, A., Arey, H., Pedersen, J.I., Christiansen, E.N. (1986) The Effect of High-Fat Diets on Microsomal Lauric Acid Hydroxylation in Rat Liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 879: 209-214
- O'Donovan, M. & Burlinson, B. (2013) Maximum Dose Levels for the Rodent Comet Assay to Examine Damage at the Site of Contact or to the Gastrointestinal Tract. *Mutagenesis*, 28 (6):621-623
- OECD (1997), Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Publishing, Paris
- OECD (2014), Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris
- OECD (2016), Test No. 489: In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Publishing, Paris
- OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris
- Oesch-Bartlomowicz, B. & Oesch, F. (2009) Role of cAMP in mediating AHR signaling. *Biochemical Pharmacology*, 77 (4): 627-641
- Olive, P.L. & Banath, J.P. (1995) Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Experimental Cell Research*, 221 (1): 19-26
- Ostling, O. & Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123 (1): 291-298
- Owen, J.B. & Butterfield, D.A. (2010) Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. *Methods Molecular Biology*, 648: 269-277
- Paolisso, G., Di Maro, G., Pizza, G., D'Amore, A., Sgambato, S., Tesauro, P., Varricchio, M., D'Onofrio, F. (1992) Plasma GSH/GSSG affects glucose homeostasis in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetics. *American Journal of Physiology*, 263: 435-440
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F. (2003) Analysis of Glutathione: Implication in Redox and Detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333: 19-39
- Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H. (2008) Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology*, 82: 667-715.
- Perez-Matute, P., Zulet, M.A., & Martinez, J.A. (2009) Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Current opinion in pharmacology*, 9 (6), 771-779

- Pushparajah, D.S., Umachandran, M., Nazir, T., Plant, K.E., Plant, N., Lewis, D.F., Ioannides, C. (2008) Up-regulation of CYP1A/B in rat lung and liver, and human liver precision-cut slices by a series of polycyclic aromatic hydrocarbons; association with the Ah locus and importance of molecular size. *Toxicology In Vitro*, 22 (1): 128-145
- Pushparajah, D.S., Lewis, D.F., Ioannides, C. (2017) Up-regulation of CYP1A1 and phase II enzymes by 5-ring isomeric polycyclic aromatic hydrocarbons in precision-cut rat hepatic slices: Importance of molecular shape. *Toxicology In Vitro*, 40: 203-213
- Committee for Risk Assessment (RAC) (2016) Opinion proposing harmonised classification and labelling at Community level of acetaldehyde
- Committee for Risk Assessment (RAC) (2014) Opinion proposing harmonised classification and labelling at Community level of 1-methyl-2-pyrrolidone (NMP)
- Ramamoorthy, S.L. (2010) The impact of proton-pump inhibitors on intraperitoneal sepsis: a word of caution for transgastric NOTES procedure. *Surgical Endoscopy*, 24 (1): 16-20
- REACH Dossier on 2-Pyrrolidon, zuletzt aktualisiert: 16.11.2017, <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14900/1>
- REACH Dossier on N-Vinyl-Caprolactame (NVC), zuletzt aktualisiert: 25.08.2017, <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/13517>
- REACH Dossier on N-Vinyl-Formamide (NVF), zuletzt aktualisiert: 21.08.2017, <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15886>
- REACH Dossier on NVP, zuletzt aktualisiert: 18.12.2017, <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15035>
- Reddy, J.K. & Hashimoto, T. (2001) Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annual Review of Nutrition*, 21:193-230
- Reubsæet, F.A., Veerkamp, J.H., Bukkens, S.G., Trijbels, J.M., Monnens, L.A. (1988) Acyl-CoA oxidase activity and peroxisomal fatty acid oxidation in rat tissues. *Biochimica Biophysica Acta*, 958 (3): 434-442
- Romagna, F. & Staniforth, C.D. (1989) The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Research*, 213 (1): 91-104
- Romeis (2010) *Mikroskopische Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, 18. Auflage, Heidelberg
- Rothfuss, A., Honma, M., Czich, A., Aardema, M.J., Burlinson, B., Galloway, S., Hamada, S., Kirkland, D., Heflich R.H., Howe, J., Nakajima, M., O'Donovan, M., Plappert-Helbig, U., Priestley, C., Recio, L., Schuler, M., Uno, Y., Martus, H.J. (2011) Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. *Mutation Research*, 723 (2): 108-120
- Rundell, M.S., Wagner, E.D., Plewa, M.J. (2003) The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation? *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42 (2): 61-67
- Salamone, M., Heddle, J.A., Stuart, E., Katz, M. (1980) Towards an improved micronucleus test: studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutation Research*, 74 (5): 347-356
- Sedlak, J. & Lindsay, R.H. (1968) Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Analytical Biochemistry*, 25: 192-205
- Senogles, E. & Thomas, R.A. (1980) The kinetics and mechanism of the acid-catalysed hydrolysis of N-vinylpyrrolidin-2-one. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (6): 825-828

- Sentellas, S., Morales-Ibanez, O., Zanuy, M., Alberti, J.J. (2014) GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. *Toxicology in vitro*, 28 (5): 1006-1015
- Sies, H. (1999) Glutathione and its Role in Cellular Functions. *Free Radical Biology & Medicine*, 27 (9-10): 916-921
- Simmon, V.F. & Baden, J.M. (1980) Mutagenic Activity of Vinyl Compounds and derived Epoxides. *Mutation Research*, 78: 227-231
- Sinal, C.J., Webb, C.D., Bend, J.R. (1999) Differential in vivo effects of alpha-naphthoflavone and beta-naphthoflavone on CYP1A1 and CYP2E1 in rat liver, lung, heart, and kidney. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 13 (1): 29-40
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175 (1): 184-191
- Singh, N.P. (2000) Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455: 111-127
- Soldatow, V.Y., LeCluyse, E.L., Griffith, L.G., Rusyn, I. (2013) In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicological Research* 2:23–39
- Speit, G., Schuetz, P., Bonzheim, I., Trenz, K., Hoffmann, H. (2004) Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicology Letters*, 146 (2): 151-158
- Squires, E.J., Sueyoshi, T., Negishi, M. (2004) Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (47): 49307-49314
- Stankowski, L.F. Jr., Aardema, M.J., Lawlor, T., Pant, K., Roy, S., Xu, Y., Elbekai, R. (2015) Integration of Pig-a, micronucleus, chromosome aberration and comet assay endpoints in a 28-day rodent toxicity study with urethane. *Mutagenesis*, 30 (3): 335-342
- Starokozhko, V., Vatakuti, S., Schievink, B., Merema, M.T., Asplund, A., Synnergren, J., Aspegren, A., Groothuis, G.M.M. (2017) Maintenance of drug metabolism and transport functions in human precision-cut liver slices during prolonged incubation for 5 days. *Archives of Toxicology*, 91 (5): 2079-2092
- Strober, W. (2001) Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons Inc.
- Suga, T. (2004) Hepatocarcinogenesis by Peroxisome Proliferators. *Journal of Toxicological Sciences*, 29 (1): 1-12
- Tabrez, S. & Ahmad, M. (2010) Cytochrome P450 system as a toxicity biomarker of industrial wastewater in rat tissues. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (3): 998-1001
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35 (3): 206-221
- Tietze, F. (1969) Enzymatic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. *Analytical Biochemistry*, 27: 502-522
- Tolson, A.H. & Wang, H. (2010) Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (13): 1238-1249
- Tompkins, L.M. & Wallace, A.D. (2007) Mechanisms of Cytochrome P450 Induction. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 21 (4): 176-181

- Tsujita, T. & Okuda, H. (1983) Carboxylesterases in rat and human sera and their relationship of serum aryl acylamidases and cholinesterases. *European Journal of Biochemistry*, 133 (1): 215-220.
- Vasquez, M.Z. (2012) Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 747 (1): 142-156
- Vickers, A.E.M., Saulnier, M., Cruz, E., Merema, M.T., Rose, K., Bentley, P., Olinga, P. (2004) Organ slice viability extended for pathway characterization: an in vitro model to investigate fibrosis. *Toxicological Sciences*, 82:534–544
- Vickers, A.E.M., Fisher, R.L., Olinga, P., Dial, S. (2011) Repair pathways evident in human liver organ slices. *Toxicology In Vitro* 25:1485–1492
- Wang, Y.M., Ong, S.S., Chai, S.C., Chen, T. (2012) Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 8 (7): 803-817
- Ward, F.W. & Coates, M.E. (1987) Gastrointestinal pH measurements in rats: influence of the microbial flora, diet and fasting. *Laboratory Animals*, 21: 216-222
- Wardlaw, S.A., Nikula, K.J., Kracko, D.A., Finch, G.L., Thornton-Manning, J.R., Dahl, A.R. (1998) Effect of cigarette smoke on CYP1A1, CYP1A2 and CYP2B1/2 of nasal mucosae in F344 rats. *Carcinogenesis*, 19 (4): 655-662
- Waxman, D.J. (1999) P450 Gene Induction by Structurally Diverse Xenochemicals: Central Role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369 (1): 11-23
- Weiss C., Faust D., Schreck I., Ruff A., Farwerck T., Melenberg A., Schneider S., Oesch-Bartlomowicz B., Zatloukalová J., Vondráček J., Oesch F., Dietrich C. (2008) TCDD deregulates contact inhibition in rat liver oval cells via Ah receptor, JunD and cyclin A. *Oncogene* 27 (15): 2198-2207
- Wells, D.A. & Digenis, G.A. (1988) Disposition and metabolism of double-labeled [3H and 14C] N-methyl-2-pyrrolidinone in the rat. *Drug Metabolism and Disposition*, 16 (2): 243-249
- Wells, D.A., Hawi, A.A., Digenis, G.A. (1988) Isolation and identification of the major urinary metabolite of N-Methylpyrrolidone in the rat. *Drug Metabolism and Disposition*, 20: 124-126
- Yamamoto, K.I. & Kikuchi, Y. (1980) A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Research*, 71 (1): 127-131
- Yeldandi, A.V., Rao, M.S., Reddy, J.K. (2000) Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutation Research*, 448 (2): 159-177
- Yilmaz, Ö., Keser, S., Tuzcu, M., Güvenc, M., Cetintas, B., Irtegün, S., Tastan, H., Sahin, K. (2009) A Practical Method to Measure Reduced (GSH) and Oxidized (GSSG) Glutathione Concentrations in Animal Tissues. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8 (2): 343-347
- Yuan, L. & Kaplowitz, N. (2009) Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Molecular Aspects of Medicine*, 30 (1-2): 29-41

8 Anhang

I Chemikalienliste

Chemikalien und Lösungen	Firma
2-Vinylpyridine (2-VP)	Sigma Aldrich, Steinheim BASF SE, Ludwigshafen
5'-Adenosinmonophosphat (5'-AMP-Na ₂)	Sigma Aldrich, Steinheim
Benzoxoresorufin	Sigma Aldrich, Steinheim
Bradfordreagenz	Sigma Aldrich, Steinheim
Brij 58	Sigma Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform	Sigma Aldrich, Steinheim
Dicumarol	Sigma Aldrich, Steinheim
Dithiotreitol	Sigma Aldrich, Schnelldorf
DMSO	AppliChem, Darmstadt Sigma Aldrich, Steinheim
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Ethanol absolut	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid, 1% in Wasser	Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim
Ethoxyresorufin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA-Na ₂ *2H ₂ O)	Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylmethansulfonat (EMS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Fetales Kälber Serum, FBS Superior	Biochrom GmbH, Berlin
Fluorescein	Sigma Aldrich, Steinheim
Fluorescein-Diacetat	Sigma Aldrich, Steinheim
Formamidopyrimidine-DNA-Glykosylase (FPG)	Sigma Aldrich, Steinheim
Giemsa-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Glucose-6-phosphat	Sigma Aldrich, Steinheim
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutathionreduktase	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutathion reduziert (GSH)	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutathion oxidiert (GSSG)	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerin	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Biochrom AG, Berlin
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Bernd Kraft, Duisburg
Kaisers Glyceringelatine	Sigma Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Bernd Kraft, Duisburg Sigma Aldrich, Schnelldorf
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Kit zur Gesamtproteinbestimmung nach Biuret	Roche, Basel
Krebs-Henseleit-Puffer	Sigma Aldrich, Schnelldorf
May-Grünwald-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchloridhexyhydrat (MgCl ₂ *6H ₂ O)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Natriumchlorid	Bernd Kraft, Duisburg
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Bernd Kraft, Duisburg

8 Anhang

Chemikalien und Lösungen	Firma
Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat) NADPH	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydroxid (NaOH)	Bernd Kraft, Duisburg
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Biochrom AG, Berlin
Pentoxyresorufin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Resorufinnatriumsalz	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Saccharose	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Salzsäure	Bernd Kraft, Duisburg
SeaKem [®] LE Agarose	Lonza, Köln
SeaPlaque [®] GTG [®] Agarose	Lonza, Köln
Testosteron	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Triethylamin	Sigma Aldrich, Schnelldorf
TritonX	Sigma Aldrich, Steinheim
Trizma [®] base (Tris)	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Uridine-5'-diphosphoglucuronsäure Trinatriumsalz	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Williams Medium E (ohne Glycerin)	Biochrom AG, Berlin

II Geräteliste

Gerät	Typ, Firma
Analysensystem	Cobas c501, Hoffmann La Roche GmbH
Eindeckautomat	RCM 7000, Medite
Elektrophoresekammer (transparent, horizontal)	CRHU25, Roth
Elektrophoresekammer (schwarz, horizontal)	SCIE-PLAS
Färbeautomat	TST 44, Medite
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2 (Fluoreszenzeinheit HXP 120 C), Zeiss
GC/FID	6890, Agilent
	GC-2010 plus mit Autosampler AOC-20s, Shimadzu
GC/MS	7890A mit CTC CombiPAL-Probengeber, Agilent
Headspace-GC/MS	6890 mit CTC CombiPAL-Probengeber, Agilent
HPLC	1260 infinity, Agilent
	1200, Agilent
	2695, Waters
	1100, Hewlett Packard
Inkubator	Heraeus Instruments
Kühleinheit (Elektrophorese)	FL300, Julabo
Lichtmikroskop	Axioskop 40, Zeiss
	CKX 31 Olympus
Massendetektoren	MS324, Agilent
	HP5-MS, Agilent
	Quattro micro™ API micromass, Waters
pH-Meter	766 calimatic, knick
	Seven compact, Mettler Toledo
Photometer	Sunrise Infinite 200, Tecan
Potter	Potter S, B.Braun
Radiodetektor	FlowStar LB 513, Berthold
	Raytest, Mirastar
Reinstwasseranlage	Synergy UV, Millipore
Stromquelle (Elektrophorese)	Power Pack P25, Biometra
Testsubstanzdosierpumpe (Inhalationsexposition)	Continous infusion pumps PHD Ultra, Havard Apparatus Inc.
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf
Thermostat (Inhalationsexposition)	Thermostat Julabo Labortechnik GmbH
Tissue Slicer	Krumdieck
Vortex-Schüttler	lab dancer, VWR
	REAX 2000, Heidolph
Waagen	LE6202P, Sartorius
	XP204, Mettler Toledo
	XP504 Delta Range®, Mettler Toledo
Zählkammer	C-Chip, DigitalBio
Zentrifugalanalysator	Cobas Fara II, Hoffmann La Roche GmbH

8 Anhang

Gerät	Typ, Firma
Zentrifugen	Multifuge 3S-R , Heraeus
	Multifuge X1R, Heraeus
	L8-M Ultracentrifuge , Beckman

III Einzelwerte des AROD-Assays

Tabelle III-1: Einzelwerte der EROD-Bestimmung in Lebermikrosomen der männlichen Ratten der NVP-Inhalationsstudie

NVP-Expositionsgruppe	Tiercode	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
0 ppm	1	28,7	28,9	19,3	6,2
		28,8			
		29,3			
	4	9,7	10,0		
		10,4			
		10,0			
	10	18,2	19,1		
		19,7			
		19,5			
	20	17,0	16,9		
		15,5			
		18,3			
	21	23,3	22,3		
		21,5			
		22,0			
30	18,0	18,2			
	18,2				
	18,4				
5 ppm	8	22,4	21,9	20,5	3,6
		21,6			
		21,8			
	9	22,6	22,6		
		22,9			
		22,3			
	11	17,2	16,7		
		16,6			
		16,3			
	15	19,2	20,2		
		20,8			
		20,7			
	26	16,1	16,3		
		16,6			
		16,3			
29	25,8	25,5			
	25,6				
	25,2				
10 ppm	5	29,6	31,4	22,0	5,8
		32,1			
		32,7			
	12	15,8	16,2		
		15,2			

8 Anhang

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
10 ppm	12	17,4	16,2	22,0	5,8
		19,0			
	13	19,4	19,5		
		20,2			
		23,7			
	14	24,0	24,6		
		26,2			
		23,8			
	16	23,4	23,8		
		24,3			
		15,9			
	25	15,7	16,5		
17,8					
21,9					
20 ppm	3	23,5	22,6	16,9	6,4
		22,5			
		25,4			
	7	23,8	25,2		
		26,5			
		16,3			
	17	16,0	16,0		
		15,6			
		16,1			
	19	16,8	16,7		
		17,2			
		12,5			
	23	12,7	13,3		
		14,7			
		7,6			
	28	7,0	7,4		
		7,5			
		18,2			
EMS	2	17,2	17,7	23,4	4,8
		17,7			
		24,6			
	6	24,8	25,2		
		26,2			
		18,4			
	18	17,8	18,5		
		19,2			
		21,9			
	21	22,8	22,3		
		22,3			
		26,2			
	24	26,3	26,7		
		27,5			
		18,2			

8 Anhang

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
EMS	27	28,4	29,9	23,4	4,8
		30,2			
		30,9			
nicht behandelte frisch hergestellte Rattenleber-mikrosome		40,5		40,6	0,3
		40,5			
		41,0			
Pufferkontrolle zur LOD- und LOQ-Bestimmung		0,8		0,7	0,1
		0,7			
		0,9			
		0,6			
		0,7			
		0,7			
		0,7			
		0,6			
		0,8			
		0,6			
		0,7			
		0,9			
		0,8			
		0,7			
		0,8			
		0,5			
0,8					
0,7					

8 Anhang

Tabelle III-2: Einzelwerte der PROD-Bestimmung in Lebermikrosomen der männlichen Ratten der NVP-Inhalationsstudie

NVP-Expositionsgruppe	Tiercode	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
0 ppm	1	17,8	17,3	12,8	3,0
		16,7			
		17,5			
	4	5,5	5,8		
		5,5			
		6,3			
	10	10,2	10,2		
		10,2			
		10,3			
	20	10,6	10,9		
		11,4			
		10,7			
21	15,8	14,4			
	13,7				
	13,7				
30	10,8	11,0			
	11,0				
	11,2				
5 ppm	8	13,3	13,0	12,4	1,9
		12,6			
		13,0			
	9	13,6	13,6		
		13,4			
		13,7			
	11	11,1	11,6		
		12,0			
		11,8			
	15	10,8	11,1		
		11,4			
		11,0			
26	10,1	10,0			
	9,9				
	10,1				
29	14,9	15,2			
	15,6				
	15,0				
10 ppm	5	22,8	21,8	16,5	4,3
		21,2			
		21,4			
	12	10,9	11,1		
		10,8			
		11,7			

8 Anhang

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
10 ppm	13	13,6	13,7	16,5	4,3
		13,5			
		14,1			
	14	20,3	21,2		
		21,5			
		21,8			
	16	16,6	16,9		
		16,6			
		17,6			
	25	13,9	14,3		
		13,5			
		15,4			
20 ppm	3	10,6	10,6	10,0	2,8
		10,4			
		11,0			
	7	13,7	14,1		
		14,4			
		14,3			
	17	7,1	7,0		
		7,2			
		6,8			
	19	11,1	11,5		
		11,4			
		11,9			
	23	9,9	9,6		
		9,5			
		9,4			
28	6,3	7,0			
	6,9				
	7,8				
EMS	2	10,5	10,6	12,0	1,8
		10,5			
		10,6			
	6	12,2	12,5		
		12,9			
		12,5			
	18	9,6	9,8		
		10,0			
		9,8			
	21	10,7	11,1		
		11,3			
		11,2			
	24	13,3	13,2		
		12,8			
		13,4			
27	14,3	14,7			

8 Anhang

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
EMS	27	14,7	14,7	12,0	1,8
		15,0			
nicht behandelte frisch hergestellte Rattenlebermikrosome		20,5		21,1	0,7
		21,8			
		20,8			
Pufferkontrolle zur LOD- und LOQ-Bestimmung		2,6		2,5	0,2
		2,7			
		2,7			
		2,3			
		2,3			
		2,2			
		2,5			
		2,6			
		2,9			
		2,4			
		2,2			
		2,4			
		2,4			
		2,7			
		2,3			
2,4					
2,5					
2,7					

Tabelle III-3: Einzelwerte der BROD-Bestimmung in Lebermikrosomen der männlichen Ratten der NVP-Inhalationsstudie

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
0 ppm	1	75,2	74,7	48,1	17,5
		74,7			
		74,2			
	4	20,9	22,1		
		22,3			
		23,1			
	10	45,6	43,8		
		42,2			
		43,8			

8 Anhang

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
0 ppm	20	44,4	45,4	48,1	17,5
		46,2			
		45,7			
	21	57,8	58,6		
		60,3			
		57,6			
	30	42,4	44,1		
		42,5			
		47,3			
5 ppm	8	50,5	50,5	54,5	11,3
		48,9			
		52,1			
	9	58,9	59,1		
		58,4			
		60,1			
	11	47,0	48,1		
		47,4			
		50,0			
	15	50,0	48,8		
		48,1			
		48,3			
	26	45,6	44,8		
		45,0			
		43,9			
29	75,0	75,4			
	74,7				
	76,5				
10 ppm	5	79,8	79,9	61,7	16,1
		80,5			
		79,4			
	12	40,0	40,8		
		39,3			
		43,1			
	13	54,1	55,5		
		56,9			
		55,3			
	14	77,0	80,2		
		77,1			
		86,5			
	16	63,6	63,8		
		64,3			
		63,5			
25	47,4	49,8			
	48,8				
	53,1				

8 Anhang

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
20 ppm	3	50,7	52,2	42,1	16,5
		50,2			
		55,7			
	7	63,6	66,8		
		67,1			
		69,7			
	17	29,8	30,2		
		29,1			
		31,6			
	19	45,8	46,5		
		46,5			
		47,1			
	23	36,3	36,5		
		36,3			
37,0					
28	20,3	20,7			
	20,7				
	21,0				
EMS	2	49,4	47,7	55,6	8,2
		46,3			
		47,4			
	6	57,8	59,6		
		60,6			
		60,4			
	18	49,2	48,3		
		50,0			
		45,7			
	21	46,1	48,9		
		50,2			
		50,5			
	24	63,7	62,9		
		62,3			
		62,9			
27	65,3	65,8			
	66,7				
	65,5				
nicht behandelte frisch hergestellte Rattenlebermikrosome	86,2		126,7	35,3	
	150,7				
	143,2				
Pufferkontrolle zur LOD- und LOQ-Bestimmung	0,4		0,38	0,05	
	0,3				
	0,5				
	0,3				
	0,4				
	0,3				

8 Anhang

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
Pufferkontrolle zur LOD- und LOQ-Bestimmung		0,3		0,38	0,05
		0,4			
		0,5			
		0,4			
		0,4			
		0,4			
		0,4			
		0,4			
		0,3			
		0,3			
		0,4			
		0,3			

Tabelle III-4: Einzelwerte der EROD-Bestimmung in Lungenmikrosomen der männlichen Ratten der NVP-Inhalationsstudie

NVP-Expositionsgruppe	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
Pufferkontrolle zur LOD- und LOQ-Bestimmung	1,3	1,4	0,1
	1,5		
	1,4		
	1,3		
	1,4		
	1,3		
	1,4		
	1,5		

Die Einzelwerte der NVP-Expositionsgruppen wurden nicht tabellarisch abgebildet, da die Enzymaktivitäten unter der LOD lagen

8 Anhang

Tabelle III-5: Einzelwerte der PROD-Bestimmung in Lungenmikrosomen der männlichen Ratten der NVP-Inhalationsstudie

NVP-Expositionsgruppe	Tiercode	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
0 ppm	1	18,4	18,4	20,1	13,8
		19,9			
		16,8			
	4	17,9	18,8		
		19,1			
		19,6			
	10	6,2	<LOD		
		6,7			
		6,1			
	20	23,7	26,0		
		26,3			
		27,8			
	21	7,0	<LOD		
		7,8			
		7,9			
30	40,1	43,8			
	47,1				
	44,2				
5 ppm	8	7,7	7,7	8,3	2,9
		8,0			
		7,4			
	9	8,3	8,1		
		7,7			
		8,2			
	11	13,0	<LOQ		
		13,0			
		15,2			
	15	5,4	<LOD		
		6,1			
		5,8			
	26	5,5	<LOD		
		5,7			
		6,4			
29	8,8	<LOD			
	8,5				
	9,5				
10 ppm	5	18,0	19,4	9,0	5,2
		19,7			
		20,5			
	12	6,3	<LOD		
		6,5			
		7,0			

8 Anhang

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
10 ppm	13	7,7	<LOD	9,0	5,2
		8,1			
		8,1			
	14	7,2	<LOD		
		7,0			
		7,2			
	16	4,6	<LOD		
		4,5			
		5,3			
	25	8,1	<LOD		
		8,0			
		8,7			
20 ppm	3	8,6	<LOD	23,8	19,9
		8,5			
		9,1			
	7	10,9	<LOQ		
		11,5			
		11,5			
	17	52,5	52,3		
		51,8			
		52,6			
	19	17,2	<LOQ		
		16,5			
		16,6			
	23	7,6	<LOD		
		7,9			
		8,1			
28	44,4	45,9			
	47,4				
	45,8				
EMS	2	32,5	32,6	14,9	11,1
		33,1			
		32,3			
	6	8,6	<LOD		
		9,1			
		9,4			
	18	6,2	<LOD		
		7,0			
		7,7			
	21	9,3	<LOD		
		9,1			
		8,7			
	24	6,7	<LOD		
		6,8			
		6,8			

8 Anhang

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
EMS	27	25,0	24,9	14,9	11,1
		26,2			
		23,6			
Pufferkontrolle zur LOD- und LOQ-Bestimmung		7,1		6,7	0,9
		7,3			
		8,4			
		6,4			
		6,6			
		7,4			
		6,4			
		5,7			
	5,2				

8 Anhang

Tabelle III-6: Einzelwerte der BROD-Bestimmung in Lungenmikrosomen der männlichen Ratten der NVP-Inhalationsstudie

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
0 ppm	1	42,8	48,0	60,7	50,3
		47,6			
		53,7			
	4	45,9	46,3		
		45,9			
		47,2			
	10	17,5	16,5		
		16,7			
		15,4			
	20	84,8	76,5		
		70,5			
		74,1			
	21	22,6	23,2		
		23,4			
		23,5			
30	159,3	153,8			
	158,8				
	143,1				
5 ppm	8	22,6	21,8	22,9	11,0
		22,0			
		20,8			
	9	21,5	20,0		
		19,5			
		19,1			
	11	49,9	43,3		
		44,7			
		35,2			
	15	14,1	13,6		
		13,7			
		13,1			
	26	14,1	13,7		
		13,7			
		13,2			
29	25,3	24,9			
	24,9				
	24,4				
10 ppm	5	64,1	64,8	25,5	19,8
		67,3			
		63,0			
	12	15,2	15,7		
		15,9			
		16,0			

8 Anhang

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
10 ppm	13	20,6	20,5	25,5	19,8
		21,3			
		19,6			
	14	14,7	16,1		
		14,4			
		19,2			
	16	10,1	10,8		
		10,7			
		11,7			
	25	23,9	25,0		
		25,0			
		26,0			
20 ppm	3	24,2	24,7	82,1	76,8
		24,8			
		25,0			
	7	31,7	32,3		
		32,6			
		32,7			
	17	201,6	195,5		
		192,5			
		192,5			
	19	54,9	54,7		
		55,1			
		54,0			
	23	21,8	22,7		
		22,5			
		23,6			
	28	159,4	162,9		
		164,5			
		164,8			
EMS	2	137,5	132,2	54,2	46,6
		130,4			
		128,7			
	6	26,1	26,8		
		27,0			
		27,4			
	18	18,0	17,8		
		16,8			
		18,5			
	21	29,6	31,7		
		32,5			
		33,0			
	24	25,9	25,7		
		25,2			
		26,0			

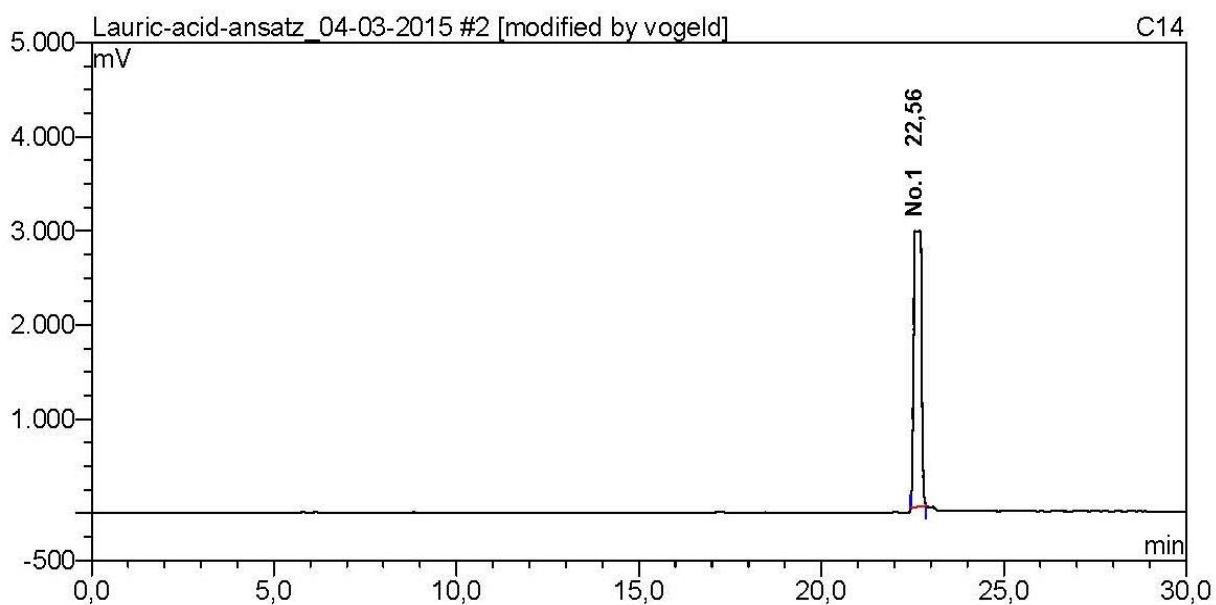
8 Anhang

NVP-Expositionsgruppe	Tier-code	Einzelmessungen der Enzymaktivität [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Tier [pmol/min/mg Protein]	Mittelwert der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]	Standardabweichung der Enzymaktivität pro Expositionsgruppe [pmol/min/mg Protein]
EMS	27	87,8	91,3	54,2	46,6
		95,0			
		91,0			
Pufferkontrolle zur LOD- und LOQ-Bestimmung		1,4		1,4	0,1
		1,5			
		1,5			
		1,4			
		1,4			
		1,3			
		1,3			
		1,4			
		1,7			

IV Laurinsäure Assay: Ansatzüberprüfung der ^{14}C -markierten Laurinsäure zum Einsatz im Laurinsäure Assay

Tabelle IV-I: Ansatzüberprüfung mittels LSC: Aktivitätsprüfung

Probe	DPM _(gemessen)	Differenz gemessener DPM und Hintergrund-DPM	MW	berechnete Aktivität	Wiederfindung [%]	MW [%]
Hintergrund	25,6	0				
^{14}C -Laurinsäure-Ansatz	491839,4	491813,8	490239,1	488400	100,7	100,4
	485870,6	485845,0			99,5	
	493084,2	493058,6			101,0	

Abbildung IV-I: Ansatzüberprüfung mittels Radio-HPLC - Nachweis der radiochemischen Reinheit von ^{14}C -Laurinsäure

V Kalibriergeraden der (Headspace-)GC-MS-Bestimmungen von NVP, 2-Pyrrolidon und Acetaldehyd

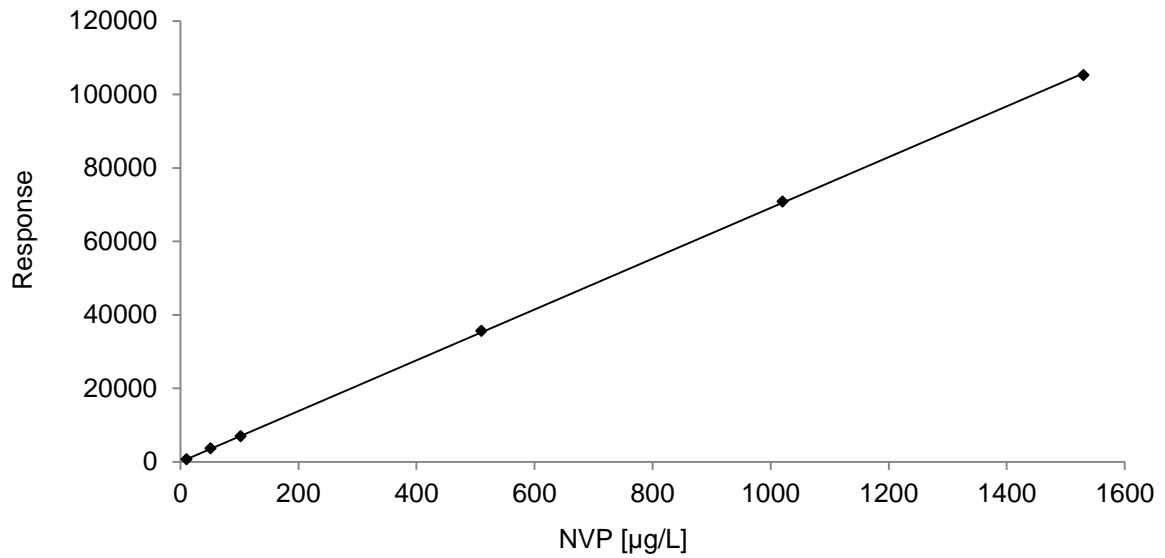


Abbildung V-I: Kalibriergerade der NVP-Bestimmung via GC/MS

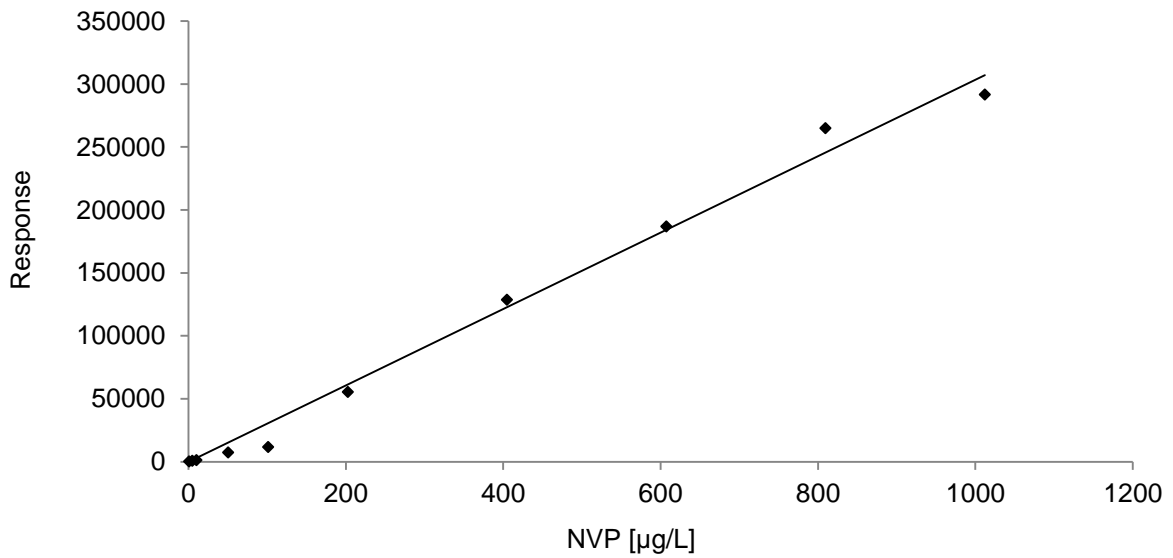


Abbildung V-II: Kalibriergerade der NVP-Bestimmung via Headspace-GC/MS

8 Anhang

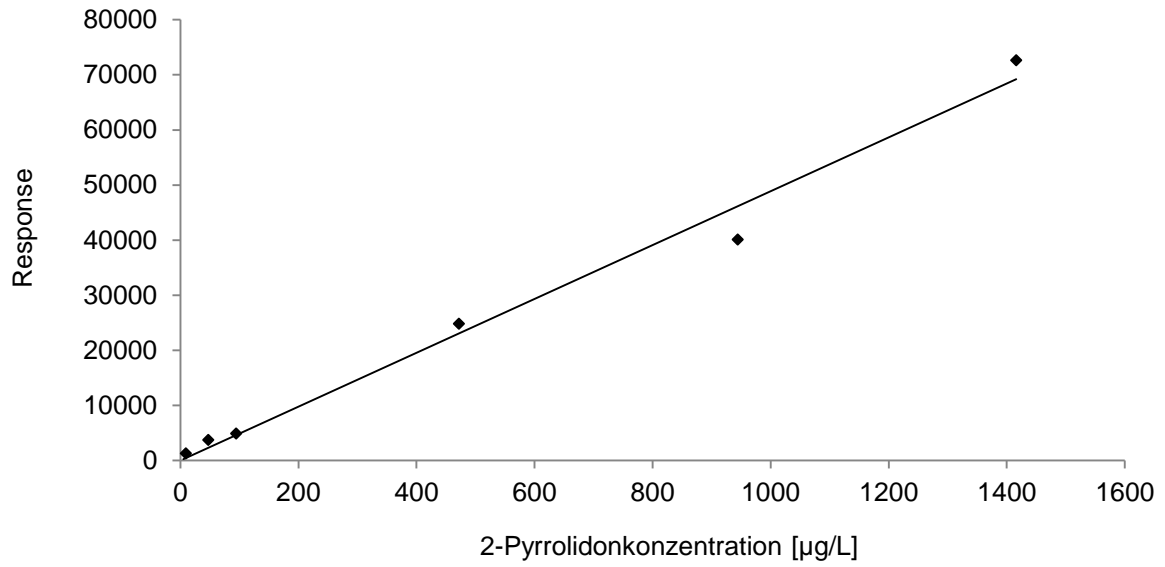


Abbildung V-III: Kalibriergerade der 2-Pyrrolidon-Bestimmung via GC/MS

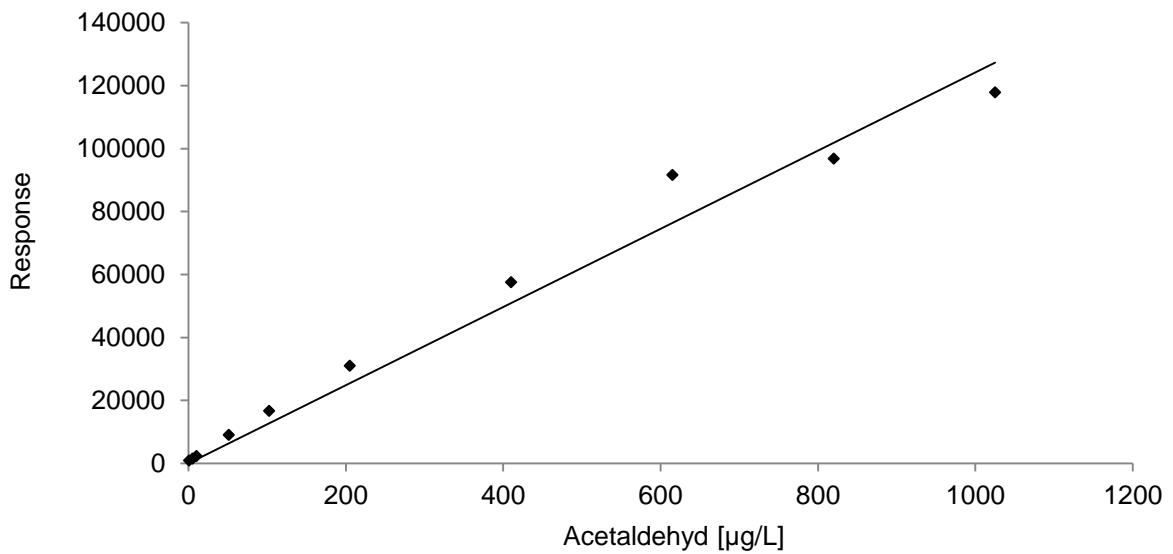


Abbildung V-IV: Kalibriergerade der Acetaldehyd-Bestimmung via Headspace-GC/MS

VI Testosteronbestimmungsmethoden

Testosteron wurde als Positivkontrolle innerhalb der *in vitro* Metabolismus Untersuchungen eingesetzt. Der Testosterongehalt der deproteinierten Inkubate wurde mit einer der folgenden HPLC-UV-Methoden analysiert.

Methode I

System	Hewlett Packard 1100, Dionex Chromeleon Software
Säule	Luna, Länge: 25 cm, innerer Durchmesser: 3 mm, Packungsdichte 5 μm
Injektion	40 μL
Fließmittel A	Wasser (0,1% HCOOH)
Fließmittel B	ACN (0,1% HCOOH)
Fluss	0,4 mL/min
Gradient	0 min: 40% Fließmittel B bis 30 min: linearer Gradient bis 95% Fließmittel B bis 35 min: 95% Fließmittel B 35,1 – 40 min: 40% Fließmittel A
Detektor	UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$)
R_t	19,8 min

Methode II

System	Hewlett Packard 1100, Dionex Chromeleon Software
Säule	Purospher RP18, Länge: 15 cm, innerer Durchmesser: 4 mm, Packungsdichte 5 μm
Injektion	40 μL
Fließmittel A	Wasser/Methanol/Ameisensäure (Volumenverhältnis:750/250/1)
Fließmittel B	Wasser/Acetonitril/Methanol/Ameisensäure (Volumenverhältnis:350/635/15/1)
Fluss	0,8 mL/min
Gradient	0 - 10 min: 25% Fließmittel B 10 - 35 min: linearer Gradient bis 100% Fließmittel B 35 - 50 min: 100% Fließmittel B 50 - 60 min: linearer Gradient von 100% auf 25% Fließmittel B 60 - 70 min: 25% Fließmittel B
Detektor	UV ($\lambda = 240 \text{ nm}$)
R_t	30,4 min

VII Veröffentlichungen

Publikationen

- Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013) Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. Archives of Toxicology, 87 (9): 1683-1696
- Otte, J.C., Schultz, B., Fruth, D., Fabian, E., van Raavenzwaay B., Hidding, B., Salinas, E.R. (2017) Intrinsic Xenobiotic Metabolizing Enzyme Activities in Early Life Stages of Zebrafish (Danio rerio). Toxicological Sciences, 159 (1):86-93

Konferenzbeiträge

03/2013 **79. Jahrestagung der DGPT in Halle**

Poster:

Activities of xenobiotic metabolizing enzymes in cell lines used for skin sensitization testing in vitro. Fabian, E., Vogel, D., Ramirez-Hernandez, T., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R.

03/2015 **81. Jahrestagung der DGPT in Kiel**

Vortrag:

Investigations on the cancerogenic mechanism of N-Vinyl-2-pyrrolidone (NVP)

08/2015 **44. Jahrestagung der EEMGS**

Poster und Vortrag:

N-Vinyl-2-pyrrolidone (NVP): Inhalative genotoxicity study applying comet assay and micronucleus test. Vogel, D., Schulz, M., Fabian, E., Berger, F.I., Oesch, F., Epe, B., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R.

Poster:

N-Vinyl-2-pyrrolidone (NVP): Investigations on enzyme induction and GSH-status in vivo. Vogel, D., Fabian, E., Schulz, M., Berger, F.I., Oesch, F., Epe, B., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R.

03/2016 **55. Jahrestagung der SOT**

Poster:

Investigations on the Carcinogenic Mechanism of N-Vinyl-2-Pyrrolidone (NVP). Fruth, D., Fabian, E., Schulz, M., Berger, F.I., Oesch, F., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R.

03/2016 **82. Jahrestagung der DGPT in Berlin**

Poster:

N-Vinyl-2-pyrrolidone (NVP): Investigations on its carcinogenic mechanism. Fruth, D., Fabian, E., Schulz, M., Berger, F.I., Oesch, F., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R.