Untersuchungen zur Bioaktivierung eines *in vitro* Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen der Maus (*Mus musculus* L.)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades im Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Markus Binder

aus Frankfurt am Main

Hamburg 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. L. RENWRANTZ
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. A. RODEWALD
Tag der Disputation: 10. Oktober 2008

Hamburg, den 25. September 2008

Universität Hamburg
64
Fakultät
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Meiner Mutter

und meinem Vater (†)

in Liebe gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **I**

Abkürzungsverzeichnis ..... **V**

1 Fragestellung **1**

2 Einleitung **3**

2.1 Reproduktionstoxikologie und Teratologie *3*
2.1.1 Embryotoxizität und sensitive Perioden der Embryonalentwicklung 3
2.1.2 Reproduktionstoxikologische Prüfungen 5
2.1.3 REACH 5

2.2 Alternativmethoden in der Reproduktionstoxikologie *7*
2.2.1 Micromass-Test 8
2.2.2 Whole Embryo Culture Test 8
2.2.3 Embryonaler Stammzelltest 8
2.2.3.1 ES-D3-Zellen als Modell für die embryonale Zelldifferenzierung 9
2.2.3.2 Testaufbau und Prädiktionsmodell 9
2.2.4 Validierung, Anwendungsmöglichkeiten und Optimierung der *in vitro* Embryotoxizitätstests 10

2.3 In vitro Systeme zur Biotransformation von Substanzen *11*
2.3.1 Primäre Hepatozyten 13
2.3.2 Permanente Leberzelllinien 14
2.3.2.1 HepG2 14
2.3.2.2 H4IIE 15
2.3.2.3 Hepa-1 15
2.3.2.4 HepaRG 15
2.3.3 Lebermikrosomen 16
2.3.4 S9-Mix 16
2.3.5 Transgene Zellen 17
2.3.6 Möglichkeiten der Integration eines Bioaktivierungssystems in den EST 17

2.4 Modellsubstanzen für in vitro-Tests *18*
2.4.1 Auswahl von Substanzen 18
2.4.2 Valpromid und Valproinsäure 19
2.4.3 Retinol und all-*trans*-Retinsäure 21
2.4.4 Cyclophosphamid und 4-Hydroperoxycyclophosphamid 24
2.4.5 Albendazol und Albendazol-Sulfoxid 26

3 Material und Methoden **28**

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial *28*

3.2 Tiere und Zelllinien *28*

3.3 Chemikalien *29*
3.3.1 Modellsubstanzen 29
3.3.2 Laborchemikalien 30

3.4 Zellkulturverfahren ... *31*
3.4.1 Behandlung von Zellkulturschalen ... 31
3.4.2 Isolierung primärer Hepatozyten ... 32
3.4.3 Zellzahlbestimmung ... 33
3.4.4 Kultivierung primärer Hepatozyten ... 33
3.4.5 Kultivierung von Zelllinien ... 34
3.4.6 Einfrieren von Zellen ... 35
3.4.7 Auftauen von Zellen ... 35
3.4.8 Herstellung von Zelllysat ... 36

3.5 Bestimmung der Zytotoxizität ... *36*
3.5.1 Trypanblau-Ausschlusstest ... 36
3.5.2 MTT-Test ... 36
3.5.2.1 Bestimmung in 96-Well-Platten ... 37
3.5.2.2 Bestimmung in Zellkultureinsätzen ... 37

3.6 Untersuchung von Enzymaktivitäten ... *38*
3.6.1 Bestimmung der CYP450-Aktivität: EROD, PROD, BROD-Assay ... 38
3.6.2 Bestimmung der UDP-Glucuronosyltransferase-Aktivität im Zelllysat ... 40
3.6.3 Bestimmung der GST-Aktivität im Zelllysat ... 42

3.7 Bestimmung des Proteingehaltes ... *44*

3.8 Bestimmung der Metabolisierungsleistung von Hepatomazellen ... *44*
3.8.1 Versuchsdurchführung ... 44
3.8.2 Analytik der Metaboliten ... 45
3.8.2.1 Valpromid und Valproinsäure ... 45
3.8.2.2 Retinoide ... 45

3.9 Der Embryonale Stammzelltest (EST) ... *46*
3.9.1 Differenzierungsassay ... 47
3.9.2 Zytotoxizitätstest mit ES-D3- und 3T3-Zellen ... 49
3.9.3 Prädiktionsmodell zur Einstufung der Testsubstanz ... 49
3.9.4 Qualitätskontrolle ... 50
3.9.5 Prüfung von Substanzen ... 50
3.9.6 Vergleich von Ergebnissen ... 51

3.10 Der metabolisch aktivierte EST: Methodenentwicklung ... *52*
3.10.1 Diffusionseigenschaften der Anopore-Membran ... 52
3.10.2 Methoden der Anzucht von EBs in Kokultur im ersten Kultivierungsschritt ... 52

3.11 Der metabolisch aktivierte EST: Versuchsprotokoll ... *53*
3.11.1 Differenzierungsassay ... 53
3.11.2 Zytotoxizitätstest mit ES-D3- und 3T3-Zellen ... 57
3.11.3 Prüfung von Substanzen ... 58
3.11.4 Vergleich von Ergebnissen ... 58

4 Ergebnisse ... 60

4.1 Validierung des EST ... *60*

4.2 Untersuchung von Proteratogenen und Teratogenen im EST ... *61*
4.2.1 Valpromid und Valproinsäure ... 62
4.2.2 Retinol und all-*trans*-Retinsäure ... 64
4.2.3 Cyclophosphamid und 4-Hydroperoxycyclophosphamid ... 67
4.2.4 Albendazol und Albendazol-Sulfoxid ... 70

4.3 Entwicklung des mEST ... *72*
4.3.1 Toleranz gegenüber Kulturmedien und Zellkultureinsätzen ... 72
4.3.1.1 Kultivierung von Leberzellen in ES-D3-Medium ... 72
4.3.1.2 Kokultur-Bedingungen für ES-D3-Zellen ... 73
4.3.1.3 Kultivierung von Hepatomazellen in Zellkultureinsätzen ... 74
4.3.2 Diffusion von Substanzen durch die Anopore-Membran ... 76
4.3.3 Anzucht von Embryoid Bodies in Kokultur ... 77
4.3.4 Einfluss der V96-Methode auf die Sensitivität des Differenzierungsassays ... 78
4.3.5 Einfluss der Kokultur auf den Differenzierungsassay ... 79
4.3.6 Einfluss der Kokultur auf die Zytotoxizitätstests ... 79
4.3.7 Charakterisierung der Hepatomazellen anhand ihrer Phase I - und Phase II-Enzymaktivitäten ... 81
4.3.7.1 EROD-/ PROD-/ BROD-Assay ... 81
4.3.7.2 UGT1/2-Assay ... 85
4.3.7.3 GST-Assay ... 86
4.3.8 Charakterisierung der Hepatomazellen anhand ihrer Metabolisierung der Modellsubstanzen ... 86
4.3.8.1 Metabolisierung von Valpromid zu Valproinsäure ... 87
4.3.8.2 Metabolisierung von Retinol zu all-trans-Retinsäure ... 89
4.3.9 Zusammenfassung der metabolischen Aktivitäten der Hepatomazellen ... 92

4.4 Prüfung von Proteratogenen im mEST ... *94*
4.4.1 Untersuchungen mit Valpromid ... 94
4.4.2 Untersuchungen mit Retinol ... 97
4.4.2.1 Prüfung von Retinol in verkürzten EST-Zytotoxizitätstests ... 97
4.4.2.2 Prüfung von Retinol im mEST mit HepG2-Kokultur ... 98
4.4.2.3 Metabolisierung von Retinol im mEST mit HepG2-Kokultur ... 100
4.4.2.4 Retinoid-Gehalte in Bestandteilen der Testansätze ... 102
4.4.2.5 Untersuchung des Einflusses von Retinol auf all-trans-Retinsäure ... 102
4.4.2.6 Wiederfindung von Retinol und all-trans-Retinsäure im ES-D3-Medium ... 103
4.4.3 Untersuchungen mit Cyclophosphamid ... 105
4.4.3.1 Prüfung von Cyclophosphamid in verkürzten EST-Zytotoxizitätstests ... 105
4.4.3.2 Prüfung von Cyclophosphamid im mEST ... 106

5 Diskussion ... 110

5.1 Untersuchung von Proteratogen und Teratogen im EST ... *110*
5.1.1 Diskriminierungsfähigkeit des EST ... 113
5.1.1.1 Diskriminierung mit dem Prädiktionsmodell ... 113
5.1.1.2 Diskriminierung mit alternativen Parametern ... 115
5.1.2 Korrelation mit *in vivo*-Daten ... 116
5.1.2.1 Valpromid und Valproinsäure ... 116
5.1.2.2 Retinol und Retinsäure ... 117
5.1.2.3 Cyclophosphamid und 4HC ... 118
5.1.2.4 Albendazol und Albendazol-Sulfoxid ... 119

5.2 HepG2-Zellen als Bioaktivierungssystem für den mEST ... *121*
5.2.1 Enzymaktivität ... 121
5.2.2 Metabolisierung der Modellsubstanzen ... 123
5.2.2.1 Valpromid und Valproinsäure ... 123
5.2.2.2 Retinol und Retinsäure ... 124

5.2.3 Untersuchung der Modellsubstanzen im mEST ... 125
5.2.3.1 Valpromid ... 125
5.2.3.2 Retinol ... 125
5.2.3.3 Cyclophosphamid ... 127

5.3 H4IIE- Zellen als Bioaktivierungssystem für den mEST ... 128
5.3.1 Enzymaktivität von H4IIE-Zellen ... 128
5.3.2 Metabolisierung der Modellsubstanzen ... 130
5.3.2.1 Valpromid und Valproinsäure ... 130
5.3.2.2 Retinol und Retinsäure ... 130
5.3.3 Untersuchung der Modellsubstanzen im mEST ... 131
5.3.3.1 Cyclophosphamid ... 131

5.4 Beurteilung von Testsystem und Modellsubstanzen ... 132
5.4.1 Das mEST-Protokoll ... 132
5.4.2 Modellsubstanzen ... 133
5.4.2.1 Valpromid und Valproinsäure ... 134
5.4.2.2 Retinol und Retinsäure ... 134
5.4.2.3 Cyclophosphamid und 4HC ... 136
5.4.2.4 Albendazol und Albendazolsulfoxid ... 136

6 Ausblick ... 138

7 Wichtige Ergebnisse in Tabellenform ... 140

***8* Zusammenfassung ... 142**

9 Summary ... 146

10 Literaturnachweis ... 149

11 Anhang ... 166

11.1 Firmenverzeichnis ... 166

11.2 Danksagung ... 167

Abkürzungsverzeichnis

ABZ	Albendazol
6AN	6-Aminonicotinsäureamid
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
AP	Aldophosphamid
ASO	Albendazolsulfoxid
ATCC	*American Type Culture Collection, VA*
BfR	Bundesamt für Risikobewertung, Berlin
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BROD	7-Benzoxyresorufin-O-Debenzylase
BSA	*Bovine Serum Albumin*
CDNB	1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol
CEZ	Chlorethylaziridin
CPP	Cyclophosphamid
CRBP I	*Cellular retinol-binding protein*
CYP	Cytochrom P450
D-Quotient	Zytotoxizität-Differenzierungsquotient
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
EB	*Embryoid Body*
ECVAM	*European Center for the Validation of Alternative Methods*
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase
EST	Embryonaler Stammzelltest
FACS	*Fluorescence Activated Cell Sorter*
FBS	*Fetal Bovine Serum*
FMO	Flavin-haltige Monooxygenasen
5-FU	5-Fluorouracil
GA	β-Glucuronidase/Arylsulfatase
GC-MS	Gaschromatograph, gekoppelt mit Massenspektrometer
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
4HC	4-Hydroperoxycyclophosphamid
4-OH-CPP	4-Hydroxycyclophosphamid
KG	Körpergewicht
LOAEL	*Lowest Observed Adverse Effect Levels*
MEM	*Minimum Essential Medium*
mEST	metabolisch aktiver EST
mLIF	*Myeloid Leukemia Inhibiting Factor*
MTT	3-[4-5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADPH	β-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NOAEL	*No Observed Adverse Effect Level*
OD/min	Optische Dichte pro Minute
PAM	Phosphoramid Mustard
p.A.	pro analysi (für die Analyse)
PB	Phenobarbital
PBS	*Phosphate Buffered Saline*

PEGT	Polyethylenglykol Terephthalat
PROD	7-Pentoxyresorufin-O-Depentylase
RA	all-*trans*-Retinsäure
RLEC	*Rat liver epithelial cells*
4oRA	all-*trans*-4-oxo-Retinsäure
9cRA	9-*cis*-Retinsäure
13cRA	13-*cis*-Retinsäure
13c4oRA	13-*cis*-4-oxo-Retinsäure
HP-M.	Ratte-/Maushepatozytenmedium
rF	relative Luftfeuchtigkeit
RAR	*Retinoic Acid Receptor*
RO	Retinol
RXR	*Retinoid X-Receptor*
SCAD	*Short Chain Alcohol Dehydrogenase*
SDS	*Sodium Dodecyl Sulfate*
T25-Flasche	Zellkulturflasche mit 25 cm² Kulturoberfläche
T75-Flasche	Zellkulturflasche mit 75 cm² Kulturoberfläche
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin
TiHo	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie, Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik, Prof. Heinz Nau
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris(Hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
UDP	Uridin-Diphosphat
UDPGA	Uridindiphosphoglucuronsäure (*Uridine diphosphoglucuronic acid*)
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
V96-Platte	96-Well-Platte mit V-förmigem Boden
VPA	Valproinsäure
VPD	Valpromid
v/v	Volumenprozent
WEC	*Whole Embryo Culture*
WME	William's Medium E
ZEBET	Zentrum für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch
Z-Quotient	Zytotoxizitätsquotient

1 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundprojektes mit dem Titel "Weiterentwicklung eines *in vitro*-Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen der Maus: Analyse embryotoxischer Wirkungen unter Berücksichtigung neuer Endpunkte und der Metabolisierung bei Verwendung einer erweiterten Stoffauswahl" durchgeführt.

Der Embryonale Stammzelltest (EST) ist ein wissenschaftlich validierter *in vitro*-Embryotoxizitätstest, der zum Nachweis von direkt wirkenden Teratogenen entwickelt wurde. Er basiert auf der Eigenschaft muriner embryonaler Stammzellen, sich *in vitro* in kontrahierende Kardiomyozyten zu differenzieren, welche als Modell für die frühe Embryonalentwicklung *in vivo* verwendet werden können. Anhand der Hemmung der Zelldifferenzierung in Anwesenheit einer Testsubstanz kann das embryotoxische Potenzial einer Testsubstanz charakterisiert werden. Ein solches *in vitro* System reduziert jedoch die Komplexität der Verhältnisse, die *in vivo* herrschen, unter anderem weil die Substanz unverändert auf die Zielzellen wirkt. In einem Organismus werden aufgenommene Fremdstoffe metabolisiert, um sie rasch wieder ausscheiden zu können. Dabei können teratogene Intermediate aus Verbindungen entstehen, die selbst nicht teratogen wirken und daher als Proteratogene bezeichnet werden. Diese Proteratogene können vom EST bislang nicht korrekt identifiziert werden, weil ihm ein metabolisch aktives System fehlt.

Um die Aussagekraft des EST zu erhöhen, wird in dieser Arbeit untersucht, unter welchen Bedingungen der EST Proteratogene identifizieren kann, und welche Metabolisierungssysteme sich dafür eignen. Diese Fragestellung wird in drei Schritten bearbeitet:

1. Kann der EST zwischen Proteratogenen und ihren teratogenen Metaboliten ausreichend differenzieren?

Es sollten Substanzpaare verwendet werden, die aus einem *in vivo* gut untersuchten Proteratogen und seinem hauptsächlichen teratogenen Metaboliten bestehen, und einzeln im EST getestet werden. Mit der Untersuchung der Substanzpaare Valpromid/Valproinsäure, Retinol/Retinsäure, Cyclophosphamid/4-Hydroperoxycyclophosphamid und Albendazol/Albendazol-Sulfoxid sollte festgestellt werden, welche Proteratogene für einen Einsatz als Modellsubstanz in einem metabolisch aktivierten EST am besten geeignet sind, und ob die Ergebnisse der Substanzpaare die *in vivo*-Situation widerspiegeln.

2. Welches Bioaktivierungssytem kann in den EST integriert werden, um Proteratogene zu metabolisieren?

In dieser Arbeit sollte eine statische Kokultur mit Hilfe von Zellkultureinsätzen mit permeabler Membran aufgebaut werden, die in die Kulturbehälter der Zielzellen gestellt werden. Als Metabolisierungssysteme sollten primäre Hepatozyten von der Ratte und der Maus, und Hepatomazellen von der Ratte (H4IIE), der Maus (Hepa1-6) und dem Menschen (HepG2, HepaRG) eingesetzt werden. Anhand ihrer Toleranz der Kultivierungsbedingungen, ihrer Aktivität typischer Phase I und II Enzyme des Fremdstoffmetabolismus sowie des Ausmaßes der Metabolisierung von zwei Proteratogenen sollte bestimmt werden, welche Zellen zur Integration in den EST am besten geeignet sind.

3. Kann der EST mit metabolischer Komponente (mEST) die Proteratogene als solche identifizieren?

Dazu sollten die ausgewählten Proteratogene im mEST getestet und das proteratogene Potenzial der Substanzen bestimmt werden. Im Vergleich mit den Ergebnissen, die im EST erzielt wurden, sollte die Effizienz des neuen Systems beurteilt werden.

An dem BMBF-Verbundprojekt waren fünf Partner beteiligt. Die Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie, Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik (TiHo) stellte dabei für alle Projektpartner die Stammlösungen der Substanzen her, die im Projekt getestet werden sollten, und führte die Analyse von Valpromid, Valproinsäure und Retinoiden durch.

2 Einleitung

2.1 Reproduktionstoxikologie und Teratologie

Die Reproduktionstoxikologie gehört zum Fachgebiet der Toxikologie und befasst sich mit dem Einfluss von Substanzen auf den Reproduktionszyklus von Organismen, der sich von der Gametogenese über Fertilisation, Embryo- und Fetogenese, Geburt und postnatale Entwicklung bis zur Geschlechtsreife erstreckt. Reproduktionstoxische Stoffe können je nach Entwicklungsphase bei den Eltern die reproduktiven Organe schädigen, den sich entwickelnden Embryo abtöten, Wachstumsretardierungen oder Missbildungen bei ihm auslösen, oder das Jungtier in seiner Entwicklung beeinträchtigen bzw. unfruchtbar machen. Die Teratologie als Lehre der Ursache von Fehlbildungen befasst sich dabei insbesondere mit abnormen, grobstrukturellen Veränderungen des sich entwickelnden Embryos.

2.1.1 Embryotoxizität und sensitive Perioden der Embryonalentwicklung

Die Prozesse in der Entwicklungsbiologie sind sehr komplex, sodass eine Substanz an vielen Orten angreifen, mit Schlüsselkomponenten interagieren und Entwicklungsstörungen hervorrufen kann. Die Mechanismen, die dabei zu einer abnormalen Entwicklung führen, sind vielfältig. Daher lassen sich nur allgemeine Prinzipien der Wechselwirkung einer Substanz mit intrazellulären Molekülen ableiten. Zu den wichtigsten Prinzipien gehören dabei die kovalente Bindung einer Substanz mit endogenen Molekülen wie z.B. der DNA oder Proteinen; die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung; die Peroxidation von Lipiden und Proteinen durch freie Radikale; und die Wechselwirkung mit Sulfhydryl-Gruppen (Anon 2000).

Der Zeitpunkt, an dem eine Störung gesetzt wird, hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Ausprägung der Embryotoxizität. Beim Menschen kann man die Embryonal- und Fetalentwicklung in drei Perioden unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Noxen einteilen (Abb. 1): die Frühentwicklung, welche mit der Fertilisation beginnt und sich weiterhin über Präimplantation, Implantation und Entwicklung der Embryonalscheibe erstreckt (1. - 2. Woche), die Embryonalperiode (3. - 8. Woche) und die Fetalperiode (9. - 38. Woche). Tritt eine Störungen in der Frühentwicklung auf, schädigt die teratogene Substanz entweder den Großteil der Zellen oder alle Zellen, und der Keim stirbt ab, oder es werden nur wenige Zellen geschädigt, und der Keim regeneriert sich vollständig (Warkany 1971). Während der Embryonalperiode resultieren toxische Einflüsse in schweren, vielfältig ausgeprägten Missbildungen. Wenn sich beispielsweise in der vierten Woche das Neuralrohr kaudal nicht schließt, führt das zu einer offenen

Wirbelsäule (Spina bifida occulta oder aperta), während durch einen verhinderten kranialen Neuralrohrschluss eine Anencephalie oder Exencephalie entsteht. Diese Neuralrohrdefekte sind multifaktoriell bedingt, wobei genetische Faktoren, Folsäuremangel oder die Einnahme von antikonvulsiven Arzneimitteln wie Valproinsäure die Anfälligkeit dafür erhöhen können. Durch eine zusätzliche Einnahme von Folsäure während der Schwangerschaft können die Defekte jedoch zu 70% verhindert werden (McLone 2003; Salvi 2003). Während der Fetalperiode beschränken sich Auswirkungen von Noxen auf kleinere morphologische Anomalien oder funktionelle Defekte (Warkany 1971).

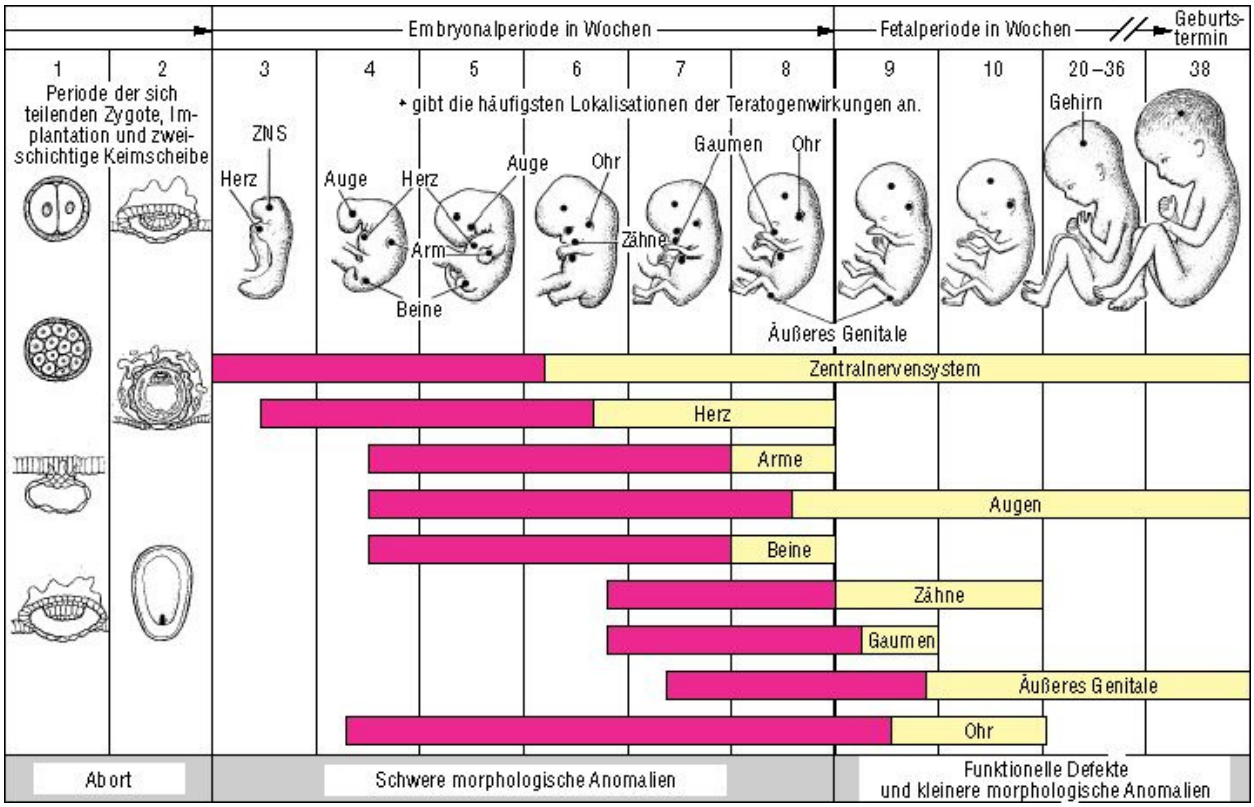


Abb. 1: Organentwicklung von Embryo und Fetus des Menschen sowie sensitive Perioden gegenüber teratogenen Einflüssen und ihre Folgen (Moore 1990).

Das Ausmaß eines entwicklungsbiologischen Defekts hängt neben der Art der Wechselwirkung auch von toxikokinetischen Parametern des mütterlichen und embryonalen Organismus wie Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion einer Substanz ab. Weitere Faktoren, die einen embryotoxischen Effekt beeinflussen können, sind der Plazentatransfer der Substanz sowie embryonale Reparaturmechanismen (Wells und Winn 1996).

2.1.2 Reproduktionstoxikologische Prüfungen

In Europa sind die für die Zulassung von Arzneimitteln notwendigen reproduktionstoxikologischen Prüfungen in der Richtlinie CPMP/ICH/386/95 der *European Medicines Agency* (EMEA) niedergelegt, die auf der Richtlinie S5(R2) der *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) basiert. In dieser Richtlinie sind die Strategien von drei Studientypen beschrieben, anhand derer die Wirkung einer Testsubstanz auf die verschiedenen Phasen des Reproduktionszyklus untersucht werden kann. Die Studientypen werden abhängig von dem Teil des Reproduktionszyklus, an dem die Tiere behandelt werden, als Segment I, II oder III-Studie bezeichnet. In einer Segment I-Studie wird die Phase der Fertilität und frühen embryonalen Entwicklung bis zur Implantation erfasst, in einer Segment II-Studie die embryo-fetale Entwicklung, und in einer Segment III-Studie die prä- und postnatale Entwicklung. Diese Studien sollen mit Säugetieren durchgeführt werden, wobei standardmäßig die Ratte als Nager eingesetzt wird, weil für diese Spezies die meisten Hintergrunddaten existieren. Für die Studien zur embryo-fetalen Entwicklung wird zusätzlich das Kaninchen als eine "Nicht-Nager"-Spezies verwendet.

Für die Zulassung von Chemikalien sind ebenfalls reproduktionstoxikologische Studien vorgeschrieben, die in Richtlinien der *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) beschrieben sind. Dies sind im einzelnen die Richtlinien 414 (*Prenatal Developmental Toxicity Study*), 415 (*One-Generation Reproduction Toxicity Study*), 416 (*Two-Generation Reproduction Toxicity Study*), 421 (*Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*) und 422 (*Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*).

2.1.3 REACH

Am 1. Juni 2007 trat die neue Europäische Chemikaliengesetzgebung REACH (*Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals*) in Kraft, die die Verfahren zur Registrierung, Evaluierung und Zulassung von Chemikalien verschiedener EU-Richtlinien harmonisiert, um das Gefährdungspotenzial von Stoffen für Mensch und Umwelt besser abschätzen zu können (EC 1907/2006). Während der Implementierung von REACH wird erwartet, dass der derzeitige Bedarf an Studien mit Tieren zunimmt.

Vor der Einführung von REACH wurde zwischen "existierenden" und "neuen" Chemikalien unterschieden, wobei Chemikalien als "existierend" eingestuft wurden, wenn sie sich vor dem 18. September 1981 auf dem Markt befanden. Chemikalien, die danach im Markt eingeführt wurden, galten als "neue" Chemikalien. "Neue" Chemikalien mussten ab einem Jahresproduk-

tionsvolumen von 10 kg ausführlich getestet werden, um ihr Risiko gegenüber der menschlichen Gesundheit und der Umwelt charakterisieren zu können. An "existierende" Chemikalien, die 99% der gehandelten Chemikalien ausmachen, wurden jedoch keine vergleichbaren Testanforderungen gestellt. Dadurch existieren bis heute Datenlücken, die ein Hindernis für den Prozess der Risikobewertung darstellen (Anon 2006; Grindon und Combes 2006).

Um die Datenlücken zu schließen, und die Risikobewertung zu verbessern, wurde REACH ins Leben gerufen. Nach der neuen Gesetzgebung müssen alle Stoffe ab einem Produktionsvolumen von einer Jahrestonne registriert werden, und abhängig vom jährlichen Produktionsvolumen (1-10 Tonnen; 10-100 Tonnen; 100-1000 Tonnen; >1000 Tonnen) müssen unterschiedlich viele toxikologische Tests durchgeführt werden, wobei die größte Zahl an Tests bei Stoffen mit der größten Jahresproduktion erforderlich ist. Es wird geschätzt, dass während der nächsten 15 Jahre ca. 30.000 Chemikalien das Zulassungsverfahren durchlaufen müssen. Reproduktionstoxikologische Studien sind ab der 10-100 Tonnen-Klasse erforderlich (Tab. 1), was für ca. 10.000 Chemikalien relevant ist (Pedersen *et al.* 2003; Spielmann und Vogel 2006).

Tab. 1: Reproduktionstoxikologische Studientypen, die im Rahmen der neuen europäischen Chemikaliengesetzgebung REACH (EC 1907/2006) für die Zulassung von Chemikalien erforderlich sind.

Jahresproduktion in Tonnen	Reproduktionstoxikologische Studie
10 - 100	Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (OECD 421 oder 422)
100 - 1000 und >1000	Prenatal Developmental Toxicity (OECD 414) und Two-Generation Study (OECD 416)

Die Anzahl an Labortieren, die für die Implementierung von REACH erforderlich ist, wird auf 2,1 - 7,5 Millionen geschätzt (Grindon *et al.* 2006; van der Jagt *et al.* 2004), wobei etwa 60% davon in reproduktionstoxikologischen Studien eingesetzt werden (van der Jagt *et al.* 2004). Um diesen potenziellen Bedarf so gering wie möglich zu halten, wurden in der neuen Chemikaliengesetzgebung vielfältige Verfahren vorgeschlagen, um die bereits vorhandenen Daten so effizient wie möglich zu nutzen. Weiterhin wurde festgelegt, dass erforderliche neue Daten wo immer möglich mit *in silico* Verfahren und *in vitro* Tests gewonnen werden sollen. Aus diesem Anspruch erwächst damit ein großer Bedarf an neuen, alternativen Testmethoden, die insbesondere reproduktionstoxikologische Studien reduzieren oder ersetzen sollen.

2.2 Alternativmethoden in der Reproduktionstoxikologie

Russel und Burch entwarfen 1959 Grundsätze zur Durchführung humaner Tierexperimente, die sie mit den Begriffen *Replace - Reduce - Refine* zusammenfassten (Russel und Burch 1959). Nach dieser Leitidee sollten Tierversuche entweder durch alternative Methoden ersetzt werden, wie zum Beispiel durch die Verwendung von nicht-empfindsamen Organismen (*Replace*), oder die Versuche sollten so effizient wie möglich durchgeführt werden, wobei die Anzahl der eingesetzten Tiere so weit wie möglich reduziert werden sollte (*Reduce*). Wenn diese beiden Maßnahmen nicht umgesetzt werden können, sollte versucht werden, die Tierversuchsanordnung so zu gestalten, dass die Belastung der Tiere so gering wie möglich ausfällt (*Refine*). Diese Grundsätze wurden unter dem Schlagwort der "3R" bekannt.

In der pharmazeutischen Industrie werden *in vitro*-Tests im Sinne der 3R eingesetzt und dazu genutzt, Tierversuche einzusparen. Diese Alternativmethoden bieten dabei zusätzlich eine Reihe weiterer Vorteile. So können bereits in der frühen Phase der Substanzentwicklung *in vitro*-Tests zum *Screening* unerwünschter Eigenschaften von Arzneimittelkandidaten eingesetzt werden, weil sie kostengünstig und gegenüber *in vivo*-Studien vergleichsweise schnell durchzuführen sind. Außerdem werden nur geringe Substanzmengen pro Test benötigt, was Zeit und Kosten spart.

Um die 3R-Grundsätze in Europa zu forcieren, wurde im Oktober 1991 das *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) gegründet mit dem Ziel, die Akzeptanz von Alternativmethoden zum Tierversuch in der Wissenschaft und bei Behörden zu erhöhen, indem neue Tests entwickelt und validiert werden sollten. Seitdem hat das ECVAM Alternativmethoden erarbeitet und getestet, die Eingang in OECD-Richtlinien zur Prüfung von Chemikalien gefunden haben (Tab. 2).

Tab. 2: OECD-Richtlinien zur Prüfung von Chemikalien, die auf *in vitro*-Alternativmethoden basieren.

Nummer	OECD-Richtlinie
428	Skin Absorption: *In vitro* Method
429	Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay
430	*In vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)
431	*In vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test
432	*In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test
435	*In vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion

Für Studien zur Reproduktionstoxikologie existieren keine behördlich anerkannten Alternativmethoden. Zur Bestandsaufnahme der vorhandenen *in vitro*-Methoden zur Reproduktionstoxi-

zität wurde auf Initiative des ECVAM 1994 ein Workshop durchgeführt (Brown *et al.* 1995). In diesem Workshop wurde die *Micromass* Kultur von Zellen der Extremitätenknospen von Rattenembryonen (*Micromass-Test*), die Kultur ganzer Rattenembryonen (*Rat Postimplantation Whole Embryo Culture*; WEC), und der embryonale Stammzelltest (EST) als vielversprechend identifiziert und wissenschaftlich validiert (Genschow *et al.* 2004; Piersma *et al.* 2004; Spielmann *et al.* 2004).

2.2.1 Micromass-Test

Für den *Micromass-Test* werden von Rattenembryonen die Extremitätenknospen isoliert, die Zellen dissoziiert, in hoher Zelldichte (*Micromass*) ausgesät und für fünf Tage kultiviert. Danach wird mit dem Knorpelzell-spezifischen Farbstoff Alcian Blau geprüft, ob sich die embryonalen Zellen in Gegenwart der Testsubstanz zu Knorpelzellen differenziert haben. Der Test eignet sich besonders zur Prüfung von Substanzen, die spezifisch mit der Differenzierung von Extremitätenknospen in Knorpelzellen interferieren (Parsons *et al.* 1990; Spielmann *et al.* 2004, 2006).

2.2.2 Whole Embryo Culture Test

Bei der Kultur ganzer Ratten- oder Mausembryonen werden Weibchen an Tag 9 bis 10 der Gravidität Embryonen entnommen und diese in einer Rollerkultur mit Testmedium für 48 h kultiviert. Zu Beginn und Ende der Inkubation wird die Ausprägung von morphologischen, funktionalen, entwicklungs- und wachstumsspezifischen Parametern der Embryonen mit einem Skalensystem quantifiziert und zusammen mit der Zytotoxizität von 3T3-Zellen anhand eines Prädiktionsmodells die Embryotoxizität der Testsubstanz ermittelt (Flick und Klug 2006; Piersma *et al.* 2004). Mit dieser Methode ist es möglich, die Organogenese ohne maternale Einflüsse zu beurteilen. Wegen der aufwändigen und schwer standardisierbaren Kulturbedingungen ist ein *Screening* vieler Testsubstanzen mit diesem System jedoch nicht möglich (Cicurel und Schmid 1988; Piersma 1993; Spielmann *et al.* 2006).

2.2.3 Embryonaler Stammzelltest

Der EST basiert auf der Fähigkeit der murinen embryonalen Stammzelllinie ES-D3, sich spontan in kontrahierende Herzmuskelzellen zu entwickeln, die mikroskopisch detektiert werden können. Zusammen mit der Prüfung von adulten 3T3-Zellen kann anhand eines biostatistischen Prädiktionsmodells das embryotoxische Potenzial einer Prüfsubstanz vorhergesagt werden

(Doetschman *et al.* 1985; Spielmann *et al.* 1997). Im Gegensatz zum *Micromass-Test* und dem WEC-Test beruht der EST ausschließlich auf der Prüfung von Zelllinien.

2.2.3.1 ES-D3-Zellen als Modell für die embryonale Zelldifferenzierung

Die ES-D3-Zellen stammen aus der inneren Zellmasse einer Mausblastozyste und sind pluripotent. *In vitro* können sie auf einer *Feeder*-Kultur aus Fibroblasten oder unter Einfluss des *Leukemia Inhibiting Factor* (LIF), einem Zytokin der Interleukin-6 Klasse, im undifferenzierten Stadium gehalten werden, und besitzen unter diesen Bedingungen einen stabilen Karyotyp sowie die Fähigkeit zur fast unbegrenzten Selbsterneuerung (Williams *et al.* 1988; Boheler *et al.* 2002). Der Erhalt ihrer Pluripotenz in Zellkultur wurde überprüft, indem man die ES-D3-Zellen in eine murine Blastozyste retransferierte, wo sie sich wie normale embryonale Stammzellen verhielten (Blau *et al.* 2001; Burdon *et al.* 1999). Ohne LIF können sich die ES-D3-Zellen auch *in vitro* in spezialisierte Zellarten differenzieren, darunter Kardiomyozyten, Neurozyten, hämatopoetische Zellen, Chondrozyten, Osteoblasten oder Epithel- und Endothelzellen (Czyz und Wobus 2001). In den meisten Fällen ist dafür zunächst die Bildung eines *Embryoid Body* (EB) genannten Zellaggregats notwendig, in dem sich unter definierten Kulturbedingungen Derivate der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm bilden. Da das Herz das erste funktionierende embryonale Organ ist, das sich nach der Gastrulation entwickelt (Sachinidis *et al.* 2003), gehören die aus dem Mesoderm entstehenden Herzmuskelzellen zu den ersten vollständig differenzierten Zellen, die sich im EB bilden. Die Kultivierung der ES-D3-Zellen *in vitro* wird als Modell für die frühe Embryonalentwicklung *in vivo* herangezogen.

2.2.3.2 Testaufbau und Prädiktionsmodell

Der EST wurde von Spielmann *et al.* (1997) am Zentrum für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), Berlin, entwickelt und besteht aus drei *in vitro*-Tests, mit denen grundlegende Mechanismen der embryotoxischen Wirkung einer Testsubstanz bestimmt werden. In zwei Zytotoxizitätstests wird die zytotoxische Wirkung der Testsubstanz auf embryonale ES-D3-Zellen mit der zytotxischen Wirkung auf adulte, maternale Zellen repräsentierende 3T3-Mausfibroblasten verglichen, und in einem Differenzierungsassay wird die Hemmwirkung der Testsubstanz auf die Differenzierung der ES-D3-Zellen in Herzmuskelzellen untersucht. Aus den experimentell bestimmten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen werden die halbmaximalen Inhibierungen der Zellproliferation bzw. der Differenzierung als Endpunkte der Tests graphisch ermittelt. Spielmann *et al.* (1997) fanden, dass alle drei Endpunkte berücksichtigt werden müssen, um die Embryotoxizität einer größeren Anzahl von Chemikalien miteinander vergleichen und richtig einzustufen zu können; nach Heuer *et al.* (1994a, b) und Laschinski *et al.* (1991)

reichen zwei Endpunkte alleine dazu nicht aus. Deshalb wurde für eine Einstufung der Embryotoxizität ein biostatistisches Prädiktionsmodell entwickelt, in das alle drei Endpunkte einfließen. Mit diesem Modell können die Testsubstanzen in drei Embryotoxizitätsklassen eingestuft werden: Klasse 1 = nicht embryotoxisch, Klasse 2 = schwach embryotoxisch, Klasse 3 = stark embryotoxisch. Für die Entwicklung des Prädiktionsmodells wurden 16 Chemikalien ausgewählt, deren Embryotoxizität *in vivo* gut charakterisiert ist (Smith *et al.* 1983), und im EST untersucht. Die Ergebnisse wurden verwendet, um mit Hilfe der linearen Diskriminanzanalyse in einem iterativen Berechnungsprozess das Prädiktionsmodell so auszulegen, dass für alle 16 Testsubstanzen die beste Vorhersagegenauigkeit erreicht wird. Für die Validierungsstudie des EST (Genschow *et al.* 2004) wurde das Prädiktionsmodell modifiziert (Genschow *et al.* 2000; Scholz *et al.* 1999a, b) und in der neuen Form in der vorliegenden Arbeit verwendet (Tab. 13).

2.2.4 Validierung, Anwendungsmöglichkeiten und Optimierung der *in vitro* Embryotoxizitätstests

Die drei *in vitro*-Embryotoxizitätstests (*Micromass-Test*, WEC, EST) wurden im Rahmen einer Multicenter-Studie mit 20 Testsubstanzen wissenschaftlich validiert (Genschow *et al.* 2004; Piersma *et al.* 2004; Spielmann *et al.* 2004). Da die Tests metabolisch nicht aktiv sind, wurden bei der Auswahl der Substanzen für die Validierungsstudie solche ausgeschlossen, die eine Aktivierung benötigen (Brown 2002). Die Tests erwiesen sich als geeignet, das unterschiedliche embryotoxische Potenzial von Chemikalien verschiedener Gruppen zu erkennen (nicht embryotoxisch bzw. schwach oder stark embryotoxisch). Die Übereinstimmung der *in vitro*- mit den *in vivo*-Daten ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Der EST und der WEC-Test wiesen in der Studie für alle Chemikalien eine gute Vorhersagegenauigkeit von 78% bzw. 79% auf, und alle drei Tests besaßen mit 100% eine exzellente Prädiktivität für stark embryotoxische Substanzen. Bei den restlichen Parametern schnitten der EST und der WEC-Test ähnlich gut ab, der *Micromass-Test* dagegen deutlich schlechter. Allen drei Tests wurde daher bestätigt, dass sie wissenschaftlich validiert sind, und dass sie von den Behörden als Alternativmethode berücksichtigt werden können (ESAC 2002). Die Empfehlung für den *Micromass-Test* wurde jedoch auf die Detektion stark embryotoxischer Substanzen beschränkt.

In einem ECVAM-Workshop, welcher nach den Validierungsstudien stattfand, wurden Anwendungsmöglichkeiten und Beschränkungen der validierten *in vitro* Embryotoxizitätstests diskutiert (Spielmann *et al.* 2006). Dabei wurde festgehalten, dass eine Reihe von Aspekten beim EST optimiert werden sollten: es sollten weitere Protokolle entwickelt werden, die eine

Tab. 3: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Klassifizierung von Testsubstanzen aus der Validierungssstudie von drei *in vitro*-Embryotoxizitätstests (Genschow *et al.* 2002; bereinigte Daten). Die Bewertung der prozentualen Anteile wurde laut Genschow nach folgendem Schema vorgenommen: 33% = zufällig; < 65% = mangelhaft; ≥ 65% = ausreichend; ≥ 75% = gut; ≥ 85% = exzellent.

	EST	MM	WEC[a]
Prädiktivität für nicht embryotoxische Substanzen (%)	72	57	70
Prädiktivität für schwach embryotoxische Substanzen (%)	73	71	73
Prädiktivität für stark embryotoxische Substanzen (%)	100	100	100
Präzision für nicht embryotoxische Substanzen (%)	76	80	80
Präzision für schwach embryotoxische Substanzen (%)	81	60	61
Präzision für stark embryotoxische Substanzen (%)	79	68	100
Genauigkeit insgesamt (%)	78	69	79

Präzision = Anteil der Chemikalien, deren *in vivo*-Embryotoxizitätsklasse vom *in vitro*-Test korrekt ermittelt wurde. Prädiktivität = Wahrscheinlichkeit, dass die Einstufung des *in vitro*-Tests für eine bestimmte Embryotoxizitätsklasse richtig ist. Genauigkeit = Gesamtanteil der richtig klassifizierten Chemikalien. EST = Embryonaler Stammzelltest; MM = Micromass-Test; WEC = Kultur ganzer Embryonen. [a]mit Prädiktionsmodell 2.

Differenzierung in andere Zellarten ermöglichen; die Datenbasis sollte mit zusätzlichen Testsubstanzen vergrößert werden; es sollten molekulare Marker entwickelt werden, damit der EST als *Screening*-Methode für einen hohen Probendurchsatz eingesetzt werden kann; und es sollte ein metabolisch aktives System in den Test integriert werden, damit der EST auch das teratogene Potenzial von Substanzen erkennen kann, die bioaktiviert werden müssen. Die Entwicklung zusätzlicher Differenzierungsprotokolle, molekularer Marker, und die Erweiterung der Datenbasis wurden seitdem von einer Reihe von Arbeitsgruppen bearbeitet (Buesen *et al.* 2004; Festag *et al.* 2007a, b; Seiler *et al.* 2002, 2004, 2006; zur Nieden *et al.* 2004). Die Integration eines metabolischen Aktivierungssystems in den EST ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Im folgenden werden daher Biotransformationssysteme vorgestellt und unter dem Gesichtspunkt betrachtet, ob sie sich in den EST integrieren lassen.

2.3 In vitro *Systeme zur Biotransformation von Substanzen*

Viele Arzneimittel, Chemikalien oder Umweltschadstoffe (Xenobiotika), die Embryonen oder Föten schädigen, üben ihre Wirkung indirekt über ihre Stoffwechselprodukte oder Metaboliten aus. In diesen Fällen ist die Muttersubstanz, die dann als Proteratogen bezeichnet wird, relativ untoxisch, kann aber *in vivo* zu reaktiven und dadurch hochtoxischen Zwischenprodukten metabolisiert werden. Erfolgt keine sofortige Detoxifizierung, können diese Intermediate - in der Regel Elektrophile oder Radikale - irreversibel mit zellulären Makromolekülen wie DNA, Proteine oder Lipide reagieren und bei unzureichenden intrazellulären Reparaturmechanismen zu

Entwicklungsstörungen führen, die schließlich in embryonalen Missbildungen oder Tod der Frucht *in utero* münden (Brown *et al.* 1986; Wells und Winn 1996). Für die Transformation der Muttersubstanzen ist das System des Fremdstoffmetabolismus verantwortlich, das den Organismus in die Lage versetzt, schlecht ausscheidbare lipophile Fremdstoffe in gut und rasch ausscheidbare hydrophile Stoffe umzuwandeln. Bei diesem Vorgang werden die Fremdstoffe in der Regel detoxifiziert, können aber auch toxifiziert werden (Oesch 1994).

Das Stoffwechselgeschehen des Fremdstoffmetabolismus wird meist in zwei Phasen I und II eingeteilt. In Phase I werden bei den Fremdstoffen funktionelle Gruppen durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse eingeführt oder freigesetzt (Funktionalisierungsreaktionen) und die apolaren, lipophilen Fremdstoffe in polare, hydrophile Stoffe umgewandelt. Dadurch wird es in einem zweiten Schritt konjugierenden Phase-II-Enzymen ermöglicht, große und sehr hydrophile, endogene Moleküle mit dem funktionalisierten Fremstoff zu konjugieren (Konjugationsreaktionen) und so leicht ausscheidbar zu machen. Typische Konjugationsreaktionen sind Glucuronidierung, Sulfatierung oder Glutathionkonjugation. Obwohl viele verschiedene Organe wie Niere, Haut, Lunge oder Gastrointestinaltrakt in der Lage sind, Xenobiotika umzusetzen, findet der größte Teil der fremdstoffmetabolisierenden Prozesse in der Leber statt (Guillouzo 1998). Deshalb basieren alle bislang entwickelten Metabolisierungssysteme auf diesem Organ, wobei die Modelle von der isolierten ganzen Leber über isolierte Hepatozyten bis hin zu subzellulären Fraktionen reichen. In Tabelle 4 sind die verschiedenen in der Literatur beschriebenen Modellsysteme mit ihren Vor- und Nachteilen zusammengefasst (Coecke *et al.* 2006; Ekins 2000; Guillouzo 1998).

Im folgenden werden die Modellsysteme näher beschrieben, die sich prinzipiell für die Integration in den EST eignen. Diese sind primäre Hepatozyten, Hepatomazellen, transgene Zelllinien und subzelluläre Fraktionen. Die isoliert perfundierte Leber sowie Leberschnitte können aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer im EST nicht eingesetzt werden.

Tab. 4: Vorteile und Nachteile verschiedener *in vitro* Metabolisierungssysteme.

Modellsystem	Vorteile	Nachteile	Metab. Komp.
Isoliert perfundierte Leber	Enzymaktivitäten und Funktionen wie im *in vivo*-Organ; Lobuläre Struktur erhalten	Kurze Lebensdauer (2 - 3 h); Untersuchung nur weniger Stoffe; kein humanes Material.	
Leberschnitte	Lobuläre Struktur und Enzymaktivität erhalten; Studien an Humanleber möglich	Kurze Lebendsdauer (6 - 48 h); hohe Variabilität zwischen einzelnen Schnitten	
Primäre Hepatozyten	Definierte Enzymaktiväten unter bestimmten Bedingungen für mehrere Tage erhalten; Induktion und Inhibition von metabolisierenden Enzymen möglich; Humanmaterial verfügbar	Frühzeitige Veränderung des Phänotyps	
Permanente Leberzelllinien	Unbegrenzte Verfügbarkeit; definierte Enzymaktivität erhalten; humane Zellen verfügbar	Genotyp ist instabil; verschiedene Enzymaktivitäten verringert oder nicht vorhanden	
Transgene Zellen	Unbegrenzte Verfügbarkeit; definierte Enzymaktivität durch Transfektion mit humanen CYPs	Keine physiologischen Enzymspiegel; nur für spezielle Fragestellungen geeignet	
Subzelluläre Fraktionen (S9 Mix; Mikrosomen)	Unbegrenzte Verfügbarkeit; Enzymaktivität erhalten; zytosolische Fraktion kann zugesetzt werden; humanes Material verfügbar	Nur kurzzeitiger Einsatz möglich; Kofaktoren für Aktivität erforderlich; keine zytosolischen Phase II-Enzyme (Mikrosomen); intrinsische Zytotoxizität	

Metab. Komp. = Metabolische Kompetenz

2.3.1 Primäre Hepatozyten

Die Anwendung von primären Hepatozyten ist in der Forschung heutzutage sehr weit verbreitet. Ihr Vorteil liegt in ihrer Enzymausstattung, die der Situation *in vivo* sehr nahe kommt, und deren Aktivität pro Gramm Lebergewicht 3- bis 4-fach höher liegt als die von Mikrosomenpräparaten. Unter geeigneten Kultivierungsbedingungen können sie auch für Langzeitstudien und Toxizitätsprüfungen eingesetzt werden (Coecke *et al.* 1999). Der Einsatz von humanen Primärzellen ist möglich, aber problematisch, weil ihre Verfügbarkeit vom Vorkommen von Bioptaten oder der Entfernung von Tumorgeweben abhängt und die Gewebequalität aufgrund interindividueller und funktionaler Variationen sowie genetischer Disposition des Spenders schwanken kann (Guillouzo 1997). Deshalb werden in der pharmazeutischen Industrie meistens Hepatozyten von Labornagern eingesetzt (Blaauboer *et al.* 1994; Nussler *et al.* 2001; Rogiers und Vercruysse 1993; Schleger *et al.* 2001). Diese Zellen werden *ex vivo* häufig auf Basis der zweistufigen Kollagenase-Perfusionsmethode gewonnen (Seglen 1976; Klaunig *et al.* 1981). Die

Enzymaktivität der frisch isolierten Zellen sinkt unter klassischen Kultivierungsbedingungen in Zellkulturschalen im Monolayer innerhalb der ersten drei Tage auf 25-60% der Ausgangswerte (McMillan *et al.* 1991; Niemann *et al.* 1991; Schuetz *et al.* 1988). Durch Kulturmedien, die mit spezifischen Hormonen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Aminosäuren angereichert wurden, oder mit aufwändigeren Kultivierungstechniken wie der Kultur im Kollagen-Sandwich oder in Immobilisationskulturen im Kollagen-Gel, kann die metabolische Aktivität der Hepatozyten verlängert und bis zu 2-3 Wochen aufrecht erhalten werden (Coecke *et al.* 1999; LeCluyse *et al.* 1996). Tuschl *et al.* (2007) konnten zeigen, wie sich in einem serumfreien Medium bei Rattenhepatozyten auch nach neun Tagen Kulturdauer noch nahezu unverändert wichtige Phase-I-Enzyme (CYP 1A, 2B, 2C, 3A) induzieren ließen. Auch Schmuck (2001) gelang eine stabile Kultivierung primärer Rattenhepatozyten in Sandwichkultur über einen Zeitraum von sieben Tagen. Eine weitere Möglichkeit, die Enzymaktivität über mehr als eine Woche zu erhalten, besteht in der Kokultur der Hepatozyten mit RLEC-Zellen (*rat liver epithelial cells*), sinusoidalen Epithelzellen oder etablierten fibroblastischen, epithelialen oder mesenchymalen Zelllinien (Coecke *et al.* 1999).

2.3.2 Permanente Leberzelllinien

Leberzelllinien besitzen einige Eigenschaften, die für den Einsatz in einem *in vitro*-Embryotoxizitätstest von großem Vorteil sind. Die Zellpopulationen sind relativ homogen, besitzen in Kultur einen stabilen Phänotyp und sind dadurch leicht zu standardisieren. Ihre Lebensdauer ist unbegrenzt, sodass sie gut zwischen verschiedenen Laboratorien ausgetauscht und verglichen werden können (Gómez-Lechón *et al.* 2001). Sie sind ständig verfügbar und können z.B. von der American Type Cell Collection (ATCC) oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) kostengünstig bezogen werden. In diesen Zellen wird jedoch oft nicht das volle Spektrum der metabolisierenden Enzyme exprimiert, was sich in der generell niedrigen Aktivität der Phase I und II - Enzyme widerspiegelt (Guillouzo 1998).

2.3.2.1 HepG2

Die HepG2-Zellen wurden 1975 von Aden *et al.* (1979) aus dem Hepatokarzinom eines 15-jährigen argentinischen Jungen isoliert und sind die am häufigsten eingesetzten und besten charakterisierten humanen Hepatomazellen (Fardel *et al.* 1992; Rueff *et al.* 1996; Urani *et al.* 1998; Walle *et al.* 2000). Diese Zelllinie besitzt unter Standardbedingungen etwa 10-20% der gesamten CYP-Aktivität im Vergleich zu frisch isolierten Hepatozyten (Doostdar *et al.* 1988), und Phase I-Enzyme (z.B. CYP1A, 2B, 2C, 3A) konnten in geringer Aktivität nachgewiesen werden (Fardel

et al. 1992; Rueff *et al.* 1996). In der Wachstumsphase nach 24 h Kultur sind die EROD- und BROD- sowie CYP 2E1-Aktivitäten der Zellen direkt mit der Aktivität humaner Hepatozyten vergleichbar (Alexandre *et al.* 1999). Auch Phase II-Enzyme (z.B. Sulfotransferase, N-Acetyltransferase und Epoxidhydrolase) konnten in geringer Aktivität nachgewiesen werden (Fardel *et al.* 1992; Rueff *et al.* 1996), und die Aktivitäten der Glutathion-S-Transferase und der UDP-Glucuronosyltransferase sind mit denen in frisch isolierten Hepatozyten vergleichbar (Doostdar *et al.* 1988; Grant *et al.* 1988). Verschiedene Phase I- und II-Enzyme sind durch Substanzen wie Methylcholanthren, Benzo[a]anthracen, Dexamethason, Rifampicin und Phenobarbital induzierbar, wodurch die Enzymaktivität deutlich erhöht werden kann (Duthie *et al.* 1988; Fardel *et al.* 1992; Grant *et al.* 1988; Labruzzo *et al.* 1989). Insgesamt wurde ihre Kapazität zur Bioaktivierung bzw. Detoxifizierung von Substanzen als durchschnittlich (Medium) eingestuft (Coecke *et al.* 2006).

2.3.2.2 H4IIE

Die H4IIE-Zelllinie wurde von Pitot *et al.* (1964) beschrieben und stammt von Reuber H35 Ratten-Hepatomazellen (Reuber 1961). Verschiedene Phase I-Enzyme (CYP1A1, 1A2, 2B1/2, 2C6) lassen sich durch TCDD, Benzo[a]pyren, Methylcholanthren, Phenobarbital oder Dexamethason induzieren (Corcos und Weiss 1988; Houser *et al.* 1992; Xu und Bresnik 1990). Auch Enzyme der Phase II (Sulfotransferase, UDP-Glucuronosyltransferase, GSH Transferase) wurden nachgewiesen und waren durch Benzo[a]pyren oder Methylcholanthren induzierbar (Hornhardt und Wiebel 1996; Malik *et al.* 1979; Summer und Wiebel 1981; Wiebel *et al.* 1980).

2.3.2.3 Hepa-1

Von Bernhard *et al.* (1973) wurde die Leberzellinie Hepa-1 aus der Maus isoliert und seitdem häufig eingesetzt. Sie verfügt über eine reduzierte Aktivität der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme wie Glutathion-S-Transferasen, UDP-Glucuronosyltransferasen und der Cytochrom P450-Familie, die sich durch verschiedene Substanzen wie Phenobarbital, Methylcholanthren oder TCDD induzieren lassen (Lewis *et al.* 1989; Jaiswal *et al.* 1985; Pottenger und Jefcoate 1990).

2.3.2.4 HepaRG

Eine weitere humane Leberzellinie mit guten Enzymaktivitäten wurde von Gripon *et al.* (2002) aus dem Hepatokarzinom einer weiblichen Patientin gewonnen. Aninat *et al.* (2006) charakterisierten die Zellen und fanden viele fremdstoffmetabolisierenden Enzyme exprimiert (Phase I: CYP1A2, 2C9, 2D6, 2E1, 3A4; Phase II: UGT1A1, GSTA1, GSTA4, GSTM1). Die Aktivität wichtiger Phase I-Enzyme (CYP1A1/2, 2C9, 2E1, 3A4) war hoch und ließ sich mit

Methylcholanthren, Rifampicin oder Isoniazid induzieren. Die Zelllinie ist patentrechtlich geschützt und wird von der Firma Biopredic International, Rennes, Frankreich, vertrieben.

2.3.3 Lebermikrosomen

Lebermikrosomen gehören zu den am meisten verwendeten *in vitro*-Metabolismussystemen, weil ihre Anwendung vergleichweise einfach ist und sie bei günstigen Kosten unbegrenzt verfügbar sind (Coecke *et al.* 2006; Ekins *et al.* 2000). Lebermikrosomen werden durch differenzielle Zentrifugation aus Hepatozyten gewonnen und bestehen aus Vesikeln des endoplasmatischen Reticulums (Pelkonen *et al.* 1974). Deshalb enthalten sie fast ausschließlich CYP und UGT-Enzyme. Um die Aktivität der Enzyme sicherzustellen muss zu der Lösung NADPH für die CYPs und UDPGA / Alamethicin für UGT als Energiequelle zugesetzt werden. Bei kommerziell erhältlichen Mikrosomen ist die Enzymaktivität vom Hersteller bereits charakterisiert, und sie sind von verschiedenen Spezies erhältlich (z.B. Mensch, Maus, Ratte, Affe). Neben den bereits erwähnten Vorteilen (Kosten, Einfachheit, Charakterisierung) müssen bei ihrer Verwendung auch einige Nachteile berücksichtigt werden. Lebermikrosomen können nicht zur quantitativen Bestimmung einer *in vivo* Biotransformation verwendet werden, da ihre CYPs und UGTs angereichert sind und keine Konkurrenz zu anderen Enzymen besteht. Das führt zu artifiziell erhöhten Biotransformationsraten. Da das System kein Zytosol besitzt, fehlen ihm die im Zytosol gelösten Phase II-Enzyme (Acetyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen, Sulfotransferasen) sowie zytosolische Kofaktoren. Schließlich lassen sich mit ihm nur Kurzzeittests durchführen, da die Enzyme nur für wenige Stunden funktional bleiben (Brandon *et al.* 2003).

2.3.4 S9-Mix

Die S9 Fraktion eines Leberhomogenats beinhaltet sowohl den mikrosomalen wie auch den zytosolischen Anteil und gibt damit das vollständige metabolische Profil einer Leber mit Phase I- und II-Enzymen wieder (Brandon *et al.* 2003; Ekins *et al.* 2000; Guillouzo 1998). Wie bei den Mikrosomen muss ein NADPH-Regenerationssystem oder NADPH zugesetzt werden, um den Energiebedarf der CYPs zu decken. Die Phase II-Enzyme benötigen außerdem zusätzliche exogene Kofaktoren. Dem vollständigeren Enzymprofil der S9-Fraktion steht jedoch im Vergleich zu Mikrosomen eine niedrigere Enzymaktivität gegenüber. Weiterhin hat sich in *in vitro*-Tests gezeigt, dass der S9-Mix eine intrinsische Embryotoxizität besitzt (Ozolins *et al.* 1995). Außerdem besitzt diese Fraktion nur eine Lebensdauer von wenigen Stunden.

2.3.5 Transgene Zellen

Für Toxizitätsprüfungen wurden aus Säugerzelllinien wie V79, NIH-3T3 oder HepG2 verschiedene transgene Zelllinien erzeugt, die ein oder mehrere Enzyme der Phase I oder II oder eine Kombination davon exprimieren, insbesondere CYP450-Isoformen (Bernauer *et al.* 2003; Yoshimoti *et al.* 2001). Die Zelllinien besitzen oft einen stabilen diploiden Kariotyp und keine CYP-Hintergrundaktivität und können für spezifische mechanistische Fragestellungen eingesetzt werden. Da sie jedoch kein vollständiges Fremdstoffmetabolismus-Enzymprofil besitzen und ihre Enzymaktivität gering sein kann, müssen die Ergebnisse differenziert interpretiert werden (Coecke *et al.* 2006; Doehmer 2006).

2.3.6 Möglichkeiten der Integration eines Bioaktivierungssystems in den EST

Es existieren mehrere Möglichkeiten, ein Bioaktivierungssystem an den EST zu koppeln. Zum einen kann ein Kulturmedium präkonditioniert bzw. präinkubiert werden, bevor es im EST eingesetzt wird. So können metabolisch aktive Zellen gegenüber dem Testmedium exponiert werden und Metaboliten generieren, oder es werden subzelluläre Fraktionen wie der S9-Mix oder Mikrosomen zur Bioaktivierung eingesetzt (Bremer *et al.* 2002; Coecke *et al.* 2006; Langsch *et al.* 2005). Mit dieser Methode können jedoch kurzlebige Metaboliten nicht erfasst werden, was als gravierender Nachteil angesehen wird (Coecke *et al.* 2006). Weiterhin ist es möglich, im Rahmen eines sogenannten Perfusionskultursystems zwei Kulturbehälter mit metabolisch aktiven Zellen und den Zielzellen über ein Schlauchsystem und Pumpen miteinander zu verbinden, sodass das Medium im Kreislauf geführt wird (Flick 2005). Der apparative Aufwand dieses Systems ist dabei jedoch relativ hoch. Alternativ zu diesen Verfahren kann auch eine Kokultur mit metabolisch aktiven Zellen und Zielzellen aufgebaut werden, indem Zellkultureinsätze in die Kulturplatten des EST eingesetzt werden. Zellkultureinsätze werden zur Herstellung einer Kokultur bei *in vitro*-Studien häufig verwendet (Hall *et al.* 1991; Murakami *et al.* 2004; van Poll *et al.* 2006). Mit einer solchen Kokultur kann die Exposition von Zielzellen gegenüber Metaboliten kontinuierlich erfolgen, sodass auch kurzlebige Metaboliten auf die Zielzellen wirken können.

2.4 *Modellsubstanzen für* in vitro-*Tests*

2.4.1 Auswahl von Substanzen

Entscheidend für den Aufbau und die Validierung von neuen *in vitro*-Testsystemen ist die Auswahl von Modellsubstanzen, denn die Qualität eines neuen Systems wird an den Ergebnissen mit diesen Substanzen gemessen. Besonders wichtig ist es dabei, dass eine Modellsubstanz in Bezug auf ihre teratogenen Eigenschaften anhand einer ausreichenden Zahl von *in vivo*-Studien mit mehreren Spezies gut charakterisiert ist.

Für entwicklungstoxikologische Prüfungen wurde 1983 von einem Expertengremium eine erste Liste von 47 Substanzen zusammengestellt und als "Smith-Liste" bekannt (Smith *et al.* 1983). Aufgrund weit reichender Kritik an dieser Liste entstand aus der Arbeit des "Schwetz-Kommittees" eine verbesserte Neuauflage (Schwetz 1992). Für die Validierungsstudien der ECVAM zur *in vitro* Embryotoxizitätsprüfung stellte Brown (2002) eine neue Liste von 309 Chemikalien zusammen, die auf den Arbeiten des Schwetz-Kommittees und weiteren Quellen aufbaute. Aus dieser Liste wurden 20 Modellsubstanzen ausgewählt und in drei Embryotoxizitätsklassen nach folgenden Kriterien eingestuft: Substanzen, die als stark embryotoxisch eingestuft wurden (Klasse 3), wiesen in allen getesteten Spezies multiple entwicklungstoxische Effekte auf und hatten einen großen *Adult/Developmental* (A/D)-Quotienten (nach einer Entwurfsliste von Brown ca. ≥2,5; die Berechnung und Signifikanz des A/D-Quotienten wird in Kapitel 3.9.6 näher erläutert). Nicht embryotoxische Substanzen (Klasse 1) zeigten keine entwicklungstoxischen Wirkungen bei maternal toxischen Expositionen, und als schwach embryotoxisch (Klasse 2) wurden alle Substanzen klassifiziert, die nicht den beiden anderen Kategorien zugeordnet werden konnten. Bei der Validierung des Prädiktionsmodells für den EST wurde überprüft, wie gut die Vorhersage des Prädiktionsmodells mit dieser *in vivo*-Einstufung korreliert.

Bei der Überprüfung eines *in vitro*-Systems mit metabolischer Komponente kommen weitere Kriterien hinzu, die eine Modellsubstanz erfüllen sollte: Die Muttersubstanz und wichtige Metaboliten sollten analytisch gut erfassbar sein, um die Metabolisierung der Muttersubstanz überprüfen zu können. Außerdem sollten die Stoffwechselwege in ihren Grundzügen bekannt sein, damit abgeschätzt werden kann, ob das metabolische System dazu in der Lage ist, die Muttersubstanz umzusetzen. Hilfreich ist es außerdem, wenn die Substanzen in anderen *in vitro*-Systemen getestet wurden, damit die Ergebnisse besser eingeschätzt werden können.

Für die vorliegende Arbeit wurden Substanzen ausgewählt, von denen aus der Literatur bekannt ist, dass sie eine metabolische Aktivierung benötigen, um teratogen zu wirken. Zusammen mit dem Proteratogen wurde der wichtigste teratogene Metabolit untersucht, um die Verände-

rung der embryotoxischen Wirkung des Proteratogens durch die Metabolisierung abschätzen und beide Substanzen miteinander vergleichen zu können. Als Proteratogen/Teratogen-Paare wurden Valpromid und Valproinsäure, Retinol und Retinsäure, Cyclophosphamid und 4-Hydroperoxy-cyclophosphamid, und Albendazol und Albendazol-Sulfoxid ausgewählt. In dem BMBF-Projekt, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, wurden Valpromid, Valproinsäure und die Retinoide als Standardsubstanzen verwendet und von dem Projektpartner TiHo analysiert. Cyclophosphamid wurde ebenfalls als Modellsubstanz für dieses Projekt eingesetzt, konnte jedoch analytisch nicht bestimmt werden. Die vier Proteratogene Valpromid, Retinol, Cyclophosphamid und Albendazol wurden außerdem vom Expertenteam des ReProTect Integrated Project der EU als Modellsubstanzen für die Erprobung eines EST mit integriertem Biotransformationssystem empfohlen (Daston *et al.* 2005). Im folgenden werden die ausgewählten Substanzpaare genauer charakterisiert.

2.4.2 Valpromid und Valproinsäure

Valpromid (2,2-Di-n-propylacetamid; VPD) ist ein primäres Amid der Valproinsäure (2-n-Propyl-Pentansäure; VPA) und wird als inaktive Vorstufe (*Prodrug*) der Valproinsäure verwendet. In der Humanmedizin werden beide Substanzen als Antiepileptika und Antikonvulsiva eingesetzt, wobei Valpromid 2- bis 5-fach wirksamer ist als Valproinsäure (Bialer 1991). Valproinsäure wird aufgrund seiner hemmenden Wirkung auf Histondeacetylasen (HDAC) zur Zeit auch klinisch auf ihre Eignung als Krebstherapeutikum geprüft (Billig *et al.* 1990; Lagace *et al.* 2004; Atmaca *et al.* 2007). Bei Raumtemperatur ist Valpromid ein weißes und kristallines Puder, während Valproinsäure flüssig ist.

Die Stoffwechselwege von Valpromid und Valproinsäure sind komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. In einem ersten Schritte wird Valpromid zu Valproinsäure hydrolysiert, wobei die daran beteiligten Enzyme bislang unbekannt sind. Billig *et al.* (1990) vermuteten, dass parallel zur Hydrolyse das Valpromid auch oxidiert wird, und in einer *in silico* Studie zum Metabolismus von Valpromid (Ovanes Mekenyan, in Langsch 2007) wurde diese Vermutung bekräftigt: neben Valproinsäure wurden als Produkte einer ersten Reaktionsstufe noch zwei weitere Metabolite postuliert, die aus einer Oxidationsreaktion hervorgingen. Aus diesen beiden Metaboliten können nach Mekenyan in nachfolgenden Reaktionsschritten weitere 39 Metabolite entstehen. Für Valproinsäure wurde in dieser Studie ein einziges Valproinsäure-Glucuronid als Phase II-Metabolit genannt. Lagace *et al.* (2004) nennen für Valproinsäure noch 14 weitere Phase II-Metaboliten, die zu etwa 50% aus Konjugationsreaktionen hervorgehen; weitere 40% der Metaboliten treten in die β-Oxidationskette ein. Kiang *et al.* (2006) stellten fest, dass die an

der Valproinsäure-Metabolisierung beteiligten Enzyme artspezifisch sind und die Metabolisierungspfade unterschiedlich ausfallen. Während in humanen Lebermikrosomen Valproinsäure hauptsächlich durch CYP2C9, CYP2A6 und CYP2B6 zu 4-ene-Valproinsäure, 4-OH-VPA und 5-OH-VPA verstoffwechselt wird, transformiert in Ratten das CYP3A Valproinsäure vorwiegend zu 3-OH-VPA.

Neben der therapeutischen besitzt Valproinsäure auch eine teratogene Wirkung. Bei Mäusen konnten bei einfacher und mehrmaliger Valproinsäure-Gabe während der frühen Organogenese posteriore und anteriore Neuralrohrdefekte wie Exencephalie und Spina bifida zuverlässig reproduziert werden, was zur Entwicklung eines Mausmodells führte (Ehlers *et al.* 1992; Nau *et al.* 1981). Auch kardiovaskuläre Anomalien wurden bei Mäusen und Ratten festgestellt (Menegola *et al.* 1996; Sonoda *et al.* 1990, 1993; Binkerd *et al.* 1988). Im Menschen verursacht Valproinsäure bei Neugeborenen vielfältige leichte und schwere Fehlbildungen, darunter Veränderungen von Fazies, Dysfunktionen des zentralen Nervensystems, Neuralrohrdefekte (Spina bifida) sowie pulmonale und kardiovaskuläre Fehlbildungen (Alsdorf und Wyszynski 2005; ten Berg *et al.* 2005; Kozma 2001; Sodhi *et al.* 2001; Thisted und Ebbesen 1993).

Im Vergleich zu Valproinsäure besitzt Valpromid kein bzw. ein wesentlich geringeres teratogenes Potenzial. Nau und Löscher (1986) sowie Nau und Scott (1987) konnten in Studien mit Mäusen nach Valpromid-Gabe keine teratogene Wirkung feststellen, während Radatz *et al.* (1998) nach einmaliger Valpromid-Gabe eine Exencephalie-Rate bei NMRI-Mäusen von 6% fanden, bei der Gabe von Valproinsäure jedoch 53% erhielten.

Zum teratogenen Mechanismus der Valproinsäure wurden eine große Zahl verschiedener Möglichkeiten diskutiert. Der wahrscheinlich wichtigste Mechanismus beruht auf der Eigenschaft der Valproinsäure, Histondeacetylasen (HDACs) zu hemmen (Phiel *et al.* 2001; Göttlicher *et al.* 2001, 2002; Lagace *et al.* 2004; Eikel *et al.* 2006). Der zelluläre Kontrollmechanismus der Deacetylierung von Histonen hemmt die Expression von Genen, weshalb umgekehrt eine Hemmung von HDACs zu einer Aktivierung bestimmter Gene führt. Eine Störung dieser Prozesse, bei der vor allem die Apoptose und Differenzierung von Zellen gesteuert werden, kann zu Fehlentwicklungen bei der Embryogenese führen. Basierend auf diesem Mechanismus erklärten Phiel *et al.* (2001) auch die geringere Teratogenität des Valpromid gegenüber der Valproinsäure: Valpromid ist ein schlechter HDAC-Hemmer. Weitere teratogene Mechanismen der Valproinsäure, die auf einer Änderung der Genexpression beruhen, sollen durch PAX-3 oder HOX-Gene, oder durch die Hemmung von Polycomb Gruppengenen vermittelt werden (Volland 2002; Okada *et al.* 2004). Im Zusammenhang mit Valproinsäure-induzierter Teratogenität wurde auch die Aktivierung von Peroxisomen Proliferator-aktivierenden Rezeptoren (PPAR δ) beschrieben,

doch scheinen diese eher als molekulare Marker denn als molekularer Angriffspunkt eine Rolle zu spielen (Lagace *et al.* 2004; Eikel *et al.* 2006). Valproinsäure kann auch den embryonalen Stoffwechsel an Homocystein und Methionin, Folaten oder Zink beeinflussen, was ebenfalls mit Embryopathien kausal in Zusammenhang gebracht wurde (Volland 2002). Schließlich wurden von Na *et al.* (2003) ein Mechanismus beschrieben, bei dem Valproinsäure den intrazellulären Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies in murinen embryonalen Stammzellen erhöhte und dadurch deren Wachstum und Differenzierung hemmte.

Valproinsäure wurde in einer Reihe von *in vitro* Embryotoxizitätstests als Modellsubstanz eingesetzt, darunter in Kleinhirn-Zellkulturen der Maus zum Vergleich des teratogenen Potenzials verschiedener Valproat-Analoga (Maar *et al.* 1997) oder im WEC-Test zur Abschätzung des Effekts der Proteinbindung auf die Teratogenität (Lewandowski *et al.* 1986) bzw. zum Vergleich weiterer Valproin-Analoga bezüglich ihrer stereoselektiven Teratogenität (Andrews *et al.* 1995). In Säugetier-basierten *in vitro*-Tests wurde ein direkter Vergleich der Effekte von Valproinsäure und Valpromid bislang jedoch noch nicht vorgenommen. Lediglich Herrmann (1993) untersuchte *in vitro* Embryonen des Zebrafisches *Brachydanio Rerio* und stellte für Valproinsäure im Kulturmedium bei 144 µg/mL eine hohe Missbildungsrate fest, während sich bei 1432 µg/mL Valpromid keine Beeinträchtigung der Embryonalentwicklung ergab.

2.4.3 Retinol und all-*trans*-Retinsäure

All-*trans*-Retinol (Retinol, Vitamin A_1) und all-*trans*-Retinsäure (Retinsäure, Tretinoin) gehören zu den wichtigsten Vertretern der natürlich vorkommenden Retinoide und besitzen eine große physiologische Bedeutung. Die Begriffe Vitamin A und Retinoide sind dabei nicht genau voneinander abzugrenzen und werden oft synonym benutzt. Man kann sie als Abkömmlinge des primären Alkohols Retinol mit ähnlicher biologischer Aktivität verstehen (Blomhoff *et al.* 1992; Sporn und Roberts 1985). Im Organismus sind Retinoide an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt. Sie unterstützen das Wachstum, die Proliferation und Differenzierung von Epithelgewebe, und sind mit dem 11-*cis*-Retinaldehyd als lichtempfindlicher Komponente des Rhodopsin am Sehprozess beteiligt. Sie sind außerdem essentiell für die Spermatogenese, Oogenese sowie für die plazentare und embryonale Entwicklung (Clagett-Dame und DeLuca 2002), und sie unterstützen das Immunsystem (Sommer 1994). Retinoide werden auch als Medikamente eingesetzt, bei zahlreichen Hauterkrankungen (Hyperkeratinisierung, Hyperproliferation), insbesondere 13-*cis*-Retinsäure (Isotretinoin, Accutane®) gegen cystische Akne, und in der Krebsprävention und -therapie (Hong *et al.* 1990; Huang *et al.* 1988; Soprano und Soprano 1995).

Im Körper wird Retinol zunächst reversibel zu Retinaldehyd, und ein einem zweiten Schritt irreversibel zu Retinsäure oxidiert. Die Oxidation zum Aldehyd wird durch zytosolische Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) und membrangebundene Dehydrogenasen kurzkettiger Alkohole (*Short Chain Alcohol Dehydrogenas*e, SCAD) katalysiert (Duester 1996; Napoli 1996), wobei die ADH nur freies Retinol umsetzen können, während die SCAD an CRBP I (*Cellular retinol-binding protein*) gebundenes Retinol als Substrat bevorzugen. Der zweite Oxidationsschritt zur Retinsäure wird durch zytosolische, substratunspezifische, NAD^+-abhängige Aldehyd-Dehydrogenasen durchgeführt (Lee *et al.* 1991). An diesem Oxidationsschritt können auch die Cytochrom P450-Isoformen 1A2 und 3A6 beteiligt sein, wie Roberts *et al.* (1992) bei der Untersuchung von Lebermikrosomen von Kaninchen feststellten. Retinol und Retinsäure können jedoch auch auf vielfältige alternative Weise reagieren, sodass die zentrale zweistufige Oxidationsreaktion vom Retinol zur Retinsäure nur einen kleinen Ausschnitt des komplexen intrazellulären Metabolismus der Retinoide darstellt. So kann das Retinol auch nicht-zellulär zu 9-*cis*-Retinol oder 13-*cis*-Retinol isomerisiert, oder durch Cytochrom P450 2C8 zu all-*trans*-4-Hydroxyretinol hydroxyliert werden (Leo *et al.* 1989), oder es tritt direkt in den Phase II-Metabolismus ein und wird durch Glucuronidasen zu all-*trans*-Retinol-Glucuronid transformiert. Die Retinsäure kann ebenfalls verschiedene alternative Reaktionswege einschlagen. Dazu gehören die nicht-zelluläre Isomerisierung zu 9-*cis*-Retinsäure oder 13-*cis*-Retinsäure, die Phase-I-Hydroxylierung durch Cytochrom P450-Isomere 2C8, 3A4 oder 26 zu all-*trans*-4-hydroxy-Retinsäure bzw. 18-hydroxy- und 4-oxo-Retinsäure (White *et al.* 1997), oder eine Phase-II-Metabolisierung (β-Glucuronidierung) durch mikrosomale UDP-Glucuronyltransferase zum all-*trans*-Retinsäure-Glucuronid.

Teratogene Effekte treten sowohl bei einem Vitamin A-Mangel als auch bei einem Überschuss an Vitamin A auf. In Tierversuchen wurde bei zahlreichen Spezies Missbildungen durch erhöhte Retinoid-Expositionen festgestellt. Bei Ratte, Maus, Hamster Kaninchen, Hund, Schwein, Huhn und Rhesusaffen betrafen die Effekte u.a. das Nervensystem (Microcephalie, Spina bifida, Exencephalie), den Kopfbereich (Hypoplasie der Maxillare, Lippen- und Gaumenspalte), Ohren- und Augendefekte, Kardiovaskuläre Abnormalitäten und die Extremitäten wie Ectrodactylie oder Syndactylie (Cohlan 1953; Geelen 1979; Rosa *et al.* 1986). Dabei führte die Exposition während einer frühen Phase der Embryonalentwicklung eher zu kraniofaszialen, kardiovaskulären oder neuronalen Defekten, während eine spätere Exposition die Extremitäten, den Gaumen oder den Genitaltrakt betraf (Kistler 1981; Shenefelt 1972). Auch beim Menschen können hohe Vitamin A-Dosen Teratogenität auslösen. Die Ausprägungen sind dabei mit denen aus den Tierversuchen vergleichbar (Lammer *et al.* 1985; Soprano und Soprano 1995).

In weiteren Tierstudien wurde festgestellt, dass die Retinsäure in verschiedenen Spezies eine 20- bis 40-fach höhere teratogene Potenz als Vitamin A besitzt (Kochhar 1967; Soprano und Soprano 1995). Auch Rosa *et al.* (1986) ermittelten bei einem Vergleich von Retinol und Retinsäure, dass die niedrigsten Retinol-Dosen zur Erzeugung teratogener Effekte bei Ratte und Maus etwa 15-fach höher lagen als die von Retinsäure, fanden jedoch beim Kaninchen keine Unterschiede. Da man allgemein davon ausgeht, dass die teratogene Wirkung des Retinols durch seine Metabolisierung zu Retinsäure ausgelöst wird (Eckhoff *et al.* 1989; Kochhar *et al.* 1988), spiegeln diese Differenzen unter anderem die unterschiedliche Metabolisierungsleistung der jeweiligen Spezies wider. Andererseits fanden Collins *et al.* (1992), dass durch Inhibition der Alkohol-Dehydrogenase mit 4-Methylpyrazol in NMRI-Mäusen die teratogenen Effekte von Retinol nur teilweise reduziert werden konnten. Die Autoren schlossen daraus, dass Retinol eine intrinsische teratogene Potenz besitzen muss, oder dass neben Retinsäure noch andere, bisher nicht identifizierte teratogen aktive Metaboliten gebildet werden.

Sowohl die physiologische wie teratogene Wirkung der Retinoide wird durch Retinsäure bzw. 9-*cis*-Retinsäure über nukleäre Transkriptionsfaktoren vermittelt (Chambon 1993). Während Retinsäure nur an den Retinsäure-Rezeptor (*Retinoic Acid Receptor*, RAR) binden kann, bindet die 9-*cis*-Retinsäure sowohl an RAR wie auch an den Retinoid X-Rezeptor (*Retinoid X-Receptor*, RXR). Beide Rezeptoren müssen durch einen weiteren RXR aktiviert werden, bevor sie an bestimmte *Response*-Elemente der DNA in der Promotorregion von Zielgenen binden können. Das RAR/RXR-Heterodimer bindet dabei vorwiegend an das RARE-*Response*-Element, während das Homodimer RXR/RXR an das RXRE-*Response*-Element bindet. In Gegenwart der Retinoide können die entsprechenden Rezeptor-Ligand-Dimere die Transkription aktivieren, während eine DNA-Bindung der Rezeptoren in Abwesenheit der Liganden die Genexpression reprimiert (Levin *et al.* 1992; Elmazar *et al.* 1997; Ali-Khan und Hales 2006).

Die Retinoide wurden auch in vielen *in vitro* Embryotoxizitätstests untersucht, wobei sich der Beinknospen-*Micromass-Test* als besonders geeignet erwies, die unterschiedliche Teratogenität verschiedener Retinoide zu detektieren. Kistler (1987) untersuchte 25 Retinoide und fand für Retinoide mit einer Carboxylgruppe eine gute Korrelation zwischen den ermittelten IC_{50}-Werten und der niedrigsten teratogenen Dosis in parallelen Versuchen mit der Ratte. In einer weiteren Studie untersuchten Kochhar *et al.* (1988) Retinol und Retinsäure im *Micromass-Test* und stellten für Retinsäure eine 20-fach höhere teratogene Wirkung fest. Den Unterschied begründeten sie mit dem Fehlen einer metabolischen Aktivierung des Retinols. Auch im WEC-Test mit Rattenembryonen wurden Retinol und Retinsäure getestet (Morriss und Steele 1977), wobei auch dort Retinsäure die größere teratogene Wirkung hatte und das Wachstum stärker hemmte als Retinol.

2.4.4 Cyclophosphamid und 4-Hydroperoxycyclophosphamid

Cyclophosphamid (CPP; N,N-Bis(2-chorethyl)-1,3,2-oxazaphosphinan-2-amin-2-oxid) ist ein antineoplastisches Chemotherapeutikum und gehört zur Gruppe der Stickstoff-Lost-Verbindungen. Bei Raumtemperatur ist es ein weißes kristallines Pulver und gut wasserlöslich (40 g/L). Das 4-Hydroperoxycyclophosphamid (4HC) wird als Vorläufer der Metaboliten von Cyclophosphamid eingesetzt, wenn kein bioaktivierendes System vorliegt. 4HC ist bei Raumtemperatur kristallin und stabil, wird jedoch rasch zu 4-Hydroxycyclophosphamid (4-OH-CPP) konvertiert, sobald es in wässrige Lösung gelangt. Diese Verbindung entsteht auch, wenn Cyclophosphamid enzymatisch bioaktiviert wird (Ludeman 1999).

In der Krebstherapie wird Cyclophosphamid als *Prodrug* eingesetzt. Daher geht die therapeutische Wirkung von den Metaboliten des Cyclophosphamid aus, die in einer mehrstufigen Reaktionskaskade gebildet werden. Nur der erste Schritt der Reaktionskaskade wird dabei durch Enzyme katalysiert, die weiteren Schritte verlaufen spontan. Zunächst wird das Cyclophosphamid durch hepatische Enzyme des Cytochrom-P450-Systems zu 4-Hydroxycyclophosphamid (4-OH-CPP) oxidiert (vgl. mit 4HC weiter oben). Die größte Rolle spielen dabei CYP2B, CYP2C und CYP3A Enzyme (Roy *et al.* 1999; Griskevicius *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005), aber auch Peroxidasen (Kanekal und Kehrer 1993) wurden mit der Aktivierung von Cyclophosphamid in Verbindung gebracht. Das 4-OH-CPP reagiert dann weiter durch eine reversible Öffnung des Kohlenstoffrings zu dem Tautomer Aldophosphamid, welches irreversibel zu Acrolein und Phosphoramid Mustard fragmentiert. Dieser reagiert unter Hydrolyse seiner P-N Bindung weiter zu Chlorethylaziridin. Das Phosphoramid Mustard ist ein bifunktionales Alkylans und induziert DNA-Strang-Vernetzungen (*cross-links*), indem es die Desoxyguanosin-Reste komplementärer DNA-Stränge an der N7-Position alkyliert (Ludeman 1999; Bailey *et al.* 2005). Die Bisalkylation verhindert die Replikation der DNA und induziert den Zelltod, woraus sich sowohl der therapeutische Effekt als auch die mutagene und teratogene Wirkung des Phosphoramid Mustard ableiten lassen. In Bezug auf die therapeutische und teratogene Wirkung kommt dem Phosphoramid Mustard im Vergleich zu den anderen Metaboliten des Cyclophosphamid die größte Bedeutung zu (Desmeules und Devine 2006). Das aus der Spaltung von Aldophosphamid ebenfalls entstehende Acrolein ist leicht flüchtig. Man nimmt an, dass es bei der Cyclophosphamid-Chemotherapie für Nebenwirkungen wie der Zystitis verantwortlich ist (Bailey *et al.* 2005), und es wirkt ebenfalls teratogen (Hales 1982; Stahlmann *et al.* 1985). Das Chlorethylaziridin ist leicht flüchtig, wirkt auch bisalkylierend und dadurch zytotoxisch. Sein Beitrag zu den durch Phosphoramid Mustard induzierten Effekten wird diskutiert (Ludeman 1999).

Die proteratogene Wirkung von Cyclophosphamid ist in der Literatur gut dokumentiert. Cyclophosphamid alleine weist dabei nur wenig biologische Aktivität auf (Spielmann und Jacob-

Müller 1981; Hales und Jain 1986). Die Metaboliten des Cyclophosphamid führten in allen Studien, die mit Säugetieren durchgeführt wurden (Ratte, Maus, Kaninchen, Primaten), zu vielfältigen Mißbildungen des Kopfes und der Gehirnregion wie Gaumenspalten, Exencephalie, Mikrocephalie, Hydrocephalie; der Wirbelsäule und des Skeletts, sowie der vorderen und hinteren Extremitäten wie Syndactylie, Polydactylie, Plantarflexionen oder Knickschwanz (Hackenberger und Kreybig 1965; Gibson und Becker 1968; Gebhardt 1970; Fritz und Hess 1971; Hendrickx *et al.* 1991). Außerdem wurde von Mißbildungen des Herzens bei Langschwanzaffen (*Macaca fascicularis*) und Hühnern berichtet (Novotna und Jelinek 1990; Hendrickx *et al.* 1991). Auch beim Menschen führte die Therapie mit Cyclophosphamid zu Embryopathien wie Gaumenspalten, Mißbildung der Extremitäten, Wachstumsretardierungen, Anomalien bei Ohren und Augen, sowie Defekte des ZNS (Kirshon *et al.* 1988; Mutchinik *et al.* 1992; Enns *et al.* 1999).

In einer Vielzahl von *in vitro*-Tests wurden Cyclophosphamid bzw. 4HC und seine Metaboliten als Modellsubstanz erfolgreich eingesetzt. Die Aktivierung des Cyclophosphamid erfolgte dabei auf unterschiedliche Weise. In Genotoxizitätstests wie dem Schwesterchromatidaustausch-Assay (SCE-Assay) wurde Cyclophosphamid durch HepG2- bzw. H4IIE-Zellen aktiviert. In diesen Tests waren die Zellen sowohl Metabolisierer als auch Zielzellen (Green *et al.* 1982; Dearfield *et al.* 1983, 1986; Chang *et al.* 1988). Im *Micromass-Test* führten sowohl 4HC als auch Phosphoramid Mustard und Acrolein zu Mißbildungen der vorderen und hinteren Extremitäten (Hales und Jain 1986; Hales 1989). Cyclophosphamid selbst konnte in diesem Assay durch ein rekonstituiertes Cytochrom P450-System aktiviert werden (Kastner *et al.* 1988). *In vitro* kultivierte Rattenembryonen (WEC-Test) wurden ebenfalls mit Cyclophosphamid getestet. Dabei wies Cyclophosphamid ohne Aktivierung nur eine geringe biologische Aktivität auf, in Rattenserum enthaltenes aktiviertes Cyclophosphamid wirkte dagegen teratogen (Klein *et al.* 1980). Mit einer Hepatozyten-Kokultur konnte Cyclophosphamid im WEC-Test ebenfalls aktiviert werden und führte zu Missbildungen bei Embryonen von Ratte und Maus (Oglesby 1986; Ozolins 1995). Schließlich wurde der Nachweis des embryotoxischen Potenzials von Cyclophosphamid auch mit gentechnisch veränderten murinen embryonalen Stammzellen geführt, die GFP (*Green Fluorescent Protein*) exprimieren, sobald sie zu Kardiomyozyten differenziert sind (Bremer *et al.* 2002). Das Cyclophosphamid wurde hier in einer separaten Zellkultur durch V79-Zellen aktiviert, die mit CYP2B1 cDNA transfiziert waren, und dessen Mediumüberstand nach 24 h Exposition den Stammzellen zugeführt wurde.

2.4.5 Albendazol und Albendazol-Sulfoxid

Albendazol, (Methyl-5-(propylthio)-1H-benzimidazol-2-yl carbamat; ABZ) und Albendazol-Sulfoxid, (Methyl-5-(propylsulfonyl)-1H-benzimidazol-2-yl carbamat) gehören zur Klasse der Benzimidazole und werden als Breitband-Antihelminticum zur Behandlung von Nematoden, Cestoden und Trematoden in der Veterinär- und Humanmedizin eingesetzt (Cristofol *et al.* 1997; Teruel *et al.* 2003). Beide Verbindungen sind bei Raumtemperatur kristallin und in DMSO löslich.

In vivo wird Albendazol schnell und reversibel durch mikrosomale Cytochrome P-450 und Flavin-haltige Monooxygenasen (FMO) zu Albendazol-Sulfoxid oxidiert. Da Albendazol-Sulfoxid ein chirales Zentrum besitzt, entstehen die zwei Enantiomere (+)-Albendazol-Sulfoxid und (-)-Albendazol-Sulfoxid. Das (+)-Albendazol-Sulfoxid entsteht wahrscheinlich durch die FMO-Aktivität, das (-)-Albendazol-Sulfoxid hingegen durch die CYP450-Aktivität (Velik *et al.* 2005). Beide Enantiomere werden dann in einem weiteren irreversiblen Oxidationsschritt durch Cytochrom P-450 zum relativ inaktiven und untoxischen Albendazol-Sulfon umgesetzt.

Die therapeutische Wirkung von Albendazol und Albendazol-Sulfoxid beruht auf ihrer selektiven Affinität für die Mikrotubuli intestinaler Zellen von Parasiten wie Nematoden, wo sie an das zelluläre Tubulin binden, seine Polymerisation und damit die Ausbildung des Spindelapparates behindern und so den Ablauf der Mitose beeinträchtigen oder verhindern (Capece *et al.* 2003; Navarro *et al.* 1999; Piscopo *et al.* 1997). Dieser Mechanismus wurde auch mit den embryotoxischen Effekten in Verbindung gebracht (Whittaker und Faustman 1991), welche in Schafen, Rindern und Ratten nachgewiesen wurden (Cristofol *et al.* 1997; Delatour *et al.* 1981; Mantovani *et al.* 1995; Navarro *et al.* 1999; Teruel *et al.* 2003). Delatour *et al.* (1981, 1984) stellten in Versuchen mit Ratten fest, dass die teratogene Wirkung dabei hauptsächlich auf das Albendazol-Sulfoxid zurückzuführen ist, welches durch die Oxidation von Albendazol entsteht. Verabreichten sie Albendazol zusammen mit Proadifen (SKF-52A), einem Inhibitor mikrosomaler Oxidation, konnte in den Versuchen fast keine Embryotoxizität festgestellt werden. Capece *et al.* (2003) bestätigten in weiteren Tests mit Ratten das teratogene Potenzial von Albendazol-Sulfoxid. Cristofol *et al.* (1997) haben andererseits bei der Untersuchung von Netobimin, einer Substanz, die in Kontakt mit gastrointestinalen Bakterien zu Albendazol transformiert wird, die teratogenen Effekte auf die Summe der Wirkungen von Albendazol und Albendazol-Sulfoxid zurückgeführt, wobei dem Albendazol-Sulfoxid jedoch die größere Potenz zugeschrieben wurde. In den Untersuchungen von Ratten wurden Mißbildungen der Wirbelsäule und Rippen, der Extremitäten und der Blutgefäße festgestellt (Capece *et al.* 2003; Cristofol *et al.* 1997; Delatour 1981, 1984; Navarro *et al.* 1999), und Mantovani *et al.* (1995) verzeichneten auch am Herz von Rattenembryonen morphologische Abnormalitäten. Beim Menschen scheinen

dagegen therapeutische Dosen von Albendazol zu keinen kongenitalen Defekten zu führen (Bradley und Horton 2001).

Im *Micromass-Test* wurden Albendazol und Albendazol-Sulfoxid erfolgreich getestet und erwiesen sich als sehr potent (Whittaker und Faustman 1991). Rolin *et al.* (1989) exponierten HepG2-Zellen gegenüber Albendazol und stellten fest, dass die Zellen das Albendazol zu Albendazol-Sulfoxid metabolisieren konnten.

3 Material und Methoden

Bei vielen Methoden wurden Zellen, Medium oder Testansätze unter definierten Bedingungen inkubiert. Falls nicht anders angegeben, fand diese Inkubation in einem Brutschrank (Heraeus) bei 37°C Lufttemperatur, 5% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchtigkeit statt.

Die Hersteller der verwendeten Geräte und Materialien sind im folgenden in Kurzform angegeben. Eine Liste mit vollständigen Angaben befindet sich im Anhang (11.1).

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät, Modell	Hersteller
Spektrophotometer, Sunrise	Tecan
Spektrophotometer, Polarstar Galaxy	BMG
Zentrifuge, Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher
Lichtmikroskop, CK X31SF	Olympus
Ultrazentrifuge, 5415D	Eppendorf
Electronicrührer, Variomag Mono	H+P
Mini-Schüttler, MS1	IKA
Sterilwerkbank, Heraeus Herasafe HSP12	Thermo Fisher
Waage, AX205DR	Mettler
Waage, Extend	Sartorius
Brutschrank, HeraCell 150	Thermo Fisher
Kryo-Einfriergerät, Nalgene Cryo -1℃ Freezing Container 5100-0001	Nalge
Zellkultureinsätze, Anopore 0,2 µm (8-Well-Streifen, 10 mm, 25 mm Einsätze)	Nunc
Multiwellschalen, QuadriPERM	Vivascience
Multiwellschalen	Nunc
Mikrowellplatten	Nunc
Gasdurchlässige Abdeckfolie, NUNC241205	Nunc
Zellkulturflaschen	Nunc

3.2 Tiere und Zelllinien

Tiere	Herkunft
Wistar WU Ratte, männlich	Charles River
NMRI Maus, männlich	Charles River

Zelllinien	Herkunft
H4IIE, CRL-1548	ATCC
Hepa 1-6, ACC 175	DSMZ
HepG2, ACC 180	DSMZ
ES-D3, CRL-1934	ATCC
BALB 3T3 Klon A31, ACC 173	DSMZ
BALB 3T3 Klon A31, CCL-163	ATCC

3.3 Chemikalien

3.3.1 Modellsubstanzen

Im Rahmen des Verbundprojektes sollten die Modellsubstanzen Valpromid, Valproinsäure, Retinol, all-*trans*-Retinsäure, Cyclophosphamid und 4-Hydroperoxycyclophosphamid (4HC) untersucht werden. Die meisten Stammlösungen wurden vom Projektpartner Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie, Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik, Leitung Prof. Heinz Nau (im weiteren kurz TiHo genannt) in DMSO hergestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Weitere Modellsubstanzen wurden direkt vom Hersteller bezogen und damit Stammlösungen oder Testmedien hergestellt. Die Charakteristika dieser Chemikalien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5: Charakteristika und Bezugsquelle der Modellsubstanzen. Eine detaillierte Liste der Hersteller bzw. der Quelle befindet sich im Anhang (11.1).

Modellsubstanz	CAS-Nr.	Bestellnr.	Matrix/Lm.	Reinheit	Hersteller/Quelle
5-Fluorouracil (5FU)	51-21-8	F6627	Pulver	≥99%	Sigma-Aldrich
Albendazol (ABZ)	54965-21-8	A4673	Pulver	≥98%	Sigma-Aldrich
(+ -) Albendazol-Sulfoxid (Ricobendazol; ASO)	54029-12-8	R3310	Pulver	≥98% (Racemat)	LKT
Cyclophosphamid-Monohydrat (CPP)	6055-19-2	C0768	DMSO	≥97%	TiHo1
Cyclophosphamid-Monohydrat (Endoxan; CPP)	6055-19-2	-	Pulver	k.A.	Baxter
4-Hydroperoxy-cyclophosphamid (4HC)	39800-16-3	D-18864	Pulver	≥96%	Niomech
Retinol (RO)	68-26-8	95144	DMSO	99%	TiHo2
all-*trans*-Retinsäure (RA)	302-79-4	R2625	DMSO	≥98%	TiHo1
Valpromid (VPD)	2430-27-5	-	DMSO	99%	TiHo3
Valpromid (VPD)	2430-27-5	L08847	Pulver	98,6%	Johnson
Valproinsäure (VPA)	99-66-1	P6273	DMSO	99,9%	TiHo1
Valproinsäure (VPA)	99-66-1	P6273	Flüssig	99,9%	Sigma-Aldrich

Lm. = Lösungsmittel; k.A. = keine Angaben

3.3.2 Laborchemikalien

Alle Chemikalien wurden in p.A. Qualität bezogen und alle Lösungen in Aqua destillata (A. dest.) hergestellt. Abweichungen davon sind angegeben.

Chemikalie	Hersteller
1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
2-Propanol	Merck
3-Methylcholanthren	Sigma-Aldrich
4-Nitrophenol	Sigma-Aldrich
7-Ethoxycoumarin	Sigma-Aldrich
Benzyloxyresorufin	Sigma-Aldrich
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid*2H2O	Merck
CDNB (1-Chlor-2,4-dinitrobenzol)	Sigma-Aldrich
Collagenase-Lyophilisat Typ I	Sigma-Aldrich
Collagenase-Lyophilisat Typ IV, C5138	Sigma-Aldrich
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck
Dicumarol (3,3'Methylene-bis(4-hydroxycoumarin))	Sigma-Aldrich
DMSO	AppliChem
EDTA	Sigma-Aldrich
EGTA	Sigma-Aldrich
ESGRO (mLIF)	Millipore
Ethanol	Merck
Ethoxyresorufin (Resorufin-Ethylether)	Sigma-Aldrich
Fötales Kälberserum	Biochrom
Gelatine	Biochrom
Gentamicin	Sigma-Aldrich
GlutaMAX - I (Gibco)	Invitrogen
Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich
GST aus Rattenleber	Sigma-Aldrich
Hepes	Biochrom
Insulin, Insuman Comb 25	Aventis
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich
Ketavet®	Pharmacia
Isotone Kochsalzlösung (0,9%)	Braun
L-Glutamin	Biochrom
L-Glutathion, reduced	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid	Merck
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
β-NADPH	Sigma-Aldrich
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumpyruvat	Biochrom
Nichtessenzielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom
Percoll	Sigma-Aldrich
Penicillin G	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Pentoxyresorufin	Sigma-Aldrich
Phenobarbital	Sigma-Aldrich
Phenolphthalein	Sigma-Aldrich
Prednisolon (Solu-Decortin H 10 mg)	Merck
Protein Assay Konzentrat	Bio-Rad
Rattenkollagen-R	menal

Chemikalie	Hersteller
Resorufin	Sigma-Aldrich
Rompun®	Bayer
Salicylamid (2-Hydroxybenzamid)	Sigma-Aldrich
SDS (Sodiumdodecylsulfat; Laurylsulfat)	Sigma-Aldrich
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich
Tris (Tris(Hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung, L2143	Biochrom
UDP-Glucuronsäure	Sigma-Aldrich
Umbelliferon (7-Hydroxycoumarin)	Sigma-Aldrich
β-Glucuronidase/ Arylsulfatase	Roche
δ-Aminolaevulinic acid	Sigma-Aldrich
Medium / Puffer, Bestellnummer	**Hersteller**
DMEM, Gibco, 41965	Invitrogen
DMEM/F12 HAM-Pulver, D8900	Sigma-Aldrich
MEM, Gibco, 51200	Invitrogen
Williams Medium E, F1125	Biochrom
PBS-Dulbecco, L1825	Biochrom
RPMI-1640	Sigma-Aldrich

3.4 Zellkulturverfahren

3.4.1 Behandlung von Zellkulturschalen

Zur Verbesserung der Zelladhäsion wurden Zellkulturplatten, -flaschen oder -einsätze nach Bedarf mit Kollagen oder Gelatine beschichtet. Zur Beschichtung von Zellkulturplatten mit Kollagen wurde eisgekühlte Kollagenlösung in ein Well pipettiert (50 µL/cm²), durch Schwenken gleichmäßig verteilt und für 30 min inkubiert. Zur Benetzung von Zellkulturplatten oder -einsätzen mit Kollagen wurde wie bei der Beschichtung verfahren, unmittelbar nach dem Verteilen der Kollagenlösung diese jedoch wieder abgesaugt und die Platten oder Einsätze für 30 min inkubiert. Zur Beschichtung von Zellkulturflaschen mit Gelatine wurde die Gelatine in die Flasche gegeben (1 mL/10 cm²) und 30 min inkubiert. Die Gelatine wurde abgesaugt und die Flasche mit warmem PBS gewaschen.

Kollagenlösung: 1,5 mg/mL Rattenkollagen-R in DMEM, pH 7,4
Gelatine: 10 mg/mL Schweinehaut-Gelatine in A. dest.

3.4.2 Isolierung primärer Hepatozyten

Die Isolierung von primären Rattenhepatozyten (Rhp) bzw. Maushepatozyten (Mhp) wurde in Anlehnung an das Protokoll von Klaunig *et al.* (1981) durchgeführt. Die Parameter des angewendeten Protokolls sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Ein männliches Tier wurde durch die intraperitoneale Injektion eines Narkotikums sowie zusätzlichem Anlegen einer Ethermaske betäubt. Nach Verschwinden der Reflexe (Druck auf die Hinterpfote) wurden Bauch und Brust mit 70% Ethanol abgerieben, der Bauchraum geöffnet und die Leber freigelegt. In die Portalvene wurde eine Flügelkanüle gelegt und mit einer Arterienklemme fixiert. Nach Einschalten der Perfusionspumpe wurde die *Vena cava* im Bauchbereich durchtrennt und die Leber zunächst mit Puffer A, dann mit Puffer B perfundiert. Anschließend wurde die Leber von ihren Ligamenten befreit und in eiskaltes steriles Zellgewinnungsmedium überführt. Dann wurde die Leber an der Kapsel festgehalten und vorsichtig mit einem Skalpell angeritzt. Die Hepatozyten wurden durch leichtes Schwenken im Medium herausgeschüttelt und die Zellsuspension über steriler Gaze filtriert. Das Schwenken und Filtrieren wurde so oft wiederholt, bis sich keine Hepatozyten mehr herauslösen ließen. Schließlich wurden die Zellen dreimalig (Rhp) bzw. zweimalig (Mhp) gewaschen (Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes, Resuspension des Zellpellets, siehe Tab. 6). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in HP-Medium aufgenommen und die Zellvitalität mit dem Trypanblau-Exklusionstest (3.5.1) bestimmt. Zellsuspensionen mit weniger als 70 - 80% vitalen Zellen wurden verworfen.

Puffer A:	4,15 g NaCl, 0,25 g KCl, 1,2 g HEPES, 10,2 ml, EGTA-Stammlösung (19 g/l in 2N NaOH) in 1 L Reinstwasser, pH 7,4. Da EGTA im sauren und neutralen pH-Bereich schwer löslich ist, erfolgte die pH-Einstellung im fertigen Puffer. Die EGTA-Stammlösung wurde am selben Tag angesetzt.
Puffer B:	1,95 g NaCl, 0,25 g KCl, 0,35 g $CaCl_2*2H_2O$, 1,2 g HEPES in 0,5 L Reinstwasser, pH 7,2. Zu dieser Lösung wurde unmittelbar vor der Perfusion Collagenase-Lyophilisat Typ IV (Ratte) bzw. Typ I (Maus) gegeben und eine Konzentration von 50 - 100 U/mL (Ratte) bzw. 100 U/mL (Maus) eingestellt. Das unsterile Lyophilisat wurde zuvor in 20-50 ml Puffer B aufgelöst und steril filtriert (0,22 µm).
Percoll-Lösung:	10% Percoll, 90% 10-faches DMEM (DMEM/F12-Pulver 10-fach konzentriert ansetzen)
HP-Medium:	5% FCS, 5 mM L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 10 µg/mL Gentamicin, 7 µg/mL Insulin, 0,75 µg/mL Prednisolon, 17,45 ng/mL Glukagon in Williams Medium E (WME)

Tab. 6: Parameter zur Isolierung von primären Hepatozyten.

	Ratte	Maus
Narkotikum	10 µL/10 g KG Ketavet® 40 µL/100 g KG Rompun® - In einer Spritze aufziehen	0,5 mL 10%iges Ketavet® 0,1 mL 2%iges Rompun® 4,4 mL phys. Kochsalzlösung - 0,1 mL/10 g KG applizieren
Körpergewicht	ca. 200 g	30 - 35 g
Durchfluss-geschwindigkeit	15 mL/min	10 mL/min
Perfusion mit Puffer A	10 min	4 min
Perfusion mit Puffer B	5 min	12 min
Zellgewinnungsmedium	WME	Puffer B (mit Collagenase Typ I)
Waschen der Hepatozyten	Waschmedium: WME 1. Zentrifugation: 4 min, 40 *g* - Pellet in WME lösen und 1:1 mit Percoll-Lösung mischen 2. Zentrifugation: 4 min, 80 *g* 3. Zentrifugation: 2 min, 40 *g*	Waschmedium: HP-Medium 1. Zentrifugation: 5 min, 50 *g* 2. Zentrifugation: 5 min, 50 *g*

3.4.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl einer Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Modell *improved*) vorgenommen, die eine Kammertiefe von 0,1 mm besitzt. Zur Auszählung der Zellen wurden die vier Großquadrate in den Ecken des Zählnetzes verwendet, die zur Leukozytenzählung vorgesehen sind und eine Fläche von 1 mm² je Großquadrat aufweisen. Es wurde ein Aliquot der Zellsuspension in den Hohlraum der Zählkammer pipettiert, die Zellen in den vier Großquadraten der Zählkammer im Mikroskop bei 100-facher Gesamtvergrößerung gezählt und die durchschnittliche Zellzahl eines Großquadrates bestimmt. Die Zellkonzentration wurde dann nach Gleichung 1 berechnet.

Gleichung 1: $$c_{\text{Zellen}} = n_{\text{dZ}} \times 10.000$$

mit

c_{Zellen} Zellkonzentration (Zellen/mL)

n_{dZ} Durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat (Zellen/0,1 µL)

3.4.4 Kultivierung primärer Hepatozyten

Die Hepatozyten wurden als Monolayer in 24-Well-Platten mit Kollagenbeschichtung (3.4.1) ausgesät (2×10^5 vitale Zellen/Well, 1 mL/Well). Nach einer Anwachszeit von 2,5 h wurde die Kultur zweimalig mit warmem PBS gewaschen und in HP-Medium für 24 h inkubiert. Danach

wurden sie erneut mit warmem PBS gewaschen und das Testmedium zugegeben. Weitere Medienwechsel erfolgten täglich.

3.4.5 Kultivierung von Zelllinien

Die in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien wachsen adhärent und wurden in Kulturflaschen mit zellspezifischem Medium kultiviert (Tab. 7). Nachdem sie 80 - 100% Konfluenz erreicht hatten (ES-D3-Zellen 50 - 80% Konfluenz) wurden sie passagiert. Dazu wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% / 0,02% w/v) versetzt und für einige Minuten inkubiert. Dann wurden sie durch leichtes Klopfen vom Boden der Kulturflasche gelöst, die Trypsinierung durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt, die Zellen mehrmalig resuspendiert und ein Aliquot der Suspension in eine neue Flasche überführt. Bei den ES-D3-Zellen wurde dem Kulturmedium nach jeder Passage 1000 U/mL mLIF zugesetzt, um die Pluripotenz der Zellen zu erhalten (Williams *et al.* 1988).

H4IIE-Medium:	10% FCS, 2 mM GlutaMAX, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat in MEM
Hepa 1-6-Medium:	10% FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin in DMEM
HepG2-Medium:	10% FCS, 2 mM GlutaMAX, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin in RPMI-1640
ES-D3-Medium:	15% FCS, 2 mM GlutaMAX, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 0,1 mM β-Mercaptoethanol in DMEM
3T3-Medium:	10% FCS, 2 mM GlutaMAX, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin in DMEM

Tab. 7: Herkunft und Kultivierungsparameter der verwendeten Zelllinien.

Zellart	Herkunft und Eigenschaften	Kultivierungsparameter			
		KF (cm²)	Passagen-intervall (d)	Verdün-nung	Max. Passage
H4IIE	Reuber-H35 Hepatom einer Ratte (Pitot *et al.* (1964). Epithelial, adhärent.	75	2 - 4	1:5 - 1:20	11
Hepa 1-6	BW7756-Hepatom einer C57L-Maus. Epithelial, adhärent.	75	3 - 4	1:3 - 1:10	10
HepG2	Hepatozellkarzinom eines 15-jährigen argentinischen Jungen (Aden *et al.* 1979). Epithelial, adhärent.	75	4 - 6	1:3 - 1:6	14
ES-D3	Innere Zellmasse der Blastozyste einer 129/Sv+c/+p Maus. Pluripotente embryonale Stammzelle; sphärische Kolonien, adhärent.	25	2 - 3	1:3 - 1:20	20
BALB/3T3 Klon A31	Aus 14 bis 17 Tage alten disaggregierten BALB/c Mausembryonen. Fibroblast, adhärent.	75	2 - 3	1:5 - 1:20	25

KF = Zellkulturflasche; Verdünnung = Typische Verdünnung bei einer Passage.

3.4.6 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen in eiskaltem zellspezifischen Medium mit 15% FCS und 10% DMSO versetzt (Zelldichten: H4IIE, Hepa 1-6, HepG2 $2{,}5 \times 10^6$ Zellen/mL; ES-D3, 3T3 3×10^6 Zellen/mL), in Kryoröhrchen aliquotiert und in einem mit Isopropanol gefüllten Kryo-Einfriergerät bei -80°C eingefroren. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

3.4.7 Auftauen von Zellen

H4IIE-, Hepa 1-6-, HepG2-, 3T3-Zellen: In eine T25-Kulturflasche wurde 7 mL zellspezifisches warmes Medium mit 20% FCS gegeben, die Zellen im Kryoröhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad zügig aufgetaut und unmittelbar in die Flasche überführt. Nach 2-3 h wurde das Medium entfernt und die Kultur in zellspezifischem Medium fortgesetzt.

ES-D3-Zellen: Die Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad zügig aufgetaut, in warmes ES-D3-Medium überführt, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in 7 mL ES-D3-Medium wieder aufgenommen. Diese Suspension wurde zusammen mit mLIF (1000 U/mL) in eine mit Gelatine beschichtete T25-Kulturflasche (3.4.1) gegeben und die Zellen darin inkubiert.

3.4.8 Herstellung von Zelllysat

Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde PBS in ein Well pipettiert (24-Well-Platte: 100 µL pro Well; 12 Well Platte: 180 µL pro Well; 6-Well-Platte: 600 µL pro Well) und die Platte bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die lysierten Zellen vom Wellboden geschabt, in ein Eppendorf-Cup überführt, resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

3.5 Bestimmung der Zytotoxizität

3.5.1 Trypanblau-Ausschlusstest

Mit dem Trypanblau-Ausschlusstest können lebende von toten Zellen unterschieden und damit die Zellvitalität bestimmt werden. Der Farbstoff Trypanblau diffundiert dabei durch die Zellmembran toter Zellen und färbt diese blau. Lebende Zellen nehmen die geladenen Farbstoffpartikel nicht auf und erscheinen im Mikroskop daher gelblich-farblos. Für die Bestimmung wurden 100 µL Trypanblau mit 900 µL Zellsuspension vermischt und 20 µL davon in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Mit Hilfe eines Mikroskops wurden ungefärbte und gefärbte Zellen gezählt, die Zellzahlen pro Milliliter bestimmt (3.4.3) und der Anteil vitaler Zellen aus der Differenz zwischen Gesamtzellzahl und Anzahl gefärbter Zellen berechnet (Lindl *et al.* 2000).

3.5.2 MTT-Test

Die Proliferation und Vitalität von Zellen kann mit dem MTT-Test (MTT = 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) bestimmt werden (Laschinsky *et al.* 1991; Mosman 1983; Spielmann *et al.* 1997). Dabei wird die Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase gemessen, ein Enzym aus der Atmungskette. Das schwach gelbe, wasserlösliche MTT wird von den Zellen aufgenommen und sein Tetrazoliumring durch die Succinat-Dehydrogenase aktiver Mitochondrien aufgebrochen (Reduktion, vgl. Abb. 2). Durch diese Reaktion entsteht das dunkelblau/violette, wasserunlösliche Formazan, welches in der Zelle ausfällt. Durch Zugabe des Lösungsreagenz werden die Zellen lysiert und das Formazan gelöst, wodurch es photometrisch nachgewiesen werden kann. Die Konzentration verhält sich proportional zur Anzahl der vitalen Zellen.

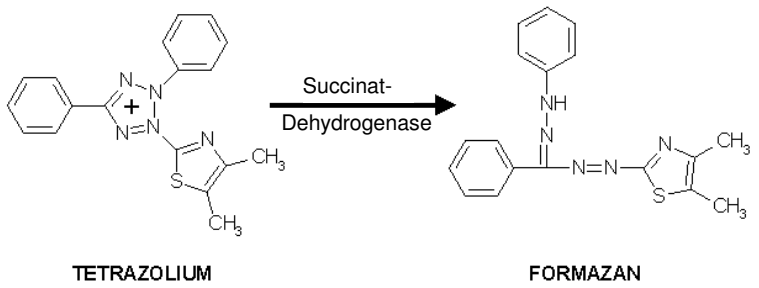


Abb. 2: Reaktionsmechanismus der Fällung des MTT durch Succinat-Dehydrogenase.

3.5.2.1 Bestimmung in 96-Well-Platten

Nach einmaligem Waschen mit warmem PBS wurde pro Well 200 µL MTT-Medium pipettiert und für 3 h inkubiert. Das MTT-Medium wurde abgenommen, 200 µL SDS-Lösungsreagenz zugegeben und die Platte für 30 min geschüttelt. Danach erfolgte eine Absorptionsmessung bei 570 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm (Spektrophotometer, Polarstar Galaxy).

MTT-Medium:	Kulturmedium mit 0,5 mg/mL MTT
SDS-Lösungsreagenz:	20% SDS-Stock in 2-Propanol
SDS-Stock:	200 mg/mL SDS

3.5.2.2 Bestimmung in Zellkultureinsätzen

8-Well-Streifen: Die 8-Well-Streifen wurden mit warmem PBS gewaschen und in eine 96-Well-Platte eingesetzt, in der sich pro Well 170 µL MTT-Medium befanden. In jeden Zellkultureinsatz eines 8-Well-Streifens wurden 60 µL MTT-Medium pipettiert und die Platte für 3 h inkubiert. Dann wurde das MTT-Medium aus den Streifen entfernt und die Streifen innen und außen mit warmem PBS gewaschen. In eine neue 96-Well-Platte wurden 120 µL HCl-Lösungsreagenz pro Well vorgelegt, die Streifen eingesetzt, die Kultureinsätze mit je 80 µL HCl-Lösungsreagenz befüllt und für 30 min geschüttelt. Dann wurde ein 5 mm starkes Distanzstück aus PEGT zwischen die Streifen und die Platte gelegt und die Platte für 5 min bei 250 g zentrifugiert. Die Absorptionsmessung der Lösung in den Wells wurde wie unter 3.5.2.1 beschrieben durchgeführt.

10 mm Einsätze: Die Einsätze wurden mit warmem PBS gewaschen und in eine 24-Well-Platte eingesetzt, in der sich 500 µL MTT-Medium pro Well befanden. Dann wurde in jeden

Einsatz 500 µL MTT-Medium pipettiert und die 24-Well-Platte für 3 h inkubiert. Das MTT-Medium wurde aus den Einsätzen entfernt, und die Einsätze wurden in eine 24-Well-Platte überführt, in der pro Well 500 µL SDS-Lösungsreagenz vorgelegt waren. Es wurden 300 µL SDS-Lösungsreagenz in jeden Einsatz pipettiert, und die 24-Well-Platte wurde für 30 min geschüttelt. Dann wurden die Lösungen aus Einsatz und Well zusammengeführt, 200 µL davon in eine 96-Well-Platte gegeben, und die Absorptionsmessung der Lösung in den Wells wie unter 3.5.2.1 beschrieben durchgeführt.

HCl-Lösungsreagenz: 0,04 N HCl in 2-Propanol

3.6 Untersuchung von Enzymaktivitäten

3.6.1 Bestimmung der CYP450-Aktivität: EROD, PROD, BROD-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD), 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylase (PROD) bzw. 7-Benzoxyresorufin-O-Debenzylase (BROD) in intakten Zellen wurde die Methode von Donato *et al.* (1993) modifiziert. Die Substrate 7-Ethoxyresorufin, 7-Pentoxyresorufin bzw. 7-Benzoxyresorufin werden in der Zelle durch spezifische Cytochrome an der Ortho-Position zum fluoreszierenden Resorufin dealkyliert (Abb. 3), welches im Medium fluorimetrisch bestimmt werden kann (Burke *et al.* 1985). Um eine weitere Oxidation des Resorufins während der Substratumsetzung durch das cytosolische Enzym Diaphorase zu vermeiden, wurde dem Substratmedium Dicumarol zugesetzt. Da Resorufin außerdem endogen weiter zu nicht-fluoreszierenden Produkten konjugiert werden kann, z.B. durch Glucuronidierung oder Sulfatierung, wurden die Substratmediumüberstände zur Hydrolyse der Konjugate mit β-Glucuronidase/Arylsulfatase inkubiert. Eine Unterbestimmung von Resorufin kann so vermieden werden (Donato *et al.* 1993). Zur Quantifizierung dieses Hinweises auf eine Phase II-Aktivität wurden parallel die Substratmediumüberstände nach der Inkubation mit Natriumacetatpuffer versetzt. Während der EROD-Assay CYP1A1/2-Aktivitäten nachweisen kann, detektiert der PROD-Assay CYP2B1/2-Aktivität, und der BROD-Assay CYP3A-Aktivität (Alexandre *et al.* 1999; Doostdar *et al.* 1988, 1993).

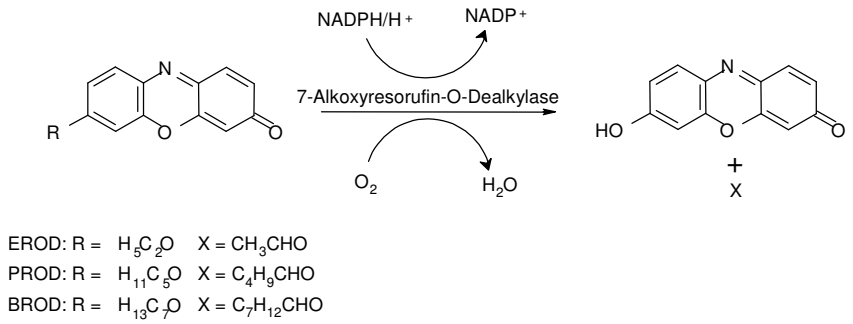


Abb. 3: Testprinzip der Bestimmung der EROD/PROD/BROD-Aktivität. EROD = 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase; PROD = 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylase; BROD = 7-Benzoxyresorufin-O-Dealkylase.

Die Enzymaktivität von Zellen in ES-D3-Medium wurde täglich über vier Tage bestimmt und die Aktivität einer Lösungsmittelkontrolle (DMSO, 0,25% v/v) mit der Aktivität stimulierter Zellen verglichen. Die für die Zellen verträglichen Konzentrationen an Induktoren wurden in Vorversuchen ermittelt. Pro Behandlung wurden drei Replikate angesetzt und Enzymaktivität und Proteinkonzentration (3.7) doppelt bestimmt. Die Rahmenparameter der Versuche sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tab. 8: Rahmenparameter des EROD-, PROD-, und BROD-Assays für H4IIE- und HepG2-Zellen. Die DMSO-Konzentration im Medium betrug 0,25% v/v. Induziert wurde mit 3-Methylcholanthren (MC) und Phenobarbital (PB).

	H4IIE-Zellen	**HepG2-Zellen**
Zelleinsaat (24-Well-Platte)	$7{,}5 \times 10^4$ Zellen/Well	$2{,}1 \times 10^5$ Zellen/Well
MC-Konzentration	0,5 µM	0,2 µM
PB-Konzentration	1000 µM	2000 µM

Die Zellen wurden in ES-D3-Medium in eine 24-Well-Platte gesät und für 2 h inkubiert. Die Aussaatdichte war so eingestellt, dass die Zellen nach 4 Tagen zu 80-100% konfluent waren, da sie in der Wachstumsphase die höchste Enzymaktivität besitzen (Alexandre *et al.* 1999). Nach dem Anwachsen wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen und mit den Induktoren behandelt (Tab. 8). Medium und Induktor wurden täglich erneuert.

Zur Messung der Enzymaktivität wurden die Zellen zweimalig mit warmem PBS gewaschen. Danach wurde in eine 24-Well-Platte 500 µL Substratmedium pro Well gegeben und für 30 min inkubiert. Das Inkubat wurde abgenommen und die Zellen zur Proteinbestimmung lysiert (3.4.8). Vom Inkubat wurden 75 µL pro Well in eine 96-Well-Platte pipettiert, mit 25 µL β-Glucuronidase/Arylsulfatase bzw. 25 µL Natriumacetatpuffer versetzt und weitere 2 h inkubiert. Anschließend wurden mit 200 µL 100% Ethanol die Proteine in der Lösung gefällt, die 96-Well-Platte für

10 min bei 1500 g zentrifugiert, 100 µL des Überstandes in eine schwarze 96-Well-Platte überführt und die Fluoreszenz bei einer Emissionswellenlänge von 590 nm mit einer Anregungswellenlänge von 530 nm gemessen (Spektrophotometer, Polarstar Galaxy). Eine Resorufin-Standardkurve (15,625 - 1000 pmol/mL) wurde in ES-D3-Medium angesetzt und wie die Proben behandelt. Die Enzymaktivitäten der Proben wurden mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse aus den Standardkurve-Messwerten berechnet und auf die zelluläre Proteinmenge bezogen (3.7).

Die Nachweisgrenze der Methode wurde mit Substratmedium ohne Zellexposition ermittelt. Dabei wurden 24 Bestimmungen arithmetisch gemittelt und mit der 3-fachen Standardabweichung multipliziert (Rücker *et al.* 2001). Die Nachweisgrenzen für Resorufin betrugen für den EROD-Assay 35,9 pmol/mL, für den PROD-Assay 37,3 pmol/mL und den BROD-Assay 34,8 pmol/mL.

Substratmedium:	Kulturmedium, Substrat*, 10 µM Dicumarol in 1N NaOH, 10 mM Hepes pH 7,1 *Substrat für EROD-Assay: 8 µM Ethoxyresorufin in DMSO *Substrat für PROD-Assay: 15 µM Pentoxyresorufin in DMSO *Substrat für BROD-Assay: 15 µM Benzoxyresorufin in DMSO DMSO-Endkonzentration 1%
Weitere Reagenzien:	15 Fisherman Units β-Glucuronidase, 120 Roy Units Arylsulfatase/Well in Natriumacetatpuffer 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 4,5 1 M Hepes pH 7,4

3.6.2 Bestimmung der UDP-Glucuronosyltransferase-Aktivität im Zelllysat

Mit dieser Methode können in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat die Aktivitäten der UDP-Glucuronosyltransferase-Familien 1 und 2 (UGT1/2) bestimmt werden (Watanabe *et al.* 1986). Dabei wird 4-Nitrophenol durch UGT1 glucuronidiert, Phenolphthalein durch UGT2. Bei der Konjugationsreaktion von UDP-Glucuronsäure mit dem Substrat verlieren die Substrate ihre Eigenfarbe, und die Abnahme der Absorption wird als Maß für die UGT-Aktivität herangezogen.

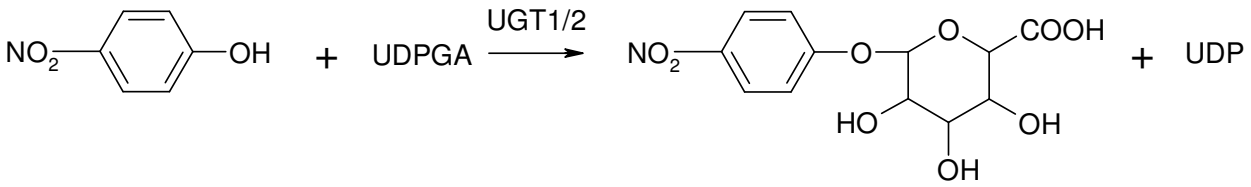


Abb. 4: Testprinzip der Bestimmung der UGT1-Aktivität mit dem Substrat 4-Nitrophenol. UDP = Uridindiphosphat; UDPGA = UDP-Glucuronsäure; UGT = UDP-Glucuronosyltransferase.

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Zellen erfolgte nach dem Schema der EROD/PROD/BROD-Assays (3.6.1). Die Parameter der Versuche sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Rahmenparameter des UGT1/2-Assays für H4IIE- und HepG2-Zellen. Die DMSO-Konzentration im Medium betrug 0,25% v/v. Induziert wurde mit 3-Methylcholanthren (MC) und Phenobarbital (PB).

	H4IIE-Zellen	**HepG2-Zellen**
Format	6-Well-Platte	12 Well Platte
Zelleinsaat	$2{,}88 \times 10^5$ Zellen/Well	$3{,}86 \times 10^5$ Zellen/Well
MC-Konzentration	0,5 µM	0,2 µM
PB-Konzentration	1000 µM	2000 µM

Die Zellen wurden in ES-D3-Medium in eine 6 Well bzw. 12 Well Platte gesät (Tab. 9) und für 2 h inkubiert. Nach dem Anwachsen wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen und mit dem Induktor behandelt. Medium und Induktor wurden täglich erneuert. Mit der gewählten Aussaatdichte erreichten die Zellen nach 4 Tagen eine Konfluenz von 80-100%.

Zur Bestimmung der UGT-Aktivität wurde das Zelllysat (3.4.8) im Inkubationsmedium mit 4-Nitrophenol (UGT1) bzw. Phenolphthalein (UGT2) als Substrat für 60 min bzw. 120 min inkubiert. Anschließend wurden davon 50 µL/Well abgenommen, die Reaktion durch Zugabe von 100 µL 0,2 M Glycin-NaOH-Puffer gestoppt und die Absorption bei 405 nm bzw. 550 nm gemessen (Tecan, Sunrise). Eine Standardreihe mit 16,9 - 540 nmol/mL 4-Nitrophenol bzw. 13,1 - 150 nmol/mL Phenolphthalein wurde in Reinstwasser angesetzt und wie die Proben behandelt. Parallel wurden je Bestimmung zwei Leerwerte aus Inkubationsmedium mit PBS mitgemessen.

Die Enzymaktivitäten der Proben wurden mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse aus den Standardkurve-Messwerten berechnet. Die Enzymaktivität (nmol/mL) wurde aus der Differenz zwischen Leerwert und Messwert berechnet. Die Nachweisgrenze der Methode wurde aus dem Mittelwert der Leerwerte berechnet, der mit der dreifachen Standardabweichung multipliziert wurde, und betrug im Assay mit H4IIE-Zellen für UGT1 357 nmol/mL, für UGT2 95,8 nmol/mL, und im Assay mit HepG2-Zellen für UGT1 335 nmol/mL und für UGT2 112 nmol/mL. Die Enzymaktivität wurde auf die Proteinmenge (3.7) bezogen.

Inkubationsmedium: Zelllysat (500 - 800 µg Protein/mL), 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,4), 40 µM EDTA, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM UDP-Glucuronsäure. Dazu:
- für UGT1-Bestimmung 360 µM 4-Nitrophenol
- für UGT2-Bestimmung 120 µM Phenolphthalein

Gesamtvolumen 200 µL

Glycin-NaOH-Puffer: 0,2 M Glycin in 0,2 M NaOH pH 10,4

3.6.3 Bestimmung der GST-Aktivität im Zelllysat

Die zytosolische und mikrosomale GST-Aktivität kann mit der Methode von Habig *et al.* (1974) bestimmt werden (Anon 2004). Dabei wird die Konjugation von 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB) mit reduziertem Glutathion gemessen, die mit einem Anstieg der Absorption verbunden ist. Die Anstiegsrate ist proportional zur GST-Aktivität der Probe.

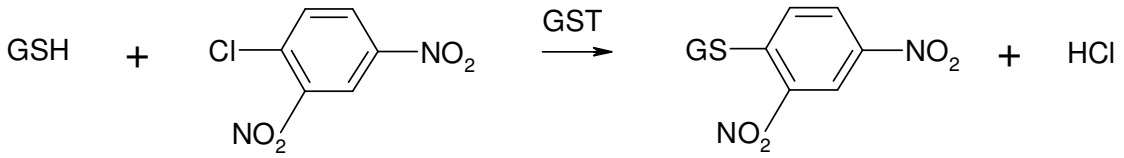


Abb. 5: Testprinzip der Bestimmung der GST-Aktivität. GSH = Glutathion; GST = Glutathion-S-Transferase.

Die GST-Aktivität von H4IIE- bzw. HepG2-Zellen in ES-D3-Medium wurde täglich über vier Tage bestimmt und mit der Aktivität der Lösungsmittelkontrolle verglichen. Es wurden zwei bzw. drei Replikate pro Behandlung angesetzt und die GST-Aktivität in einer kinetischen Messung über 6 min bestimmt. Der Proteingehalt wurde doppelt bestimmt. Wichtige Parameter der Versuche sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Rahmenparameter des GST-Assays für H4IIE- und HepG2-Zellen. Die DMSO-Konzentration im Medium betrug 0,25% v/v. Induziert wurde mit 3-Methylcholanthren (MC) und Phenobarbital (PB).

	H4IIE-Zellen	**HepG2-Zellen**
Format	12 Well Platte	92 mm Petrischale
Zelleinsaat für 24 h Inkubation	3×10^5 Zellen/Well	17×10^6 Zellen/Schale
Zelleinsaat für 48 h Inkubation	$1{,}48 \times 10^5$ Zellen/Well	$6{,}8 \times 10^6$ Zellen/Schale
Zelleinsaat für 72 h Inkubation	$7{,}4 \times 10^4$ Zellen/Well	$4{,}5 \times 10^6$ Zellen/Schale
Zelleinsaat für 96 h Inkubation	$7{,}4 \times 10^4$ Zellen/Well	$2{,}8 \times 10^6$ Zellen/Schale
Anzahl der Replikate	3	2
MC-Konzentration	0,5 µM	0,2 µM
PB-Konzentration	1000 µM	2000 µM

Die Zellen wurden in ES-D3-Medium in eine 12 Well Platte bzw. 92 mm Petrischale gesät und für 2 h inkubiert. Die Aussaatdichte war so eingestellt, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Bestimmung zu 80-100% konfluent waren (Tab. 10). Nach dem Anwachsen wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen und mit dem Induktor behandelt. Medium und Induktor wurden täglich erneuert.

Zur Bestimmung der GST-Aktivität wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen. Dann wurde 150 µL Lysepuffer zu den Zellen gegeben, diese mit einem Zellschaber vom Boden

abgeschabt und in ein Eppendorf-Cup überführt. Die Zellsuspension wurde auf Eis für 5 min im Ultraschallbad behandelt und bei 4°C mit 14000*g* für 15 min zentrifugiert. Der Überstand der Probe wurde bei -80°C eingefroren und zur Messung der GST-Aktivität und des Proteingehaltes wieder aufgetaut.

Für die GST-Bestimmung wurden zu 150 µL Assaypuffer 20 µL Glutathion und 20 µL Probe gegeben. Parallel wurde ein Leerwert (170 µL Assaypuffer + 20 µL Glutathion) und eine Positivkontrolle (150 µL Assaypuffer + 20 µL Glutathion + 20 µL Rattenleber-GST) mitgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µL CDNB initiiert. Nach einer Equilibrationsphase von einer Minute (einige Sekunden schütteln, dann Ruhen) wurde bei 25°C die Zunahme der Absorption bei 340 nm alle 60 s über 6 min aufgezeichnet (Sunrise, Fa. Tecan).

Lysepuffer:	100 mM Kaliumphosphat pH 7,0; 2 mM EDTA
Assaypuffer:	100 mM Kaliumphosphat pH 6,5; 0,1% Triton X-100
Probenpuffer:	100 mM Kaliumphosphat pH 6,5; 0,1% Triton X-100, 1 mM Glutathion (GSH), 1 mg/mL BSA
Rattenleber-GST:	100 µg GST aus Rattenleber in 200 µL Probenpuffer
Weitere Reagenzien:	100 mM Glutahion in Assaypuffer 20 mM CDNB in Ethanol

Zur Berechnung der GST-Aktivität wurde zunächst die Absorption nach Abzug des Leerwertes gegen die Zeit aufgetragen und im linearen Bereich der Kurve die Steigung bzw. Absorptionsrate ΔA_{340} pro Minute berechnet (Gleichung 2; Anon 2004).

Gleichung 2:

$$\Delta A_{340}/\text{min} = \frac{A_{340\,t2} - A_{340\,t1}}{t_2 - t_1}$$

mit

ΔA_{340}/min	Absorptionsrate (OD/min)
$A_{340\,t1}$	Absorption zu Beginn des Messintervalls (OD)
$A_{340\,t2}$	Absorption zum Ende des Messintervalls (OD)
t_1	Zeit zu Beginn des Messintervalls (min)
t_2	Zeit am Ende des Messintervalls (min)

Bei allen Proben und der Positivkontrolle soll die Absorptionsrate zwischen 0,012 und 0,064 OD/min liegen. Die GST-Aktivität wurde mit Gleichung 3 berechnet (Anon 2004).

Gleichung 3: $$\text{GST-A.} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{\varepsilon_{CDNB}} \times \frac{200\ \mu\text{L (Gesamtvolumen)}}{20\ \mu\text{L (Probenvolumen)}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

mit

GST-A.	GST-Aktivität (nmol/min/mL)
ΔA_{340}/min	Absorptionsrate (OD/min)
ε_{CDNB}	CDNB-Extinktionskoeffizient = 0,00503 μM^{-1} (korrigiert um die Wegstrecke, die vom Licht im Well zurückgelegte wird)

3.7 Bestimmung des Proteingehaltes

Der zelluläre Proteingehalt wurde mit der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Dabei wird eine saure Lösung mit dem Nachweisreagenz Coomassie Brilliant Blue G-250 eingesetzt, welche kovalent an die Sulfhydryl-Gruppen der Proteine bindet, wodurch sich das Absorptionsmaximum der Lösung von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Die Menge des entstandenen Farbstoffkomplexes verhält sich proportional zur Menge des zellulären Proteins.

Von einer geeigneten Verdünnung des Zelllysats in PBS (3.4.8) wurden 50 µL mit 200 µL Nachweisreagenz versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Messung bei 620 nm. Zur Kalibrierung wurde eine Standardreihe mit BSA angesetzt (20 - 140 µg/mL) und wie die Proben behandelt. Der Proteingehalt der Proben wurde mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse aus den Standardkurve-Messwerten berechnet.

Nachweisreagenz: Bio Rad Protein Assay Konzentrat, 1:10 verdünnt

3.8 Bestimmung der Metabolisierungsleistung von Hepatomazellen

3.8.1 Versuchsdurchführung

Die H4IIE- oder HepG2-Zellen wurden in eine 6-Well-Platte gesät (3 mL/Well) und zum Anwachsen für 2 h inkubiert (Zelldichten: H4IIE $1{,}6 \times 10^5$ Zellen/Well; HepG2 2,5 bis $5{,}8 \times 10^5$ Zellen/Well). Die Aussaatdichte war so eingestellt, dass die Zellen nach fünf Tagen zu 80 - 100% konfluent waren. Nach dem Anwachsen wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen, ES-D3-Medium mit Testsubstanz zugegeben und die Platten für zwei und fünf Tage inkubiert. Diese Zeiträume entsprechen dem kürzesten und längsten Kultivierungsschritt im mEST (3.9). Am Ende der Expositionszeit wurde das Medium abgenommen, die Proben bei -20°C eingefroren und auf Trockeneis zur Analyse an die Tierärztliche Hochschule Hannover verschickt (3.8.2).

3.8.2 Analytik der Metaboliten

Die Bestimmung der Modellsubstanzen und Metaboliten wurde von der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie, Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik, Prof. Heinz Nau (kurz TiHo) vorgenommen. Die Proben wurden direkt nach Entnahme bei -20°C in Dunkelheit eingefroren, gesammelt, und auf Trockeneis an die TiHo versand.

3.8.2.1 Valpromid und Valproinsäure

Es wurde von den Valproinsäure-Derivaten die Gesamtkonzentration (proteingebundene und freie Fraktion) des Proteratogens Valpromid (VPD) und seines teratogenen Metaboliten Valproinsäure (VPA) bestimmt. Die bei -18°C gelagerten Proben wurden vor der Analyse auf Raumtemperatur erwärmt und homogenisiert. Dann wurde der interne Standard zugesetzt, die Proben durch eine flüssig-flüssig-Extraktion mit Phosphatsäurepuffer (pH 5,0) / Essigsäureethylester extrahiert, mittels N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) derivatisiert und im GC-MS analysiert. Valpromid, Valproinsäure und der interne Standard wurden an einer DB 1701 Säule gaschromatographisch getrennt, anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert und durch das Peakflächenverhältnis ihrer charakteristischen Massenspuren quantifiziert (Eikel *et al.* 2006). Die Kenngrößen des Analysenverfahrens sind in Tabelle 11 wiedergegeben. Die dort aufgeführte Messunsicherheit ist als doppelte Wiederholstandardabweichung angegeben (Anon 1993), welche in mehreren Ringversuchen ermittelt worden ist.

Tab. 11: Kenngrößen der Analytik von Valpromid und Valproinsäure, zusammengefasst aus den Analysenberichten der TiHo über den Projektzeitraum. Die Messunsicherheit ist als doppelte Wiederholstandardabweichung angegeben.

Parameter	VPD	VPA
Nachweisgrenze	0,01 - 0,02 µg/mL	0,01 µg/mL
Bestimmungsgrenze	0,05 µg/mL	0,04 µg/mL
Messunsicherheit	20%	12,9%

3.8.2.2 Retinoide

Von den Retinoiden wurden das Proteratogen Retinol (RO) und sein teratogener Metabolit all-*trans*-Retinsäure (Retinsäure oder RA) sowie 9-*cis*-Retinsäure (9cRA), 13-*cis*-Retinsäure (13cRA), 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure (13c4oRA) und all-*trans*-4-oxo-Retinsäure (4oRA) analysiert. Retinoide sind empfindlich gegnüber Tageslicht und Hitze und können dadurch leicht

isomerisieren oder oxidieren (Schmidt *et al.* 2003). Deshalb wurde im Labor mit gedämpften Gelblicht gearbeitet und die Proben sofort nach ihrer Gewinnung in undurchsichtigen Probenbehältern eingefroren. Die Proben wurden bei -80°C dunkel gelagert, vor der Analyse auf Raumtemperatur erwärmt und homogenisiert. Dann wurde der interne Standard zugesetzt, die Proben durch eine flüssig-flüssig-Extraktion mit 2-Propanol/Chloroform extrahiert und mittels Festphasenextraktion an einer Aminopropylsäule in eine polare und eine unpolare Fraktion aufgetrennt. Die beiden Fraktionen wurden im Vakuum aufkonzentriert, und die polaren Retinoide in Methanol/PBS, die unpolaren Retinoide in Chloroform/Acetonitril aufgenommen. Die Messung erfolgte mittels HPLC mit UV-Detektion bei 340 nm für die polaren und bei 325 nm für die unpolaren Retinoide (Schmidt *et al.* 2003). Die Kenngrößen des Analysenverfahrens sind in Tabelle 12 wiedergegeben. Die dort aufgeführte Messunsicherheit ist als doppelte Wiederholstandardabweichung angegeben (Anon 1993), welche in mehreren Ringversuchen ermittelt worden ist.

Tab. 12: Kenngrößen der Analytik von Retinoiden, zusammengefasst aus den Analysenberichten der TiHo über den Projektzeitraum. Die Messunsicherheit ist als doppelte Wiederholstandardabweichung angegeben.

Parameter	Retinol	RA
Nachweisgrenze	0,1 - 0,98 ng/mL	0,1 - 0,12 ng/mL
Bestimmungsgrenze	0,5 - 2,95 ng/mL	0,34 - 0,5 ng/mL
Messunsicherheit	32% (bis 10 ng/mL Retinol) 10% (>10 ng/mL Retinol)	12%

3.9 Der Embryonale Stammzelltest (EST)

Mit dem Embryonalen Stammzelltest (EST) wird das embryotoxische Potenzial von Testsubstanzen bestimmt (Seiler *et al.* 2006). Er besteht aus drei *in vitro*-Tests, in denen die Endpunkte Zytotoxizität und Hemmung der Zelldifferenzierung untersucht und drei verschiedene Halbhemmkonzentrationen bestimmt werden. Eine Halbhemmkonzentration gibt dabei die Konzentration einer Testsubstanz an, bei welcher 50% der getesteten Zellen in Wachstum oder Differenzierung gehemmt werden. Ein EST ist wie folgt aufgebaut:

1. Test: Differenzierungsassay mit embryonalen Stammzellen der Maus (ES-D3-Zellen).
   Endpunkt: Hemmung der Differenzierung in kontrahierende Kardiomyozyten
   Halbhemmkonzentration: ID_{50}-Wert
2. Test: Zytotoxizitätstest mit ES-D3-Zellen.
   Endpunkt: Zellvitalität
   Halbhemmkonzentration: IC_{50}D3-Wert
3. Test: Zytotoxizitätstest mit adulten Mausfibroblasten (BALB/3T3-Zellen).
   Endpunkt: Zellvitalität
   Halbhemmkonzentration: IC_{50}3T3-Wert

Für die drei Tests wurde ein biometrisches Prädiktionsmodell entwickelt (Tab. 13), mit dem eine Klassifizierung der Testsubstanz in die Embryotoxizitätsklassen nicht embryotoxisch, schwach oder stark embryotoxisch vorgenommen werden kann (Genschow *et al.* 2004, Seiler *et al.* 2006).

3.9.1 Differenzierungsassay

Mit dem Differenzierungsassay wird die Hemmwirkung einer Testsubstanz auf die Differenzierung der ES-D3-Zellen zu kontrahierendem Myocard bestimmt. Es werden 6 - 8 Konzentrationen einer Testsubstanz zusammen mit einer Lösungsmittel- und einer Mediumkontrolle geprüft. Der Assay ist valide, wenn sich in den beiden Kontrollen nach 10 Tagen in 21 von 24 Wells kontrahierende Kardiomyozyten gebildet hatten (Genschow *et al.* 2004). In Abbildung 6 ist der Assay schematisch dargestellt.

Am Tag 0 wurde von undifferenzierten ES-D3-Zellen eine Zellsuspension mit $3{,}75 \times 10^4$ Zellen/mL angesetzt und daraus die Testmedien (Konzentrationsreihe, Lösungsmittel- und Mediumkontrolle) hergestellt. Pro Testmedium wurden 50-70 Tropfen (20 µL) der Zellsuspension in den Deckel einer 92 mm Petrischale pipettiert. Die Petrischale wurde mit 5 mL PBS befüllt, der Deckel vorsichtig umgedreht, auf die Schale gesetzt und für 3 Tage inkubiert.

Am Tag 3 wurden frische Testmedien wie am Tag 0 hergestellt, jedoch ohne Zellen. Die Embroyid Bodies (EBs), die sich in den Tropfen im Deckel der Petrischale gebildet hatten, wurden mit 5 mL Testmedium abgespült, in eine 60 mm Petrischale überführt und dort für weitere zwei Tage inkubiert.

Am Tag 5 wurden wie am Tag 3 frische Testmedien hergestellt, und pro Testmedium wurde in eine 24-Well-Platte je 1 mL pro Well vorgelegt. Die EBs wurden mit einer Pipette einzeln der Petrischale entnommen (35 µL pro EB), in die 24-Well-Platte übertragen (ein EB pro Well) und für weitere 5 Tage inkubiert.

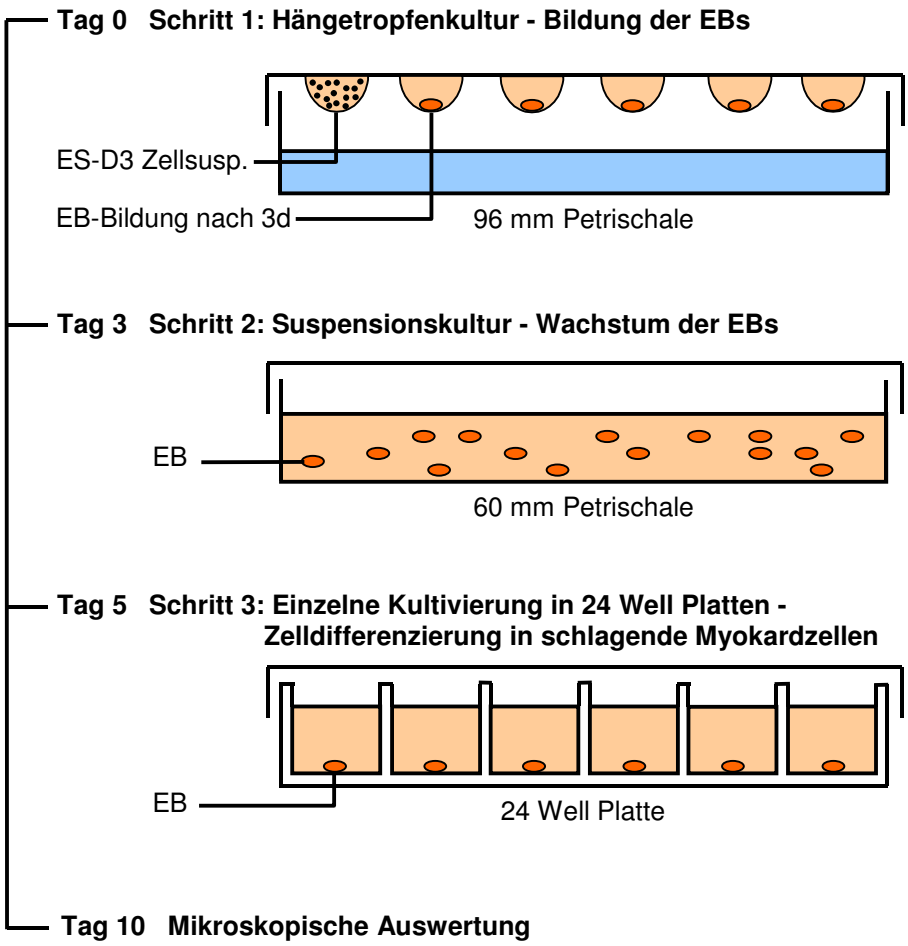


Abb. 6: Schematischer Ablauf des Differenzierungsassays des EST. EB = Embryoid Body.

Am Tag 10 wurden im Lichtmikroskop (Olympus, Phasenkontrastobjektiv, Gesamtvergrößerung 100-fach) die Wells mit kontrahierendem Myocard pro Platte gezählt. Von der Lösungsmittelkontrolle wurde die Anzahl der Wells mit Myocard auf 100% gesetzt, und die Hemmung der Differenzierung in einer Testlösung als prozentualer Anteil von der Lösungsmittelkontrolle berechnet. Aus der Konzentrations-Wirkungskurve wurde graphisch der ID_{50}-Wert abgelesen.

3.9.2 Zytotoxizitätstest mit ES-D3- und 3T3-Zellen

Die zytotoxische Wirkung der Testsubstanz auf ES-D3- bzw. 3T3-Zellen wird mit einem MTT-Test (3.5) ermittelt. Dabei wurden in einer 96-Well-Platte in 6-fach-Bestimmung sieben Konzentrationen der Testsubstanz mit einer Positivkontrolle und zwei Lösungsmittelkontrollen für 10 Tage inkubiert. Ein Mediumwechsel wurde im gleichen Zeitraster wie beim Differenzierungsassay vorgenommen. Der Zytotoxizitätstest gilt als valide, wenn nach 10 Tagen in der Positivkontrolle 20 - 80% vitale Zellen festgestellt werden (Genschow *et al.* 2004).

Am Tag 0 wurde von undifferenzierten ES-D3-Zellen bzw. 3T3-Zellen eine Zellsuspension mit 1×10^4 Zellen/mL hergestellt, 50 µL pro Well davon in eine 96-Well-Platte pipettiert und zum Anwachsen für 3 h inkubiert. Testkonzentrationen, Positivkontrolle und Lösungsmittelkontrollen wurden in zellspezifischem Medium in 1,33-facher Höhe der geplanten Endkonzentration hergestellt und nach dem Anwachsen der Zellen in die Wells gegeben (150 µL/Well). Als Positivkontrolle wurde 5-Fluorouracil (5-FU) eingesetzt mit einer Endkonzentration von 0,06 µg/mL für ES-D3-Zellen und 0,29 µg/mL für 3T3-Zellen.

An den Tagen 3 und 5 wurden die Testlösungen in Zellkulturmedium in der Höhe der Endkonzentration hergestellt und das Medium in der 96-Well-Platte getauscht.

Am Tag 10 wurde ein MTT-Test durchgeführt (3.5) und der IC_{50}D3-Wert (Test mit ES-D3-Zellen) bzw. IC_{50}3T3-Wert (Test mit 3T3-Zellen) bestimmt. Dazu wurden die Vitalitäten der Testkonzentrationen auf den Mittelwert der Vitalität der beiden Lösungsmittelkontrollen bezogen und aus der Konzentrations-Wirkungskurve der IC_{50}-Wert graphisch abgelesen.

3.9.3 Prädiktionsmodell zur Einstufung der Testsubstanz

Die Einstufung der Testsubstanz in eine Embryotoxizitätsklasse wurde mit Hilfe eines statistischen Prädiktionsmodells vorgenommen, das anhand experimenteller *in vivo*-Daten und *in vitro*-Daten aus dem EST für 20 Modellsubstanzen mit der Methode der linearen Diskriminanzanalyse erstellt wurde (Genschow *et al.* 2004). Das Prädiktionsmodell beinhaltet drei lineare Diskriminanz-Funktionen I - III, in die die Halbhemmkonzentrationen ID_{50}, IC_{50}D3 und IC_{50}3T3 aus den drei *in vitro*-Tests des EST eingesetzt werden. Die drei aus den Funktionen erhaltenen Zahlenwerte werden mit Klassifizierungskriterien verglichen, die die Einstufung in eine der drei Embryotoxizitätsklassen 1 bis 3 erlauben (Tab. 13).

Tab. 13: Gleichungen des validierten Prädiktionsmodells des EST. A) Lineare Diskriminanzfunktionen; B) Klassifizierungskriterien.

A	Funktion I	$5{,}92\ \lg(IC_{50}3T3) + 3{,}50\ \lg(IC_{50}D3) - 5{,}31\ \frac{IC_{50}3T3 - ID_{50}}{IC_{50}3T3} - 15{,}7$	
	Funktion II	$3{,}65\ \lg(IC_{50}3T3) + 2{,}39\ \lg(IC_{50}D3) - 2{,}03\ \frac{IC_{50}3T3 - ID_{50}}{IC_{50}3T3} - 6{,}85$	
	Funktion III	$-0{,}125\ \lg(IC_{50}3T3) - 1{,}92\ \lg(IC_{50}D3) + 1{,}50\ \frac{IC_{50}3T3 - ID_{50}}{IC_{50}3T3} - 2{,}67$	
B	Klasse 1	Nicht embryotoxisch	wenn I > II und I > III
	Klasse 2	Schwach embryotoxisch	wenn II > I und II > III
	Klasse 3	Stark embryotoxisch	wenn III > I und III > II

3.9.4 Qualitätskontrolle

Bei jedem zweiten bis dritten neu aufgetauten Zellstock wurde die Qualität der ES-D3- und 3T3-Zellen überprüft. Dazu wurde 5-FU als Referenzsubstanz im EST eingesetzt und die erzielten Halbhemmkonzentrationen mit den Validitätskriterien verglichen (Tab. 14). Als Negativkontrolle wurde außerdem eine Konzentration mit 1000 µg/mL Penicillin in allen Tests mitgeführt.

Tab. 14: Konzentrationsreihe und Validitätsgrenzen für die im EST eingesetzten Zellen (A. Seiler *pers. komm.*, vgl. 4.1) unter Verwendung der Standard-Positivsubstanz 5-Fluorouracil.

***in vitro*-Test des EST**	**Konzentrationsreihe**	**Validitätsgrenzen (µg/mL)**
Zytotoxizitätstest (3T3)	3,0; 1,0; 0,3; 0,1; 0,03; 0,01; 0,003	$IC_{50}3T3$:0,12 - 0,50
Zytotoxizitätstest (ES-D3)	1,0; 0,3; 0,1; 0,03; 0,01; 0,003; 0,001	$IC_{50}D3$: 0,04 - 0,09
Differenzierungsassay	0,09; 0,06; 0,04; 0,026; 0,018	ID_{50}: 0,04 - 0,06

3.9.5 Prüfung von Substanzen

Die Testsubstanzen wurden in DMSO, PBS oder isotoner Kochsalzlösung gelöst. Die Endkonzentrationen der Lösungsmittel im EST betrugen (v/v) 0,25% für DMSO, 1% für PBS und 2,5% für isotone Kochsalzlösung (Seiler *et al.* 2006). Die höchste eingesetzte Konzentration wurde in Abhängigkeit von der Löslichkeit der Testsubstanz festgelegt und betrug im Regelfall 1000 µg/mL. Während eines Laufes wurde dabei immer der gleiche Substanzstock verwendet.

In einem Konzentrationsfindungs-Test wurde zunächst der Konzentrationsbereich ermittelt, in dem 0 - 100% Hemmung der Differenzierung bzw. der Proliferation erzielt werden konnten.

Dazu wurde eine siebenstufige Verdünnungsreihe hergestellt, die bei 1000 µg/mL begann und in 1:10-Verdünnungen fortgesetzt wurde. Anschließend wurden die finalen ESTs durchgeführt.

Bei allen Substanzen wurden die Zytotoxizitätstests in 96-Well-Platten durchgeführt und mit den mitgelieferten Deckeln abgedeckt (3.9.2). Bei der Prüfung von 4-Hydroperoxycyclophosphamid (4HC) wurden die 96-Well-Platten mit steriler, gasdurchlässiger Folie abgeklebt, um eine Well-zu-Well-Kontamination durch die flüchtigen Zerfallsprodukte des 4HC, Acrolein und Chlorethylaziridin, zu vermeiden (Flowers *et al.* 2000).

3.9.6 Vergleich von Ergebnissen

Die Ergebnisse der Proteratogen/Teratogen-Paare, die im EST untersucht wurden, wurden mit Hilfe von drei verschiedenen Parametern verglichen:

1) Von beiden Substanzen wurde die Embryotoxizitätsklasse mit dem biostatistischen Prädiktionsmodells ermittelt (3.9.3), und die Einstufungen wurden miteinander verglichen.

2) Die Substanzpaare wurden direkt anhand ihrer Halbhemmkonzentrationen verglichen, z.B. der IC_{50}D3 des Proteratogens mit dem IC_{50}D3 des Teratogens. Durch diesen Vergleich werden die Substanzen anhand der Endpunkte Zytotoxizität und Differenzierungshemmung beurteilt, und Unterschiede werden unmittelbar sichtbar.

3) Aus den Halbhemmkonzentrationen der drei *in vitro*-Tests des EST wurden zwei verschiedene Quotienten Z und D berechnet, die embryotoxische Eigenschaften einer Testsubstanz charakterisieren.

Der Z-Quotient (Zytotoxizitätsquotient): Mit einem Vergleich der Halbhemmkonzentrationen aus den Zytotoxizitätstests des EST von ES-D3- und 3T3-Zellen kann festgestellt werden, ob die embryonalen ES-D3-Zellen sensitiver auf die Testsubstanz reagiert haben als die adulten 3T3-Zellen. Dieses Verhältnis der Halbhemmkonzentrationen zueinander wurde durch einen Zytotoxizitätsquotienten (Z-Quotient = IC_{50}3T3/IC_{50} D3) ausgedrückt. Der Z-Quotient entspricht dabei in seiner Logik einem A/D-Quotienten, der in reproduktionstoxikologischen Tierstudien vom Segment II-Typ ermittelt wird (2.1.2). Der A/D-Quotient (*Adult/Developmental*) wird dort aus den *No Observed Adverse Effect Levels* (NOAEL) oder den *Lowest Observed Adverse Effect Levels* (LOAEL) der Muttertiere (*Adult*) und der Feten (*Developmental*) berechnet und quantifiziert die Embryotoxizität einer Testsubstanz. Diese ist umso größer, je größer der A/D-Quotient ausfällt (Brown 2002). Analog dazu charakterisiert beim EST der Z-Quotient einer Substanz ihr embryotoxisches Potenzial, und durch den Vergleich verschiedener Z-Quotienten kann ermittelt werden, welche Substanz das größere embryotoxische Potenzial besitzt.

Der D-Quotient (Zytotoxizität-Differenzierungsquotient): Im Differenzierungsassay kann die Hemmung der Differenzierung der ES-D3-Zellen in Herzmuskelzellen durch eine spezifisch differenzierungshemmende Wirkung der Testsubstanz, durch eine zytotoxische Wirkung, oder durch eine Kombination beider Wirkungen hervorgerufen werden. Durch die Berechnung eines D-Quotienten aus den Halbhemmkonzentrationen des Differenzierungsassays und des Zytotoxizitätstests mit ES-D3-Zellen (D-Quotient = $IC_{50}D3/ID_{50}$) kann bestimmt werden, welche der beiden Komponenten stärker ausgeprägt ist.

3.10 Der metabolisch aktivierte EST: Methodenentwicklung

3.10.1 Diffusionseigenschaften der Anopore-Membran

Die Durchlässigkeit der Anopore-Membran für gelöste Stoffe wurde mit einer Tintenlösung geprüft. Dazu wurden in eine 96-Well-Platte 170 µL PBS pro Well pipettiert und mit 8-Well-Streifen bestückt, deren Membranen mit Kollagen benetzt waren. Die Tintenlösung (80 µL) wurde zeitversetzt in die Einsätze gegeben und unterschiedlich lange darin belassen (10; 20; 40 min; 1,3; 2,3; 6; 12 h). Danach wurden 160 µL des gefärbten PBS im Well in eine neue 96-Well-Platte überführt, um Volumengleichheit herzustellen. Die Färbung der Testwells wurde optisch mit einer Standardreihe verglichen, deren dunkelster Farbton einer vollständigen Diffusion zwischen Einsatz und Well entspricht.

3.10.2 Methoden der Anzucht von EBs in Kokultur im ersten Kultivierungsschritt

Um EBs in Kokultur anzuzüchten, wurden zwei Methoden angewendet:

V96-Methode (Abb. 7A): In eine 96-Well-Platte mit V-förmigem Boden ohne Zelladhäsionsbehandlung (V96-Platte) wurde eine Zellsuspension mit ES-D3-Zellen pipettiert ($7{,}5 \times 10^3$ Zellen/mL). Zur Kokultivierung mit Hepatomazellen wurden 8-Well-Streifen in die Wells der V96-Platte eingesetzt und je 60 µL Zellsuspension in einen Zellkultureinsatz pipettiert. Die Kokultur wurde dann für drei Tage inkubiert.

Methode B (Abb. 7B): Es wurde eine Kokultur im hängenden Tropfen hergestellt. In die Einsätze von 8-Well-Streifen wurde eine Zellsuspension mit metabolisch aktiven Zellen pipettiert (60 µL). Dann wurden 10 µL-Tropfen einer Zellsuspension aus undifferenzierten ES-D3-Zellen ($7{,}5 \times 10^4$ Zellen/mL) auf die Membranen der 8-Well-Streifen Einsätze gesetzt (750 Zellen pro Tropfen). Der 8-Well-Streifen wurde vorsichtig auf die Ränder einer 4 Well

Multischale (Nunc) platziert, die mit 1 mL PBS pro Kammer gefüllt war. Der Deckel einer zweiten 4 Well Multischale (Vivascience) wurde auf die Schale gesetzt und die Kokultur für drei Tage inkubiert.

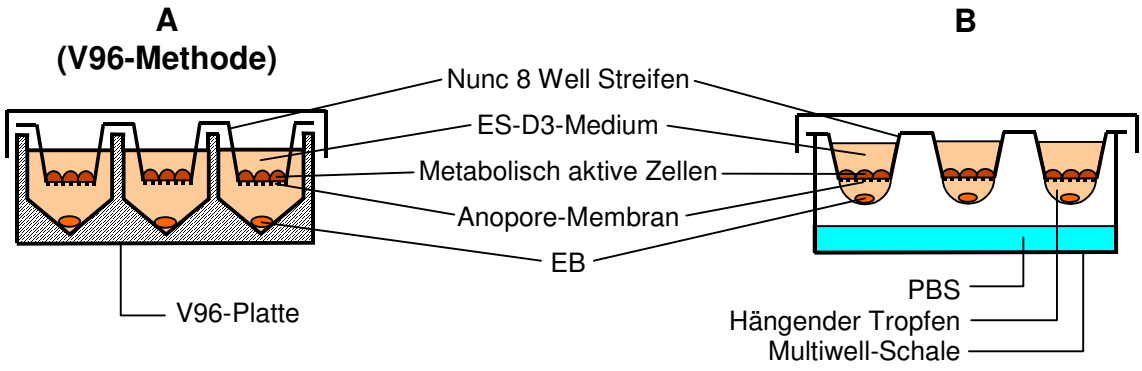


Abb. 7: Anzuchtmethoden für Embryoid Bodies (EBs) mit Kokultur metabolisch aktiver Zellen. A (V96-Methode): Anzucht in einer 96-Well-Platte mit V-förmigem Boden (V96-Platte). Zur Kokultur wurden 8-Well-Streifen in die V96-Platte eingesetzt und metabolisch aktive Zellen in die Zellkultureinsätze (Nunc 8-Well-Streifen) gesät. Methode B: Anzucht im hängenden Tropfen an 8-Well-Streifen. Zur Kokultur wurden metabolisch aktive Zellen in die Einsätze der 8-Well-Streifen gesät.

3.11 Der metabolisch aktivierte EST: Versuchsprotokoll

Das Protokoll des mEST basiert auf dem Protokoll des klassischen EST (3.9.1). Für die statische Kokultur mit den Hepatomazelllinien H4IIE bzw. HepG2 wurden Zellkultureinsätze der Firma Nunc verwendet (Anopore-Membran, 0,2 µm Porengröße). Für HepG2-Zellen wurden diese mit Kollagen benetzt (3.4.1).

3.11.1 Differenzierungsassay

In einem Differenzierungsassay wurden 6 - 8 Konzentrationen einer Testsubstanz zusammen mit einer Lösungsmittel- und einer Mediumkontrolle in Kokultur mit den metabolisch aktiven Zellen geprüft. Zusätzlich wurde eine Mediumkontrolle ohne Kokultur mitgeführt, um den Einfluss der Kokultur auf die ES-D3-Zellen zu kontrollieren. In Abbildung 8 ist der Ablauf des mEST-Differenzierungsassays schematisch dargestellt, und in Abbildung 9 sind die Kulturbehälter mit den Zellkultureinsätzen abgebildet. Bei jedem Kultivierungsschritt wurden zuerst die ES-D3-Zellen bzw. EBs in die neuen Kulturbehälter überführt, dann die Zellkultureinsätze eingesetzt und eine neue Hepatomazellkultur im Testmedium eingesät. Die Mediumkontrolle ohne Kokultur wurde nach dem Protokoll des EST-Differenzierungsassays (3.9.1) hergestellt.

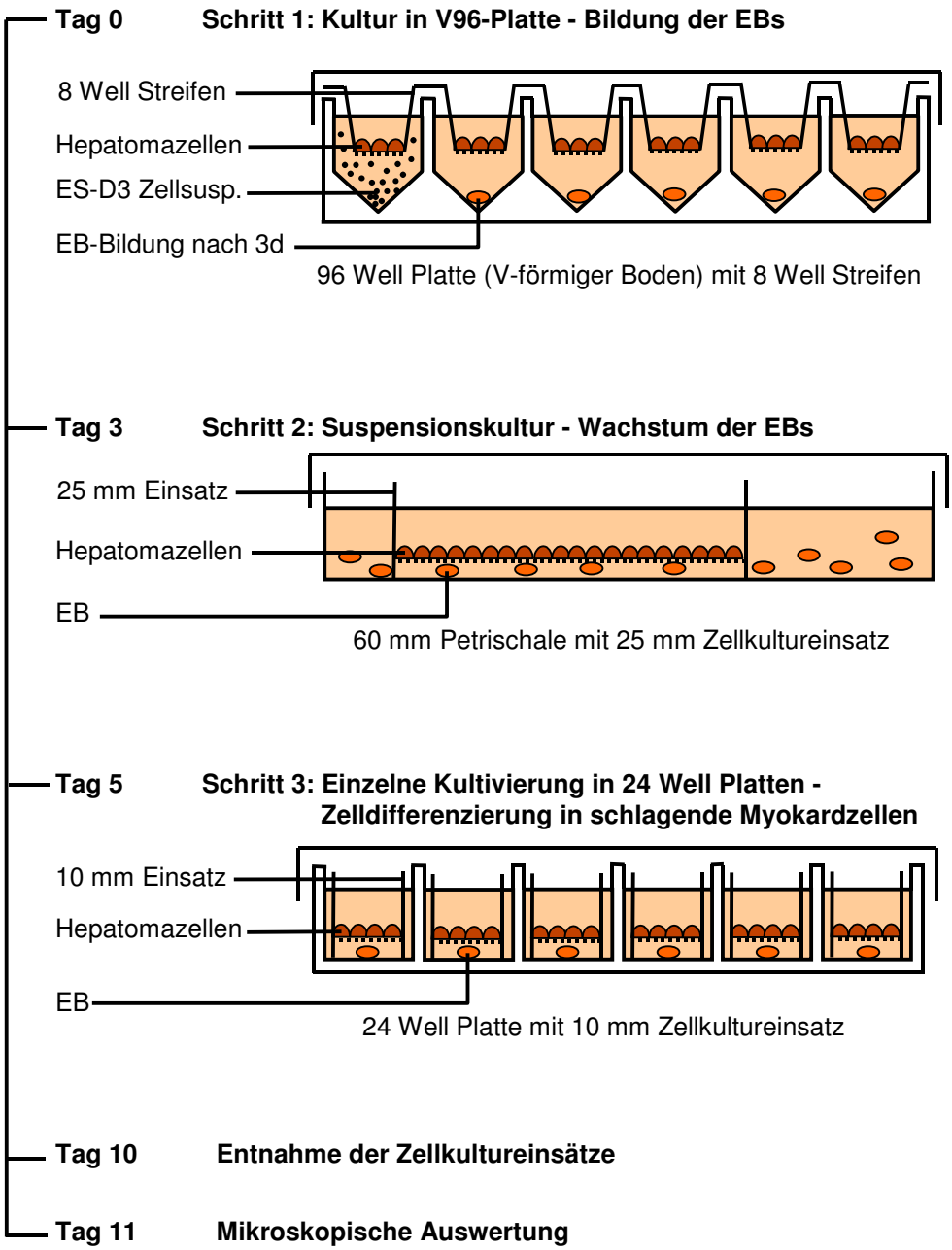
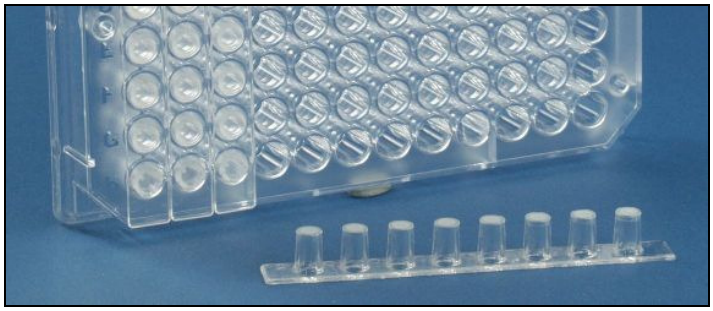
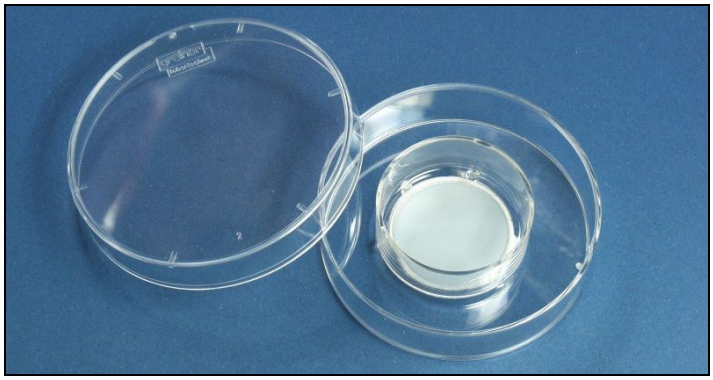


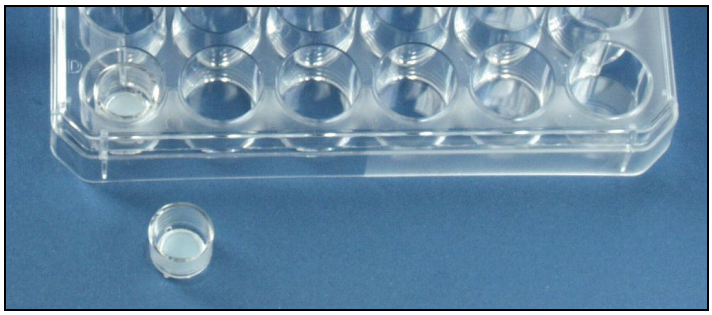
Abb. 8: Schematischer Ablauf des Differenzierungsassays des mEST. EB = Embryoid Body.



A: Zellkulturbehälter für den Kultivierungsschritt 1 (Tag 0 - 3) bei einem mEST. 96-Well-Platte mit eingesetzten 8-Well-Streifen, davor ein einzelner 8-Well-Streifen.



B: Zellkulturbehälter für den Kultivierungsschritt 2 (Tag 3 - 5) bei einem mEST. 60 mm Petrischale mit eingesetztem 25 mm Zellkultureinsatz.



C: Zellkulturbehälter für den Kultivierungsschritt 3 (Tag 5 - 10) bei einem mEST. 24 Well Platte mit 10 mm Zellkultureinsätzen.

Abb. 9: Kulturbehälter mit Zellkultureinsätzen für die drei Kultivierungsschritten eines mEST-Differenzierungsassays.

Am Tag 0 wurden Zellsuspensionen mit ES-D3-Zellen in ES-D3-Medium hergestellt ($7{,}5 \times 10^3$ Zellen/mL), und den Suspensionen Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. In eine 96-Well-Platte mit V-förmigem Boden (V96-Platte) wurden je 100 µL eines Testansatzes in 36 Wells (6×6 Wells, Plätze B4 - G9) pipettiert und die umgebenden Wells mit je 100 µL PBS befüllt. Die Kokultur mit Hepatomazellen wurde mit Hilfe von 8-Well-Streifen hergestellt, die in die V96-Platte zu den Wells mit ES-D3-Zellsuspension gesetzt werden können (Abb. 9A). Dazu wurden zunächst neue Zellsuspensionen mit Hepatomazellen in ES-D3-Medium hergestellt (Zellkonzentration sh. Tab. 15), und den Suspensionen Testsubstanz in den gleichen Konzentrationen wie für die ES-D3-Zellen zugesetzt. Für die Kokultur wurden sechs 8-Well-Streifen mit der Hepatoma-Zellsuspension befüllt, indem je 60 µL der Zellsuspension in die inneren sechs Einsätze eines 8-Well-Streifens pipettiert wurden. Die Membranen der 8-Well-Streifen wurden an der Unterseite mit ES-D3-Medium benetzt, um einer Blasenbildung beim

Einsetzen vorzubeugen. Schließlich wurden die sechs 8-Well-Streifen in die Wells der V96-Platte gesetzt, die mit ES-D3-Zellsuspension befüllt waren (Plätze B4 - G9), und für 3 Tage inkubiert.

Am Tag 3 wurden die gleichen Testansätze wie am Tag 0 hergestellt, aber ohne Zellen. Die 8-Well-Streifen wurden aus der V96-Platte entfernt und die Konfluenz und Morphologie der Hepatomazellen darin mikroskopisch beurteilt. Dann wurden die EBs aus den 36 Wells der V96-Platte mit einer Pipette entnommen (Entnahmevolumen 100 µL pro Well) und in einer 60 mm Petrischale zusammengeführt. Von den 3,6 mL Testmedium mit EBs, das sich nach dem Transfer der EBs in der Petrischale befand, wurden 2,6 mL ohne EBs abgenommen und mit 4 mL frischem Testmedium ersetzt, sodass das Endvolumen 5 mL betrug. Für eine neue Kokultur mit Hepatomazellen wurden Zellsuspensionen auf die gleiche Weise wie am Tag 0 angesetzt, jedoch in einer veränderten Zellkonzentration (Tab. 15). Die 25 mm Einsätze wurden in die Petrischalen mit den EBs gesetzt (Abb. 9B), je 2 mL Testmedium mit Hepatomazellen in die Einsätze pipettiert und die Petrischalen mit Zellkultureinsatz für zwei Tage inkubiert.

Am Tag 5 wurden die gleichen Testansätze wie am Tag 3 hergestellt. Die Zellkultureinsätze wurden aus den Petrischalen genommen und die Hepatomazellen darin mikroskopisch auf Konfluenz und Morphologie kontrolliert. Dann wurde pro Testansatz in einer 24-Well-Platte 0,5 mL Testmedium pro Well vorgelegt, mit einer Pipette die EBs der Petrischale einzeln entnommen (35 µL pro EB) und in die 24-Well-Platte überführt (ein EB pro Well). Für eine neue Kokultur wurden Zellsuspensionen mit Hepatomazellen in ES-D3-Medium angesetzt (Tab. 15) und daraus die gleichen Testmedien hergestellt wie für die ES-D3-Zellen. Die 10 mm Einsätze wurden in die 24-Well-Platte mit den EBs gesetzt (Abb. 9C), je 0,5 mL Testlösung mit Hepatomazellen in die Einsätze gegeben und die Platten mit Einsätzen für fünf Tage inkubiert.

Am Tag 10 wurden die Einsätze aus den 24-Well-Platten genommen, Konfluenz und Morphologie der Hepatomazellen mikroskopisch beurteilt und die 24-Well-Platten ohne Einsätze für einen weiteren Tag inkubiert.

Am Tag 11 wurden die 24-Well-Platten wie beim EST ausgewertet und der ID_{50}-Wert bestimmt (3.9.1).

Tab. 15: Zellkonzentrationen für die Aussaat von H4IIE- bzw. HepG2-Zellen in Zellkultureinsätzen zur Kokultur im Differenzierungsassay des mEST.

Kultivierungsschritt	Format Zellkultureinsatz	H4IIE-Zellen		HepG2-Zellen	
		Zellen/mL	Zellen/Einsatz	Zellen/mL	Zellen/Einsatz
Schritt 1	8-Well-Streifen	$6{,}9 \times 10^4$	$4{,}1 \times 10^3$	$1{,}0 \times 10^5$	$6{,}0 \times 10^3$
Schritt 2	25 mm Einsätze	$1{,}7 \times 10^5$	$3{,}4 \times 10^5$	$2{,}8 \times 10^5$	$5{,}6 \times 10^5$
Schritt 3	10 mm Einsätze	$2{,}4 \times 10^4$	$1{,}2 \times 10^4$	$5{,}0 \times 10^4$	$2{,}5 \times 10^4$

3.11.2 Zytotoxizitätstest mit ES-D3- und 3T3-Zellen

In einer 96-Well-Platte wurden in 6-fach-Bestimmung sieben Konzentrationen der Testsubstanz mit einer Positivkontrolle und zwei Lösungsmittelkontrollen für 7 Tage inkubiert. Für die Kokultur wurden zusätzlich 8-Well-Streifen mit Hepatomazellen in die Platte eingesetzt. Mediumwechsel und Einsaat neuer Hepatomazellen wurde im gleichen Zeitraster wie beim Differenzierungsassay vorgenommen.

Am Tag 0 wurde von undifferenzierten ES-D3-Zellen bzw. 3T3-Zellen eine Zellsuspension mit 1×10^4 Zellen/mL hergestellt, 50 µL pro Well davon in eine 96-Well-Platte pipettiert und zum Anwachsen für 3 h inkubiert. Testkonzentrationen, Positivkontrolle und Lösungsmittelkontrollen wurden in zellspezifischem Medium in 1,42-facher Höhe der geplanten Endkonzentration hergestellt und nach dem Anwachsen zu den Zellen gegeben (120 µL/Well). Als Positivkontrolle wurde 5-Fluorouracil (5-FU) eingesetzt mit einer Endkonzentration von 0,06 µg/mL für ES-D3-Zellen, und 0,29 µg/mL für 3T3-Zellen. Diese wurde ohne Kokultur wie im EST behandelt (3.9.2). Von den Hepatomazellen wurden Zellsuspensionen in ES-D3-Medium bzw. 3T3-Medium angesetzt (Tab. 16) und daraus die gleichen Testlösungen hergestellt wie für die ES-D3-Zellen. Dann wurde pro Testlösung von einem 8-Well-Streifen die inneren sechs Einsätze mit je 80 µL der Zellsuspension befüllt. Die Membranen der 8-Well-Streifen wurden an der Unterseite mit ES-D3- bzw. 3T3-Medium benetzt, um einer Blasenbildung beim Einsetzen vorzubeugen, in die V96-Platte eingesetzt und für 3 Tage inkubiert. Das Gesamtvolumen eines Wells betrug 250 µL.

An den Tagen 3 und 5 wurden die 8-Well-Streifen den 96-Well-Platten entnommen und die Konfluenz und Morphologie der Hepatomazellen mikroskopisch beurteilt. Die Testlösungen wurden in Zellkulturmedium wie am Tag 0 hergestellt, jedoch in Höhe der Endkonzentration. Dann wurde von den 96-Well-Platten das Medium abgenommen und durch 170 µL Testlösung pro Well ersetzt. Bei der Positivkontrolle wurden 200 µL Testlösung ersetzt. Von den Hepatomazellen wurden Zellsuspensionen in ES-D3-Medium angesetzt (Tab. 16) und daraus die

gleichen Testlösungen hergestellt wie für die ES-D3-Zellen. Dann wurden wie am Tag 0 die 8-Well-Streifen mit je 80 µL Zellsuspension befüllt, in die V96-Platte eingesetzt und die Platte mit Einsätzen für 2 Tage inkubiert.

Am Tag 7 wurden die 8-Well-Streifen den 96-Well-Platten entnommen und Konfluenz und Morphologie der Hepatomazellen mikroskopisch beurteilt. Dann wurde wie beim EST mit den ES-D3- bzw. 3T3-Zellen ein Zytotoxizitätstest durchgeführt (3.5.2.1) und der IC_{50}D3- bzw. IC_{50}3T3-Wert bestimmt (3.9.2).

Tab. 16: Zellkonzentrationen für die Aussaat von H4IIE- bzw. HepG2-Zellen in 8-Well-Streifen zur Kokultur im Zytotoxizitätstest des mEST.

Kultivierungsschritt	H4IIE-Zellen		HepG2-Zellen	
	Zellen/mL	Zellen/Einsatz*	Zellen/mL	Zellen/Einsatz*
Schritt 1	$5{,}1 \times 10^4$	$4{,}1 \times 10^3$	$7{,}5 \times 10^4$	$6{,}0 \times 10^3$
Schritte 2 und 3	$8{,}5 \times 10^4$	$6{,}8 \times 10^3$	$1{,}3 \times 10^5$	$1{,}0 \times 10^4$

* Ein einzelner Einsatz eines 8-Well-Streifens für ein Well.

3.11.3 Prüfung von Substanzen

Die Prüfung einer Substanz im mEST wurde nach dem gleichen Schema wie bei einem EST durchgeführt (3.9).

3.11.4 Vergleich von Ergebnissen

Die Ergebnisse der im mEST untersuchten Proteratogene wurden mit den Ergebnissen aus dem EST anhand der Z- und D-Quotienten sowie der Halbhemmkonzentrationen verglichen (3.9.6). Ein Vergleich mit Hilfe der Ergebnisse aus dem Prädiktionsmodell war nicht möglich, da das Modell spezifisch für den EST entwickelt wurde.

Damit die *in vitro*-Tests aus EST und mEST bzw. die daraus berechneten Z- und D-Quotienten miteinander verglichen werden können, müssen die Tests unter gleichen Bedingungen durchgeführt worden sein. Ein Unterschied zwischen EST und mEST ergibt sich durch die Expositionszeiten, da die Zytotoxizitätstests im EST zehn Tage dauern, während sie im mEST bereits nach sieben Tagen ausgewertet werden. Für eine direkte Vergleichbarkeit der Tests und der Quotienten war es daher erforderlich, die Proteratogene zusätzlich in sieben Tage dauernden EST-Zytotoxizitätstests zu prüfen. Die Berechnung der Z- und D-Quotienten wurde für einen Vergleich zwischen EST und mEST daher wie folgt verändert (Gleichungen 4 - 6):

Berechnung des Z-Quotienten für einen Vergleich zwischen EST und mEST

Gleichung 4: Z-Quotient für EST bzw. Z-Quotient für mEST $= \frac{IC_{50}3T3 \text{ (7 Tage Exposition)}}{IC_{50}D3 \text{ (7 Tage Exposition)}}$

Berechnung des D-Quotienten für einen Vergleich zwischen EST und mEST

Gleichung 5: D-Quotient für EST $= \frac{IC_{50}D3 \text{ (7 Tage Exposition)}}{ID_{50} \text{ (10 Tage Exposition)}}$

Gleichung 6: D-Quotient für mEST $= \frac{IC_{50}D3 \text{ (7 Tage Exposition)}}{ID_{50} \text{ (11 Tage Exposition)}}$

4 Ergebnisse

Im ersten Teil dieses Kapitels wird auf die Validierung des EST näher eingegangen (4.1). Dazu wurden bekannte Positiv- und Negativsubstanzen im EST getestet und mit den bereits veröffentlichten Validierungskriterien verglichen. Im weiteren wird der EST auf seine Fähigkeit hin untersucht, Proteratogene von Teratogenen zu unterscheiden. Dazu wurden bekannte Proteratogen-Teratogen-Paare ausgewählt und im EST getestet (4.2). Der zweite Teil umfasst die Entwicklung eines metabolisch kompetenten EST (mEST), in dem Leberzellen in einer statischen Kokultur an den EST gekoppelt wurden. Im Zuge dieser Entwicklung wurden die dafür am besten geeigneten Leberzellen ausgewählt und ihre metabolische Aktivität anhand von Enzymassays und dem Umsatz von Modellsubstanzen charakterisiert (4.3). Im letzten Teil wurden ausgewählte Proteratogene in dem mEST abschließend getestet (4.4).

4.1 Validierung des EST

Der EST wurde im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes mit 5-Fluorouracil (5-FU, Positivsubstanz) und Penicillin G (PenG, Negativsubstanz) nach Genschow *et al.* (2004) validiert. Während der Tests für die vorliegende Arbeit wurde 5-FU routinemäßig als Positivsubstanz bei jedem zweiten oder dritten Auftauen eines neuen Zellstocks getestet (Auftaukontrolle).

Zur anfänglichen Validierung des EST wurde PenG zweifach und 5-FU dreifach getestet (Tab. 17). Es zeigte sich, dass PenG wie erwartet keine Embryotoxizität aufwies, alle Halbhemmkonzentrationen über 1000 µg/mL lagen und der Test damit valide reagierte. Für 5-FU wurden die Validitätskriterien ebenfalls größtenteils eingehalten. Alle Zytotoxizitätsuntersuchungen waren valide, der Differenzierungsassay reagierte jedoch in zwei von drei Tests etwas empfindlicher, wenn man die anfänglichen Validitätsgrenzen zugrunde legte (ZEBET 2001; siehe VG1 in Tabelle 17). Im Rahmen des Verbundprojektes wurde von den beteiligten Laboren festgestellt, dass die verwendete ES-D3-Zelllinie gegenüber 5-FU allgemein etwas empfindlicher reagierte. Deshalb wurden die Validitätsbereiche erweitert (A. Seiler *pers. komm.*; siehe VG2 in Tabelle 17). Unter Berücksichtigung dieser neuen Grenzen wurde der EST als valide eingestuft.

Tab. 17: Ergebnisse der Validierung des EST mit 5-Fluorouracil (5-FU) und Penicillin G (PenG).

Substanz/ Grenze	Lauf	IC_{50}3T3 (µg/mL)	IC_{50}D3 (µg/mL)	ID_{50} (µg/mL)	Prädiktions-modell[a]
5-FU	1	0,38	0,050	0,033	stark
5-FU	2	0,45	0,048	0,047	stark
5-FU	3	0,29	0,057	0,052	stark
PenG	1	>1000	>1000	>1000	nicht
PenG	2	>1000	>1000	>1000	nicht
VG1 (5-FU)	-	0,12 - 0,50	0,048 - 0,086	0,048 - 0,06	-
VG2 (5-FU)	-	0,12 - 0,50	0,04 - 0,09	0,04 - 0,06	-

[a]Einstufung der Testsubstanz vom Prädiktionsmodell als stark, schwach oder nicht embryotoxisch. VG = Validitätsgrenze; VG1 = VG des EST nach ZEBET (2001); VG2 = VG des EST im BMBF-Projekt (A. Seiler *pers. komm.*)

4.2 Untersuchung von Proteratogenen und Teratogenen im EST

Zur Untersuchung der Proteratogene und Teratogene wurden im EST, der im einzelnen aus zwei Zytotoxizitätstests mit ES-D3-Zellen bzw. 3T3-Zellen und einem Differenzierungsassay mit ES-D3-Zellen besteht (3.9), drei Endpunkte geprüft und die Halbhemmkonzentrationen ermittelt. In den zwei Zytotoxizitätstests wurde die Hemmung der Proliferation der Zellen mit dem MTT-Test bestimmt und als IC_{50}D3- bzw. IC_{50}3T3-Wert ausgedrückt (3.9.2). Im Differenzierungsassay wurde der hemmende Einfluss der Testsubstanz auf die Differenzierung der ES-D3-Zellen in kontrahierende Kardiomyozyten untersucht und als ID_{50}-Wert ausgedrückt (3.9.1). Die Ergebnisse der Testansätze wurden bei allen drei *in vitro*-Tests auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, welche auf 100% gesetzt wurde. Durch dieses Verfahren konnte es vorkommen, dass die Zellvitalität bzw. die Menge an schlagenden Herzmuskelzellen 100% überstieg, wenn in den Testansätzen der Zytotoxizitätstests die Zellen im Vergleich zur Kontrolle stärker gewachsen waren, oder sich im Differenzierungsassay mehr Zellen als in der Kontrolle differenziert hatten. Die Embryotoxizität der Testsubstanzen wurde zum einen mit Hilfe des Prädiktionsmodells bestimmt (3.9.3). Zum anderen wurde aus den Halbhemmkonzentrationen zwei Quotienten Z und D gebildet, die embryotoxische Eigenschaften der Testsubstanz beschreiben (3.9.6). Der Z-Quotient (Zytotoxizitätsquotient) charakterisiert das embryotoxische Potenzial der Testsubstanz, während mit dem D-Quotient (Zytotoxizität-Differenzierungsquotient) die spezifisch differenzierungshemmende Wirkung der Testsubstanz bestimmt werden kann.

4.2.1 Valpromid und Valproinsäure

Als erstes Substanzpaar wurden die strukturverwandten Antiepileptika Valpromid und Valproinsäure im EST getestet. Die Substanzen wurden in DMSO gelöst von der TiHo bezogen (Tab. 5) und mit einer Endkonzentration von 0,25% v/v DMSO im EST eingesetzt (Abb. 10 und Tab. 18). Eine Wiederfindung des Valpromid in der Valpromid-Stocklösung von 74% wurde bei der Angabe der Ergebnisse berücksichtigt.

Vom Prädiktionsmodell wurden beide Substanzen als schwach embryotoxisch eingestuft und ließen sich daher anhand dieses Parameters nicht voneinander unterscheiden. Die Z-Quotienten der Valproinsäure fielen mit 2,8 - 3,4 größer aus als die des Valpromid mit >1,9 und kennzeichneten so die Valproinsäure als die gegenüber ES-D3-Zellen embryotoxischere Substanz. Auch die D-Quotienten der Valproinsäure waren mit 2,5 - 7,6 größer als die des Valpromid mit 1,8 und zeigten damit an, dass die differenzierungshemmende Komponente der Valproinsäure stärker ausgeprägt war. Im direkten paarweisen Vergleich der Halbhemmkonzentrationen lagen die Werte von Valproinsäure im Mittel 1,2-fach (IC_{50}3T3), 1,9-fach (IC_{50}D3) bzw. 4,3-fach (ID_{50}) unter den Werten von Valpromid, sodass Valproinsäure in allen drei EST-*in vitro*-Einzeltests toxischer wirkte.

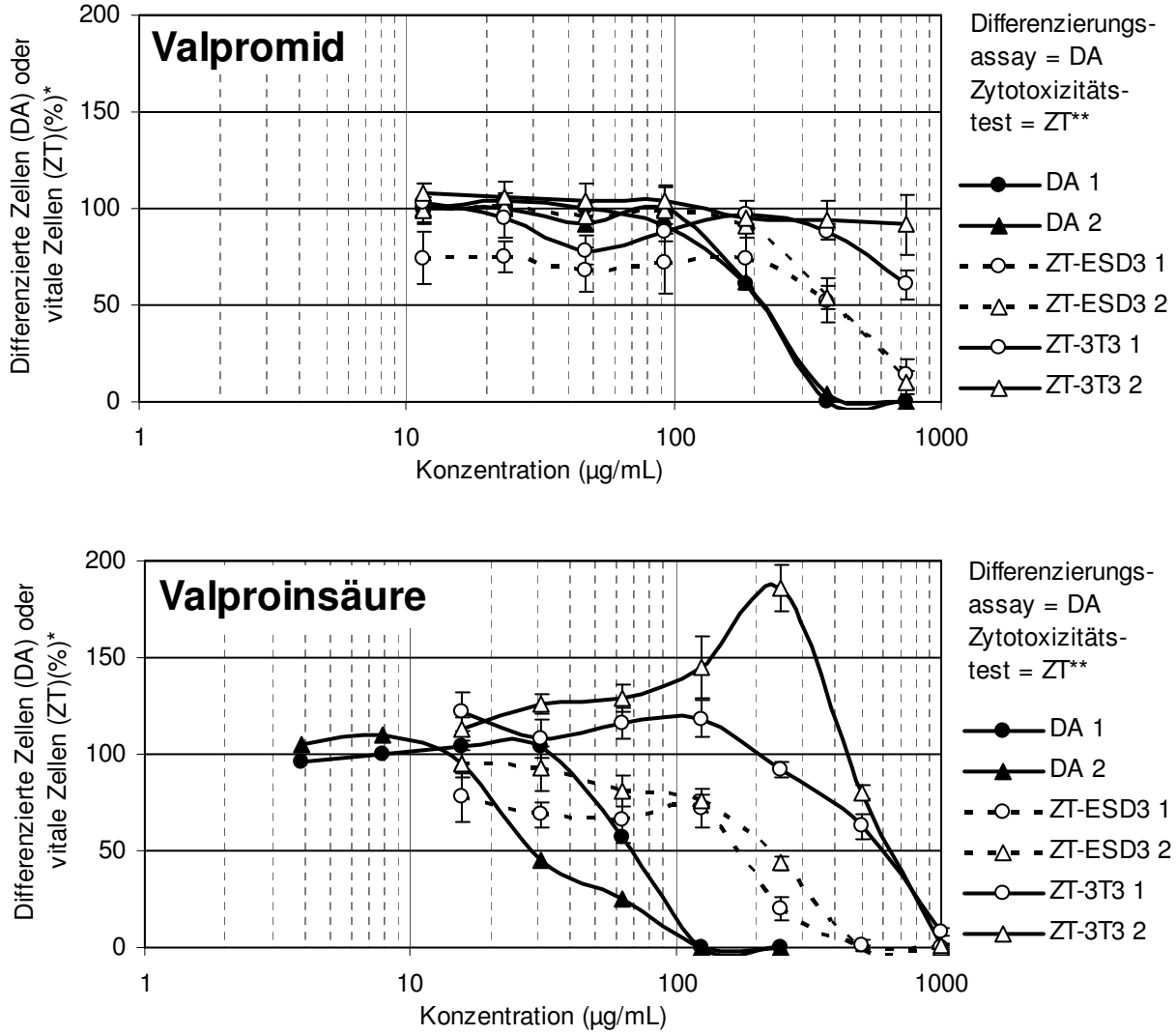


Abb. 10: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Valpromid und Valproinsäure im EST (3.9); Lösungsmittel 0,25% v/v DMSO. Pro Substanz wurden zwei unabhängige ESTs durchgeführt. Die Messwerte der Zytotoxizitätstests sind mit ihrer Standardabweichung angegeben. *Beim Differenzierungsassay (DA) ist der Prozentsatz an Zellen angegeben, die sich am Ende des Tests in schlagende Herzmuskelzellen differenziert haben; bei den Zytotoxizitätstests (ZT) ist der Prozentsatz an Zellen angegeben, die am Ende des Tests vital waren. In allen drei *in vitro*-Tests wurden die Ergebnisse der Testansätze auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, welche auf 100% gesetzt wurde. **ZT-ESD3 bzw. -3T3 = Zytotoxizitätstest mit ES-D3- bzw. 3T3-Zellen.

Tab. 18: Halbhemmkonzentrationen von Valpromid (VPD) und Valproinsäure (VPA), die im EST bestimmt wurden (3.9), und Klassifizierung der Embryotoxizität der Testsubstanzen mit Hilfe des Prädiktionsmodells (3.9.3). Als Lösungsmittel wurde 0,25% v/v DMSO verwendet. Die Halbhemmkonzentrationen wurden aus den Konzentrations-Wirkungskurven des EST graphisch ermittelt. Lauf 1 und 2 stellen zwei voneinander unabhängige Versuche dar.

Substanz	Lauf	IC_{50}3T3 (µg/mL)	IC_{50}D3 (µg/mL)	ID_{50} (µg/mL)	Prädiktions-modell[a]
VPD	1	>740	380	210	schwach
	2	>740	386	215	schwach
VPA	1	600	175	69	schwach
	2	620	220	29	schwach

[a]Einstufung der Testsubstanz vom Prädiktionsmodell als stark, schwach oder nicht embryotoxisch.

Tab. 19: Z- und D-Quotienten von Valpromid (VPD) und Valproinsäure (VPA). Die Quotienten wurden aus den Halbhemmkonzentrationen der *in vitro*-Tests des EST berechnet (3.9.6).

Substanz	Lauf	Z-Quotient (IC_{50}3T3 / IC_{50}D3)	D-Quotient (IC_{50}D3 / ID_{50})
VPD	1	>1,9	1,8
VPD	2	>1,9	1,8
VPA	1	3,4	2,5
VPA	2	2,8	7,6

Z-Quotient = Zytotoxizitätsquotient; D-Quotient = Zytotoxizität-Differenzierungsquotient.

Der EST konnte damit zwischen Valpromid und Valproinsäure anhand der Z- und D-Quotienten sowie anhand des direkten Vergleichs der Halbhemmkonzentrationen diskriminieren, während mit dem Prädiktionsmodell kein Unterschied gezeigt werden konnte. Aufgrund der größeren Z- und D-Quotienten besitzt Valproinsäure ein größeres embryotoxisches Potenzial und eine größere differenzierungshemmende Komponente.

4.2.2 Retinol und all-*trans*-Retinsäure

Als weiteres Substanzpaar wurden Retinol und all-*trans*-Retinsäure (Retinsäure) im EST untersucht. Auch diese Substanzen wurden in DMSO gelöst von der TiHo bezogen (Tab. 5) und mit einer Konzentration von 0,25% v/v DMSO im EST eingesetzt (Abb. 11 und Tab. 20). Im Laufe der Versuche stellte sich heraus, dass die Retinoid-Konzentrationen in den Stocklösungen abnahmen. Deshalb wurde die Wiederfindung von Retinol und Retinsäure im ES-D3-Medium mehrfach ermittelt (sh. Kapitel 4.4.2.4), und die Ergebnisse wurden entsprechend korrigiert. In den ESTs mit Retinol wurde mit einer Wiederfindung von 38% gerechnet, in den ESTs mit Retinsäure mit einer Wiederfindung von 88% (Tab. 42).

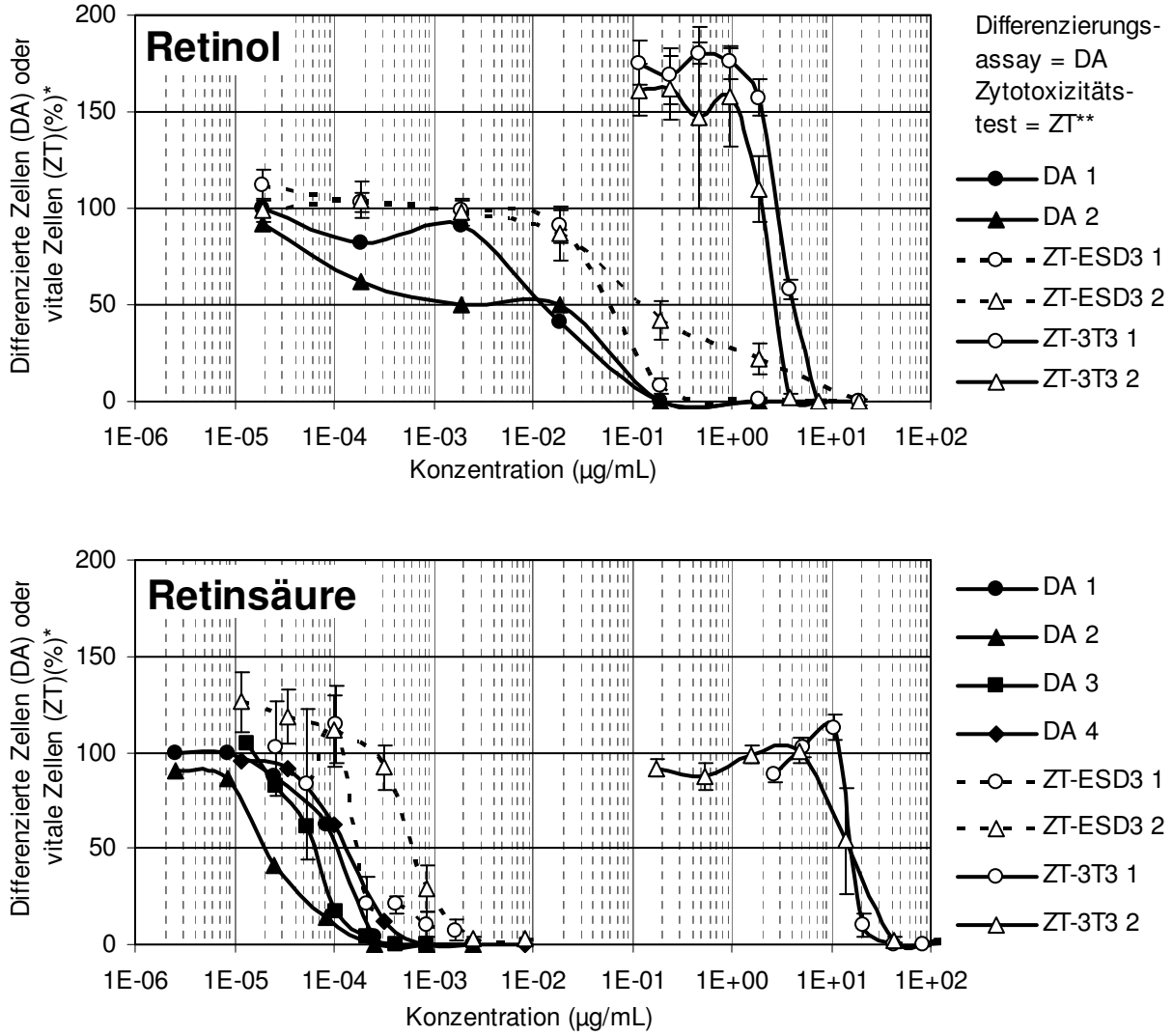


Abb. 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Retinol und Retinsäure im EST (3.9); Lösungsmittel 0,25% v/v DMSO. Pro Substanz wurden zwei unabhängige ESTs durchgeführt; die Retinsäure wurde im Differenzierungsassay vierfach getestet. Die Messwerte der Zytotoxizitätstests sind mit ihrer Standardabweichung angegeben. *Beim Differenzierungsassay (DA) ist der Prozentsatz an Zellen angegeben, die sich am Ende des Tests in schlagende Herzmuskelzellen differenziert haben; bei den Zytotoxizitätstests (ZT) ist der Prozentsatz an Zellen angegeben, die am Ende des Tests vital waren. In allen drei *in vitro*-Tests wurden die Ergebnisse der Testansätze auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, welche auf 100% gesetzt wurde. **ZT-ESD3 bzw. -3T3 = Zytotoxizitätstest mit ES-D3- bzw. 3T3-Zellen.

Tab. 20: Halbhemmkonzentrationen von Retinol (RO) und all-*trans*-Retinsäure (RA), die im EST bestimmt wurden (3.9), und Klassifizierung der Embryotoxizität der Testsubstanzen mit Hilfe des Prädiktionsmodells (3.9.3). Als Lösungsmittel wurde 0,25% v/v DMSO verwendet. Die Halbhemmkonzentrationen wurden aus den Konzentrations-Wirkungskurven des EST graphisch ermittelt. Lauf 1 und 2 stellen zwei voneinander unabhängige Versuche dar. Der Differenzierungsassay mit Retinsäure wurde aufgrund der größeren Schwankungen der Ergebnisse vierfach wiederholt.

Substanz	Lauf	IC_{50}3T3 (µg/mL)	IC_{50}D3 (ng/mL)	ID_{50} (ng/mL)	Prädiktions-modell[a]
RO	1	4,2	61	11	stark
RO	2	2,7	118	19	stark
RA	1	17	0,18	0,11	stark
RA	2	16	0,62	0,020	stark
RA	3	-	-	0,066	-
RA	4	-	-	0,15	-

[a]Einstufung der Testsubstanz vom Prädiktionsmodell als stark, schwach oder nicht embryotoxisch.

Tab. 21: Z- und D-Quotienten von Retinol (RO) und all-*trans*-Retinsäure (RA). Die Quotienten wurden aus den Halbhemmkonzentrationen der *in vitro*-Tests des EST berechnet (3.9.6).

Substanz	Lauf	Z-Quotient (IC_{50}3T3 / IC_{50}D3)	D-Quotient (IC_{50}D3 / ID_{50})
RO	1	69	5,5
RO	2	23	6,2
RA	1	94000	1,6
RA	2	26000	31

Z-Quotient = Zytotoxizitätsquotient; D-Quotient = Zytotoxizität-Differenzierungsquotient.

Das Prädiktionsmodell stufte beide Retinoide gleichermaßen als stark embryotoxisch ein, sodass sich auf dieser Basis kein Unterschied zwischen den Substanzen ergab. Beim Vergleich der Z-Quotienten wurde jedoch ein großer Unterschied deutlich: die Retinsäure wies ein etwa 1000-fach größeres embryotoxisches Potenzial auf als das Retinol. Anhand der D-Quotienten konnte dagegen keine Aussage über einen Unterschied getroffen werden, da die beiden D-Quotienten der Retinsäure mit 1,6 und 31 stark schwankten und verglichen mit dem Bereich der D-Quotienten des Retinols von 5,5 - 6,2 einmal darunter und einmal darüber lagen. Im direkten Vergleich der Halbhemmkonzentrationen der Substanzen untereinander wirkte die Retinsäure auf die ES-D3-Zellen um gut zwei Größenordnungen toxischer als das Retinol, sowohl in den Zytotoxizitätstests als auch im Differenzierungsassay. Die 3T3-Zellen reagierten dagegen im Zytotoxizitätstest auf die Retinsäure etwa fünffach weniger empfindlich.

Der EST konnte damit zwischen Retinol und Retinsäure basierend auf den Z-Quotienten und dem Vergleich der Halbhemmkonzentrationen diskriminieren, während das Prädiktionsmodell

beide Substanzen gleich einstufte. Aufgrund des 1000-fach höheren Z-Quotienten besitzt die Retinsäure ein größeres embryotoxisches Potenzial als Retinol.

4.2.3 Cyclophosphamid und 4-Hydroperoxycyclophosphamid

Als weiteres Substanzpaar wurden das Cytostatikum Cyclophosphamid (CPP) und die Vorläufersubstanz seines Metaboliten 4-Hydroxycyclophosphamid, das 4-Hydroperoxycyclophosphamid (4HC), im EST untersucht. Stammlösungen von Cyclophosphamid in DMSO (CPP-DMSO) wurden von der TiHo verschickt (Tab. 5), und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Da das 4HC laut Herstellerangabe in wässriger Lösung gelöst werden sollte, wurden von Cyclophosphamid außerdem Stammlösungen in isotoner Kochsalzlösung hergestellt (CPP-i.K.), um Cyclophosphamid und 4HC im gleichen Lösungsmittel gelöst miteinander vergleichen zu können. Für die Tests mit Cyclophosphamid und 4HC in isotoner Kochsalzlösung wurde vor jedem Kultivierungsschritt eine Stocklösung frisch hergestellt, da beide Substanzen in wässriger Lösung bei Raumtemperatur 30 min (4HC) bzw. 24 h (Cyclophosphamid) stabil sind (Flowers *et al.* 2000; Sifton 1995). Die Ergebnisse der Tests sind in Abbildung 12 und Tabelle 22 zusammengefasst.

Zunächst war auffällig, dass der mittlere ID_{50} von 4HC mit 0,56 µg/mL höher lag als der mittlere IC_{50}D3 von 0,14 µg/mL und der Differenzierungsassay damit auf 4HC weniger empfindlich reagiert hatte als der Zytotoxizitätstest. Dieser Unterschied ist auch in Abbildung 12 gut erkennbar, denn die Konzentrations-Wirkungskurven der Zytotoxizitätstests mit ES-D3-Zellen sind deutlich nach links verschoben. Dieses Ergebnis ist biologisch paradox, da sich hiernach die ES-D3-Zellen bei einer zytotoxischen Cyclophosphamid-Konzentration differenzieren würden. Deshalb konnten die ID_{50}-Werte nicht gewertet werden und sind in Tabelle 22 in Klammern gefasst. Eine Klassifizierung des 4HC durch das Prädiktionsmodell (Tab. 22) sowie die Berechnung der D-Quotienten (Tab. 23) war damit nicht möglich. Im vorliegenden Fall konnte die Implausibilität auf unterschiedliche Expositionsbedingungen in den verschiedenen *in vitro*-Tests des EST zurückgeführt werden, was in Kapitel 5.1 näher diskutiert wird.

Das Cyclophosphamid wurde vom Prädiktionsmodell unabhängig vom Lösungsmittel als schwach embryotoxisch eingestuft. Zum Vergleich der Z- und D-Quotienten sowie der Halbhemmkonzentrationen wurden die Tests mit isotoner Kochsalzlösung als Lösungsmittel herangezogen. Die Z-Quotienten beider Substanzen waren etwa gleich groß, sodass sie sich in ihrem embryotoxischen Potenzial nicht unterschieden. Die D-Quotienten von 4HC waren aufgrund der versuchstechnischen Einflüsse auf die ID_{50}-Werte nicht auswertbar und konnten daher mit den

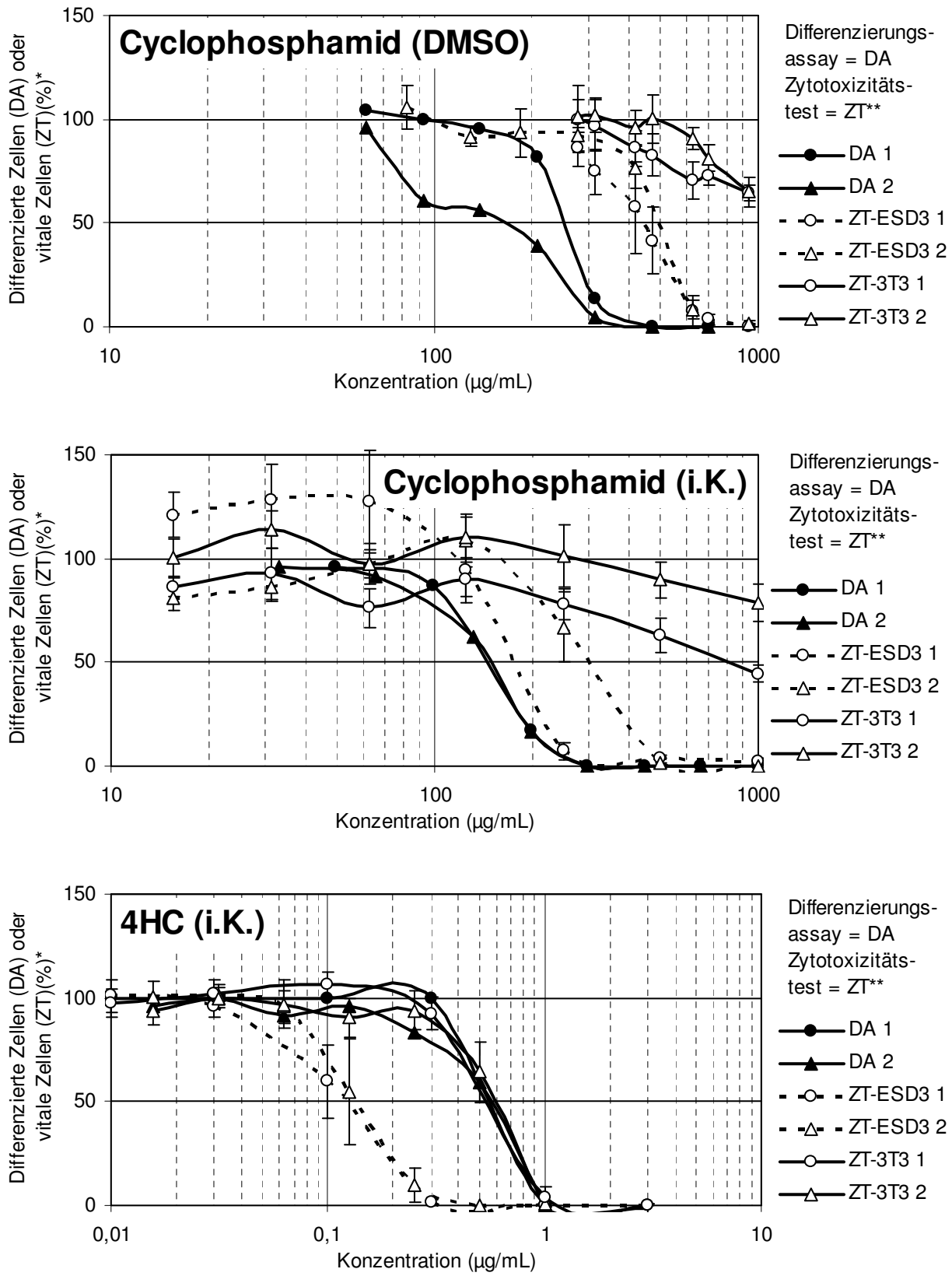


Abb. 12: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Cyclophosphamid und 4HC im EST (3.9); Lösungsmittel 0,25% v/v DMSO oder 2,5% v/v isotone Kochsalzlösung (i.K.). Pro Substanz wurden zwei unabhängige ESTs durchgeführt. Die Messwerte der Zytotoxizitätstests sind mit ihrer Standardabweichung angegeben. *Beim Differenzierungsassay (DA) ist der Prozentsatz an Zellen angegeben, die sich am Ende des Tests in schlagende Herzmuskelzellen differenziert haben; bei den Zytotoxizitäts-

tests (ZT) ist der Prozentsatz an Zellen angegeben, die am Ende des Tests vital waren. In allen drei *in vitro*-Tests wurden die Ergebnisse der Testansätze auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, welche auf 100% gesetzt wurde. **ZT-ESD3 bzw. -3T3 = Zytotoxizitätstest mit ES-D3- bzw. 3T3-Zellen.

Tab. 22: Halbhemmkonzentrationen von Cyclophosphamid (CPP) und 4HC, die im EST bestimmt wurden (3.9), und Klassifizierung der Embryotoxizität der Testsubstanzen mit Hilfe des Prädiktionsmodells (3.9.3). Das Cyclophosphamid wurde sowohl in DMSO (CPP-DMSO; 0,25% v/v) als auch in isotoner Kochsalzlösung (CPP-i.K.; 2,5% v/v) gelöst und getestet. Das 4HC wurde nur in isotoner Kochsalzlösung gelöst und getestet (4HC-i.K.; 2,5% v/v). Die Halbhemmkonzentrationen wurden aus den Konzentrations-Wirkungskurven des EST graphisch ermittelt. Lauf 1 und 2 stellen zwei voneinander unabhängige Versuche dar.

Substanz	Lauf	IC_{50}3T3 (µg/mL)	IC_{50}D3 (µg/mL)	ID_{50} (µg/mL)	Prädiktions-modell[a]
CPP-DMSO	1	>940	450	260	schwach
	2	>940	480	170	schwach
CPP-i.K.	1	800	170	150	schwach
	2	>1000	300	150	schwach
4HC-i.K.	1	0,53	0,13	(0,55)[b]	-
	2	0,60	0,14	(0,56)[b]	-

[a]Einstufung der Testsubstanz vom Prädiktionsmodell als stark, schwach oder nicht embryotoxisch. [b]Die Expositionsbedingungen in diesem Test unterschieden sich von den Bedingungen der anderen Tests mit 4HC, sodass die ID_{50}-Werte für eine weitere Auswertung nicht verwendet werden konnten.

Tab. 23: Z- und D-Quotienten von Cyclophosphamid (CPP) und 4HC. Die Quotienten wurden aus den Halbhemmkonzentrationen der *in vitro*-Tests des EST berechnet (3.9.6).

Substanz	Lauf	Z-Quotient (IC_{50}3T3 / IC_{50}D3)	D-Quotient (IC_{50}D3 / ID_{50})
CPP-DMSO	1	>2,1	1,7
	2	>2,0	2,8
CPP-i.K.	1	4,7	1,1
	2	>3,3	2,0
4HC-i.K.	1	4,1	-
4HC-i.K.	2	4,3	-

Z-Quotient = Zytotoxizitätsquotient; D-Quotient = Zytotoxizität-Differenzierungsquotient; CPP-DMSO = CPP gelöst in DMSO (0,25% v/v); CPP-i.K. = Cyclophosphamid gelöst in isotoner Kochsalzlösung (2,5% v/v); 4HC-i.K. = 4-Hydroperoxycyclophosphamid gelöst in isotoner Kochsalzlösung (2,5% v/v).

D-Quotienten des Cyclophosphamid nicht verglichen werden. Beim direkten Vergleich der Halbhemmkonzentrationen der Substanzen untereinander zeigte sich ein großer Unterschied. Die IC_{50}-Werte von 4HC lagen um etwa drei Größenordnungen niedriger als die von CPP-i.K..

Der EST konnte damit Cyclophosphamid von 4HC auf der Basis des direkten Vergleichs der IC_{50}-Werte diskriminieren und charakterisierte 4HC als die zytotoxischere Substanz. Bezogen auf die Z-Quotienten besitzen beide Substanzen das gleiche embryotoxische Potenzial.

4.2.4 Albendazol und Albendazol-Sulfoxid

Das Anthelminticum Albendazol und sein aktiver Metabolit Albendazol-Sulfoxid wurden im EST geprüft und dazu in DMSO gelöst. Die DMSO-Konzentration in den Tests betrug 0,25% v/v. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 und Tabelle 24 dargestellt.

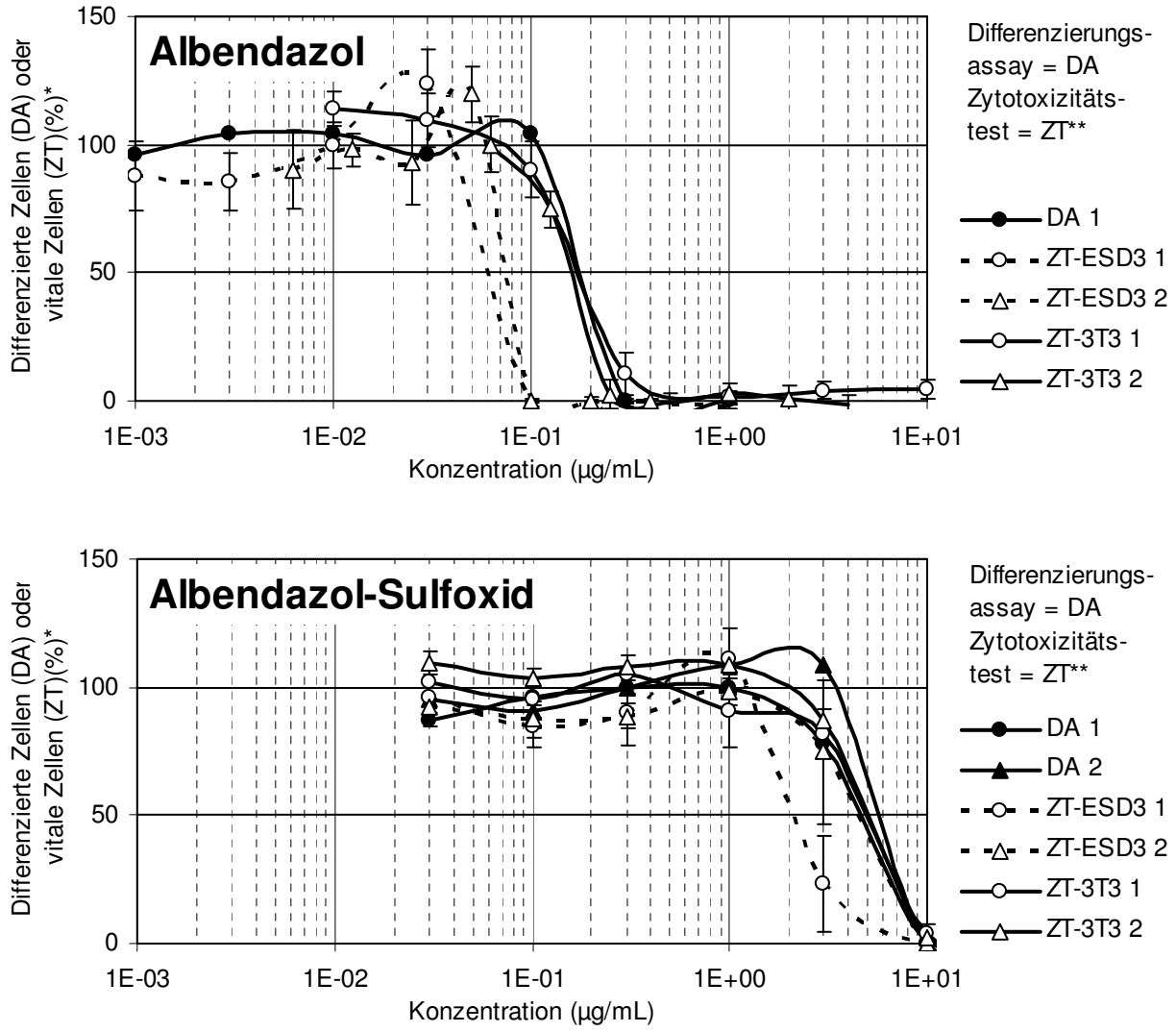


Abb. 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Albendazol und Albendazol-Sulfoxid im EST (3.9); Lösungsmittel 0,25% v/v DMSO. Pro Substanz wurden zwei unabhängige ESTs durchgeführt. Die Messwerte der Zytotoxizitätstests sind mit ihrer Standardabweichung angegeben. *Beim Differenzierungsassay (DA) ist der Prozentsatz an Zellen angegeben, die sich am Ende des Tests in schlagende Herzmuskelzellen differenziert haben; bei den Zytotoxizitätstests (ZT) ist der Prozentsatz an Zellen angegeben, die am Ende des Tests vital waren. In allen drei *in vitro*-Tests wurden die Ergebnisse der Testansätze auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, welche auf 100% gesetzt wurde. **ZT-ESD3 bzw. -3T3 = Zytotoxizitätstest mit ES-D3- bzw. 3T3-Zellen.

Tab. 24: Halbhemmkonzentrationen von Albendazol (ABZ) und Albendazol-Sulfoxid (ASO), die im EST bestimmt wurden (3.9), und Klassifizierung der Embryotoxizität der Testsubstanzen mit Hilfe des Prädiktionsmodells (3.9.3). Als Lösungsmittel wurde 0,25% v/v DMSO verwendet. Die Halbhemmkonzentrationen wurden aus den Konzentrations-Wirkungskurven des EST graphisch ermittelt. Lauf 1 und 2 stellen zwei voneinander unabhängige Versuche dar.

Substanz	Lauf	IC_{50}3T3 (µg/mL)	IC_{50}D3 (µg/mL)	ID_{50} (µg/mL)	Prädiktions-modell[a]
ABZ	1	0,17	0,060	0,18	stark
	2	0,16	0,075	-	-
ASO	1	5,0	2,1	4,6	stark
	2	5,0	4,5	5,7	schwach

[a]Einstufung der Testsubstanz vom Prädiktionsmodell als stark, schwach oder nicht embryotoxisch.

Tab. 25: Z- und D-Quotienten von Albendazol (ABZ) und Albendazol-Sulfoxid (ASO). Die Quotienten wurden aus den Halbhemmkonzentrationen der *in vitro*-Tests des EST berechnet (3.9.6).

Substanz	Lauf	Z-Quotient (IC_{50}3T3 / IC_{50}D3)	D-Quotient (IC_{50}D3 / ID_{50})
ABZ	1	2,8	0,33
ABZ	2	2,1	-
ASO	1	2,4	0,46
ASO	2	1,1	0,79

Z-Quotient = Zytotoxizitätsquotient; D-Quotient = Zytotoxizität-Differenzierungsquotient.

Von den Tests mit Albendazol konnte der zweite Lauf des Differenzierungsassays nicht gewertet werden, weil die Mediumkontrolle nicht valide war. Bei beiden Substanzen fiel weiterhin auf, dass die IC_{50}D3-Werte niedriger ausfielen als die ID_{50}-Werte, was biologisch nicht plausibel war (vgl. Abschnitt 4.2.3). Bei Albendazol-Sulfoxid bewegten sich diese Abweichungen jedoch noch im Rahmen der Messungenauigkeit.

Das Prädiktionsmodell stufte Albendazol und Albendazol-Sulfoxid unterschiedlich ein. Albendazol wurde in Lauf 1 als stark embryotoxisch klassifiziert. Die Einstufung von Albendazol-Sulfoxid fiel doppeldeutig aus, obwohl die Halbhemmkonzentrationen der Doppelbestimmungen nahe beieinander lagen. In Lauf 1 wurde Albendazol-Sulfoxid als stark, in Lauf 2 als schwach embryotoxisch klassifiziert. Die Z-Quotienten von Albendazol lagen mit 2,1 und 2,8 im gleichen Bereich wie die von Albendazol-Sulfoxid mit 1,1 und 2,4 und ließen so keinen Unterschied zwischen den Substanzen erkennen. Die D-Quotienten beider Substanzen konnten nicht sinnvoll miteinander verglichen werden, da Quotienten <1 biologisch widersprüchliche Verhältnisse beschreiben. Im paarweisen Vergleich der Halbhemmkonzentrationen beider Substanzen zeigte sich, dass alle Halbhemmkonzentrationen von Albendazol-Sulfoxid 30- bis 50-fach höher lagen als die von Albendazol.

Der EST konnte somit Albendazol von Albendazol-Sulfoxid basierend auf dem direkten Vergleich der Halbhemmkonzentrationen diskriminieren, während anhand der Z-Quotienten und des Prädiktionsmodells kein eindeutiger Unterschied erkennbar war. Das Proteratogen wies *in vitro* jedoch eine höhere Toxizität auf als der teratogene Metabolit. Da in dieser Arbeit nur Substanzpaare untersucht werden sollten, bei denen der teratogene Metabolit toxischer wirkt als die Muttersubstanz, wurden mit Albendazol und Albendazol-Sulfoxid keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

4.3 Entwicklung des mEST

Der metabolisch aktive embryonale Stammzelltest (mEST) wurde auf der Basis des bereits etablierten und vom ECVAM validierten EST-Protokolls entwickelt, da die Endpunkte valide und gut detektierbar sind und die Versuchsdauer vergleichsweise kurz ist. Für den mEST sollten metabolisch aktive Zellen in Zellkultureinsätzen in Form einer statischen Kokultur mit den Zellen des EST kultiviert werden. Bei der Entwicklung des Testprotokolls wurden daher eine Reihe von Parametern überprüft. Es wurden Zellkulturmedien getestet, die von beiden Zellarten der Kokultur toleriert werden, und der optimale Ort zur Kultivierung der jeweiligen Zellart (Zellkultureinsatz oder Well) wurde ermittelt. Weiterhin wurden Methoden zur Anzucht von Embryoid Bodies (EBs) unter Kokultur-Bedingungen entwickelt, und die allgemeine Toleranz der Zellen gegenüber den Kokultur-Bedingungen in Bezug auf Morphologie und Vitalität wurde geprüft. Schließlich wurden weitere Rahmenbedingungen wie die Permeabilität der Membranen der Zellkultureinsätze für Metaboliten sowie der Einfluss von Expositionsdauer und Intervall auf den ID_{50}-Wert untersucht. In einem weiteren Schritt wurden die Leberzellen anhand ihrer Phase-I und II-Enzymaktivität sowie ihrer Fähigkeit, die Modellsubstanzen zu metabolisieren, charakterisiert.

4.3.1 Toleranz gegenüber Kulturmedien und Zellkultureinsätzen

4.3.1.1 Kultivierung von Leberzellen in ES-D3-Medium

Die ES-D3-Zellen benötigen ihr spezifisches Medium, um sich in kontrahierende Herzmuskelzellen zu differenzieren. Deshalb wurde untersucht, wie gut Leberzellen (primäre Hepatozyten von Ratte und Maus sowie die Hepatomazellarten HepaRG, H4IIE, Hepa1-6 und HepG2) dieses Medium tolerieren.

Primäre Hepatozyten von Ratte und Maus wurden durch Perfusion isoliert (3.4.2) und in 24-Well-Platten im Monolayer mit Kollagenbeschichtung kultiviert (3.4.3). Nach einer Ruhephase von 24 h in HP-Medium wurden sie in ES-D3-Medium sowohl ohne als auch mit 0,25% v/v DMSO weiter kultiviert und täglich im Lichtmikroskop morphologisch begutachtet. In einer Reihe von Versuchen zeigte sich, dass sich die Morphologie der Zellen nach 72 h sowohl im zellspezifischen als auch im ES-D3-Medium stark verschlechtert hatte. Sie verloren ihre polygonale Form, die im Monolayer eine schachbrettartige Struktur aufweist, und nahmen eine atypische Gestalt an. Im ES-D3-Medium war dieser Prozess ausgeprägter und schneller zu beobachten als im HP-Medium, wobei kein Unterschied zwischen Kulturen mit oder ohne DMSO festgestellt werden konnte. Aufgrund dieses Befundes waren primäre Hepatozyten für einen Einsatz im mEST nicht geeignet und wurden nicht weiter untersucht.

Die HepaRG-Zellen werden von der Fa. Biopredic, Rennes, Frankreich, vertrieben und wurden in deren Labor auf Toleranz des ES-D3-Mediums untersucht. Dazu wurden sie nach dem Protokoll von Aninat *et al.* (2006) angezüchtet, in zwei unabhängigen Versuchen für 72 h gegenüber ES-D3-Medium exponiert und täglich mikroskopisch beurteilt. Es wurde festgestellt, dass die Zellen nach 24 h Exposition begannen, sich vom Boden abzulösen. Nach 48 h wiesen sie nekrotische Bereiche auf und starben nach 72 h ab. Da die Zellen das ES-D3-Medium nicht tolerierten, war ihre Integration in den EST nicht möglich.

Die H4IIE-, Hepa1-6- und HepG2-Zellen wurden in 24-Well-Platten gesät ($7{,}5 \times 10^4$ H4IIE-Zellen/Well; 8×10^4 Hepa1-6-Zellen/Well; $2{,}1 \times 10^5$ HepG2-Zellen/Well), nach 2 h Anwachsen mit PBS gewaschen, gegenüber ES-D3-Medium exponiert und täglich im Lichtmikroskop morphologisch begutachtet. Über einen Zeitraum von 5 Tagen zeigten diese Zellen keinen morphologischen Unterschied im Vergleich zu ihrem Erscheinungsbild in der Erhaltungskultur. Damit war es prinzipiell möglich, diese Zellen in einem mEST mit ES-D3-Medium einzusetzen.

4.3.1.2 Kokultur-Bedingungen für ES-D3-Zellen

In einem variierten EST-Differenzierungsassay wurden von Meyer *et al.* (2005a) verschiedene Kokultur-Bedingungen für ES-D3-Zellen untersucht, die im folgenden näher beschrieben werden. Sie züchteten ES-D3-Zellen für die ersten beiden Kultivierungsschritte nach EST-Protokoll an (3.9.1) und kultivierten parallel dazu H4IIE-Zellen in H4IIE-Medium und in ES-D3-Medium. Im dritten Kultivierungsschritt (Tag 5) wurden verschiedene Ansatz-Varianten in 24-Well-Platten hergestellt. Die Versuchsparameter des dritten Kultivierungsschrittes sind in Tabelle 26 zusammengefasst. Die H4IIE-Zellen wurden täglich im Mikroskop begutachtet und die EBs am zehnten Tag mikroskopisch ausgewertet (siehe Tab. 26 letzten Spalte).

Tab. 26: Versuchsparameter von Kultivierungsschritt 3 (Tag 5 - 10) in einem EST zur Untersuchung von Kokultur-Bedingungen mit H4IIE-Zellen (Meyer *et al.* 2005a). Die ersten beiden Kultivierungsschritte (Tag 0 - 3 und 3 - 5) wurden nach EST-Protokoll durchgeführt (3.9), der dritte Schritt wurde in 24-Well-Platten ausgeführt und wie in der Tabelle angegeben variiert (pro Variante vier Ansätze).

Variante	Medium	Kultivierungsort		Kontrahierende
		Zellen im Zellkultureinsatz[a]	Zellen im Well	Kardiomyozyten
1	ES-D3-Medium	H4IIE-Zellen[b]	EB	ja
2	ES-D3-Medium	EB	H4IIE-Zellen[b]	nein
3	H4IIE-Medium	H4IIE-Zellen[b]	EB	nein
4	H4IIE-Medium	EB	H4IIE-Zellen[b]	nein

EB = Embryoid Body. [a]Fa. Nunc, Anopore-Membran, 0,2 µm Porengröße; [b]2 - 3 $\times$ 10^4 Zellen/Einsatz bzw. Zellen/Well.

Meyer *et al.* (2005a) konnten nur bei Variante 1 (Tab. 26) eine Differenzierung der ES-D3-Zellen in schlagende Herzmuskelzellen feststellen. Sie schlussfolgerten, dass in einem mEST die EBs in ES-D3-Medium im Well kultiviert werden müssen, und die metabolisch aktiven Zellen im Zellkultureinsatz.

4.3.1.3 Kultivierung von Hepatomazellen in Zellkultureinsätzen

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurden die Hepatoma-Zelllinien H4IIE, Hepa1-6 und HepG2 daraufhin untersucht, ob sie Zellkultureinsätze und insbesondere die Oberfläche der Membrane tolerieren, ohne sich morphologisch zu verändern. Die Zellen wurden in 8-Well-Streifen mit Anopore-Membrane gesät (6,8 $\times$ 10^3 H4IIE-Zellen/Einsatz; 4 $\times$ 10^3 Hepa1-6-Zellen/Einsatz; 1,2 $\times$ 10^4 HepG2-Zellen/Einsatz), für zwei Tage in ES-D3-Medium inkubiert und ihre Morphologie beobachtet. Die 8-Well-Streifen wurden dabei unbehandelt und zusätzlich mit Kollagenbenetzung (3.4.1) getestet, da Kollagen die Adhäsion von Zellen auf Kulturoberflächen im allgemeinen verbessert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

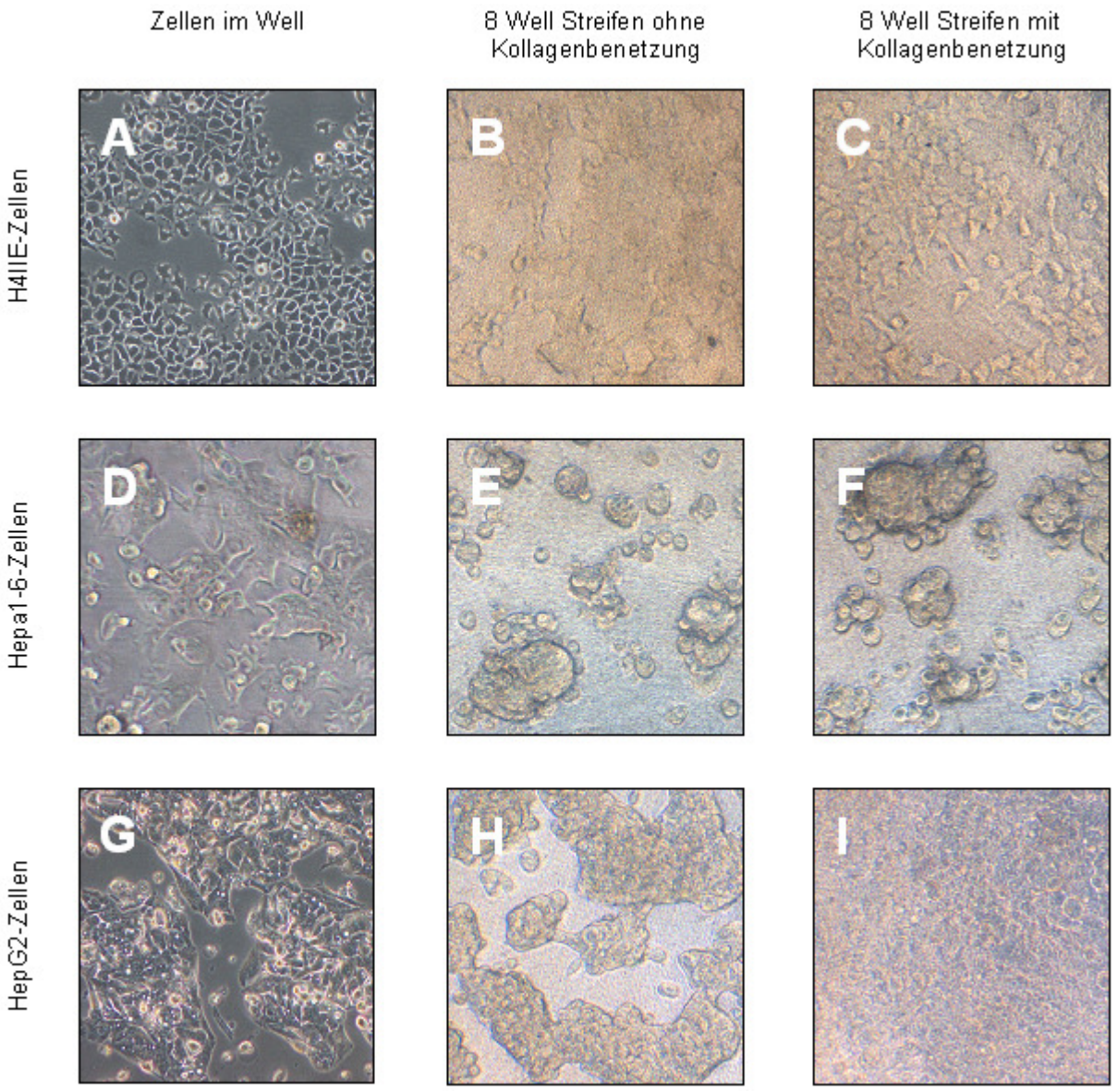


Abb. 14: Morphologie der Hepatomazellen H4IIE (A-C), Hepa1-6 (D-F) und HepG2 (G-I) auf Membranen von 8-Well-Streifen ohne bzw. mit Kollagenbenetzung. Die Zellen wurden zwei Tage in ES-D3-Medium kultiviert. Als Kontrolle diente eine Kultur in den Wells einer 96-Well-Platte.

Bei diesem Versuch zeigte sich, dass die H4IIE-Zellen auf den Anopore Membranen sowohl ohne als auch mit Kollagenbenetzung etwa gleich gut wachsen. Die Benetzung mit Kollagen brachte keine Verbesserung der Morphologie. Die Hepa1-6-Zellen hatten dagegen nach zwei Tagen noch keinen Monolayer ausgebildet, waren ungleichmäßig verteilt und hatten untypische Zellaggregate ausgebildet. Die HepG2-Zellen bildeten nur auf Kollagen-benetzten Membranen einen ähnlich guten Monolayer aus wie im Well. Damit stand fest, dass nur H4IIE- und HepG2-Zellen zur Kokultur eingesetzt werden konnten, und dass für HepG2-Zellen die Membranen der Zellkultureinsätze mit Kollagen benetzt werden müssen.

4.3.2 Diffusion von Substanzen durch die Anopore-Membran

Die von den Hepatomazellen im Zellkultureinsatz erzeugten Metaboliten müssen möglichst rasch vom Zellkultureinsatz in das Well diffundieren können, um die ES-D3-Zellen zu exponieren. Deshalb wurde getestet, wie schnell Tinte als Modellsubstanz durch die Membranen diffundiert (3.10.1), wobei 8-Well-Streifen ohne Behandlung und mit Kollagenbenetzung geprüft wurden. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt.

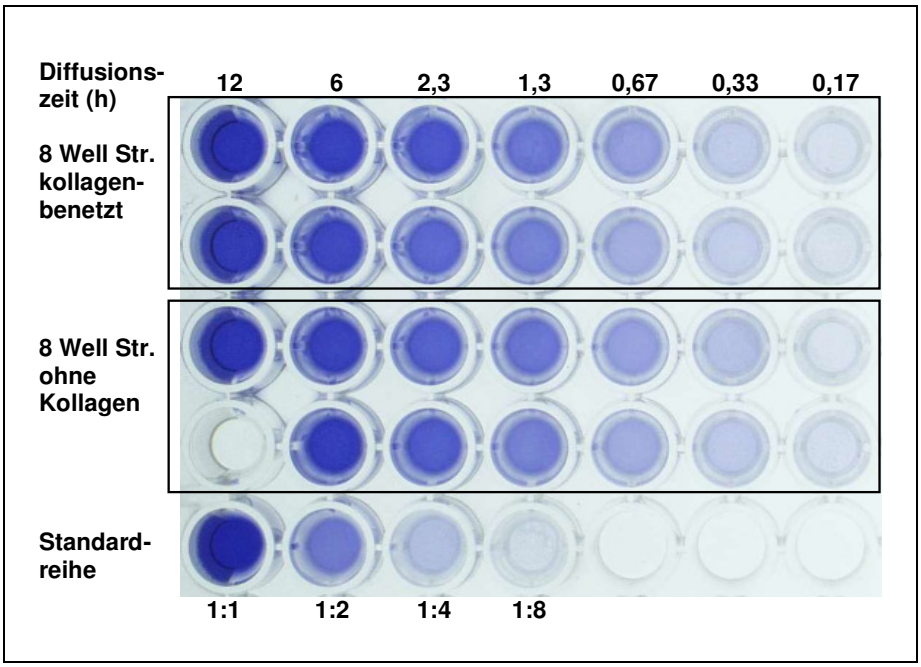


Abb. 15: Diffusion einer Tintenlösung durch die Membran von 8-Well-Streifen, die einmal unbehandelt und einmal mit Kollagen benetzt getestet wurden. Der dunkelste Farbton der Standardreihe (1:1) entspricht einer vollständigen Diffusion zwischen Einsatz und Well.

Der dunkelste Farbton der Standardreihe (1:1) entspricht einem vollständigen Konzentrationsausgleich der Tintenlösung zwischen Zellkultureinsatz und Well. Vergleicht man die Färbung der Testwells mit der Standardreihe kann man erkennen, dass die Farbe der 1:1-Tintenlösung der Färbung der Testwells gleicht, die nach 6 - 12 h Diffusion erreicht wird. Ein Unterschied zwischen 8-Well-Streifen mit oder ohne Kollagenbenetzung ist nicht erkennbar. Diese Diffusionsdauer ist für den mEST ausreichend kurz, und es können daher 8-Well-Streifen mit und ohne Kollagenbenetzung verwendet werden. Da die gleiche Membran auch in den andersformatigen Zellkultureinsätzen verwendet wird, ist dort mit einer gleich guten Diffusion zu rechnen. Im mEST sind die Membranen der Zellkultureinsätze jedoch bei fortschreitender Kultivierungsdauer immer dichter mit Zellen bewachsen, was eine Diffusion der Metaboliten erschweren kann. Die Diffusion von Metaboliten wurde deshalb auch unter mEST-Bedingungen geprüft (sh. Kapitel 4.4.1).

4.3.3 Anzucht von Embryoid Bodies in Kokultur

Vorangegangene Versuche hatten gezeigt, dass die Expositionsdauer einen wesentlichen Einfluss auf die Hemmung der Differenzierung der ES-D3-Zellen hat. Meyer *et al.* (2005b) prüften 5-Fluorouracil und 6-Aminonicotinsäureamid in einer Reihe von ESTs, in denen sie die gesamte Behandlungsdauer und die Expositionsintervalle der ES-D3-Zellen variierten. Dabei wurde festgestellt, dass jede Abweichung vom EST-Protokoll zu einer Veränderung der Halbhemmkonzentrationen führt und zur Folge haben kann, dass die Testsubstanz vom Prädiktionsmodell falsch klassifiziert wird. In einem EST muss daher die Substanzexposition über den gesamten Zeitraum erfolgen, um valide Ergebnisse zu erhalten, und folglich muss auch eine metabolische Komponente über den gesamten Testzeitraum präsent sein.

Deshalb wurden zwei Methoden entwickelt, die eine Anzucht von EBs unter statischen Kokulturbedingungen erlauben und so eine Exposition der EBs gegenüber Metaboliten während des ersten Kultivierungsschrittes ermöglichen. Beide Methoden wurden miteinander verglichen (3.10.2 und Abb. 7). Da H4IIE-Zellen die Kokultur-Bedingungen am besten tolerierten (4.3.1), wurden sie als metabolische Komponente eingesetzt. Der Ablauf des Experiments ist in Tabelle 27 zusammengefasst, die Ergebnisse sind in Tabelle 28 wiedergegeben.

Tab. 27: Durchführung verschiedener Differenzierungsassays zum Vergleich von zwei Anzuchtmethoden für EBs in Kokultur. Methode A (V96-Methode): Anzucht von EBs in einer 96-Well-Platte mit V-förmigem Boden, mit 8-Well-Streifen; Methode B: Anzucht von EBs in Hängetropfen an 8-Well-Streifen (siehe auch 3.10.2. bzw. Abb. 7.).

Differenzierungs-assay	Durchführung der einzelnen Schritte des Differenzierungsassays		
	Schritt 1 (Tag 0-3)	Schritt 2 (Tag 3-5)	Schritt 3 (Tag 5-11)
#1: Methode A mit H4IIE-Kokultur	Methode A mit $3{,}5 \times 10^3$ H4IIE-Zellen/Einsatz. Sonst Durchführung wie mEST (3.11.1)	Durchführung wie mEST (3.11.1) mit 3×10^5 H4IIE-Zellen/Einsatz	Durchführung wie mEST (3.11.1) mit $1{,}2 \times 10^4$ H4IIE-Zellen/Einsatz
#2: Methode B mit H4IIE-Kokultur	Methode B. Sonst wie #1	Wie #1	Wie #1
#3: Klassischer EST	Hängetropfen in Petrischalendeckel (3.9.1)	Durchführung wie EST (3.9.1)	Durchführung wie EST (3.9.1)
#4: Methode A ohne H4IIE-Kokultur	Methode A ohne 8-Well-Streifen; mit 160 µL/Well in V96-Platte	Wie #3	Wie #3

Tab. 28: Ergebnisse des Vergleichs von zwei Anzuchtmethoden für EBs in Kokultur (Versuchsaufbau siehe Tab. 27). Die Ergebnisse sind als Wells mit kontrahierendem Myokardium pro Gesamtzahl an EBs angegeben. Die Differenzierungsassays wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten t_1 bis t_4 ausgewertet. Nach t_2 wurden die Zellkultureinsätze wieder in die 24-Well-Platten eingesetzt und bis Tag 11 darin belassen.

Differenzierungs-assay	t_1: Tag 10 0 h nach Entnahme der E	t_2: Tag 10 2,4 - 4,5h nach Entnahme der E	t_3: Tag 11 0 h nach Entnahme der E	t_4: Tag 11 5 h nach Entnahme der E
#1: Methode A mit H4IIE-Kokultur	7	17	22	23
#2: Methode B mit H4IIE-Kokultur	6	14	24	24
#3: Klassischer EST	23	23	23	23
#4: Methode A ohne H4IIE-Kokultur	24	24	24	24

E = Zellkultureinsätze

In dem Versuch (Tab. 28) zeigte sich, dass mit beiden Methoden eine Anzucht von EBs in Kokultur mit H4IIE-Zellen möglich ist. Nach 11 Tagen Inkubation direkt nach Entnahme der Zellkultureinsätze (t_3) wurde eine den Validitätskriterien entsprechend ausreichende Anzahl an Wells mit schlagendem Myokardium erreicht. Weiterhin wurde deutlich, dass am Tag 10 direkt nach Entnahme der Zellkultureinsätze (t_1) noch zu wenig EBs kontrahierende Kardiomyozyten ausgebildet hatten. Deshalb wurde für die Auswertung eines mESTs festgelegt, die Kokultur am Tag 10 zu beenden, die Zellkultureinsätze zu entnehmen, die 24-Well-Platten ohne Einsätze bis Tag 11 weiter zu inkubieren und dann auszuwerten. Da die V96-Methode wesentlich einfacher zu handhaben war als Methode B, wurde der mEST mit der V96-Methode aufgebaut.

4.3.4 Einfluss der V96-Methode auf die Sensitivität des Differenzierungsassays

Da die neue Methode der EB-Anzucht eine wesentliche Veränderung gegenüber dem Protokoll des klassischen EST darstellte und die ersten drei Kultivierungstage einen deutlichen Einfluss auf den ID_{50}-Wert haben (Meyer *et al.* 2005b), wurde überprüft, ob die V96-Methode die Sensitivität der EBs verändert. Dazu wurden Differenzierungsassays mit 5-FU als Testsubstanz durchgeführt, bei denen die Anzuchtmethode im Schritt 1 des EST-Differenzierungsassays variiert wurde. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 29 dargestellt.

Tab. 29: Sensitivität von ES-D3-Zellen im Differenzierungsassay mit V96-Methode (3.10.2) im Vergleich zum klassischen EST-Protokoll (3.9). Testsubstanz 5-Fluorouracil (5-FU). Kontrollen: Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten pro 24 EBs.

Methode von Kultivierungsschritt 1	ID_{50}-Wert von 5-FU (µg/mL)	Mediumkontrolle	Lösungsmittelkontrolle
Hängetropfenkultur	0,031	24/24	24/24
V96-Methode, Lauf 1	0,030	23/24	21/24
V96-Methode, Lauf 2	0,031	18/24	21/24

Im Vergleich zum klassischen EST-Protokoll (Hängetropfenkultur) ist durch die V96-Methode keine Verschiebung des ID_{50}-Wertes von 5-FU erkennbar. Die V96-Methode beeinflusst die Empfindlichkeit der EBs also nicht.

4.3.5 Einfluss der Kokultur auf den Differenzierungsassay

Im Differenzierungsassay mit Kokultur sollen die ES-D3-Zellen durch die Kokultur in ihrer Differenzierung nicht behindert werden, und die eingesetzten Hepatomazellen müssen in jedem Kultivierungsschritt vital bleiben. Um die Differenzierung der EBs zu kontrollieren wurden deshalb in jedem mEST drei Kontrollen mitgeführt: je eine Medium- und Lösungsmittelkontrolle mit Kokultur, in der die EBs mit der V96-Methode angezüchtet wurden, und eine Mediumkontrolle ohne Kokultur, bei der die EBs wie im klassischen EST in einer Hängetropfenkultur gezüchtet wurden (3.11.1). Das Ergebnis dieser Kontrollen wurde mit dem Validitätskriterium des ESTs verglichen (3.9.1).

Die Vitalität der Hepatomazellen wurde in Schritt 3 des Differenzierungsassays überprüft. Dazu wurde in einem mEST eine zusätzliche Hepatomazellen-Mediumkontrolle mitgeführt, in der die Hepatomazellen in 10 mm Zellkultureinsätzen ohne EBs kultiviert wurden. Am Tag 10 wurden diese Einsätze entfernt und mit den Einsätzen aus der regulären Mediumkontrolle mit EBs verglichen, indem bei beiden die Vitalität der Hepatomazellen mit dem MTT-Test bestimmt wurden (3.5.2.2). Für H4IIE-Zellen in Kokultur wurde eine Vitalität von 101% im Vergleich zur Mediumkontrolle ohne EBs bestimmt, für HepG2-Zellen waren es 90%. Die Hepatomazellen wurden im Differenzierungsassay von den ES-D3-Zellen daher nicht beeinträchtigt.

4.3.6 Einfluss der Kokultur auf die Zytotoxizitätstests

Um den Einfluss der Kokultur auf die Vitalität der verschiedenen Zellen zu untersuchen, wurden Zytotoxizitätstests in Kokultur mit H4IIE- bzw. HepG2-Zellen durchgeführt, die in ihrem Ablauf dem Protokoll des mEST folgten (3.11.2), in denen aber nur drei Testansätze in 12-fach-

Bestimmung untersucht wurden: Zielzellen (ES-D3- bzw. 3T3-Zellen), Hepatomazellen (H4IIE- bzw. HepG2-Zellen) und Zielzellen in Kokultur mit Hepatomazellen. Der dritte Schritt des Zytotoxizitätstests wurde außerdem in seiner Dauer variiert, sodass sich für die Zielzellen Gesamtinkubationszeiten von sieben Tagen bzw. zehn Tagen ergaben. Die Vitalität der Hepatomazellen wurde mit dem MTT-Test am Ende von jedem Kultivierungsschritt bestimmt (3.5.2.2), die Vitalität der Zielzellen am Ende der Gesamtinkubationszeit (3.5.2.1). Die Vitalität der Zellen in Kokultur wurde berechnet, indem die Vitalität der Zellen in Kokultur auf die Zellen ohne Kokultur bezogen wurde. Eine Zellvitalität >100% ergab sich daher in den Fällen, in denen die Zellen mit Kokultur stärker proliferiert sind als die Zellen ohne Kokultur. Die Ergebnisse der Tests sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Tab. 30: Zellvitalität in Zytotoxizitätstests mit H4IIE- bzw. HepG2-Kokultur. Die Vitalität der Hepatomazellen wurde mit dem MTT-Test am Ende des jeweiligen Kultivierungsschrittes bestimmt (3.5.2), die Vitalität der ES-D3 bzw. 3T3-Zellen am Ende von Schritt 3. Schritt 3 wurde mit zwei Laufzeiten ausgeführt, sodass sich eine Gesamtdauer des Zytotoxizitätstests von sieben bzw. zehn Tagen ergab. Die Vitalität in (%) ist das Ergebnis des Vergleichs zwischen Zellen in Kokultur mit Zellen ohne Kokultur. Eine Vitalität >100% zeigt an, dass die Zellen in Kokultur stärker gewachsen sind als die Zellen ohne Kokultur.

Zellen in Kokultur	Vitalität nach Schritt 1 3 Tage Kultur	Vitalität nach Schritt 2 5 Tage Kultur	Vitalität nach Schritt 3 7 Tage Kultur	Vitalität nach Schritt 3 10 Tage Kultur
Einsatz: H4IIE	105%	118%	60%	29%
Well: ES-D3	-	-	97%	96%
Einsatz: H4IIE	107%	88%	-	87%
Well: 3T3	-	-	-	110%
Einsatz: HepG2	109%	113%	86%	-
Well: ES-D3	-	-	87%	-
Einsatz: HepG2	91%	102%	133%	-
Well: 3T3	-	-	95%	-

Die Vitalität der Zielzellen (ES-D3- und 3T3-Zellen) war zu keinem der untersuchten Zeitpunkte stark beeinträchtigt. Die geringste Vitalität zeigte sich bei den ES-D3-Zellen nach 7 Tagen Gesamtinkubationszeit in HepG2-Kokultur mit 87% im Vergleich zur Kultur ohne Hepatomazellen.

Die Hepatomazellen wurden dagegen durch die Kokultur in ihrer Vitalität stärker beeinträchtigt. Während die Vitalität beider Zellarten nach Schritt 1 und 2 88% - 118% erreichte, zeigten die H4IIE-Zellen in Kokultur mit ES-D3-Zellen bei 10 Tagen Gesamtinkubationszeit eine Vitalität von nur 29%. Ein häufigerer Tausch des Mediums während dieses Kultivierungsschrittes brachte keine deutliche Verbesserung (Daten nicht dargestellt). Erst eine Verkürzung des dritten Schrittes auf zwei Tage (Gesamtinkubationszeit sieben Tage) erhöhte die Vitalität der

H4IIE-Zellen auf akzeptable 60%. In Kokultur mit 3T3-Zellen ergab sich eine gute Vitalität der H4IIE-Zellen nach 10 Tagen Gesamtinkubationszeit von 87%. Eine Bestimmung nach sieben Tagen war daher nicht notwendig.

Aufgrund der Erfahrungen mit den H4IIE-Zellen wurde die Vitalität der HepG2-Zellen nur bei verkürzter Gesamtinkubationszeit bestimmt. Es zeigte sich, dass die HepG2-Zellen in ES-D3-Kokultur nach sieben Tagen Gesamtinkubation eine Vitalität von 86% aufwiesen. In 3T3-Kokultur lag die Vitalität bei 133%. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für beide Hepatomazell-linien die Gesamtinkubationszeit der mEST-Zytotoxizitätstests mit ES-D3- bzw. 3T3-Zellen auf sieben Tage festgelegt.

4.3.7 Charakterisierung der Hepatomazellen anhand ihrer Phase I - und Phase II-Enzymaktivitäten

Bei der Prüfung der zur Auswahl stehenden Hepatomazellen hatte sich gezeigt, dass sich nur H4IIE- und HepG2-Zellen mit den ES-D3-Zellen unter den für den mEST geplanten Versuchs-bedingungen kokultivieren lassen (4.3.1). Da für die Hepatomazellen die Kultivierung in dem für sie atypischen ES-D3-Medium eine bedeutende Veränderung darstellt, sollte die Aktivität der wichtigsten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme dieser Zellen im ES-D3-Medium charakteri-siert werden. Damit sollte festgestellt werden, welche Zellart darin die größte Aktivität besitzt. Deshalb wurden mit den Hepatomazellen Enzymaktivitätsassays in ES-D3-Medium durchgeführt. Zur Charakterisierung der Phase I-Aktivität wurden der EROD-Assay (CYP1A1/2-Aktivität), der PROD-Assay (CYP2B1/2-Aktivität) und der BROD-Assay (CYP3A-Aktivität) durchgeführt. Die Phase II-Aktivität wurde mit dem UGT-Assay (UGT1/2) und dem GST-Assay bestimmt.

4.3.7.1 EROD-/ PROD-/ BROD-Assay

Die Enzymaktivität der Hepatomazellen wurde im ES-D3-Medium mit 0,25% v/v DMSO (Lösungsmittelkontrolle) über vier Tage bestimmt (3.6.1). Zur Steigerung der Grundaktivität wurden die Zellen mit 3-Methylcholanthren (MC) bzw. Phenobarbital (PB) behandelt. Da sich bei den HepG2-Zellen zeigte, dass die Grundaktivität der Zellen im ES-D3-Medium öfters im Bereich der Nachweisgrenze lag (Tabelle 31), wurde die Bestimmung der Enzymaktivitäten von den H4IIE-Zellen sowohl in ES-D3-Medium (Tab. 32) als auch im H4IIE-Medium (Tab. 33) durchgeführt.

Bei den HepG2-Zellen konnte im EROD-Assay keine Grundaktivität nachgewiesen werden. Durch Induktion mit MC wurde die höchste Aktivität nach 24 h mit 52 pmol/mg/min erreicht. Im

Tab. 31: EROD-, PROD- bzw. BROD-Aktivität von HepG2-Zellen in ES-D3-Medium. Die Zellen wurden mit 0,2 µM 3-Methylcholanthren (MC) bzw. 2 mM Phenobarbital (PB) behandelt. Es wurden drei Wells pro Behandlung angesetzt, ein Teil der Mediumüberstände zusätzlich mit Glucuronidase/Arylsulfatase (G/A) behandelt und Enzymaktivität sowie Proteingehalt eines Wells doppelt bestimmt. Die Aktivität ist mit Standardabweichung sowie ΔA in (pmol/mg/min) angegeben.

		Kontrolle		**MC-induziert**			**PB-induziert**		
Beh.	I.-zeit	Aktivität	ΔA	Aktivität	IF	ΔA	Aktivität	IF	ΔA
EROD									
U	24	<NG		51,6 ± 5,7	n.b.				
U	48	<NG		32,3 ± 1,9	n.b.				
U	72	<NG		9,9 ± 1,6	n.b.				
U	96	<NG		9,3 ± 0,5	n.b.				
G/A	24	<NG	n.b.	52,2 ± 4,4	n.b.	0,61			
G/A	48	<NG	n.b.	31,8 ± 1,1	n.b.	-0,54			
G/A	72	<NG	n.b.	10,0 ± 1,7	n.b.	0,14			
G/A	96	<NG	n.b.	9,3 ± 0,4	n.b.	-0,01			
PROD									
U	24	5,2 ± 0,4		7,5 ± 0,4	1,5		6,3*	1,2	
U	48	<NG		2,9*	n.b.		<NG	n.b.	
U	72	1,3 ± 0,01		2,9 ± 0,7	2,2		<NG	n.b.	
U	96	<NG		1,5 ± 0,6	n.b.		1,0*	n.b.	
G/A	24	<NG	n.b.	7,3*	n.b.	-0,21	<NG	n.b.	n.b.
G/A	48	<NG	n.b.	<NG	n.b.	n.b.	<NG	n.b.	n.b.
G/A	72	1,2 ± 0,03	-0,05	2,9 ± 0,8	2,3	-0,01	<NG	n.b.	n.b.
G/A	96	<NG	n.b.	<NG	n.b.	n.b.	<NG	n.b.	n.b.
BROD									
U	24	5,6 ± 0,4		10,3 ± 4,1	1,8		8,0 ± 0,9	1,4	
U	48	1,6*		2,8*	1,7		2,0*	1,2	
U	72	1,1 ± 0,02		2,2 ± 0,3	1,9		1,4 ± 0,1	1,3	
U	96	0,7*		1,6 ± 2,4	2,4		<NG	n.b.	
G/A	24	5,9 ± 0,3	0,28	10,5 ± 4,4	1,8	0,25	7,8 ± 0,8	1,3	-0,2
G/A	48	<NG	n.b.	2,8 ± 0,1	n.b.	-0,03	2,1*	n.b.	0,1
G/A	72	1,2 ± 0,04	0,06	2,3 ± 0,3	1,9	0,14	1,5 ± 0,1	1,3	0,1
G/A	96	0,7*	0,00	1,5 ± 0,3	2,2	-0,10	0,9*	1,3	n.b.

Beh. = Behandlung; I.-zeit = Inkubationszeit; ΔA = Aktivitätsdifferenz von G/A und U; IF = Induktionsfaktor; U = Überstand unbehandelt; G/A = Überstand mit Glucuronidase/Arylsulfatase behandelt; n.b. = nicht bestimmbar; NG = Nachweisgrenze; * = Einfachbestimmung.

PROD-Assay war eine maximale Grundaktivität nach 24 h Inkubation von 5,2 pmol/mg/min nachweisbar, die sich durch Induktion mit MC nach 72 h höchstens 2,3-fach steigern ließ. Im BROD-Assay lag die Grundaktivität zwischen 0,7 und 5,9 pmol/mg/min. Durch PB und MC ließ sie sich auf das 1,7- bis 2,4-fache (MC) bzw. 1,2- bis 1,4-fache (PB) steigern. Die Aktivitäten zwischen unbehandelten und mit Glucuronidase/Arylsulfatase (G/A) behandelten Wells unterschieden sich in allen Assays kaum, sodass kein Hinweis auf eine Phase II-Aktivität erhalten wurde.

Tab. 32: EROD-, PROD- bzw. BROD-Aktivität von H4IIE-Zellen in ES-D3-Medium. Die Zellen wurden mit 0,5 µM 3-Methylcholanthren (MC) bzw. 1 mM Phenobarbital (PB) behandelt. Es wurden drei Wells pro Behandlung angesetzt, ein Teil der Mediumüberstände zusätzlich mit Glucuronidase/Arylsulfatase (G/A) behandelt und Enzymaktivität sowie Proteingehalt eines Wells doppelt bestimmt. Die Aktivität ist mit Standardabweichung sowie ΔA in (pmol/mg/min) angegeben.

		Kontrolle		**MC-induziert**			**PB-induziert**		
Beh.	I.-zeit	Aktivität	ΔA	Aktivität	IF	ΔA	Aktivität	IF	ΔA
EROD									
U	24 h	<NG		98,7 ± 0,9	n.b.				
U	48 h	<NG		64,9 ± 3,6	n.b.				
U	72 h	<NG		44,8 ± 2,4	n.b.				
U	96 h	<NG		26,3 ± 1,4	n.b.				
G/A	24 h	<NG	n.b.	114,5 ± 4,0	n.b.	15,8			
G/A	48 h	<NG	n.b.	77,2 ± 2,6	n.b.	12,3			
G/A	72 h	<NG	n.b.	53,8 ± 1,8	n.b.	9,0			
G/A	96 h	<NG	n.b.	35,1 ± 1,9	n.b.	8,8			
PROD									
U	24 h	<NG		33,2*	n.b.		<NG	n.b.	
U	48 h	<NG		<NG	n.b.		<NG	n.b.	
U	72 h	<NG		<NG	n.b.		<NG	n.b.	
U	96 h	3,7*		3,9 ± 0,4	1,1		<NG	n.b.	
G/A	24 h	<NG	n.b.	31,3*	n.b.	-1,9	<NG	n.b.	n.b.
G/A	48 h	<NG	n.b.	<NG	n.b.	n.b.	<NG	n.b.	n.b.
G/A	72 h	<NG	n.b.	<NG	n.b.	n.b.	<NG	n.b.	n.b.
G/A	96 h	3,7*	0,01	4,8 ± 0,3	1,3	0,9	4,7*	n.b.	n.b.
BROD									
U	24 h	45,1 ± 24,5		31,4 ± 3,4	0,7		25,1*	0,6	
U	48 h	8,8 ± 2,0		11,2 ± 0,6	1,2		11,2 ± 4,1	1,3	
U	72 h	6,0 ± 1,3		7,1 ± 0,1	1,2		5,0 ± 0,1	0,8	
U	96 h	3,7 ± 0,1		4,5 ± 0,1	1,2		3,9 ± 0,3	1,1	
G/A	24 h	46,0 ± 24,5	0,9	30,9 ± 3,9	0,7	-0,5	31,2 ± 9,5	0,7	6,1
G/A	48 h	9,0 ± 2,3	0,2	10,9 ± 0,4	1,2	0,3	11,4 ± 4,9	1,3	0,2
G/A	72 h	6,0 ± 1,3	0,1	7,9 ± 0,2	1,3	0,8	5,1 ± 0,6	0,9	0,2
G/A	96 h	3,9 ± 0,2	0,2	5,2 ± 0,2	1,3	0,8	4,2 ± 0,5	1,1	0,3

Beh. = Behandlung; I.-zeit = Inkubationszeit; ΔA = Aktivitätsdifferenz von G/A und U; IF = Induktionsfaktor; U = Überstand unbehandelt; G/A = Überstand mit Glucuronidase/Arylsulfatase behandelt; n.b. = nicht bestimmbar; NG = Nachweisgrenze; * = Einfachbestimmung.

Im ES-D3-Medium war bei den H4IIE-Zellen im EROD-Assay keine Grundaktivität nachweisbar (Tab. 32). Die Enzymaktivität ließ sich durch MC induzieren und war nach 24 h Induktion in den G/A-behandelten Wells am höchsten (115 pmol/mg/min). Im PROD-Assay war eine geringe Grundaktivität nachweisbar, die sich kaum induzieren ließ. Im BROD-Assay war eine Grundaktivität von 3,7 bis 45 pmol/mg/min nachweisbar, die sich durch Induktion mit MC oder PB höchstens auf das 1,3-fache steigen ließ. Ein Hinweis auf Phase II-Aktivität war aufgrund der

Tab. 33: EROD-, PROD- bzw. BROD-Aktivität von H4IIE-Zellen in H4IIE-Medium. Die Zellen wurden mit 0,5 µM 3-Methylcholanthren (MC) bzw. 1 mM Phenobarbital (PB) behandelt. Es wurden drei Wells pro Behandlung angesetzt, ein Teil der Mediumüberstände zusätzlich mit Glucuronidase/Arylsulfatase (G/A) behandelt und Enzymaktivität sowie Proteingehalt eines Wells doppelt bestimmt. Die Aktivität ist mit Standardabweichung sowie ΔA in (pmol/mg/min) angegeben.

		Kontrolle		**MC-induziert**			**PB-induziert**		
Beh.	I.-zeit	Aktivität	ΔA	Aktivität	IF	ΔA	Aktivität	IF	ΔA
EROD									
U	24 h	<NG		51,5 ± 6,2	n.b.				
U	48 h	<NG		68,3 ± 2,4	n.b.				
U	72 h	<NG		46,6 ± 3,5	n.b.				
U	96 h	<NG		23,2 ± 2,3	n.b.				
G/A	24 h	<NG	n.b.	56,7 ± 7,1	n.b.	5,2			
G/A	48 h	<NG	n.b.	78,7 ± 1,8	n.b.	10,4			
G/A	72 h	<NG	n.b.	54,1 ± 4,4	n.b.	7,5			
G/A	96 h	<NG	n.b.	30,2 ± 2,2	n.b.	7,0			
PROD									
U	24 h	<NG		<NG	n.b.		<NG	n.b.	
U	48 h	<NG		<NG	n.b.		<NG	n.b.	
U	72 h	<NG		4,8 ± 0,8	n.b.		<NG	n.b.	
U	96 h	<NG		<NG	n.b.		<NG	n.b.	
G/A	24 h	<NG	n.b.	<NG	n.b.	n.b.	<NG	n.b.	n.b.
G/A	48 h	<NG	n.b.	<NG	n.b.	n.b.	<NG	n.b.	n.b.
G/A	72 h	<NG	n.b.	5,0 ± 0,6	n.b.	0,2	<NG	n.b.	n.b.
G/A	96 h	<NG	n.b.	<NG	n.b.	n.b.	<NG	n.b.	n.b.
BROD									
U	24 h	<NG		<NG	n.b.		<NG	n.b.	
U	48 h	9,2 ± 1,3		11,0 ± 0,4	1,2		10,7 ± 1,7	1,2	
U	72 h	7,0 ± 3,9		6,7 ± 0,3	1,0		5,4 ± 0,5	0,8	
U	96 h	<NG		3,2 ± 0,5	n.b.		<NG	n.b.	
G/A	24 h	<NG	n.b.	18,8 ± 3,0	n.b.	n.b.	<NG	n.b.	n.b.
G/A	48 h	9,4 ± 1,5	0,2	11,9 ± 0,3	1,3	0,9	11,7 ± 1,6	1,2	1,0
G/A	72 h	7,1 ± 3,4	0,1	7,0 ± 0,4	1,0	0,3	5,2 ± 0,9	0,9	-0,2
G/A	96 h	<NG	n.b.	3,8 ± 0,3	n.b.	0,5	<NG	n.b.	n.b.

Beh. = Behandlung; I.-zeit = Inkubationszeit; ΔA = Aktivitätsdifferenz von G/A und U; IF = Induktionsfaktor; U = Überstand unbehandelt; G/A = Überstand mit Glucuronidase/Arylsulfatase behandelt; n.b. = nicht bestimmbar; NG = Nachweisgrenze; * = Einfachbestimmung.

Differenz zwischen unbehandeltem und G/A-behandeltem Überstand nur im EROD-Assay erkennbar. In allen Assays mit H4IIE-Medium (Tab. 33) zeigten die Enzymaktivitätsmessungen keinen deutlichen Unterschied zu den Messungen in ES-D3-Medium. Eine Ausnahme bildete die Messung der EROD-Aktivität nach 24 h Induktion mit MC, wo sie im H4IIE-Medium halb so hoch ausfiel wie im ES-D3-Medium.

4.3.7.2 UGT1/2-Assay

Zur Bestimmung der UGT1/2-Aktivität wurden H4IIE- bzw. HepG2-Zellen in ES-D3-Medium mit 0,25% v/v DMSO (Lösungsmittelkontrolle) über vier Tage inkubiert. Die Enzymaktivität wurde täglich im Zelllysat bestimmt und auf den Proteingehalt bezogen (3.6.2). Drei Kontrollwells wurden mit je drei MC- bzw. PB-induzierten Wells verglichen. Ein Kontrollwert ohne Zellen (n = 2) wurde von den Messwerten mit Zellen abgezogen.

Tab. 34: UGT1- und UGT2-Aktivität von H4IIE- und HepG2-Zellen in ES-D3-Medium. Die Zellen wurden mit 0,5 µM 3-Methylcholanthren (MC) / 1 mM Phenobarbital (PB) (H4IIE-Zellen) bzw. 0,2 µM MC / 2 mM PB (HepG2-Zellen) behandelt. Es wurden drei Wells pro Behandlung angesetzt und Enzymaktivität sowie Proteingehalt eines Wells doppelt bestimmt. Die Aktivität ist mit Standardabweichung in (pmol/mg/min) angegeben.

H4IIE-Zellen	**UGT1**			**UGT2**		
Inkubationszeit	**Kontrolle** Aktivität	**MC** Aktivität	IF	**Kontrolle** Aktivität	**PB** Aktivität	IF
24 h	14100 ± 1490	14970 ± 2750	1,1	<NG	486 ± 100	n.b.
48 h	5870 ± 758	6310 ± 248	1,1	<NG	286 ± 47,3	n.b.
72 h	5540 ± 304	6420 ± 610	1,2	<NG	<NG	n.b.
96 h	4680 ± 764	6350 ± 793	1,4	168 ± 35,5	301 ± 68,6	1,8
HepG2-Zellen						
24 h	423*	<NG	n.b.	38,5*	75,9 ± 19,2	2,0
48 h	<NG	<NG	n.b.	28,0*	50,2 ± 23,4	1,8
72 h	<NG	<NG	n.b.	<NG	28,9 ± 15,8	n.b.
96 h	<NG	546 ± 27,3	n.b.	23,7 *	<NG	n.b.

IF = Induktionsfaktor; NG = Nachweisgrenze; n.b. nicht bestimmbar; * = Einfachbestimmung

Bei den H4IIE-Zellen lag im UGT1-Assay die Grundaktivität im Bereich von 4680 bis 14100 pmol/mg/min. Die Enzymaktivität war durch MC maximal 1,4-fach nach 96 h induzierbar und lag nach 24 h Induktion am höchsten (14970 pmol/mg/min). Im UGT2-Assay war eine Grundaktivität nur nach 96 h Inkubation nachweisbar. Die Enzymaktivität war durch PB induzierbar (1,8-fach nach 96 h) und lag nach 24 h Induktion am höchsten (486 pmol/mg/min).

Bei den HepG2-Zellen war im UGT1-Assay eine Grundaktivität nur nach 24 h Inkubation nachweisbar (423 pmol/mg/min). Durch eine Induktion mit MC ließ sich nur nach 96 h eine Enzymaktivität von 546 pmol/mg/min nachweisen. Im UGT2-Assay lag die Grundaktivität zwischen 23,7 und 38,5 pmol/mg/min. Die Enzymaktivität ließ sich durch PB maximal 2,0-fach nach 24 h induzieren (75,9 pmol/mg/min).

4.3.7.3 GST-Assay

Zur Bestimmung der GST-Aktivität wurden die H4IIE- bzw. HepG2-Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen in ES-D3-Medium inkubiert. Die Enzymaktivität wurde täglich aus doppelten (HepG2-Zellen) bzw. dreifachen (H4IIE-Zellen) Ansätzen im Zelllysat bestimmt und auf den Proteingehalt bezogen. Die Kontrollwells (0,25% v/v DMSO) wurden mit MC- bzw. PB-induzierten Wells verglichen.

Tab. 35: GST-Aktivität von H4IIE- und HepG2-Zellen in ES-D3-Medium. Die Zellen wurden mit 0,5 µM 3-Methylcholanthren (MC) / 1 mM Phenobarbital (PB) (H4IIE-Zellen) bzw. 0,2 µM MC / 2 mM PB (HepG2-Zellen) behandelt und 2 - 3 Wells pro Behandlung angesetzt. Die Aktivität ist mit Standardabweichung in (nmol/mg/min) angegeben.

H4IIE-Zellen					
	Kontrolle	**MC**		**PB**	
Inkubationszeit	Aktivität	Aktivität	IF	Aktivität	IF
24 h	105,1 ± 26,7	99,3 ± 7,5	0,9	118,2 ± 14,8	1,1
48 h	167,8 ± 19,6	220,2 ± 23,0	1,3	200,1 ± 23,6	1,2
72 h	195,0 ± 5,3	284,1 ± 4,2	1,5	263,0 ± 37,8	1,4
96 h	146,4 ± 8,4	188,8 ± 17,9	1,3	145,3 ± 12,8	1,0
HepG2-Zellen					
24 h	4,4 ± 0,3	5,0 ± 0,4	1,1	5,7 ± 1,3	1,3
48 h	4,9 ± 0,6	4,9 ± 0,3	1,0	5,1 ± 0,5	1,1
72 h	4,6 ± 0,1	4,5 ± 0,3	1,0	4,9*	1,1
96 h	5,1 ± 0,2	5,1 ± 0,8	1,0	5,8 ± 0,1	1,1

* = Einfachbestimmung.

Die GST-Grundaktivität der H4IIE-Zellen lag im Bereich von 105 bis 195 nmol/mg/min. Diese Enzymaktivität ließ sich durch MC max. 1,5-fach nach 72 h, und durch PB max. 1,4-fach nach 72 h induzieren. Bei den HepG2-Zellen lag die Grundaktivität im Bereich von 4,4 bis 5,1 nmol/mg/min. Die Enzymaktivität ließ sich maximal nach 24 h durch PB 1,3-fach und durch 3MC 1,1-fach induzieren.

4.3.8 Charakterisierung der Hepatomazellen anhand ihrer Metabolisierung der Modellsubstanzen

Um Proteratogene im mEST nachweisen zu können, müssen sie von den Hepatomazellen in dem für sie atypischen ES-D3-Medium in ausreichendem Maße aktiviert werden. Durch die Analyse ausgewählter Proteratogene und ihrer teratogenen Metaboliten im Kulturmedium sollte festgestellt werden, welche Zellart bezüglich dieser Substanzen eine größere metabolische Aktivität besitzt. Diese Tests wurden mit den Substanzpaaren Valpromid (Proteratogen) /

Valproinsäure (Teratogen) bzw. Retinol (Proteratogen) / all-*trans*-Retinsäure (Teratogen) durchgeführt.

4.3.8.1 Metabolisierung von Valpromid zu Valproinsäure

Der Umsatz der Modellsubstanzen Valpromid und Valproinsäure durch die Hepatomazellen wurde für eine Expositionszeit von zwei und fünf Tagen untersucht (3.8). Zur Auswahl nicht-toxischer Konzentrationen für die Hepatomazellen wurden die IC_{50}-Werte beider Substanzen nach fünf Tagen Exposition bestimmt. Sie betrugen für Valpromid 290 µg/mL (H4IIE-Zellen) bzw. 450 µg/mL (HepG2-Zellen), und für Valproinsäure 53 µg/mL (H4IIE-Zellen) bzw. 18 µg/mL (HepG2-Zellen). Für die Versuche zum Metabolismus wurden die Substanzen direkt im ES-D3-Medium gelöst und unter Berücksichtigung der IC_{50}-Werte Konzentrationen von 60 µg/mL Valpromid und 2 µg/mL Valproinsäure im Medium hergestellt. Zur Kontrolle der Substanzstabilität wurden auch Wells mit Testmedium ohne Zellen mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

Ohne Zellen veränderten sich die Valpromid- und Valproinsäure-Konzentrationen über den Testzeitraum nur sehr wenig (Abb. 16 A und B), und der geringe Konzentrationsanstieg bewegte sich bei beiden Substanzen im Rahmen der Messunsicherheit. Ohne Zellexposition blieben die Substanzen über den Testzeitraum damit stabil.

Ein Abbau des Valpromid durch die H4IIE-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 16 C), da die Valpromid-Konzentration während des Behandlungszeitraumes von fünf Tagen im Rahmen des Analysefehlers konstant blieb. Valproinsäure war während dieses Zeitraumes ebenfalls nicht nachweisbar. Dagegen war bei der Inkubation von H4IIE-Zellen mit Valproinsäure ein kontinuierlicher Abbau um 45% nach fünf Tagen feststellbar (Abb. 16 D). Es wird daher vermutet, dass die H4IIE-Zellen im Valpromid-Ansatz entweder keine Valproinsäure (Abb. 16 C) produzierten oder sie rasch zu Metaboliten weiter verstoffwechselten, die mit der eingesetzten Analytik nicht nachgewiesen werden konnte.

Im Valpromid-Ansatz mit HepG2-Zellen war Valproinsäure nachweisbar und nahm kontinuierlich bis zu einer mittleren Konzentration von 7,4 µg/mL zu (Abb. 16 E). Das entsprach einem äquimolaren Anteil von 13,1% der anfänglichen Valpromid-Konzentration. Ein dafür notwendiger Abbau des Valpromid konnte in dem Ansatz nicht nachgewiesen werden, da sich die potenzielle Abnahme innerhalb des 20%igen Messfehlers für Valpromid bewegte. Da die HepG2-Zellen im Valproinsäure-Ansatz die Valproinsäure nicht abbauten (Abb. 16 F), wurde die Zunahme der Konzentration an Valproinsäure im Valpromid-Ansatz während der Inkubation nicht beeinträchtigt.

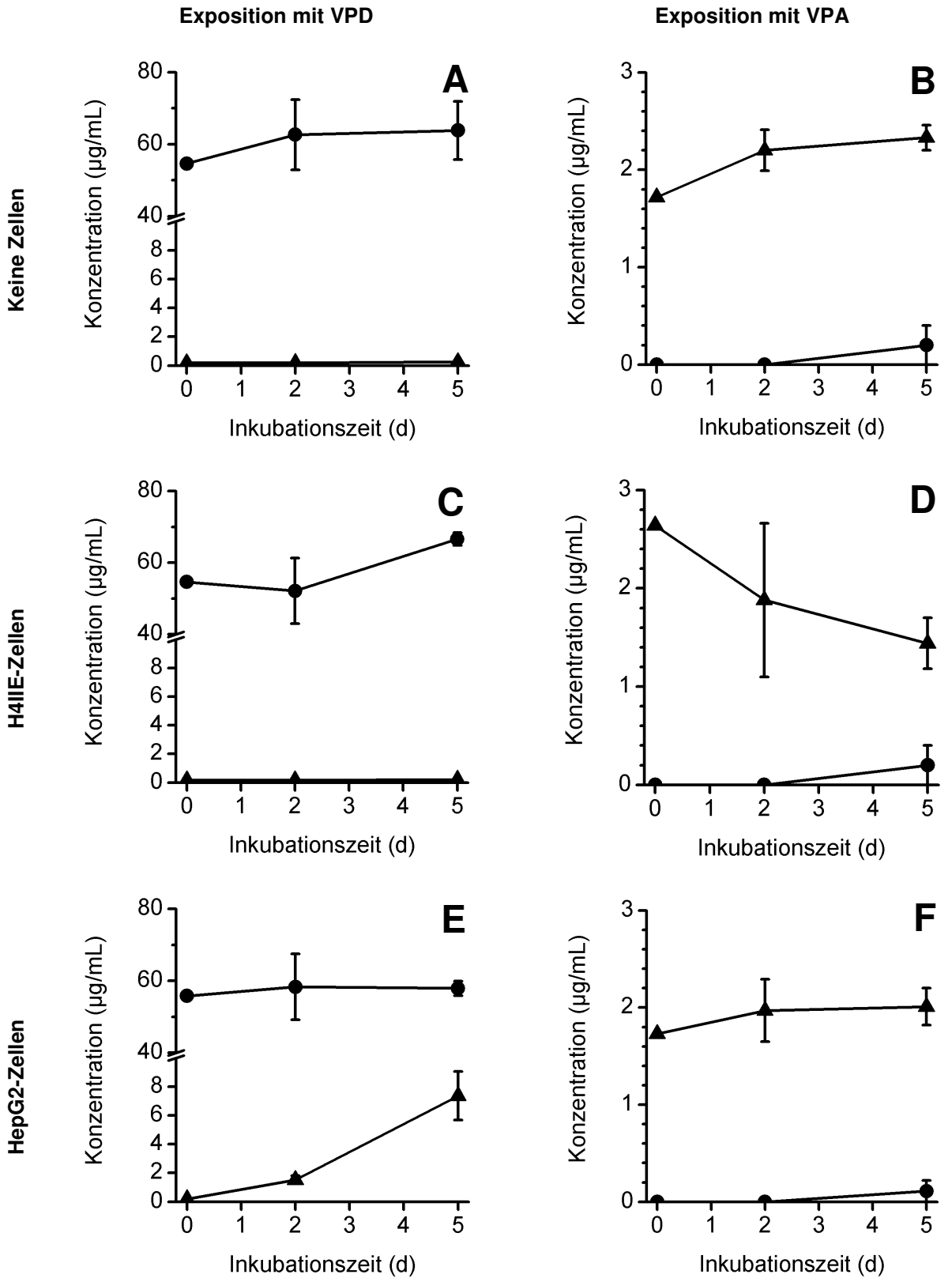


Abb. 16: Abbau von Valpromid (VPD) und Valproinsäure (VPA) in ES-D3-Medium. Die Testlösungen wurden ohne Zellexposition (A und B) bzw. mit H4IIE- (C und D) oder HepG2-Zellen (E und F) über fünf Tage in doppeltem Ansatz inkubiert. Die Konzentrationen sind mit Standardabweichung angegeben. Legende: —●— VPD —▲— VPA.

*4.3.8.2 Metabolisierung von Retinol zu all-*trans*-Retinsäure*

Die Metabolisierung von Retinol und all-*trans*-Retinsäure (Retinsäure) durch die Hepatomazellen wurde für eine Expositionszeit von zwei und fünf Tagen untersucht (3.8), wobei nicht-zelluläre Abbauprozesse der Substanzen in Ansätzen ohne Zellen überprüft wurden. Um Retinoid-Konzentrationen einzusetzen, die die Vitalität der Hepatomazellen nicht beeinträchtigten, wurden die IC_{50}-Werte der beiden Substanzen nach fünf Tagen Exposition bestimmt. Sie betrugen für Retinol 7,0 µg/mL (H4IIE-Zellen) bzw. 10 µg/mL (HepG2-Zellen), und für Retinsäure 30 µg/mL (H4IIE-Zellen) bzw. 24 µg/mL (HepG2-Zellen). Am Ende der Expositionszeit wurden Retinol, Retinsäure, 9-*cis*-Retinsäure (9cRA), 13-*cis*-Retinsäure (13cRA), 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure (13c4oRA) und all-*trans*-4-oxo-Retinsäure (4oRA) im Medium analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

In keinem der untersuchten Ansätze konnte 4oRA nachgewiesen werden. Im Retinol-Ansatz ohne Zellen (Abb. 17 A) verringerte sich die Retinol-Konzentration nach fünf Tagen auf 50% des Ausgangswertes. Retinsäure wurde bereits zu Beginn in einer geringen Konzentration nachgewiesen (4,4 ng/mL), die während des Testzeitraumes geringfügig bis auf 8,6 ng/mL anstieg. Auch 13cRA war nach zwei Tagen, 9cRA nach fünf Tagen Inkubation geringfügig nachweisbar (mittlere Konzentrationen am fünften Tag: 2,1 ng/mL 9cRA und 2,7 ng/mL 13cRA). 13c4oRA konnte nicht nachgewiesen werden.

Im Retinsäure-Ansatz ohne Zellen (Abb. 17 B) verringerte sich die Retinsäure-Konzentration kontinuierlich und war nach fünf Tagen auf 39% des Ausgangswertes abgesunken. Dagegen stiegen die Konzentrationen von 9cRA und 13cRA stetig an und erreichten nach fünf Tagen 317 ng/mL bzw. 603 ng/mL. Damit waren 52% der Retinsäure nach fünf Tagen zu 9cRA bzw. 13cRA transformiert; die Summe aus Retinsäure, 9cRA und 13cRA entsprach 91% der Retinsäure-Ausgangskonzentration. Während des ganzen Versuches waren außerdem Retinol und 13c4oRA in geringen Konzentrationen nachweisbar, die jedoch keinen zeitlich eindeutigen Trend erkennen ließen (Retinol 22 - 26 ng/mL; 13c4oRA 6,9 - 10 ng/mL).

Es wurde deutlich, dass im Retinol-Ansatz das Retinol unter den vorliegenden Testbedingungen durch nicht-zelluläre Prozesse zur Hälfte zu Verbindungen abgebaut wurde, die mit der vorhandenen Analytik nicht erfasst werden konnten. Im Retinsäure-Ansatz wurde die Retinsäure im Inkubationszeitraum zur Hälfte nicht-zellulär zu 9cRA bzw. 13cRA isomerisiert.

Bei den Versuchen mit H4IIE-Zellen nahm im Retinol-Ansatz (Abb. 17 C) das Retinol bis auf 26% der Ausgangskonzentration ab. Auch in diesem Ansatz war bereits zu Beginn Retinsäure nachweisbar (4,1 ng/mL), die im Verlauf des Versuchs bis maximal 7,1 ng/mL anstieg. Während 13cRA und 13c4oRA nicht nachgewiesen werden konnten, lag die 9cRA-Konzentration nach fünf Tagen bei 8,2 ng/mL.

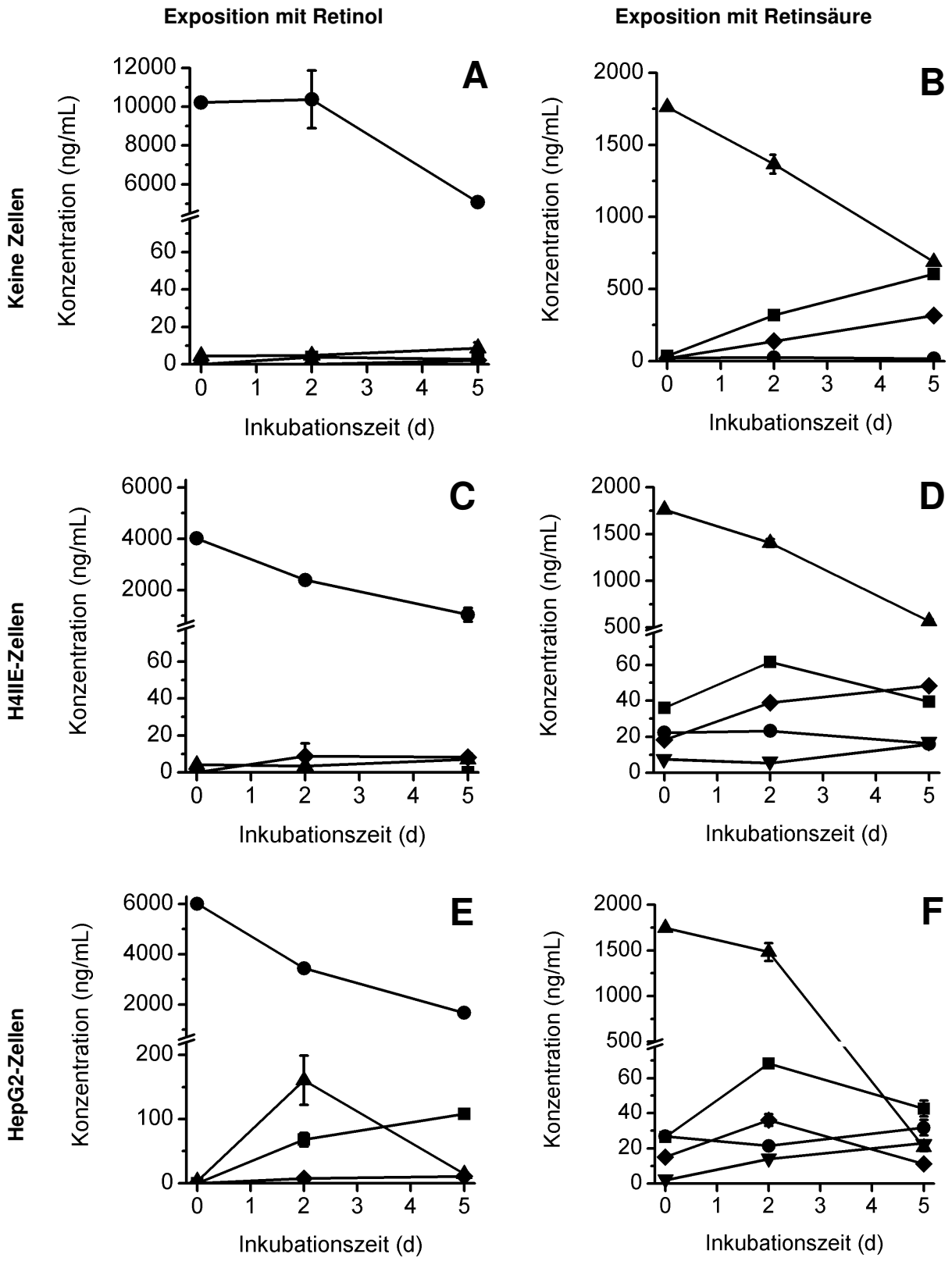


Abb. 17: Abbau von Retinol und all-*trans*-Retinsäure (RA) in ES-D3-Medium. Die Testlösungen wurden ohne Zellexposition (A und B) bzw. mit H4IIE- (C und D) oder HepG2-Zellen (E und F) über fünf Tage mit doppeltem Ansatz inkubiert. Analysiert wurden Retinol, Retinsäure, 9-*cis*-Retinsäure (9cRA), 13-*cis*-Retinsäure (13cRA) und 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure (13c4oRA). Die Konzentrationen sind mit Standardabweichung angegeben. Legende: —●— RO —▲— RA —◆— 9cRA —■— 13cRA —▼— 13c4oRA

Im Retinsäure-Ansatz mit H4IIE-Zellen (Abb. 17 D) sank die Retinsäure-Konzentration im Laufe der Inkubation ähnlich stark ab wie im Retinsäure-Ansatz ohne Zellen (Abb. 17 B), und zwar bis auf 32% des Ausgangswertes. Die Konzentration der 9cRA stieg von 18 ng/mL am ersten Tag kontinuierlich an bis auf 48 ng/mL am letzten Tag. Die 13cRA lag am ersten Tag in einer Konzentration von 36 ng/mL vor, stieg am zweiten Tag auf fast das Doppelte an und fiel bis zum fünften Tag fast wieder auf die Ausgangskonzentration zurück. Retinol und 13c4oRA waren in geringen Konzentrationen ohne Trend über den ganzen Testzeitraum nachweisbar (Retinol 16 - 22 ng/mL; 13c4oRA 6,9 - 18 ng/mL).

Der Abbau von Retinol im Ansatz mit H4IIE-Zellen überstieg damit den Abbau von Retinol ohne Zellen um 24%. Die Retinsäure-Ausgangskonzentration nahm dagegen sowohl mit als auch ohne H4IIE-Zellen bis zum fünften Tag kaum zu (um 4,2 ng/mL im Retinol-Ansatz ohne Zellen, um 3,0 ng/mL im Ansatz mit Zellen). Die H4IIE-Zellen bauten daher Retinol teilweise ab, ohne es zu Retinsäure zu oxidieren. Da im Retinsäure-Ansatz ohne Zellen der Abbau von Retinsäure im gleichen Ausmaß stattfand wie im Ansatz mit Zellen, metabolisierten die H4IIE-Zellen keine Retinsäure. Die Konzentrationen der 9cRA und 13cRA stiegen im Retinsäure-Ansatz mit H4IIE-Zellen jedoch nicht so an, wie man es aufgrund des Anstiegs im Retinsäure-Ansatz ohne Zellen hätte erwarten können. Die H4IIE-Zellen metabolisierten daher vermutlich Anteile der 9cRA bzw. 13cRA, die sich während der Inkubation nicht-zellulär aus der Retinsäure gebildet hatten.

Bei den Versuchen mit HepG2-Zellen sank im Retinol-Ansatz (Abb. 17 E) die Retinol-Konzentration bis auf 28% der Ausgangskonzentration. Nach zwei Tagen Exposition war ein deutlicher Retinsäure-Anstieg bis auf 161 ng/mL feststellbar, der nach fünf Tagen wieder auf 14 ng/mL absank. Dafür stieg die 13cRA-Konzentration kontinuierlich an, bis auf 108 ng/mL am fünften Tag. Ein Anstieg der 9cRA-Konzentration war dagegen kaum festzustellen und erreichte maximal 11 ng/mL. 13c4oRA war zu keinem Zeitpunkt nachweisbar.

Im Retinsäure-Ansatz mit HepG2-Zellen (Abb. 17 F) fiel die Retinsäure-Konzentration viel stärker ab als in den Ansätzen ohne Zellen, nämlich auf nur noch 1,2% der Ausgangskonzentration. Der stärkste Abbau fand dabei zwischen dem zweiten und fünften Inkubationstag statt. Die Konzentrationen der 9cRA, 13cRA und 13c4oRA sowie des Retinols bewegten sich in einem ähnlichen Bereich wie im Retinsäure-Ansatz mit H4IIE-Zellen.

Die HepG2-Zellen produzierten im Retinol-Ansatz damit Retinsäure. Da sie jedoch wie im Retinsäure-Ansatz gezeigt Retinsäure selber stark verstoffwechseln, konnte sich die Retinsäure im Retinol-Ansatz nicht anreichern und wurde nach fünf Tagen fast vollständig wieder abgebaut. Da die 9cRA- und 13cRA-Konzentrationen im Retinsäure-Ansatz mit HepG2-Zellen nicht so stark anstiegen wie im Retinsäure-Ansatz ohne Zellen, metabolisierten die HepG2-Zellen ähnlich wie die H4IIE-Zellen einen Teil dieser Verbindungen vermutlich weiter.

4.3.9 Zusammenfassung der metabolischen Aktivitäten der Hepatomazellen

Zum Vergleich der metabolischen Kompetenz der beiden Hepatomazellarten sind die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Enzymaktivität und dem Metabolismus der Modellsubstanzen in Tabelle 36 zusammengefasst.

Tab. 36: Metabolische Kompetenz von HepG2- und H4IIE-Zellen im ES-D3-Medium. Zusammenfassung der Enzymaktivitätsassays (Spannweiten, Tabellen Tab. 48, Tab. 49) und der Ergebnisse aus den Metabolismusstudien. Einheiten in (pmol/mg/min) bzw. *(nmol/mg/min).

Enzymaktivitäten				
	HepG2-Zellen		**H4IIE-Zellen**	
Assay	Kontrolle	Induziert (Ind.)	Kontrolle	Induziert (Ind.)
EROD	<NG	9,3 - 52 (MC)	<NG	35 - 114 (MC)
PROD	<NG - 1,2	<NG - 7,3[a] (MC)	<NG - 3,7	<NG - 31,3[a] (MC)
BROD	<NG - 5,9	1,5 - 11 (MC)	3,9 - 46	5,2 - 31 (MC)
UGT1	<NG - 423[a]	<NG - 546 (MC)	4680 - 14100	6310 - 15000 (MC)
UGT2	<NG - 39[a]	<NG - 76 (PB)	<NG - 168	<NG - 486 (PB)
GST	4,4* - 5,1*	4,9* - 5,8* (PB)	105* - 195*	118* - 263* (PB)
Metabolismus von Modellsubstanzen				
VPA Bildung aus VPD	**ja**		**nein**	
VPD Abbau	nein		nein	
VPA Abbau	nein		ja	
RA Bildung aus RO	**ja**		**nein**	
RO Abbau	ja		ja	
RA Abbau	ja		nein	

Ind. = Induktor; MC = 3-Methylcholanthren; PB = Phenobarbital; NG = Nachweisgrenze; VPD = Valpromid; VPA = Valproinsäure; RO = Retinol; RA = all-*trans*-Retinsäure; 9cRA = 9-*cis*-Retinsäure; 13cRA = 13-*cis*-Retinsäure. [a]Einfachbestimmung.

In Bezug auf die Enzymaktivitäten wiesen die H4IIE-Zellen in beiden Phasen des Fremdstoffmetabolismus fast immer höhere Aktivitäten auf als die HepG2-Zellen. Bei den Phase I-Assays waren die Grundaktivitäten beider Zellarten vergleichbar (Ausnahme BROD-Assay). Nach Induktion mit 3-Methylcholanthren lagen die Aktivitäten der H4IIE-Zellen im EROD-Assay etwa doppelt so hoch wie die der HepG2-Zellen, und im PROD- bzw. BROD-Assay etwa dreifach so hoch. Bei den Phase II-Assays fiel die Differenz deutlicher aus. Hier zeigte sich bereits im EROD-Assay anhand der Differenz zwischen unbehandeltem und mit Glucuronidase/Arylsulfatase behandeltem Überstand, dass die H4IIE-Zellen eine aktivere Phase II besaßen (vgl. ΔA, Tab. 32). Dieser Eindruck bestätigte sich in den spezifischen Phase II-Assays. Im UGT1-Assay lag die Grundaktivität der H4IIE-Zellen nach 24 h Inkubation etwa 30-fach über der Aktivität der HepG2-Zellen, im UGT2-Assay wiesen die H4IIE-Zellen in den Kontrollen und

nach Induktion eine 6- bis 7-fach höhere Aktivität auf, und im GST-Assay lag sie etwa 20- bis 40-fach höher.

Durch Induktion ließ sich bei beiden Zellarten eine Steigerung der Enzymaktivität nur teilweise erreichen. Im EROD-Assay lagen die Enzymaktivitäten in den Kontrollen unterhalb der Nachweisgrenze, während sie mit MC bei den HepG2-Zellen 52 pmol/mg/min und bei den H4IIE-Zellen 115 pmol/mg/min erreichte (Tab. 31, Tab. 32). In den anderen Phase I-Assays konnte eine Induktion mit MC oder PB die Enzymaktivität bei den HepG2-Zellen höchstens um den Faktor 2,4 (BROD), bei den H4IIE-Zellen höchstens um den Faktor 1,3 (PROD/BROD) anheben. Auch die Phase II-Enzymaktivität ließ sich durch Induktion bei den HepG2-Zellen maximal 2,0-fach (UGT2), bei den H4IIE-Zellen maximal 1,8-fach (UGT2) steigern.

Bei Betrachtung der Metabolisierung der Modellsubstanzen Valpromid, Valproinsäure, Retinol und Retinsäure durch die Hepatomazellen ergab sich im Vergleich zu den Enzymaktivitäten ein entgegengesetztes Bild. Hier waren nur die HepG2-Zellen in der Lage, Valproinsäure aus Valpromid, und Retinsäure aus Retinol zu bilden (Tab. 36). Beide Zelllinien konnten Retinol abbauen, aber nur die HepG2-Zellen metabolisierten Retinsäure, und nur die H4IIE-Zellen Valproinsäure.

An dieser Gegenüberstellung zeigte sich, dass anhand der Enzymaktivitäten und Umsatz der Modellsubstanzen aus den untersuchten Hepatomazellarten kein genereller Favorit abgeleitet werden konnte. Da sich bei den H4IIE-Zellen in den Metabolismusversuchen kein Umsatz von Valpromid und Retinol nachweisen ließ, war ihr Einsatz als Kokultur im mEST zur Prüfung dieser Substanzen nicht sinnvoll. Die HepG2-Zellen waren dagegen aufgrund ihres Umsatzes für eine Kokultur prinzipiell geeignet und wurden zur Prüfung von Valpromid und Retinol im mEST verwendet. Bei der Modellsubstanz Cyclophosphamid konnte eine Metabolisierung durch die Hepatomazellen vorab nicht bestimmt werden. Deshalb wurde Cyclophosphamid im mEST mit beiden Hepatomazellarten als Kokultur untersucht. Da sich die Enzymaktivitäten der Zellen durch Induktion in den meisten Assays nicht deutlich steigern ließen, und das Versuchsprotokoll des mEST möglichst einfach gehalten werden sollte, wurden die Zellen für den Einsatz im mEST nicht mit Induktoren behandelt.

4.4 Prüfung von Proteratogenen im mEST

Zur Bestimmung des proteratogenen Potenzials von Valpromid, Retinol und Cyclophosphamid wurden diese Substanzen im mEST getestet und die Ergebnisse mit den aus den ESTs erhaltenen Daten verglichen.

4.4.1 Untersuchungen mit Valpromid

Die Stoffwechseltests mit den Hepatomazellen (4.3.8.1) hatten gezeigt, dass nur HepG2-Zellen Valpromid zu Valproinsäure metabolisieren. Die von ihnen produzierte Menge war aber mit 7,4 µg/mL relativ gering, sodass sich die Frage stellte, ob ein erfolgreicher Nachweis des proteratogenen Potenzials von Valpromid im mEST erreicht werden konnte. Deshalb wurde zunächst ein Differenzierungsassay mit HepG2-Kokultur mit nur einer Valpromid-Konzentration durchgeführt. Dabei wurde untersucht, welche Valproinsäure-Konzentrationen unter mEST-Bedingungen generiert werden; ob die ES-D3-Zellen im Differenzierungsassay Valpromid selber verstoffwechseln; und ob sie den Valpromid-Metabolismus der HepG2-Zellen beeinflussen. Weiterhin wurden die Diffusionseigenschaften der Zellkulturmembranen unter mEST-Bedingungen bestimmt, welche zuvor nur unter idealisierten Bedingungen untersucht worden waren (4.3.2).

In einem mEST-Differenzierungsassay mit HepG2-Zellen (3.11.1) wurde eine Valpromid-Konzentration von 60 µg/mL getestet und zwei Ansätze ohne und zwei Ansätze mit HepG2-Zellen untersucht. Zur Analyse der Stoffwechselaktivität und der Diffusionsdynamik des Metaboliten Valproinsäure wurden Proben aus den Zellkultureinsätzen und Wells zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und auf Valpromid und Valproinsäure analysiert. In Tabelle 37 sind die Ergebnisse der Analysen zur Beurteilung der Diffusion zusammengefasst, wobei die im Zellkultureinsatz bestimmte Valproinsäure-Konzentration auf die Konzentration im Well bezogen und in Prozent angegeben wurde. In Abbildung 18 sind die Valpromid- und Valproinsäure-Konzentrationen der verschiedenen Testansätze in ihrem zeitlichen Verlauf dargestellt.

Tab. 37: Diffusion von Valproinsäure zwischen Zellkultureinsatz und Well während der drei Kultivierungsschritte eines mEST. Die Valproinsäure wurde von HepG2-Zellen produziert, die mit einer Valpromid-Konzentration von 60 µg/mL inkubiert wurden. Die Valproinsäure wurde vor und nach jedem mEST-Kultivierungsschritt in Zellkultureinsatz und Well bestimmt. Ihre Konzentration im Well wurde auf ihre Konzentration im Zellkultureinsatz bezogen, welche auf 100% gesetzt wurde.

	Kultivierungsschritt 1 (Tag 0 - 3)	**Kultivierungsschritt 2 (Tag 3 - 5)**	**Kultivierungsschritt 3 (Tag 5 - 10)**
	Bestimmung am Tag 3	Bestimmung am Tag 5	Bestimmung am Tag 10
	8-Well-Streifen	25 mm Einsätze	10 mm Einsätze
Test-ansatz	VPA im Well, bezogen auf Zellkultureinsatz (%)	VPA im Well, bezogen auf Zellkultureinsatz (%)	VPA im Well, bezogen auf Zellkultureinsatz (%)
H	49,8 ± 8,8	70,8 ± 15,0	87,6 ± 2,5
EBH	71,0 ± 31,2	61,7 ± 34,7	90,6 ± 10,9

VPA = Valproinsäure; H = Ansatz mit HepG2-Zellen; EBH = Ansatz mit EB und HepG2-Zellen.

Das Ausmaß der Diffusion unterschied sich nicht deutlich zwischen den Messungen am Tag 3 (nach drei Tagen Inkubation in 8-Well-Streifen) und Tag 5 (nach zwei Tagen Inkubation in 25 mm Einsätzen). Die Valproinsäure-Konzentrationen zwischen Einsatz und Well differierten um 29% - 50%. Am Tag 10 (nach fünf Tagen Inkubation in 10 mm Einsätzen) betrug die Valproinsäure-Menge im Well 88% - 91% der Menge im Einsatz. Die Valproinsäure verteilte sich damit zwischen Einsatz und Well erwartungsgemäß umso besser, je länger der Einsatz im Well verblieb.

In den Ansätzen ohne HepG2-Zellen (Abbildung 18 A) blieb das Valpromid im Rahmen der Standardabweichung stabil. Valproinsäure lag in geringer Grundkonzentration vor, die sich im Laufe des Versuchs nicht veränderte. Da sich die Dynamik der Stoffkonzentrationen in den Ansätzen mit EBs von denen ohne EBs nicht unterschied, konnte davon ausgegangen werden, dass die EBs kein Valpromid zu Valproinsäure metabolisierten. In den Ansätzen mit HepG2-Zellen (Abb. 18 Diagramm B) fluktuierten die Valpromid-Konzentrationen in ähnlicher Weise wie in den Ansätzen ohne HepG2-Zellen. Die Valproinsäure-Konzentrationen stiegen jedoch nach jedem Kultivierungsschritt an und erreichten am Tag 10 eine maximale Konzentration von 1,46 µg/mL. Da sich die Ansätze mit HepG2-Zellen von den Kokultur-Ansätzen mit EBs und HepG2-Zellen nicht signifikant unterschieden (vergleiche VPD-H mit VPD-EBH, und VPA-H mit VPA-EBH, Abb. 18B), wurde davon ausgegangen, dass die EBs keinen Einfluss auf die Metabolisierung von Valpromid durch die HepG2-Zellen hatten.

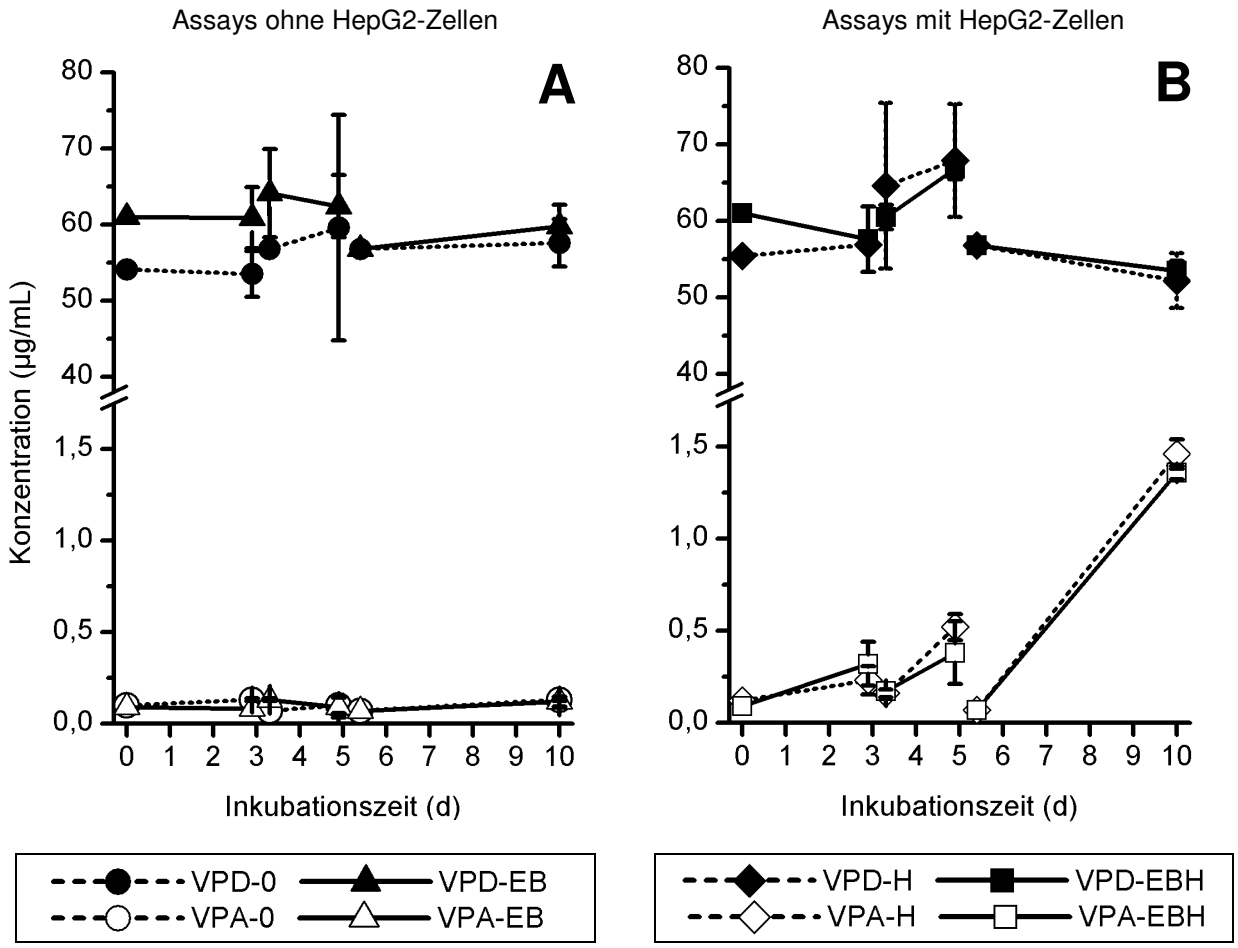


Abb. 18: Umsatz von Valpromid (VPD, 60 µg/mL) zu Valproinsäure (VPA) während der einzelnen Kultivierungsschritte in einem mEST-Differenzierungsassay (3.11.1). Es wurden vier verschiedene Ansätze untersucht: 0 = ohne Zellen; EB = mit Embryoid Bodies; H = mit HepG2-Zellen; EBH = EB mit HepG2-Zellen. In Diagramm A sind die Valpromid- und Valproinsäure-Konzentrationen der zwei Testansätze ohne HepG2-Zellen (0 und EB), in Diagramm B die zwei Testansätze mit HepG2-Zellen (H und EBH) dargestellt. Die Valpromid/Valproinsäure-Konzentrationen wurden am Tag 0, 3 und 5 in Doppelbestimmung, am Tag 10 in Dreifachbestimmung ermittelt. Alle dargestellten Konzentrationen wurden im Well bestimmt und sind mit ihrer Standardabweichung angegeben.

Im Verlauf dieses eingeschränkten Differenzierungsassays mit HepG2-Kokultur waren die EBs einer Valproinsäure-Konzentration von 0,32 bis 1,36 µg/mL ausgesetzt. Die höchste Konzentration betrug 2,8% des mittleren ID_{50}-Wertes von Valproinsäure im EST (49 µg/mL). Diese Konzentration war damit zu gering, um eine deutliche Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve des Valpromid in einem mEST-Differenzierungsassays zu bewirken. Da deshalb die proteratogenen Eigenschaften des Valpromid im mEST mit HepG2-Kokultur nicht detektiert werden können, wurden weitere Untersuchungen mit Valpromid nicht durchgeführt.

4.4.2 Untersuchungen mit Retinol

Damit die Ergebnisse aus dem EST mit dem mEST direkt verglichen werden können, wurden die EST-Zytotoxizitätstests mit Retinol in verkürzten Tests mit siebentägiger Expositionszeit wiederholt (4.4.2.1). In den Tests zur Metabolisierung von Retinol und Retinsäure durch die Hepatomazellen hatte sich gezeigt, dass nur die HepG2-Zellen Retinol zu Retinsäure metabolisieren. Die nach zwei Tagen erreichte Retinsäure-Konzentration von 161 ng/mL (Abb. 17) war am fünften Tag wieder abgebaut, lag jedoch deutlich höher als die ID_{50}-Werte der Substanz von 0,02 - 0,15 ng/mL (Tab. 20). Deshalb wurde Retinol im mEST mit HepG2-Kokultur getestet (4.4.2.2). Zur direkten Untersuchung der Metabolisierung von Retinol durch die HepG2-Zellen im mEST wurde eine einzelne Testkonzentration von 23,4 ng/mL Retinol im mEST auf Retinoide analysiert (4.4.2.3).

4.4.2.1 Prüfung von Retinol in verkürzten EST-Zytotoxizitätstests

Die verkürzten Zytotoxizitätstests wurden nach EST-Protokoll durchgeführt (3.9.2). Die Konzentrations-Wirkungskurven sind in Abbildung 19 und die Halbhemmkonzentrationen in Tabelle 38 dargestellt. Bei der Angabe der Ergebnisse dieser Tests wurde die Wiederfindung des Retinols im ES-D3-Medium von 75% berücksichtigt (Tab. 43).

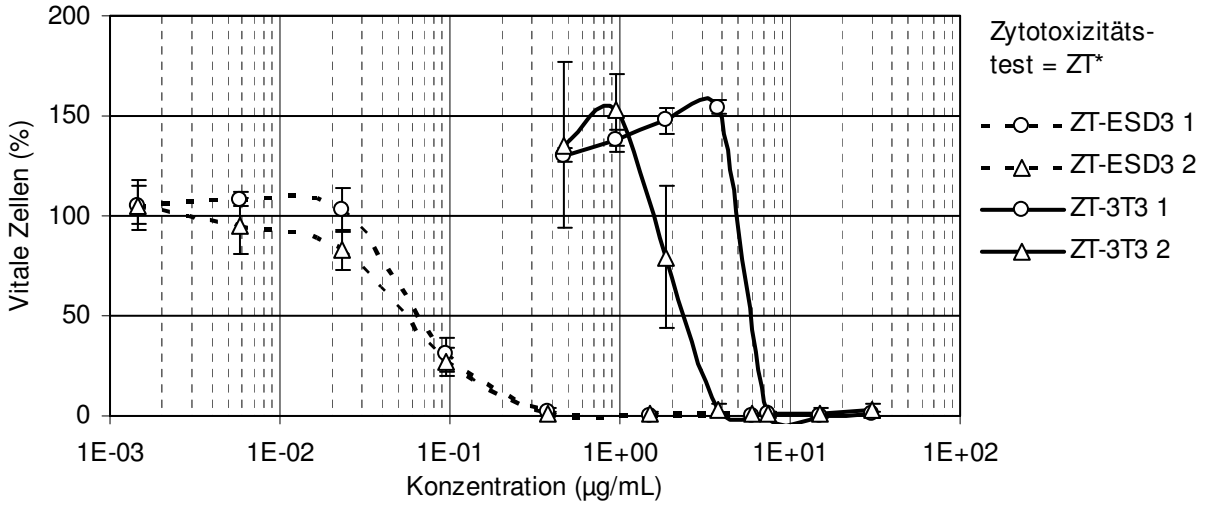


Abb. 19: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Retinol in verkürzten EST-Zytotoxizitätstests (3.9.2); 7 d Exposition; Lösungsmittel 0,25% v/v DMSO. Es wurden zwei unabhängige Tests durchgeführt. Die Ergebnisse der Testansätze wurden mit ihrer Standardabweichung relativ zur Lösungsmittelkontrolle angegeben, welche auf 100% gesetzt wurde. *ZT-ESD3 bzw. -3T3 = Zytotoxizitätstest mit ES-D3- bzw. 3T3-Zellen.

Bei den 3T3-Zellen zeigte sich in den Zytotoxizitätstests über sieben Tage im Vergleich zu zehn Tagen Exposition keine Veränderung. Bei den ES-D3-Zellen lagen die IC_{50}-Werte der

zehntägigen Exposition um den Faktor 2 auseinander (Tab. 38 letzte Spalte), wobei der niedrigere IC_{50} im gleichen Bereich lag wie die IC_{50}-Werte aus den siebentägigen Tests. Dieser Unterschied wurde auf die Variabilität des Tests zurückgeführt (Tab. 38).

4.4.2.2 Prüfung von Retinol im mEST mit HepG2-Kokultur

Die proteratogenen Eigenschaften von Retinol wurden im mEST mit HepG2-Kokultur untersucht (3.11). Die Konzentrations-Wirkungskurven sind in Abbildung 20, die Halbhemmkonzentrationen in Tabelle 38 dargestellt. In Tabelle 38 sind insgesamt alle Ergebnisse für Retinol aus dem EST, den verkürzten EST-Zytotoxizitätstests und dem mEST zusammengefasst, um einen direkten Vergleich der Halbhemmkonzentrationen zu ermöglichen. Bei der Angabe der Ergebnisse der mESTs wurde eine Wiederfindung des Retinols im ES-D3-Medium von 38% bzw. 75% berücksichtigt (Tab. 42, Tab. 43).

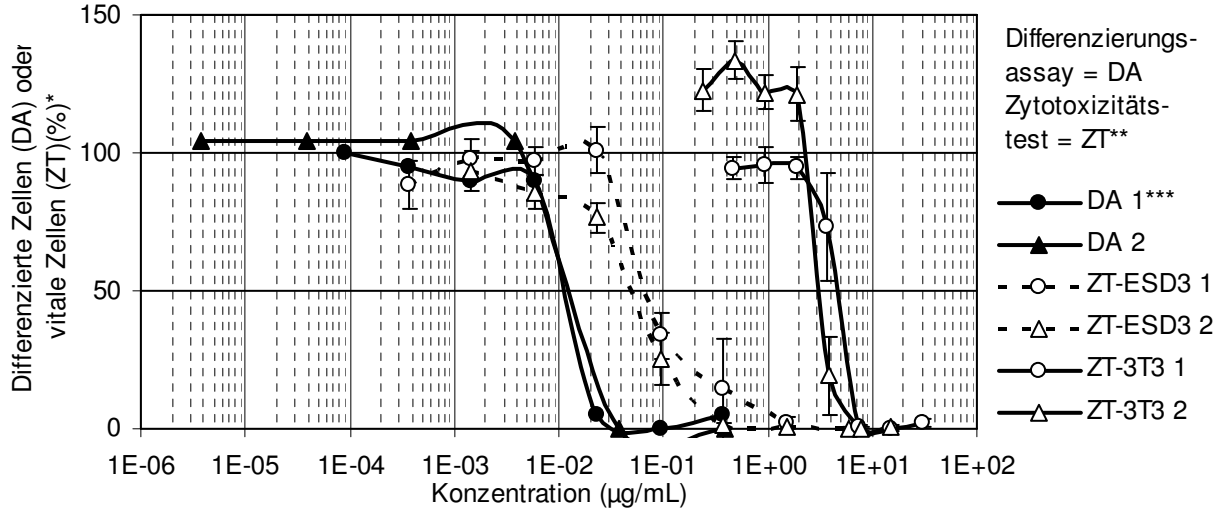


Abb. 20: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Retinol im mEST mit HepG2-Kokultur (3.11); Lösungsmittel 0,25% v/v DMSO. Es wurden zwei unabhängige mESTs durchgeführt. Die Messwerte der Zytotoxizitätstests sind mit ihrer Standardabweichung angegeben. *Beim Differenzierungsassay (DA) ist der Prozentsatz an Zellen angegeben, die sich am Ende des Tests in schlagende Herzmuskelzellen differenziert haben; bei den Zytotoxizitätstests (ZT) ist der Prozentsatz an Zellen angegeben, die am Ende des Tests vital waren. In allen drei *in vitro*-Tests wurden die Ergebnisse der Testansätze auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, welche auf 100% gesetzt wurde. **ZT-ESD3 bzw. -3T3 = Zytotoxizitätstest mit ES-D3- bzw. 3T3-Zellen. ***Die Lösungsmittelkontrolle dieses Differenzierungsassays wies 20/24 Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten auf.

Tab. 38: Halbhemmkonzentrationen von Retinol, die im EST (3.9) und mEST mit HepG2-Kokultur (3.11) zu verschiedenen Expositionszeiten bestimmt wurden. Als Lösungsmittel wurde 0,25% v/v DMSO verwendet. Die Halbhemmkonzentrationen wurden aus den Konzentrations-Wirkungskurven des EST graphisch ermittelt. Lauf 1 und 2 stellen zwei voneinander unabhängige Versuche dar.

Test	Lauf	IC_{50}3T3 7d Exp. (µg/mL)	IC_{50}D3 7d Exp. (ng/mL)	ID_{50} 10 / 11d Exp.* (ng/mL)	IC_{50}3T3 10d Exp. (µg/mL)	IC_{50}D3 10d Exp. (ng/mL)
EST	1	5,9	64	11	4,2	61
EST	2	2,3	53	19	2,7	118
mEST	1	4,7	65	10	-	-
mEST	2	3,0	48	13	-	-

Exp. = Expositionsdauer. *10 d Exposition im EST, 11 d Exposition im mEST.

Tab. 39: Z- und D-Quotienten von Retinol im EST und im mEST mit HepG2-Kokultur. Die Quotienten wurden aus den Halbhemmkonzentrationen der *in vitro*-Tests des EST bzw. mEST berechnet (Tab. 38). Im Unterschied zu den Quotienten für einen EST wurden für den Vergleich zwischen EST und mEST Halbhemmkonzentrationen zur Berechnung der Quotienten eingesetzt, die aus Tests mit unterschiedlichen Expositionszeiten stammen. In dieser Tabelle wurden die Quotienten wie folgt berechnet (siehe auch Kapitel 3.11.4): Z-Quotient = IC_{50}3T3 (7 d Exposition) / IC_{50}D3 (7 d Exposition). D-Quotient für EST = IC_{50}D3 (7 d Exposition) / ID_{50} (10 d Exposition). D-Quotient für mEST = IC_{50}D3 (7 d Exposition) / ID_{50} (11 d Exposition).

Test	Lauf	Z-Quotient	D-Quotient
EST	1	92	5,8
EST	2	43	2,8
mEST	1	72	6,5
mEST	2	63	3,7

Z-Quotient = Zytotoxizitätsquotient; D-Quotient = Zytotoxizität-Differenzierungsquotient.

Bei Lauf 1 des mEST-Differenzierungsassays mit HepG2-Kokultur konnte in der Lösungsmittelkontrolle das EST-Validitätskriterium von 21/24 Wells mit Myokardium (entspricht 87,5%) nicht eingehalten werden, denn es wurden nur 20/24 Wells gezählt (83,3%). Da die Mediumkontrolle jedoch valide war (22/24 Wells) und die Lösungsmittelkontrolle nur um ein Well vom Validitätskriterium abwich (entspricht 4,2%), wurde der Test in die Wertung mit einbezogen.

Vergleicht man die Z-Quotienten von EST und mEST miteinander (Tab. 39), so ist kein Unterschied feststellbar, und auch die D-Quotienten von EST und mEST unterscheiden sich nicht. Der direkte Vergleich der Halbhemmkonzentrationen der beiden Substanzen ließ ebenfalls keinen Unterschied erkennen. Damit konnte das proteratogene Potenzial von Retinol im mEST mit HepG2-Kokultur nicht nachgewiesen werden.

4.4.2.3 Metabolisierung von Retinol im mEST mit HepG2-Kokultur

Der fehlende Nachweis der proteratogenen Eigenschaften des Retinols im mEST mit HepG2-Kokultur warf die Frage auf, ob die Menge an Retinsäure, die die HepG2-Zellen im mEST produziert hatten, ausreichend war, um die Halbhemmkonzentrationen zu beeinflussen. Deshalb wurden bei Lauf 1 des Differenzierungsassays (Abb. 20 "DA1" bzw. Tab. 38) exemplarisch vom Testansatz mit 23,4 ng/mL Retinol Proben zu Beginn und Ende von jedem Kultivierungsschritt entnommen und auf Retinoide analysiert. Von diesem Testansatz wurden zu Beginn des Tests mehrere Varianten ohne und mit HepG2-Kokultur hergestellt, um zusätzlich die Fragen zu klären, wie stark Retinol unter mEST-Bedingungen ohne Zellen abgebaut wird; ob die ES-D3-Zellen Retinol verstoffwechseln; und ob die Kokultur den Retinol-Stoffwechsel der HepG2-Zellen beeinträchtigt. Die Ansätze für Retinol wurden dabei nach dem gleichen Schema wie für Valpromid hergestellt (4.4.1). Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 40 zusammengefasst.

Tab. 40: Metabolisierung von Retinol zu Retinsäure in einem Testansatz von 23,4 ng/mL Retinol aus Lauf 1 des mEST-Differenzierungsassays mit HepG2-Kokultur (Abb. 20 "DA 1" bzw. Tab. 38). Der Testansatz wurde zu Beginn und Ende der einzelnen mEST-Kultivierungsschritte beprobt. Parallel dazu wurden vier weitere Ansätze mit 23,4 ng/mL Retinol getestet: Ansatz 0 (ohne Zellen), Ansatz EB (mit Embryoid Bodies), Ansatz H (mit HepG2-Zellen) und Ansatz EBH (Embryoid Bodies mit HepG2-Zellen). Während der ersten beiden Schritte wurden die Testansätze doppelt hergestellt, im dritten Schritt dreifach. Falls nicht anders vermerkt wurden alle dargestellten Konzentrationen im Well gemessen (ng/mL).

	Kultivierungsschritt 1		**Kultivierungsschritt 2**		**Kultivierungsschritt 3**	
	Tag 0	**Tag 3**	**Tag 3**	**Tag 5**	**Tag 5**	**Tag 10**
Retinol						
0	47	43 - 44	51	44 - 48	50	34 - 35
EB	48	47	49 - 50	45 - 46	50	41 - 44
H	56	50 - 51	53	47	40	47 - 48
EBH	52	39 - 40	48 - 50	47 - 48	40	43 - 54
Retinsäure						
0	0,9	0,9 - 1,1	1,1	0,8 - 0,9	1,0	0,8 - 1,0
EB	0,8	0,8 - 1,8	0,9 - 1,0	0,9 - 1,0	1,0	0,8 - 0,9
H	0,9	E: 0,9 - 2,1 W: 0,9	1,0	E: 0,9 W: 0,9 - 1,0	0,9	E: 1,5 - 1,6 W: 1,2 - 1,8
EBH	0,9	E: 1,0 - 1,0 W: 0,9	0,9 - 1,0	E: 0,9 - 1,1 W: 1,0 - 1,1	0,9	E: 1,5 - 1,7 W: 1,6 - 1,9

E = Zellkultureinsatz; W = Well.

Zu Beginn der Kultivierungsschritte wurden Retinol-Konzentrationen von 47 - 56 ng/mL gemessen. Am Ende lagen sie oft etwas niedriger als zu Beginn, aber noch innerhalb der Variabilität der Methode. Bezüglich des Retinols konnte daher kein Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungen festgestellt werden. Alle gemessenen Retinol-Konzentrationen lagen jedoch über der zugesetzten Menge von 23,4 ng/mL.

Retinsäure wurde bereits zu Beginn aller Kultivierungsschritte in allen Testansätzen in Konzentrationen zwischen 0,8 und 1,1 ng/mL nachgewiesen. Am Ende der jeweiligen Kultivierungsschritte hatten sich die Retinsäurekonzentrationen meist nicht verändert, lediglich am Ende des dritten Schrittes lagen sie in den Ansätzen H und EBH (Ansätze mit HepG2-Zellen) in den Zellkultureinsätzen und im Well etwas höher als zu Beginn. Außerdem wurden erhöhte Werte auch am Ende des ersten Schrittes in einem Ansatz ohne Hepatomazellen (Ansatz EB; 1,8 ng/mL) sowie in einem Ansatz mit Hepatomazellen (Ansatz H; 2,1 ng/mL) festgestellt. Insgesamt bewegten sich jedoch alle Konzentrationen nahe der Bestimmungsgrenze der Retinsäure von 0,3 - 0,5 ng/mL (Tab. 12). Deshalb lieferten die erhöhten Retinsäurekonzentrationen keinen Hinweis auf eine metabolische Aktivität der HepG2-Zellen. Alle weiteren analysierten Retinoide lagen zu allen Zeitpunkten meist unterhalb der Nachweisgrenze, traten nur vereinzelt und inkonsistent am Ende des dritten Kultivierungsschrittes auf (max. 1,4 ng/mL 9cRA bzw. 13cRA) und lieferten so keine weiteren Hinweise auf eine metabolische Aktivität. Basierend auf den Messungen der Retinsäure wurde daher kein Hinweis auf eine metabolische Aktivität der HepG2-Zellen im mEST gefunden, und es konnte keine metabolische Aktivität der EBs oder ihr diesbezüglicher Einfluss auf die HepG2-Zellen festgestellt werden.

Dass die Retinolkonzentration in den Testansätzen höher ausfiel als angesetzt, war möglicherweise auf das Serum zurückzuführen, welches dem ES-D3-Medium zugesetzt wurde, denn in Serum kann Vitamin A enthalten sein (Lindl 2000). Dagegen war die Quelle der Retinsäure unbekannt. Die Konzentrationen der Retinsäure lagen mit 0,8 - 1,1 ng/mL wesentlich höher als die ID_{50}-Werte von 0,02 - 0,15 ng/mL, die für Retinsäure ermittelt worden waren (Tab. 20). Da alle Ansätze aus dem gleichen Kulturmedium und der gleichen Stammlösung in zusammenhängenden Arbeitsschritten hergestellt worden waren, wurde angenommen, dass die erhöhten Retinsäuregehalte auch in den anderen Ansätzen vorhanden gewesen sein mussten, was zu einer Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve in dem mEST mit HepG2-Kokultur hätte führen müssen. Da dies nicht der Fall war stellte sich weiterhin die Frage, ob Retinol die differenzierungshemmende Wirkung von Retinsäure reduzieren kann.

Zur Klärung der Herkunft von Retinol und Retinsäure wurden zusätzliche Analysen von Medium und Mediumbestandteilen durchgeführt (4.4.2.4). Die Hypothese der letzten Frage wurde in einem Differenzierungsassay mit verschiedenen Kombinationen von Retinol und Retinsäure überprüft (4.4.2.5).

4.4.2.4 Retinoid-Gehalte in Bestandteilen der Testansätze

Die Bestandteile des ES-D3-Mediums aus Lauf 1 des mEST mit HepG2-Kokultur (Tab. 40) wurden auf Retinoide untersucht (Tab. 41).

Tab. 41: Retinoid-Gehalte von Bestandteilen des Testansatzes für Lauf 1 des mEST-Differenzierungsassays mit HepG2-Kokultur (Tab. 40).

Mediumbestandteil	Retinol	RA	Andere Retinoide
Bestandteile des ES-D3-Mediums: GlutaMAX, Penicillin/Streptomycin, nicht-essentielle Aminosäuren, β-Mercaptoethanol, DMEM (3.4.5)	<NG	<NG	<NG
DMSO zur Verdünnung der Retinol-Stammlösung	<NG	<NG	<NG
Fetales Kälberserum (FCS)	163 ng/mL	<NG	<NG

RA = all-*trans*-Retinsäure; NG = Nachweisgrenze

Retinol konnte bei allen untersuchten Bestandteilen des ES-D3-Mediums nur im fetalen Kälberserum (FCS) in einer Höhe von 163 ng/mL nachgewiesen werden. Da dem ES-D3-Medium 15% FCS zugesetzt wurden, enthielt das ES-D3-Medium eine rein rechnerische Grundkonzentration an Retinol von 24,5 ng/mL.

Retinsäure wurde in keinem der Mediumbestandteile gefunden. Deshalb wurde als nächstes die für diesen Versuch verwendete Retinol-Stammlösung auf Retinoide untersucht. In dieser Stammlösung wurde jedoch auch keine Retinsäure gefunden, sodass die Quelle für die Retinsäure in den Testansätzen nicht aufgeklärt werden konnte.

*4.4.2.5 Untersuchung des Einflusses von Retinol auf all-*trans*-Retinsäure*

Zur Prüfung des Einflusses von Retinol auf die teratogene Wirkung der Retinsäure wurden im Differenzierungsassay des EST fünf Retinsäure-Konzentrationen (0; 12,5; 25; 50; 100 pg/mL) mit drei Retinol-Konzentrationen (0; 3; 20 ng/mL) einzeln und kombiniert getestet. Dabei wurde jeweils eine Lösungsmittel- und eine Mediumkontrolle mitgeführt. Die Retinsäure-Konzentrationen deckten mit 0,0125 - 0,1 ng/mL den Bereich des ID_{50}-Wertes von Retinsäure von 0,02 - 0,15 ng/mL ab (Tab. 20), während die beiden Retinol-Konzentrationen mit 20 ng/mL einmal im Bereich des ID_{50}-Wertes lagen (11 - 19 ng/mL, Tab. 20), und mit 3 ng/mL einmal deutlich darunter. Eine Wiederfindung des Retinols im ES-D3-Medium von 75% (Tab. 43) und der Retinsäure von 88% (Tab. 42) wurde beim Versuchsansatz berücksichtigt und der Versuch dreimalig durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 zusammengefasst.

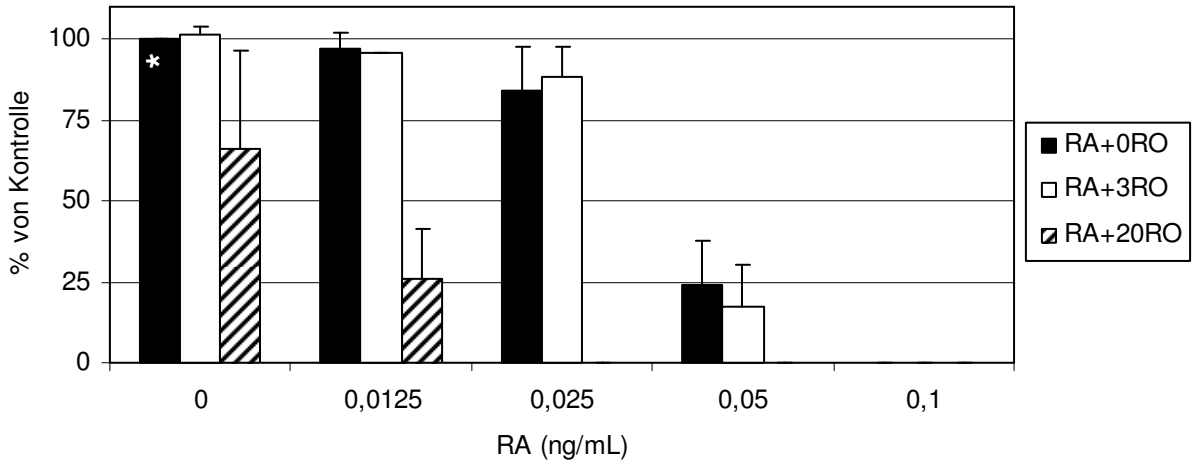


Abb. 21: Kombinierte Wirkung von Retinol (RO) und all-*trans*-Retinsäure (RA) auf ES-D3-Zellen im Differenzierungsassay (3.9.1). Verschiedenen RO-Konzentrationen (0 ng/mL = 0RO; 3 ng/mL = 3RO; 20 ng/mL = 20RO) wurden mit verschiedenen Retinsäure-Konzentrationen (0; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,10 ng/mL) kombiniert und nach 10 Tagen ausgewertet. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung angegeben. *Entspricht der Lösungsmittelkontrolle (100%), auf die die Testansätze bezogen wurden.

Es zeigte sich wie erwartet ein von der Retinsäurekonzentration abhängiger Verlauf der Zelldifferenzierung, die mit zunehmender Retinsäurekonzentration abnahm (Abb. 21). Wurden die Retinsäurekonzentrationen mit 3 ng/mL Retinol kombiniert (RA+3RO, weiße Säulen), ergab sich keine Veränderung. Die Zelldifferenzierung in den kombinierten Testansätzen nahm in gleicher Weise ab wie in den Testansätzen ohne Retinol (RA+0RO, schwarze Säulen). Wurden jedoch 20 ng/mL Retinol zu den Retinsäurekonzentrationen gegeben (RA+20RO, gestreifte Säulen), addierten sich die toxischen Wirkungen von Retinol und Retinsäure. Damit wurde die Ausgangshypothese widerlegt: Retinol hemmt nicht die differenzierungshemmende Wirkung der Retinsäure, sondern die Wirkungen beider Substanzen addieren sich.

*4.4.2.6 Wiederfindung von Retinol und all-*trans*-Retinsäure im ES-D3-Medium*

Im Zuge der Analyse der Testansätze für die Versuche zum Metabolismus von Retinol und Retinsäure (4.3.8.2) wurde die Wiederfindung der Substanzen im ES-D3-Medium bestimmt (Tab. 42).

Tab. 42: Soll- und Ist-Konzentrationen der Testansätze zur Untersuchung des Abbaus von Retinol und all-*trans*-Retinsäure in ES-D3-Medium direkt nach der Herstellung.

Testansatz zu Beginn des Versuchs	Matrix	Retinol			all-*trans*-Retinsäure		
		Soll-Konz. (ng/mL)	Ist-Konz. (ng/mL)	Wieder-findung	Soll-Konz. (ng/mL)	Ist-Konz. (ng/mL)	Wieder-findung
Keine Zellen	ES-D3-M.	30000	10215	34%	2000	1761	88%
H4IIE-Zellen	ES-D3-M.	10000	4010	40%	2000	1761	88%
HepG2-Zellen	ES-D3-M.	15000	6001	40%	2000	1747	87%
Mittlere Wiederfindung				38%			88%

Für Retinol wurde eine mittlere Wiederfindung von 38% erhalten, für Retinsäure von 88%. Diese Werte wurden zur Korrektur der Ergebnisse der ESTs und mESTs verwendet. Da die mittlere Wiederfindung des Retinols geringer ausfiel als angenommen, und als Ursache ein oxidativer Abbau des Retinols in der Stammlösung vermutet wurde, wurden die Retinol-Stammlösungen für weitere Versuche unter Stickstoffatmosphäre hergestellt. Zur Überprüfung der Stabilität dieser neuen Retinol-Stammlösungen wurde eine Testkonzentration von 40 ng/mL Retinol in ES-D3-Medium angesetzt und auf Retinoide analysiert (n = 6). Zur Kontrolle der Retinol-Grundkonzentration im ES-D3-Medium (4.4.2.4) wurden auch im ES-D3-Medium die Retinoide sechsfach bestimmt (Tab. 43).

Tab. 43: Wiederfindung von Retinol im ES-D3-Medium.

	ES-D3-Medium	40 ng/mL Retinol in ES-D3-Medium
Mittlere Retinol-Konzentration (n = 6)	26,9 ng/mL	56,9 ng/mL
Retinolgehalt unter Abzug des Gehaltes im ES-D3-Medium		29,8 ng/mL
Resultierende Wiederfindung aus 40 ng/mL Retinol		75%

Die aus den Messergebnissen bestimmte mittlere Wiederfindung lag bei 75% und wurde zur Korrektur der Ergebnisse der verkürzten Zytotoxizitätstests (4.4.2.1) und des mEST (4.4.2.2) eingesetzt. Die im ES-D3-Medium gefundene Retinol-Konzentration von 26,9 ng/mL stimmt mit dem rechnerisch ermittelten Wert von 24,5 ng/mL (4.4.2.4) gut überein.

4.4.3 Untersuchungen mit Cyclophosphamid

Aus der Literatur war bekannt, dass sowohl H4IIE- als auch HepG2-Zellen Cyclophosphamid aktivieren können (Green *et al.* 1982; Dearfield *et al.* 1982, 1986; Chang *et al.* 1988). Deshalb sollte Cyclophosphamid im mEST mit beiden Zellarten geprüft werden. Zunächst wurden die Cyclophosphamid-Tests im mEST mit HepG2-Kokultur durchgeführt und Cyclophosphamid-Stammlösungen in DMSO verwendet (Tab. 5). DMSO stellt als Lösungsmittel jedoch einen Kompromiss dar, da es in höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkt (Miret *et al.* 2006) und einen hemmenden Einfluss auf die Enzymaktivität von Zellen haben kann (Chauret *et al.* 1997). Deshalb wurde das Cyclophosphamid für die mESTs mit H4IIE-Kokultur in isotoner Kochsalzlösung gelöst. Die Ergebnisse der mESTs sind in Abschnitt 4.4.3.2 aufgeführt. Damit die ermittelten Halbhemmkonzentrationen aus einem mEST-Zytotoxizitätstest direkt mit Ergebnissen aus einem EST-Zytotoxizitätstest verglichen werden können, wurde das Cyclophosphamid in verkürzten EST-Zytotoxizitätstests getestet (4.4.3.1). Um eine mögliche Beeinträchtigung der Hepatomazellen durch die getesteten Cyclophosphamid-Konzentrationen einschätzen zu können wurden außerdem die IC_{50}-Werte der Hepatomazellen nach fünf Tagen Exposition bestimmt. Der IC_{50}-Wert für Cyclophosphamid gelöst in isotoner Kochsalzlösung betrug 410 µg/mL (H4IIE-Zellen) bzw. 990 µg/mL (HepG2-Zellen).

4.4.3.1 Prüfung von Cyclophosphamid in verkürzten EST-Zytotoxizitätstests

Die Zytotoxizitätstests wurden nach EST-Protokoll durchgeführt (3.9.2) und am Tag 7 ausgewertet. Das Cyclophosphamid wurde sowohl gelöst in isotoner Kochsalzlösung (CPP-NaCl; 2,5% v/v) als auch gelöst in DMSO (CPP-DMSO; 0,25% v/v) getestet, um eine direkte Vergleichbarkeit zu den mEST zu gewährleisten. Die Konzentrations-Wirkungskurven sind in Abbildung 22, die Halbhemmkonzentrationen in Tabelle 44 dargestellt.

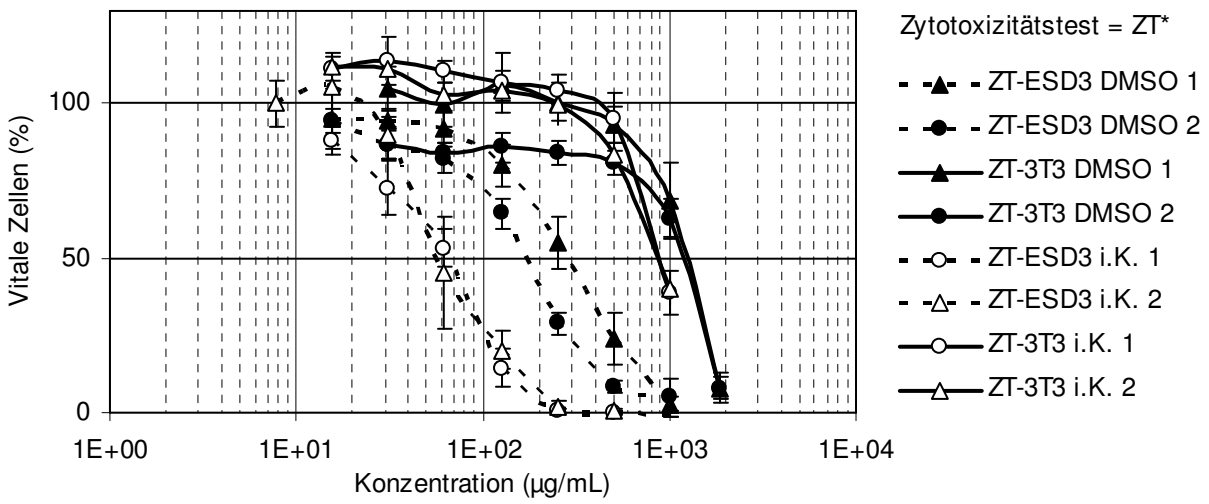


Abb. 22: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Cyclophosphamid in verkürzten EST-Zytotoxizitätstests (3.9.2); 7 d Exposition; Lösungsmittel 0,25% v/v DMSO oder 2,5% v/v isotone Kochsalzlösung (i.K.). Es wurden zwei unabhängige Tests durchgeführt. Die Ergebnisse der Testansätze wurden mit ihrer Standardabweichung relativ zur Lösungsmittelkontrolle angegeben, welche auf 100% gesetzt wurde. *ZT-ESD3 bzw. -3T3 = Zytotoxizitätstest mit ES-D3- bzw. 3T3-Zellen.

Bei den 3T3-Zellen ließ sich zwischen 7 d und 10 d Exposition praktisch kein Unterschied feststellen (Tab. 44). Die ES-D3-Zellen reagierten dagegen auf die kürzere Expositionszeit deutlich empfindlicher: der IC_{50}D3 lag im 7-Tage-Test 2,3- bzw. 3,7-fach niedriger, je nach eingesetztem Lösungsmittel.

4.4.3.2 Prüfung von Cyclophosphamid im mEST

Die Untersuchung von Cyclophosphamid im mEST wurde sowohl mit kokultivierten HepG2-Zellen (mEST-HepG2) als auch mit H4IIE-Zellen (mEST-H4IIE) durchgeführt. Dabei war das Cyclophosphamid beim mEST-HepG2 in DMSO gelöst, beim mEST-H4IIE in isotoner Kochsalzlösung. Die Konzentrations-Wirkungskurven der Tests sind in Abbildung 23 dargestellt, die Halbhemmkonzentrationen in Tabelle 44. In Tabelle 44 sind insgesamt alle Ergebnisse für Cyclophosphamid aus dem EST, den verkürzten EST-Zytotoxizitätstests und dem mEST zusammengefasst. In Tabelle 45 werden die Z- und D-Quotienten aus mEST und EST miteinander verglichen.

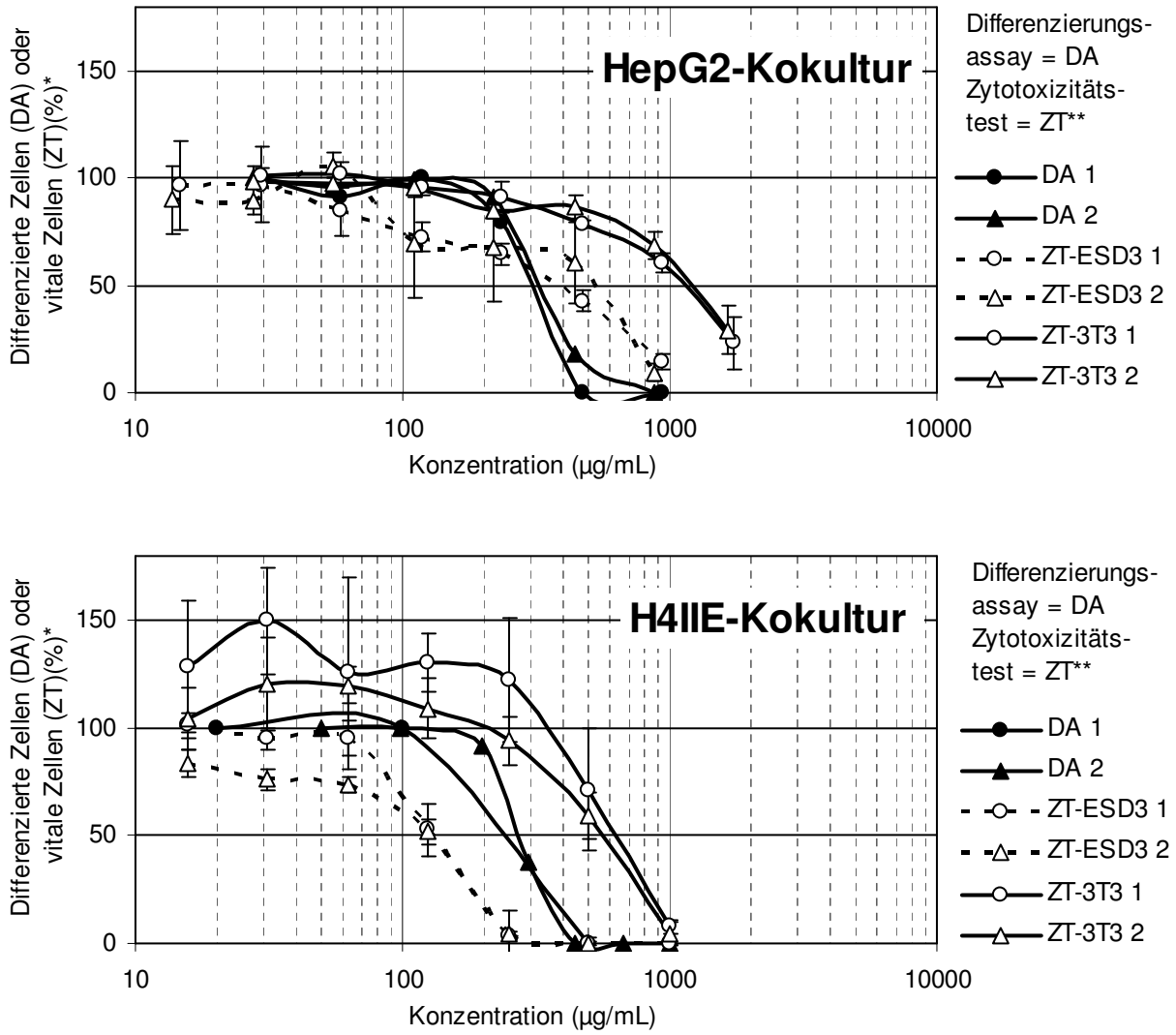


Abb. 23: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Cyclophosphamid im mEST mit HepG2- oder H4IIE-Kokultur (3.11). Lösungsmittel bei HepG2-Kokultur: 0,25% v/v DMSO; Lösungsmittel bei H4IIE-Kokultur: 2,5% v/v isotone Kochsalzlösung. Pro Kokultur wurden zwei unabhängige mESTs durchgeführt. Die Messwerte der Zytotoxizitätstests sind mit ihrer Standardabweichung angegeben. *Beim Differenzierungsassay (DA) ist der Prozentsatz an Zellen angegeben, die sich am Ende des Tests in schlagende Herzmuskelzellen differenziert haben; bei den Zytotoxizitätstests (ZT) ist der Prozentsatz an Zellen angegeben, die am Ende des Tests vital waren. In allen drei *in vitro*-Tests wurden die Ergebnisse der Testansätze auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, welche auf 100% gesetzt wurde. **ZT-ESD3 bzw. -3T3 = Zytotoxizitätstest mit ES-D3- bzw. 3T3-Zellen.

Tab. 44: Halbhemmkonzentrationen von Cyclophosphamid, die im EST (3.9) und mEST mit HepG2- bzw. H4IIE-Kokultur (3.11) in verschiedenen Lösungsmitteln (0,25% v/v DMSO; 2,5% v/v isotone Kochsalzlösung (i.K.)) zu verschiedenen Expositionszeiten bestimmt wurden. Die Halbhemmkonzentrationen wurden aus den Konzentrations-Wirkungskurven des EST graphisch ermittelt. Lauf 1 und 2 stellen zwei voneinander unabhängige Versuche dar.

Test	Ko-kultur	Löse-mittel	Lauf	IC_{50}3T3 7d Exp. (µg/mL)	IC_{50}D3 7d Exp. (µg/mL)	ID_{50} 10 / 11d Exp.* (µg/mL)	IC_{50}3T3 10d Exp. (µg/mL)	IC_{50}D3 10d Exp. (µg/mL)
EST	-	DMSO	1	1220	260	260	>939	450
EST	-	DMSO	2	970	150	170	>939	480
mEST	HepG2	DMSO	1	1130	380	300	-	-
mEST	HepG2	DMSO	2	1220	560	350	-	-
EST	-	i.K.	1	870	67	150	800	170
EST	-	i.K.	2	850	58	150	>1000	300
mEST	H4IIE	i.K.	1	640	140	250	-	-
mEST	H4IIE	i.K.	2	560	130	270	-	-

Exp. = Expositionsdauer. *10 d Exposition im EST, 11 d Exposition im mEST.

Tab. 45: Z- und D-Quotienten von Cyclophosphamid im EST und im mEST mit HepG2- bzw. H4IIE-Kokultur. Die Quotienten wurden aus den Halbhemmkonzentrationen der *in vitro*-Tests des EST bzw. mEST berechnet (Tab. 44). Im Unterschied zu den Quotienten für einen EST wurden für den Vergleich zwischen EST und mEST Halbhemmkonzentrationen zur Berechnung der Quotienten eingesetzt, die aus Tests mit unterschiedlichen Expositionszeiten stammen. In dieser Tabelle wurden die Quotienten wie folgt berechnet (siehe auch Kapitel 3.11.4): Z-Quotient = IC_{50}3T3 (7 d Exposition) / IC_{50}D3 (7 d Exposition). D-Quotient für EST = IC_{50}D3 (7 d Exposition) / ID_{50} (10 d Exposition). D-Quotient für mEST = IC_{50}D3 (7 d Exposition) / ID_{50} (11 d Exposition).

Test	Lösungsmittel	Z-Quotient	D-Quotient
EST	DMSO	6,5	1,0
EST	DMSO	4,7	0,9
mEST-HepG2	DMSO	3,0	1,3
mEST-HepG2	DMSO	2,0	1,6
EST	i.K.	12,9	0,45
EST	i.K.	14,7	0,39
mEST-H4IIE	i.K.	4,6	0,56
mEST-H4IIE	i.K.	4,3	0,48

Z-Quotient = Zytotoxizitätsquotient; D-Quotient = Zytotoxizität-Differenzierungsquotient; mEST-HepG2 = mEST mit HepG2-Kokultur; mEST-H4IIE = mEST mit H4IIE-Kokultur. i.K. = Lösungsmittel isotone Kochsalzlösung.

Beim mEST mit HepG2-Kokultur (Lösungsmittel DMSO, Tab. 45) waren die Z-Quotienten im Vergleich zum EST etwas kleiner, und die D-Quotienten unterschieden sich nicht stark voneinander. Im direkten Vergleich der Halbhemmkonzentrationen lagen die des mEST-HepG2 in allen *in vitro*-Tests etwas höher als beim EST (Tab. 44).

Beim mEST mit H4IIE-Kokultur (Lösungsmittel isotonische Kochsalzlösung) ergab sich ein ähnliches Bild. Die Z-Quotienten des mEST-H4IIE waren ebenfalls kleiner, und die D-Quotienten unterschieden sich nicht. Die D-Quotienten waren <1, was auf die Verkürzung der Zytotoxizitätstests zurückgeführt werden konnte (5.3.3.1). Die Halbhemmkonzentrationen des mEST-H4IIE waren ebenfalls meist etwas höher als beim EST, nur die IC_{50}3T3-Werte lagen etwas niedriger.

Entgegen der Erwartung reagierten damit die Zielzellen des mESTs auf Cyclophosphamid bis auf eine Ausnahme weniger empfindlich als im EST. Deshalb wurden keine direkten Hinweise darauf erhalten, dass Cyclophosphamid im mEST aktiviert wurde.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, unter welchen Bedingungen der EST eine Modellsubstanz als Proteratogen identifizieren kann, und welche Metabolisierungssyteme in den EST integriert werden können. Im ersten Teil der Diskussion wird daher zum einen auf die Fähigkeit des EST eingegangen, Proteratogene von Teratogenen zu unterscheiden, und zum anderen, mit welchen Vergleichsparametern das am besten gelingt (5.1). Im den nächsten beiden Kapiteln werden die Hepatomazellarten HepG2 und H4IIE unter dem Gesichtspunkt ihrer Eignung als metabolisch aktive Kokultur für den mEST diskutiert (5.2, 5.3). Im letzten Kapitel werden schließlich das mEST-Protokoll und die verwendeten Modellsubstanzen beurteilt (5.4)

5.1 Untersuchung von Proteratogen und Teratogen im EST

Für eine übergreifende Diskussion dieses Kapitels sind die Ergebnisse der vier untersuchten Substanzpaare Valpromid/Valproinsäure (VPD/VPA), Retinol/Retinsäure (RO/RA), Cyclophosphamid/4-Hydroperoxycyclophosphamid (CPP/4HC) und Albendazol/Albendazolsulfoxid (ABZ/ASO) in Tabelle 46 zusammengefasst. Die Tabelle beinhaltet zum einen die Halbhemmkonzentrationen, die bei der Prüfung einer Substanz in den drei *in vitro*-Tests eines ESTs erhalten wurden (IC_{50}3T3-Wert; IC_{50}D3-Wert; ID_{50}-Wert). Eine Halbhemmkonzentration gibt dabei an, bei welcher Konzentration 50% der getesteten Zellen eine Hemmung des Endpunktes erfahren, der in dem jeweiligen *in vitro*-Test untersucht wird (3.9). Dies sind in einem EST die Zellproliferation in den Zytotoxizitätstests und die Zelldifferenzierung im Differenzierungsassay. Weiterhin sind die Z-Quotienten (Zytotoxizitätsquotienten) und D-Quotienten (Zytotoxizität-Differenzierungsquotienten) aufgeführt, welche das embryotoxische Potenzial der Testsubstanz (Z-Quotient) bzw. die differenzierungshemmende Komponente der Testsubstanz (D-Quotient) charakterisieren (3.9.6). Schließlich ist auch angegeben, in welche Embryotoxizitätsklassen das biostatistische Prädiktionsmodell die Testsubstanzen einstuft.

Tab. 46: Vergleich der Ergebnisse von Proteratogen und Teratogen im EST anhand der verschiedenen Endpunkte und berechneten Parameter (Halbhemmkonzentrationen, Z- und D-Quotienten, Prädiktionsmodell).

Sub.	IC_{50}3T3 (µg/mL)	IC_{50}D3 (µg/mL)	ID_{50} (µg/mL)	Z-Quotient	D-Quotient	PM[a]
VPD	>740	380 - 386	210 - 215	>1,9	1,8	2
VPA	600 - 620	175 - 220	29 - 69	2,8 - 3,4	2,5 - 7,6	2
RO	2,7 - 4,2	$[61 - 118]\times10^{-3}$	$[11 - 19]\times10^{-3}$	23 - 69	5,5 - 6,2	3
RA	16 - 17	$[0,18 - 0,62]\times10^{-3}$	$[0,02 - 0,15]\times10^{-3}$	$[2,6 - 9,4]\times10^{4}$	1,6 - 31	3
CPP	800 - >1000	170 - 300	150	>3,3 - 4,7	1,1 - 2,0	2
4HC	0,53 - 0,60	0,13 - 0,14	-	4,1 - 4,3	-	-
ABZ	0,16 - 0,17	0,06 - 0,075	0,18	2,1 - 2,8	0,33	3
ASO	5,0	2,1 - 4,5	4,6 - 5,7	1,1 - 2,4	0,46 - 0,79	2/3

Sub. = Substanz; PM = Prädiktionsmodell; VPD = Valpromid; VPA = Valproinsäure; RO = Retinol; RA = all-*trans*-Retinsäure; CPP = Cyclophosphamid; 4HC = 4-Hydroperoxycyclophosphamid; ABZ = Albendazol; ASO = Albendazol-Sulfoxid; Z-Quotient = Zytotoxizitätsquotient; D-Quotient = Zytotoxizität-Differenzierungsquotient. [a]1 = nicht embryotoxisch; 2 = schwach embryotoxisch, 3 = stark embryotoxisch.

Um die Plausibilität der ermittelten Halbhemmkonzentrationen dieser Arbeit zu überprüfen, wurden sie zunächst mit Daten verglichen, die aus der Literatur bekannt waren (Tab. 47).

Tab. 47: Vergleichsdaten aus der Literatur zu Substanzen, die im EST getestet wurden.

Substanz	IC_{50}3T3 (µg/mL)	IC_{50}D3 (µg/mL)	ID_{50} (µg/mL)	Prädiktions-modell[a]	Quelle
VPD	148[b]- 375[b]	444[b]- 488[b]	133[b] - 375[b]	schwach	#1, #2
VPA	235 - 545[c]	69 - 276[c]	38 - 66[c]	schwach	#3
RO	18	286×10^{-3}	$[28,6 - 286]\times10^{-3}$	stark	#2
RA	4,8	$[0,03 - 0,3]\times10^{-3}$	$[0,003 - 0,15]\times10^{-3}$	stark	#2
RA	17 - 42[c]	$[0,8 - 1900^{c}]\times10^{-3}$	$[0,3 - 400^{c}]\times10^{-3}$	stark	#3
CPP	825	275	275	schwach	#1
CPP	>1000	>1000	344 - 392	schwach	#4

Quellen: #1) Flick (2005); #2) Flick (2006); #3) Genschow *et al.* (2004); #4) Bremer *et al.* (2002). VPD = Valpromid; VPA = Valproinsäure; RO = Retinol; RA = all-*trans*-Retinsäure; CPP = Cyclophosphamid; 4HC = 4-Hydroperoxycyclophosphamid; ABZ = Albendazol; ASO = Albendazol-Sulfoxid. [a]Einstufung der Testsubstanz als stark, schwach oder nicht embryotoxisch; [b]Literaturdaten korrigiert mit einer Wiederfindung von 74% wie vom Hersteller der Stammlösung (TiHo) angegeben; [c]Spannweite der Daten von den vier Laboratorien, die an der Validierungsstudie teilgenommen hatten.

Die für Valpromid und Valproinsäure ermittelten Halbhemmkonzentrationen stimmen gut mit den Daten aus bereits veröffentlichten Studien überein (Tab. 46, Tab. 47).

Die Halbhemmkonzentrationen, die für Retinol gefunden wurden, liegen im Vergleich zu Daten aus der Literatur (Flick 2006; Tab. 47 #2) etwas niedriger, weil bei ihnen eine Wiederfindung des Retinols im ES-D3-Medium von 38% berücksichtigt wurde (4.2.2). Als Verbundpart-

ner des BMBF-Projektes hatte Flick die Retinol-Stammlösung für seine Versuche von der gleichen Quelle bezogen, aber bei der Angabe seiner Ergebnisse keinen Korrekturfaktor angewendet. Berücksichtigt man diesen Unterschied, sind alle Daten für Retinol gut miteinander vergleichbar.

Die Daten für Retinsäure liegen in einem ähnlichen Bereich wie die von Flick (2006; Tab. 47 #2), aber etwas niedriger als die aus der Validierungsstudie (Genschow *et al.* 2004; Tab. 47 #3). Bei den Halbhemmkonzentrationen aus der Validierungsstudie fällt auf, dass sie über einen sehr weiten Bereich streuen. Die in dieser Studie erzielten minimalen und maximalen Werte unterscheiden sich dabei bis zu einem Faktor 2400 bei den IC_{50}D3-Werten und einem Faktor 1300 bei den ID_{50}-Werten. Vor diesem Hintergrund ist die Differenz zwischen den in der vorliegenden Arbeit erzielten Werte und den Daten der Validierungsstudie als gering einzuschätzen. Die großen Spannweiten der Halbhemmkonzentrationen aus der Validierungsstudie verdeutlichen vielmehr, dass die im EST erzielten Ergebnisse für Retinsäure nur schlecht reproduziert werden können. In wie weit deshalb Retinsäure als Modellsubstanz für den EST geeignet ist, wird in Kapitel 5.4.2.2 diskutiert.

Die Ergebnisse für Cyclophosphamid aus der vorliegenden Arbeit (Tab. 46) bestätigen gut die Werte der anderen Autoren (Tab. 47). Zu 4HC exisitieren bislang keine Vergleichsdaten. Bei Betrachtung der Halbhemmkonzentrationen für 4HC (Tab. 22) fiel jedoch auf, dass der ID_{50} mit 0,56 µg/mL höher ausfiel als der IC_{50}D3 mit 0,14 µg/mL. Das ist biologisch paradox, denn es hätte bedeutet, dass sich die ES-D3-Zellen noch bei einer Konzentration differenziert hatten, bei der sie aufgrund der zytotoxischen Wirkung des 4HC bereits hätten abgestorben sein müssen. Dieser Widerspruch lässt sich jedoch mit den unterschiedlichen Expositionsbedingungen erklären, die bei dem Versuch vorgelegen haben. Das 4HC wurde als Vorläufer der teratogenen Cyclophosphamid-Metaboliten Acrolein, Phosphoramid Mustard und Chlorethylaziridin eingesetzt. Diese bilden sich spontan, sobald das 4HC in wässrige Lösung gebracht wird, und haben kurze Halbwertszeiten von 17 bis 89 Minuten (Ludeman 1999). Da Acrolein und Chlorethylaziridin leicht flüchtig sind, können sie in 96-Well-Platten die benachbarten Wells über die Gasphase kontaminieren (Blomgren und Hallström 1989). Um eine solche Kontamination zu vermeiden, wurden die 96-Well-Platten der Zytotoxizitätstests mit 4HC mit einer gasdurchlässigen Folie beklebt (3.9.5). Damit war ein CO_2-Austausch zur Erhaltung der Pufferkapazität des Mediums gewährleistet, flüchtige Stoffwechselprodukte wurden jedoch nach Passage der Folie im Luftvolumen des Brutschranks verdünnt. Bei den 24-Well-Platten des Differenzierungsassays wurde keine Folie eingesetzt, sondern der Deckel des Herstellers verwendet. In den 24-Well-Platten konnte keine Querkontamination stattfinden, weil sich in einer Platte nur ein einziger Testansatz befand und so alle Wells gleich exponiert waren. Die unterschiedliche Abdeckung der

Platten könnte nun aufgrund der unterschiedlichen Diffusionsverhältnisse zu einer unterschiedlichen Exposition der Zellen geführt haben. Die Diffusionsdynamiken der flüchtigen Produkte zwischen Medium und Gasphase oberhalb des Mediums sowie durch die Folie hindurch sind allerdings nicht bekannt (Flowers *et al.* 2000). Zur Bestätigung dieser Hypothese müssen die Metaboliten in Medium und Gasphase analysiert werden.

Die beiden Antihelmintica Albendazol und Albendazol-Sulfoxid wurden bislang im EST noch nicht untersucht, sodass dafür aus der Literatur keine Vergleichsdaten existieren. Bei Betrachtung der Halbhemmkonzentrationen (Tab. 24) fiel auf, dass bei beiden Substanzen die ID_{50}-Werte ebenfalls höher ausfielen als die IC_{50}D3-Werte (1,3- bzw. 2,2-fach bei Albendazol-Sulfoxid; 3-fach bei Albendazol). Bei Albendazol-Sulfoxid bewegten sich diese Unterschiede noch im Bereich der Messungenauigkeit: Bei Lauf 1 wurde der um den Faktor 2,2 kleinere IC_{50}D3 durch eine einzelne Konzentration zwischen 0% und 100% Vitalität bestimmt (3 µg/mL bei ZT-D3 1 in Abb. 13B), deren Vitalität stark streute, und bei Lauf 2 lag der IC_{50}D3 nur um den Faktor 1,3 unterhalb des ID_{50}. Bei Albendazol unterschied sich der IC_{50}D3 vom ID_{50} aus Lauf 1 jedoch um den Faktor 3. Die Ursache für diesen größeren Unterschied ist nicht bekannt.

5.1.1 Diskriminierungsfähigkeit des EST

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden angewendet, um Unterschiede zwischen Proteratogen und Teratogen im EST feststellen zu können (3.9.6). Zum einen wurde das Prädiktionsmodell des EST verwendet, mit dem die Embryotoxizität von Substanzen eingestuft werden kann. Zum anderen wurden zwei Quotienten Z und D gebildet, mit denen die Verhältnisse der Endpunkte des ESTs zueinander bestimmt werden konnten, und zusätzlich wurden die Halbhemmkonzentrationen paarweise miteinander verglichen. Der EST konnte bei jedem Substanzpaar die Wirkungen des Proteratogens von der des Teratogens deutlich unterscheiden, aber diese Trennung gelang nicht mit jeder Methode.

5.1.1.1 Diskriminierung mit dem Prädiktionsmodell

Mit dem Prädiktionsmodell war es bei keinem Paar möglich, Proteratogen vom Teratogen zuverlässig zu differenzieren. Die Paare VPD/VPA und RO/RA wurden jeweils in die gleiche Embryotoxizitätsklasse eingestuft, und bei ABZ/ASO fiel die Einstufung von Albendazol-Sulfoxid nicht eindeutig aus (Tab. 46). Das Paar CPP/4HC konnte für eine Bewertung nicht verwendet werden, weil der ID_{50} von 4HC nicht gewertet werden konnte. Mit diesen Ergebnissen wurde deutlich, dass die Trennungsschärfe des Prädiktionsmodells für die untersuchten Sub-

stanzpaare nicht ausreichte und Fehlklassifizierungen stattfanden. Dafür kommen mehrere Gründe in Betracht.

Das Prädiktionsmodell basiert auf einem iterativen Berechnungsprozess, der mit einem Trainingskollektiv von zehn Modellsubstanzen durchgeführt wurde (Scholz *et al.* 1999a). Mit dieser Anzahl von Substanzen kann nur eine begrenzte Anzahl von Mustern abgebildet werden - der Begriff Muster beschreibt hier ein spezifisches Verhältnis der drei Halbhemmkonzentrationen des EST zueinander - welche Chemikalien im EST hervorrufen können. Wenn das spezifische Muster einer neuen Prüfsubstanz fehlt, kann es zu einer Fehlklassifizierung kommen. Dies wurde von Genschow *et al.* (2004) in der EST-Validierungsstudie z.B. bei Quecksilbermethylchlorid festgestellt, das mehrfach als nicht embryotoxisch eingestuft wurde, obwohl es *in vivo* stark embryotoxisch wirkt. Genschow *et al.* beobachteten, dass die Fehlklassifizierung dort auftrat, wo in den Tests der IC_{50}3T3 niedriger war als der IC_{50}D3, und begründeten dies mit der Feststellung, dass ein dem Quecksilbermethylchlorid ähnliches Muster im Trainingskollektiv der Modellsubstanzen nicht vorgekommen war. Bei einer rückblickenden Beurteilung des EST (Spielmann *et al.* 2006) wurde deshalb empfohlen, die Datenbasis für den EST zu erweitern.

Die Beschränkung auf drei Embryotoxizitätsklassen stellt eine starke Vereinfachung reproduktionstoxikologischer Befunde dar und erlaubt *per se* keine fein abgestufte Differenzierung zwischen verschiedenen Substanzen. Welche Abstufung möglicherweise notwendig ist, um der komplexen Realität entwicklungstoxischer Befunde gerecht zu werden, wird an dem von Schwetz (1992) entwickelten Klassifizierungssystem deutlich. Auf der Basis von sieben gewichteten Faktoren kann mit diesem System die Entwicklungstoxizität einer Substanz *in vivo* mit einer Skala beschrieben werden, die von 0 bis 190 reicht (Brown 2002).

Die Daten aus der Validierungsstudie (Genschow *et al.* 2004) zeigen, dass das Prädiktionsmodell Substanzen mit einem IC_{50}D3 bzw. ID_{50} unter 10 µg/mL als stark embryotoxisch klassifiziert. Da dies bereits die Klasse mit der höchsten Embryotoxizität darstellt, können Substanzen mit Halbhemmkonzentrationen unterhalb 10 µg/mL nicht weiter differenziert werden. Damit wird jedoch das Spektrum an Konzentrationen, innerhalb dessen eine Graduierung möglich ist, stark eingeschränkt. Die Halbhemmkonzentrationen der sechs Substanzen, die in der Validierungsstudie in die Embryotoxizitätsklasse 3 eingeordnet wurden, reichten von 10 µg/mL ausgehend noch drei bis vier Größenordnungen niedriger bis zu 0,0001 µg/mL. Folglich wurden in dieser Arbeit Retinol und Retinsäure aufgrund ihrer IC_{50}D3 bzw. ID_{50}-Werte <10 µg/mL als stark embryotoxisch eingestuft und konnten nicht voneinander differenziert werden.

ABZ/ASO konnten vom Prädiktionsmodell nicht eindeutig diskriminiert werden, weil Albendazol-Sulfoxid einmal als schwach und einmal als stark embryotoxisch eingestuft wurde, obwohl die Halbhemmkonzentrationen der Doppelbestimmung nur wenig variierten. Dieses Phänomen

der divergierenden Klassifizierung einer Substanz bei einer Doppelbestimmung scheint zur Charakteristik des Prädiktionsmodells zu gehören und kam in der Validierungsstudie bei neun der zwanzig untersuchten Chemikalien vor. Genschow *et al.* (2004) illustrierten das Phänomen am Beispiel des Hydroxyharnstoff, dessen Halbhemmkonzentrationen im gleichen Konzentrationsbereich liegen wie Albendazol-Sulfoxid. Sie stellten fest, dass variierende Endpunkte einer Doppelbestimmung umso wahrscheinlicher zu einer unterschiedlichen Klassifizierung führen können, je näher die Konzentrationen an der postulierten Konzentrations-Obergrenze für den EST von 1000 µg/mL liegen.

Bei 4HC, Albendazol und Albendazol-Sulfoxid wurden im EST ID_{50}-Werte bestimmt, die größer waren als der IC_{50}D3 und damit biologisch widersprüchlich. Für 4HC und Albendazol-Sulfoxid konnte diese Situation mit dem Versuchsaufbau oder der Messungenauigkeit erklärt werden, nicht aber für Albendazol. Dass ein ID_{50} gegenüber dem IC_{50}D3 größer ausfällt ist jedoch nicht ungewöhnlich und wurde sowohl bei Ascorbinsäure in der Prävalidierungsstudie des EST festgestellt (Scholz *et al.* 1999), als auch bei Acrylamid, Quecksilbermethylchlorid und Isobutyl-ethyl-Valproinsäure in mindestens zwei der vier Prüflaboratorien, die an der Validierungsstudie teilgenommen hatten (Genschow *et al.* 2004). Das Phänomen wurde im Laufe der Entwicklung des EST explizit bei der Verbesserung des ersten Prädiktionsmodells berücksichtigt, indem anstatt der Variablen IC_{50}D3/ID_{50} vom ursprünglichen Prädiktionsmodell (Spielmann *et al.* 1997) der Term (IC_{50}3T3 - ID_{50})/IC_{50}3T3 in das verbesserte Prädiktionsmodell integriert wurde. Scholz *et al.* (1999a) stellten fest, dass dadurch die Prädiktivität des Modells in den Fällen verbessert wurde, in denen der ID_{50} sowohl gegenüber dem IC_{50}D3 als auch dem IC_{50}3T3 größer ist. Der sich daraus ergebende biologische Widerspruch wurde von den Autoren nicht erklärt.

Die Daten dieser Arbeit zeigen daher, dass das Prädiktionsmodell in seiner bestehenden Form nicht dazu geeignet ist, Substanzen zu differenzieren, deren Embryotoxizität nicht stark variiert.

5.1.1.2 Diskriminierung mit alternativen Parametern

Eine alternative Möglichkeit, die Substanzpaare zu differenzieren, besteht im direkten paarweisen Vergleich der Halbhemmkonzentrationen miteinander. Diese Methode besitzt den Vorteil, dass Unterschiede direkt erfasst werden, erlaubt andererseits jedoch nur eine Aussage über die verglichenen Endpunkte Zytotxizität und Differenzierungshemmung. Um auch spezifisch embryotoxische Eigenschaften der Testsubstanz beschreiben zu können, wurden für die vorliegende Arbeit zusätzlich zwei Quotienten Z und D berechnet (3.9.6). Mit dem Z-Quotient wird das embryotoxische Potenzial einer Substanz *in vitro* ähnlich dem A/D-Quotienten *in vivo* charakterisiert, und mit dem D-Quotient kann festgestellt werden, ob die Differenzierungshem-

mung im Differenzierungsassay auf einen spezifisch differenzierungshemmenden Mechanismus zurückgeführt werden kann. Diese verschiedenen Parameter - die Halbhemmkonzentrationen und der Z- bzw. D-Quotient - beschreiben unterschiedliche Aspekte der selben Testsubstanz. Beim Vergleich der Substanzen eines Paares wurden die Paare deshalb nicht immer anhand aller Parameter differenziert (Tab. 46). Durch einen direkten Vergleich der Halbhemmkonzentrationen ließen sich alle Substanzpaare deutlich differenzieren, mit Ausnahme der IC_{50}3T3-Werte von VPD/VPA. Anhand der Z-Quotienten konnten dagegen nur VPD/VPA und RO/RA diskriminiert werden, und mit dem D-Quotienten ließ sich nur VPD von VPA differenzieren.

Der direkte Vergleich von Halbhemmkonzentrationen war damit die sensitivste Methode, um Substanzen voneinander zu unterscheiden. Zusammen mit den Z- und D-Quotienten wurden die Substanzpaare individuell charakterisiert. Bei VPD/VPA und RO/RA wirkte das Teratogen in allen EST-*in vitro*-Tests toxischer (niedrigere Halbhemmkonzentrationen) und war embryotoxischer (größerer Z-Quotient) als das Proteratogen. Die Valproinsäure besaß zudem ein größeres differenzierungshemmendes Potenzial (größerer D-Quotient). Mit CPP/4HC zeigte sich, dass das 4HC zytotoxischer wirkte (niedrigere Halbhemmkonzentrationen), dass aber beide Substanzen das gleiche embryotoxische Potenzial besaßen (gleiche Z-Quotienten). Bei ABZ/ASO schließlich wirkte das Teratogen weniger toxisch (höhere Halbhemmkonzentrationen), aber beide Substanzen hatten ebenfalls das gleiche embryotoxische Potenzial. Durch die gemeinsame Betrachtung von Halbhemmkonzentrationen und Z- bzw. D-Quotienten ist es damit möglich, im EST ein Proteratogen von seinem Teratogen zu differenzieren und embryotoxische Eigenschaften zu beschreiben.

5.1.2 Korrelation mit *in vivo*-Daten

Ob der EST die Datenlage *in vivo* reproduzieren kann, wurde durch einen Vergleich der *in vitro*-Tests mit *in vivo*-Studien ermittelt. Es zeigte sich, dass bei VPD/VPA und RO/RA die Ergebnisse aus dem EST gut mit den Befunden *in vivo* korrelierten, und bei CPP/4HC teilweise. Nur bei ABZ/ASO kamen die *in vitro*-Tests zu gegensätzlichen Ergebnissen.

5.1.2.1 Valpromid und Valproinsäure

Obwohl mit dem Prädiktionsmodell zwischen Valpromid und Valproinsäure kein Unterschied festgestellt werden konnte, zeigte der Vergleich der Halbhemmkonzentrationen und der Z- und D-Quotienten, dass Valproinsäure ein größeres embryotoxisches Potenzial und eine größere differenzierungshemmende Komponente besitzt (Tab. 18, Tab. 19). Die *in vivo*-Daten aus der Literatur belegen das Ergebnis des Vergleichs der letzteren Parameter.

Die *in vivo* Embryotoxizität der Valproinsäure wurde von Brown (2002) als schwach eingestuft. Da für Valpromid keine Einstufung existiert, wurde eine Abschätzung seiner *in vivo* Embryotoxizität anhand von Studien vorgenommen, in der Valpromid und Valproinsäure parallel untersucht wurden, bzw. die unter vergleichbaren Bedingungen stattgefunden haben. In Studien von Nau (1985, 1986) mit NMRI-Mäusen riefen Valproinsäure-Dosen bei einer einmaligen subkutanen Dosis von 400 bis 600 mg/kg an Trächtigkeitstag 8 bis zu 60% Exencephalie hervor, während sich Valpromid (Nau und Löscher 1986; Nau und Scott 1987) bei vergleichbaren Konzentrationen und Applikationen als nicht teratogen herausstellte. Radatz *et al.* (1998) verglichen beide Substanzen direkt und gaben NMRI-Mäusen an Trächtigkeitstag 8 einmalig eine i.p. Injektion von 3 mmol/kg Valpromid oder Valproinsäure (je ca. 430 mg/kg). Für Valproinsäure erzielten sie eine Exencephalie-Rate von 53% gegenüber der Kontrolle, für Valpromid dagegen nur von 6%. Einen ähnlichen Befund erzielten Okada *et al.* (2004), die NMRI-Mäusen nach gleichem Schema je 800 mg/kg Valproinsäure oder Valpromid subkutan verabreichten und neben Exencephalie und Verlust an Föten auch skeletale Abnormalitäten untersuchten. Für Valpromid erhielten sie in allen Parametern erhöhte Inzidenzen, während für Valpromid kaum Unterschiede zur Kontrolle festgestellt wurden. Valproinsäure besitzt also *in vivo* ein teratogenes Potenzial, während Valpromid bei vergleichbaren Dosen davon weitgehend frei ist. Damit korreliert der Befund des EST auf Basis des Vergleichs von Z- und D-Quotienten sowie von Halbhemmkonzentrationen sehr gut mit der *in vivo*-Datenlage.

5.1.2.2 Retinol und Retinsäure

Auch bei Retinol und Retinsäure konnte das Prädiktionsmodell keinen Unterschied feststellen. Der Vergleich von Z-Quotienten und Halbhemmkonzentrationen zeigte jedoch, dass die Retinsäure ein deutlich größeres embryotoxisches Potenzial besitzt als Retinol. Dieser Befund korreliert mit den *in vivo*-Daten aus der Literatur.

Die *in vivo* Embryotoxizität der Retinsäure wurde von Brown (2002) als stark eingestuft, während für Retinol bislang keine Einstufung existiert. Zur Abschätzung der Embryotoxizität beider Substanzen wurden Studien untersucht, in denen beide Stoffe getestet wurden. Kochhar (1967) behandelte A/Jax-Mäuse einmalig am Tag 8, 9 oder 10 der Gestation peroral mit 500 mg/kg Vitamin A (als Retinylacetat) oder 50 mg/kg Retinsäure und fand bei beiden Gruppen 20 - 50% missgebildete Föten. Unter Berücksichtigung aller gewonnenen Daten urteilte sie, dass Retinsäure in Bezug auf ihr teratogenes Potenzial eine 40-fach höhere Aktivität besitzt als Retinol. In weiteren Versuchen mit *black-hooded* Long-Evans Ratten kam sie zu einem ähnlichen Ergebnis. In einer späteren Studie mit ICR-Mäusen schätzten Kochhar *et al.* (1988) die teratogene Potenz von Retinol auf 1/4 der teratogenen Potenz von Retinsäure. Auch Rosa *et al.*

(1986) untersuchten die Unterschiede zwischen Retinol und Retinsäure *in vivo*, indem sie die niedrigsten teratogenen Dosen aus verschiedenen Studien verglichen. Bei Ratten und Mäusen stellten sie fest, dass die niedrigsten Retinol-Dosen (50 bzw. 90 mg/kg/Tag) etwa 15 - 17-fach über den niedrigsten Retinsäure-Dosen lagen. Diese Studien zeigen, dass Retinsäure *in vivo* die größere teratogene Potenz besitzt und bestätigen damit den Befund aus dem EST.

Das Retinol wurde vom Prädiktionsmodell als stark embryotoxisch eingestuft und wies einen Z-Quotienten auf, der mit 23 - 69 etwa zehnfach größer war als die Z-Quotienten der anderen in dieser Arbeit untersuchten Proteratogene (>1,9 - 4,7). Dieser *in vitro*-Befund weist darauf hin, dass Retinol ein intrinsisches teratogenes Potenzial besitzt, was durch *in vivo*-Daten unterstützt wird. Im Säugetier geht man davon aus, dass die teratogene Wirkung des Retinols durch die Retinsäure und andere Metaboliten des Retinols ausgeübt wird (Collins *et al.* 1992; Soprano und Soprano 1995). Collins *et al.* (1992) erhielten in ihrer Studie jedoch Hinweise darauf, dass auch Retinol selbst teratogen wirken kann. Sie gaben zwei Gruppen von NMRI-Mäusen 50 mg/kg Retinol einmalig am Tag 11 der Gestation. Die eine Gruppe war unbehandelt, die andere wurde mit 4-Methylpyrazol vorbehandelt, einem Alkohol-Dehydrogenasehemmer. Während die skeletalen Missbildungen durch die Vorbehandlung mit 4-Methylpyrazol um 19,9 - 24,7% abnahmen, wurden immer noch 24 - 31,3% Skelettanomalien festgestellt, die sich signifikant von der Kontrolle unterschieden. Die Autoren schlossen daraus, dass entweder Retinol ebenfalls teratogen oder als Ko-Teratogen wirkt, oder dass sich noch andere, bislang unbekannte teratogene Metaboliten gebildet hatten.

5.1.2.3 Cyclophosphamid und 4HC

Cyclophosphamid wurde vom Prädiktionsmodell als schwach embryotoxisch eingestuft. Mit 4HC konnte es jedoch nicht verglichen werden, da der ID_{50} von 4HC nicht valide war und die Substanz vom Prädiktionsmodell nicht eingestuft werden konnte. Aufgrund ähnlicher Z-Quotienten unterschied sich das embryotoxische Potenzial beider Substanzen nicht, aber die IC_{50}-Werte von 4HC lagen um etwa drei Größenordnungen niedriger. 4HC übte damit auf die 3T3- und ES-D3-Zellen eine wesentlich größere zytotoxische Wirkung aus als Cyclophosphamid. Dieses Ergebnis korreliert in einigen Bereichen mit der Datenlage *in vivo*.

Zur Untersuchung der embryotoxischen Wirkung von Cyclophosphamid, 4HC, Phosphoramid Mustard und Acrolein *in vivo* injizierte Hales (1982) diese Substanzen in die Amnionflüssigkeit der Embryonen von Sprague-Dawley-Ratten am Tag 13 der Gestation. Mit dieser Technik konnte eine Metabolisierung der Substanzen durch das Muttertier vermieden werden. Sie fand missgebildete Föten bei allen Substanzen, wobei die teratogen wirkende 4HC-Konzentration um zwei bis drei Größenordnungen unterhalb der Konzentration für Cyclophosphamid lag und

zusätzlich die doppelte Anzahl an Missbildungstypen hervorrief. Damit belegte Hales die größere *in vivo* Embryotoxizität für 4HC, stellte gleichzeitig aber auch eine teratogene Wirkung bei unmetabolisiertem Cyclophosphamid fest. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren. Zum einen belegt die Mehrheit der Studien, dass Cyclophosphamid aktiviert werden muss, um teratogene Effekte auszulösen (Spielmann und Jacob-Müller 1981; Mirkes *et al.* 1991). Andererseits stellten einige Autoren bei Labornagern auch für unmetabolisiertes Cyclophosphamid eine teratogene Wirkung fest (Gibson und Becker 1968, 1971; Hales 1982). Im Vergleich zum Befund des EST ergibt sich daher folgendes Bild. Die Einstufung des Prädiktionsmodells von Cyclophosphamid als schwach embryotoxisch stimmt mit den Ergebnissen *in vivo* überein, da auch unmetabolisiertes Cyclophosphamid eine teratogene Wirkung ausübt. Weiterhin korreliert der Abstand der toxischen Wirkung zwischen 4HC und Cyclophosphamid im EST mit dem Abstand *in vivo*: die Differenz zwischen den IC_{50}-Werten von 4HC und Cyclophosphamid im EST (ca. Faktor 1000) ist ähnlich so groß wie jener, der von Hales (1982) für embryotoxische Wirkungen *in vivo* zwischen beiden Substanzen gefunden wurde. In Bezug auf den toxischen Wirkungsmechanismus unterschieden sich jedoch die *in vitro*- von den *in vivo*-Befunden. Während 4HC *in vivo* eindeutig teratogen wirkte, konnte für die Substanz *in vitro* basierend auf den Z-Quotienten kein höheres embryotoxisches Potenzial festgestellt werden. Möglicherweise stehen diese Befunde zueinander in Widerspruch, weil es sich bei den teratogenen Metaboliten um Substanzen einer Reaktionskette handelt, deren Dynamik sich *in vivo* von der Dynamik *in vitro* unterscheidet, was in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen der Metaboliten zueinander und damit in unterschiedlichen Gesamtexpositionen resultieren würde. Der EST konnte daher im Vergleich zu den *in vivo*-Befunden die unterschiedlichen zytotoxischen Potenziale von Cyclophosphamid und 4HC vorhersagen, nicht jedoch Unterschiede in der Embryotoxizität. Dazu bleibt anzumerken, dass sich allgemein die Endpunkte Zytotoxizität und Entwicklungstoxizität oft nicht vollständig voneinander trennen lassen, weil viele entwicklungstoxische Effekt durch zytotoxische Mechanismen hervorgerufen werden (Spielmann *et al.* 2006).

5.1.2.4 Albendazol und Albendazol-Sulfoxid

Das Prädiktionsmodell stufte Albendazol als stark embryotoxisch ein, während Albendazol-Sulfoxid einmal als schwach und einmal als stark embryotoxisch klassifiziert wurde, sodass eine eindeutige Unterscheidung beider Substanzen nicht möglich war. Die embryotoxische Potenz beider Substanzen war aufgrund ähnlicher Z-Quotienten gleich, die Halbhemmkonzentrationen zeigten dagegen sowohl in den Zytotoxizitätstests als auch dem Differenzierungsassay eine größere toxische Potenz des Proteratogens Albendazol an. Dieses Ergebnis widersprach der Datenlage *in vivo*.

In vivo wurde in Studien mit Ratten für Albendazol-Sulfoxid eine größere embryotoxische Wirkung nachgewiesen als für Albendazol (Capece *et al.* 2003; Delatour *et al.* 1981, 1984). Delatour *et al.* (1981) verabreichten Sprague-Dawley-Ratten eine Dosis von 8,8 - 9,6 mg/kg Albendazol bzw. Albendazol-Sulfoxid von Tag 8 bis 15 der Gestation und fanden für Albendazol-Sulfoxid eine gegenüber dem Albendazol erhöhte Embryolethalität (18,4% *vs.* 63,3%), und erhöhte externe (14,4% *vs.* 20,3%) sowie skeletale (39,5% *vs.* 50%) Missbildungen. Andererseits brachten Cristofol *et al.* (1997) auch Albendazol selbst in Kombination mit Albendazol-Sulfoxid mit teratogenen Effekten in Verbindung, wobei sie dem Albendazol-Sulfoxid die größere Wirkung beimaßen. Möglicherweise besitzt also auch Albendazol eine intrinsische teratogene Potenz. Ob Albendazol jedoch vom Prädiktionsmodell zutreffend als stark embryotoxisch klassifiziert wurde, kann aufgrund der unzureichenden *in vivo*-Datenlage nicht beurteilt werden.

Whittaker und Faustman (1991) untersuchten ebenfalls die Embryotoxizität von Albendazol und Albendazol-Sulfoxid *in vitro*, jedoch mit der *Micromass* Zellkulturmethode mit Zellen aus Mittelhirn (CNS) und Beinknospen (LB) der Ratte. Dabei erhielten sie Ergebnisse, die mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind. Für Albendazol ermittelten sie IC_{50}-Werte von 0,93 / 1,3 µg/mL (CNS / LB), für Albendazol-Sulfoxid dagegen 50-fach höhere Werte von 42 / 82 µg/mL (CNS / LB). Als Erklärung für die *in vitro* höhere Toxizität des Albendazol-Sulfoxid führten die Autoren seine höhere Polarität und die damit einhergehende niedrigere Lipophilie an. Sie ließe das Albendazol-Sulfoxid gegenüber dem Albendazol weniger effizient durch die Zellmembran der Zielzellen diffundieren und mit den intrazellulären *Targets* reagieren. Bei dieser Erklärung bleibt jedoch offen, weshalb dieser Sachverhalt *in vivo* nicht auch gelten soll. Der teratogene Mechanismus von Benzimidazol-Carbamaten wie dem Albendazol und seinem Sulfoxid beruht auf der Hemmung der Tubulin-Polymerisation während der Mitose, was die Ausbildung des Spindelapparates beeinträchtigt oder verhindert (Capece *et al.* 2003; Navarro *et al.* 1999; Piscopo *et al.* 1997). Da sowohl Albendazol als auch Albendazol-Sulfoxid eine vergleichbar hohe Bindungsaffinität für Tubulin besitzen (Whittaker und Faustman 1991), muss die unterschiedliche teratogene Wirkung der Substanzen durch andere Faktoren begründet sein. Die Ursache für die Diskrepanz der Befunde aus dem EST und der *in vivo*-Datenlage muss durch spezifische Studien aufgeklärt werden. Insgesamt war es mit dem EST deshalb nicht möglich, den *in vivo*-Befund zu reproduzieren.

5.2 *HepG2-Zellen als Bioaktivierungssystem für den mEST*

Im Zuge der Entwicklung des mEST Testprotokolls wurden die HepG2-Zellen als eine Zelllinie identifiziert, die in den EST integriert werden kann (4.3). Zur Charakterisierung ihrer metabolischen Kompetenz wurde ihre Enzymaktivität und ihr Umsatz der Modellsubstanzen im Kokulturmedium untersucht. Es zeigte sich, dass die Zellen auch im ES-D3-Medium ihre Enzymaktivität behielten und in der Lage waren, auf niedrigem Niveau Valpromid und Retinol zu metabolisieren. Diese Substanzen und Cyclophosphamid wurden daraufhin im mEST mit HepG2-Kokultur getestet um zu prüfen, in welchem Umfang die Substanzen auch im mEST metabolisiert wurden, bzw. ob mit den erzeugten Metaboliten der proteratogene Charakter der Testsubstanzen nachgewiesen werden konnte. Dies war bei keiner Substanz der Fall. Im folgenden werden verschiedene Aspekte der Untersuchungen und Gründe für das Fehlen eines positiven Nachweises diskutiert.

5.2.1 Enzymaktivität

Um die gemessenen Enzymaktivitäten auf Plausibilität zu prüfen und den Einfluss des ES-D3-Mediums abzuschätzen, wurden die Phase I- und II-Enzymaktivitäten der HepG2-Zellen in ES-D3-Medium mit Literaturdaten verglichen (Tab. 48).

Die EROD-Aktivität der HepG2-Zellen dieser Arbeit lässt sich gut mit der Studie von Alexandre *et al.* (1999) vergleichen, da die Autoren die gleiche Analysenmethode, Inkubationszeit, Kulturplatten und Basismedium (DMEM) verwendeten. Nach Induktion mit MC lagen die Aktivitäten beider Untersuchungen in einem ähnlichen Bereich. In den Kontrollen fanden Alexandre *et al.* eine Grundaktivität von 2,2 - 5,1 pmol/mg/min, während die EROD-Aktivität der HepG2-Zellen in den Kontrollen dieser Arbeit unterhalb der Nachweisgrenze lag. Möglicherweise hat das ES-D3-Medium hier die Grundaktivität der HepG2-Zellen gehemmt, denn die verwendeten Medien unterschieden sich in Bezug auf FCS-Gehalt, FCS-Charge und Supplemente, welche die Enzymaktivität beeinflussen können (Doostdar *et al.* 1988; Nakama *et al.* 1995). Die PROD-Aktivitäten der HepG2-Zellen müssen mit den Literaturdaten unter dem Gesichtspunkt unterschiedlicher untersuchter Matrices, Kulturmedien und Inkubationszeiten verglichen werden. Unter Berücksichtigung dieser Umstände sind die Daten gut miteinander vergleichbar. Die BROD-Aktivitäten dieser Arbeit liegen im Vergleich zu den Daten von Alexandre *et al.* (1999) nach Induktion etwas höher, und in den Kontrollen deutlich höher. Das ES-D3-Medium schien hier die BROD-Aktivität zu fördern. Mit MC oder PB konnte keine wesentliche Steigerung der Enzymaktivität erreicht werden, was mit den Ergebnissen von

Tab. 48: Phase I- und II-Enzymaktivitäten von HepG2-Zellen. Eigene Daten sind Angaben aus der Literatur gegenübergestellt. Die eigenen Daten zur EROD-, PROD- und BROD-Aktivität wurden aus den Messwerten zusammengestellt, die nach der Behandlung mit Glucuronidase/Arylsulfatase erhalten wurden (Tab. 31).

Versuchsbedingungen Medium; Inkubationszeit (Induktionszeit); analysierte Matrix; Methodentyp[a]	**Kontrolle** (pmol/mg/min)	**Induziert** (pmol/mg/min)	**Induktor**	**Quelle**
EROD-Aktivität				
ES-D3-Med.; 1-4 d (1-4 d); intakte Zellen	<NG	9,3 - 52	0,2 µM MC	
DMEM; 1-4 d (Tag 2-4); intakte Zellen; A	2,2 - 5,1	16 - 36	5 µM MC	#1
PROD-Aktivität				
ES-D3-Med.; 1-4 d (1-4 d); intakte Zellen	<NG - 1,2	<NG - 7,3 <NG	0,2 µM MC 2 mM PB	
WME; 3 d; Zelllysat; B	0,5	2,8	2 mM PB	#2
Versch. Medien; 7-10 d; Zelllysat; B	0,2 - 3,0	-	-	#3
BROD-Aktivität				
ES-D3-Med.; 1-4 d (1-4 d); intakte Zellen	<NG - 5,9	1,5 - 11 0,9 - 7,8	0,2 µM MC 2 mM PB	
DMEM; 1-4 d; intakte Zellen; A	0,03 - 0,21	-	-	#1
WME; 3 d; Zelllysat; B	1,7	1,9	2 mM PB	#2
UGT2-Aktivität				
ES-D3-Med.; 1-4 d (1-4 d); Zelllysat	<NG - 38,5[b]	<NG - 75,9	2 mM PB	
DMEM; Konfluente Kultur; Zelllysat; C	107	267	2 mM PB	#4
GST-Aktivität	(nmol/mg/min)	(nmol/mg/min)		
ES-D3-Med.; 1-4 d (1-4 d); Zelllysat	4,4 - 5,1	4,9[b] - 5,8	2 mM PB	
DMEM; 3 d (3 d); Zelllysat; A	45	69	2 mM PB	#5
Versch. Medien; 7 d; Zelllysat; A	6,7 - 16	-	-	#6

Quellen: #1) Alexandre *et al.* (1999); #2) Doostdar *et al.* (1993); #3) Doostdar *et al.* (1988, 1991), Grant *et al.* (1988); #4) Grant *et al.* (1988); #5) Dierickx *et al.* (1994); #6) Doostdar *et al.* (1988). NG = Nachweisgrenze; MC = 3-Methylcholanthren; PB = Phenobarbital; MEM = complete Minimal Essential Medium; WME = Williams Medium E; E-Medium = Eagle's Medium. [a]Methodentyp: A = identische Methode; B = unterschiedliche Methode, gleiches Messprinzip; C = gleiches Substrat, HPLC-Messung; [b]Einfachbestimmung.

Doostdar *et al.* (1993) übereinstimmt. Zur UGT1-Aktivität exisitieren keine vergleichbaren Daten aus der Literatur. Die in dieser Arbeit bestimmte UGT2-Aktivität lag etwas niedriger als die Ergebnisse, die von Grant *et al.* (1988) erhalten wurden. Angesichts der unterschiedlichen Analysenmethoden und Kulturzeiten liegen die Daten in einem vergleichbaren Bereich. Die GST-Aktivität fiel schließlich niedriger aus als jene, die von Dierickx *et al.* (1994) für HepG2-Zellen bestimmt wurde, bewegte sich aber in dem Bereich, den Doostdar *et al.* (1988) ermittelt hatten. Auch hier kommen Unterschiede in Medienzusammensetzung und Kulturdauer für die Differenzen der Aktivitäten in Frage.

Insgesamt lagen die ermittelten Enzymaktivitäten meist in einem ähnlichen Bereich wie die Ergebnisse anderer Autoren. Der deutlichste Unterschied zeigte sich beim EROD-Assay, bei dem die Aktivitäten in den Kontrollen nicht nachweisbar waren, während in der Literatur für HepG2-Zellen eine Grundaktivität festgestellt wurde. Die Aktivitäten der PROD-Assays waren miteinander vergleichbar, und in den BROD-Assays wurde eine höhere Aktivität nachgewiesen. Der Vergleich der Phase-II-Aktivitäten fielen ebenfalls differenziert aus. Während die Angaben aus der Literatur zu den Aktivitäten im UGT2-Assay etwas höher lagen als die eigenen Daten, waren sie im GST-Assay niedriger. Diese Daten wiesen daher auf eine hemmende Wirkung des ES-D3-Mediums im EROD- und GST-Assay hin, während in den anderen Assays keine unterschiedliche bzw. im BROD-Assay eine aktivitätssteigernde Wirkung festgestellt wurde. Durch Induktion konnte nur im EROD-Assay eine deutliche Aktivitätssteigerung erreicht werden.

5.2.2 Metabolisierung der Modellsubstanzen

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten einer Zellart liefert nur einen indirekten Hinweis auf ihre metabolische Kompetenz, erlaubt aber keine Schlüsse auf den tatsächlichen Umsatz einer Testsubstanz. Deshalb wurden die HepG2-Zellen gegenüber den Modellsubstanzen Valpromid, Valproinsäure, Retinol und Retinsäure exponiert, und die Substanzen direkt im Medium analysiert (4.3.8.1).

5.2.2.1 Valpromid und Valproinsäure

Die HepG2-Zellen waren in der Lage, Valpromid zu Valproinsäure zu metabolisieren, konnten aber keine Valproinsäure abbauen (4.3.8.1, Abb. 16). Trotz dieses fehlenden Abbaus war die synthetisierte Menge an Valproinsäure mit 7,4 µg/mL (13,1% Umsatz von Valpromid) nach fünf Tagen relativ niedrig. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch Flick (2005), der ebenfalls HepG2-Zellen in ES-D3-Medium inkubierte und nach vier Tagen nur ca. 20 µg/mL Valproinsäure erhielt. Die höhere Valproinsäure-Konzentration ist dabei hauptsächlich der von ihm eingesetzten größeren Zelldichte zuzurechnen.

Ursächlich für die niedrige Umsatzrate ist wahrscheinlich eine fehlende oder zu geringe Aktivität der Enzyme der HepG2-Zellen, die die Valpromid-Hydrolyse katalysieren. Die für diese Reaktion notwendigen Enzyme sind jedoch bislang nicht bekannt. Der fehlende Abbau der Valproinsäure spiegelt die niedrige Aktivität des Phase-II-Metabolismus der HepG2-Zellen wider (Tab. 48). Bei diesem geringen Umsatz war es fraglich, ob in einem mEST mit HepG2-Kokultur das proteratogene Potenzial von Valpromid nachgewiesen werden konnte.

5.2.2.2 Retinol und Retinsäure

In den Metabolisierungsversuchen hatten die HepG2-Zellen bei einer Retinolkonzentration von 6 µg/mL nach zwei Tagen 161 ng/mL Retinsäure produziert, was einem Umsatz von 2,7% entspricht (Abb. 17 E). Die Zellen waren aber auch in der Lage, Retinsäure abzubauen. In Säugerzellen wird das Retinol in einem ersten Oxidationsschritt zu Retinaldehyd hauptsächlich durch Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) katalysiert, in einem zweiten Schritt durch Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDH) zu Retinsäure (Duester 1996; Lee *et al.* 1991; Napoli 1996). Da die HepG2-Zellen nur eine geringe ADH-Aktivität besitzen (Wolfla *et al.* 1988), aber dennoch Retinsäure bilden konnten, musste der erste Oxidationsschritt vorrangig durch andere Enzyme katalysiert worden sein. Dies könnte durch CYP2E1 geschehen sein, welches Ethanol, Retinol und Retinsäure oxidieren kann (Dan *et al.* 2005; Wu *et al.* 2006). Obwohl einige Autoren bei HepG2-Zellen davon ausgehen, dass sie CYP2E1-defizient sind (Dai *et al.* 1993; Hewitt und Hewitt 2004), konnten Alexandre *et al.* (1999) in diesen Zellen eine hohe *p*-Nitrophenolhydroxylase-Aktivität nachweisen, die mit CYP2E1-Aktivität assoziiert ist. Es könnten aber auch noch andere Enzyme bei der Oxidation von Retinol eine Rolle gespielt haben, da Jiménéz-López *et al.* (2002) zeigen konnten, dass neben CYP2E1 auch weitere Enzyme des Cytochrom-P450-Systems Alkohol in HepG2-Zellen oxidieren konnten. Der zweite Oxidationsschritt wurde dann wahrscheinlich durch Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) katalysiert, da Marselos *et al.* (1987) ALDH-Aktivität in HepG2-Zellen bestimmen konnten.

Die geringe ADH-Aktivität ist ein möglicher Faktor für den relativ geringen Umsatz der HepG2-Zellen von Retinol zu Retinsäure. Ein weiterer Faktor ist sicherlich die Fähigkeit der Zellen, ihrerseits Retinsäure auch wieder abzubauen, sodass sich Retinsäure im Medium gar nicht erst anreichern konnte. Als Abbaureaktionen der Retinsäure können die Konjugation mit Glukuroniden mittels UGT (Salyers *et al.* 1993; Sass *et al.* 1994), oder eine weitere Oxidation durch Cytochrome P450 wie das CYP2E1 eine Rolle spielen (Lansink *et al.* 1997; Ozpolat *et al.* 2005). Eine UGT1-Aktivität konnte bei den HepG2-Zellen in dieser Arbeit im UGT-Assay nachgewiesen werden (Tabellen 34 und 48).

Trotz eines Retinol-Umsatzes von nur 2,7% wurde in den Metabolisierungsversuchen eine Retinsäure-Konzentration von 161 ng/mL erreicht. Vor dem Hintergrund eines ID_{50}-Wertes für Retinsäure von 0,02 - 0,15 ng/mL (Tab. 20) erschienen die HepG2-Zellen damit kompetent genug, um als metabolische Komponente in einem mEST eine Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von Retinol bewirken zu können.

5.2.3 Untersuchung der Modellsubstanzen im mEST

Aufgrund der Ergebnisse aus den Metabolismusversuchen wurden die HepG2-Zellen als Kokultur im mEST zur Prüfung von Valpromid und Retinol eingesetzt. Als dritte Modellsubstanz wurde Cyclophosphamid im mEST getestet.

5.2.3.1 Valpromid

Der Valpromid-Umsatz war in den Metabolismusversuchen mit 13,1% bzw. einer maximalen Valpronisäure-Konzentration von 7,4 µg/ml gering, sodass mit dem Valpromid zunächst nur ein vereinfachter Differenzierungsassay mit einer einzelnen Konzentration von 60 µg/mL durchgeführt wurde um zu prüfen, wieviel Valproinsäure unter mEST-Bedingungen generiert wird (4.4.1). Als weiterer Aspekt dieser Untersuchung wurden die Diffusionseigenschaften der Membranen der Zellkultureinsätze unter mEST-Bedingungen untersucht, welche in Kapitel 5.4.1 diskutiert werden.

In dem Differenzierungsassay hatten die HepG2-Zellen am Ende des dritten Kultivierungsschrittes maximal 1,46 µg/mL Valproinsäure produziert, was einem Umsatz von 2,4% entspricht. Damit stand fest, dass im Hinblick auf den ID_{50} der Valproinsäure von 29 - 69 µg/mL die Menge an produzierter Valproinsäure nicht ausreichen würde, um in einem nach Protokoll durchgeführten mEST die Konzentrations-Wirkungskurve signifikant zu verschieben. Diese Einschätzung wurde durch eine Untersuchung von Flick (2006) bekräftigt, der verschiedene Kombinationen von Valpromid und Valproinsäure herstellte, im EST untersuchte und fand, dass theoretisch mindestens 50% Umsatz erforderlich sind, um in einem aktivierten mEST eine signifikante Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve zu erreichen.

Die maximal erzielte Konzentration von 1,46 µg/mL war niedriger als die in der Metabolismusstudie erreichte Konzentration von 7,4 µg/mL. Hier machte sich wahrscheinlich ein Verdünnungseffekt bemerkbar, der sich durch die unterschiedlichen Kultivierungsbehälter beider Versuche ergab. Die mittlere HepG2-Zelldichte pro Wellvolumen in einem mEST betrug mit $4{,}75 \times 10^4$ Zellen/mL etwa ein Viertel der Zelldichte der HepG2-Zellen in den 6-Well-Platten der Metabolismusstudie ($1{,}9 \times 10^5$ Zellen/mL). Im mEST stand daher durchschnittlich ein Viertel der Zellen pro Wellvolumen für die Metabolisierung zur Verfügung, welche entsprechend weniger Valproinsäure erzeugen konnten.

5.2.3.2 Retinol

Die in den Metabolismusversuchen produzierte Konzentration an Retinsäure erschien hoch genug, um im mEST das Retinol als Proteratogen identifizieren zu können (5.2.2.2). Bei dieser

Abschätzung war jedoch nicht bekannt, welche Abhängigkeit zwischen der eingesetzten Retinolkonzentration und dem Umsatz der HepG2-Zellen besteht. Da sich die Versuchsbedingungen zwischen den Metabolisierungsversuchen und dem mEST unterschieden, wurde die metabolische Aktivität der HepG2-Zellen im mEST auch direkt untersucht, indem Proben von einem Testansatz mit 23,4 ng/mL Retinol entnommen und auf Retinoide analysiert wurden. In den mESTs mit HepG2-Kokultur konnte das proteratogene Potenzial von Retinol nicht nachgewiesen werden (4.4.2.2), und die Analysenergebnisse zeigten, dass die HepG2-Zellen im mEST keine Retinsäure produziert hatten (Tab. 40).

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass sich die Menge an Retinsäure, die von den HepG2-Zellen synthetisiert werden kann, proportional zur eingesetzten Retinolmenge verhält. Untersuchungen von Flick (2006) zum Retinolumsatz von HepG2-Zellen weisen in diese Richtung: Bei einer Retinol-Konzentration von 134 ng/mL erhielt Flick nach vier Tagen Inkubation 5,7 ng/mL Retinsäure, was einem Umsatz von 4,2% entspricht und damit im Bereich der 2,7% Umsatz bei 6 µg/ml Retinol liegt. Wenn man diesen Zusammenhang voraussetzt, hätten die HepG2-Zellen in dem untersuchten Testansatz mit 23,4 ng/mL Retinol rechnerisch eine Retinsäurekonzentration von 0,16 ng/mL produzieren können (2,7% von 23,4 ng/mL Retinol = 0,64 ng/mL. 0,64 ng/mL : 4 = 0,16 ng/mL Retinsäure. Der Faktor 4 berücksichtigt den Verdünnungseffekt zwischen Metabolismusversuch und mEST; sh. Kapitel 5.2.3.1). Die theoretisch zusätzlich produzierten 0,16 ng/mL Retinsäure konnten jedoch empirisch nicht bestätigt werden, weil sie von einer Retinsäurekonzentration von 0,8 - 1,1 ng/mL überlagert wurden, die in dem untersuchten Testansatz als Basiskonzentration nachgewiesen wurde (5.4.2.2).

In dem Differenzierungsassay mit Retinol wurden 0 bis 100% Hemmung der Zelldifferenzierung in einem Retinol-Konzentrationsbereich von etwa 1 bis 100 ng/mL nachgewiesen. Die obige Berechnung vorausgesetzt, hätten die HepG2-Zellen in diesem Bereich Retinsäure von 0,0068 - 0,68 ng/mL produzieren können, womit im Hinblick auf den ID_{50} der Retinsäure von 0,02 - 0,15 ng/mL die Möglichkeit bestanden hätte, dass die ES-D3-Zellen zusätzlich gehemmt wurden - auch weil sich die differenzierungshemmenden Potenziale von Retinol und Retinsäure addieren (4.4.2.5). Da in den mESTs jedoch keine Veränderung zu beobachten war, müssen weitere Gründe vorgelegen haben, die die Wirkung der Retinsäure reduziert oder aufgehoben haben. Dazu zählen eine verzögerte Diffusion durch die Membran der Zellkultureinsätze, der parallele Abbau der Retinsäure durch die HepG2-Zellen, oder ein veränderter Metabolismus der HepG2-Zellen aufgrund des Wachstums in Zellkultureinsätzen. Zur Klärung der Abhängigkeit zwischen eingesetzter Retinol-Konzentration und erzielter Retinsäuremenge bedarf es weiterer Untersuchungen.

5.2.3.3 Cyclophosphamid

Cyclophosphamid wurde ohne vorherige Untersuchung seines Metabolismus im mEST getestet, da für diese Substanz und seine Metaboliten im Rahmen des Projektes keine Analytik zur Verfügung stand. Beim Vergleich der Ergebnisse von EST und mEST waren die Z-Quotienten des mEST kleiner, die D-Quotienten unterschieden sich nicht, und die Halbhemmkonzentrationen des mEST lagen im Mittel bis zu 2,3-fach höher (Tab. 44, Tab. 45). Das Cyclophosphamid wirkte also im mEST wider Erwarten weniger hemmend auf Proliferation und Differenzierung und wies ein geringeres embryotoxisches Potenzial auf, sodass auf direkte Weise kein teratogenes Potenzial des Cyclophosphamid nachgewiesen werden konnte.

Eine Erklärung für die in den mESTs höheren Halbhemmkonzentrationen könnte sein, dass die HepG2-Zellen das Cyclophosphamid metabolisiert haben, dass aber die Metaboliten aufgrund ihrer Flüchtigkeit und kurzen Halbwertszeit in die Gasphase entwichen, bevor sie durch die Membran der Zellkultureinsätze hatten diffundieren und auf die Zielzellen wirken können. Die wichtigen teratogenen Metaboliten des Cyclophosphamid, Acrolein, Phosphoramid Mustard und Chlorethylaziridin, haben kurze Halbwertszeiten, und Acrolein sowie Chlorethylaziridin sind leicht flüchtig (Ludeman 1999). Hinzu kommt, dass die Halbwertszeiten der Metaboliten mit maximal eineinhalb Stunden viel kürzer sind als die Zeit, die Substanzen brauchen, um durch die Membran der Zellkultureinsätze zu diffundieren (4.4.1). Auf diese Weise wäre dem Testsystem durch die Metabolisierung kontinuierlich Cyclophosphamid entzogen worden, was in verringerten Halbhemmkonzentrationen resultierte. An der Metabolisierung des Cyclophosphamid sind vor allem die Enzyme CYP2B und CYP3A beteiligt (Roy *et al.* 1999; Griskevius *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005), welche in dieser Arbeit bei den HepG2-Zellen durch eine Enzymaktivität in den PROD- und BROD-Assays nachgewiesen werden konnten (Tab. 31). Dies unterstützt den indirekten Hinweis auf eine Metabolisierung des Cyclophosphamid durch die HepG2-Zellen. Zur Bestätigung dieser Hypothese müssen jedoch die Metaboliten im EST in Medium und Gasphase direkt bestimmt werden.

Da die HepG2-Zellen das proteratogene Potenzial von Valpromid, Retinol und Cyclophosphamid im mEST aufgrund einer unzureichenden Metabolisierung nicht nachweisen konnten, sind sie für den mEST als metabolisch aktives System zur Prüfung dieser Substanzen nicht geeignet.

5.3 H4IIE- Zellen als Bioaktivierungssystem für den mEST

Die H4IIE-Zellen wurden als zweite Zelllinie identifiziert, die in einen mEST integriert werden kann. Wie auch bei den HepG2-Zellen wurde die metabolische Aktivität dieser Zelllinie mit Enzymassays und dem Umsatz der Modellsubstanzen charakterisiert. Die H4IIE-Zellen behielten ebenfalls im ES-D3-Medium ihre Enzymaktivität, waren jedoch nicht in der Lage, Valpromid oder Retinol zu den Teratogenen zu metabolisieren. Deshalb wurde nur das Cyclophosphamid in einem mEST mit H4IIE-Kokultur getestet. Sein proteratogenes Potenzial konnte dort jedoch nicht direkt nachgewiesen werden. Mögliche Gründe für dieses Ergebnis sowie Aspekte der Untersuchungen werden im folgenden diskutiert.

5.3.1 Enzymaktivität von H4IIE-Zellen

Auch bei den H4IIE-Zellen wurden die Enzymaktivitäten anhand von Literaturdaten auf Plausibilität geprüft und der Einfluss des ES-D3-Mediums abgeschätzt (Tab. 49). Da sich bei den HepG2-Zellen gezeigt hatte, dass die Grundaktivität der Zellen in den Phase I-Assays oft im Bereich der Nachweisgrenze lag, wurden diese Aktivitäten bei den H4IIE-Zellen in ES-D3- und H4IIE-Medium bestimmt (Tab. 32 und Tab. 33).

Die EROD-Aktivität der H4IIE-Zellen fiel in den eigenen Untersuchungen im ES-D3- bzw. H4IIE-Medium sehr ähnlich aus. Während in den Kontrollen beider Medien keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, war nach Induktion mit MC eine Enzymaktivität in den Medien nachweisbar und im ES-D3-Medium höher als im H4IIE-Medium. Andere Autoren kamen bei der Untersuchung der EROD-Grundaktivität von H4IIE-Zellen zum gleichen Ergebnis (Houser *et al.* 1992), bzw. fanden eine Grundaktivität sowie eine erhöhte Aktivität nach MC-Induktion (Donato *et al.* 1994). Die Unterschiede sind wahrscheinlich auf die Labormethode und das Kulturmedium zurückzuführen. Die PROD-Aktivitäten der H4IIE-Zellen unterschieden sich zwischen den beiden Kulturmedien der eigenen Untersuchung kaum und bewegten sich im gleichen Bereich wie die Daten von Donato *et al.* (1994). Die Aussagekraft der Bestimmungen im ES-D3-Medium ist jedoch eingeschränkt, da es sich um Einzelbestimmungen handelt. Die BROD-Aktivitäten der H4IIE-Zellen fielen im ES-D3-Medium etwas höher aus als im H4IIE-Medium und ließen sich in beiden Medien durch Induktion kaum steigern. Vergleichsdaten aus der Literatur existieren zu diesem Assay keine. Auch zur UGT1- oder UGT2-Aktivität gibt es für H4IIE-Zellen keine Vergleichsstudien, die mit den gleichen Substraten durchgeführt wurden. Zur Einschätzung des Einflusses der beiden Medien auf die Phase II-Aktivität wurden daher die ΔA-Werte des EROD-Assays in beiden Medien verglichen (3.6.1). Sie liefern einen deutlichen

Tab. 49: Phase I- und II-Enzymaktivität von H4IIE-Zellen. Eigene Daten sind Angaben aus der Literatur gegenübergestellt. Die eigenen Daten zur EROD-, PROD- und BROD-Aktivität wurden aus den Messwerten zusammengestellt, die nach der Behandlung mit Glucuronidase/Arylsulfatase erhalten wurden (Tab. 32, Tab. 33).

Versuchsbedingungen Medium; Inkubationszeit (Induktionszeit); analysierte Matrix; Methodentyp[a]	**Kontrolle** (pmol/mg/min)	**Induziert** (pmol/mg/min)	**Induktor**	**Quelle**
EROD-Aktivität				
ES-D3-Med.; 1-4 d (1-4 d); intakte Zellen	<NG	35 - 114	0,5 µM MC	
H4IIE-Medium; 1-4 d (1-4 d); intakte Z.	<NG	30 - 79	0,5 µM MC	
DMEM/F12; 2 d (2 d); Zelllysat; B	35,4	200	5 µM MC	#1
DMEM/Hams; fast konfluent; Zelllysat; B	<NG	-	-	#2
PROD-Aktivität				
ES-D3-Med.; 1-4 d (1-4 d); intakte Zellen	<NG - 3,7[b]	<NG - 31,3[b] <NG - 4,7[b]	0,5 µM MC 1 mM PB	
H4IIE-Medium; 1-4 d (1-4 d); intakte Z.	<NG	<NG - 5,0 <NG	0,5 µM MC 1 mM PB	
DMEM/F12; 2 d (2 d); Zelllysat; A	1,2	1,6 1,8	5 µM MC 2 mM PB	#1
BROD-Aktivität				
ES-D3-Med.; 1-4 d (1-4 d); intakte Zellen	3,9 - 46	5,2 - 31 4,2 - 31	0,5 µM MC 1 mM PB	
H4IIE-Medium; 1-4 d (1-4 d); intakte Z.	<NG - 9,4	3,8 - 19 <NG - 12	0,5 µM MC 1 mM PB	
Hinweis auf Phase II (ΔA von EROD)				
ES-D3-Med.; 1-4 d (1-4 d); intakte Zellen	n.b.	8,8 - 15,8	0,5 µM MC	
H4IIE-Medium; 1-4 d (1-4 d); intakte Z.	n.b.	5,2 - 10,4	0,5 µM MC	
GST-Aktivität	(nmol/mg/min)	(nmol/mg/min)		
ES-D3-Med.; 1-4 d (1-4 d); Zelllysat	105 - 195	118 - 263	1 mM PB	
DMEM/F12; 75% Konfluenz nach 4 d; Zelllysat; A	258	-	-	#3
Versch. Medien; 1 d bis nahe Konfluenz; Zelllysat; A	148 - 340	-	-	#4

Quellen: #1) Donato *et al.* (1994); #2) Houser *et al.* (1992); #3) Donato *et al.* (1994); #4) Glatt *et al.* (1987), Romert *et al.* (1989), Summer und Wiebel (1981), Swedmark *et al.* (1992). NG = Nachweisgrenze; MC = 3-Methylcholanthren; PB = Phenobarbital; MEM = complete Minimal Essential Medium; WME = Williams Medium E; E-Medium = Eagle's Medium; ΔA von EROD = Differenz zwischen unbehandeltem Überstand und mit Glucuronidase/Arylsulfatase-behandeltem Überstand des EROD-Assays (Tab. 32). [a]Methodentyp: A = identische Methode; B = unterschiedliche Methode, gleiches Messprinzip; [b]Einfachbestimmung.

Hinweis auf eine Phase II-Aktivität, die im ES-D3-Medium ausgeprägter ist. Die GST-Grundaktivität der H4IIE-Zellen aus dieser Arbeit ist schließlich mit den von anderen Autoren bestimmten Aktivitäten gut vergleichbar, trotzdem sich die Medien und Inkubationszeiten unterschieden

(Donato *et al.* 1994; Glatt *et al.* 1987; Romert *et al.* 1989; Summer und Wiebel 1981; Swedmark *et al.* 1992). Durch Induktion mit PB ließ sich nur eine geringe Steigerung der GST-Aktivität erzielen.

Ein Vergleich der ermittelten H4IIE-Enzymaktivitäten mit Angaben aus der Literatur war nur bei den EROD-, PROD- und GST-Assays möglich. Dort bestätigten sie im allgemeinen die Befunde der zitierten Autoren. Bei dem Vergleich der Enzymaktivitäten im ES-D3- und H4IIE-Medium deuteten die Daten meist auf höhere Aktivitäten im ES-D3-Medium hin.

5.3.2 Metabolisierung der Modellsubstanzen

Die H4IIE-Zellen wurden ebenfalls gegenüber Valpromid, Valproinsäure, Retinol und Retinsäure exponiert, um die metabolische Kapazität der Zellen direkt zu prüfen.

5.3.2.1 Valpromid und Valproinsäure

Die H4IIE-Zellen konnten Valproinsäure abbauen, aber keine Valproinsäure aus Valpromid produzieren (4.3.8.1, Abb. 16). Für dieses Ergebnis sind mehrere Ursachen denkbar. Entweder fehlt den H4IIE-Zellen die Enzymausstattung, die für die Hydrolyse von Valpromid notwendig ist, oder die Aktivität ist zu gering. Andererseits kann es auch sein, dass die H4IIE-Zellen Valproinsäure zwar gebildet, diese im Rahmen des Phase-II-Metabolismus jedoch rasch weiter verstoffwechselt haben, sodass sie analytisch nicht erfasst werden konnte. Diese Hypothese wird durch die ausgeprägte UGT1- und GST-Aktivität der H4IIE-Zellen unterstützt, die sich im ES-D3-Medium nachweisen ließ (4.3.7, Tabellen 34 und 35).

5.3.2.2 Retinol und Retinsäure

Die H4IIE-Zellen waren am Abbau von Retinol beteiligt, konnten daraus aber keine Retinsäure produzieren und waren auch nicht in der Lage, Retinsäure abzubauen (Tab. 17). Dass der Abbau von Retinol nicht in der Produktion von Retinsäure mündete, konnte verschiedene Ursachen haben. Prinzipiell besitzen H4IIE-Zellen eine ADH- und ALDH-Aktivität (Lin *et al.* 1984; Wolfla *et al.* 1988) und sollten damit in der Lage sein, Retinol zu Retinsäure zu oxidieren. Möglicherweise waren die Enzyme aber nicht aktiv genug, oder sie wurden durch das ES-D3-Medium in ihrer Aktivität gehemmt. Weitere Möglichkeiten sind eine direkte Glucuronidierung des Retinols durch UGT-Enzyme (Barua *et al.* 1989) oder eine Hydroxylierung durch Cytochrom P450-Isoformen (Leo *et al.* 1989), welche in Produkten münden, die von der verwendeten Retinoid-Analytik nicht erfasst werden konnten. Die Ursachen der fehlenden Retinsäure-Produktion müssen in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

5.3.3 Untersuchung der Modellsubstanzen im mEST

Da die H4IIE-Zellen weder Valpromid noch Retinol umsetzen konnten, wurde nur Cyclophosphamid in einem mEST mit H4IIE-Kokultur getestet (3.11).

5.3.3.1 Cyclophosphamid

In den mESTs mit H4IIE-Kokultur wurden Ergebnisse erhalten, die den Daten aus den mESTs mit HepG2-Kokultur sehr ähnlich waren: Die Halbhemmkonzentrationen aus den mEST-*in vitro*-Tests mit ES-D3-Zellen waren größer als die der *in vitro*-Tests des EST. Eine Ausnahme bildeten lediglich die mEST-Zytotoxizitätstests mit 3T3-Zellen, deren IC_{50}3T3-Werte etwas niedriger lagen. Die höheren Halbhemmkonzentrationen im mEST können auf gleiche Weise wie bei der HepG2-Kokultur erklärt werden (5.2.3.3): die H4IIE-Zellen waren metabolisch aktiv, aber die teratogenen Metabolite entwichen aufgrund ihrer Flüchtigkeit und kurzen Halbwertszeit in die Atmosphäre, bevor sie auf die Zielzellen wirken konnten. Der proteratogene Charakter des Cyclophosphamid konnte in diesen mESTs damit nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich traten noch zwei weitere Phänomene auf, die diskutiert werden sollen.

Zum direkten Vergleich von Ergebnissen der Zytotoxizitätstests aus mEST und EST wurden EST-Zytotoxizitätstests durchgeführt, die auf sieben Tage verkürzt waren (4.4.3.1). Bei den verkürzten EST-Zytotoxizitätstests mit ES-D3-Zellen fiel auf (Tab. 44; sechste Spalte), dass dort das Cyclophosphamid im Mittel etwa vierfach toxischer wirkte als in den zehn Tage dauernden Tests (Tab. 44; letzte Spalte). Seiler *et al.* (2004) fanden beim Vergleich von siebentägigen und zehntägigen Zytotoxizitätstests auch bei Retinsäure eine fünffach erhöhte Toxizität in den kürzeren Tests, aber nicht bei 5-Fluorouracil und Penicillin G. Beim Test von Retinol in dieser Arbeit wurde ebenfalls kein Unterschied zwischen den Inkubationszeiten festgestellt (Tab. 38). Eine erhöhte Toxizität in kürzeren Tests scheint daher ein substanzspezifisches Phänomen zu sein und könnte dort, wo es auftrat, mit einer fehlenden Regenerationszeit der behandelten Zellen erklärt werden. In den 7-Tage-Tests wurde zwei Tage nach der letzten Substanzgabe die Vitalität mit dem MTT-Test bestimmt (3.5.2). Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen, die auf die zytotoxische Wirkung der Substanz ansprachen, abgestorben, und die überlebenden Zellen hatten noch keine Zeit nachzuwachsen. In den zehntätgigen Tests blieb den überlebenden Zellen dagegen mehr Zeit, sich zu regenerieren.

Da die IC_{50}D3-Werte der siebentägigen Zytotoxzitätstests in den Tests mit isotoner Kochsalzlösung als Lösungsmittel niedriger ausfielen als die ID_{50}-Werte der Differenzierungsassays (Tab. 44), wurden die D-Quotienten kleiner 1 (Tab. 45; zur Berechnungsmethode dieser D-Quotienten sh. 3.11.4). Mit den D-Quotienten <1 wird in diesem Fall jedoch kein biologischer Widerspruch angezeigt, sondern die Werte sind auf die Verkürzung der Zytotoxizitätstests

zurückzuführen. Vergleicht man Tests mit gleicher Inkubationszeit, also die IC_{50}D3-Werte des zehntägigen EST (170 - 300 µg/mL) mit den ID_{50}-Werten dieses EST (150 µg/mL), so ist kein Unterschied zu erkennen.

Der IC_{50}-Wert der H4IIE-Zellen für Cyclophosphamid (410 µg/mL) lag unterhalb der IC_{50}-Werte der 3T3-Zellen in den siebentägigen Tests (850 - 870 µg/mL). Bei den Zytotoxizitätstests mit 3T3-Zellen kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die H4IIE-Zellen in den beiden höchsten Konzentrationen der im mEST getesteten Cyclophosphamid-Konzentrationsreihe (1000 µg/mL und 500 µg/mL) geschädigt worden sind. Da der IC_{50} von 410 µg/mL nach 5 Tagen Exposition ermittelt wurde, die Expositionszeit der H4IIE-Zellen in einem mEST-Zytotoxizitätstest pro Kultivierungsschritt jedoch nur 2-3 Tage betrug, kann davon ausgegangen werden, dass die H4IIE-Zellen auch noch höhere Konzentrationen toleriert haben. Eine Folge geschädigter H4IIE-Zellen wäre wahrscheinlich, dass die metabolische Aktivität dieser Zellen und damit die Produktion von Metaboliten abnimmt, und somit eine erzielte Halbhemmkonzentration höher ausfällt als es bei vollständig intakten H4IIE-Zellen der Fall gewesen wäre. Zur genaueren Charakterisierung dieses Effektes sind jedoch weitere Versuche notwendig. Die Halbhemmkonzentrationen des ES-D3-Zytotoxzitätstests bzw. des Differenzierungsassays liegen deutlich unterhalb von 410 µg/mL, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die H4IIE-Zellen hier nicht geschädigt wurden.

Da die H4IIE-Zellen Valpromid und Retinol zu den respektiven Teratogenen nicht umsetzen und das proteratogene Potenzial von Cyclophosphamid im mEST nicht nachweisen konnten, sind sie für den mEST als Bioaktivierungssystem zum Nachweis dieser Substanzen nicht geeignet.

5.4 Beurteilung von Testsystem und Modellsubstanzen

5.4.1 Das mEST-Protokoll

Während der Arbeit mit dem mEST wurde deutlich, dass das System technische Grenzen besitzt. Diese zeigten sich in der Diffusionsdynamik der Metaboliten zwischen den Zellkultureinsätzen und den Zielzellen, und in den Möglichkeiten, die Zelldichte der Kokultur an die benötigte Stoffwechselaktivität anzupassen.

Bei der Prüfung einer einzelnen Valpromid-Konzentration im mEST-Differenzierungsassay mit HepG2-Kokultur (4.4.1) wurden Mediumproben aus den Zellkultureinsätzen und dem Well

vor und nach jedem Kultivierungsschritt entnommen. In den Proben wurden Valpromid und Valproinsäure analysiert, um die Effizienz der Diffusion beurteilen zu können, mit der die von den HepG2-Zellen produzierte Valproinsäure die Membran des Einsatzes passiert (Tab. 37). Die Valproinsäure verteilte sich erwartungsgemäß umso besser zwischen beiden Kompartimenten, je länger der Zellkultureinsatz im Well verblieb. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation herrschte jedoch immer noch eine Differenz von 29 - 50% zwischen der Valproinsäurekonzentration im Well und im Einsatz, während in einem ersten Diffusionsversuch (4.3.2) festgestellt worden war, dass ein vollständiger Konzentrationsausgleich zwischen beiden Kompartimenten bereits nach 12 h stattgefunden hatte. Ursache für die zusätzliche Behinderung der Diffusion im mEST-Differenzierungsassay war wahrscheinlich der Zellrasen auf der Membran des Zellkultureinsatzes, der die Poren der Membran partiell blockiert hat.

Eine weitere Limitierung zeigte sich dadurch, dass die H4IIE- bzw. HepG2-Zellen die Proteratogene zu wenig umsetzten. Mit dem Testsystem konnte die niedrige Aktivität der Zellen durch eine höhere Zelleinsaat nicht ausgeglichen werden, da die Einsaatdichten der Hepatomazellen bereits so eingestellt waren, dass am Ende eines Kultivierungsschrittes 80 - 100% Konfluenz erreicht wurden. Eine höhere Zelleinsaat hätte zu einem mehrlagigen Bewuchs geführt, bei dem der Stoffaustausch der Zellen beeinträchtigt worden wäre. Außerdem besitzen die HepG2-Zellen nur in ihrer Wachstumsphase die größte Enzymaktivität, reduzieren diese aber stark, nach dem sie 100% Konfluenz erreicht haben (Alexandre *et al.* 1999). Eine dichtere Aussaat hätte bei ihnen daher zu einem geringeren Umsatz geführt.

Um den mEST in den beiden beschriebenen Aspekten zu verbessern, müssten Membranen mit größerer Permeabilität und größerer Fläche verwendet werden. Alternative Einsätze mit diesen Eigenschaften sind jedoch für die Kulturbehälter des EST zur Zeit kommerziell nicht erhältlich. Deshalb eignet sich das Testsystem in seiner bestehenden Form für metabolisch aktive Zellen, die eine deutlich höhere Stoffwechselaktivität als die bisher getesteten Zellen besitzen. Dabei sollten Proteratogene untersucht werden, deren Metaboliten langlebig und stabil sind, sodass sie in ausreichender Menge die Membran passieren können.

5.4.2 Modellsubstanzen

Für die Entwicklung eines neuen Testsystems sollte eine Modellsubstanz leicht handhabbar sein und Eigenschaften besitzen, die eine möglichst einfache Interpretation der Ergebnisse erlauben, damit die Funktionalität des neuen Systems belegt werden kann. Günstige Eigenschaften sind zum Beispiel eine gute Löslichkeit im Kulturmedium oder einem geeigneten Lösungsvermittler, eine ausreichend lange Stabilität der Muttersubstanz und ihrer teratogenen Metaboli-

ten, eine ausreichende Kenntnis der Metabolisierungspfade und der daran beteiligten Enzyme, und eine möglichst große Differenz zwischen den Metaboliten und der Muttersubstanz in Bezug auf ihre Endpunkte in den Toxizitätstests.

5.4.2.1 Valpromid und Valproinsäure

Valpromid und Valproinsäure erwiesen sich in ihrer Handhabung als einfach, und im Kulturmedium blieben sie über den Testzeitraum stabil (4.3.8.1). Die Enzyme, die an der Metabolisierung von Valpromid zu Valproinsäure beteiligt sind, sind bislang jedoch nicht bekannt, sodass ein metabolisch aktives System auf die erforderlichen Aktivitäten nicht abgestimmt werden kann. Die Substanzen unterscheiden sich in den Halbhemmkonzentrationen der EST-*in vitro*-Tests im Mittel um die Faktoren 1,2 (IC_{50}3T3-Werte), 1,9 (IC_{50}D3-Werte) und 4,3 (ID_{50}-Werte). Das Valpromid muss daher zu einem hohen Prozentsatz umgesetzt werden, damit die Konzentrations-Wirkungskurve in einem mEST signifikant verschoben werden. Flick (2006) ermittelte, dass dafür wenigstens 50% Umsatz notwendig sind. Unter der Voraussetzung einer ausreichenden Metabolisierung ist Valpromid als Modellsubstanz für einen bioaktivierten EST geeignet.

5.4.2.2 Retinol und Retinsäure

Der Metabolismus von Retinol und Retinsäure ist sehr komplex, aber in weiten Teilen aufgeklärt (Schmidt 2001). Größere Schwierigkeiten in Bezug auf Handhabung und Interpretation der Ergebnisse entstanden aufgrund der Empfindlichkeit der Retinoide gegenüber Wärme, Licht und Sauerstoff (Fisher *et al.* 1972; Schmidt *et al.* 2003). So blieben beide Substanzen im Testmedium während der Tests nicht stabil und wurden ohne Zellexposition abgebaut (4.3.8.2). Auch in den konservierten Stammlösungen fand ein Abbau statt, der bei Retinol 25 - 62% und bei Retinsäure 12% betrug (4.4.2.6). Die Stabilitätsprobleme mit der Retinsäure zeigten sich bei anderen Autoren besonders deutlich, denn in der Validierungsstudie des EST (Genschow *et al.* 2004) schwankten die ID_{50}-Werte aus vier Laboren um den Faktor 1300, und bei den IC_{50}D3-Werte sogar um den Faktor 2400.

Bei der Analytik der Retinoide erwies sich die Bestimmungsgrenze für Retinsäure von 0,3 - 0,5 ng/mL als nicht sensitiv genug, um Konzentrationen im Bereich des ID_{50}-Wertes von 0,02 - 0,15 ng/mL nachzuweisen. Ein lückenloser Nachweis tatsächlich wirksamer Konzentrationen konnte in den Versuchen daher nicht geführt werden.

Im Laufe verschiedener Retinsäuremessungen wurde außerdem eine Diskrepanz zwischen verschiedenen Daten festgestellt. In dem analysierten Retinol-Testansatz eines mESTs mit HepG2-Zellen (4.4.2.3, Tab. 40) wurde eine Retinsäure-Basiskonzentration von 0,8 - 1,1 ng/mL

nachgewiesen, deren Herkunft unbekannt war. Zur Aufklärung wurden alle in dem Test eingesetzten Mediumbestandteile auf Retinoide untersucht, ohne dabei fündig zu werden (4.4.2.4). Aufgrund der Methode, mit der der Testansatz hergestellt worden war, musste davon ausgegangen werden, dass diese Basiskonzentration in allen Ansätzen vorhanden war, und mit 0,8 - 1,1 ng/mL war die Konzentration im Vergleich zum Retinsäure-ID_{50} so hoch, dass eine Veränderung der Konzentrations-Wirkungskurve hätte stattfinden müssen - was jedoch nicht der Fall war. Die daraufhin entwickelte Hypothese, dass das Retinol möglicherweise die differenzierungshemmende Wirkung von Retinsäure vermindert, konnte nicht bestätigt werden (4.4.2.5). Deshalb musste schließlich davon ausgegangen werden, dass es sich bei der gemessenen Basiskonzentration um einen Fehler bei der Retinoid-Analytik handelte. Schmidt (2001) beschrieb in seiner Arbeit zur Analyse von Retinoiden in biologischen Matrizes, dass die bei der Analytik verwendeten Geräte leicht mit Retinoid-Spuren verunreinigt werden können. Möglicherweise handelte es sich bei der vermeintlichen Retinol-Basiskonzentration daher um eine Kontamination der Laborgeräte. Da die Retinoid-Analytik jedoch von dem Projektpartner TiHo durchgeführt wurde, konnte diese Vermutung im Detail nicht nachvollzogen werden.

Ein weiterer Faktor, der die Interpretation von Ergebnissen erschwerte, ergab sich durch das Retinol, welches im ES-D3-Medium enthalten war und aus dem zugesetzten FCS stammte (Tab. 41). Im ES-D3-Medium existierte eine Retinol-Grundkonzentration von 26,9 ng/mL (4.4.2.6, Tab. 43), weshalb in dem Retinol-Testansatz, der in einem mEST untersucht wurde (Tab. 40), die Retinol-Konzentrationen mit 47 - 56 ng/mL höher lagen als angesetzt. Zieht man die Grundkonzentration des ES-D3-Mediums davon ab, stimmen sie mit den für den Testansatz geplanten 23,4 ng/ml Retinol gut überein. Die gemessene Konzentration setzte sich daher aus der Grundkonzentration und dem zugesetzten Retinol zusammen.

Die Retinol-Grundkonzentration im ES-D3-Medium lag mit 26,9 ng/mL über dem Retinol-ID_{50} von 11 - 19 ng/mL, sodass potenziell die Möglichkeit bestand, die Ergebnisse der EST-Differenzierungsassays zu beeinflussen. Das war jedoch nicht der Fall, weil die Kontrollen ebenfalls mit ES-D3-Medium hergestellt wurden, und die Validitätskriterien der Differenzierungsassays eingehalten wurden. Die meisten Zellkulturmedien enthalten FCS und damit Retinol (Lindl 2000), ohne die Zellen zu schädigen. Deshalb kann diese Grundkonzentration an Retinol nicht in der gleichen Weise bioverfügbar sein wie das Retinol, das in Versuchen dem Medium zugesetzt. Im Plasma ist Retinol an Albumin oder dem *retinol binding protein* (RBP) gebunden, von denen es transportiert wird, und wo es vor oxidativem Abbau geschützt ist (Noy und Xu 1990; Tosetti *et al.* 1999). Auch FCS enthält Albumin (Lindl 2000), der Gehalt an RBP ist nicht bekannt. Möglicherweise war das im Serum enthaltene Retinol an Albumin oder RBP gebunden und damit weniger bioverfügbar als das experimentell zugesetzte freie Retinol. Die zellulären

Aufnahmemechanismen sind für Retinol noch nicht vollständig aufgeklärt. Während Sivaprasadarao und Findlay (1988) einen Zelloberflächen-Rezeptor vermuten, der RBP erkennt und anschließend freigesetztes Retinol in die Zelle aufnimmt, gehen Fex und Johannesson (1988) davon aus, dass Retinol die Zellmembran ohne Mitwirkung eines Rezeptors durchdringen kann. Die Ursachen der unterschiedlichen Bioverfügbarkeit müssen daher in spezifischen Versuchen geklärt werden.

Beim Vergleich der Halbhemmkonzentrationen der EST-*in vitro*-Tests von Retinol und Retinsäure unterschieden sich beide Substanzen im Mittel um die Faktoren 4,8 (IC_{50}3T3-Werte), 225 (IC_{50}D3-Werte) und 173 (ID_{50}-Werte). Dieser Abstand ist bei den Tests mit den ES-D3-Zellen groß, sodass theoretisch nur ein geringer Anteil Retinol metabolisiert werden muss, um eine deutliche Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve in einem mEST zu bewirken. Der Anteil muss jedoch wesentlich über 2,7% liegen, wie in dieser Arbeit festgestellt wurde (5.2.3.2).

Aufgrund der Instabilität und der aufwändigen Analytik von Retinol und Retinsäure erscheinen die Substanzen als Modellsubstanz zum Einsatz in einem mEST nur bedingt geeignet.

5.4.2.3 Cyclophosphamid und 4HC

Die am Umsatz von Cyclophosphamid beteiligten Enzyme und die sich anschließende nichtenzymatische Reaktionskette sind weitgehend aufgeklärt (Chen *et al.* 2005; Daston *et al.* 2005; Griskevius *et al.* 2003; Kanekal und Kehrer 1993; Ludeman 1999; Roy *et al.* 1999). Bei Cyclophosphamid und 4HC muss auf die Stabilität der beiden Substanzen in wässriger Lösung geachtet werden, denn Cyclophosphamid ist in Lösung bei Raumtemperatur für 24 h stabil (Sifton 1995), während 4HC bereits nach 30 min zu zerfallen beginnt. Die kurzen Halbwertszeiten der Metaboliten Phosphoramid Mustard, Acrolein und Chlorethylaziridin (2.4.4) sowie die Flüchtigkeit der beiden letzteren erfordern eine unmittelbare Exposition der Zielzellen nach der metabolischen Aktivierung von Cyclophosphamid. Da im mEST ein vollständiger Konzentrationsausgleich zwischen den Kompartimenten der statischen Kokultur jedoch erst innerhalb von Tagen stattfindet (4.4.1), erwies sich Cyclophosphamid zum Einsatz im mEST mit Zellkultureinsätzen nur als bedingt geeignet. Für ein bioaktiviertes *in vitro* Testsystem kann es als Modellsubstanz dort eingesetzt werden, wo eine Migration der Metaboliten zum Zielsystem barrierefrei möglich ist.

5.4.2.4 Albendazol und Albendazolsulfoxid

Der Stoffwechselmechanismus und die daran beteiligten Enzyme sind bei Albendazol und Albendazol-Sulfoxid gut bekannt (Capece *et al.* 2003; Navarro *et al.* 1999; Piscopo *et al.* 1997; Velik *et al.* 2005). Die Substanzen ließen sich gut in DMSO lösen, ihre Stabilität in Stammlö-

sung und Kulturmedium wurde jedoch nicht untersucht. In den ESTs stellte sich heraus, dass Albendazol-Sulfoxid eine geringere Toxizität besitzt als Albendazol, obwohl es *in vivo* als das aktive und teratogen wirkende Prinzip gilt (4.2.4). Whittaker und Faustman (1991) erklärten die geringere Toxizität des Albendazol-Sulfoxid mit seiner geringeren Lipophilie und damit reduzierten Membrangängigkeit. Dieser Zusammenhang besteht jedoch auch *in vivo* und reicht deshalb als Erklärung nicht aus. Zur Aufklärung der Ursachen dieses Widerspruchs sind daher weitere Untersuchungen notwendig, weshalb die Substanzen für einen Einsatz im mEST nicht geeignet sind.

6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der EST prinzipiell die Fähigkeit besitzt, Proteratogene zu detektieren, weil er zwischen einem Proteratogen und den hauptsächlichen Metaboliten unterscheiden kann. Mit dem Aufbau des mEST-Protokolls gelang es, die Zielzellen des EST zusammen mit den beiden Hepatomazellarten HepG2 und H4IIE zu kultivieren, ohne dass die Zielzellen dabei geschädigt wurden. Der erfolgreiche Nachweis der proteratogenen Potenz der Modellsubstanzen Valpromid, Retinol und Cyclophosphamid konnte in dem System jedoch noch nicht erbracht werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Herausforderungen, die bei der Kopplung eines metabolisch aktiven Systems an den EST noch bestehen.

Der wichtigste Faktor für eine erfolgreiche Identifikation eines Proteratogens ist die metabolische Aktivität des eingesetzten Metabolisierungssystems. Bei der anfänglichen Selektion der für den mEST geeigneten Leberzellen zeigte sich, dass die Versuchsbedingungen des EST die wichtigsten Auswahlkriterien darstellten, und die Toleranz des ES-D3-Mediums dabei die wichtigste Rolle spielte: drei der sechs untersuchten Leberzellarten (primäre Hepatozyten von Ratte und Maus, HepaRG) mussten wegen Unverträglichkeit des ES-D3-Mediums von der weiteren Entwicklung ausgeschlossen werden. Diese Problematik ist typisch für die Etablierung einer Kokultur (Coecke *et al.* 2006). In zukünftigen Arbeiten, die die Bioaktivierung des EST zum Ziel haben, ist es daher notwendig zu prüfen, wie das ES-D3-Medium modifiziert werden kann, damit es sowohl die Differenzierung der ES-D3-Zellen ermöglicht, als auch die Vitalität und metabolische Kompetenz der stoffwechselaktiven Zellart aufrecht erhält. Unter der Prämisse eines geeigneten Kokultur-Mediums existieren einige Alternativen zu den untersuchten Leberzelllinien. Dazu zählen die humane BC2-Zelllinie (Fabre *et al.* 2003; Gómez-Lechón *et al.* 2001), welche wichtige Cytochrom P450-Isoenzyme sowie GST und UGT exprimiert, als auch die Neohepatozyten (Ruhnke *et al.* 2005a, b), die ebenfalls Phase I- und II-Aktivitäten besitzen. Coecke *et al.* (2006) zitieren sieben weitere metabolisch aktive Zelllinien, deren Aktivität sich aber meist auf Phase II-Enzyme beschränkt. Prinzipiell können auch transgene Zellen zum Einsatz im mEST geprüft werden, und viele dieser Zelllinien exprimieren Phase I und II Enzyme oder eine Kombination davon (Bernauer *et al.* 2003; Yoshimoti *et al.* 2001; Doehmer 2006). Da sich ihre Enzymaktivität aber meist auf einige wenige CYPs beschränkt, müssen die Ergebnisse aus Tests unbekannter Substanzen vorsichtig interpretiert werden. Mit einem spezifisch an die stoffwechselaktive Zellart angepassten ES-D3-Medium könnten schließlich auch die in dieser Arbeit nicht weiter untersuchten Zellarten erneut geprüft werden.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Optimierung des Kokultur-Mediums beachtet werden muss, ist die Erhaltung der Vitalität der metabolisch aktiven Zellen in den mEST-Zytotoxizitätstests.

Am Beispiel der H4IIE-Zellen wurde deutlich, dass manche Zellarten die Kokulturbedingungen nur für eine begrenzte Zeit tolerieren, weil sich die Pufferkapazität für toxische Abbauprodukte und die Nährstoffe des Mediums erschöpft haben (4.3.6). In Vorversuchen wurden Hinweise erhalten, dass es durch Austausch des für das ES-D3-Medium eingesetzte Basismedium DMEM durch ein Advanced DMEM von invitrogen™ möglich sein könnte, die Vitalität der H4IIE-Zellen in Kokultur zu verlängern (Daten nicht präsentiert). Ein solcher Austausch könnte auch für andere Zellarten von Vorteil sein.

Die statische Kokultur als Möglichkeit, ein Bioaktivierungssystem an den EST zu koppeln, besitzt Grenzen, die nicht leicht verändert werden können (5.4.1). Wie sich am Beispiel des Cyclophosphamid gezeigt hatte, lassen sich kurzlebige Metaboliten nicht erfassen. Als alternatives System zur statischen Kokultur existiert die Präinkubationsmethode, die eingangs kurz beschrieben wurde (2.3.6). Mit ihr können zwar auch keine kurzlebigen Metaboliten erfasst werden, aber sie bietet größere Spielräume in Bezug auf die Variation experimenteller Parameter. Bei Einsatz eines zellbasierten Systems zur Bioaktivierung kann im Rahmen der Präinkubationsmethode zum Beispiel die Zelldichte pro Volumen leicht verändert werden, oder das Medium kann vor dem Einsatz im EST modifiziert werden. Außerdem ist es mit dieser Methode prinzipiell möglich, alle gängigen momentan zur Verfügung stehenden Bioaktivierungssysteme einzusetzen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Modellsubstanzen konnten von den Hepatomazellen nicht ausreichend metabolisiert werden, und einige wiesen Eigenschaften auf, die den erfolgreichen Einsatz im mEST erschwerten. Von der Expertengruppe des ReProTect Integrated Project der EU wurden eine Reihe weiterer Modellsubstanzen empfohlen, mit denen bioaktivierte *in vitro*-Tests wie der EST getestet werden können (Daston *et al.* 2005). Diese sind 2-Acetylaminofluoren, Procarbazin, Niridazol, Phenytoin, Trimethadion, 2-Methoxyethanol, 2-Ethoxyethanol, Methoxyethanolacetat und Retinylpalmitat. Diese Substanzen können alternativ in künftigen Studien eingesetzt werden.

7 Wichtige Ergebnisse in Tabellenform

In den folgenden vier Tabellen sind die Ergebnisse zu den Fragen zusammengefasst, die zu Beginn dieser Arbeit in Kapitel 1 formuliert wurden.

Kann der EST zwischen Proteratogenen und ihren teratogenen Metaboliten ausreichend diskriminieren?

Substanzpaar	Parameter, auf der die Diskriminierung beruht				Toxische Wirkung	Korrelation mit *in vivo*-Befunden
ProT./Terat.	HHK	Z-Quotient	D-Quotient	PM		
VPD/VPA	ja	ja	ja	nein	Terat. > ProT.	ja
RO/RA	ja	ja	n.b.	nein	Terat. > ProT.	ja
CPP/4HC	ja	nein	n.b.	n.b.	Terat. > ProT.	teilweise
ABZ/ASO	ja	nein	n.b.	nein	Terat. < ProT.	nein

HHK = Halbhemmkonzentrationen der drei EST *in vitro*-Tests; PM = Prädiktionsmodell; Terat. = Teratogen; ProT. = Proteratogen; VPD = Valpromid; VPA = Valproinsäure; RO = Retinol; RA = all-*trans*-Retinsäure; CPP = Cyclophosphamid; 4HC = 4-Hydroperoxycyclophosphamid; ABZ = Albendazol; ASO = Albendazol-Sulfoxid; n.b. = nicht bestimmbar aufgrund stark schwankender Messwerte oder invalider Daten.

Welches Bioaktivierungssytem kann in den EST integriert werden, um Proteratogene zu metabolisieren? Wie ist der Fremdstoffmetabolismus des Systems charakterisiert?

	H4IIE-Zellen	HepG2-Zellen	Andere geprüfte Zellarten[a]
Integration in mEST möglich[b]	ja	ja	nein (Inkompatibel zu den Versuchsbedingungen)
Enzymaktivität Phase I und II	vorhanden	vorhanden (< als H4IIE)	-
Umsatz von VPD zu VPA	nein	ja	-
Umsatz von RO zu RA	nein	ja	-

[a]Primäre Ratten- und Maushepatozyten, Hepa1-6- und HepaRG-Zellen; [b]Statische Kokultur mit Nunc-Zellkultureinsätzen. VPD = Valpromid; VPA = Valproinsäure; RO = Retinol; RA = all-*trans*-Retinsäure.

Kann der EST mit metabolischer Komponente (mEST) die Proteratogene als solche identifizieren?

	mEST mit H4IIE-Zellen	mEST mit HepG2-Zellen
Valpromid	-	nein
Retinol	-	nein
Cyclophosphamid	nur indirekter Hinweis	nur indirekter Hinweis

Eignen sich die Modell-Proteratogene zum Einsatz im mEST?

	Bewertung
Valpromid	Ja, wenn Umsatz von VPD zu VPA ≥50% (Flick 2006).
Retinol	Bedingt: Instabilität von Retinol und Retinsäure gegenüber Licht, Wärme, Sauerstoff erschwert Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.
Cyclophosphamid	Bedingt: alle teratogenen Metaboliten haben kurze Halbwertszeiten, und Acrolein und Chlorethylaziridin sind leicht flüchtig.
Albendazol	Nein, da der Metabolit Albendazol-Sulfoxid weniger toxisch wirkt als Albendazol und damit ein ungeklärter Widerspruch zur *in vivo* Datenlage exisitiert.

8 Zusammenfassung

Mit dem wissenschaftlich validierten Embryonalen Stammzelltest (EST) können embryotoxische Testsubstanzen, sogenannte Teratogene, *in vitro* nachgewiesen werden. *In vivo* ist es jedoch möglich, dass auch zunächst nicht teratogene Verbindungen, sogenannte Proteratogene, aufgrund der Stoffwechselaktivität des Organismus zu Teratogenen metabolisiert werden. Diese Proteratogene können im EST nicht nachgewiesen werden, weil dem EST ein metabolisch aktives System fehlt. Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, unter welchen Bedingungen der EST auch Proteratogene identifizieren kann, und wie er dazu modifiziert werden muss.

Der EST basiert auf der Fähigkeit embryonaler Stammzellen der Maus (ES-D3-Zellen), sich innerhalb von zehn Tagen in schlagende Herzmuskelzellen zu differenzieren, was als Modell für die Embryonalentwicklung verwendet werden kann. Ein EST besteht dabei insgesamt aus drei verschiedenen *in vitro*-Tests. In einem Differenzierungsassay bilden sich aus ES-D3-Zellen Zellaggregate (*Embryoid Bodies*, EBs), die im Verlauf des Assays kontrahierende Areale ausbilden. Diese können am Tag 10 mikroskopisch detektiert werden. Als Maßzahl für die embryotoxische Wirkung der Testsubstanz wird die (Halbhemm-) Konzentration ermittelt, bei der die Hälfte der EBs durch die Substanz an der Differenzierung in Kardiomyozyten gehindert werden (ID_{50}-Wert). In zwei weiteren Zytotoxizitätstests mit embryonalen ES-D3-Zellen bzw. differenzierten, adulten Fibroblasten (3T3-Zellen) werden die Halbhemmkonzentrationen des Zellwachstums bestimmt (IC_{50}D3-Wert bzw. IC_{50}3T3-Wert), um allgemein toxische Effekte von spezifisch differenzierungshemmenden Effekten abgrenzen zu können. Mit diesen drei Halbhemmkonzentrationen kann mit Hilfe eines biostatistischen Prädiktionsmodells das embryotoxische Potenzial der Testsubstanz bestimmt werden.

Die Zielsetzung dieser Arbeit wurde in mehreren Schritten bearbeitet. 1) Es wurde untersucht, ob der EST Proteratogene von ihren teratogenen Metaboliten unterscheiden kann; ob der gefundene Unterschied die Datenlage *in vivo* widerspiegelt; und welche der untersuchten Proteratogene sich dazu eignen, einen neu zu entwicklenden EST mit metabolisch aktivem System (mEST) modellhaft zu prüfen. 2) Zur Bioaktivierung sollten metabolisch aktive Leberzellen zusammen mit den Zellen des EST kultiviert werden (statische Kokultur mit Hilfe von Zellkultureinsätzen). Dafür wurden mehrere Leberzellarten auf folgende Parameter untersucht: Aktivität von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus (EROD, PROD, BROD, UGT1/2, GST-Assay); Umsatz der Modellsubstanzen; Toleranz der Versuchsbedingungen. Anschließend wurde geprüft, ob 3) der mEST die Proteratogene identifizieren kann, und 4) wie effizient mit dem mEST gearbeitet werden kann.

1) Im EST wurden die Proteratogen-Teratogenpaare Valpromid / Valproinsäure (VPD/VPA), Retinol / all-*trans*-Retinsäure (RO/RA), Cyclophosphamid / 4-Hydroperoxycyclophosphamid (CPP/4HC) und Albendazol / Albendazol-Sulfoxid (ABZ/ASO) untersucht. Mit dem für den EST entwickelten biostatistischen Prädiktionsmodell konnte kein Substanzpaar eindeutig differenziert werden, weil seine Trennungsschärfe dazu nicht ausreichte. Die Diskriminierung aller Substanzpaare gelang jedoch mit einem direkten paarweisen Vergleich der Halbhemmkonzentrationen der drei *in vitro*-Tests. Mit diesem paarweisen Vergleich können jedoch nur Aussagen über Zytotoxizität und Differenzierungshemmung getroffen werden. Um auch embryotoxische Eigenschaften der Substanzpaare beschreiben zu können, wurden aus den Halbhemmkonzentrationen zwei zusätzliche Quotienten berechnet. Der Zytotoxizitätsquotient (Z-Quotient = IC_{50}3T3 / IC_{50}D3) charakterisiert das embryotoxische Potenzial einer Substanz; der Zytotoxizität-Differenzierungsquotient (D-Quotient = IC_{50}D3 / ID_{50}) erlaubt es, den Anteil der differenzierungshemmenden Komponente an der Gesamtwirkung im Differenzierungsassay zu beschreiben. Diese Quotienten wurden je Substanzpaar ebenfalls miteinander verglichen, um eine weitere Möglichkeit zu erhalten, die Substanzpaare zu differenzieren. Dies gelang jedoch nicht bei allen Paaren. Daher müssen die Z- und D-Quotienten zusammen mit den Halbhemmkonzentrationen beurteilt werden, um die Substanzpaare eindeutig charakterisieren zu können.

Der EST reproduzierte den *in vivo* gefundenen Unterschied zwischen Proteratogen und Teratogen nicht immer eindeutig. Bei VPD/VPA und RO/RA wiesen die Teratogene VPA und RA im EST die jeweils größere embryotoxische Potenz auf und bestätigten damit die Datenlage *in vivo*. Für CPP/4HC traf das jedoch nur beim Vergleich der Halbhemmkonzentrationen der Zytotoxizitätstests des EST zu. Der Vergleich der Z-Quotienten von Cyclophosphamid und 4HC wies dagegen darauf hin, dass beide Substanzen das gleiche embryotoxische Potenzial besitzen. Bei ABZ/ASO zeigte das Proteratogen ABZ die größere toxische Wirkung, was dem *in vivo*-Befund widersprach, weil dort das ASO toxischer wirkte. Deshalb war ABZ zur Untersuchung im mEST nicht geeignet, und nur VPD, RO und CPP wurden darin untersucht. Die Ursachen der teilweise widersprüchlichen Befunde müssen in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

2) Bei der Entwicklung des mEST-Protokolls zeigte sich, dass nur die Hepatoma-Zelllinien H4IIE und HepG2 in den EST integriert werden können. Die ebenfalls untersuchten primären Hepatozyten von Ratte und Maus sowie die HepaRG-Zellen tolerierten das ES-D3-Medium nicht, und die Hepa1-6-Zellen wuchsen auf der Membran der Zellkultureinsätze nicht an.

In Bezug auf die Enzymaktivitäten und Umsatz der Modellsubstanzen erwiesen sich weder die H4IIE- noch die HepG2-Zellen als eindeutig vorteilhaft. Die H4IIE-Zellen besaßen im ES-D3-Medium in allen Assays eine größere Enzymaktivität. Bei beiden Zellarten ließ sich diese

Aktivität durch Induktion mit 3-Methylcholanthren bzw. Phenobarbital meist nicht deutlich steigern. Dagegen setzten nur die HepG2-Zellen Valpromid zu Valproinsäure, und Retinol zu Retinsäure um.

3) Aufgrund der Ergebnisse aus den Metabolismusversuchen wurden Valpromid und Retinol im mEST nur in einer Kokultur mit HepG2-Zellen geprüft. Ihre proteratogenen Eigenschaften konnten jedoch nicht nachgewiesen werden, da unter mEST-Bedingungen von den HepG2-Zellen zu wenig Valproinsäure bzw. keine Retinsäure gebildet wurde und sich daher die Halbhemmkonzentrationen von EST und mEST nicht unterschieden. Cyclophosphamid wurde im mEST mit HepG2- und H4IIE-Kokultur untersucht, und in beiden Tests lagen die Halbhemmkonzentrationen höher als im EST. Dies widersprach den Erwartungen, da eine Aktivierung von Cyclophosphamid zu niedrigeren Halbhemmkonzentrationen führen sollte. Als Erklärung wurde die Hypothese formuliert, dass die Metaboliten des Cyclophosphamid aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeiten und Flüchtigkeit (Acrolein und Chlorethylaziridin) nicht schnell genug durch die Membranen der Zellkultureinsätze diffundieren und auf die Zielzellen wirken konnten, sondern in die Gasphase entwichen. Aufgrund dieses Verlustes an Cyclophosphamid erhöhten sich die Halbhemmkonzentrationen. Um diese Hypothese zu belegen, müssen jedoch spezifische Untersuchungen durchgeführt werden.

4) Untersuchungen zur Permeabilität der Membranen der Zellkultureinsätze unter mEST-Bedingungen zeigten, dass die im Einsatz erzeugten Metaboliten mehrere Tage benötigen, bis sie in größerer Menge in das Well diffundiert sind. Aufgrund dieser Dynamik können kurzlebige Metaboliten im mEST wahrscheinlich nicht ausreichend erfasst werden. Als Modellsubstanz erwies sich Valpromid für einen mEST prinzipiell geeignet, da die Valproinsäure im Medium stabil bleibt. Der prozentuale Umsatz an Valpromid muss jedoch wesentlich höher sein als der in dieser Arbeit erreichte. Retinol und Cyclophosphamid erschienen als Modellsubstanzen für einen mEST aufgrund von Instabilität, kurzer Halbwertszeit und Flüchtigkeit der Muttersubstanz oder ihrer Metaboliten nur bedingt geeignet.

In dieser Arbeit konnte damit gezeigt werden, dass der EST Proteratogene von Teratogenen unterscheiden kann. Dies gelingt mit dem Vergleich der Halbhemmkonzentrationen unter zusätzlicher Berücksichtigung der Z- bzw. D-Quotienten. Weiterhin wurde ein mEST aufgebaut, in dem die Zellen des EST mit H4IIE- bzw. HepG2-Zellen als Bioaktivierungssystem erfolgreich kokultiviert werden konnten. Zum Nachweis der Proteratogene Valpromid, Retinol und Cyclophosphamid war dieser mEST jedoch nicht geeignet, weil die Hepatomazellen die Proterato-

gene nicht genügend umsetzten, oder die teratogenen Metaboliten nicht schnell genug in das Zellkultur-Well diffundieren konnten. Es sollten alternative Zellen mit höherer Stoffwechselaktivität zur Kokultur im mEST eingesetzt werden. Die statische Kokultur als Möglichkeit, ein Bioaktivierungssystem an den EST zu koppeln, eignet sich zur Untersuchung von Proteratogenen, deren Metaboliten über mehrere Tage stabil bleiben.

9 Summary

With the Embryonic Stem Cell Test (EST), embryotoxic substances can be detected *in vitro*. These substances are also termed teratogens. *In vivo* it is possible, that substances which are not teratogenic by itself are metabolised to such teratogens. These so-called pro-teratogens cannot be detected by the EST, because the EST has no metabolic capacity. It was therefore the aim of this study to investigate, under which conditions the EST can detect pro-teratogens, and how the test has to be modified to achieve this capability.

The EST uses the ability of murine embryonic stem cells (ES-D3 cell line) to differentiate into contracting cardiomyocytes within ten days of culture - a process which can serve as a model for embryonic development *in vivo*. The EST consists of three different *in vitro* tests. In a differentiation assay with ES-D3 cells, embryoid bodies (EBs) are formed which develop contracting areas that can be assessed on day 10 by microscopic inspection. As a parameter for embryotoxicity, the halfmaximal concentration of the test substance is determined, where 50% of the EBs are inhibited in their differentiation into contracting cardiomyocytes (ID_{50}). In another two cytotoxicity tests with embryonic ES-D3 cells and differentiated (adult) 3T3 cells, the 50%-inhibition of cell proliferation is determined (IC_{50}D3 and IC_{50}3T3). The cytotoxicity tests serve to separate the inhibition of differentiation from general toxic effects. With the three toxicity values, the embryotoxic potential of the test substance can be classified by using a biostatistical prediction model that was developed for the EST.

The present work was conducted in several steps. 1) It was investigated whether the EST can differentiate between pro-teratogens and their teratogenic metabolites; whether the results reflect the situation *in vivo*; and which pro-teratogens are suited as model substances to be tested in an EST with metabolic capacity (mEST). 2) To bioactivate the EST, metabolically competent liver cells were cultivated together with the cells of the EST (static co-culture in cell culture inserts). Primary hepatocytes and liver cell lines were selected and tested for the following parameters: enzyme activity (EROD, PROD, BROD, UGT1/2, GST-Assay); metabolism of model substances; and tolerance of test conditions. It was then investigated 3) whether the new mEST can detect pro-teratogens, and 4) how efficient the mEST performs.

1) In the EST, the following pro-teratogen / teratogen-pairs were tested: Valpromide / valproic acid (VPD/VPA), retinol / all-*trans*-retinoic acid (RO/RA), cyclophosphamide / 4-hydroperoxycyclophosphamide (CPP/4HC) and albendazole / albendazole-sulfoxide (ABZ/ASO). With the biostatistical prediction model of the EST, no substance pair could be discriminated, because its discriminating capacity was not sufficient. Contrariwise it was

possible to distinguish the partners of a pair by a direct comparison of IC_{50}- and ID_{50}-values. However, only the endpoints cytotoxicity and inhibition of differentiation can be assessed with this method. To be able to also describe embryotoxic properties of the substance pairs, further two ratios were calculated from halfmaximal concentrations. The cytotoxicity ratio (Z-Ratio = IC_{50}3T3 / IC_{50}D3) characterises the embryotoxic potential of a substance. The cytotoxicity-differentiation-ratio (D-Ratio = IC_{50}D3 / ID_{50}) allows to quantify the component in the differrentiation assay which inhibits the cell differentiation. These two ratios were additionally compared per substance pair. It was found, that with this method not all pairs could be discriminated. Therefore, Z- and D-Ratios have to be assessed together with the halfmaximal concentrations to be able to fully characterise a substance pair.

The EST did not in all cases reproduce the results found *in vivo* for the difference between pro-teratogen and teratogen. For VPD/VPA and RO/RA, the teratogens VPA and RA were more embryotoxic than the pro-teratogens and thus confirmed the situation *in vivo*. For CPP/4HC, this pattern was only found when the IC_{50}-values were compared. The comparison of the Z-Ratios of cyclophosphamide and 4HC suggested that both substances possess the same embryotoxic potential. With ABZ/ASO, the pro-teratogen ABZ showed the greater toxicity which contrasted with the situation *in vivo*, where ASO is the more teratogenic substance. Therefore ABZ was not suited as a model substance for the mEST, and only VPD, RO and CPP were tested in the new mEST. The reasons for the contradictory findings must be investigated in further studies.

2) When the mEST protocol was developed it was found that only the hepatoma cell lines HepG2 and H4IIE could be integrated into the EST. The also tested primary hepatocytes from rat and mouse did not tolerate the ES-D3 medium, and the Hepa1-6 cells did not grow on the cell culture inserts.

With respect to the enzyme activity and model substance metabolism, no favorite cell line could be determined. The H4IIE cells showed the greater enzyme activity, whereas only the HepG2 cells metabolised valpromide to valproic acid, and retinol to retinoic acid. By induction with 3-methylcholanthrene or phenobarbitone, the enzyme activity could not be increased in most cases in both cell lines.

3) Due to the results of the metabolism experiments, valpromide and retinol were only tested in the mEST with HepG2 co-culture. Their pro-teratogenic properties could however not be detected, because under mEST conditions, the HepG2 cells did not produce enough valproic acid or retinoic acid, and therefore the concentration-response curves of the EST and the mEST were similar. Cyclophosphamide was tested in the mEST with HepG2 and H4IIE co-culture. In both

tests, the halfmaximal concentrations were higher than in the EST. This was counterintuitive, because an activation of cyclophosphamide should lead to lower IC_{50}- and ID_{50}-values. It was hypothesized that the teratogenic metabolites of cyclophosphamide (acroleine and chloroethylaziridine) did not diffuse fast enough through the membranes of the cell culture inserts to interact with the target cells, but quickly escaped into the gas phase due to their short half-life and volatility. Because of this continuous loss of cyclophosphamide in the medium, the halfmaximal concentrations ascended. To confirm this hypothesis, specific experiments need to be conducted.

4) Investigations of the permeability of the membranes of the cell culture inserts showed, that the metabolites that are produced in the inserts need several days to diffuse in larger amounts into the wells below. Due to this dynamic, short-lived metabolites can probably not be detected sufficiently in the mEST. Valpromide is a suitable model substance for the mEST because its metabolite valproic acid is stable in the medium. The amount that has to be produced needs however to be much larger than the amount achieved in the present study. Retinole and cyclophosphamide do not seem to be suitable model substances because of the instability, short half-lives and volatility of the mother substance or its metabolite.

With this work it could be shown that the EST can distinguish between pro-teratogens and teratogens. This is possible through a comparison of the halfmaximal concentrations and parallel consideration of the the Z- and D-Ratios. Furthermore, a new mEST was developed in which H4IIE and HepG2 cells as a bioactivation system could be successfully co-cultivated with cells of the EST. This mEST was however not suited to detect the pro-teratogenic properties of valpromide, retinol and cyclophosphamide, because the hepatoma cells did not metabolise these substances in a sufficient amount, or the metabolite could not diffuse fast enough into the cell culture well. Therefore, alternative cells with higher metabolic activity should be used as a bioactive component for the mEST. The static co-culture as a method to integrate a bioactivation system into the EST is suited for model substances whose metabolites remain stable for several days.

10 Literaturnachweis

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Nature 282:615-616

Alexandre E, David P, Viollon C, Wolf P, Jaeck D, Azimzadeh A, Nicod L, Boudjema K, Richert L (1999) Expression of Cytochromes P-450 2E1, 3A4 and 1A1/1A2 in Growing and Confluent Human HepG2 Hepatoma Cells-Effect of Ethanol. Toxicology in Vitro 13(3) 427-435

Ali-Khan SE, Hales BF (2006) Novel retinoid targets in the mouse limb during organogenesis. Toxicological Sciences 94(1):139-152

Alsdorf R, Wyszynski DF (2005) Teratogenicity of sodium valproate. Expert Opinion on Drug Safety 4(2):345-353

Andrews JE, Ebron-McCoy M, Bojic U, Nau H, Kavlock RJ (1995) Validation of an in vitro teratology system using chiral substances: stereoselective teratogenicity of 4-yn-valproic acid in cultured mouse embryos. Toxicology and Applied Pharmacology 132(2):310-316

Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2006) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. Drug Metabolism and Disposition 34(1):75-83

Anon (1993) Guide to the expression of uncertainty in measurement, erste Ausgabe. ISBN 92-67-10188-9. International Organization for Standardization, Genf, Schweiz. 101 S.

Anon (2000) Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment. Committee on Developmental Toxicology, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council, 354 S. http//:www.nap.edu/catalog.php?record_id=9871#toc (Besucht 21.04.2008)

Anon (2004) Glutathione S-Transferase Assay Kit, Catalog No. 703302, 96 wells. Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA

Anon (2006) REACH in brief. Enterprise and Industry Directorate General and Environment Directorate General, European Commission. http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/REACH/REACH_in_brief_council_comm_pos_060905.pdf (Besucht 22.05.2008)

Atmaca A, Al-Batran SE, Maurer A, Neumann A, Heinzel T, Hentsch B, Schwarz SE, Hövelmann S, Göttlicher M, Knuth A, Jäger E (2007) Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial. British Journal of Cancer 97(2):177-182

Bailey MM, Sawyer RD, Behling JE, Boohaker JG, Hicks JG, O'donnell MA, Stringer KR, Rasco JF, Hood RD (2005) Prior exposure to indole-3-carbinol decreases the incidence of specific cyclophosphamide-induced developmental defects in mice. Birth defects research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology 74(3):261-267

Barua AB, Batres RO, Olson JA (1989) Characterization of retinyl beta-glucuronide in human blood. The American Journal of Clinical Nutrition 1989(2):370-374

Bernauer U, Glatt H, Heinrich-Hirsch B, Liu Y, Muckel E, Vieth B, Gundert-Remy U (2003) Heterologous expression of mouse cytochrome P450 2e1 in V79 cells: construction and characterisation of the cell line and comparison with V79 cell lines stably expressing rat P450 2E1 and human P450 2E1. Alternatives to Laboratory Animals 31(1):21-30

Bernhard HP, Darlington GJ, Ruddle FH (1973) Expression of liver phenotypes in cultered mouse hepatoma cells: synthesis and secretion of serum albumin. Developmental Biology 35:83-96

Bialer M (1991) Clinical pharmacology of valpromide. Clinical Pharmacokinetics 20(2):114-122

Billig H, Ziv E, Bar-On H, Bialer M (1990) The disposition of valpromide in rats and the isolated perfused rat liver. Drug Metabolism and Disposition 18(2):238-244

Binkerd PE, Rowland JM, Nau H, Hendrickx AG (1988) Evaluation of valproic acid (VPA) developmental toxicity and pharmacokinetics in Sprague-Dawley rats. Fundamental and Applied Toxicology 11(3):485-493

Blaauboer BJ, Boobis AR, Castell JV, Coecke S, Groothuis GMM, Guillouzo A, Hall TJ, Hawksworth GM, Lorenzon G, Miltenburger HG, RogiersV, Skett P, Villa P, Wiebel FJ (1994) The practical applicability of hepatocyte cultures in routine testing. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 22:231-241

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM (2001) The evolving concept of a stem cell: entity or funtion? Cell 105:829-841

Blomgren H, Hallström M (1989) Release of a volatile factor from solutions of oxazaphosphorines which damage normal and malignant cells. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 11(6):391-397

Blomhoff R, Green MH, Norum KR. (1992) Vitamin A: physiological and biochemical processing. Annual Review of Nutrition 12:37-57

Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM (2002) Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. Circulation Research 91(3):189-201

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254

Bradley M, Horton J (2001) Assessing the risk of benzimidazole therapy during pregnancy. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 95(1):72-73

Brandon EFA, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM (2003) An update on *in vitro* test methods in human hepatioc drug biotransformation research: pros and cons. Toxicology and Applied Pharmacology 189:233-246

Bremer S, Pellizzer C, Coecke S, Paparella M, Catalani P (2002) Detection of the embryotoxic potential of cyclophosphamide by using a combined system of metabolic competent cells and embryonic stem cells. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 30(1):77-85

Brown LP, Flint OP, Ortin TC, Gibson GG (1986) Chemical teratogenesis: Testing methods and the role of metabolism. Drug Metabolism Reviews 17(3&4):221-260

Brown NA (2002) Selection of test chemicals for the ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests. European Centre for the Validation of Alternative Methods. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 30(2):177-198

Brown NA, Spielmann H, Bechter R, Flint OP, Freeman SJ, Jelinek RJ, Koch E, Nau H, Newall DR, Palmer AK, Renault J-Y, Repetto MF, Vogel R, Wiger R (1995) Screening Chemicals for Reproductive Toxicity: the Current Alternatives. The report and recommendations of an ECVAM/ETS workshop (ECVAM Workshop 12) Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 23:868-882

Buesen R, Visan A, Genschow E, Slawik B, Spielmann H, Seiler A (2004) Trends in improving the embryonic stem cell test (EST): an overview. Alternativen zu Tierexperimenten (ALTEX) 21(1):15-22

Burdon T, Chambers I, Stracey C, Niwa H, Smith A (1999) Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. Cells Tissues Organs 165(3-4):131-143

Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T, Mayer RT (1985) Ethoxy-, Pentoxy- and Benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced Cytochromes P-450. Biochemical Pharmacology 34(18):3337-3345

Capece BP, Navarro M, Arcalis T, Castells G, Toribio L, Perez F, Carretero A, Ruberte J, Arboix M, Cristòfol C (2003) Albendazole sulphoxide enantiomers in pregnant rats' embryo concentrations and developmental toxicity. Veterinary Journal 165(3):266-275

Chambon P (1993) The molecular and genetic dissection of the retinoid signalling pathway. Gene 135(1-2):223-228

Chang G, Jacobson-Kram D, Williams JR (1988) Use of an established human hepatoma cell line with endogenous bioactivation for gene mutation studies. Cell Biology and Toxicology 4(3):267-279

Chauret N, Gauthier A, Nicoll-Griffith DA (1997) Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. Drug Metabolism and Disposition 26(1):1-4

Chen CS, Jounaidi Y, Waxman DJ (2005) Enantioselective metabolism and cytotoxicity of R-ifosfamide and S-ifosfamide by tumor cell-expressed cytochromes P450. Drug Metabolism and Disposition 33(9):1261-1267

Cicurel L, Schmid BP (1988) Postimplantation embryo culture for the assessment of the teratogenic potential and potency of compounds. Experientia 44:833-840

Clagett-Dame M, DeLuca HF (2002) The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. Annual Review of Nutrition 22:347-381

Coecke S, Ahr H, Blaauboer BJ, Bremer S, Casati S, Castell J, Combes R, Corvi R, Crespi CL, Cunningham ML, Elaut G, Elettim B, Freidig A, Gennari A, Ghersi-Egea J-F, Guillouzo A, Hartung T, Hoet P, Ingelman-Sundberg M, Munn S, Janssens W, Ladstetter B, Leahy D, Long A, Meneguz A, Monshouwer M, Morath S, Nagelkerke F, Pelkonen O, Ponti J, Prieto P, Richert L, Sabbioni E, Schaack B, Steiling W, Testai E, Vericat J-A, Worth A (2006) Metabolism: A bottleneck in *in vitro* toxicological test development. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 34:49-84

Coecke S, Rogiers V, Bayliss M, Castell J, Doehmer J, Fabre G, Fry J, Kern A, Wetmoreland C (1999) The use of long-term hepatocyte cultures for detecting induction of drug metabolising enzymes: the current status. ECVAM Hepatocytes and Metabolically Competent Systems Task Force Report 1. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 27:579-638

Cohlan SQ (1953) Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. Science 117(3046):535-536

Collins MD, Eckhoff C, Chahoud I, Bochert G, Nau H (1992) 4-Methylpyrazole partially ameliorated the teratogenicity of retinol and reduced the metabolic formation of all-trans-retinoic acid in the mouse. Archives of Toxicology 66(9):652-659

Corcos L, Weiss MC (1988) Phenobarbital, dexamethasone and benzanthracene induce several cytochrome P450 mRNAs in rat hepatoma cells. FEBS Letters 233(1):37-40

Cristòfol C, Navarro M, Franquelo C, Valladares JE, Carretero A, Ruberte J, Arboix M (1997) Disposition of netobimin, albendazole, and its metabolites in the pregnant rat: developmental toxicity. Toxicology and Applied Pharmacology 144(1):56-61

Czyz J, Wobus AM (2001) Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors. Differentiation 68:167-174

Dai Y, Rashba-Step J, Cederbaum AI (1993) Stable expression of human cytochrome P4502E1 in HepG2 cells: characterization of catalytic activities and production of reactive oxygen intermediates. Biochemistry 32(27):6928-6937

Dan Z, Popov Y, Patsenker E, Preimel D, Liu C, Wang XD, Seitz HK, Schuppan D, Stickel F (2005) Hepatotoxicity of alcohol-induced polar retinol metabolites involves apoptosis via loss of mitochondrial membrane potential. FASEB Journal 19(7):845-847

Daston GP, Wells PG, Hales BF, Ozolins TRS, Chapin RE, Carney EW (2005) Chemical selection for the research area "Prenatal Development" in the Integrated Project ReProTect. Objective 4: Proteratogenic compounds in order to establish a metabolising system for in vitro embryotoxicity tests: A list of at least 10 proteratogens is needed to evaluate the EST and WEC combined with adequate biotransformation systems. ECVAM, Ispra, Italien.

Dearfield KL, Jacobson-Kram D, Brown NA, Williams JR (1983) Evaluation of a human hepatoma cell line as a target cell in genetic toxicology. Mutation Research 108(1-3):437-449

Dearfield KL, Jacobson-Kram D, Huber BE, Williams JR (1986) Induction of sister chromatid exchanges in human and rat hepatoma cell lines by cyclophosphamide and phosphoramide mustard and the effects of cytochrome P-450 inhibitors. Biochemistry and Pharmacology 35(13):2199-2205

Delatour P, Garnier F, Benoit E, Longin C (1984) A correlation of toxicity of albendazole and oxfendazole with their free metabolites and bound residues. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 7(2):139-145

Delatour P, Parish RC, Gyurik RJ (1981) Albendazole : a comparison of relay embryotoxicity with embryotoxicity of individual metabolites. Annales de Recherches Vétérinaires 12(2):159-167

Desmeules P, Devine PJ (2006) Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. Toxicological Sciences 90(2):500-509

Dierickx PJ (1994) The influence of picolines on glutathione transferase activity and subunit composition in human liver derived Hep G2 cells. Biochemical Pharmacology 48(10):1976-1978

Doehmer J (2006) Predicting drug metabolism-dependent toxicity for humans with a genetically engineered cell battery. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 34(6):561-575

Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. Journal of Embryology and Experimental Morphology 87:27-45

Donato MT, Bassi AM, Gómez-Lechón MJ, Penco S, Herrero E, Adamo D, Castell JV, Ferro M (1994) Evaluation of the xenobiotic biotransformation capability of six rodent hepatoma cell lines in comparison with rat hepatocytes. In vitro Cellular & Developmental Biology. Animal 30A(9):574-580

Donato MT, Gómez-Lechón MJ, Castell JV (1993) A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. Analytical Biochemistry 213:29-33

Doostdar H, Burke MD, Melvin WT, Grant MH (1991) The effects of dimethylsulphoxide and 5-aminolaevulinic acid on the activities of cytochrome P450-dependent mixed function oxidase

and UDP-glucuronosyl transferase activities in human HepG2 hepatoma cells. Biochemical Pharmacology 42(6):1307-1313

Doostdar H, Duthie SJ, Burke MD, Melvin WT, Grant MH (1988) The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived HepG2 cell line. FEBS Letters 241(1-2):15-18

Doostdar H, Grant MH, Melvin WT, Wolf CR, Burke MD (1993) The effects of inducing agents on cytochrome P450 and UDP-glucuronyltransferase activities in human HepG2 hepatoma cells. Biochemical Pharmacology 46(4):629-635

Duester G (1996) Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. Biochemistry 35(38):12221-12227

Duthie SJ, Coleman CS, Grant MH (1988) Status of reduced glutathione in the human hepatoma cell line, HepG2. Biochemical Pharmacology 37(17):3365-3368

EC 1907/2006 - Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Official Journal of the European Union L 396/1 - L 396/849

Eckhoff C, Löfberg B, Chahoud I, Bochert G, Nau H (1989) Transplacental pharmacokinetics and teratogenicity of a single dose of retinol (Vitamin A) during organogenesis in the mouse. Toxicology Letters 48(2):171-184

Ehlers K, Stürje H, Merker HJ, Nau H (1992) Valproic acid-induced spina bifida: a mouse model. Teratology 45(2):145-154

Eikel D, Lampen A, Nau H (2006) Teratogenic effects mediated by inhibition of histone deacetylases: evidence from quantitative structure activity relationships of 20 valproic acid derivatives. Chemical Research and Toxicology 19:272-278

Ekins S, Ring BJ, Grace J, McRobie-Belle DJ, Wrighton SA (2000) Present and future *in vitro* approaches for drug metabolism. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 44:313-324

Elmazar MM, Rühl R, Reichert U, Shroot B, Nau H (1997) RARalpha-mediated teratogenicity in mice is potentiated by an RXR agonist and reduced by an RAR antagonist: dissection of retinoid receptor-induced pathways. Toxicology and Applied Pharmacology 146(1):21-28

Enns GM, Roeder E, Chan RT, Ali-Khan Catts Z, Cox VA, Golabi M (1999) Apparent cyclophosphamide (cytoxan) embryopathy: a distinct phenotype? American Journal of Medical Genetics 86(3):237-241

ESAC (2002) The use of scientifically validated *in vitro* tests für embryotoxicity. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 30:265-273

Fabre N, Arrivet E, Trancard J, Bichet N, Roome NO, Prenez A, Vericat JA (2003) A new hepatoma cell line for toxicity testing at repeated doses. Cell Biology and Toxicology 19(2):71-82

Fardel O, Morel F, Ratanasavanh D, Fautrel A, Beaune P, Guillouzo A (1992) Expression of drug metabolizing enzymes in human HepG2 hepatoma cells. Cellular and Molecular Aspects of Cirrhosis 216:327-330

Festag M, Sehner C, Steinberg P, Viertel B (2007a) An *in vitro* embryotoxicity assay based on the disturbance of the differentiation of murine embryonic stem cells into endothelial cells. I: Establishment of the differentiation protocol. Toxicology In Vitro 21(8):1619-1630

Festag M, Viertel B, Steinberg P, Sehner C (2007b) An *in vitro* embryotoxicity assay based on the disturbance of the differentiation of murine embryonic stem cells into endothelial cells. II. Testing of compounds. Toxicology In Vitro 21(8):1631-1640

Fex G, Johannesson G (1988) Retinol transfer across and between phospholipid bilayer membranes. Biochimica et Biophysica Acta 944(2):249-255

Fisher D, Lichti FU, Lucy JA (1972) Environmental effects on the autoxidation of retinol. The Biochemical journal 130(1):259-270

Flick B (2005) Weiterentwicklung eines in vitro-Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen der Maus: Analyse embryotoxischer Wirkung unter Berücksichtigung der Metabolisierung. Präsentation zur 3. Sitzung der Kooperationspartner zum BMBF-Verbundprojekt, 20.07.2005, Berlin

Flick B (2006) Weiterentwicklung eines in vitro-Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen der Maus: Analyse embryotoxischer Wirkung unter Berücksichtigung der Metabolisierung. Präsentation zur 5. Sitzung der Kooperationspartner zum BMBF-Verbundprojekt, 29.06.2006, Hannover

Flick B, Klug S (2006) Whole Embryo Culture: An important tool in developmental toxicology today. Current Pharmaceutical Design 12:1467-1488

Flowers JL, Ludeman SM, Gamcsik MP, Colvin OM, Shao KL, Boal JH, Springer JB, Adams DJ (2000) Evidence for a role of chloroethylaziridine in the cytotoxicity of cyclophosphamide. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 45(4):335-344

Fritz H, Hess R (1971) Effects of cyclophosphamide on embryonic development in the rabbit. Agents and Actions 2(2):83-86

Gebhardt DO (1970) The embryolethal and teratogenic effects of cyclophosphamide on mouse embryos. Teratology 3(3):273-277

Geelen JA (1979) Hypervitaminosis A induced teratogenesis. CRC critical reviews in toxicology 6(4):351-375

Genschow E, Scholz G, Brown N, Piersma A, Bradey M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K, Spielmann H (2000) Development of prediction models for three *in vitro* embryotoxicity tests in an ECVAM validation study. In vitro & Molecular Toxicology 13(1):51-65

Genschow E, Scholz G, Brown NA, Piersma AH, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Spielmann H (1999) Development of prediction models for three in vitro embryotoxicity tests which are evaluated in an ECVAM validation study. Alternativen zu Tierexperimenten (ALTEX) 16(2):73-83

Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Pohl I, Seiler A, Clemann N, Bremer S, Becker K (2004) Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 32(3):209-244

Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Seiler A, Brown N, Piersma A, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K (2002) The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 30(2):151-176

Gibson JE, Becker BA (1968) The teratogenicity of cyclophosphamide in mice. Cancer Research 28:475-480

Glatt H, Gemperlein I, Turchi G, Heinritz H, Doehmer J, Oesch F (1987) Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. Molecular Toxicology 1(4):313-334

Gómez-Lechón MJ, Donato T, Jover R, Rodriguez C, Ponsoda X, Glaise D, Castell JV, Guguen-Guillouzo C (2001) Expression and induction of a large set of drug-metabolizing enzymes by the highly differentiated human hepatoma cell line BC2. European Journal of Biochemistry 268(5):1448-1459

Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. The EMBO Journal 20(24):6969-6978

Göttlicher M, Zhu P, Werling U, Sleeman J, Krämer O, Heinzel T (2002) Molekulare Toxikologie der Valproinsäure: Von der Schädigung der Embryonalentwicklung zur Therapie von Krebs. Nachrichten Forschungszentrum Karlsruhe 34:69-74

Grant MH, Duthie SJ, Gray AG, Burke MD (1988) Mixed function oxidase and UDP-glucuronyltransferase activities in the human HepG2 hepatoma cell line. Biochemical Pharmacology 37(21):4111-4116

Green HA, Kram D, Williams JR (1982) Utilization of an established rat hepatoma cell line for mutation studies. Mutation Research 97:327-336

Grindon C, Combes R (2006) Introduction to the EU REACH Legislation. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 34 Supplement 1:5-10

Grindon C, Combes R, Cronin MT, Roberts DW, Garrod J (2006) A review of the status of alternative approaches to animal testing and the development of integrated testing strategies for assessing the toxicity of chemicals under REACH--a summary of a DEFRA-funded project conducted by Liverpool John Moores University and FRAME. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 34 Supplement 1:149-158

Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 99:15655–15660

Griskevicius L, Yasar U, Sandberg M, Hidestrand M, Eliasson E, Tybring G, Hassan M, Dahl ML (2003) Bioactivation of cyclophosphamide: the role of polymorphic CYP2C enzymes. European Journal of Clinical Pharmacology 59(2):103-109

Guillouzo A (1997) Biotransformation of drugs by hepatocytes. In: In Vitro Methods in Pharmaceutical Research. Hrsg. Castell JV, Gomez-Lechon MJ. Academic Press, San Diego. S. 411-431

Guillouzo A (1998) Liver cell models in in vitro toxicology. Environmental Health Perspectives 106 Suppl 2:511-532

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. The Journal of Biological Chemistry 249(22):7130-7139

Hackenberger I, Kreybig T (1965) Vergleichende teratologische Untersuchungen bei der Maus und bei der Ratte. Arzneimittelforschung 15(12):1456-1460

Hales BF (1982) Comparison of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and ist active metabolites, 4-hydroxycyclophosphamide, phosphoramide mustard, and acrolein. Cancer Research 42(8):3016-3021

Hales BF (1989) Effects of phosphoramide mustard and acrolein, cytotoxic metabolites of cyclophosphamide, on mouse limb development in vitro. Teratology 40(1):11-20

Hales BF, Jain R (1986) Differential effects of 4-hydroperoxycyclophosphamide on limb development in vitro. Teratology 34(3):303-311

Hall TJ, Cambridge G, James PR (1991) Development of a co-culture system with induced HepG2 cells and K562 cells for examining drug metabolism in vitro. Studies with cyclophosphamide, ondansetron and cisplatin. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology. 72(2):161-168

Hendrickx AG, Peterson PE, Rowland JR, Tarantal AF (1991) early embryonic sensitivity to Cyclophosphamide in long-tailed Monkeys (Macaca fascicularis). Teratology 43:445

Herrmann (1993) The effects of the anticonvulsant drug valproic acid and related substances on the early development of the zebrafish (Brachydanio rerio). Toxicology in Vitro 7:41-54

Heuer J, Graeber M, Pohl I, Spielmann H (1994a) An in vitro embryotoxicity assa using the differentiation of embryonic mouse stem cells into haematopoietic cells. Toxicology in vitro 8(4):585-587

Heuer J, Graeber M, Pohl I, Spielmann H (1994b) Culture system for the differentiation of murine embryonic stem cells - a new approach to in vitro testing for embryotoxicity and for developmental immunotoxicology. European Medicines Research. G.N. Fraccia (Ed.) IOS Press: Amsterdam, S. 134-145

Hewitt NJ, Hewitt P (2004) Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. Xenobiotica 34(3):243-256

Hong WK, Lippman SM, Itri LM, Karp DD, Lee JS, Byers RM, Schantz SP, Kramer AM, Lotan R, Peters LJ, et al. (1990) Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. The New England journal of medicine 323(12):795-801

Hornhardt S, Wiebel FJ (1996) CCLTOP Catalogue of cell lines in toxicology and pharmacology. 1st ed., GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg

Houser WH, Raha A, Vickers M (1992) Induction of CYP1A1 gene expression in H4-II-E rat hepatoma cells by benzo[a]pyrene. Molecular Carcinogenesis 5:232-237

Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhoa L, Gu LJ, Wang ZY (1988) Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Blood 72(2):567-572

Jaiswal AK, Nebert DW, Eisen HW (1985) Comparison of aryl hydrocarbon hydrolase and acetanilide 4-hydroxylase induction by polycyclic aromatic compounds in human and mouse cell lines. Biochemical Pharmacology 34:2721-2731.

Jiménez-López JM, Carrasco MP, Segovia JL, Marco C (2002) Resistance of HepG2 cells against the adverse effects of ethanol related to neutral lipid and phospholipid metabolism. Biochemical Pharmacology 63(8):1485-1490

Kanekal S, Kehrer JP (1993) Evidence for peroxidase-mediated metabolism of cyclophosphamide. Drug Metabolism and Disposition 21(1):37-42

Kastner M, Blankenburg G, Schulz T, Schack G, Neubert D (1988) Activation of cyclophosphamide in mouse limb bud cultures using a reconstituted cytochrome P-450 system. Archives of Toxicology 61:426-432

Kiang TK, Ho PC, Anari MR, Tong V, Abbott FS, Chang TK (2006) Contribution of CYP2C9, CYP2A6, and CYP2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the CYP2C9*1/*1 genotype. Toxicological Sciences 94(2):261-271

Kirshon B, Wasserstrum N, Willis R, Herman GE, McCabe ER (1988) Teratogenic effects of first-trimester cyclophosphamide therapy. Obstetrics and Gynecology 72:462-464

Kistler A (1981) Teratogenesis of retinoic acid in rats: susceptible stages and suppression of retinoic acid-induced limb malformations by cycloheximide. Teratology 23:25-31

Kistler A (1987) Limb bud cell cultures for estimating the teratogenic potential of compounds. Validation of the test system with retinoids. Archives of Toxicology 60(6):403-414

Klaunig JE, Goldblatt PJ, Hinton DE, Lipsky MM, Chacko J, Trump BF (1981) Mouse liver cell culture: I. Hepatocyte Isolation. In Vitro 17(10):913-925

Klein NW, Vogler MA, Chatot CL, Pierro LJ (1980) The use of cultured rat embryos to evaluate the teratogenic activity of serum: cadmium and cyclophosphamide. Teratology 21(2):199-208

Kochhar DM (1967) Teratogenic activity of retinoic acid. Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica 70(3):398-404

Kochhar DM, Penner JD, Satre MA (1988) Derivation of retinoic acid and metabolites from a teratogenic dose of retinol (vitamin A) in mice. Toxicology and Applied Pharmacology 96(3):429-441

Kozma C (2001) Valproic acid embryopathy: report of two siblings with further expansion of the phenotypic abnormalities and a review of the literature. American Journal of Medical Genetics 98(2):168-175

Labruzzo P, Yu XF, Dufresne MJ (1989) Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and demonstration of a specific nuclear receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in two human hepatoma cell lines. Biochemical Pharmacology 38(14):2339-2348

Lagace DC, O'Brien WT, Gurvich N, Nachtigal MW, Klein PS (2004) Valproic acid: how it works. Or not. Clinical Neuroscience Research 4:215-225

Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curray CJ, Fernhoff PM, Girixte AW, Lott LT, Richard JM, Sun SC (1985) Retinoic acid embryopathy. New England Journal of Medicine 313: 837–841

Langsch A (2007) Metabolic activation - WP IV.3. Vortrag vom Projektpartner Tierärztliche Hochschule Hannover, Zentrumsabteilung für Lebensmitteltoxikologie (VHM, Partner 15) auf dem ReProTect Joint Research Area Meeting 11. - 12. Juni 2007, Tübingen, Deutschland

Langsch A, Eikel D, Lampen A, Nau H (2005) Metabolic activation of pro-teratogens *in vitro*. Alternativen zu Tierexperimenten (ALTEX) 22, Special Issue:263

Lansink M, van Bennekum AM, Blaner WS, Kooistra T (1997) Differences in metabolism and isomerization of all-trans-retinoic acid and 9-cis-retinoic acid between human endothelial cells and hepatocytes. European Journal of Biochemistry 247(2):596-604.

Laschinski G, Vogel R, Spielmann H (1991) Cytotoxicity test using blastocyst-derived euploid embryonal stem cells: a new approach to in vitro teratogenesis screening. Reproductive Toxicology 5(1):57-64.

LeCluyse EL, Bullock PL, Parkinson A (1996) Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function on long-term cultures of rat hepatocytes. Advanced Drug Delivery Reviews 22:133-186

Lee MO, Manthey CL, Sladek NE (1991) Identification of mouse liver aldehyde dehydrogenases that catalyze the oxidation of retinaldehyde to retinoic acid. Biochemical Pharmacology 42(6):1279-1285

Leo MA, Lasker JM, Raucy JL, Kim CI, Black M, Lieber CS (1989) Metabolism of retinol and retinoic acid by human liver cytochrome P450IIC8. Archives of Biochemistry and Biophysics 269(1):305-312

Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M, Lovey A, et al. (1992) 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. Nature 355(6358):359-361

Lewandowski C, Klug S, Nau H, Neubert D (1986) Pharmacokinetic aspects of drug effects in vitro: effects of serum protein binding on concentration and teratogenicity of valproic acid and 2-en-valproic acid in whole embryos in culture. Archives of Toxicology 58(4):239-242

Lewis AD, Forrester LM, Hayes JD, Wareing CJ, Carmichael J, Harris AL, Mooghen M, Wolf CR (1989) Glutathione-S-transferase isoenzymes in human tumours and tumour derived cell lines. British Journal of Cancer 60:327-331

Lin KH, Winters AL, Lindahl R (1984) Regulation of aldehyde dehydrogenase activity in five rat hepatoma cell lines. Cancer Research 44(11):5219-5226

Lindl T (2000) Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 316 S.

Ludeman SM (1999) The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. Current Pharmaceutical Design 5(8):627-643

Maar TE, Ellerbeck U, Bock E, Nau H, Schousboe A, Berezin V (1997) Prediction of teratogenic potency of valproate analogues using cerebellar aggregation cultures. Toxicology 116(1-3):159-168

Malik N, Koteen GM, Owens IS (1979) Induction of UDP-Glucuronosyltransferase activity in the Reuber H-4-II-E hepatoma cell culture. Molecular Pharmacology 16:950-960

Mantovani A, Ricciardi C, Stazi AV, Macrì C (1995) Effects observed on gestational day 13 in rat embryos exposed to albendazole. Reproductive Toxicology 9(3):265-273

Marselos M, Strom SC, Michalopoulos G (1987) Effect of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on aldehyde dehydrogenase activity in cultures of HepG2 cells and normal human hepatocytes. Chemico-biological Interactions 62(1):75-88

McLone DG (2003) The etiology of neural tube defects: the role of folic acid. Child's Nervous System 19(7-8):537-539

McMillan JM, Shaddock JG, Casciano DA, Arlotto MP, Leakey JEA (1991) Differ3ential stability of drug-metabolizing enzyme activities in primary rat hepatocytes, cultured in the absence or presence of dexamethasone. Mutation Research 249:81-92

Menegola E, Broccia ML, Nau H, Prati M, Ricolfi R, Giavini E (1996) Teratogenic effects of sodium valproate in mice and rats at midgestation and at term. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 16(2):97-108

Meyer F, Volland J, Helm D, Hensen S, Leu J, Risse K (2005a) Co-Kultivierungs-Vorversuche im statischen System: H4IIE-Zellen mit D3-Zellen. Arbeitsbericht Nr. 0960, 04. Februar 2005. ALTANA Pharma AG, Institut für präklinische Arzneimittelsicherheit, Barsbüttel.

Meyer F, Volland J, Helm D, Hensen S, Leu J, Risse K (2005b) Ermittlung des Zeitfaktors im embryonalen Stammzelltest (EST). Arbeitsbericht Nr. 0976, 15. Februar 2005. ALTANA Pharma AG, Institut für präklinische Arzneimittelsicherheit, Barsbüttel.

Miret S, De Groene EM, Klaffke W (2006) Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. Journal of Biomolecular Screening 11(2):184-193

Mirkes PE, Ellison A, Little SA (1991) Resistance of rat embryonic heart cells to the cytotoxic effects of cyclophosphamide does not involve aldehyde dehydrogenase-mediated metabolism. Teratology 43(4):307-318

Moore KL (1990) Embryologie - Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen, 3. Auflage. Schattauer, Stuttgart, New York. 550 S.

Morriss GM, Steele CE (1977) Comparison of the effects of retinol and retinoic acid on postimplantation rat embryos in vitro. Teratology 15(1):109-119

Mosmann 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

Murakami S, Ijima H, Ono T, Kawakami K (2004) Development of co-culture system of hepatocytes with bone marrow cells for expression and maintenance of hepatic functions. International Journal of Artificial Organs 27(2):118-126

Mutchinik O, Aizpuru E, Grether P (1992) The human teratogenic effect of cyclophosphamide. Teratology 45:329.

Na L, Wartenberg M, Nau H, Hescheler J, Sauer H (2003) Anticonvulsant valproic acid inhibits cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by increasing intracellular levels of reactive oxygen species. Birth Defects Research (Part A) 67:174–180

Nakama A, Kuroda K, Yamada A (1995) Induction of cytochrome P450-dependent monooxygenase in serum-free cultured HepG2 cells. Biochemical Pharmacology 50(9):1407-1412

Napoli JL (1996) Retinoic acid biosynthesis and metabolism. The FASEB Journal 10(9):993-1001

Nau H (1985) Teratogenic valproic acid concentrations: infusion by implanted minipumps vs. conventional injection regimen in the mouse. Toxicology and Applied Pharmacology 80(2):243-250

Nau H (1986) Valproic acid teratogenicity in mice after various administration and phenobarbital-pretreatment regimens: the parent drug and not one of the metabolites assayed is implicated as teratogen. Fundamental and Applied Toxicology 6(4):662-668

Nau H, Löscher W (1986) Pharmacologic evaluation of various metabolites and analogs of valproic acid: teratogenic potencies in mice. Fundamental and Applied Toxicology 6(4):669-676

Nau H, Scott WJ (1987) Teratogenicity of valproic acid and related substances in the mouse: drug accumulation and pHi in the embryo during organogenesis and structure-activity considerations. Archives of Toxicology - Supplement 11:128-139

Nau H, Zierer R, Spielmann H, Neubert D, Gansau C (1981) A new model for embryotoxicity testing: teratogenicity and pharmacokinetics of valproic acid following constant-rate administration in the mouse using human therapeutic drug and metabolite concentrations. Life Sciences 29(26):2803-2814

Navarro M, Canut L, Carretero A, Cristofol C, Pérez-Aparicio FJ, Arboix M, Ruberte J (1999) Developmental toxicity in rat fetuses exposed to the benzimidazole netobimin. Reproductive Toxicology 13(4):295-302

Niemann C, Gauthier JC, Richert L, Ivanov MA, Melcion C, Cordier A (1991) Rat adult hepatocytes in primary pure and mixed monolayer culture. Biochemical Pharmacology 42(2):373-379

Novotna B, Jelinek R (1990) Mutagenic and teratogenic effects of cyclophosphamide in the chick embryo: chromosomal aberrations and cell proliferation on affected and unaffected tissues. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 10:341-350

Noy N, Xu ZJ (1990) Interactions of retinol with binding proteins: implications for the mechanism of uptake by cells. Biochemistry 29(16):3878-3883

Nussler AK, Wang A, Neuhaus P, Fischer J, Yuan J, Liu L, Zeilinger K, Gerlach J, Arnold PJ, Albrecht W (2001) The suitability of hepatocyte culture models to study various aspects of drug metabolism. Alternativen zu Tierexperimenten (ALTEX) 18:91-101

Oesch F (1994) Fremdstoffmetabolismus. In: Lehrbuch der Toxikologie. Hrsg. Marquardt H, Schäfer SG. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 68-93.

Oglesby LA, Ebron MT, Beyer PE, Carver BD, Kavlock RJ (1986) Co-culture of rat embryos and hepatocytes: in vitro detection of a proteratogen. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 6(2):129-138

Okada A, Kurihara H, Aoki Y, Bialer M, Fujiwara M (2004) Amidic modification of valproic acid reduces skeletal teratogenicity in mice. Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology 71(1):47-53

Ozolins TRS, Oglesby LA, Wiley MJ, Wells PG (1995) *In vitro* murine embryotoxicity of cyclophosphamide in embryos co-cultured with maternal hepatocytes: development and application of a murine embryo-hepatocyte co-culture model. Toxicology 102:259-274

Ozpolat B, Mehta K, Lopez-Berestein G (2005) Regulation of a highly specific retinoic acid-4-hydroxylase (CYP26A1) enzyme and all-trans-retinoic acid metabolism in human intestinal, liver, endothelial, and acute promyelocytic leukemia cells. Leukemia & Lymphoma 46(10):1497-1506

Parsons JF, Rockley J, Richold M (1990) In vitro micromass teratogen test: interpretation of results from a blind trial of 25 compounds using three separate criteria. Toxicology in vitro 4(4/5):609-611

Pedersen F, de Bruijn J, Munn S, van Leeuwen K (2003) Assessment of additional testing needs under REACH - effects of (Q)SARs, risk based testing and voluntary industry initiatives. 33 S. JRC Report EUR 20863. http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/REACH/PUBLICATIONS/REACH_testing_needs_final.pdf (Besucht 22.05.2008)

Pelkonen O, Kaltiala EH, Larmi TKI, Kärki NT (1974) Cytochrome P-450-linked monooxygenase system and drug-induced spectral interactions in human liver microsomes. Chemico-Biological Interactions 9:205-216.

Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS (2001) Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. The Journal of Biological Chemistry 276(39):36734-36741

Piersma AH (1993) Whole embryo culture and toxicity testing. Toxicology in vitro 7(6):763-768

Piersma AH, Genschow E, Verhoef A, Spanjersberg MQI, Brown NA, Brady M, Burns A, Clemann N, Seiler A, Spielmann H (2004) Validation of the postimplantation rat whole-embryo culture test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 32:275-307

Piscopo SE, Smoak IW (1997) Comparison of effects of albendazole sulfoxide on in vitro produced bovine embryos and rat embryos. American Journal of Veterinary Research 58(9):1038-1042

Pitot HC, Peraino C, Morse PA, Potter VR (1964) Hepatoma in tissue culture compared with adapting liver *in vivo*. National Cancer Institute Monographs 13:229-242.

Pottenger LH, Jefcoate CR (1990) Characterization of a novel cytochrome P450 from the transformable cell line C3H/10T1/2. Carcinogenesis 11:312-327.

Radatz M, Ehlers K, Yagen B, Bialer M, Nau H (1998) Valnoctamide, valpromide and valnoctic acid are much less teratogenic in mice than valproic acid. Epilepsy Research 30(1):41-48

Reuber MD (1961) A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat. Journal of the National Cancer Institute 26:891-899

Roberts ES, Vaz AD, Coon MJ (1992) Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. Molecular Pharmacology 41(2):427-433

Rogiers V, Vercruysse A (1993) Rat hepatocyte cultures and co-cultures in biotransformation studies of xenobiotics. Toxicology 82(1-3):193-208

Rolin S, Souhaili-el Amri H, Batt AM, Levy M, Bagrel D, Siest G (1989) Study of the in vitro bioactivation of albendazole in human liver microsomes and hepatoma cell lines. Cell Biology and Toxicology 5(1):1-14

Romert L, Dock L, Jenssen D, Jernström B (1989) Effects of glutathione transferase activity on benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol metabolism and mutagenesis studied in a mammalian cell co-cultivation assay. Carcinogenesis 10(9):1701-1707

Rosa FW, Wilk AL, Kelsey FO (1986) Teratogen update: vitamin A congeners. Teratology 33(3):355-364

Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ (1999) Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. Drug Metabolism and Disposition 27(6):655-666

Rücker G, Neugebauer M, Willems GG (2001) Instumentelle pharmazeutische Analytik. 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 705 S.

Rueff J, Chiapella C, Chipman JK, Darroudi F, Silva ID, Duverger-van Bogaert M, Fonti E, Glatt HR, Isern P, Laires A, Léonard A, Llagostera M, Mossesso P, Natarajan AT, Palitti F, Rodrigues AS, Schinoppi A, Turchi G, Werle-Schneider G (1996) Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays. Mutation Research 353(1-2):151-176

Ruhnke M, Nussler AK, Ungefroren H, Hengstler JG, Kremer B, Hoeckh W, Gottwald T, Heeckt P, Fandrich F (2005a) Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. Transplantation 79(9):1097-1103

Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, Hengstler JG, Klapper W, Ulrichs K, Hutchinson JA, Soria B, Parwaresch RM, Heeckt P, Kremer B, Fändrich F (2005b) Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. Gastroenterology 128(7):1774-1786

Russell WMS, Burch RL (1959) The principles of humane experimental technique. Methuen, London, UK. 238 S.

Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J (2003) Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. Cardiovascular Research 58(2):278-291

Salvi VS (2003) Folic acid and birth defects. Journal of Postgraduate Medicine 49(3):195-196.

Salyers KL, Cullum ME, Zile MH (1993) Glucuronidation of all-trans-retinoic acid in liposomal membranes. Biochimica et Biophysica Acta 1152(2):328-334

Sass JO, Forster A, Bock KW, Nau H (1994) Glucuronidation and isomerization of all-trans- and 13-cis-retinoic acid by liver microsomes of phenobarbital- or 3-methylcholanthrene-treated rats. Biochemical Pharmacology 47(3):485-492

Schleger C, Krebsfänger N, Kalkuhl A, Bader R, Singer T (2001) Möglichkeiten zur Nutzung von Zellkulturmethoden in der Arzneimitteleintwicklung. Alternativen zu Tierexperimenten (ALTEX) 18:5-8

Schmidt C (2001) Entwicklung einer Analysenmethode zur sensitiven Bestimmung von Retinoiden in biologischen Matrizes sowie ihre Anwendung in der Untersuchung des Einflusses von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin auf den Vitamin-A-Metabolismus. Dissertation, Universität Hannover.

Schmidt CK, Brouwer A, Nau H (2003) Chromatographic analysis of endogenous retinoids in tissues and serum. Analytical Biochemistry 315(1):36-48

Schmuck G (2001) Die Bedeutung standardisierter Zellkulturverfahren für die Routine-Toxikologie der Pharmaindustrie. Alternativen zu Tierexperimenten (ALTEX) 18:79-80

Scholz G, Genschow E, Pohl I, Bremer S, Paparella M, Raabe H, Southee J, Spielmann H (1999a) Prevalidation of the embryonic stem cell test (EST) - A new *in vitro* embryotoxicity test. Toxicology in Vitro 13:675-681

Scholz G, Pohl I, Genschow E, Klemm M, Spielmann H (1999b) Embryotoxicity screening using embryonic stem cells *in vitro*: Correlation to *in vivo* teratogenicity. Cells Tissues Organs 165:203-211

Schuetz EG, Li D, Omiecinski CJ, Muller-Eberhard U, Kleinmann HK, Elswick B, Guzelian PS (1988) Regulation of gene expression on adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. Journal of Cellular Physiology 134:309-323

Schwetz BA (1992) Criteria for judging the relative toxicity of chemicals from developmental toxicity data: a workshop summary. Teratology 45(4):337-339

Seglen PO (1976) Preparation of isolated rat liver cells. Methods in Cell Biology 13:29-83

Seiler A, Buesen R, Visan A, Spielmann H (2006) Use of murine embryonic stem cells in embryotoxicity assays: the embryonic stem cell test. Methods in Molecular Biology 329:371-95

Seiler A, Visan A, Buesen R, Genschow E, Spielmann H (2004) Improvement of an in vitro stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test. Reproductive Toxicology 18(2):231-240

Seiler A, Visan A, Pohl I, Genschow E, Buesen R, Spielmann H. (2002) Etablierung molekularer Endpunkte zur Weiterentwicklung des Embryonalen Stammzelltests (EST) mit embryonalen Stammzellen der Maus (Zelllinie D3). Alternativen zu Tierexperimenten (ALTEX) 19 Suppl 1:55-63

Shenefelt RE (1972) Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. Teratology 5(1):103-118

Sifton DW (1995) Physicians' Desk Reference. David W. Sifton (Editor). 49. Ausgabe, Montvale, NJ

Sivaprasadarao A, Findlay JB (1988) The interaction of retinol-binding protein with its plasma-membrane receptor. The Biochemical Journal 255(2):561-569

Smith MK, Kimmel GL, Kochhar DM, Shepard TH, Spielberg SP, Wilson JG (1983) A selection of candidate compounds for *in vitro* teratogenesis test validation. Teratogenicity, Carcinogenicity, Mutagenicity 3:461-480

Sodhi P, Poddar B, Parmar V (2001) Fatal cardiac malformation in fetal valproate syndrome. Indian Journal of Pediatrics 68(10):989-990

Sommer A (1994) Vitamin A: its effect on childhood sight and life. Nutrition reviews 52:60-66

Sonoda T, Ohdo S, Ohba K, Okishima T, Hayakawa K (1990) Teratogenic effects of sodium valproate in the Jcl: ICR mouse fetus. Acta Paediatrica Japonica 32(5):502-507

Sonoda T, Ohdo S, Ohba K, Okishima T, Hayakawa K (1993) Sodium valproate-induced cardiovascular abnormalities in the Jcl:ICR mouse fetus: peak sensitivity of gestational day and dose-dependent effect. Teratology 48(2):127-132

Soprano DR, Soprano KJ (1995) Retinoids as teratogens. Annual Review of Nutrition 15:111-132

Spielmann H, Genschow E, Brown NA, Piersma AH, Verhoef A, Spanjersberg MQI, Huuskonen H, Paillard F, Seiler A (2004) Validation of the rat limb bud micromass test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 32:245-274

Spielmann H, Jacob-Müller U (1981) Investigation on cyclophosphamide treatment during the preimplantation period. II. In vitro studies on the effects of cyclophosphamide and its metabolites 4-OH-cyclophosphamide, phosphoramide mustard, and acrolein on blastulation of four-cell and eight-cell mouse embryos and on their subsequent development during implantation. Teratology 23(1):7-13

Spielmann H, Pohl I, Döring B, Liebsch M, Moldenhauer F (1997) The embryonic stem cell test, an *in vitro* embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. In vitro Toxicology 10(1):119-127

Spielmann H, Seiler A, Bremer S, Hareng L, Hartung T, Ahr H, Faustman E, Haas E, Moffat GJ, Nau H, Vanparys P, Piersma A, Sintes JR, Stuart J (2006) The practical application of three validated in vitro embryotoxicity tests. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 34:527-538

Spielmann H, Vogel R (2006) REACH testing requirements must not be driven by reproductive toxicity testing. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 34(4):365-366

Sporn MB, Roberts AB (1985) What is a retinoid? Ciba Foundation Symposium 113:1-5

Stahlmann RU, Bluth U, Neubert D (1985) Effects of the cyclophosphamide metabolite acrolein an mammalian limb Bud cultures. Archives of Toxicology 57:163-167

Summer KH, Wiebel FJ (1981) Glutathione and Glutathione S-Transferase activities of mammalian cells in culture. Toxicology Letters 9:409-413

Swedmark S, Romert L, Morgenstern R, Jenssen D (1992) Studies on glutathione transferases belonging to class pi in cell lines with different capacities for conjugating (+)-7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9 alpha, 10 alpha-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. Carcinogenesis 13(10):1719-1723

ten Berg K, van Oppen AC, Nikkels PG, Gittenberger-de Groot AC, van der Voet GB, Brilstra EH, Lindhout D (2005) Complex cardiac defect with hypoplastic right ventricle in a fetus with valproate exposure. Prenatal Diagnosis 25(2):156-158

Teruel MT, Felipe AE, Solana HD, Sallovitz JM, Lanusse CE (2003) Placental and fetal toxicity of albendazole sulphoxide in Wistar rats. Veterinary and Human Toxicology 45(3):131-136

Thisted E, Ebbesen F (1993) Malformations, withdrawal manifestations, and hypoglycaemia after exposure to valproate in utero. Archives of Disease in Childhood 69:288-291

Tosetti F, Campelli F, Levi G (1999) Studies on the cellular uptake of retinol binding protein and retinol. Experimental Cell Research 250(2):423-433

Tuschl G, Hrach J, Hewitt PG, Müller SO (2007) Langzeitkulturen primärer Rattenhepatozyten: Modell zur Analyse hepatotypischer Toxizität. Vortrag auf der 48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz.

Urani C, Doldi M, Crippa S, Camatini M (1998) Human-derived cell lines to study xenobiotic metabolism. Chemosphere 37(14-15):2785-2795

van der Jagt K, Munn S, Tørsløv J, de Bruijn J (2004) Alternative approaches can reduce the use of test animals under REACH. European Commission Addendum to the JCR Report: Assessment of additional testing needs under REACH - effects of (Q)SARs, risk based testing and voluntary industry initiatives. 25 S. http://ihcp.jrc.cec.eu.int/docs/ecb/Reducing_the_use_of_test_animals_under_REACH_IHCP_report.pdf (Besucht 22.05.2008)

van Poll D, Sokmensuer C, Ahmad N, Tilles AW, Berthiaume F, Toner M, Yarmush ML (2006) Elevated hepatocyte-specific functions in fetal rat hepatocytes co-cultured with adult rat hepatocytes. Tissue Engineering 12(10):2965-2973

Velík J, Baliharová V, Skálová L, Szotáková B, Wsól V, Lamka J (2005) Liver microsomal biotransformation of albendazole in deer, cattle, sheep and pig and some related wild breeds. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 28(4):377-384

Volland J (2002) Embryotoxizität, Antikonvulsive Wirkung, Sedierung und Adipogenese: Struktur-Aktivitäts-Studien von Valproinsäure-Derivaten bei der Maus und in 3H/10T1/2-Zellen. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

Walle T, Otake Y, Galijatovic A, Ritter JK, Walle UK (2000) Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in the human hepatoma cell line hep G2. Drug Metabolism and Disposition 28(9):1077-1082

Warkany J (1971) Congenital Malformations. Yearbook Medical Publishers Chicago. 1309 S.

Watanabe HK, Hoskins B, Ho IK (1986) Selective inhibitory effect of organophosphates on UDP-glucuronyl transferase activities in rat liver microsomes. Biochemical Pharmacology 35(3):455-460

Wells PG, Winn LM (1996) Biochemical toxicology of chemical teratogenesis. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 31(1):1-40.

White JA, Beckett-Jones B, Guo YD, Dilworth FJ, Bonasoro J, Jones G, Petkovich M (1997) cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. The Journal of Biological Chemistry 272(30):18538-18541

Whittaker SG, Faustman EM (1991) Effects of albendazole and albendazole sulfoxide on cultures of differentiating rodent embryonic cells. Toxicology and Applied Pharmacology 109(1):73-84

Wiebel FJ, Singh J, Schindler E, Summer K-H (1980) UDP-glucuronosyl-, phenol sulfo-, and glutathione-S-transferase activities of mammalian cells in permanent culture. Toxicology 17:123-126

Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature 336(6200):684-687

Wilson JG (1973) Environment and Birth Defects. Academic Press, New York, 305 S.

Wolfla CE, Ross RA, Crabb DW (1988) Induction of alcohol dehydrogenase activity and mRNA in hepatoma cells by dexamethasone. Archives of Biochemistry and Biophysics 263(1):69-76

Wu H, Cai P, Clemens DL, Jerrells TR, Ansari GA, Kaphalia BS (2006) Metabolic basis of ethanol-induced cytotoxicity in recombinant HepG2 cells: role of nonoxidative metabolism. Toxicology and Applied Pharmacology 216(2):238-247

Xu LC, Bresnick E (1990) Induction of cytochrome P450IA1 in rat hepatoma cell by polycyclic hydrocarbons and a dioxin. Biochemical Pharmacology 40(6):1399-1404

Yoshitomi S, Ikemoto K, Takahashi J, Miki H, Namba M, Asahi S (2001) Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. Toxicology In Vitro 15(3):245-256

ZEBET (2001) Standard Operating Procedure - Embryonic Stem Cell Test, Version 19.10.2001. Zentrum für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch, Bundesamt für Risikobewertung (BfR), Berlin

zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ (2004) Molecular multiple endpoint embryonic stem cell test - a possible approach to test for the teratogenic potential of compounds. Toxicology and Applied Pharmacology 194(3):257-269

11 Anhang

11.1 Firmenverzeichnis

Kurzform	Name und Ort
AppliChem	AppliChem, 64291 Darmstadt
ATCC	ATCC, Manassas, VA 20110-2209
Aventis	Aventis Pharma Deutschland, 65926 Frankfurt am Main
Baxter	Baxter Oncology, 33790 Halle/Westfalen
Bayer	Bayer Vital, 51368 Leverkusen
Biochrom	Biochrom AG, 12247 Berlin
Bio-Rad	Bio-Rad, 80939 München
BMG	BMG LABTECH, 77656 Offenburg
Braun	Braun, 34209 Melsungen
Charles River	Charles River, 97633 Sulzfeld
DSMZ	DSMZ, 38124 Braunschweig
Eppendorf	Eppendorf, 22331 Hamburg
H+P	H+P Labortechnik, 85764 Oberschleißheim
IKA	IKA-Works, Wilmington, NC 28405
Invitrogen	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
Johnson	Johnson Matthey, Emmerich, NL
LKT	LKT Laboratories, Minnesota 55114, USA
menal	menal, 79312 Emmendingen
Merck	Merck, 64293 Darmstadt
Mettler	Mettler-Toledo, 35353 Giessen
Millipore	Millipore (Chemicon International), Billerica, MA 01821, USA
Nalge	Nalge Nunc International, Rochester, NY 14625
Niomech	Niomech / IIT, 33615 Bielefeld
Nunc	Nunc, 65201 Wiesbaden
Olympus	Olympus Europa, 20034 Hamburg
Pharmacia	Pharmacia GmbH, 91058 Erlangen
Roche	Roche, 82372 Penzberg
Sartorius	Sartorius, 37075 Göttingen
Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Tecan	Tecan Deutschland, 74564 Crailsheim
Thermo Fisher	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA 02454
TiHo	Tierärztliche Hochschule Hannover, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie, Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik, Prof. Heinz Nau
TiHo1	Bezug über TiHo. Hersteller: Sigma-Aldrich
TiHo2	Bezug über TiHo. Hersteller: Fluka (jetzt Sigma-Aldrich)
TiHo3	Bezug über TiHo. Hersteller: Katwijk Chemie, 2222 BA Katwijk, NL
Vivasience	Vivascience (jetzt Sartorius, 37075 Göttingen)

11.2 Danksagung

Diese Arbeit entstand am Institut für Präklinische Arzneimittelsicherheit (IPAS) der Nycomed GmbH (ehemals ALTANA Pharma AG) in der Abteilung Reproduktionstoxikologie. Ich danke den während meiner Zeit tätigen Institutsleitern Herrn Dr. G. Bode und Herrn Prof. Dr. P.-G. Germann dafür, dass ich diese Arbeit in ihrem Hause durchführen konnte. Dem Abteilungsleiter Herrn Dr. U. Hübel danke ich für den Arbeitsplatz in seiner Abteilung, und für die gewährten Weiterbildungsmaßnahmen und Besuche von Kongressen.

Frau Dr. Frauke Meyer und Frau Dr. Jutta Volland organisierten und leiteten den Teil des BMBF-Verbundprojektes, in dessen Rahmen ich diese Arbeit anfertigen konnte. Für ihre qualifizierte Betreuung und ihre wertvollen Anregungen und Diskussionen möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. L. Renwrantz vom Zoologischen Institut der Universität Hamburg danke ich für die Bereitschaft, meine Arbeit zu betreuen und zu begutachten, sowie für die konstruktive Kritik in Bezug auf meine Manuskripte.

Herrn Prof. Dr. A. Rodewald danke ich ebenfalls für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Ohne die Unterstützung der aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter aus den verschiedenen Abteilungen am IPAS hätte diese Arbeit niemals gelingen können. Den Kolleginnen aus der Reproduktionstoxikologie danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre Runde und die gute Zusammenarbeit. Jennifer Leu und Jette Dierich danke ich besonders für die Bereitschaft einzuspringen, wenn es im Zellkulturlabor eng wurde, und für so manches spannende Gespräch über Gott und die Welt.

Aus der Frühen Toxikologie danke ich insbesondere Kerstin Risse, Doris Helm und Sabrina Hensen für die Einarbeitung in die Methoden der Zellkultivierung, die Bestimmung der Enzymaktivitäten und die Durchführung des Embryonalen Stammzelltest, sowie für ihre Hilfe und geduldige Beantwortung meiner Fragen.

Frau Dr. R. Slacik-Erben, Ronny Kaufmann, Susan Kostecki, Natalie Peters, Tatjana Schönberg, Renate Meißner und Sergej Kaschurow aus der Genetischen Toxikologie danke ich für die fruchtbaren Diskussionen, Unterstützung bei der Entwicklung neuer Ideen und netten Worte, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit weitergeholfen haben.

Herrn Dr. T. Wöhrmann danke ich für die Ermöglichung eines Histologie-Praktikums in seiner Abteilung.

Schließlich danke ich allen Mitarbeitern des IPAS für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die stets offenen Türen, wenn es Fragen zu klären gab.

Dr. Burkhard Flick und Dr. Stefan Lunkenbein möchte ich für die gute Zusammenarbeit im BMBF-Verbundprojekt und den fachlichen Austausch danken.

Werner Höra danke ich für die gewissenhafte Durchsicht meines letzten Entwurfes auf Fehler und Verständlichkeit.

Thorsten, Volker, Michael, Roland - Mein tiefster Dank und Verbundenheit gelten Euch für Eure treue Begleitung und Geduld mit mir, und für die Aufmunterungen in den Zeiten, als das Ziel außer Sicht zu geraten schien.

Zum Schluss geht mein ganz besonderer Dank an meine liebe Mutter und an Dieter. Ich danke Euch für Euren steten Optimismus, Eure Ermutigungen, und dass ich immer mit Eurer Unterstützung rechnen konnte.