

Evaluation von Gallensäuren als Biomarker für Lebertoxizität in der präklinischen Arzneimittelentwicklung

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Markus Slopianka

aus Lingen (Ems)

Würzburg 2020

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Angela Mally für die Möglichkeit der Promotion, die Bereitschaft die Betreuung meiner Arbeit zu übernehmen und den wissenschaftlichen Diskurs. Die zahlreichen Gespräche und die hilfreichen Hinweise werden mir immer als bereichernder und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben. Zudem danke ich Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe für die Übernahme des Zweitgutachtens und die wissenschaftliche Betreuung. Ohne Ihre wertvolle akademische Unterstützung wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Dr. Thomas Steger-Hartmann danke ich für die Möglichkeit die Arbeit in der Abteilung Investigational Toxicology der Bayer AG durchzuführen zu können sowie für die Bereitstellung der nötigen Infrastruktur sowie der fachgruppenübergreifenden Vernetzung. Außerdem möchte ich mich bei der Bayer AG für die finanzielle Unterstützung meiner Forschung bedanken. Dr. Björn Riefke danke ich für die Vergabe des Themas, die jederzeit hilfsbereite und fachlich fundierte Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Ich bedanke mich herzlich bei Dr. Rainer Ernst, Dr. Elke Hartmann und Dr. Hanna Pischon für die histopathologische Auswertung, die ausführlichen Antworten auf viele Fragen und ihre Hilfsbereitschaft.

Dr. Andreas Reichel und Dr. Ursula Mönning danke ich für die Unterstützung bei Übertragung der Methode auf den In vitro Forschungsbereich der Bayer AG. Darüberhinaus möchte ich mich bei ihnen für die zahlreichen Fachdiskussionen bedanken, die mir viele neue Impulse für die Erstellung der Arbeit gegeben haben.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei allen anderen Kollegen*innen der Bayer AG in Berlin/Wuppertal und der Universität Würzburg für ihre hilfsbereite Unterstützung meiner Arbeit bedanken. Ganz besonders bedanke ich mich bei Daniela Kirchhoff, Daniela Schlichka, Peter Slabke, Corinna Czupalla, Mirko Klein, Dr. Amol Fantagare, Olaf Christian und Anne Herrmann für die lustigen Mittagspausen, die offenen Ohren sowie aufbauenden Worte und zusammengefasst für die schöne Zeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Regine Fuchs für die fachlichen Hinweise bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Vielen lieben Dank an meine Familie und meine Freunde, die meine Arbeit in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben. Ganz besonders gilt hier mein Dank Anne Herrmann, die mit ihrer unglaublichen moralischen Unterstützung Kraft sowie Mut zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation gegeben hat.

Inhalt

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Arzneimittelentwicklung	1
1.2	Präklinische Arzneimittelentwicklung	2
1.2.1	Entwicklungsabbruch durch Arzneimittel-induzierte Lebertoxizität	5
1.2.2	Sicherheitsbewertung der Hepatotoxizität in präklinischen Studien	6
1.2.2.1	Makropathologie und Histopathologie der Hepatotoxizität	6
1.2.2.2	Klinische Pathologie von Hepatotoxizität	9
1.2.2.3	Schwierigkeiten bei der etablierten präklinischen Diagnostik von Hepatotoxizität	11
1.2.3	Die Evaluierung neuer Methoden in der präklinischen Diagnostik der Hepatotoxizität	12
1.3	Gallensäuren	14
1.3.1	Biogenese von Gallensäuren	14
1.3.2	Physiologische Funktion der Gallensäuren	17
1.3.3	Gallensäuren als Biomarker für arzneimittel-induzierte Lebertoxizität	20
1.4	Arzneimittel-induzierte Lebertoxizität	22
1.4.1	Steatose	23
1.4.1.1	Mechanismus der Valproinsäure induzierten Steatose	24
1.4.2	Cholestase	26
1.4.2.1	Mechanismus der Diclofenac induzierten Cholestase	27
1.5	Ziele der Dissertation	29
2	<i>Material und Methoden</i>	31
2.1	Materialien für die LC-MS/MS Analytik	31
2.2	Materialien für die Analyse der Genexpression	33
2.3	Materialien <i>In-vitro</i>-kultivierte Rattenhepatozyten	36
2.4	Substanzen	39
2.5	Software	39
2.6	Rationale zur Auswahl und Dosierung der Wirkstoffe für die tierexperimentellen Studien	40
2.7	Tierexperimentelle Studien	41

2.7.1 Allgemeine Haltungsbedingungen, Tötung der Tiere und Probenentnahme	41
2.7.2 Studiendesign Methapyrilen-induzierte Hepatotoxizität	43
2.7.3 Studiendesign zur Nahrungskarenz und Geschlechterspezifität	44
2.8 Klinische Chemie	45
2.8.1 Fotometrisches Messsystem COBAS 6000 c501	45
2.8.2 Alaninaminotransferase.....	46
2.8.2.1 Bestimmungsverfahren	46
2.8.2.2 Durchführung.....	47
2.8.3 Aspartat-Aminotransferase.....	48
2.8.3.1 Bestimmungsverfahren	48
2.8.3.2 Durchführung.....	49
2.8.4 Alkalische Phosphatase	50
2.8.4.1 Bestimmungsverfahren	50
2.8.4.2 Durchführung.....	51
2.8.5 Gamma-Glutamyltransferase	52
2.8.5.1 Bestimmungsverfahren	52
2.8.5.2 Durchführung.....	53
2.8.6 Glutamat-Dehydrogenase	54
2.8.6.1 Bestimmungsverfahren	54
2.8.6.2 Durchführung.....	54
2.8.7 Bilirubin.....	56
2.8.7.1 Bestimmungsverfahren	56
2.8.7.2 Durchführung.....	56
2.8.8 Cholesterin	58
2.8.8.1 Bestimmungsverfahren	58
2.8.8.2 Durchführung.....	59
2.8.9 Triglyzeride	60
2.8.9.1 Bestimmungsverfahren	60
2.8.9.2 Durchführung.....	60
2.9 Histopathologie	62
2.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	63
2.9.1.1 Prinzip der Hämatoxylin-Färbung.....	63
2.9.1.2 Durchführung der Hämatoxylin-Färbung.....	63
2.9.2 Lipidnachweis mit Oelrot O	65
2.9.2.1 Prinzip der Oelrot O-Färbung.....	65
2.9.2.2 Durchführung der Oelrot O-Färbung.....	66
2.10 Instrumentelle Analytik	68

Inhaltsverzeichnis

2.10.1 Allgemeine Beschreibung zur Gallensäure-Quantifizierung	68
2.10.2 Chromatographie und Konfiguration des Massenspektrometers	69
2.10.3 Kalibrierung mit Standardlösungen und internem Standard	72
2.10.4 Analytische Qualitätssicherung	73
2.10.5 Probenaufarbeitung und Vorbereitung für die UHPLC-MS/MS.....	74
2.10.5.1 Plasma.....	74
2.10.5.2 Lebergewebe.....	75
2.10.5.3 Zellkulturmedium	75
2.10.6 Experimentelle Vorbereitung UHPLC-MS/MS Analyse.....	75
2.10.7 Probenvorbereitung der Matrixvalidierung für Gallensäuren	76
2.11 Quantifizierung von RNA mittels QuantiGene® <i>Multiplex Assay</i>.....	78
2.11.1 Herangehensweise und Auswahl der Gene.....	78
2.11.2 Allgemeines Funktionsprinzip eines <i>Multiplex Assays</i>	78
2.11.3 Vorbereitung der Leberhomogenate zur Extraktion der RNA	80
2.11.4 Hybridisierungsreaktion spezifischer RNA	81
2.11.5 Signalamplifikation spezifischer RNA.....	81
2.11.6 Visualisierung der MultiPlex Daten	82
2.12 Analyse der Genexpression mittels Affymetrix Microarrays.....	83
2.12.1 Herangehensweise und Auswahl der Gene.....	83
2.12.2 Durchführung der Analyse der Genexpression im Lebergewebe	83
2.12.3 Statistische Auswertung der Genexpression	85
2.13 Hepatozyten-Kultivierung zwischen zwei Kollagenmatrices.....	86
2.13.1 Experimentelles Design des Gallensäure-Profilings	89
2.14 Statistische Auswertung.....	90
3 Ergebnisse & Diskussion.....	92
3.1 Rationale für die Wirkstoffauswahl der tierexperimentellen Studien	92
3.1.1 Hintergrundinformationen zur Substanzauswahl von Amitriptylin.....	96
3.1.2 Hintergrundinformationen zur Substanzauswahl von Diclofenac.....	97
3.1.3 Hintergrundinformationen zur Substanzauswahl von Flutamid.....	98
3.1.4 Hintergrundinformationen zur Substanzauswahl von Methapyrilen.....	99
3.1.5 Hintergrundinformationen zur Substanzauswahl von Methotrexat	100
3.1.6 Hintergrundinformationen zur Substanzauswahl von Valproinsäure	101
3.2 Methodvalidierung der quantitativen Analytik von Gallensäuren.....	102
3.2.1 Validierungsparameter der quantitativen Analyse von individuellen Gallensäuren	102
3.2.1.1 Kalibrierung	102

Inhaltsverzeichnis

3.2.1.2 Bestimmungsgrenze.....	104
3.2.1.3 Selektivität	105
3.2.1.4 Stabilität des internen Standards	106
3.2.1.5 Richtigkeit.....	108
3.2.1.6 Wiederholpräzision	109
3.2.2 Analyse individueller Gallensäuren im Plasma von Ratten.....	110
3.2.2.1 Richtigkeit.....	110
3.2.2.2 Wiederholpräzision.....	112
3.2.3 Analyse individueller Gallensäuren im Leberhomogenat von Ratten	112
3.2.3.1 Richtigkeit.....	112
3.2.3.2 Wiederholpräzision	114
3.2.4 Validierungsparameter individueller Gallensäuren im Zellkulturmedium	115
3.2.4.1 Richtigkeit & Präzision.....	115
3.2.5 Diskussion	116
3.3 Studien zur Gallensäure-Homöostase in Ratten	118
3.3.1 Variabilität der Konzentrationen von Gallensäuren in unbehandelten Ratten	118
3.3.1.1 Einfluss des Geschlechts und des Ernährungsstatus auf die Gallensäure- Plasmakonzentrationen	118
3.3.1.2 Einfluss des Vehikels auf die Plasmakonzentrationen von Gallensäure	120
3.3.1.3 Referenzwerte von Gallensäure-Konzentrationen im Plasma von Ratten.....	124
3.3.2 Diskussion	125
3.4 Einfluss von Methapyriolen auf das Gallensäure-Profil in Ratten	128
3.4.1 Histopathologie.....	128
3.4.2 Klinische Chemie.....	131
3.4.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber.....	132
3.4.4 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma	133
3.4.5 Untersuchung der Genexpression des Gallensäure-Metabolismus im Lebergewebe.....	134
3.4.6 Diskussion	136
3.5 Einfluss von Valproinsäure auf das Gallensäure-Profil in Ratten.....	138
3.5.1 Histopathologie.....	138
3.5.2 Klinische Chemie.....	139
3.5.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber von Ratten	141
3.5.4 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma von Ratten.....	144
3.5.5 Untersuchung der Genexpression des Gallensäure-Metabolismus im Lebergewebe.....	147
3.5.6 Diskussion	150
3.6 Einfluss von Amitriptylin auf das Gallensäure-Profil in Ratten.....	154
3.6.1 Histopathologie.....	154

3.6.2 Klinische Chemie.....	156
3.6.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber.....	157
3.6.4 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma.....	160
3.6.5 Untersuchung der Genexpression des Gallensäure-Metabolismus im Lebergewebe.....	163
3.6.6 Diskussion.....	166
3.7 Einfluss von Diclofenac auf das Gallensäure-Profil in Ratten.....	170
3.7.1 Histopathologie.....	170
3.7.2 Klinische Chemie.....	172
3.7.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber.....	174
3.7.4 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma.....	176
3.7.5 Untersuchung der Genexpression des Gallensäure-Metabolismus im Lebergewebe.....	179
3.7.6 Diskussion.....	182
3.8 Einfluss von Flutamid auf das Gallensäure-Profil in Ratten.....	186
3.8.1 Histopathologie.....	186
3.8.2 Klinische Chemie.....	188
3.8.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber.....	189
3.8.4 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma.....	190
3.8.5 Untersuchung der Genexpression des Gallensäure-Metabolismus im Lebergewebe.....	192
3.8.6 Diskussion.....	196
3.9 Einfluss von Methotrexat auf das Gallensäure-Profil in Ratten.....	199
3.9.1 Histopathologie.....	199
3.9.2 Klinische Chemie.....	200
3.9.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber.....	200
3.9.4 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma.....	201
3.9.5 Untersuchung der Genexpression des Gallensäure-Metabolismus im Lebergewebe.....	202
3.9.6 Diskussion.....	205
3.10 Korrelation zwischen verschiedenen Arten der Leberschädigung und unterschiedlichen Gallensäure-Profilen im Plasma von Ratten.....	207
3.11 Gallensäure-Profiling im Supernatant von <i>In-vitro</i>-kultivierten Rattenhepatozyten.....	210
3.11.1 Gallensäureprofil im Zellkulturmedium des <i>In-vitro</i> -Assays.....	210
3.11.2 Evaluierung der metabolischen Kompetenz kultivierter Rattenhepatozyten nach Zugabe von primären Gallensäuren.....	211
3.11.3 Behandlung der Hepatozyten mit Troglitazon.....	213
3.11.4 Übertragbarkeit von veränderten Gallensäureprofilen im Rattenplasma auf ein <i>In-vitro</i> -Testsystem von kultivierten Rattenhepatozyten.....	215

3.11.5 Diskussion	217
4 Abschließende Diskussion	220
5 Schlussfolgerung	228
6 Abbildungsverzeichnis.....	I
7 Tabellenverzeichnis.....	V
8 Literaturverzeichnis.....	XI
9 Anhang	XI
9.1 Methodenvalidierung der quantitativen Analytik von Gallensäuren.....	XI
9.1.1 Bestimmungsgrenze.....	XII
9.1.2 Kalibrierung	XII
9.1.3 Spezifität.....	XIII
9.1.4 Stabilität des internen Standards	XIII
9.1.5 Richtigkeit.....	XIII
9.1.6 Wiederholpräzision	XIV
9.2 Referenzwerte von Gallensäure-Konzentrationen in Plasma von Ratten.....	XV
9.3 Daten Valproinsäure.....	XVI
9.3.1 Klinische Chemie.....	XVI
9.3.2 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber von Ratten	XVII
9.3.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma von Ratten.....	XVIII
9.3.4 Mechanistische Untersuchung des veränderten Gallensäureprofils durch Transkriptionsanalysen im Lebergewebe.....	XXI
9.4 Daten Amitriptylin	XXII
9.4.1 Klinische Chemie.....	XXII
9.4.2 Multivariate Datenanalyse von Gallensäuren im Lebergewebe weiblicher Ratten	XXIII
9.4.3 Gallensäure-Konzentrationen im Plasma männlicher Ratten	XXIV
9.4.4 Gallensäure-Konzentrationen weiblicher Ratten im Plasma	XXV
9.4.5 Mechanistische Untersuchung des veränderten Gallensäureprofils durch Transkriptionsanalysen im Lebergewebe.....	XXVI
9.5 Daten Diclofenac	XXVII
9.5.1 Gallensäure-Konzentrationen weiblicher Ratten Leber	XXVII
9.5.2 Gallensäure-Konzentrationen männlicher Ratten im Plasma	XXIX
9.5.3 Gallensäure-Konzentrationen weiblicher Ratten im Plasma.....	XXX

Inhaltsverzeichnis

9.5.4 Mechanistische Untersuchung des veränderten Gallensäureprofils durch Transkriptionsanalysen im Lebergewebe	XXXI
9.6 Daten Flutamid	XXXII
9.6.1 Klinische Chemie	XXXII
9.6.2 Gallensäuren im Lebergewebe	XXXIV
9.6.3 Gallensäuren im Plasma	XXXVI
9.7 Daten Methotrexat	XLI
9.7.1 Klinische Chemie	XLI
9.7.2 Gallensäuren im Lebergewebe	XLIII
9.7.3 Gallensäuren im Plasma	XLV
9.8 Daten <i>In vitro</i> Profiling von Gallensäuren	L
9.8.1 Translationale Studie Methapyrilen	L

Abkürzungsverzeichnis

ABCD3	<i>ATP-binding cassette, sub-family D, member 3</i>
ABCG5	<i>ATP-binding cassette, sub-family G, member 5</i>
ABCG8	<i>ATP-binding cassette, sub-family G, member 8</i>
ACOT8	<i>Acyl-CoA Thioesterase 8</i>
ACOX2	<i>Acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain</i>
ALAT	<i>Alanin-Aminotransferase</i>
AMACR	<i>Alpha-methylacyl-CoA-Racemase</i>
APh	<i>alkalische Phosphatase</i>
ASAT	<i>Aspartat-Aminotransferase</i>
ASBT	<i>Apical sodium–bile acid transporter</i>
BAAT	<i>Bile acid-CoA: amino acid N-acyltransferase</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>Apoptosis-Suppressing Oncoprotein</i>
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
BSEP	<i>Bile Salt Export Pump</i>
CA	<i>Cholsäure</i>
Std	<i>Kalibrierstandard</i>
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>
CDCA	<i>Chenodesoxycholsäure</i>
CoA	<i>Coenzym-A-Ester</i>
CsA	<i>Cyclosporin A</i>
CYP27A1	<i>Cytochrom P450, family 27, sub-family a, polypeptide 1</i>
CYP7A1	<i>Cytochrom P450, family 7, sub-family a, polypeptide 1</i>
CYP7b1	<i>Cytochrom P450, family 7, sub-family b, polypeptide 1</i>
CYP8B1	<i>Cytochrom P450, family 8, sub-family b, polypeptide 1</i>
DCA	<i>Deoxycholsäure</i>
DILI	<i>Drug induced liver injury</i>
FXR	<i>Farnesoid-X-Rezeptor</i>
GCA	<i>Glycocholsäure</i>
GCDCA	<i>Glycochenodeoxycholsäure</i>
GC-MS	<i>Gaschromatographie-Massenspektrometrie</i>
GDCA	<i>Glycodeoxycholsäure</i>
γGT	<i>Gamma-Glutamyltransferase</i>
GLCA	<i>Glycolithocholsäure</i>
GLDH	<i>Glutamat-Dehydrogenase</i>
GUDCA	<i>Glycoursodeoxycholsäure</i>
HDCA	<i>Hyodeoxycholsäure</i>
HED	<i>Human equivalent dose</i>
HNF4 α	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha</i>
LCA	<i>Lithocholsäure</i>
LC-MS	<i>Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie</i>
LC-MS/MS	<i>Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie</i>
LXR	<i>Liver X receptor</i>

Abkürzungsverzeichnis

MCA(a)	<i>Muricholsäure-alpha</i>
MCA(b)	<i>Muricholsäure-beta</i>
MCA(o)	<i>Muricholsäure-omega</i>
MDR1a	<i>Multidrug-Resistance-Protein 1a</i>
MDR1b	<i>Multidrug-Resistance-Protein 1b</i>
MDR2/3	<i>Multidrug-Resistance-Protein 2/3</i>
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MRP2	<i>Multidrug Resistance-Related Protein 2</i>
MRP3	<i>Multidrug Resistance-Related Protein 3</i>
MRP4	<i>Multidrug Resistance-Related Protein 4</i>
MW	<i>Aritmetisches Mittel</i>
NTCP	<i>Sodium/taurocholate cotransporting polypeptide</i>
OATP1	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide 1</i>
OATP2	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide 2</i>
OATP4	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide 4</i>
OATPB	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide b</i>
OPLS-DA	<i>orthogonal partial least squares discriminant analysis</i>
OST α	<i>Organic Solute Transporter alpha</i>
OST β	<i>Organic Solute Transporter beta</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
PPAR α	<i>Peroxisome proliferator activated receptor alpha</i>
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>
QC	<i>Qualitätskontrolle</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RT	<i>Retentionszeit</i>
SAPE	<i>Phycoerythrin-gekoppeltem Streptavidin</i>
SCPx	<i>Sterol carrier protein x</i>
SD	<i>Standardabweichung</i>
SHP	<i>Small heterodimer partner</i>
Srebp1c	<i>Sterol regulatory element-binding transcription factor 1</i>
TCA	<i>Taurocholsäure</i>
TCDCA	<i>Taurochenodeoxycholsäure</i>
TDCA	<i>Taurodeoxycholsäure</i>
TLCA	<i>Tauroolithocholsäure</i>
TMCA(a+b)	<i>Tauromuricholsäure-alpha+beta</i>
TUDCA	<i>Tauroursodeoxycholsäure</i>
UDCA	<i>Ursodeoxycholsäure</i>
VPA	<i>Valproinsäure</i>
VPA-CoA	<i>Valproinsäure-Coenzym-A-Ester</i>
WME	<i>Williams Medium E</i>

Zusammenfassung

Die Detektion Arzneimittel-induzierter Leberschädigung (engl. DILI – *Drug induced liver injury*) stellt eine Herausforderung in der präklinischen Entwicklung von Arzneistoffen dar. Die zur Verfügung stehenden konventionellen klinisch-chemischen Marker, wie Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Alkalische Phosphatase (APh), zeigen z. B. bei minimaler bis leichter Leberpathologie keine Veränderungen im Serum an und besitzen somit nur eine geringe Sensitivität für den frühzeitigen Nachweis einer Lebertoxizität. Des Weiteren besitzen klinisch-chemische Serummarker gleichzeitig eine geringe Spezifität und sind somit für die Differenzierung unterschiedlicher Lebertoxizitäten nur limitiert geeignet. Neben den beschriebenen diagnostischen Herausforderungen können u. a. auch histopathologische Befunde in der Leber, ohne eine Veränderung der klinisch-chemischen Serummarker auftreten und umgekehrt. Die Histopathologie ist als Goldstandard zwar spezifisch, als invasive Technik für eine Verlaufskontrolle in toxikologischen und klinischen Studien aber ungeeignet. In den vergangenen Jahren lieferten Studien zum Gallensäure-*Profiling* mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) mit Modellsubstanzen, die unterschiedliche Formen einer Lebertoxizität in Ratten induzierten Hinweise, dass individuelle Gallensäuren ein diagnostisches Potential für die Bewertung einer Leberschädigung besitzen. Ziel dieser Arbeit ist es, dass Gallensäure-*Profiling* in die vorgeschriebene Diagnostik der Lebertoxizität in der präklinischen Arzneimittelentwicklung zu implementieren und zu bewerten, ob diese Marker einen wertvollen Beitrag zur Charakterisierung einer Lebertoxizität leisten können.

Hierzu wurde eine quantitative LC-MS/MS-Methode etabliert und validiert, die es ermöglicht, 20 verschiedene endogene Gallensäuren in Ratten zu analysieren. Die quantitative Analytik ermöglichte eine selektive Bestimmung von primären, konjugierten und sekundären Gallensäuren. Für die Quantifizierung der individuellen Gallensäuren wurden 2 MRM-Übergänge bestimmt. Zur Bestimmung des Arbeitsbereiches wurden 20 Referenzstandards von Gallensäuren verwendet. Eine Kalibrierung mit sieben Kalibrierpunkten in aufsteigender Konzentration wurde für die Bestimmung der endogenen Konzentrationen genutzt. Zur Kompensation des Matrixeffektes wurden 10 isotopenmarkierte interne Standards in die Analytik eingefügt. Die Reproduzierbarkeit laufender Messungen wurde durch eingefügte Qualitätskontrollen (QCs) in drei verschiedenen Konzentrationsbereichen überwacht.

Es wurde ein Gallensäure-*Profiling* mittels LC-MS/MS im Plasma und Lebergewebe von Ratten, die mit verschiedenen Arzneimitteln behandelt wurden, durchgeführt. Histopathologische

Untersuchungen konnten aufzeigen, dass sich in den Lebern von männlichen Ratten, die mit dem Arzneimittel Amitriptylin über 14 Tage behandelt wurden, eine makrovesikuläre Steatose in der Leber manifestierte. Die klassischen Serummarker, wie ALAT, ASAT und Gamma-Glutamyltransferase (γ GT), konnten diese Art des Leberschadens nicht detektieren. Dagegen erhöhten sich die Konzentrationen Glycin-konjugierter Gallensäuren mit parallel absinkenden Konzentrationen von Taurin-konjugierten Gallensäuren im Lebergewebe behandelter Ratten. Gleichzeitig ergaben sich signifikant erhöhte Konzentrationen der primären Gallensäuren CA und CDCA im Plasma behandelter Ratten.

Andere Gallensäure-Profile konnten nach einer Methapyrilen-induzierten Leberzellnekrose mit hepatobiliärer Schädigung beobachtet werden. Nach einer 14-tägigen Behandlungsphase mit 80 mg/kg KG Methapyrilen, erhöhten sich die Konzentrationen von 11 Gallensäuren im Lebergewebe behandelter Tiere. Gleichzeitig stiegen die Konzentrationen von allen 20 individuellen Gallensäuren im Plasma behandelter Ratten an.

Zusätzlich zur quantitativen Analyse von Gallensäuren mittels LC-MS/MS wurde die Expression von Genen der Gallensäure-Biosynthese, des Gallensäure-Transports und die Regulation der Gallensäure-Homöostase mittels Multiplex-Analyse untersucht. Die erhöhte Expression von Genen für Efflux-Transporter der *Multidrug Resistance-Related Protein* (MRP)-Familie deutet auf einen gesteigerten Abtransport von Gallensäuren ins Blut hin und korrespondierte mit erhöhten Gallensäure-Konzentrationen im Plasma der behandelten Ratten.

Des Weiteren wurden die Erkenntnisse der Gallensäure-Profile aus den tierexperimentellen Studien als Grundlage genutzt, um Arzneimittel-induzierte Lebertoxizität auf ein zellbiologisches *In-vitro*-System zu übertragen. Es wurden *In-vitro*-Experimente mit primären Rattenhepatozyten zwischen zwei Kollagenmatrices (*Sandwich*-Kultivierung) durchgeführt. Dieses etablierte System wird u. a. für Untersuchungen an hepatobiliären Transportsystemen (z. B. *Bile Salt Export Pump*, BSEP) genutzt. Das Gallensäure-*Profiling* in den Zellkulturüberständen belegt, dass die primären Hepatozyten konjugierte Gallensäuren bilden, dass sie bei einer Inkubation mit primären Gallensäuren diese verstoffwechseln und dadurch, neben den bereits vorhandenen Gallensäuren, weitere konjugierte Gallensäuren produzieren. Eine Exposition mit den Hepatotoxinen Troglitazon und Methapyrilen führte zu Veränderungen in der Gallensäure-Homöostase der Hepatozyten.

In den *In-vivo*-Experimenten wurde eine Methapyrilen-induzierte Nekrose mit hepatobiliärer Schädigung in den behandelten Ratten festgestellt. Bei der Behandlung mit Methapyrilen ergaben sich starke Konzentrationsanstiege der Gallensäuren im Plasma (u. a. von GCA und TCA), die mit den histopathologischen Befunden korrelierten. Anhand dieser Daten und der

Zusammenfassung

pharmakokinetischen Eigenschaften von Methapyrilen wurde ein Studiendesign für Rattenhepatozyten in *Sandwich*-Kulturen entwickelt, um eine initiale Abschätzung der Konzentrationsveränderungen von Gallensäuren im *In-vitro*-Testsystem durchzuführen. Ab Tag 8 der Behandlung kam es zu einem erhöhten Anstieg der GCA- und TCA-Konzentrationen im Zellkulturmedium. Daher besitzt das *In-vitro*-Testsystem möglicherweise das Potential, tierexperimentelle Studien bei der Bewertung einer Hepatotoxizität zu unterstützen oder sogar zu reduzieren.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse aus dieser Arbeit, dass Gallensäure-*Profiling* in männlichen und weiblichen Ratten eine geeignete Methode zur Detektion und Differenzierung von Leberschäden ist. Die Technologie ist flexibel einsetzbar und kann bereits etablierte Testverfahren, wie die Bestimmung von Serummarkern in der Klinischen Chemie und die Histopathologie unterstützen. Damit besitzt das Gallensäure-*Profiling* das Potential, die Bewertung beim Nachweis und bei der Charakterisierung einer Lebertoxizität im Rahmen der Evaluierung von präklinischen Arzneimittelkandidaten zu verbessern.

Summary

Drug-induced liver injury (DILI) remains a significant challenge in preclinical drug development. Nonclinical studies provide an opportunity to correlate the biochemical and morphological findings; however, liver injury is often complex and heterogeneous, confounding the ability to relate biochemical changes to specific, histopathological patterns of liver injury. The diagnostic performance of the available hepatobiliary markers, such as alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT) or alkaline phosphatase (APh), for specific manifestations of liver injury, is often limited and insensitive, e.g. minimal to slight liver pathology might not result in changes to the serum marker. Furthermore, histopathological findings in the liver can occur without there being significant changes in the serum markers and vice versa. Although histopathology is the gold standard, its invasive nature makes it unsuitable for monitoring liver injury in toxicological and non-clinical studies. In recent years, study results of bile acid profiling, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), indicated diagnostic potential regarding the detection of hepatotoxicity. This work aims to establish bile acid profiling in preclinical drug development and to demonstrate that bile acids can provide a valuable contribution to characterizing liver injury in preclinical safety diagnostics.

For this purpose, a quantitative LC-MS/MS method was established and validated, in order to analyze 20 different endogenous bile acids in rats. The quantitative analysis enabled the selective determination of primary, conjugated and secondary bile acids. 2 MRM-transitions for qualitative and quantitative analysis were used for the quantification of the individual bile acids. Twenty bile acid reference standards were used for the calibration range. A seven-point calibration, in ascending concentration, was performed to quantify the absolute endogenous bile acid concentrations. Ten isotopically labeled internal standards were employed in the analyses to compensate for matrix effects. The reproducibility of the current measurements was monitored by quality controls (QCs) inserted into three different concentration ranges. Bile acid profiling was performed by LC-MS/MS of plasma and liver tissue of rats that had been treated with different hepatotoxins.

The results of the bile acid profiling and histopathological evaluation revealed correlation between bile acid profiles and histopathological graded liver toxicity, e.g., the quantitative analysis and histopathological examination showed that macrovesicular steatosis was induced in the livers of male rats which had been treated with amitriptyline for 14 days. Classic serum markers, such as ALAT, ASAT, and gamma-glutamyltransferase (γ GT), were unable to detect this specific manifestation of liver injury. In contrast, the concentrations of glycine-conjugated bile acids

increased while there was a parallel decrease in the levels of taurine-conjugated bile acids in the treated rats' liver tissue. At the same time, there was a significant increase in the concentration of primary bile acids, CA and CDCA, in plasma of treated rats. Different bile acid profiles were observed following methapyrilene-induced liver cell necrosis with hepatobiliary damage. After a 14-day treatment phase with 80 mg/kg body weight methapyrilene, the concentrations of 11 bile acids increased in liver tissue of treated animals. At the same time, the levels of all 20 individual bile acids increased in plasma of treated rats. In addition to the quantitative analysis of bile acids with LC-MS/MS, the expression of specific genes associated with bile acid biosynthesis, and the transport and regulation of bile acid homeostasis, was analyzed using multiplex analysis of targeted mRNA. The increased expression of efflux transporter genes belonging to the multidrug resistance-related protein (MRP) family, indicated an increase in the efflux transport of bile acids into blood, and corresponded to increased bile acid concentrations in the plasma of treated rats. Furthermore, bile acid profiles originated from the animal studies, were used as reference to evaluate bile acid profiles regarding liver toxicity on a liver cell-based biological system. In vitro experiments were performed using primary rat hepatocytes between two collagen matrices (sandwich cultivation). This traditional in vitro model is used to study of hepatobiliary transport alterations (e.g., Bile Salt Export Pump, BSEP). Bile acid profiling of the cell culture supernatants demonstrated that the primary hepatocytes produced conjugated bile acids. Incubation with primary bile acids resulted in an improvement of the in vitro system by producing conjugated bile acids, in addition to those already existed. Exposure to troglitazone and methapyrilene resulted in changes in the hepatocytes' bile acid homeostasis.

In the in vivo experiments, methapyrilene treatment induced necrosis and hepatobiliary damage in the treated rats. There was a substantial increase in the concentration of plasma bile acids in the methapyrilene treatment group (including GCA and TCA), which correlated with the histopathological findings. Based on these data and the pharmacokinetic properties of methapyrilene, a study design was developed that used rat hepatocytes in sandwich cultures to provide an initial estimate of bile acid concentration changes in the in vitro test system. There was an increase in GCA and TCA concentrations in the cell culture medium from day 8 of the methapyrilene treatment. Therefore, the in vitro test system may have the potential to support or even reduce animal studies for evaluating hepatotoxicity.

Bile acid profiling in male and female rats is a suitable method for detecting and differentiating liver injury. The technology can be used flexibly and can support already established test procedures, such as the determination of serum markers in clinical chemistry and histopathology.

Thus, bile acid profiling has the potential to fill the gap in the detection and characterization of hepatotoxicity, as part of the evaluation of preclinical drug candidates.

1 Einleitung

1.1 Arzneimittelentwicklung

Die Wirkstoffentwicklung in der pharmazeutischen Industrie ist ein langer, kostenintensiver und in mehrere Phasen gegliederter Prozess (Faqi, 2017), der die Identifizierung und Synthese einer geeigneten Verbindung, die präklinische Effektivität und die klinische Phase umfasst. In der klinischen Phase wird die Effektivität des Wirkstoffkandidaten erstmals an humanen Probanden und für die angestrebte Indikation getestet (Abbildung 1) (EUPATI, 2015b). Vor dieser letzten Phase werden in der präklinischen Entwicklung die pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften des Wirkstoffes mittels *In-vitro*-Modellsystemen und *In vivo* Untersuchungen an verschiedenen Tierspezies analysiert (Reno, 2010). Die daraus resultierenden Erkenntnisse müssen auf den Menschen übertragbar sein und die sichere Erstanwendung beim Menschen gewährleisten (Blass, 2015). Die dazu notwendige, detaillierte toxikologische Charakterisierung neuer Wirkstoffkandidaten wird durch internationale Richtlinien geregelt und ist gesetzlich vorgeschrieben (Shenoy, 2016).

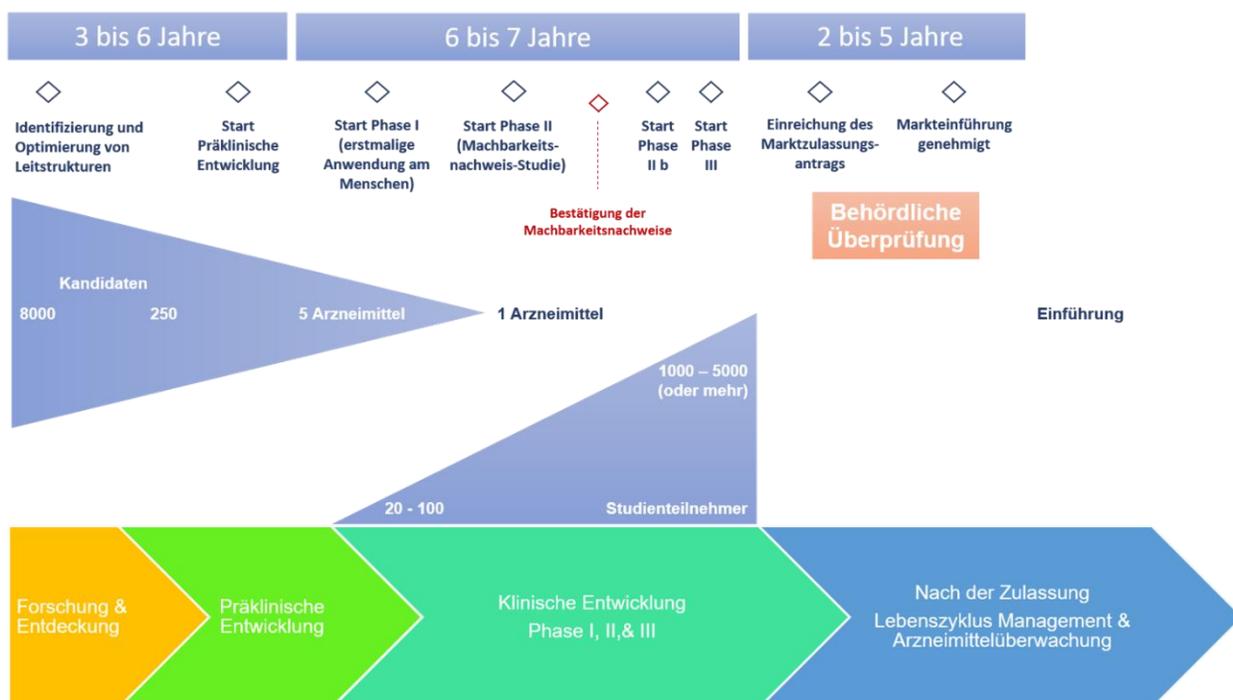


Abbildung 1 Überblick über den Arzneimittelentwicklungsprozess (angelehnt an (EUPATI, 2015b).

1.2 Präklinische Arzneimittelentwicklung

Nach der Identifizierung eines potentiellen Wirkstoffes erfolgt in der präklinischen Prüfung die pharmakologische und toxikologische Charakterisierung des Entwicklungskandidaten, um eine sichere Erstanwendung am Menschen zu ermöglichen (Holt *et al.*, 2014). Die Anforderungen an die Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit eines Arzneimittels, die ein Pharmaunternehmen für dessen Zulassung vorlegen muss, sind im Wesentlichen in den – in weiten Teilen Europas einheitlichen – Arzneimittelprüfrichtlinien festgelegt (europäische Prüfrichtlinie im Anhang zum Kodex für Humanarzneimittel, Richtlinie 2001/83/EG) (Brodniewicz *et al.*, 2010; EU, 2001).

Im pharmakologischen Prüfprogramm werden biochemische und physiologische Effekte des Wirkstoffs auf den Organismus (Pharmakodynamik) getestet (Pacey *et al.*, 2011). Ein Entwicklungskandidat kann auf zwei Arten auf den Körper wirken: Die primäre Pharmakodynamik erfasst die für die angestrebte therapeutische Verwendung maßgeblichen Effekte, die sekundäre Pharmakodynamik allgemeine inklusive mögliche unerwünschte pharmakodynamische Wirkungen des Stoffes (Duncan *et al.*, 2010; Tuntland *et al.*, 2014). Die Sicherheitspharmakologie beschreibt die Auswirkungen eines Wirkstoffs auf wichtige physiologische Funktionen. Unverzichtbar sind hierbei Studien und ggf. *Follow-up*-Studien zu folgenden vitalen Organsystemen (*Core Battery*): Herz-Kreislauf-System (u. a. Verlängerung des QT-Intervalls am Herzen), Atemwege, Zentralnervensystem (Pugsley *et al.*, 2008).

Pharmako- und toxikodynamische Studien sind von zentraler Bedeutung für die Beurteilung der Sicherheit eines Arzneistoffes. Dabei werden die unerwünschten Wirkungen des Arzneistoffes und der Dosisbereich für die erwünschte Wirkung analysiert. Daneben untersuchen pharmakokinetische Studien, die mit der Abkürzung ADME bezeichneten Merkmale (L Steinmetz *et al.*, 2009; Pacey, *et al.*, 2011):

- **Absorption:** Wie gelangt der Arzneistoff in den Körper?
- **Distribution:** Wohin wird der Arzneistoff im Körper verteilt?
- **Metabolismus:** Wie verändert der Körper den Arzneistoff chemisch (Stoffwechsel)?
- **Elimination:** Wie scheidet der Körper den Arzneistoff aus?

Daten aus pharmakokinetischen Studien geben Aufschluss darüber, was mit einem Arzneistoff im Körper innerhalb eines Zeitraums passiert. Mit diesen Daten werden mathematische Modelle erstellt, die die Wanderung des Arzneimittels und seiner Abbauprodukte durch den Körper erklären und vorhersagen können. Dadurch lässt sich das Verhältnis zwischen positiven und toxischen Wirkungen des Arzneimittels bestimmen und die Sicherheit und Verträglichkeit des Arzneimittels für den Menschen vorhersagen. Diese Daten sind für die Dosierungen in klinischen Studien unverzichtbar (Bernd *et al.*, 2002; Gallo, 2010).

Neben den pharmakologischen Prüfungen werden parallel auch toxikologische Wirkungen des Arzneimittelkandidaten untersucht. Dabei werden in jüngster Zeit auf der Basis der chemischen Struktur des Moleküls computerbasierte Studien (*in silico*) für die Vorhersage des toxikologischen Profils unter Verwendung von datenbankbasierten Ansätzen durchgeführt (Cases *et al.*, 2014). Die Datenbanken basieren auf qualitativ hochwertigen Ergebnissen, deren Quelle bereits abgelaufene behördlich-regulatorisch vorgeschriebene *In vivo* Studien in der Arzneimittelentwicklung sind (Andrade *et al.*, 2016; Cases, *et al.*, 2014). Ein weiteres Hilfsmittel für die Risikoabschätzung ist die Durchführung von Versuchen in einer kontrollierten Umgebung außerhalb eines lebenden Organismus (*In vitro*). Zur Charakterisierung der Aktivität des Kandidaten im *In-vitro*-System werden u. a. isolierte Zellkulturen verschiedener Organe, wie Hepatozyten (Leber) oder Kardiozyten (Herz) verwendet. Zellkultur-Systeme bieten die Möglichkeit, die durch den Wirkstoff ausgelösten Effekte z. B. auf die Zellvitalität, die Zellproliferation, die Genexpression und auf Transportwege (z. B. durch direkte Inhibition eines Transporters) zu identifizieren (Andrade, *et al.*, 2016; Draheim *et al.*, 2010; Heise *et al.*, 2012). Ein weiteres vorgeschriebenes Verfahren ist der Ames-Test, der die Mutagenität eines Wirkstoffes analysiert (McCarren *et al.*, 2011). Experimente am lebenden Organismus (*In vivo*) erlauben eine umfangreiche toxikologische Charakterisierung. Dazu zählt die Identifizierung der maximal tolerierbaren Dosis (MTD) anhand vorgeschriebener Studienmodelle, die eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ermöglichen (Denayer *et al.*, 2014; Friese *et al.*, 2006; van Meer *et al.*, 2015).

Die Ziele der präklinischen Untersuchungen sind der Nachweis der Wirksamkeit des Wirkstoffkandidaten, die Evaluation seines Sicherheitsprofils und die Abschätzung von Auswirkungen, die am Menschen nicht erforscht werden können. Zu den letzteren zählen Effekte auf Schwangere durch reproduktionstoxikologische Untersuchungen (Stanard *et al.*, 2015). Präklinische Daten sind primär für die frühen Abschnitte innerhalb des Prozesses der Entwicklung eines Wirkstoffkandidaten von Bedeutung (Abbildung 2). Bevor ein Arzneistoff durch die Marktzulassung für Patienten zur Verfügung steht, wurden die präklinischen Daten zur Sicherheit und Wirksamkeit durch die Daten aus klinischen Studien am Menschen ergänzt (EUPATI, 2015a).

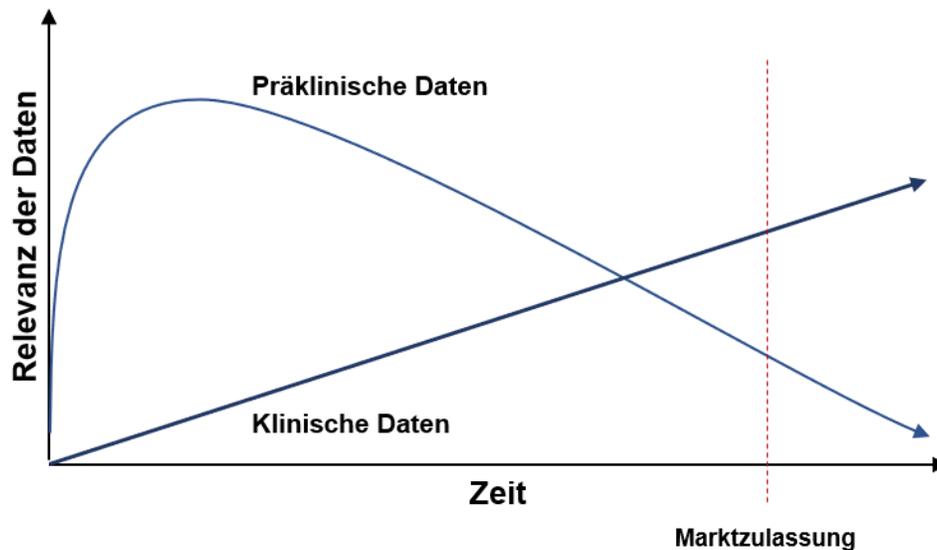


Abbildung 2 Relevanz präklinischer Studien in der Arzneimittelentwicklung (angelehnt an (EUPATI, 2015a).

Nach der erfolgreich absolvierten präklinischen Phase geht der Entwicklungskandidat in die erste klinische Phase (Phase I) über. Ab diesem Zeitpunkt erhöhen sich die Anzahl, die Kosten, sowie die Komplexität der Aktivitäten im Rahmen des Arzneimittel-Entwicklungsprozesses. Eine erste explorative Studie (*First in Human* – FIH) an gesunden Probanden ermöglicht es Ärzten und Wissenschaftlern festzustellen, ob das Arzneimittel für Menschen sicher ist. Diese Studie analysiert auch, ob sich das Arzneimittel beim Menschen in seinen pharmakokinetischen Eigenschaften genauso verhält wie in den verwendeten Tiermodellen. Darüber hinaus liefert sie Informationen über die Tolerierung und die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik des Wirkstoffes. Phase I Studien zielen auch darauf ab, etwaige Nebenwirkungen des Arzneimittels zu identifizieren (Al-Shurbaji, 2010; Curry *et al.*, 2010; EUPATI, 2015b).

Nach dem erfolgreichen Abschluss der Phase I folgen die therapeutische Versuchsphase (Phase II), in der durch eine *Proof of Concept*-(PoC) -Studie die Wirksamkeit ermittelt wird, sowie die therapeutische Bestätigung (Phase III) und die Pharmakovigilanz (Phase IV), in der das bereits zugelassene Arzneimittel weiterhin überwacht wird (EUPATI, 2015c). Der dargestellte Prozess hat zum Ziel, einen sicheren und spezifischen Wirkstoff für ein bestimmtes Krankheitsbild zu ermitteln. Trotz der ausführlichen Sicherheitsüberprüfung während der Entwicklungsphase kommt es immer wieder zu schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen, die zum Abbruch der Wirkstoffentwicklung oder zum Rückruf eines bereits vermarkteten Arzneimittels führen können. Ein nicht ausreichendes Sicherheitsprofil kann in den verschiedenen Phasen der Arzneimittelentwicklung zu Wirkstoff-induzierten Organschäden führen. Die am häufigsten

auftretenden Toxizitäten betreffen das Herz und die Leber. Von 1994–2006 waren 45 % aller Marktrücknahmen von Arzneimitteln wegen kardiotoxischer Wirkungen (z. B. kardiale Ischämie, arhythmogene Effekte). Die Arzneimittel-induzierte Lebertoxizität ist eine der häufigsten Ursachen für ein akutes Leberversagen in den USA und Europa. Marktanalysen in Frankreich und Island belegen, dass die Inzidenz der Arzneimittel-induzierten Lebertoxizität jährlich zwischen 14 und 19 pro 100.000 Einwohner liegt. Bei 12 von 76 Arzneimitteln, die zwischen 1969 und 2002 vom Markt genommen wurden, war eine Hepatotoxizität der Grund (Fontana *et al.*, 2014; Kullak-Ublick *et al.*, 2017; Lee, 2013). Hierfür fehlen aktuell Screening-Methoden zum besseren Verständnis der Mechanismen (Guengerich, 2011; Mohs *et al.*, 2017; Varga *et al.*, 2015).

1.2.1 Entwicklungsabbruch durch Arzneimittel-induzierte Lebertoxizität

Eine Arzneimittel-induzierte Lebertoxizität gehört zu den häufigsten unerwünschten Wirkungen während der Entwicklungsphase von Arzneimittelkandidaten, aber auch von bereits zugelassenen Medikamenten (Dambach, 2014). Angesichts ihrer zentralen Rolle bei der Biotransformation und Ausscheidung von Xenobiotika stellt die Leber eines der Hauptzielorgane für Arzneimittelreaktionen dar (Ballet, 1997; Lin *et al.*, 2012). Durch Biotransformation werden hydrophobe Substanzen in den Hepatozyten in polare, hydrophile Metaboliten umgewandelt, die ausgeschieden werden können (Detoxifikation). Durch Biotransformation können aber auch reaktive Metabolite entstehen, die u. a. in den Hepatozyten beispielweise Transportproteine angreifen oder über eine kovalente Bindung an Cytochrom-P450-Enzyme deren Funktion im Stoffwechsel inhibieren können (Meyer, 1996). Bei der Leberschädigung werden mit der intrinsischen und idiosynkratischen Hepatotoxizität zwei Grundformen unterschieden. Bei der intrinsischen Aktivität handelt es sich um Leberschäden mit einer klaren Dosis-Wirkungsbeziehung. Diese Form der Lebertoxizität wird in präklinischen toxikologischen Studien detektiert und kann heutzutage zum Abbruch der Arzneistoffentwicklung führen. Ein klassisches Beispiel für einen Arzneistoff mit intrinsischer Hepatotoxizität ist Paracetamol. Das Analgetikum führt in hoher Dosierung zu massiven Leberschädigungen. Paracetamol wird in der Leber durch Cytochrom-P450-Enzyme zu N-Acetyl-p-benzochinonimin verstoffwechselt. Dieser reaktive Metabolit kann, nach Erschöpfung der Glutathionspeicher mit Proteinen der Leberzellen reagieren und zu einer komplexen Beeinträchtigung der ATP-, Ca²⁺- und Thiol-Homöostase führen (Vohr, 2010). Wirkstoffe mit idiosynkratischer Hepatotoxizität (Abbildung 3) sind in den USA für 10–15 % aller Fälle von akutem Leberversagen verantwortlich. Aufgrund der fehlenden

Kenntnisse über die komplexen biologischen Wirkmechanismen kann die Lebertoxizität der Substanzen nicht eindeutig vorhergesagt werden. Idiosynkratische Reaktionen können bereits bei therapeutischer Dosierung auftreten (Kullak-Ublick, et al., 2017; Roth *et al.*, 2010). Ein frühzeitiger Nachweis von Arzneimittel-induzierter Lebertoxizität ist somit eine wichtige Funktion im Entwicklungsprozess von Arzneimitteln, um ungeeignete Arzneimittelkandidaten frühzeitig selektieren zu können (Mohs, et al., 2017).

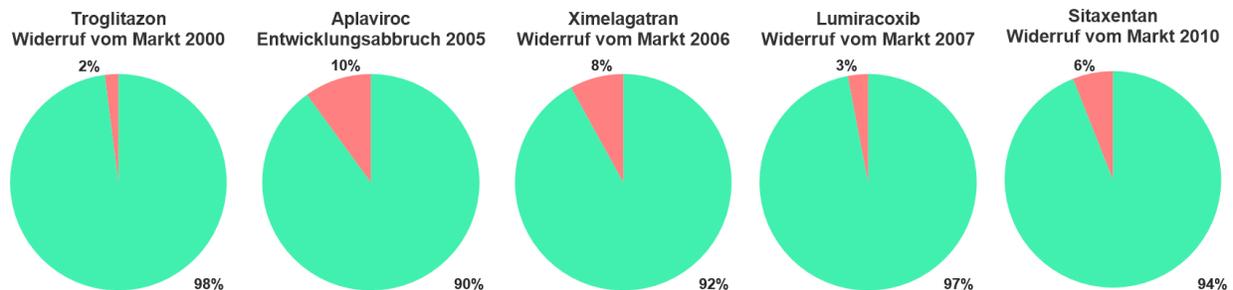


Abbildung 3 Arzneimittelkandidaten mit idiosynkratischer Arzneimittel-induzierter Lebertoxizität. Die Scheibendiagramme zeigen die Anteile der Patienten mit Leberschäden nach Einnahme von Arzneimittelkandidaten, deren Entwicklung eingestellt wurde oder die nach Zulassung vom Markt genommen wurden. Blau: Anteil der Patienten mit normalen Lebertestwerten, Rot: Anteil der Patienten mit Wirkstoff-verbundenen Leberenzym erhöhungen (angelehnt an (Kullak-Ublick, et al., 2017).

1.2.2 Sicherheitsbewertung der Hepatotoxizität in präklinischen Studien

Aktuell wird Arzneimittel-induzierte Lebertoxizität über *In-vitro*-Testsysteme und im Rahmen tierexperimenteller Studien *in vivo* bestimmt. Die Bewertung der *In-vivo*-Studien basiert auf makro-pathologischen, histopathologischen und klinisch-pathologischen Untersuchungen.

1.2.2.1 Makro-pathologie und Histopathologie der Hepatotoxizität

Am Ende einer tierexperimentellen Studie wird die Leber im Zuge der Sektion zunächst auf makroskopisch sichtbare Veränderungen untersucht und gewogen. Unterscheiden sich die Lebergewichte von Tieren, die mit einem Wirkstoff behandelt wurden, von denen der Kontrolltiere, kann dies ein erster Hinweis auf eine substanzinduzierte Reaktion der Leber sein. Die endgültige Diagnose wird durch histopathologische Untersuchungen ermittelt (Vohr, 2010). Ebenfalls werden festgestellte makroskopische Veränderungen der Leber histopathologisch genauer untersucht. Die Charakterisierung der histopathologischen Veränderungen zielt darauf ab, unerwünschte Wirkungen auf die Leber, die mit der Behandlung mit dem Arzneimittelkandidaten direkt in Verbindung stehen, zu identifizieren (Abdi, 2017) und von physiologischen Anpassungsreaktionen der Leber abzugrenzen.

Das Repertoire morphologischer Veränderungen und Anpassungsreaktionen der Leber ist begrenzt, sodass unterschiedliche Wirkstoffe auf verschiedenen pathogenetischen Wegen zu gleichartigen morphologischen Ausprägungen führen können (Dancygier, 2013).

Angesichts der zentralen Rolle der Leber bei der Biotransformation und Ausscheidung von Xenobiotika sind Leberzellen ständigen schädigenden Einflüssen ausgesetzt. Die Leberzellen reagieren auf diese dynamischen Prozesse durch biochemische Anpassungsvorgänge, um ihre Struktur und Funktion zu erhalten. Der Erfolg oder Misserfolg dieser Adaption entscheidet darüber, ob eine Noxe zur einer Lebertoxizität führen wird oder nicht. Hierbei ist es durchaus möglich, dass die Anfangsphase einer erfolgreichen Adaption mit einer Funktionssteigerung verbunden ist. Erst wenn die Leberzelle nicht mehr imstande ist, eine adäquate Homöostase aufrechtzuerhalten, entwickelt sich ein hepatozellulärer Schaden. Das Ausmaß der Zellschädigung hängt u. a. vom Differenzierungsgrad und Anpassungsvermögen, sowie von der Art der Noxe, ihrer Intensität und der Dauer ihrer Einwirkung ab. Die Reaktionsformen der Leber können sich in Änderungen des Wachstums, der Organellenalteration und in Zellablagerungen manifestieren (Dancygier, 2013).

Zu den Änderungen des Wachstums und der Differenzierung in der Leber gehört u. a. die Hypertrophie. Diese Reaktionsform wird bei einer funktionell erhöhten Mehrbeanspruchung des Leberparenchyms beobachtet. Unter dem metabolischen Druck bestimmter Medikamente, Toxine oder Viren kommt es zur Induktion der Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums oder zur Vermehrung der Mitochondrien. Die Biosynthese metabolischer Enzyme wie z. B. der Cytochrom-P450-Enzyme wird gesteigert (Dancygier, 2013; Maronpot, 2014).

Weitere Anpassungsreaktionen der Leber sind z. B. intrazelluläre Einschlüsse und Ablagerungen von Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten, Metallen und Pigmenten. Eine degenerative hepatozelluläre Veränderung ist u. a. der Zelltod. Der Zelltod tritt entweder als programmiertes, physiologisches Ereignis im Rahmen der Organhomöostase auf (Apoptose), oder er ist die Folge eines traumatischen, pathologischen Ereignisses (Nekrose). Apoptose wird von der Leberzelle selbst gesteuert, kann aber auch durch Fremdstoffe ausgelöst werden, während bei einer Nekrose die Leberzellen, z. B. durch ein Toxin oder einen Wirkstoff absterben. Bei der Apoptose bleibt die Plasmamembran intakt. Der apoptotische Zelltod resultiert in einer Fragmentierung des Zellkerns und der Leberzelle mit der Bildung membranbegrenzter Zellbruchstücke, die zunächst noch strukturell intakte, lebensfähige Organellen enthalten. Das strukturelle Merkmal der Nekrose ist der Verlust der Integrität der Plasmamembran mit Freisetzung des Zellinhalts in den Extrazellulärraum, der zu einer entzündlichen Reaktion führt (Dancygier, 2013; Thoolen *et al.*, 2010b).

Die Adaption durch intrazelluläre Einschlüsse und Ablagerungen umfasst Vorgänge, mit denen sich die Leberzelle unterschiedlichen Erfordernissen anpasst. Die intrazelluläre Akkumulation von endogenen Substanzen oder Xenobiotika kann ein Ausdruck von Adaptionsmechanismen, aber auch von metabolischen Störungen sein. Die Speicherung selbst kann harmlos sein oder zur Schädigung der Leberzelle beitragen (Dancygier, 2013). Im Folgenden wird die Adaption durch die Ablagerung von Lipiden im Leberparenchym näher erläutert.

Die vermehrte Ablagerung intrazellulärer Triglyzeride ist eine der häufigsten pathologischen Veränderung der Leber. Einer Leberverfettung liegt nahezu immer eine vermehrte Ablagerung von Triglyzeriden zugrunde und ist Ausdruck einer Lipidstoffwechselstörung. Eine Steatose entsteht, wenn bei den Hepatozyten mehr Triglyzeride ankommen bzw. hergestellt werden als abgeführt bzw. abgebaut werden. Die Ursachen einer Steatose sind daher vielfältig. Eine überschüssige Zufuhr exogener Triglyzeride (Adipositas), von Toxinen wie Alkohol und hypoxische Ursachen mit einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Fettsäuren- β -Oxidation sind häufige Gründe für eine Steatose. In Paraffin-eingebettetem Lebergewebe erscheinen die Fettablagerungen als optisch leere Vakuolen. Im Gefrierschnitt können die Triglyzeride mit Spezialfärbungen wie Öl-Rot angefärbt werden. Je nach Größe der Fettvakuolen wird eine makrovesikuläre von einer mikrovesikulären Steatose unterschieden. Bei der großtropfigen Verfettung kann der Fetttropfen das gesamte Zytoplasma einnehmen und den Kern an den Rand des Hepatozyten drängen, bei der kleintropfigen Steatose füllen zahlreiche kleine und kleinste Fettvakuolen das Zytoplasma aus. Während es sich bei der rein makrovesikulären Verfettung wahrscheinlich in erster Linie um ein Speicherphänomen handelt, scheint die mikrovesikuläre Verfettung Ausdruck eines stärkeren Zellschadens mit einer Beeinträchtigung der mitochondrialen β -Oxidation zu sein (Amacher *et al.*, 2014; Dancygier, 2013; Vohr, 2010).

Neben den erläuterten hepatozellulären Schädigungen können auch hepatobiliäre Schäden im Leberparenchym entstehen. Hierzu zählt das Symptom der Cholestase, das extra- und/oder intrahepatische Ursachen haben kann. Im Weiteren wird die intrahepatische Cholestase näher erläutert. Bei einer intrahepatischen Cholestase handelt es sich um eine Störung der Gallenbildung oder des Gallentransports (Gallestau) in der Leber. Pathogenetische Aspekte der intrahepatischen Cholestase sind z. B. ein Einfluss von Xenobiotika, die Änderung der Membranfluidität am kanalikulären Pol des Hepatozyten, Veränderungen der membranösen Transportsysteme, eine beeinträchtigte Funktion von Zellorganellen, oder ein gestörter Gallensäurestoffwechsel (Dancygier, 2013). Dabei wird Bilirubin (Gallenpigment) mikroskopisch im Leberschnitt sichtbar, die Bilirubintropfen sind als grünliche oder rötlich-grüne Gebilde in den Canaliculi zwischen den Hepatozyten erkennbar (Bubendorf *et al.*, 2011; Greaves, 2012). Die

aufgeführten zytotoxischen Schädigungen des Leberparenchyms können als einzelne, aber auch als gemischte Befunde bei der histopathologischen Evaluation auftreten (David *et al.*, 2010; Kleiner *et al.*, 2014). Ursache für einen akut zytotoxischen Leberschaden sind vorherrschende Mechanismen wie die Lipidperoxidation, die kovalente Modifikation von Proteinen sowie die Inhibierung der Proteinbiosynthese (Vohr, 2010).

1.2.2.2 Klinische Pathologie von Hepatotoxizität

Zusätzlich zu den histopathologischen Daten werden klinisch-chemische Parameter im Serum behandelter Tiere bestimmt. Bei diesen Parametern handelt es sich meist um Enzyme und Substrate, die unter Normbedingungen entweder in der Leber lokalisiert sind, oder von der Leber produziert werden und deren physiologische Konzentration in unbehandelten Tieren bekannt ist. Konzentrationsveränderungen dieser Parameter in behandelten Tieren lassen demnach einen Rückschluss auf die Integrität und Funktion der Leber zu und können zur Bewertung einer substanz-induzierten hepatozellulären / hepatobiliären Toxizität herangezogen werden.

So gibt der Serumalbuminwert beispielsweise Aufschluss über die Proteinsyntheseleistung der Leber und deren Funktion. Albumin ist ein von der Leber produziertes Protein, welches in großen Mengen im Blut vorkommt und dort vielfältige Funktionen hat wie u. a. den Transport wasserunlöslicher Substanzen im Blut und die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks des Blutserums. Kommt es aufgrund einer Leberschädigung zur Beeinträchtigung der Syntheseleistung des Organs, wird weniger Albumin von der Leber produziert, was sich anhand einer Senkung des Serumalbumingehaltes nachweisen lässt (Thapa *et al.*, 2007).

Hepatozelluläre Schäden, die mit einem Integritätsverlust der Zellmembran in der Leber einhergehen, sind vor allem durch erhöhte Aktivität der Alanin-Aminotransferase (ALAT) im Serum gekennzeichnet. Die ALAT kommt hauptsächlich im Zytosol der Hepatozyten vor und ist damit ein spezifisches Enzym für die Diagnose einer Leberzellschädigung, wenn es in erhöhten Konzentrationen im Serum zu finden ist (Alves-Bezerra *et al.*, 2017; Arguello *et al.*, 2015; Aulbach *et al.*, 2017; den Boer *et al.*, 1987; Gad, 2014). Der Anstieg der Aktivität im Serum ist dabei darauf zurückzuführen, dass durch einen hepatozellulären Schaden die Durchlässigkeit der Hepatozytenmembran ansteigt, so dass zelluläre Enzyme in extrazelluläre Kompartimente freigesetzt werden.

Die Aspartat-Aminotransferase (ASAT) wird auch zur Bewertung einer Leberzellschädigung genutzt, allerdings ist die ASAT nicht nur in den Mitochondrien und im Zytosol der Leber lokalisiert, sondern auch im Herz- und in den Skelettmuskeln zu finden. Erhöhte Aktivitäten der

ASAT im Serum weisen demnach nicht ausschließlich auf einen Leberzellschaden hin (Hallbach, 2006). Daher wird die Aktivität der ASAT im Serum in der Diagnostik eines Leberschadens generell zusammen mit der Aktivität der ALAT interpretiert. Ein paralleler Anstieg beider Parameter deutet auf eine Leberzellschädigung hin.

Die Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) ist ein mitochondriales Enzym in der Leber. Diagnostische Bedeutung besitzt die GLDH für die Beurteilung der Schwere und des Ausmaßes einer akuten Leberzellnekrose und zur Differentialdiagnose des Ikterus (Heilmeyer *et al.*, 2013).

Die Gamma-Glutamyltransferase (γ GT) befindet sich gebunden an die Zellmembranen in größeren Mengen in der Leber, dort vor allem in den Zellen der Gallengänge, sie ist aber auch im proximalen Tubulus der Niere und in den Mucosazellen des Dünndarms vorhanden. Da die gemessene Aktivität der γ GT im Serum zum größten Teil aus der Leber stammt, wird die γ GT als leberspezifisches Leitenzym verwendet. Erhöhte γ GT-Aktivitäten im Serum findet man u. a. bei medikamenten-induzierten Leberschäden, Ikterus, akuter Virushepatitis oder toxisch-nutritiven Leberschäden durch Alkohol (Hallbach, 2011).

Der klinisch-enzymatische Parameter der alkalischen Phosphatase (APh) wird in Verbindung mit anderen Serummarkern zur Diagnose einer Cholestase herangezogen. Die APh ist ein membranständiges Enzym mit vielen gewebsspezifischen Isoformen, das nicht nur in der Leber und den Gallengängen lokalisiert ist, sondern auch in anderen Organen wie z. B. den Knochen vorkommt. Im Vergleich zur ALAT oder γ GT ist eine Erhöhung der APh-Aktivität im Serum damit nicht so ein spezifischer Marker für einen Leberschaden, weil die APh u. a. auch von Osteoblasten während der Knochensynthese freigesetzt wird (Siegenthaler *et al.*, 2005).

Neben den beschriebenen Enzymen gibt es weitere endogene Substanzen, wie z. B. Cholesterin und Bilirubin, die für eine Bewertung der Lebertoxizität genutzt werden. Cholesterin ist wegen seiner Struktur-stabilisierenden Funktion ein wichtiger Bestandteil aller biologischen Membranen. Außerdem stellt das Cholesterin eine Vorstufe in der Biosynthese zahlreicher Steroidhormone, des Vitamin D und der Gallensäuren dar. Die Leber erhält Cholesterin aus der Nahrung, der endogenen Synthese und aus Lipoproteinen im Plasma wie z. B. HDL (*high density lipoprotein*), das Cholesterin aus der Peripherie (z. B. beim Zellmembranabbau) zur Leber transportiert. Das wasserunlösliche Cholesterin wird in der Leber durch Gallensäuren in Lösung gehalten. Kommt es zu einer Verminderung der enterohepatischen Zirkulation oder einer beeinträchtigten Produktion von Gallensäuren, kann es zur Kristallisation von Cholesterin und damit zur Bildung von Konkrementen (Gallensteinen) kommen (Abdolvahab-Emminger *et al.*, 2005).

Bilirubin ist ein Abbauprodukt des Hämoglobins. Es wird von der Leber aus dem Blut aufgenommen und intrahepatisch mit Glucuronsäure konjugiert. Die konjugierte Form ist im

Vergleich zur unkonjugierten Form wasserlöslich und kann über das hepatobiliäre System und den Darm ausgeschieden werden. Eine Erhöhung des Bilirubin-Wertes im Serum kann aus einem beeinträchtigten Bilirubinstoffwechsel in der Leber resultieren. So kann eine eingeschränkte hepatische Konjugation des Bilirubins oder eine gehemmte Sekretion des konjugierten Bilirubins in das hepatobiliäre System zu einer Veränderung der Serumkonzentrationen führen. Erhöhte Bilirubin-Konzentrationen können aber auch durch hepatozelluläre Nekrosen oder eine intrahepatische Cholestase, d. h. die Störung der kanalikulären Gallensekretion sowie durch eine intrahepatische Obstruktion der Gallengänge, ausgelöst werden (Hallbach, 2011).

Lebertoxizität wird meist durch die zusammenfassende Bewertung mehrerer der beschriebenen Serummarker durchgeführt. Eine hepatobiliäre Leberschädigung (z. B. intrahepatische Cholestase) geht beispielsweise mit erhöhten Aktivitäten der alkalischen Phosphatase (APh) und der Gamma-Glutamyltransferase (γ GT) einher. Gleichzeitig kommt es zu erhöhten Serumkonzentrationen von Cholesterol (CHOL) und Gesamt-Bilirubin. Einlagerungen von Triglyzeriden ins Leberparenchym (Steatose) können über eine erhöhte Aktivität der Gamma-Glutamyltransferase (γ GT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) sowie Konzentrationsanstiegen von Cholesterol (CHOL) und Triglyzeriden (TGZ) im Serum bestimmt werden (Alves-Bezerra, et al., 2017; Arguello, et al., 2015; Aulbach, et al., 2017; den Boer, et al., 1987; Gad, 2014).

1.2.2.3 Schwierigkeiten bei der etablierten präklinischen Diagnostik von Hepatotoxizität

Trotz der etablierten Bestimmung klinisch-chemischer Parameter zur Überwachung von Leberveränderungen bei Tieren und Menschen bleibt die Beziehung zwischen biochemischen und morphologischen Veränderungen bei Leberschäden oft unklar. Beispielsweise zeigt die in der präklinischen oder klinischen Überwachung häufig genutzte ALAT-Aktivität keine Veränderungen bei Patienten mit minimaler bis leichter Leberpathologie. Das Ausmaß der morphologischen Veränderung oder die Schwere und Prognose eines Leberschadens korreliert daher nicht immer mit der ALAT-Aktivität oder mit anderen hepatobiliären Markern. Diskrepanzen zwischen klinisch-chemischen und histopathologischen Befunden der Leber treten auch in präklinischen toxikologischen Studien auf. Möglich sind Veränderungen der Plasma- oder Serummarker ohne morphologische Anzeichen einer durch Arzneimittel induzierten Lebertoxizität und umgekehrt. Wichtig bei der Einordnung der Effekte ist auch, dass sich biochemische Veränderungen durch die komplexen Prozesse während einer Lebertoxizität verändern können und sich häufig als multiple histopathologische Befunde und nicht als isolierte Veränderungen im Zielorgan manifestieren (Boone *et al.*, 2005; Ennulat *et al.*, 2010). Aufgrund der limitierten

Sensitivität und Spezifität der klinisch-chemischen Parameter in der präklinischen Sicherheitsbewertung besteht die Notwendigkeit der Evaluierung neuer Methoden zur Verbesserung der Risikoabschätzung des Potentials einer Leberschädigung von Arzneimittelkandidaten (Aubrecht *et al.*, 2013; Schomaker *et al.*, 2013).

1.2.3 Die Evaluierung neuer Methoden in der präklinischen Diagnostik der Hepatotoxizität

Durch die technologische Entwicklung in den vergangenen Jahrzehnten stehen neuartige Methoden zur Verfügung, die für die Vorhersage einer arzneimittel-induzierten Lebertoxizität in der präklinischen Sicherheitsbewertung genutzt werden können. Die Basis dieser Untersuchungen bilden dabei die „Omics“-Technologien zur Analyse von Transkripten, Proteinen oder Metaboliten, die in Verbindung mit den etablierten präklinischen Biomarkern eingesetzt werden können, um die Diagnostik zu verfeinern.

Das Transkriptom beschreibt die Gesamtheit der aus der DNA in RNA umgeschriebenen Erbinformationen einer Zelle zu einem spezifischen Zeitpunkt. Der Vorgang, in dem RNA nach dem Vorbild der DNA synthetisiert wird, nennt man Transkription. Transkription ist der erste Schritt der Genexpression, d. h. der Biosynthese von Proteinen anhand der genetischen Information. Nach der Transkription folgt die Translation, bei der nach einer Vorlage der RNA eine Aminosäuresequenz gebildet wird. Durch Faltung der Aminosäurekette entsteht ein Protein, das in der Regel noch posttranslational modifiziert wird, um die vorgesehene Funktion zu erwerben. Genexpressionsprofile von Organismen können anhand von Technologien wie Microarrays und die RNA-Sequenzierung auf der Ebene des Transkriptoms untersucht werden. Die Analyse des Transkriptoms ermöglicht die Feststellung einer veränderten Genexpression in verschiedenen Geweben, die beispielsweise durch die Exposition mit Arzneimittelwirkstoffen hervorgerufen wurde. Damit kann das Transkriptom genutzt werden, um den Mechanismus einer arzneimittel-basierten Toxizität besser zu charakterisieren. Die betroffenen Gene, für die eine Abweichung im Expressionsmuster festgestellt wird, können über Informationen aus Datenbanken annotiert und kategorisiert werden (Kohonen *et al.*, 2017; Lowe *et al.*, 2017).

Analog zum Transkriptom beschreibt das Proteom die Summe aller Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Lebewesens zu einem bestimmten Zeitpunkt. Das Proteom ist komplex, dynamisch und unterliegt ständigen Veränderungen in der Konzentration und Zusammensetzung der einzelnen Proteine. Die Analyse des Proteoms ermöglicht u. a. die quantitative und qualitative Analyse der Genexpression auf der Protein-Ebene und die Erforschung von Protein-Protein

Interaktionen sowie der Wirkstoff-Protein Affinität. Ein möglicher Ansatz zur Analyse von Proteinveränderungen in einer Zelle oder einem komplexen Organismus ist die globale Analyse von Proteinen und ihren Proteinvarianten nach posttranslationaler Modifikation (engl. *global protein profiling*). Dabei werden zumeist LC-MS/MS-basierte Methoden eingesetzt, um die Konzentrationen von Proteinen in behandelten Proben im Vergleich zu Kontrollproben zu bestimmen. Dieser technologische Ansatz ermöglicht mittlerweile eine Identifizierung von bis zu 10000 Proteinen in einer Zelllinie. Dadurch können beispielsweise Informationen zur Regulierung von Proteinen, die an bestimmten zellulären Prozessen nach einer Arzneimittelbehandlung beteiligt sind, gewonnen werden (Amacher, 2010; Schirle *et al.*, 2012).

Die Analyse des Metaboloms umfasst die Bestimmung niedermolekularer Verbindungen im Stoffwechsel eines biologischen Systems z. B. von Zellen, Geweben, Urin oder Plasma mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie oder der NMR-Spektroskopie. Dabei werden die Konzentrationen von endogenen Molekülen wie Aminosäuren, Lipiden oder Steroiden gemessen. Durch die quantitative und qualitative Analyse der endogenen Moleküle können beispielsweise mechanistische Erkenntnisse für das Auftreten eines Leberschadens gewonnen werden (Weckwerth *et al.*, 2005). Die Massenspektrometrie ermöglicht eine simultane Quantifizierung von mehreren tausend niedermolekularen Verbindungen (globales Profil) in biologischen Proben. Neben der Analyse eines globalen Profils besteht auch die Möglichkeit, spezifische Metabolite gezielt zu analysieren (gezielte Analyse). Eine sensitive und robuste Technologie zur Analyse des Metaboloms ist die *Ultra-high performance liquid chromatography-Tandemmassenspektrometrie* (UHPLC-MS/MS), die verlässlichen quantitativen Ergebnisse in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich liefert (J Patti *et al.*, 2012). Damit können beispielweise endogene Metabolite wie z. B. Gallensäuren in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten und Gewebeproben bestimmt werden (Griffiths *et al.*, 2010). Die Analyse von primären und konjugierten Gallensäuren mittels LC-MS/MS liefert beispielsweise erste Hinweise für eine Differenzierung zwischen verschiedenen Typen der hepatozellulären und hepatobiliären Toxizität (Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2018; Suter *et al.*, 2011). In den letzten Jahren konnte die Evaluation von quantitativen Gallensäure-Profilen in Serum, Plasma oder Urin von behandelten Ratten erste wertvolle Hinweise zur Detektion und Differenzierung einer Arzneimittel-induzierten Lebertoxizität liefern (Luo *et al.*, 2014b; Yamazaki *et al.*, 2013).

1.3 Gallensäuren

1.3.1 Biogenese von Gallensäuren

Die zu den Steroiden gehörenden Gallensäuren sind Endprodukte des Cholesterin-Stoffwechsels in Hepatozyten. Durch den Abbau des Cholesterins entstehen die beiden wichtigsten Vertreter, die primären Gallensäuren Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA). Der wichtigste Schritt bei der Synthese von Gallensäuren ist die Hydroxylierung des Cholesterins am siebten Kohlenstoffatom (C7) des Steroidringsystems. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Cholesterin-7 α -Hydroxylase (CYP7A1), deren Aktivität durch resorbierte Gallensäuren aus dem Blut der Pfortader bestimmt wird (Abbildung 4). Durch eine weitere Hydroxylierung am zwölften Kohlenstoffatom (C12) des Steroidrings und eine Verkürzung der Seitenkette unter Einführung einer Carboxylgruppe werden die primäre Gallensäure CA gebildet. Das apolare Cholesterinmolekül kann durch neu eingeführte Hydroxylgruppen polarer und damit gleichzeitig hydrophiler werden. Bei der Synthese von CA wird die beschriebene Ringhydroxylierung mit anschließender Verkürzung der Seitenkette beschritten, während bei der Synthese von CDCA die Veränderungen des Rings und der Seitenkette gleichzeitig ablaufen (Dancygier, 2013; Zhang *et al.*, 2016).

Die beiden nur schlecht wasserlöslichen primären Edukte bilden zwei Grundgerüste, die durch die säureamidartige Bindung mit einer der beiden Aminosäuren Glycin oder Taurin polarer und somit nach der Konjugation über einen erweiterten pH- und Konzentrationsbereich besser wasserlöslich sind. Die Amidierung konjugierter Gallensäuren wird durch die Enzyme Gallensäure-CoA-Synthase (BACS) und Gallensäure-CoA:Aminosäure-N-Acyltransferase (BAAT) katalysiert (Abbildung 4 und Abbildung 5). Die aus den primären Gallensäuren CA und CDCA synthetisierten Taurin- oder Glycin-Konjugate sind Glycocholsäure (GCA), Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA), Taurocholsäure (TCA) und Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA) (Maria J Monte, 2009; Soma *et al.*, 2012). Im endoplasmatischen Retikulum findet die 7 α -Hydroxylierung des Steroidringsystems statt, die 12 α -Hydroxylierung und die Verkürzung der Seitenkette in den Mitochondrien und die Konjugation mit den Aminosäuren Glycin oder Taurin im Zytoplasma des Hepatozyten (Dancygier, 2013).

Des Weiteren können Gallensäuren durch die Mikroflora des Darms modifiziert werden, wodurch sekundäre Gallensäuren entstehen. Gallensäuren werden zunächst im Darm dekonjugiert und anschließend am C7 des Steroidringsystems dehydroxyliert. Durch diesen Prozess entsteht aus der primären CA die dihydroxylierte Deoxycholsäure (DCA) und aus CDCA die monohydroxylierte Lithocholsäure (LCA). Erfolgt danach bei CDCA eine Oxidation am C7 des Steroidringsystems,

entsteht die sekundäre 7-Keto-Lithocholsäure, welche in weiteren Umbauprozessen zu Ursodeoxycholsäure (UDCA) umgewandelt wird (Abbildung 4) (Dancygier, 2013; Schadt *et al.*, 2016).

Gallensäuren können neben der Konjugation mit Glycin und Taurin auch durch Enzyme wie z. B. die Sulfotransferase (SULT2A1) sulfatiert und durch die UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT2B4/UGT2B7) glukuronidiert werden (Li *et al.*, 2015; Schadt, *et al.*, 2016). Glukuronidierung und Sulfatierung können wenig hydrophile und hydrophobe Gallensäuren, wie z. B. die zytotoxische Gallensäure LCA wasserlöslich und damit nierengängig machen (Entgiftung). Diese Syntheseschritte sind nicht nur auf die Leber begrenzt, sondern auch im Gastrointestinal-Trakt und in der Niere nachgewiesen (Dancygier, 2013).

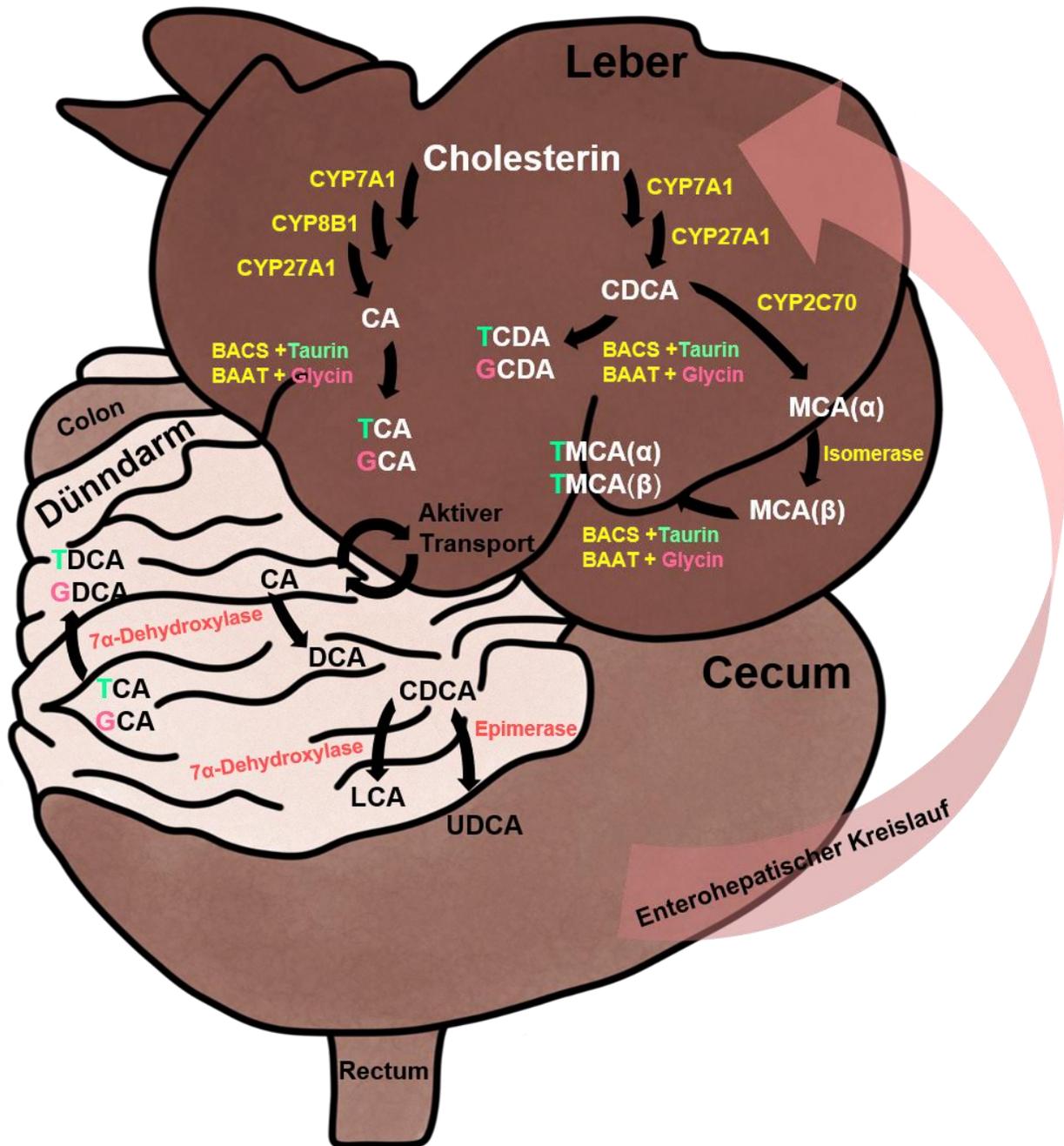


Abbildung 4 Überblick über den Metabolismus von Gallensäuren.

Legende: BACS - Gallensäure-CoA-Synthase, BAAT - Gallensäure-CoA:Aminosäure-N-Acyltransferase, CYP7A1 - Cholesterin-7 α -Hydroxylase, CYP8B1 - Cytochrom P450, family 8, sub-family b, polypeptide 1, CYP2C70 - Cytochrom P450, family 2, sub-family c, polypeptide 70, HDCA – Hyodeoxycholsäure, MCA($\alpha/\beta/\omega$) – Muricholsäure ($\alpha/\beta/\omega$), CYP27A1 - Cytochrom P450, family 27, sub-family a, polypeptide 1, CYP7A1 - Cytochrom P450, family 7, sub-family a, polypeptide 1, CYP7b1 - Cytochrom P450, family 7, sub-family b, polypeptide 1, CYP8B1 - Cytochrom P450, family 8, sub-family b, polypeptide 1, CA – Cholsäure, CDCA – Chenodesoxycholsäure, DCA – Deoxycholsäure, GCA – Glycocholsäure, GCDCA – Glycochenodeoxycholsäure, GDCA – Glycodeoxycholsäure, GLCA – Glycolithocholsäure, GUDCA- Glycoursodeoxycholsäure, HDCA – Hyodeoxycholsäure, LCA – Lithocholsäure, MCA(a) - Muricholsäure-alpha, MCA(b) - Muricholsäure-beta, MCA(o) - Muricholsäure-omega, TCA – Taurocholsäure, TCDCA – Taurochenodeoxycholsäure, TDCA – Taurodeoxycholsäure, TLCA – Tauroolithocholsäure, TMCA(a+b) - Tauromuricholsäure-alpha+beta, TUDCA – Tauroursodeoxycholsäure, UDCA – Ursodeoxycholsäure. In Anlehnung an (Ridlon *et al.*, 2014; Schadt, *et al.*, 2016; Behr, *et al.*, 2018; Chiang *et al.*, 2018).

1.3.2 Physiologische Funktion der Gallensäuren

Gallensäuren übernehmen im Organismus essentielle Funktionen, wie z. B. die Lipid- und Vitaminresorption im Intestinum. CA und CDCA sind gute Mizellbildner und können dadurch die intestinale Resorption fettlöslicher Verbindungen verbessern. UDCA bildet Flüssigkristalle mit Cholesterin, somit wird das wasserunlösliche Cholesterin in Lösung gehalten und kann Cholesteringallensteine auflösen. Gleichzeitig wird mehr als 50 % des hydrophoben Cholesterins über eine Kaskade von enzymatischen Reaktionen in wasserlöslichere Gallensäuren umgewandelt; dadurch wird die Entstehung von Gallensteinen in der Leber verhindert. Ein Mangel an Gallensäuren kann zur Bildung von Gallensteinen, Diarrhö, Vitaminmangelzuständen und Oxalatsteinen in der Niere führen (Dancygier, 2013; Maria J Monte, 2009; Staels *et al.*, 2009).

Aus den Hepatozyten werden Gallensäuren über die kanalikuläre Membran in die Gallengänge transportiert und in der Gallenblase (nicht in der Ratte vorhanden) gespeichert. Von dort aus werden sie nach der Nahrungsaufnahme in den Dünndarm freigesetzt. Als Emulgatoren bilden Gallensäuren zusammen mit biliären Phospholipiden Mizellen und ermöglichen dem aus der Bauchspeicheldrüse stammenden fettspaltenden Enzym Lipase den Abbau von Triglyzeriden in freie Fettsäuren und Monoglyceride (Gareth J Jenkins, 2008). Die freigesetzten Gallensäuren werden im terminalen Ileum zu 90–95 % wieder absorbiert und über die Portalvene zurück zur Leber transportiert. Nach der Extraktion werden sie wieder in der Gallenblase gespeichert (Soma, *et al.*, 2012). Eine strenge Gallensäure-Regulation ist für den Organismus wichtig, da höhere Konzentrationen von Gallensäuren zytotoxisch wirken. Eine zentrale Rolle spielt in diesem Zusammenhang die Lipophilie der individuellen Gallensäuren. Aufgrund dieser Eigenschaft können Gallensäuren mit einer stärker hydrophoben Molekülstruktur, wie DCA, LCA oder CDCA, durch Membranen passiv diffundieren (Schadt, *et al.*, 2016). Strukturanalysen ermöglichen die Klassifikation der Zytotoxizität der Gallensäuren. DCA besitzt das höchste zytotoxische Potential und CA das niedrigste (DCA > LCA > CDCA >> CA) (Schadt, *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2010). Gallensäuren regulieren ihren hepatischen Metabolismus selbst und sind endogene Liganden verschiedener Transkriptionsfaktoren (Abbildung 5) (Alrefai *et al.*, 2007; Schadt, *et al.*, 2016). Der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) gehört zu den wichtigsten Transkriptionsfaktoren der Regulation des Gallensäure-Metabolismus (Abbildung 5). Die hydrophobe Gallensäure CDCA besitzt die höchste Affinität für FXR, gefolgt von LCA und DCA. Stärker hydrophile Gallensäuren, wie UDCA oder Muricholsäure (MCA), können FXR nicht aktivieren. Eine Aktivierung von FXR durch Gallensäuren setzt eine Signalkaskade in Gang, die letztlich die Transkription des *Cytochrom P450, family 7, sub-family a, polypeptide 1*-(CYP7A1)-Gens und somit die Biosynthese von primären Gallensäuren hemmt (Abbildung 5). Des Weiteren werden verschiedene Transporter für

die Aufnahme von Substraten in die Hepatozyten (*Sodium/taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP), *Organic Anion Transporting Polypeptides* (OATP)) sowie für die biliäre/basolaterale Exkretion (*Bile Salt Export Pump* (BSEP), *Multidrug Resistance-Related Protein* (MRP) 2/3/4, *Multidrug-Resistance-Protein* (MDR) 1/2, *Organic Solute Transporter* (OST) α/β) durch FXR reguliert (Abbildung 5) (Geier *et al.*, 2007; Goodwin *et al.*, 2000; Kuipers *et al.*, 2014; Kullak-Ublick, 2003; Landrier *et al.*, 2006; Schadt, *et al.*, 2016). Das relative Potential für die FXR-Aktivierung ist für individuelle Gallensäuren verschieden (CDCA > DCA > LCA). Die Glycin-/Taurin-Konjugate dieser Gallensäuren zeigen in *In-vitro*-Experimenten bei der Co-Expression von Transportsystemen ebenfalls eine Affinität zum FXR (Makishima *et al.*, 1999; Parks *et al.*, 1999). Freie, unkonjugierte Gallensäuren, wie CA, die sekundäre Gallensäure UDCA und muricholierte Gallensäuren (MCA[a/b]), haben nur eine geringe Affinität zu FXR (Makishima, *et al.*, 1999; Parks, *et al.*, 1999).

Gallensäuren können in hohen Konzentrationen durch ihre amphiphilen Moleküleigenschaften die Zellmembranintegrität beeinträchtigen. Aufgrund der hohen Gallensäure-Konzentrationen in der Leber (Gallengängen (Canaliculi biliferi): 20–50 mM) ist das Organ besonders anfällig für deren toxische Wirkung (Hofmann, 1999; Yang *et al.*, 2013).

Gallensäuren sind aufgrund ihrer komplexen hepatischen Biosynthese in verschiedenen Kompartimenten in der Leber, sowie der autonomen Regulation ihres hepatozellulären Metabolismus potentiell interessante endogene Metabolite zur Detektion einer Lebertoxizität.

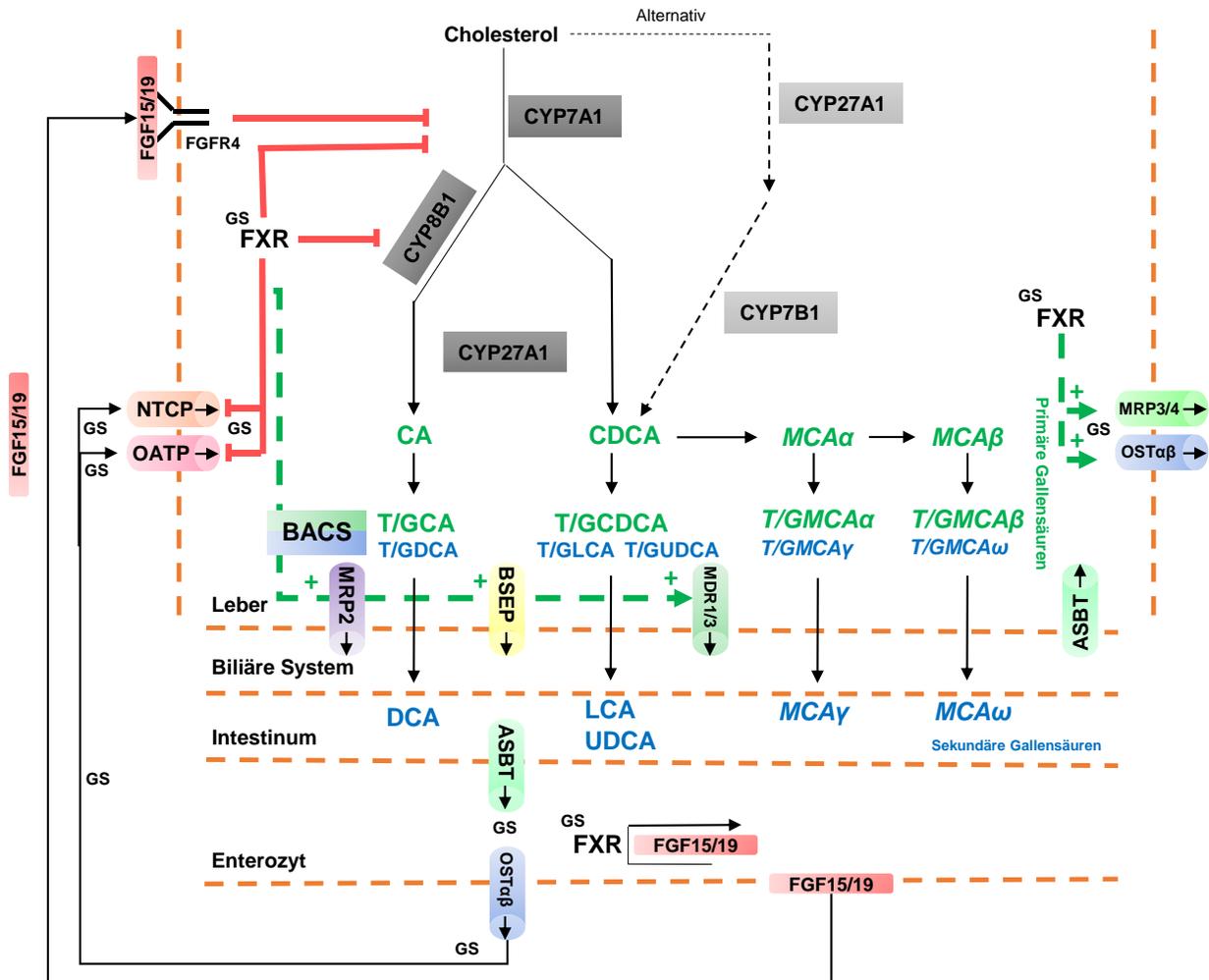


Abbildung 5 Überblick über die hepatische Biosynthese, die Konjugation, den Transport und den enterohepatischen Kreislauf von Gallensäuren.

Nager-spezifische Gallensäuren sind kursiv dargestellt. Legende: ASBT - *Apical sodium-bile acid transporter*, BACS - *bile acid:CoA synthase*, BSEP - *Bile Salt Export Pump*, CYP27A1 - *Cytochrom P450, family 27, sub-family a, polypeptide 1*, CYP7A1 - *Cytochrom P450, family 7, sub-family a, polypeptide 1*, CYP7b1 - *Cytochrom P450, family 7, sub-family b, polypeptide 1*, CYP8B1 - *Cytochrom P450, family 8, sub-family b, polypeptide 1*, FGF - *fibroblast growth factor*, FGFR4 - *fibroblast growth factor receptor 4*, FXR - *Farnesoid-X-Rezeptor*, GS – Gallensäuren, MDR - *Multidrug Resistance-Protein*, MRP - *Multidrug Resistance-Related Protein*, NTCP - *Sodium/taurocholate cotransporting polypeptide*, OATP - *Organic Anion Transporting Polypeptide*, OST - *Organic Solute Transporter*. CA – Cholsäure, CDCA – Chenodesoxycholsäure, DCA – Deoxycholsäure, GCA – Glycocholsäure, GCDCA – Glycochenodeoxycholsäure, GDCA – Glycodeoxycholsäure, GLCA – Glycolithocholsäure, GUDCA – Glycoursodeoxycholsäure, HDCA – Hyodeoxycholsäure, LCA – Lithocholsäure, MCA(a) - Muricholsäure-alpha, MCA(b) - Muricholsäure-beta, MCA(o) - Muricholsäure-omega, TCA – Taurocholsäure, TCDCA – Taurochenodeoxycholsäure, TDCA – Taurodeoxycholsäure, TLCA – Tauroolithocholsäure, TMCA(a+b) - Tauromuricholsäure-alpha+beta, TUDCA – Tauroursodeoxycholsäure, UDCA – Ursodeoxycholsäure. In Anlehnung an (Schadt, et al., 2016).

1.3.3 Gallensäuren als Biomarker für arzneimittel-induzierte Lebertoxizität

Als Summenparameter werden zirkulierende Gallensäuren bereits als klinisch-chemischer Marker zum Nachweis einer Leberschädigung genutzt (Manzotti *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2017). Veränderungen des Summenparameters allein sind jedoch nicht hinreichend aussagekräftig zum Nachweis einer hepatozellulären oder hepatobiliären Schädigung. Durch die Verfügbarkeit neuer analytischer Methoden basierend auf LC-MS/MS und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) können zirkulierende Gallensäuren auch individuell bestimmt und als potentielle Biomarker für eine Lebertoxizität untersucht werden (Aubrecht, *et al.*, 2013).

In ersten Experimenten zur Untersuchung von Gallensäuren als potentielle Biomarker für eine Lebertoxizität wurden signifikante Erhöhungen verschiedener Gallensäuren im Plasma und im Urin von Ratten beobachtet, die mit Hepatotoxinen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen behandelt wurden. Bei Gabe von 1-Naphtylisocyanat erhöhten sich die Aktivitäten von ALAT, ASAT und γ GT in der Leber. Die Veränderung der klinisch-chemischen Serummarker wurde mit einer Cholestase assoziiert. Die klinischen Befunde wurden anhand histologischer Untersuchungen bestätigt, da degenerative Veränderungen des biliären Epithels detektiert wurden. Gleichzeitig stiegen die Konzentrationen von konjugierten Gallensäuren (GCDCA, GCA, TCDCA, TCA) im Plasma der Tiere an. Die primäre Gallensäure CA wurde vermehrt über den Urin ausgeschieden (Yamazaki, *et al.*, 2013).

Auch eine Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) führte im Tierexperiment mit Ratten zu Leberzellnekrosen sowie einer Akkumulation von Lipiden in den Hepatozyten, die durch histologische und klinische Daten nachgewiesen wurden. Der Grund für die Lebertoxizität von CCl_4 begründet sich durch sein Stoffwechselverhalten in der Leber. CCl_4 wird durch den Prozess der oxidativen Dehalogenierung primär durch CYP2E1 in das hochreaktive Trichlormethyl-Radikal ($\cdot\text{CCl}_3$) metabolisiert. Dieses freie Radikal kann kovalent an zelluläre Makromoleküle, wie z. B. Proteine, Enzyme oder ungesättigte Fettsäuren binden und deren Funktion beeinträchtigen. Parallel zu den histopathologischen und klinischen Befunden stiegen im Tierexperiment vor allem die primären Gallensäuren CA und CDCA, aber auch konjugierte (GCA, TCA, TCDCA) und sekundäre (DCA) Gallensäuren signifikant im Plasma an (Coen *et al.*, 2003; Coen *et al.*, 2004; Jinchun *et al.*, 2013).

In einer anderen Studie (Luo, *et al.*, 2014b) zeigten Ratten bei einer einmaligen Behandlung mit Galactosamin (1000 mg/kg KG) nach 24 Stunden histopathologische Anzeichen einer hepatozellulären Nekrose. Die quantitative Analyse von drei Gallensäuren mittels LC-MS/MS bestätigte eine erhöhte Konzentration von CA, GCA und TCA im Serum. In der gleichen Studie verursachte die Behandlung mit einem nicht genau definierten lebertoxischen Wirkstoff in einer

Dosis von 1000 mg/kg KG über einen Zeitraum von 5 Tagen eine Hyperplasie der Gallengänge, die mit einer Erhöhung von GCA und TCA im Serum einherging. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass individuelle Gallensäuren im Serum als diagnostischer Marker genutzt werden können, um verschiedene Formen von Leberschädigungen zu unterscheiden (Luo, et al., 2014b). Auch die funktionelle Hemmung von Gallensäure-Transportern *in vivo* kann die Gallensäure-Zusammensetzung im Kreislauf verändern. Dies wurde in einer Studie mit Ratten, denen für sieben Tage Cyclosporin A (CsA), ein bekannter OATP-Inhibitor, in einer Dosis von 20 mg/kg KG pro Tag per Schlundsonde verabreicht wurde, nachgewiesen. Hierbei wurden signifikante Veränderungen einzelner Gallensäuren im Plasma festgestellt. Die unkonjugierten primären Gallensäuren CA, CDCA und MCA(a/b), die etwa 60 % der Gesamtkonzentration an Gallensäuren im Plasma unbehandelter Ratten (Kontrollgruppe) ausmachten, waren nach der Gabe von CsA signifikant erhöht, während der DCA-Plasmaspiegel durch die Behandlung nicht beeinflusst wurde. Die unkonjugierten sekundären Gallensäuren MCA(o) und UDCA zeigten eine minimal erhöhte Plasmakonzentration in behandelten Ratten. Weder für primäre noch für sekundäre Taurin-konjugierte Gallensäuren konnten signifikante Konzentrationsveränderungen im Plasma von behandelten Ratten detektiert werden. Die Zunahme des Summenwertes aller gemessenen Gallensäuren bei der Behandlung mit CsA um den Faktor drei war hauptsächlich auf die Zunahme der unkonjugierten primären Gallensäuren CA, CDCA und MCA(a) zurückzuführen. Die Hemmung von verschiedenen hepatobiliären Gallensäure-Transportern in den mit CsA behandelten Ratten resultierte in einer Veränderung der Gallensäure-Homöostase. Vergleichend nutzten die Autoren auch *In-vitro*-Ergebnisse von Studien mit CsA, in denen die Folgen einer Inhibition von Gallensäurezufluss- und -effluxtransportern untersucht wurde (Schadt, et al., 2016). Ellinger-Ziegelbauer *et al.* (2011) kombinierten konventionelle Analysen (z. B. Klinische Chemie und Histopathologie) mit Omics-Technologien, um eine frühzeitige Bewertung von arzneimittel-induzierten hepatobiliären Schäden zu verbessern. Hierfür analysierte die Arbeitsgruppe u. a. Serum und Urin von Ratten, die mit verschiedenen Hepatotoxinen behandelt wurden, mittels LC-MS/MS. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Erhöhung der Serumkonzentration von primären und konjugierten Gallensäuren beim Auftreten eines hepatobiliären Schadens. Mit dem Profil der primären und konjugierten Gallensäuren konnte zwischen verschiedenen Arten von hepatobiliären Schädigungen differenziert werden. Ceba *et al.* (2018) konnten nachweisen, dass veränderte Gallensäure-Profile im Serum das Potenzial besitzen, Lebertoxizität basierend auf dem Mechanismus einer BSEP-Inhibition zu identifizieren. Sie bestimmten das Serumprofil von 19 Gallensäuren durch Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS), um Störungen der Gallensäure-

Homöostase bei Ratten nach intravenöser Verabreichung des Vehikels oder von 5, 25 und 50 mg/kg KG Troglitazon nachzuweisen. BSEP ist ein hepatozellulärer Transporter in der kanalikulären Membran, der Gallensäuren ins biliäre Netzwerk der Leber transportiert. Bei einer Hemmung von BSEP ist dieser Efflux unterbrochen und die Gallensäuren akkumulieren sich in den Hepatozyten, was eine Cholestase zur Folge hat (Funk *et al.*, 2001).

Zusammenfassend deuten die Erkenntnisse der bisherigen Studien darauf hin, dass die quantitative Analyse von primären, konjugierten und sekundären Gallensäuren in verschiedenen biologischen Matrices mittels LC-MS/MS wertvolle Daten zur Bestimmung einer arzneistoff-induzierten Lebertoxizität liefern kann. Daher sollte die quantitative Analyse von individuellen Gallensäuren in die präklinische Sicherheitsbewertung miteinbezogen werden, um den Erkenntnisgewinn der Methodik in Verbindung mit den etablierten Verfahren zur Feststellung eines Leberschadens anhand weiterer Substanzen zu untersuchen.

1.4 Arzneimittel-induzierte Lebertoxizität

Die arzneimittel-induzierte Lebertoxizität ist eine häufige Ursache von Leberfunktionsstörungen (Ye *et al.*, 2018). Von 1975–2007 wurden 15 von insgesamt 47 Arzneimitteln (32 %) aufgrund einer Hepatotoxizität vom Markt genommen. Damit ist die Arzneistoff-induzierte Lebertoxizität einer der häufigsten Gründe für die Marktrücknahme bereits zugelassener Arzneimittel (Regev, 2014). Neben den klassischen Arzneimitteln werden zunehmend auch pflanzliche Heilmittel und Nahrungsergänzungsmittel als Ursachen für einen Leberschaden identifiziert (Jain *et al.*, 2010). Die Arzneimitteltoxizität beruht auf unterschiedlichen Mechanismen; dazu zählen unter anderem die Immunhypersensitivität, wie z. B. die allergische Reaktion auf Penicilline oder die Bioaktivierung des Wirkstoffes in einen toxischen und reaktiven Metaboliten, dessen Folge eine kovalente Modifikation von Proteinen, wie z. B. die Inaktivierung von Enzymen, sein kann (Guengerich, 2011). Die Hepatotoxizität wird durch ein breites Spektrum klinischer Befunde charakterisiert, kann aber in zwei Subtypen, intrinsische und idiosynkratische Hepatotoxizität, unterteilt werden (Ye, et al., 2018). Bei der intrinsischen Hepatotoxizität handelt es sich um einen Leberschaden mit einer klaren Dosis-Wirkungsbeziehung. Diese Form der Lebertoxizität wird in präklinischen toxikologischen Studien detektiert und führt zum Abbruch der Arzneistoffentwicklung (Tonder *et al.*, 2013). Die idiosynkratische Hepatotoxizität kann aufgrund der fehlenden Kenntnisse über die komplexen biologischen Wirkmechanismen der Substanzen nicht eindeutig vorhergesagt werden. Idiosynkratische Reaktionen können bereits bei therapeutischer Dosierung auftreten (Kullak-Ublick, et al., 2017; Roth, et al., 2010). Bezüglich der

Art der Lebertoxizität können verschiedene Mechanismen unterschieden werden. Einerseits gibt es akute zytotoxische Leberschäden, die im Fall einer Nekrose durch Zelluntergänge und im Fall einer Steatose durch die Akkumulation von Fett gekennzeichnet sind. Die Cholestase hingegen stellt einen anderen Mechanismus der Lebertoxizität dar, dem ein Rückstau der Galle und ihrer Bestandteile zugrunde liegt. Wird die Cholestase von einer mechanischen Hinderung des Gallenabflusses über die Gallengänge z. B. durch Gallensteine ausgelöst, spricht man von einer extrahepatischen Cholestase, wohingegen die intrahepatische Cholestase auf einen Gallenstau im Leberparenchym charakterisiert ist, z. B. durch hepatozelluläre Karzinome oder Zirrhosen. Einen weiteren Mechanismus stellen vaskuläre Störungen dar, die auf eine Erkrankung der Blutgefäße der Leber zurückzuführen sind und mit einer Beeinträchtigung des Blutflusses in oder aus der Leber einhergehen (Bahr, 2017; Bjornsson *et al.*, 2013; López-Riera *et al.*, 2017).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die arzneimittel-induzierte Steatose und Cholestase gelegt, die in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.

1.4.1 Steatose

Eine arzneimittel-induzierte Steatose ist meist eine chronische, aber reversible Schädigung der Leber, bei der es zu einer Fettakkumulation (Einlagerung von Triglyzeriden) in die Leberzellen kommen kann. Unbehandelt geht eine Steatose in der Regel ohne Beschwerden einher und kann sich zu einer Steatohepatitis entwickeln und im weiteren Verlauf zu einer Fibrose oder Zirrhose bis hin zum Leberversagen (Vohr, 2010). Studien an männlichen Wistar-Ratten konnten aufzeigen, dass eine induzierte Steatose auch die Sensitivität der Leber gegenüber einer Cholestase erhöht. Grund dafür sind erhöhte zirkulierende Konzentrationen von Gallensäuren im Plasma der Tiere mit einer gleichzeitig eintretenden Veränderung der Zusammensetzung individueller Gallensäuren. Hierbei verlagert sich das Konzentrationsgleichgewicht von der hydrophilen Gallensäure TMCA(b) bei einer Steatose mehr zur stärker hydrophoben TCA. Die hydrophobere Gallensäure TCA kann durch erhöhte Konzentrationen zytotoxisch wirken. Gleichzeitig wurde bei einer induzierten Steatose auch eine erhöhte Expression des Gens CYP7A1 festgestellt und eine Veränderung des Transportsystems von Gallensäuren (Lionarons *et al.*, 2016), die durch die Fettakkumulation in der Leber erfolgt entweder in großen (makrovesikulär) oder kleinen (mikrovesikulär) Fetttropfen. Bisher wurden vier Mechanismen der Induktion einer makrovesikulären Steatose beschrieben (Begriffe *et al.*, 2011):

- moderate Beeinträchtigung der mitochondrialen Fettsäureoxidation z. B. durch Valproinsäure, Amiodaron, Ibuprofen
- Verringerung der Sekretion von *Very low density lipoprotein* (VLDL) durch Tetrazykline
- Aktivierung von an der hepatischen Lipogenese beteiligten Transkriptionsfaktoren (z. B. *Sterol regulatory element-binding transcription factor 1* (SREBP-1c), *Peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR γ) und *Pregnane X receptor* (PXR) durch Nifedipin
- Insulinresistenz und Hyperinsulinämie als Folge einer Fettleibigkeit oder Lipoatrophie (d. h. eine Verringerung des Körperfetts) ausgelöst durch Glukokortikoide

Zu den Wirkstoffen, die eine Steatose induzieren können, gehören Amiodaron, Amitriptylin, Valproinsäure (VPA) oder Tamoxifen (Amacher, et al., 2014; López-Riera, et al., 2017; Sahini et al., 2014). Die klinische Pathologie einer Fettleber kann über eine erhöhte Aktivität von Gamma-Glutamyltransferase (γ GT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) sowie Konzentrationsanstiege von Cholesterol (CHOL) und Triglyzeriden (TGZ) im Serum bestimmt werden (Vohr, 2010). Der Goldstandard zum Nachweis hepatischer Einlagerung von Lipiden ist die histopathologische Untersuchung von Lebergewebe. Diese Untersuchungen sind sowohl bei Tieren als auch beim Menschen aufwendig. Aufgrund ihres invasiven Charakters ist kein Verlaufs-Monitoring möglich. In der Regel ist die histopathologische Beurteilung daher auf einen Probenahmezeitpunkt beschränkt (Amacher, 2011).

1.4.1.1 Mechanismus der Valproinsäure induzierten Steatose

Der Prozess der Induktion einer Steatose wird am Beispiel von Valproinsäure (VPA) näher erläutert. VPA wird zur Behandlung von Epilepsie und Krampfanfällen sowie zur Stimmungsstabilisierung bei bipolaren Störungen verwendet (LiverTox, 2015c). Als Analogon zu Fettsäuren mittlerer Kettenlänge kann VPA die Mitochondrienmembran passieren und bildet in der mitochondrialen Matrix einen Coenzym-A-(CoA) -Ester (VPA-CoA), der die Carnitin-Palmitoyltransferase-1 (CPT 1) hemmt (Abbildung 6). Das Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des mitochondrialen Eintritts sowie die β -Oxidation von langkettigen Fettsäuren. Darüber hinaus reduziert die Bildung des VPA-CoA-Esters die mitochondrialen Konzentrationen des für die Fettsäureoxidation obligatorischen Kofaktors CoA (Abbildung 6). Ein zweiter Mechanismus, der eine Rolle bei der VPA-induzierten Inhibition der Fettsäureoxidation spielen könnte, ist die Cytochrom P450 vermittelte Metabolisierung zu 4-en-

Valproinsäure (ein VPA-Metabolit). 4-en-Valproinsäure tritt in das Mitochondrium ein, wo er in 2,4-dien-VPA-CoA umgewandelt wird (Abbildung 6). 2,4-dien-VPA-CoA ist in der Lage, Enzyme der Fettsäureoxidation, wie z. B. Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase oder Ketoacyl-CoA-Thiolase, kovalent zu binden und somit zu inaktivieren. Die Umwandlung zu 4-en-VPA kann durch eine Cobehandlung mit den Cytochrom P450 Induktoren Phenytoin und Phenobarbital verstärkt werden (Abbildung 6). Durch die Störung der Fettsäureoxidation in der Leber wird der Fettabbau verlangsamt und Triglyzeride akkumulieren sich in den Zellen (Abbildung 6) (Begriche, et al., 2011; Bjorge *et al.*, 1991).

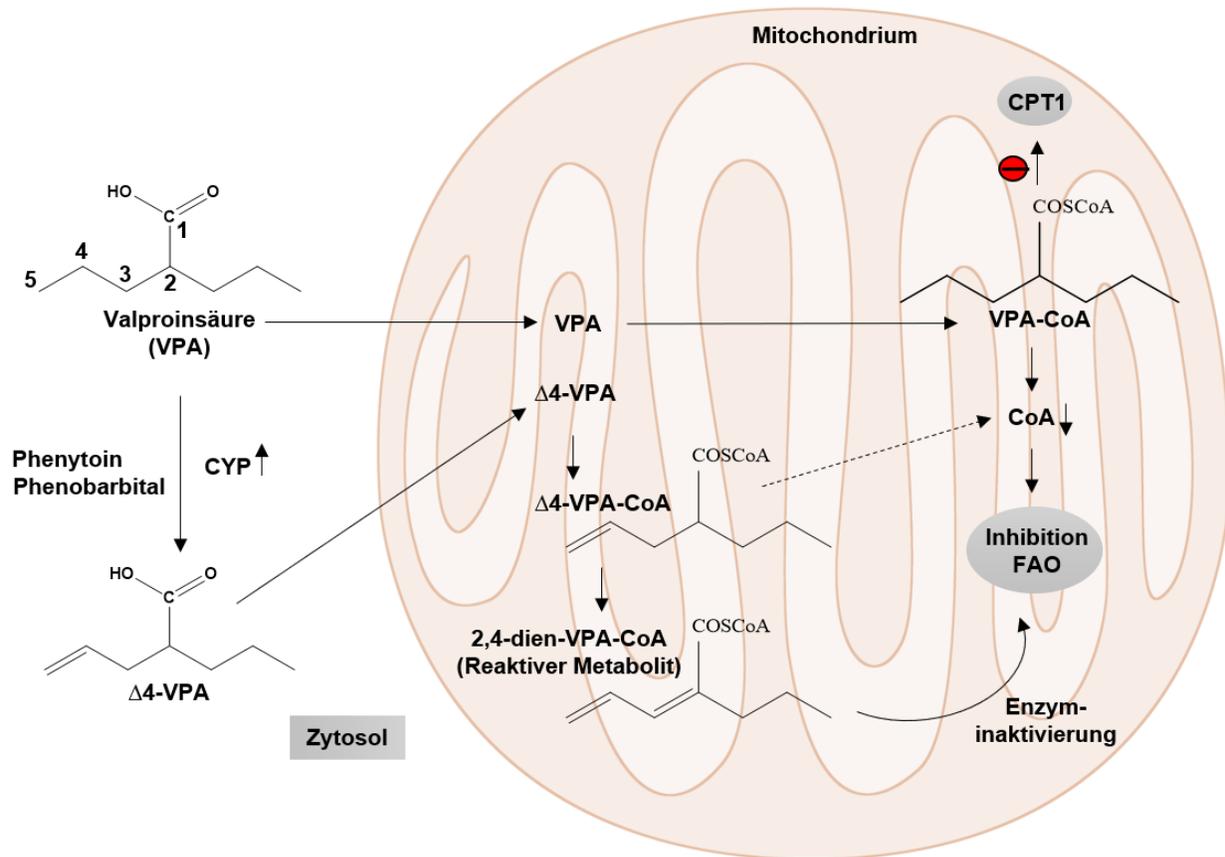


Abbildung 6 Mechanismus der Valproinsäure-induzierten Hemmung der mitochondrialen Fettsäure-β-Oxidation (FAO). Legende: Δ4-VPA - 4-en-Valproinsäure, Δ4-VPA-CoA - 4-en-Valproinsäure Coenzym-A, 2,4-dien-VPA-CoA - 2,4-dien-Valproinsäure Coenzym-A, VPA - Valproinsäure, CYP - *Cytochrom P450*, CPT1 - Carnitin-Palmitoyltransferase-1, FAO - Fettsäureoxidation. In Anlehnung an (Begriche, et al., 2011).

1.4.2 Cholestase

Eine Cholestase tritt auf, wenn vermindert Galle in das Duodenum transportiert wird. Dem verminderten Gallenfluss liegt eine Abfluss-, Bildungs- oder Sekretionsstörung in der Galle oder einzelner ihrer Bestandteile zugrunde. Beeinträchtigungen der Sekretion von Galle können somit entweder auf funktionale Störungen bei der Gallenbildung im Hepatozyten oder auf einen defekten Gallenfluss auf der Ebene der Gallengänge zurückgeführt werden (Dancygier, 2013).

Der Nachweis einer arzneimittel-induzierten Cholestase ist eine diagnostische Herausforderung, da sich die Erkrankung beim Menschen klinisch variabel z. B. als cholestatische Hepatitis oder sekundär sklerosierende Cholangitis präsentiert. Die sofortige Identifizierung und das Absetzen des Arzneimittels können überlebenswichtig sein; die mit einer cholestatischen Leberschädigung assoziierte Mortalität beträgt bis zu 10 %. Zu den Risikofaktoren für eine arzneimittel-induzierte Cholestase gehören ein höheres Alter oder eine genetische Disposition. Arzneimittel, die zu einer cholestatischen Lebertoxizität führen können, sind beispielsweise die Antibiotika Amoxicillin/Clavulansäure und Diclofenac. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl anderer Arzneistoffe, die eine Cholestase induzieren können (Devarbhavi *et al.*, 2018; Sundaram *et al.*, 2017; Yang, *et al.*, 2013).

Tabelle 1 Eine Auswahl von weiteren Arzneimitteln, die eine Cholestase induzieren können (Padda *et al.*, 2011; Sundaram, *et al.*, 2017).

Cholestase	Cholestatische Hepatitis	
Orale Kontrazeptiva	Penicillin	Carbamazepin
Warfarin	Diclofenac (NSAIDs)	Metformin
Prochlorperazin	Ketoconazol	Troglitazon
Cyclosporin	Diazepam	Ticlopidin
Tamoxifen	Allopurinol	Isoniazid

Angeborene Cholestasesyndrome werden durch Mutationen in Genen für hepatozelluläre Transporter verursacht. Auch cholestatische Noxen (z. B. Medikamente, Hormone, inflammatorische Zytokine) beeinträchtigen die Transporter-Expression oder -Funktion. Diese Veränderungen sind einerseits die Ursache der Cholestase, andererseits werden hepatoprotektive Mechanismen aktiviert, um einen alternativen Gallensäure-Efflux in die systemische Zirkulation zu ermöglichen. Dies führt zu einer gesteigerten renalen Elimination

gallenpflichtiger toxischer Substanzen (z. B. Gallensäuren, Bilirubin). Zusätzlich werden Gallensäuren durch Hydroxylierung, Sulfatierung und Glucuronidierung in der Leber vermehrt entgiftet. An diesem Detoxifizierungsstoffwechsel sind Kernrezeptoren beteiligt, deren Aktivität wiederum durch Gallensäuren, inflammatorische Zytokine, Medikamente und Hormone reguliert wird. Zusätzlich zu transkriptionellen Veränderungen wird auch ein verminderter Einbau und gesteigerter Abbau von Transporterproteinen beobachtet (Wagner *et al.*, 2009; Zollner *et al.*, 2006).

1.4.2.1 Mechanismus der Diclofenac induzierten Cholestase

Die zu einer Cholestase führenden Mechanismen werden im Folgenden am Beispiel der Wirkung von Diclofenac beschrieben. Diclofenac gehört zu den nicht-steroidalen Antiphlogistika (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID). Diclofenac blockiert die Cyclooxygenase, wodurch die Bildung von Prostaglandinen inhibiert wird. Prostaglandine spielen eine zentrale Rolle bei inflammatorischen Prozessen, bei der Schmerzwahrnehmung und bei Fieber. Diclofenac wirkt schmerzlindernd, anti-inflammatorisch und anti-pyretisch (Altman *et al.*, 2015; Kantor, 1986). Diclofenac wird in der Leber über zwei Hauptwege metabolisiert. Dabei entstehen reaktive Diclofenac-Glucuronid-Intermediate (Abbildung 7), die via MRP2 über die kanalikuläre Plasmamembran in die Galle abtransportiert werden. Reaktive Glucuronid-Intermediate binden kovalent an kanalikuläre Zielproteine und weiter distal gelegene Proteine (Boelsterli, 2003). Die Modifikation von MRP2 beeinflusst den Transport u. a. von Gallensäuren und Bilirubin. Der beeinträchtigte Transport kann zu Leberzellschädigungen in Verbindung mit einer schweren Cholestase führen (Watanabe *et al.*, 2007).

Ein anderer Mechanismus, der zur Hepatotoxizität führen kann, ist die Bioaktivierung von Diclofenac durch CytochromP450-Enzyme (CYP) zum 4'- und 5-Hydroxy-Diclofenac (Abbildung 7). Diese Reaktion wird z. B. in der Ratte über CYP3A, CYP2C, CYP2C6, CYP2C7 und CYP2C11 katalysiert (Bruyère *et al.*, 2009; Masubuchi *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 1999). Die Cyp450-abhängigen Metaboliten können weiter zu reaktiven Chinoniminen oxidiert werden (Abbildung 7), die durch *Redox cycling* oxidativen Stress auslösen oder kovalent an Protein- und Nicht-Protein-SH-Gruppen wie Glutathion binden (Boelsterli, 2003; Shen *et al.*, 1999; Tang, et al., 1999).

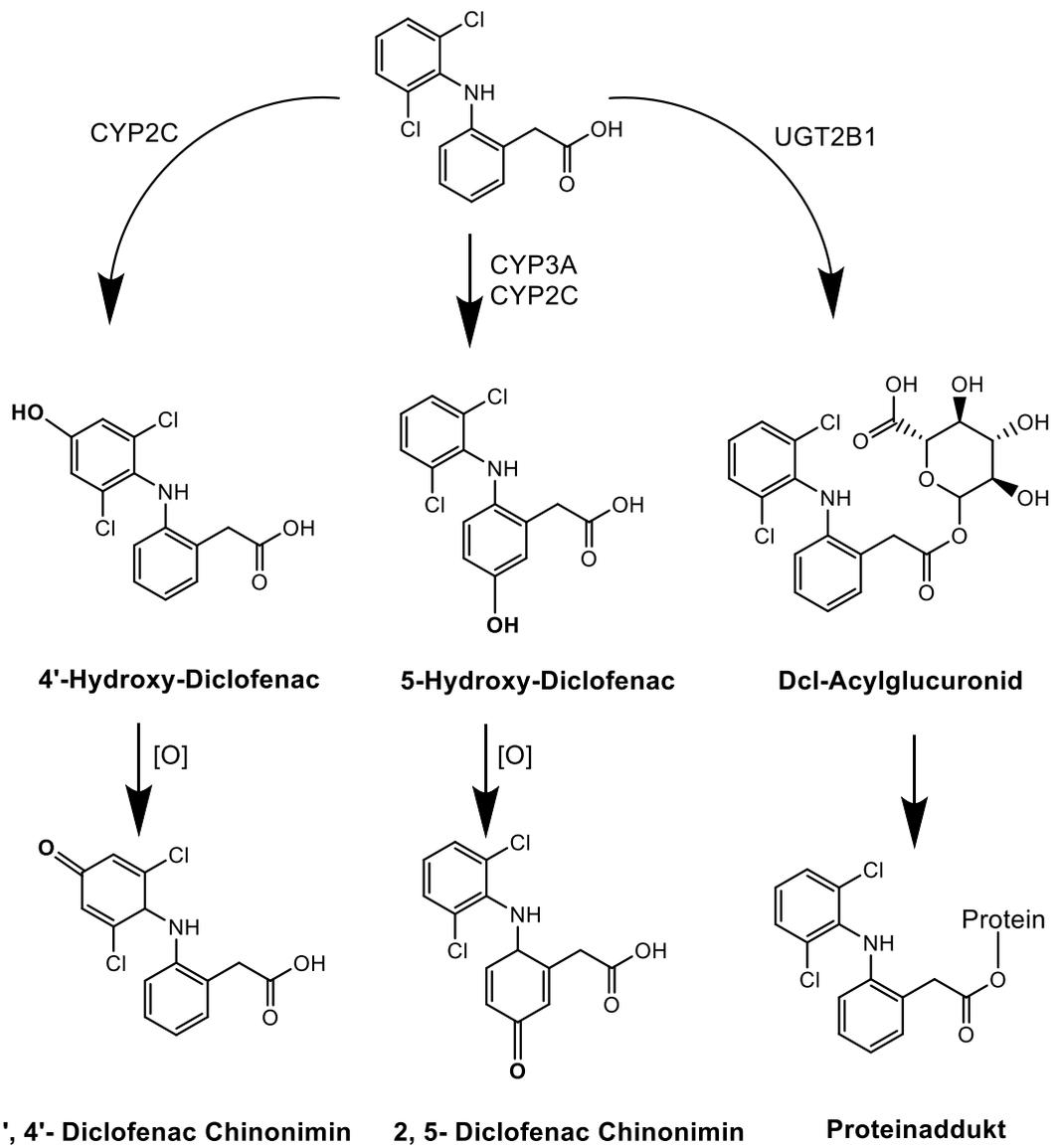


Abbildung 7 Metabolisierung von Diclofenac und potentielle Bildung reaktiver Metaboliten. Legende: [O] - oxidativer Stress, Dcl – Diclofenac (Boelsterli, 2003; Shen *et al.*, 1999; Tang, *et al.*, 1999).

1.5 Ziele der Dissertation

In den vergangenen Jahren haben verschiedene Arbeitsgruppen eine induzierte Hepatotoxizität in tierexperimentellen Studien mit Ratten untersucht. Diese ersten Experimente haben gezeigt, dass die quantitative Analyse von individuellen Gallensäuren im Serum der Tiere mittels LC-MS/MS einen potentiellen Beitrag zur Verbesserung der präklinischen Sicherheitsbewertung für eine arzneimittel-induzierte Lebertoxizität leisten könnte. Klassische klinisch-chemische Biomarker konnten in diesen Experimenten keine Lebeschädigung detektieren. Gallensäure-Profile besitzen somit nicht nur eine bessere Sensitivität gegenüber den klassischen klinischen Biomarkern, sondern sie erlauben auch Rückschlüsse auf die Art des Leberschadens.

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Eignung von Gallensäureprofilen als unterstützende Marker für die Identifizierung und Differenzierung von Leberschäden in präklinischen Studien zu untersuchen. Damit sollen die Sensitivität und Spezifität des Nachweises von hepatozellulären und hepatobiliären Leberschäden in tierexperimentellen Modellen und Zellkultursystemen gesteigert werden. Über die Quantifikation von primären, konjugierten und sekundären Gallensäuren sollen charakteristische Profile zu individuellen Leberschäden herausgearbeitet werden.

Um dies zu erreichen wurde durch die Verabreichung von Arzneimitteln bei männlichen und weiblichen Ratten charakteristische Endpunkte der Hepatotoxizität wie z. B. eine Cholestase oder Steatose induziert. Dafür wurden Modelltoxine mit einer nachgewiesenen Leberpathologie genutzt, die verschiedene Formen der Hepatotoxizität auslösen können. Die Art des Leberschadens wurde in den einzelnen Behandlungsgruppen anschließend durch die präklinische Sicherheitsbewertung bestimmt. Hierfür wurden die Ratten histopathologisch untersucht und die Leberenzymaktivitäten wurden gemessen.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese zu untersuchen, ob quantitativ analysierte Profile von Gallensäuren charakteristische Lebertoxizitäten nachweisen können und gleichzeitig sensitivere Biomarker sind, als bereits etablierte klinisch-chemische Parameter. Um dies zu erreichen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur quantitativen Analytik von individuellen Gallensäuren mittels LC-MS/MS im Plasma und im Lebergewebe von Ratten etabliert und in den Prozessablauf der präklinischen Sicherheitsbewertung implementiert. Dadurch sollte überprüft werden, ob der quantitative Nachweis von Gallensäuren die Sensitivität und Spezifität zur Detektion einer arzneimittel-induzierten Lebertoxizität verbessern kann.

Als zweites Ziel sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Profile von individuellen Gallensäuren mit essentiellen Genen des hepatischen Metabolismus von Gallensäuren korrelieren, um somit ein besseres mechanistisches Verständnis über die induzierte

Lebertoxizität und dessen einhergehend verändertes Gallensäure-Profil zu erhalten. Hierfür wurde eine molekularbiologische Methode zur Quantifizierung von Ribonukleinsäure (RNA) im Lebergewebe für eine Analyse von Genen des Gallensäure-Metabolismus in der Leber genutzt. Mit einer gezielten RNA-Analyse in einem Multiplex-Assay-Verfahren wurde das regulatorische Netzwerk von Transportsystemen, Transkriptionsfaktoren und von Enzymen der Gallensäuren-Biosynthese in der Leber untersucht. Die sich aus einer veränderten Genexpression ergebenden mechanistischen Hinweise wurden mit den Gallensäure-Profilen in Plasma und Lebergewebe verknüpft. Dabei wurde beispielsweise evaluiert, ob eine induzierte Cholestase zu einer erhöhten Genexpression von Transportern führt, die für einen basolateralen Gallensäure-Transport aus Hepatozyten zuständig sind. Gleichzeitig bildet das dazugehörige Gallensäure-Profil veränderte Plasmakonzentrationen von individuellen Gallensäuren ab.

Als drittes Ziel wurde die Eignung von Gallensäureprofilen im Überstand von *In-vitro*-kultivierten Rattenhepatozyten untersucht, um die Bewertung von hepatozellulärer Toxizität in einem zellbiologischen Testsystem zu verbessern. Dieses Modellsystem erlaubt z. B. die Analyse der BSEP (engl. *bile salt export pump*), die gezielt Gallensäuren aus den Hepatozyten in die Gallengänge abtransportiert. Durch Kultivierung der Zellen mit dem Hepatotoxin Troglitazon wurde analysiert, welchen Einfluss eine BSEP-Inhibition auf die Gallensäure-Konzentration im Kulturmedium hat. Darüber hinaus wurde mit dem Hepatotoxin Methapyrilen ein erstes Experiment zur Untersuchung der Übertragbarkeit von erzielten *In-vivo*-Ergebnissen zum Gallensäure-Profiling, mit einem etablierten *In-vitro*-Testsystem zur Kultivierung von Rattenhepatozyten im Sandwichdesign durchgeführt. Dazu wurden die *In-vivo*-Dosierungen in adäquate *In-vitro*-Konzentrationen für das Zellkultursystem umgewandelt. Damit wurde geprüft, ob vergleichbare Gallensäure-Konzentrationsveränderungen im Plasma von behandelten Tieren und im Kulturmedium des Testsystems auftreten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien für die LC-MS/MS Analytik

Tabelle 2 Liste des Equipments der LC-MS/MS Analytik.

Material	Hersteller
Massenspektrometer	SCIEX QTRAP® 5500 MS/MS System ausgestattet mit einer Turbo V™ ESI-Ionenquelle, AB Sciex Deutschland GmbH, Darmstadt
LC-System	Agilent 1290 Infinity II LC System, Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn
Trennsäule	UHPLC-Säule, BIOCRATES (Produktnummer 91220052120868), Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Vorsäulenhalter	SecurityGuard ULTRA Holder Phenomenex (Cat No AJ0-9000), Phenomenex LTD, Aschaffenburg
Vorsäule	SecurityGuard ULTRA Cartridge C18/XB-C18, 2.1 mm ID column Phenomenex (Cat No AJ0-8782), Phenomenex LTD, Aschaffenburg
Kapillarsäulenferrule	Sure-LOK High Pressure PEEK Nut 10-32, 1/16 Tubing, 12000 psi Phenomenex (AQ0-8503), Sure-Lok Fitting Tightening Tool Aluminium (AQ0-8530), Phenomenex LTD, Aschaffenburg
Druckverteiler-System	Waters Positive Pressure-96 Processor, Waters GmbH, Eschborn
Vortex Mixer	neoLab Vortex Genie 2, 2700 U/Min, Artikelnummer 7-0092, neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Mixer	Eppendorf ThermoMixer® C, Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Eppendorf Research® plus, Volumen 10µL, 20µL, 200 µL, 1000 µL, jeweils mit Justierungsoption, Eppendorf AG, Hamburg
Multipipette	Multipipette® E3/E3x, Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf Combitips advanced®, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.5mL, 1 mL, 5 mL, Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	ep Dualfilter T.I.P.S.® SealMax, PCR clean und sterile, 0.1 – 10 µL, 2 – 100 µL, 50 -1000 µL, Eppendorf AG, Hamburg
96-well Platte	Nunc™ 96-Well Platte mit Kombifilterplatte, Biocrates Lifescience AG, Innsbruck

Tabelle 3 Liste der verwendeten Chemikalien der LC-MS/MS Analytik.

Chemikalien	Hersteller
Acetonitril	CAS Nummer 75-05-8, HPLC grade, $\geq 99.93\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	CAS Nummer 67-56-1, HPLC grade, $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	CAS Nummer 67-63-0, HPLC grade, $\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Wasser	CAS Nummer 7732-18-5, HPLC grade, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumacetat	CAS Nummer 631-61-8, HPLC grade, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ameisensäure	CAS Nummer 64-18-6, HPLC LiChropur® , $\geq 98 - 100\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Cholsäure (CA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Chenodesoxycholsäure (CDCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Desoxycholsäure (DCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Glycocholsäure (GCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Glycochenodesoxycholsäure (GCDCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Glyco-Deoxycholsäure (GDCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Glyco-Lithocholsäure (GLCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Glyco-Ursodeoxycholsäure (GUDCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Hyodesoxycholsäure (HDCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Lithocholsäure (LCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
α -Muricholsäure (MCA[α])	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
β -Muricholsäure (MCA[β])	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck

Tabelle 3 Liste der verwendeten Chemikalien der LC-MS/MS Analytik (weitergeführt).

Chemikalien		Hersteller
o-Muricholsäure	(MC[o])	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Taurocholsäure	(TCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Taurochenodeoxycholsäure	(TCDCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Taurodeoxycholsäure	(TDCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Tauroolithocholsäure	(TLCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Tauroursodeoxycholsäure	(TUDCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Tauro- α/β -muricholsäure	(TMCA[a+b])	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Ursodeoxycholsäure	(UDCA)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Cholsäure-d5	(CA-d5)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Chenodeoxycholsäure-d5	(CDCA-d5)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Glycocholsäure-d5	(GCA-d5)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Glyco-Lithocholsäure-d4	(GLCA-d4)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Glyco-Ursodeoxycholsäure-d4	(GUDCA-d4)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Hyodesoxycholsäure-d4	(HDCA-d4)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Lithocholsäure-d4	(LCA-d4)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Taurocholsäure-d5	(TCA-d5)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Taurochenodeoxycholsäure-d5	(TCDCA-d5)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
Tauroursodeoxycholsäure-d5	(TUDCA-d5)	Biocrates Lifescience AG, Innsbruck

2.2 Materialien für die Analyse der Genexpression

Tabelle 4 Liste der verwendeten Chemikalien und des Laborequipments zur Analytik von spezifischen mRNAs.

Material	Hersteller
Magnetische Separationsplatte (96-Well Format)	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
VorTemp™ 56 Inkubator	Labnet International, Inc. Global, Edison, USA
Mikrotiterplatten-Schüttler	Eppendorf ThermoMixer® C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Luminex Bio-Plex	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Tabelle 4 Liste der verwendeten Chemikalien und des Laborequipments zur Analytik von spezifischen mRNAs (weitergeführt).

Material	Hersteller
Vortex Mixer	neoLab Vortex Genie 2, 2700 U/Min, Artikelnummer 7-0092, neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Pipetten	Eppendorf Research® plus, Volumen 10µL, 20µL, 200 µL, 1000 µL, jeweils mit Justierungsoption, Eppendorf AG, Hamburg
Multipipette	Multipipette® E3/E3x, Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf Combitips advanced®, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.5mL, 1 mL, 5 mL, Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	ep Dualfilter T.I.P.S.® SealMax, PCR clean und sterile, 0.1 – 10 µL, 2 – 100 µL, 50 -1000 µL, Eppendorf AG, Hamburg
Reservoir Corning® Costar® (25mL/100mL)	VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Mikrozentrifuge (PCR-Platten)	VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
QuantiGene Assay	
Proteinase K	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Blocking Reagent	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Label Probe Solution	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Pre-Amplifier Solution	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Amplifier Solution	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
SAPE	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
SAPE Diluent	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Lysis Mixture	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Wash Buffer Solution	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Wash Buffer Solution	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
SAPE Wash Buffer	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Plate Seals	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Hybridization Plates	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Pressure Seals	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland

Tabelle 4 Liste der verwendeten Chemikalien und des Laborequipments zur Analytik von spezifischen mRNAs (weitergeführt).

Capture Probes	Hersteller
Probe Set	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Abcb11	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Abcb1a	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Abcb1b	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Abcb4	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Abcc2	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Abcc3	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Abcc4	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Abcd3	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Abcg2	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Abcg5	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Abcg8	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Acot8	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Acox2	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Actb	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Amacr	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Baat	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Cyp27a1	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Cyp7a1	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Cyp7b1	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Cyp8b1	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Gusb	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Hnf4a	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Nr0b2	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Nr1h3	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Nr1h4	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Nr1i2	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Nr1i3	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Ostalpa	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland

Tabelle 4 Liste der verwendeten Chemikalien und des Laborequipments zur Analytik von spezifischen mRNAs (weitergeführt).

Capture Probes	Hersteller
Ostbeta	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Polr2a	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Ppara	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Pparg	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Rpl13a	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Scp2	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Slc10a1	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Slc10a2	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Slco1a1	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Slco1b2	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Slco2b1	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Sredf1	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Sult1a1	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Sult1a2	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Sult1b1	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Sult1c2a	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Sult1c3	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland
Sult1e1	ThermoFisher Scientific GmbH, Berlin, Deutschland

2.3 Materialien *In-vitro*-kultivierte Rattenhepatozyten

Tabelle 5 Liste der Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Analysenwaage	AT261 Delta-Range®, Mettler-Toledo GmbH, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Cytoperm 2, Kendro Laboratory Products GmbH, Deutschland
Kamerasystem	NG-P700 I, AVT-Horn, Deutschland
Lichtmikroskop	Axiovert S100, Carl Zeiss, Deutschland

Tabelle 5 Liste der Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien (weitergeführt).

Material	Hersteller
Mechanische & elektrische Pipetten	Research Pro, Eppendorf AG, Hamburg
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetboy	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilwerkbank	Heraeus Hera Safe 18, Kendro Laboratory Products GmbH, Deutschland
Wasserbad	Grant Instruments Ltd., England
Zellzählkammer	Neubauer improved, Brand, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge primo R, Deutschland
Magnetrührer	Bibby Stuart, Bibby Sterilin Ltd., England
pH-Meter	Knick Portamess, Tamb, Deutschland
Schüttler	Titramax 100, Heidolph GmbH
Schüttler	KL-2, Edmund-Bühler Labortechnik, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex Mixer	SA8, Bibby Sterilin Ltd., England
Zentrifuge	5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland
Fluoreszenzmikroskopie	
Elektron. Vorschaltgerät	HBO 100, Carl Zeiss, Deutschland
Filtersatz	38 HE, Carl Zeiss, Deutschland
Filtersatz	46 HE, Carl Zeiss, Deutschland
Filtersatz	49, Carl Zeiss, Deutschland
Inverses Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200, Carl Zeiss, Deutschland
Quecksilberdampfkurzbogenlampe	HBO 103 W/2, Osram, Deutschland
Zellkultur: Chemikalien, Reagenzien, Medien	
Collagenase Typ II, 3,2 U/mg, Charge: 76H8617	Worthington Biomedical Corporation, USA
Dexamethason, wasserlöslich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
DMSO, wasserfrei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Ethanol 96%	Merck KGaA, Deutschland
Troglitazon ≥ 98% (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

Tabelle 5 Liste der Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien (weitergeführt).

Zellkultur: Chemikalien, Reagenzien, Medien	
Dulbeccos Modified Eagles Medium 10 x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Glukagon 2 mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Fetales Kälberserum, Charge: 06Q4200K	Invitrogen, Deutschland
GlutaMax™ I-Supplement	Invitrogen, Deutschland
HBSS-Puffer ohne CaCl ₂ , MgCl ₂	Invitrogen, Deutschland
HBSS-Puffer w/o CaCl ₂ , MgCl ₂	Invitrogen, Deutschland
Insulin-Lösung 10 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Lysispuffer pH 7,4	Merck KGaA, Deutschland
Zellkultur: Chemikalien, Reagenzien, Medien	
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
PBS-Puffer w/o CaCl ₂ , MgCl ₂	Invitrogen, Deutschland
Penicillin 10000 U/ml +Streptomycin 10000 µg/ml	Invitrogen, Deutschland
Percoll®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Protease-Inhibitor-Mix, Complete	Roche Holding GmbH, Deutschland
Rattenschwanzkollagenlösung, Typ I; 3,5 mg/ml	Becton Dickinson, Deutschland
Tunicamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Trypanblau-Lsg. 0,4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Williams' Medium E	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	
5 ml Luer Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
6-&12-Lochplatten, mit Kollagen Typ I beschichtet	Becton Dickinson, Deutschland
Costar Stripetten	Corning Inc., Niederlande
Midisart® Absaugfilter 2000	Sartorius AG, Deutschland
Nalgene® Filtriereinheiten	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Pasteurpipetten 230 mm	VWR International GmbH, Deutschland
Sterican-Kanülen Gr. 1	B. Braun Melsungen AG, Deutschland

2.4 Substanzen

Tabelle 6 Liste der verwendeten Wirkstoffe in den tierexperimentellen Studien.

Wirkstoffe	Hersteller
Amitriptylin	≥98%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Diclofenac	≥98.5%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Flutamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Methapyrilen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,
Methotrexat (EP) Reference Standard	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,
Valproinsäure (EP) Reference Standard	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.5 Software

Tabelle 7 Liste der verwendeten Software.

Software	Hersteller
SCIEX Analyst® 1.5.2	AB Sciex Deutschland GmbH, Darmstadt
Met/DQ®	Version Boron, Biocrates Lifescience AG, Innsbruck
GraphPad Prism 8.0.2	GraphPad Software, San Diego, USA
Simca 14	Sartorius Stedim biotech, Malmö, Schweden
AxioVision 4.6.3	Carl Zeiss, Deutschland
EasyMeasure Rel. 1.0	Inteq GmbH, Deutschland

2.6 Rationale zur Auswahl und Dosierung der Wirkstoffe für die tierexperimentellen Studien

Zur Auswahl der Arzneimittelwirkstoffe wurde eine umfangreiche Literaturrecherche zu klinischen Fallberichten sowie zu klinischen und präklinischen Studien an Menschen und Tieren durchgeführt. Die Identifizierung geeigneter Wirkstoffkandidaten wurde anhand von definierten Kriterien durchgeführt.

Als erstes Auswahlkriterium geeigneter Modellsubstanzen wurden Wirkstoffe mit einem deklarierten hepatotoxischen Risiko auf den Menschen selektiert. Das schloss sowohl Arzneimittelwirkstoffe ein, die eine Marktzulassung haben, als auch solche, die aufgrund starker Leberschädigung vom Markt genommen wurden.

Als zweites Kriterium für die Auswahl wurde das Vorliegen eines pathologischen Nachweises einer schädigenden Wirkung auf die Leber beim Menschen oder beim Tier definiert. Dabei wurden Modellsubstanzen mit verschiedenen pathologischen Endpunkten wie z. B. Cholestase oder Steatose ausgewählt, damit durch die Analyse von individuellen Gallensäuren diese Endpunkte durch spezifische Gallensäure-Profile klassifiziert werden können.

Da aus tierethischen Erwägungen keine gesonderten Dosisfindungs-Studien durchgeführt werden sollten, bestand das dritte Kriterium darin, dass es für die ausgewählten Wirkstoffe in der Literatur Hinweise zu Dosierung in Nagerstudien gab, bei denen Leberschäden ausgelöst werden. Darauf basierend wurden drei Dosierungen für die tierexperimentellen Studien abgeleitet. Dabei sollte die hohe Dosis der Modellsubstanz der jeweiligen Effektdosis entsprechen, bei der klinische und histologische Befunde der Leberschädigung induziert werden. Die niedrige Dosis sollte keine klinischen und pathologischen Befunde verursachen und die mittlere Dosis sollte zur besseren Charakterisierung der Dosis-Wirkungsbeziehung dienen (Oyejide *et al.*, 2017). Die Studiendauer wurde in Anlehnung an die Richtlinie der OECD 407 auf 14 Tage mit täglich einmalig wiederholter Gabe der Modellsubstanz festgelegt (OECD, 2008). Für ausgewählte Tiere aus den Gruppen der applizierten Hochdosis wurde eine anschließende 14tägige Erholungsphase festgelegt.

Die auf Basis der Literatur ausgewählten Substanzen und Dosierungen für die tierexperimentellen Studien, werden in den Kapiteln 3.1.1 bis 3.1.7 näher erläutert.

2.7 Tierexperimentelle Studien

2.7.1 Allgemeine Haltungsbedingungen, Tötung der Tiere und Probenentnahme

Der Antrag für die geplanten Tierversuche (Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes) wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt (Geschäftszeichen G0113/16). Die Studien wurden in Anlehnung an regulatorisch behördliche Richtlinien geplant und durchgeführt.

Die in der Literatur berichteten Untersuchungen der Gallensäure-Profile nach Gabe von Modellsubstanzen, die einen wirkstoff-induzierten Leberschaden auslösen, wurden mit Ratten durchgeführt. Die Ratte ist in der Toxikologie das am häufigsten eingesetzte Versuchstier (Alhaji Saganuwan, 2017; Bioethics, 2005). Sie wird in einer Vielzahl von Versuchen mit Entwicklungswirkstoffen und anderen Modellsubstanzen im Rahmen regulatorischer Prüfungen eingesetzt (EMA, 2010).

Im Rahmen der tierexperimentellen Studien erfolgte eine einmalige Substanzapplikation pro Tag, mit einer Studiendauer von bis zu 14 Tagen. Dazu wurde eine Recovery-Periode von 14 Tagen in der Hoch-Dosis Gruppe hinzugefügt, um eventuell vorhandene persistierende Effekte und deren Nachweis mit den verschiedenen analytischen Methoden zu untersuchen. Die Substanzapplikation erfolgte, je nach Formulierung des ausgewählten Wirkstoffes oral mittels Schlundsonde oder intraperitoneal. Auf Basis der Formulierung wurde das dazugehörige Vehikel für die Kontrollgruppen festgelegt (Tabelle 46). In jeder Studie wurden eine Vehikel-, drei Dosis-, sowie eine Recovery-Gruppe pro Substanz eingesetzt (Tabelle 46). Männliche und weibliche Han-Wistar-Ratten (Alter: 8–12 Wochen, Gewicht: 170–200 g) wurden randomisiert in drei Dosis-Gruppen (n=6 Tiere pro Geschlecht), eine Kontroll-Gruppe (n=6 Tiere pro Geschlecht) und eine Recovery-Gruppe (n=3 Tiere pro Geschlecht) aufgeteilt.

Das Studiendesign sah keine Nahrungskarenzphase vor der Blutentnahme vor, um eine zusätzliche Belastung der Versuchstiere zu vermeiden. Das Körpergewicht der Tiere wurde täglich erfasst, dabei wurden die Tiere täglich gewogen. Die Futter- und Wasseraufnahme wurde einmal pro Woche aufgezeichnet, dafür wurden das Futter und Wasser zu Beginn der Studie eingewogen und dann zum gegebenen Zeitpunkt erneut gewogen. An Tag 2, 9 und 14 der Behandlungsphase, sowie an Tag 21 und 28 der Recovery-Phase wurde eine Blutentnahme durch Punktieren der *Vena jugularis* oder *Vena cava* (Serum: 700 µL, Plasma: 200 µL) durchgeführt (Abbildung 8). Die Proben wurden direkt im Anschluss der Entnahme nach Zentrifugation bei -80 °C gelagert. An den Sektionstagen 14 und 28 wurde zusätzlich

Lebergewebe entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Leber, Herz, Niere, Testikel, Pankreas und Bereiche des Magen-Darm-Trakts wurden in Formalin fixiert und für die histopathologischen Untersuchungen aufgearbeitet (siehe Abschnitt 2.8 Klinische Chemie und 2.9 Histopathologie).

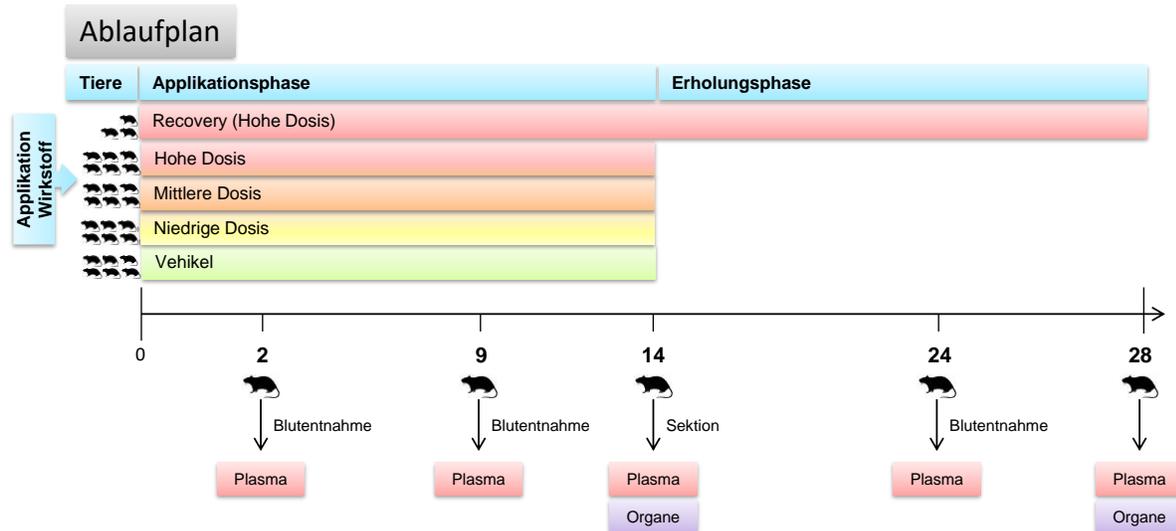


Abbildung 8 Tierexperimentelles Studiendesign.

Für die Quantifizierung von individuellen Gallensäuren im Lebergewebe wurde die Leber entnommen und gewogen. Anschließend wurden die Leberlappen separiert. Der obere Teil des linken lateralen Lappens wurde für die quantitativen Analysen in der LC-MS/MS gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert (Abbildung 9). Für die Untersuchung von mRNAs im Lebergewebe wurde der untere Teil des linken Leberlappens in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

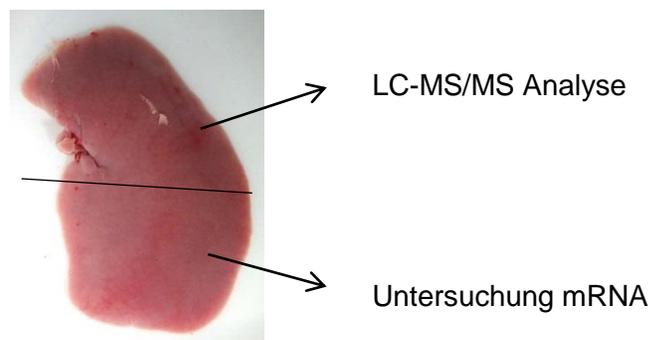


Abbildung 9 Unterteilung des linken lateralen Leberlappens.

2.7.2 Studiendesign Methapyrilen-induzierte Hepatotoxizität

In einer Studie der Bayer AG an männlichen Wistar-Ratten wurde durch die Verabreichung von Methapyrilen (Geschäftszeichen G0259/05) eine Lebernekrose mit einhergehenden hepatobiliärer Schädigungen induziert (Pavkovic, 2014). Nach einwöchiger Akklimatisierung wurden acht Wochen alte männliche Wistar-Ratten in Vehikel- und Behandlungs-Gruppen eingeteilt und über 14 Tage täglich per Schlund-Sonde mit Methapyrilen (MPy) behandelt. Kontrollgruppen erhielten Carboxymethylcellulose als Vehikel, Niedrigdosis-Gruppen 30 mg/ kg KG und Hochdosis-Gruppen 80 mg/ kg KG MPy. Des Weiteren wurden Ratten in Recovery-Gruppen für die jeweiligen Behandlungsgruppen eingeteilt (Tabelle 8). Das Studiendesign sah keine Nahrungskarenzphase vor der Blutentnahme vor, um eine zusätzliche Belastung der Versuchstiere zu vermeiden. Das Körpergewicht der Tiere wurde täglich erfasst, dabei wurden die Tiere täglich gewogen. Die Futter- und Wasseraufnahme wurde einmal pro Woche aufgezeichnet, dafür wurden das Futter und Wasser zu Beginn der Studie eingewogen und dann zum gegebenen Zeitpunkt erneut gewogen. An den Tagen 4, 8, 15 im Behandlungszeitraum wurde den Tieren Blut entnommen. In der Recovery-Periode wurde an Tag 10 erneut eine Blutentnahme bei den Recovery-Gruppen durchgeführt. Das Blut wurde über die *Vena cava* entnommen und es wurden sowohl Serum als auch EDTA Plasma gewonnen. An den Tagen 4, 8, 15 und 24 nach der Behandlung wurde jeweils eine Dosis -Gruppe nekropsiert und die Leber entnommen. Für die Untersuchungen der Genexpression wurde ein Teil des linken Leberlappens in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingelagert. Die klinische Chemie und Histopathologie erfolgten gemäß der in den nächsten Kapiteln beschriebenen Methoden.

Tabelle 8 Behandlungs- und Untersuchungsschema.

Gruppe	Tieranzahl	Substanz	Dosis	Tötungszeitpunkt
1 Kontrolle	6	Carboxymethylcellulose (Vehikel)	0 mg/kg KG	Tag 4
	6			Tag 8
	6			Tag 15
	6			Tag 24
2	6	Methapyrilen	30 mg/kg KG	Tag 4
	6			Tag 8
	6			Tag 15
	6			Tag 24
3	6	Methapyrilen	80 mg/kg KG	Tag 4
	6			Tag 8
	6			Tag 15
	6			Tag 24

2.7.3 Studiendesign zur Nahrungskarenz und Geschlechterspezifität

In toxikologischen Studien mit Ratten wird bei der Bayer AG routinemäßig Futter *ad libitum* bereitgestellt. Um die verschiedenen Einflussfaktoren (Ernährung, Geschlecht) auf die Gallensäure-Konzentration im Plasma zu analysieren und systematische Fehler in den Versuchsreihen zu vermeiden, wurde der Einfluss des Ernährungsstatus auf die Gallensäure-Profile bei 4 männlichen und 4 weiblichen Ratten (Alter: 8–12 Wochen, Gewicht: 170–200 g) untersucht. Die männlichen und weiblichen Ratten wurden jeweils in Gruppen gehalten. Es wurde Alleinfutter für Ratten und Mäusehaltung (ssniff Spezialdiäten GmbH, 10 mm (Pellet), Artikel-Nr. V1534 ssniff R/M-H) in einer Raufe im Käfigdeckel (Einwaage 200 g Pellets), *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Nahrungsaufnahme wurde täglich überprüft, in dem das Alleinfutter abgewogen wurde und anschließend wurde durch die ermittelte Differenz der Einwaage eine mittlere Futteraufnahme pro Tier berechnet. Für die Nahrungskarenzphase wurde den Tieren das Futter mindestens 12 Stunden vor der ersten geplanten Blutentnahme entzogen. *Ad libitum* Futter wurde nach dem letzten Blutentnahmezeitpunkt in der Karenzphase wieder zur Verfügung gestellt. In einer zweiwöchigen Studienphase wurde den Ratten in der ersten Woche an drei verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten (*ad libitum* Fütterung und Nahrungskarenz von 12, 16 und 20 h), durch Punktieren der *Vena jugularis* Blut (Plasma: 100 µL) entnommen (Abbildung 10). In der zweiten Studienwoche wurde den Tieren erneut an den gleichen Blutentnahmezeitpunkten (*ad libitum* Fütterung und Nahrungskarenz von 12, 16 und 20 h), durch Punktieren der *Vena jugularis* Blut (Plasma: 100 µL) entnommen. Die Gallensäure-Plasmakonzentrationen wurden bei einer *ad libitum* Fütterung und nach einer Karenzphase von 12, 16 und 20 h bestimmt.

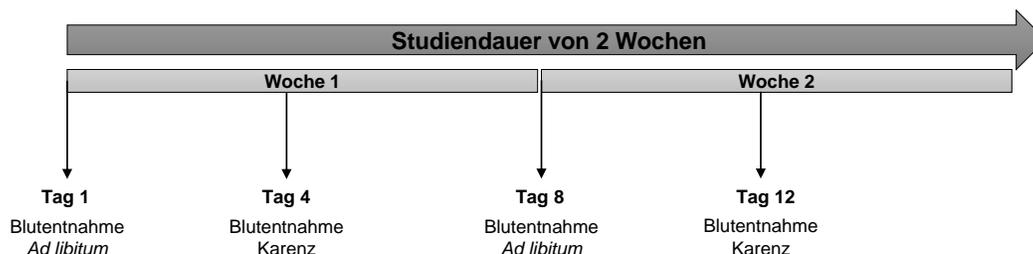


Abbildung 10 Studiendesign zur Nahrungskarenz und Geschlechterspezifität.

2.8 Klinische Chemie

ALAT, ASAT, APh, γ GT, GLDH, Triglyzeride, Cholesterin, Gesamt-Bilirubin (TBIL) und Gesamt-Gallensäuren (BAs-t) wurden im Serum am automatisierten Testsystem COBAS 6000 c501 Analyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Diese Analysen wurden durch die Biologielaboranten des Labors der Klinischen Chemie in Berlin (*Metabolic Profiling and Clinical Pathology*, Leitung: Dr. Björn Riefke, Bayer AG Berlin) und durch die technischen Mitarbeiter des Labors der Klinischen Chemie in Wuppertal (*Clinical Pathology*, Leitung: Dr. Alexius Freyberger, Bayer AG Wuppertal) durchgeführt.

2.8.1 Fotometrisches Messsystem COBAS 6000 c501

Der Cobas 6000 c501 ist ein vollautomatisiertes Messsystem für photometrische Bestimmungen von Enzymen und Substraten sowie für die ionenselektive Bestimmung von Natrium, Kalium und Chlorid. Die genaue Arbeitsweise des Cobas 6000 c501 wurde nach Angabe des Herstellers entnommen. Alle methodenspezifischen Einstellungen, z.B. Methodenbezeichnung, Testprinzip, Wellenlänge, Reagenzien etc. wurde den Methodenbeschreibungen entnommen. Die Gerätespezifikation wurde in Tabelle 9 zusammengefasst. Als Analysenmaterial für die klinische Diagnostik wurde Serum verwendet. Die für die einzelnen Parameter benötigten spezifischen gebrauchsfertigen Reagenzkassetten (ALAT: Tabelle 10, ASAT: Tabelle 12, AP: Tabelle 14, γ GT: Tabelle 16, GLDH: Tabelle 18, Bilirubin: Tabelle 20, Cholesterin: Tabelle 22, Triglyzeride: Tabelle 24) und Haltbarkeiten wurden der Packungsbeilagen entnommen. Für die Analyse wurden alle Seren im Probenentnahmeröhrchen direkt in vorgesehene Racks eingesetzt. Die gebrauchsfertigen Reagenzkassetten und die automatisierte Messmethode (Testdefinition ALAT: Tabelle 11, ASAT: Tabelle 13, AP: Tabelle 15, γ GT: Tabelle 17, GLDH: Tabelle 19, Bilirubin: Tabelle 21, Cholesterin: Tabelle 23, Triglyzeride: Tabelle 25) wurde für jeden Analyten eingestellt. Die untere Nachweisgrenze entspricht der niedrigsten messbaren Analytkonzentration, die von Null unterschieden wurde. Sie wurde als die Konzentration berechnet, die drei Standardabweichungen oberhalb des niedrigsten Standards lag (Standard 1 + 3 SD, Wiederholpräzision, n= 21). In einem Analysezyklus wurden mehrere Analyten gleichzeitig bestimmt. Im Folgenden werden die Bestimmungsverfahren sowie die Methode mit den dazugehörigen Messbereichen näher erläutert.

Tabelle 9 Gerätespezifikationen COBAS 6000 c501.

System	Beschreibung
Lichtquelle	Halogenlampe, 12 V / 50 W
Fotometer	Spektralfotometer mit mehreren Wellenlängen
Wellenlängen	12 Wellenlängen: 340, 376, 415, 450, 480, 505, 546, 570, 600, 660, 700, 800 nm
Länge des optischen Pfads	5,6 mm
Messbereich	0,0000 -3,3000 E
Linearität	Bis zu 2,5 E
Optische Messung	Monochromatisch und bichromatisch

2.8.2 Alaninaminotransferase

2.8.2.1 Bestimmungsverfahren

Die ALAT katalysiert die Übertragung einer NH₂-Gruppe zwischen L-Alanin und 2-Oxoglutarat zu Pyruvat und L-Glutamat. In der nachgeschalteten Indikatorreaktion wurde das entstehende Pyruvat mithilfe von NADH in einer von der Lactatdehydrogenase (LDH) katalysierten Reaktion zu L-Lactat und NAD⁺ reduziert (Abbildung 11). Damit eine volle Enzymaktivierung sichergestellt wurde, diente Pyridoxalphosphat als Coenzym in der Aminotransferreaktion. Durch die Zugabe von Pyridoxalphosphat zu dem Test wurde die Aminotransferaseaktivität erhöht. Die Oxidationsgeschwindigkeit von NADH ist direkt proportional zur katalytischen ALAT-Aktivität. Da NADH das spezifische Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzt, wurde die Extinktionsabnahme in der Indikatorreaktion von der Oxidation des NADH bei 340 nm gemessen.

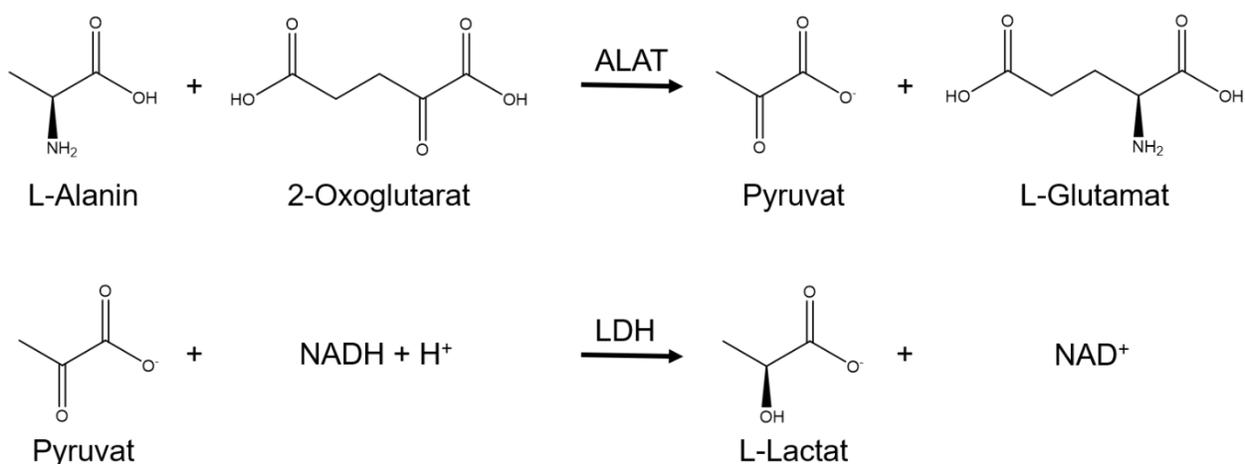


Abbildung 11 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.

2.8.2.2 Durchführung

Die Messung der ALAT-Aktivität in Serumproben wurde automatisiert mit Hilfe des Cobas 6000 c501 durchgeführt. Für eine Messung wurde automatisiert Serumprobe aus einem Barcode-beschrifteten Röhrchen gezogen und mit verschiedenen zum Teil vorher verdünnten Reagenzien versetzt. Die Zusammensetzungen der Reagenzien R1, R2 und R3 sind Tabelle 10 zu entnehmen. Die Einstellungen der Messmethode wurden vom Gerätehersteller übernommen (Tabelle 11). Demnach wurde ein Vorinkubationsmix erzeugt, indem 59 µL Reagenz R1 mit 32 µL Wasser versetzt wurden und anschließend 20 µL Reagenz R2 und 9 µL Probe dazugegeben wurden. Das in Reagenz 2 enthaltene Pyridoxalphosphat sorgt dafür, dass in einer Probe, in der zu wenig endogenes Coenzym Pyridoxalphosphat enthalten ist, die potenziell als Apoenzym ohne gebundenes Coenzym vorliegende ALAT in das aktive Holoenzym zu überführen. Die LDH im Vorinkubationsmix dient dazu, dass in der Probe enthaltene endogene Pyruvat zu reduzieren, damit ein konkurrierend zur Indikatorreaktion verlaufender NADH-Verbrauch verhindert wird. Nach einer Vorinkubation von insgesamt 5 min. wurden automatisiert 40 µL des verdünnten Reagenz 3, welches aus der vorangehenden Mischung von 20 µL Wasser und 20 µL Reagenz 3 resultierte, zum Vorinkubationsansatz gegeben. Die Zugabe von 2-Oxoglutarat aus Reagenz 3 sorgt für den Start der Mess- und Indikatorreaktion für 3 min. 45 sec. (siehe Abbildung 11), da nun durch die ALAT die NH₂-Gruppe zwischen L-Alanin und 2-Oxoglutarat übertragen werden kann. Die Abnahme der NADH-Konzentration im Reaktionsansatz wurde über die Absorptionsabnahme bei 340 nm gemessen, welche proportional zur Enzymaktivität in der Probe ist. Die Analyse wurde in einem Messbereich von 5-700 U/L durchgeführt. Serumproben mit höheren Aktivitäten wurden automatisch 1:10 verdünnt und erneut gemessen. Dafür wurden automatisiert 15 µL Probe mit 135 µL NaCl versetzt und 9 µL dieser Probenverdünnung analog zur unverdünnten Probe mit dem Reagenzien-Mix versetzt und vermessen. Die Ergebnisse der erneut verdünnt gemessenen Proben wurden automatisch mit dem Faktor 10 multipliziert.

Tabelle 10 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung der Alanin-Aminotransferase im Serum.

Reagenz	Beschreibung
R1	TRIS-Puffer: 224 mmol/L, pH 7,3 (37 °C); L-Alanin: 1120 mmol/L; Albumin (Rind): 0,25 %; LDH (Mikroorganismen): > 45 pkat/L; Stabilisatoren; Konservierungsmittel
R2	Pyridoxalphosphat: 730 pmol/L; Zusatzstoffe; Konservierungsmittel
R3	Oxoglutarat: 94 mmol/L; NADH: > 1,7 mmol/L; Zusatzstoffe; Konservierungsmittel

Systemhinweis ALTLP (ACN 684): R1 befindet sich in Position A, R2 in Position B und R3 in Position C.

Tabelle 11 Einstellungen der Messmethode.

Testdefinition COBAS 6000 c501			
Messart	Kinetik A		
Reaktionszeit/Messpunkte	10/44-70		
Wellenlänge (Neben/Haupt)	700/340 nm		
Reagenzpipettierung	Diluens (H ₂ O)		
R1	59 µL	32 µL	
R2	20 µL		
R3	20 µL	20 µL	
Probenvolumen	Probe	Probenverdünnung	
		Probe	Diluens (NaCl)
Normal	9 µL	-	-
Reduziert	9 µL	15 µL	135 µL

2.8.3 Aspartat-Aminotransferase

2.8.3.1 Bestimmungsverfahren

Die ASAT in der Probe katalysiert den Transfer einer Aminogruppe zwischen L-Aspartat und 2-Oxoglutarat, wobei Oxalacetat und L-Glutamat entstehen. In der nachgeschalteten Indikatorreaktion wurde das Oxalacetat unter Anwesenheit von Malatdehydrogenase (MDH) und NADH/NAD⁺ zu L-Malat reduziert (Abbildung 12). Pyridoxalphosphat dient als Coenzym in der Aminotransferreaktion, es stellt die volle Enzymaktivierung sicher. Die Oxidationsgeschwindigkeit von NADH ist direkt proportional zur katalytischen ASAT-Aktivität. Da NADH das spezifische Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzt, wurde die Extinktionsabnahme in der Indikatorreaktion von der Oxidation des NADH bei 340 nm gemessen.

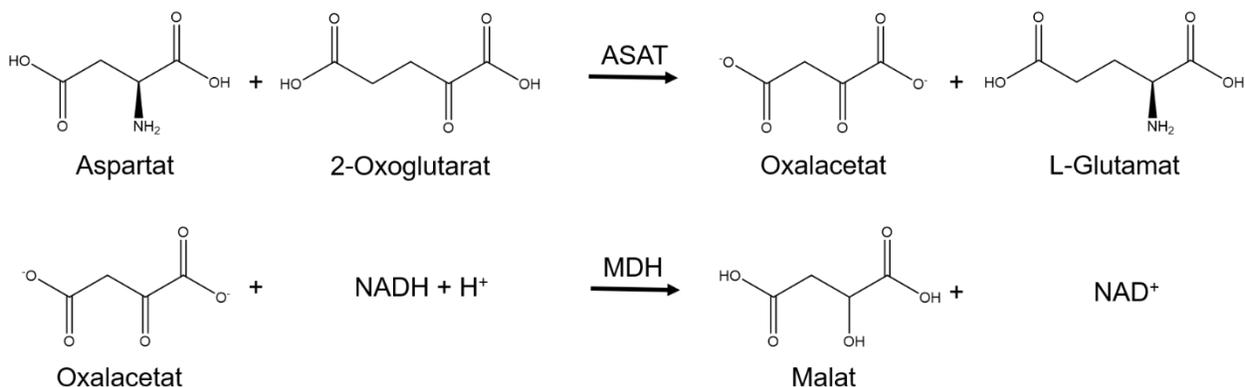


Abbildung 12 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.

2.8.3.2 Durchführung

Die Messung der ASAT-Aktivität in Serumproben wurde automatisiert mit Hilfe des Cobas 6000 c501 durchgeführt. Für eine Messung wurde automatisiert Serumprobe aus einem Barcode-beschrifteten Röhrchen gezogen und mit verschiedenen zum Teil vorher verdünnten Reagenzien versetzt. Die Zusammensetzungen der Reagenzien R1, R2 und R3 sind Tabelle 12 zu entnehmen. Die Einstellungen der Messmethode wurden vom Gerätehersteller übernommen (Tabelle 13). Demnach wurde ein Vorinkubationsmix erzeugt, indem 40 µL Reagenz R1 mit 51 µL Wasser versetzt wurden und anschließend 20 µL Reagenz R2 und 9 µL Probe dazugegeben wurden. Das in Reagenz 2 enthaltene Pyridoxalphosphat sorgt dafür, dass in einer Probe, in der zu wenig endogenes Coenzym Pyridoxalphosphat enthalten ist, die potenziell als Apoenzym ohne gebundenes Coenzym vorliegende ASAT in das aktive Holoenzym zu überführen. Die LDH im Vorinkubationsmix dient dazu, dass in der Probe enthaltene endogene Pyruvat zu reduzieren, damit ein konkurrierend zur Indikatorreaktion verlaufender NADH-Verbrauch verhindert wird. Nach der Vorinkubation von 5 min. wurden automatisiert 40 µL des verdünnten Reagenz 3, welches aus der vorangehenden Mischung von 20 µL Wasser und 20 µL Reagenz 3 resultierte, zum Vorinkubationsansatz gegeben. Die Zugabe von 2-Oxoglutarat aus Reagenz 3 sorgt für den Start der Mess- und Indikatorreaktion für 2 min. 17 sec. (Abbildung 12), da nun durch die ASAT die NH₂-Gruppe zwischen L-Aspartat und 2-Oxoglutarat übertragen werden kann. Die Abnahme der NADH-Konzentration im Reaktionsansatz wurde über die Absorptionsabnahme bei 340 nm gemessen, welche proportional zur Enzymaktivität in der Probe ist. Die Analyse wurde in einem Messbereich von 5-700 U/L durchgeführt. Serumproben mit höheren Aktivitäten wurden automatisch 1:10 verdünnt und erneut gemessen. Dafür wurden automatisiert 15 µL Probe mit 135 µL NaCl versetzt und 9 µL dieser Probenverdünnung analog zur unverdünnten Probe mit dem Reagenzien-Mix versetzt und vermessen. Die Ergebnisse der erneut verdünnt gemessen Proben wurden automatisch mit dem Faktor 10 multipliziert.

Tabelle 12 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase im Serum.

Reagenz	Beschreibung
R1	TRIS-Puffer: 264 mmol/L, pH 7,8 (37°C); L-Aspartat: 792 mmol/L; MDH (Mikroorganismen): a 24 pkat/L; LDH (Mikroorganismen): > 48 pkat/L; Albumin (Rind): 0,25 %; Konservierungsmittel
R2	Pyridoxalphosphat: 730 pmol/L; Zusatzstoffe; Konservierungsmittel
R3	NADH (Hefe): > 1,7 mmol/L; 2-Oxoglutarat: 94 mmol/L; Konservierungsmittel
Systemhinweis ASTLP (ACN 686): R1 befindet sich in Position A, R2 in Position B und R3 in Position C.	

Tabelle 13 Einstellungen der Messmethode.

Testdefinition			
Messart	Kinetik A		
Reaktionszeit/Messpunkte	10/54-70		
Wellenlänge (Neben/Haupt)	700/340 nm		
Reagenzpipettierung	Diluens (H ₂ O)		
R1	40 µL		
R2	20 µL	51 µL	
R3	20 µL		
Probenvolumen	Probe	20 µL	
		Probenverdünnung	
Normal	9 µL	Probe	Diluens (NaCl)
Reduziert	9 µL	15 µL	135 µL

2.8.4 Alkalische Phosphatase

2.8.4.1 Bestimmungsverfahren

Die Reaktion wurde nach einer standardisierten Methode durch die Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat erzielt. In Gegenwart von Magnesium und Zinkionen wurde durch die Anwesenheit von Phosphatasen p-Nitrophenylphosphat in Phosphat und p-Nitrophenol gespalten (Abbildung 13). Das freigesetzte p-Nitrophenol und dessen Farbintensität ist direkt proportional zur katalytischen ALP- Aktivität. Die ALP- Aktivität wurde durch photometrische Messungen der Farbintensität des p-Nitrophenols bei 450 nm bestimmt.

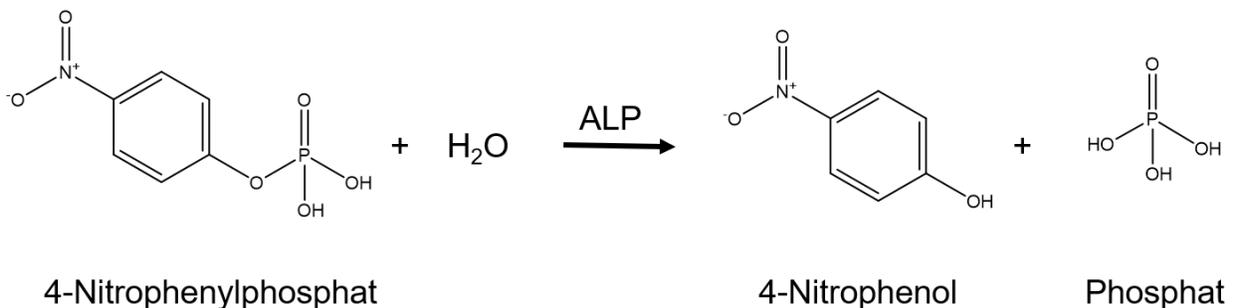


Abbildung 13 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.

2.8.4.2 Durchführung

Die Messung der ALP-Aktivität in Serumproben wurde automatisiert mit Hilfe des Cobas 6000 c501 durchgeführt. Für eine Messung wurde automatisiert Serumprobe aus einem Barcode-beschrifteten Röhrchen gezogen und mit verschiedenen zum Teil vorher verdünnten Reagenzien versetzt. Die Zusammensetzungen der Reagenzien R1 und R2 sind Tabelle 14 zu entnehmen. Die Einstellungen der Messmethode wurden vom Gerätehersteller übernommen (Tabelle 15). Demnach wurde ein Vorinkubationsmix erzeugt, indem 75 µL Reagenz R1 mit 25 µL Wasser versetzt wurden und anschließend 2,8 µL Probe dazugegeben wurden. Das in Reagenz 1 enthaltene Magnesium und Zink sorgt dafür, dass die katalytische Aktivität des Enzyms sichergestellt ist, da die prosthetischen Gruppen des Enzyms sowohl Magnesium als auch Zink enthalten. Nach der Vorinkubation von 2 min. 47 sec. wurden automatisiert 38 µL des verdünnten Reagenz 2, welches aus der vorangehenden Mischung von 21 µL Wasser und 17 µL Reagenz 2 resultierte, zum Vorinkubationsansatz gegeben. Die Zugabe von Nitrophenylphosphat aus Reagenz 2 sorgt für den Start der Messreaktion von 4 min. 10 sec. (Abbildung 13), da die ALP nun die Hydrolyse des Substrats durchführen kann. Die Abnahme der Nitrophenylphosphat-Konzentration im Reaktionsansatz wurde über die Absorptionzunahme bei 450 nm gemessen, welche proportional zur Enzymaktivität in der Probe ist. Die Analyse wurde in einem Messbereich von 5-1200 U/L durchgeführt. Serumproben mit höheren Aktivitäten wurden automatisch 1:5 verdünnt und erneut gemessen. Dafür wurden automatisiert 20 µL Probe mit 80 µL NaCl versetzt und 2,8 µL dieser Probenverdünnung analog zur unverdünnten Probe mit den Reagenzien versetzt und vermessen. Die Ergebnisse der erneut verdünnt gemessenen Proben wurden automatisch mit dem Faktor 5 multipliziert.

Tabelle 14 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase im Serum.

Reagenz	Beschreibung
R1	Amino-2-methyl-1 -propanol: 1,724 mol/L, pH 10,44 (30°C); Magnesiumacetat: 3,83 mmol/L; Zinksulfat: 0,766 mmol/L; N-(2-hydroxyethyl)-ethylendiamintriessigsäure: 3,83 mmol/L
R2	Nitrophenylphosphat: 132,8 mmol/L, pH 8,50 (25°C); Konservierungsmittel
Systemhinweis ALP2: R1 befindet sich in Position A, R2 in Position B	

Tabelle 15 Einstellungen der Messmethode.

Testdefinition			
Messart	Kinetik A		
Reaktionszeit/Messpunkte	10/19-48		
Wellenlänge (Neben/Haupt)	480/450 nm		
Reagenzpipettierung	Diluens (H ₂ O)		
R1	75 µL		
R2	17 µL	25 µL	
Probenvolumen	Probe	21 µL	
		Probenverdünnung	
Normal	2,8 µL	Probe	Diluens (NaCl)
Reduziert	2,8 µL	20 µL	80 µL

2.8.5 Gamma-Glutamyltransferase

2.8.5.1 Bestimmungsverfahren

Die γ -Glutamyltransferase überträgt die γ -Glutamylgruppe von L- γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid auf Glycylglycin (Abbildung 14). Die freigesetzte Menge des entstehenden Farbstoffs 5-Amino-2-nitrobenzoat ist proportional zur γ GT-Aktivität in der Probe. Der entstehende Farbstoff 5-Amino-2-nitrobenzoat wurde durch photometrische Messungen bei 415 nm bestimmt.

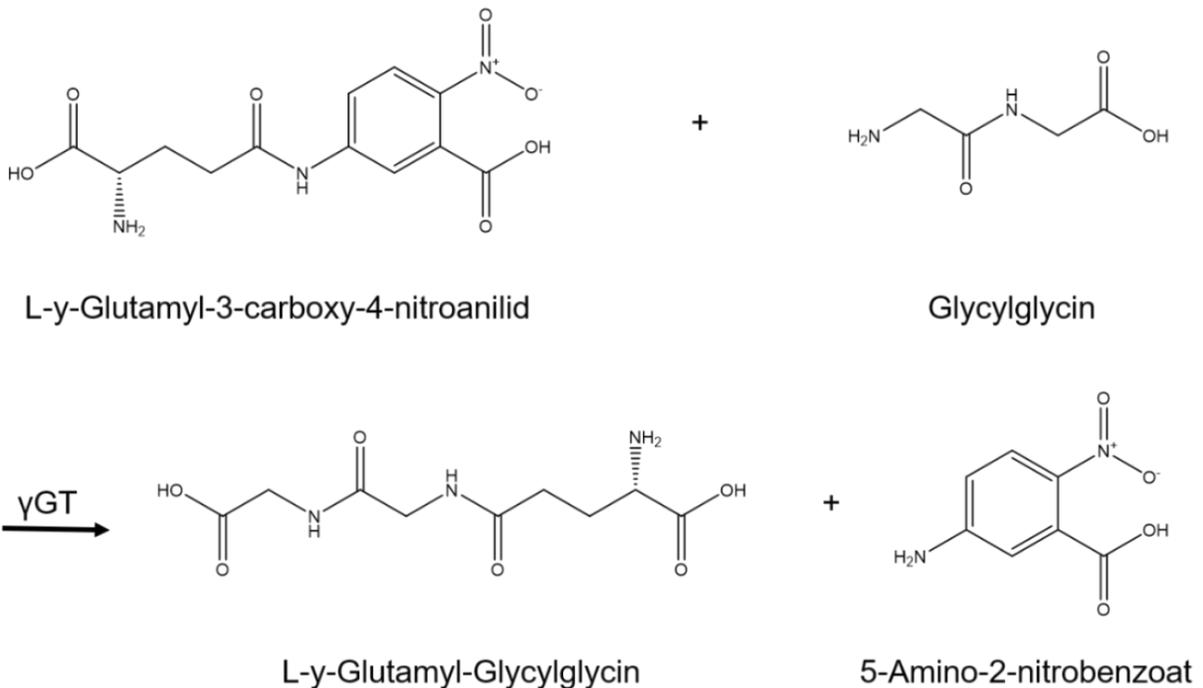


Abbildung 14 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.

2.8.5.2 Durchführung

Für eine Messung wurde automatisiert Serumprobe aus einem Barcode-beschrifteten Röhrchen gezogen und mit verschiedenen zum Teil vorher verdünnten Reagenzien versetzt. Die Zusammensetzungen der Reagenzien R1 und R2 sind Tabelle 16 zu entnehmen. Die Einstellungen der Messmethode wurden vom Gerätehersteller übernommen (Tabelle 17). Demnach wurde ein Vorinkubationsmix erzeugt, indem 25 µL Reagenz R1 mit 75 µL Wasser versetzt wurden und anschließend 3 µL Probe dazugegeben wurden. Nach der Vorinkubation von 2 min. 47 sec. wurden automatisiert 20 µL des unverdünnten Reagenz 2 zum Vorinkubationsansatz gegeben. Die Zugabe von γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid aus Reagenz 2 sorgt für den Start der Messreaktion für 5 min. 14 sec. (Abbildung 14), da die γ GT nun die Übertragung der γ -Glutamylgruppe durchführen kann. Die γ GT-Aktivität in der Probe wurde über die Absorptionzunahme bei 415 nm gemessen. Die Analyse wurde in einem Messbereich von 3-1200 U/L durchgeführt. Serumproben mit höheren Aktivitäten wurden automatisch 1:11 verdünnt und erneut gemessen. Dafür wurden automatisiert 15 µL Probe mit 150 µL NaCl versetzt und 3 µL dieser Probenverdünnung analog zur unverdünnten Probe mit den Reagenzien versetzt und vermessen. Die Ergebnisse der erneut verdünnt gemessenen Proben wurden automatisch mit dem Faktor 11 multipliziert.

Tabelle 16 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung der Gamma-Glutamyltransferase im Serum.

Reagenz	Beschreibung
R1	TRIS: 492 mmol/L, pH 8.25; Glycylglycin: 492 mmol/L; Konservierungsmittel; Zusatzstoff
R2	γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid: 22.5 mmol/L; Acetat: 10 mmol/L, pH 4.5; Stabilisator; Konservierungsmittel
Systemhinweis GGT12 (ACN220): R1 befindet sich in Position B, R2 in Position C	

Tabelle 17 Einstellungen der Messmethode.

Testdefinition			
Messart	Kinetik A		
Reaktionszeit/Messpunkte	10/19-56		
Wellenlänge (Neben/Haupt)	700/415 nm		
Reagenzpipettierung	Diluens (H ₂ O)		
R1	25 µL		
R2	20 µL	75 µL	
Probenvolumen	Probe	-	
		Probenverdünnung	
Normal	3 µL	Probe	Diluens (NaCl)
Reduziert	3 µL	15 µL	150 µL

2.8.6 Glutamat-Dehydrogenase

2.8.6.1 Bestimmungsverfahren

Das Enzym katalysiert die reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat zu Glutamat unter gleichzeitiger Oxidation von NADH (Abbildung 15). Die NADH-Abnahme ist direkt proportional zu der GLDH-Aktivität. Es wurde die Extinktionsabnahme von NADH bei 340 nm gemessen.

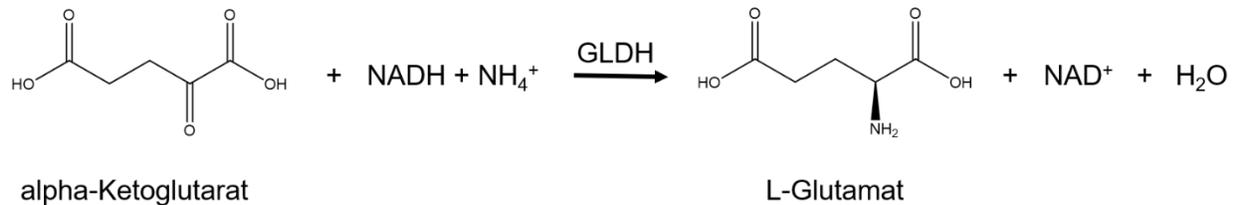


Abbildung 15 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.

2.8.6.2 Durchführung

Die Messung der GLDH -Aktivität in Serumproben wurde automatisiert mit Hilfe des Cobas 6000 c501 durchgeführt. Für eine Messung wurde automatisiert Serumprobe aus einem Barcode-beschrifteten Röhrchen gezogen und mit verschiedenen Reagenzien versetzt. Die Zusammensetzungen der Reagenzien R1 und R2 sind Tabelle 18 zu entnehmen. Die Einstellungen der Messmethode wurden vom Gerätehersteller übernommen (Tabelle 19). Demnach wurde ein Vorinkubationsmix erzeugt, indem 90 μL Reagenz R1 mit 12,5 μL Probe versetzt wurden. Nach der Vorinkubation von 2 min. 47 sec. wurden automatisiert 20 μL des unverdünnten Reagenz 2 zum Vorinkubationsansatz gegeben. Die Zugabe von α -Ketoglutarat aus Reagenz 2 sorgt für den Start der Messreaktion für 3 min. 54 sec. (Abbildung 15), da die GLDH nun die reduktive Aminierung des Substrats durchführen kann. Die GLDH-Aktivität in der Probe wurde über die Absorptionsabnahme bei 340 nm gemessen. Die Analyse wurde in einem Messbereich von 1-80 U/L durchgeführt. Serumproben mit höheren Aktivitäten wurden automatisch 1:5 verdünnt und erneut gemessen. Dafür wurden statt 12,5 μL nur 2,5 μL analog zur unverdünnten Probe mit den Reagenzien versetzt und vermessen. Die Ergebnisse der erneut verdünnt gemessenen Proben wurden automatisch mit dem Faktor 5 multipliziert.

Tabelle 18 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung der Glutamat-Dehydrogenase im Serum.

Reagenz	Beschreibung
R1	Triethanolamin-Puffer: 60 mmol/L, pH 8,0; EDTA: 3,1 mmol/L; Ammoniumacetat: 124 mmol/L; ADP: > 1,36 mmol/L; NADH (Hefe): 0,27 mmol/L; LDH (Kaninchenmuskel): > 45 pkat/L; Stabilisatoren; Konservierungsmittel
R2	Triethanolamin-Puffer: 8,6 mmol/L, pH 7,9; α -Ketoglutarat: 48 mmol/L; Stabilisatoren; Konservierungsmittel
Systemhinweis GLDH3 (ACN588): R1 befindet sich in Position A, R2 in Position B	

Tabelle 19 Einstellungen der Messmethode.

Testdefinition			
Messart	Kinetik A		
Reaktionszeit/Messpunkte	10/19-46		
Wellenlänge (Neben/Haupt)	700/340 nm		
Reagenzpipettierung	Diluens (H ₂ O)		
R1	90 μ L	-	
R2	20 μ L	-	
Probenvolumen	Probe	Probenverdünnung	
		Probe	Diluens (NaCl)
Normal	12,5 μ L	-	-
Reduziert	2,5 μ L	20 μ L	80 μ L

2.8.7 Bilirubin

2.8.7.1 Bestimmungsverfahren

Gesamtbilirubin wurde in Anwesenheit eines geeigneten Lösungsmittels mit 3,5-Dichlorphenyldiazonium in stark saurer Lösung zu Azobilirubin umgewandelt (Abbildung 16). Die Farbintensität des gebildeten roten Azofarbstoffs ist direkt proportional zum Gesamtbilirubin und wurde photometrisch bei 546 nm gemessen.

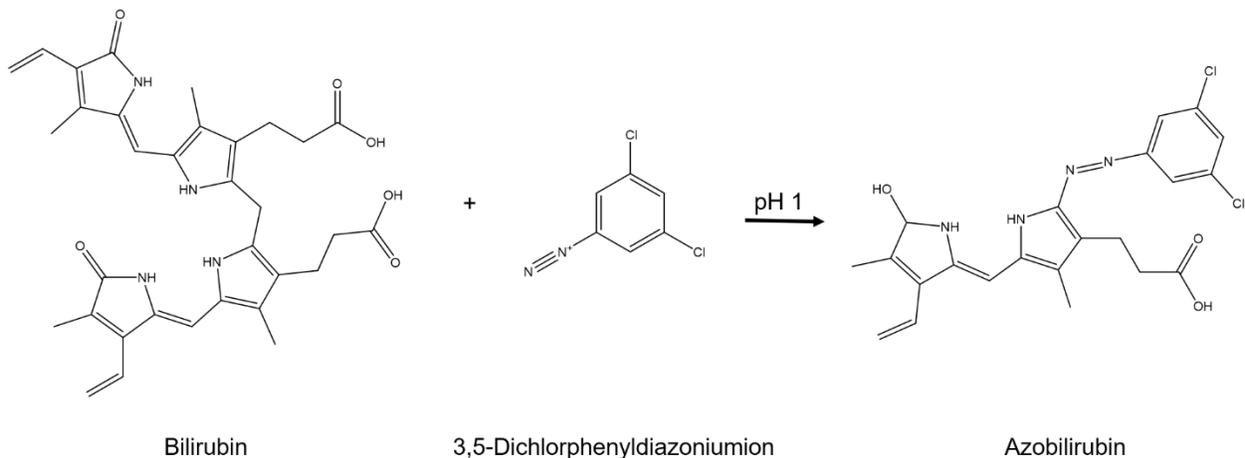


Abbildung 16 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.

2.8.7.2 Durchführung

Die Messung der Gesamtbilirubins-Konzentration in Serumproben wurde automatisiert mit Hilfe des Cobas 6000 c501 durchgeführt. Für eine Messung wurde automatisiert Serumprobe aus einem Barcode-beschrifteten Röhrchen gezogen und mit verschiedenen Reagenzien versetzt. Die Zusammensetzungen der Reagenzien R1 und R2 sind Tabelle 20 zu entnehmen. Die Einstellungen der Messmethode wurden vom Gerätehersteller übernommen (Tabelle 21). Demnach wurde ein Vorinkubationsmix erzeugt, indem 120 µL Reagenz R1 mit 2 µL Serumprobe versetzt wurden. Nach der Vorinkubation wurden automatisiert 24 µL des unverdünnten Reagenz 2 zum Vorinkubationsansatz gegeben. Die Zugabe von 3,5-Dichlorphenyldiazoniumsalz aus Reagenz 2 sorgt für den Start der Messreaktion (Abbildung 16 da das Gesamtbilirubin nun zum Azobilirubin umgewandelt werden kann. Die Gesamtbilirubin-Konzentration in der Probe wurde über die Absorptionzunahme bei 546 nm gemessen. Die Analyse wurde in einem Messbereich von 2,5-650 µmol/L durchgeführt. Die Bestimmungsgrenze wurde bei 2,5 µmol/L bestimmt. Die Bestimmungsgrenze entspricht der niedrigsten Gesamtbilirubin-Konzentration, die

reproduzierbar mit einem Gesamtfehler von 30 % gemessen wurde. Serumproben mit höheren Gesamtbilirubin-Konzentrationen als 650 µmol/L wurden automatisch durch das Messsystem verdünnt und in einer 1:2 Verdünnung gemessen. Dafür wurden automatisiert 15 µL Probe mit 105 µL NaCl versetzt und 8 µL dieser Probenverdünnung analog zur unverdünnten Probe mit den Reagenzien versetzt und vermessen. Die Ergebnisse der erneut verdünnt gemessenen Proben wurden automatisch mit dem Faktor 2 multipliziert.

Tabelle 20 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung von Gesamtbilirubin im Serum.

Reagenz	Beschreibung
R1	Phosphat: 25 mmol/L; Detergenzien; Stabilisatoren, pH 1,0
R2	3,5-Dichlorphenyldiazoniumsalz: ≥ 1,35 mmol/L
Systemhinweis BILT3 (ACN712): R1 befindet sich in Position B, R2 in Position C	

Tabelle 21 Einstellungen der Messmethode.

Testdefinition			
Messart	2-Punkt-End		
Reaktionszeit/Messpunkte	10/10-25 (STAT 4 / 10-25)		
Wellenlänge (Neben/Haupt)	600/546 nm		
Reagenzpipettierung	Diluens (H ₂ O)		
R1	120 µL	-	
R2	24 µL	-	
Probenvolumen	Probe	Probenverdünnung	
		Probe	Diluens (NaCl)
Normal	2 µL	-	-
Reduziert	8 µL	15 µL	105 µL

2.8.8 Cholesterin

2.8.8.1 Bestimmungsverfahren

Die Cholesterinester wurden durch die Anwesenheit der Cholesterinesterase (CE) in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Die Cholesterinoxidase (CHOD) katalysiert die Oxidation von Cholesterin zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid (Abbildung 17). Durch die katalytische Wirkung von vorhandener Peroxidase (POD) wird das entstandene Wasserstoffperoxid mit 4-Aminophenazon (4-AAP) und Phenol zu einem roten Chinoniminfarbstoff umgewandelt. Die Farbintensität des gebildeten Farbstoffes ist direkt proportional zur Cholesterinkonzentration. Gemessen wurde diese bei 505 nm.

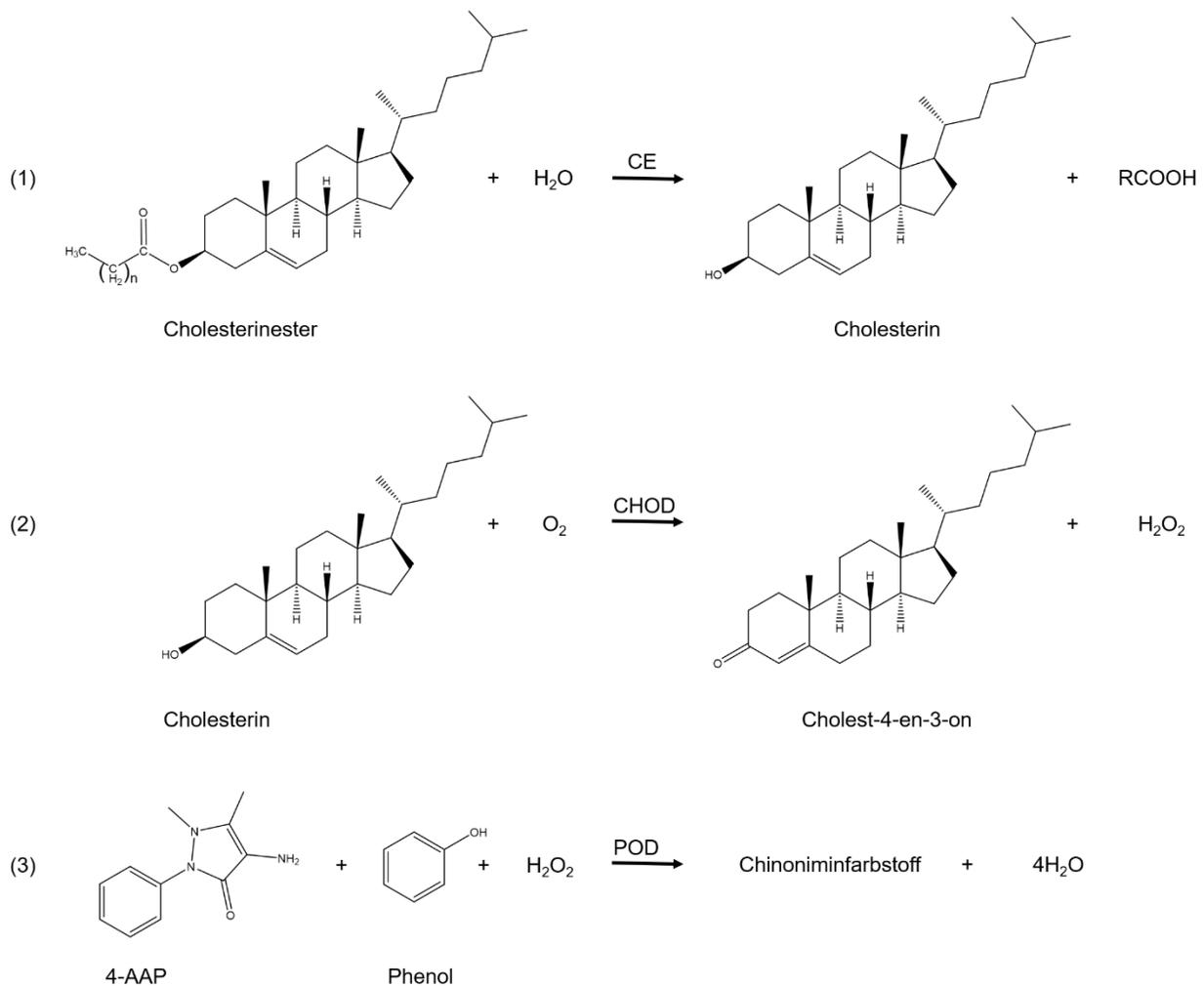


Abbildung 17 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.

2.8.8.2 Durchführung

Die Messung der Cholesterin-Konzentration in Serumproben wurde automatisiert mit Hilfe des Cobas 6000 c501 durchgeführt. Für eine Messung wurde automatisiert Serumprobe aus einem Barcode-beschrifteten Röhrchen gezogen und mit zuvor verdünntem Reagenz R1 versetzt. Die Zusammensetzungen des Reagenz R1 ist Tabelle 22 zu entnehmen. Die Einstellungen der Messmethode wurden vom Gerätehersteller übernommen (Tabelle 23). Demnach wurden 47 µL Reagenz R1 mit 93 µL Wasser versetzt und anschließend 2 µL Serumprobe hinzugegeben. Die Cholesterin-Konzentration in der Probe wurde über die Absorptionzunahme bei 505 nm nach 10 min. gemessen. Die Analyse wurde in einem Messbereich von 0,1-20,7 mmol/L durchgeführt. Serumproben mit höheren Cholesterin-Konzentrationen wurden automatisch durch das Messsystem 1:10 verdünnt erneut gemessen. Dafür wurden automatisiert 15 µL Probe mit 135 µL NaCl versetzt und 2 µL dieser Probenverdünnung analog zur unverdünnten Probe mit Reagenz R1 versetzt und vermessen. Die Ergebnisse der erneut verdünnt gemessenen Proben wurden automatisch mit dem Faktor 10 multipliziert.

Tabelle 22 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung von Cholesterin im Serum.

Reagenz	Beschreibung
R1	PIPES-Puffer: 225 mmol/L, pH 6,8; Mg ²⁺ : 10 mmol/L; Natriumcholat: 0,6 mmol/L; 4-Aminophenazon: > 0,45 mmol/L; Phenol: a 12.6 mmol/L; Fettalkoholpolyglykoether: 3 %; Cholesterinesterase (Pseudomonas spec.): > 25 µkat/L (> 1,5 U/mL); Cholesterinoxidase (E. coli): > 7,5 µkat/L (> 0,45 U/mL); Peroxidase (Meerrettich): > 12,5 µkat/L (> 0,75 U/mL); Stabilisatoren; Konservierungsmittel
Systemhinweis CHO2L (ACN798): R1 befindet sich in Position B	

Tabelle 23 Einstellungen der Messmethode.

Testdefinition			
Messart	1-Punkt		
Reaktionszeit/Messpunkte	10/70		
Wellenlänge (Neben/Haupt)	700/505 nm		
Reagenzpipettierung	Diluens (H ₂ O)		
R1	47 µL	93 µL	
Probenvolumen	Probe	Probenverdünnung	
		Probe	Diluens (NaCl)
Normal	2 µL	-	-
Reduziert	2 µL	15 µL	135 µL

2.8.9 Triglyzeride

2.8.9.1 Bestimmungsverfahren

Die Reaktion wurde durch Verwendung einer Lipoproteinlipase (LPL) aus Mikroorganismen zur schnellen und vollständigen Hydrolyse von Triglyzeriden zu Glycerin durchgeführt. In Anwesenheit von ATP und Glycerokinase (GK) wurde Glycerin in Glycerin-3-phosphat und ADP umgesetzt (Abbildung 18). Anschließend wurde das Glycerin-3-phosphat durch Oxidation und Glycerinphosphatoxidase (GPO) in Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid umgewandelt (Abbildung 18). Das entstandene Wasserstoffperoxid bildete unter der katalytischen Wirkung der Peroxidase (POD) mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol in einer Endpunktreaktion einen roten Farbstoff (4-(p-Benzochinon-monoimino) -phenazon). Die Farbintensität des gebildeten roten Farbstoffes ist direkt proportional zur Triglyzerid-Konzentration und wurde photometrisch bei 505 nm gemessen.

2.8.9.2 Durchführung

Die Messung der Triglyzerid-Konzentration in Serumproben wurde automatisiert mit Hilfe des Cobas 6000 c501 durchgeführt. Für eine Messung wurde automatisiert Serumprobe aus einem Barcode-beschrifteten Röhrchen gezogen und mit zuvor verdünntem Reagenz R1 versetzt. Die Zusammensetzungen des Reagenz R1 ist Tabelle 24 zu entnehmen. Die Einstellungen der Messmethode wurden vom Gerätehersteller übernommen (Tabelle 25). Demnach wurden 120 µL Reagenz R1 mit 28 µL Wasser versetzt und anschließend 2 µL Serumprobe hinzugegeben. Die Triglyzerid-Konzentration in der Probe wurde über die Absorptionzunahme bei 505 nm gemessen. Die Analyse wurde in einem Messbereich von 0,1-10,0 mmol/L durchgeführt. Serumproben mit höheren Triglyzerid-Konzentrationen wurden automatisch durch das Messsystem verdünnt und in einer 1:5 Verdünnung erneut gemessen. Dafür wurden automatisiert 15 µL Probe mit 135 µL NaCl versetzt und 4 µL dieser Probenverdünnung analog zur unverdünnten Probe mit Reagenz R1 versetzt und vermessen. Die Ergebnisse der erneut verdünnt gemessenen Proben wurden automatisch mit dem Faktor 5 multipliziert.

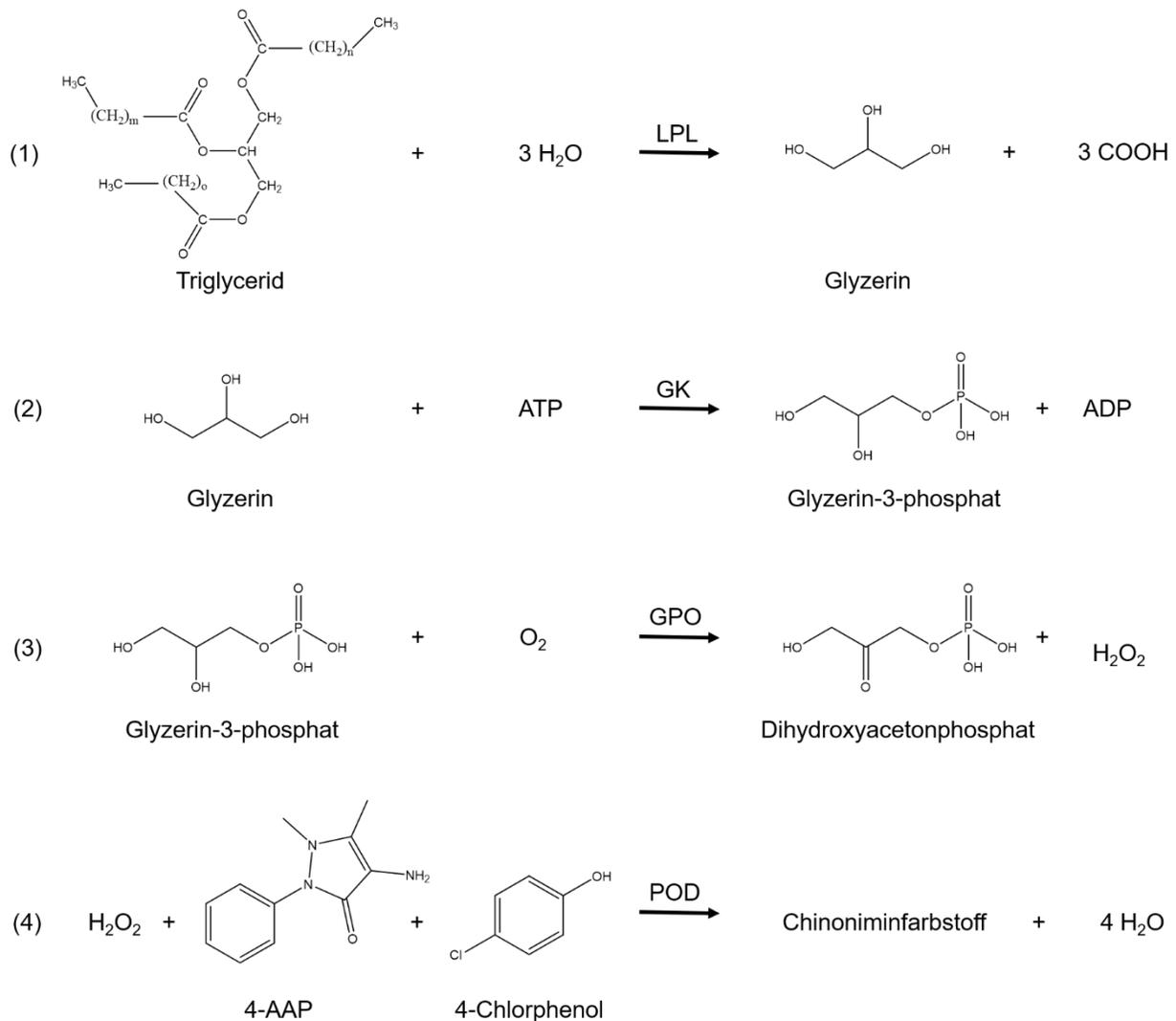


Abbildung 18 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.

Tabelle 24 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung von Triglyzeriden im Serum.

Reagenz	Beschreibung
R1	PIPES-Puffer: 50 mmol/L, pH 6,8; Mg ²⁺ : 40 mmol/L; Natriumcholat: 0,20 mmol/L; ATP: a 1.4 mmol/L; 4-Aminophenazon: > 0,13 mmol/L; 4-Chlorphenol: 4,7 mmol/L; Lipoproteinlipase (Pseudomonas spec.): > 83 pkat/L; Glycerokinase (Bacillus stearothermophilus): > 3 pkat/L; Glycerinphosphatoxidase (E. coli): > 41 pkat/L; Peroxidase (Meerrettich): > 1,6 pkat/L; Konservierungsmittel; Stabilisatoren
Systemhinweis TRIGL (ACN781): R1 befindet sich in Position B	

Tabelle 25 Einstellungen der Messmethode.

Testdefinition			
Messart	1-Punkt		
Reaktionszeit/Messpunkte	10/70		
Wellenlänge (Neben/Haupt)	700/505 nm		
Reagenzpipettierung	Diluens (H ₂ O)		
R1	120 µL	28 µL	
Probenvolumen	Probe	Probenverdünnung	
		Probe	Diluens (NaCl)
Normal	2 µL	-	-
Reduziert	4 µL	15 µL	135 µL

2.9 Histopathologie

Für die histopathologischen Untersuchungen wurden die Organe durch erfahrene Biologielaaboranten für die histologischen Untersuchungen vorbereitet. In den folgenden Abschnitten werden die standardisierten Arbeitsabläufe der Pathologie näher erläutert. Die histopathologischen Bewertungen erfolgten durch erfahrene Pathologen, (Dr. Elke Hartmann, Dr. Jakob Walter und Dr. Rainer Ernst, *Investigational Toxicology, Clinical Pathology*, Bayer AG Berlin/Wuppertal). Die Mikroskop-Aufnahmen wurden 20-fach vergrößert mit einer Skalierung von 50 µm. Die Art präsender histopathologischer Veränderungen, der Verlauf ihrer Entwicklung sowie der Schweregrad wurden entsprechend der Morphologie, beispielsweise nach Art und des Musters der Veränderung im Gewebe, charakterisiert. Die Einteilung der Schweregrade erfolgte abhängig davon, in wie vielen der definierten Regionen des Lebergewebes histologische Alterationen vorhanden waren, sowie nach der Art und Häufigkeit der Alteration. Hierbei wurde folgende Einteilung genutzt: Grad 0: abwesend, Grad 1: minimal, Grad 2: leicht, Grad 3: moderat, Grad 4: schwer, Grad 5: massiv.

2.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

2.9.1.1 Prinzip der Hämatoxylin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine einfache Übersichtsfärbung, bei der Hämatoxylin zur Färbung der Zellkerne und Eosin zur Färbung des Zytoplasmas dient. Dafür werden in Formalin-fixierte Präparate entwässert und in Paraffin eingebettet. Anschließend werden Gewebeschnitte angefertigt, die für die Färbung entparaffiniert und rehydriert werden.

Der natürliche Farbstoff Hämatoxylin bildet mit Aluminiumionen Hämalaun, das bei niedrigem pH-Wert einen positiv geladenen Metall-Hämatein-Komplex bildet. Im sauren Milieu bindet die Hämalaun an basophile Strukturen im Lebergewebe, wodurch eine rot-braune Färbung entsteht. Durch spülen mit Leitungswasser wird der pH-Wert angehoben, was einen Farbumschlag in die typisch blau-violette Farbe zur Folge hat. Da die Färbung bei höheren pH-Werten schlecht löslich ist, wird sie durch den Spülvorgang mit Leitungswasser gleichzeitig fixiert. Der synthetische Farbstoff Eosin ist negativ geladen und kann dadurch an azidophile Strukturen binden. Durch diesen Färbeschritt werden die azidophile Strukturen in verschiedenen Rottönen angefärbt. Nach Abschluss des Färbeprozesses werden die Präparatschnitte mit einer in der Konzentration aufsteigenden EtOH-Reihe entwässert und geklärt. Danach erfolgt die Eindeckung, wodurch die präparierten Schnitte vor mechanischer Zerstörung geschützt werden.

2.9.1.2 Durchführung der Hämatoxylin-Färbung

Nach der Organentnahme wurde das Lebergewebe in eine Dicke von 0,5 cm geschnitten und in neutral gepufferten Formalin fixiert. Durch die Fixierung wurden die nach dem Tode einsetzenden autolytischen Prozesse gestoppt und die Zell- und Gewebestrukturen für die histopathologische Untersuchung in möglichst natürlichem Zustand erhalten. Die Zusammensetzung des neutralgepufferten Formalin wurde in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26 Zusammensetzung des neutralgepufferten Formalin.

Mischungsverhältnis	1. Formaldehydlösung (37 – 40 %)	200 mL
	2. VE-Wasser	1800 mL
	3. Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, Art. Nr. 1.06346)	8.0 g
	4. di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei (Merck, Art. Nr. 1.06586)	13.0 g
	5. auf pH 7 mit 1 M Natronlauge einstellen	
Haltbarkeit	12 Monate	
Fixierungsdauer	mindestens 1 Tag oder länger bei Raumtemperatur	
Spülen	unter fließendem Wasser ½ bis 4 Stunden	
Entwässerung	ab 70 % Ethanol	

Das Lebergewebe wurde in Kunststoffkassetten eingelegt und darin vor dem Einbetten ausgewaschen, um das Fixierungsmittel zu entfernen. Ausgewaschen wurden die Proben dreimal mit PBS für 30 Minuten. Die Gewebeproben wurden im Entwässerungsautomaten in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, mit dem Intermedium Xylol durchtränkt und schließlich mit Paraffin eingegossen, ausgerichtet und kurz gekühlt. Nach dem Erstarren des Paraffins auf der Kühlplatte der Ausgießstation wurde der Gewebeblock in die Mikrotom-Halterung zum Schneiden eingesetzt. Pro Paraffinblock wurde ein Schnitt von 2 - 6 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden mit angefeuchtetem Pinsel vom Messer abgenommen und im Wasserbad (VE-Wasser) bei 40 - 48°C gestreckt. Zum Aufziehen der Schnitte aus dem Wasserbad wurden gereinigte und geschliffene Objektträger mit Mattrand (Fa. Menzel) benutzt. Dabei wurde ein Schnitt pro Organblock aufgezogen. Vor dem Färben wurden die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur oder im Wärmeschrank bei 40°- 60°C getrocknet.

Die Herstellung der Färbelösung und die Durchführung der Färbung ist in den folgenden Schritten zusammengefasst:

- a) 1 g Hämatoxylin (Hämatoxylin-Monohydrat, Fa. Merck) wurde in 1000 mL VE-Wasser gelöst. 0,2 g Natriumjodat (NaJO_3) und 50 g Kaliumaluminiumsulfat ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$) wurden hinzugegeben und gelöst. Dabei wurde die Lösung blaviolett.
- b) 50 g Chloralhydrat und 1g Zitronensäure wurden anschließend in a) gelöst. Dabei ergab sich eine Farbänderung nach rotviolett. Dies entsprach der gebrauchsfertigen Hämatoxylin-Färbelösung (Farbindex Hämatoxylin: CI – Nr. 75 290).
- c) Für die Herstellung Eosin-Lösung wurden 400 mg Eosin (Eosin, gelblich, Fa. Merck) in 100 mL 60 %-igem Ethanol gelöst. Für die Gebrauchslösung wurden 0.1 mL Eisessig p.A. zu 100 mL Farblösung mit hinzugegeben (Farbindex Eosin: CI – Nr. 45 380).

Die Proben wurden manuell gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und durch die absteigende Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt. Anschließend wurde mit der Hämatoxylin-Eosin Färbung nach Mayer gefärbt. Dabei wurden die Schnitte für 10 min in die Hämatoxylin-Gebrauchslösung gelegt und anschließend mit Wasser und Ethanol (60%) gespült. Daraufhin erfolgte die Färbung mit der Eosin-Gebrauchslösung für 2 min. Im Anschluss wurden die Schnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe bis ins Xylol konserviert. Mithilfe eines Deckglases und Eukitt wurden die gefärbten Schnitte eingedeckt. Die Arbeitsschritte zur Färbung wurden in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Manuelle Färbung).

Arbeitsschritt	Beschreibung	Dauer
1.	Entparaffinieren in Xylol	10 min
2.	2x Spülen in Isopropanol	
3.	Spülen in 96 %igem Ethanol	
4.	Spülen in 80 %igem Ethanol	
5.	Spülen in 70 %igem Ethanol	
6.	Spülen in 50 %igem Ethanol	
7.	Spülen in VE-Wasser	
8.	Färben in Hämalan nach Mayer (eigene Herstellung)	10 min
9.	Bläuen in fließendem Wasser	10 min
10.	Spülen in 60 %igem Ethanol	
11.	Färben in 0.4 %iger alkoholischer Eosin-Gebrauchslösung	1 – 2 min
12.	Spülen in 60 %igem Ethanol	
13.	Spülen in 70 %igem Ethanol	
14.	Spülen in 80 %igem Ethanol	
15.	Spülen in 96 %igem Ethanol	
16.	2x Spülen in Isopropanol	
17.	2x Spülen in Xylol	
18.	Eindecken in Eukitt	

2.9.2 Lipidnachweis mit Oelrot O

2.9.2.1 Prinzip der Oelrot O-Färbung

Für den Nachweis einer Steatose im Lebergewebe wurden die Lipide in den Zellen des Lebergewebes mithilfe des Azofarbstoffes Oelrot O angefärbt. Der Farbstoff Oelrot O ist lipophil

und diffundiert auf Grund des Lösungsverhaltens zu den Gewebelipiden, welche nach Anlagerung von Oelrot O unter dem Mikroskop rot dargestellt werden.

2.9.2.2 Durchführung der Oelrot O-Färbung

Für die Untersuchungen von Lipiden im Lebergewebe (Steatose) wurden Gefrierschnitte erstellt. Dafür wurden die in neutralgepufferten Formalin fixierten, zugeschnittenen Gewebeproben in Kunststoffkassetten bzw. Metallkapseln $\frac{1}{2}$ - 1 Stunde mit Leitungswasser gewässert. Auf dem Gefriertisch des Gefriermikrotoms (Fa. Leitz) wurden die Proben mit Hilfe des Gefriergeräts ("Kryofix") schnell tiefgefroren. Zum Schneiden wurden 12 cm lange c-Messer benutzt, die Schnittdicke beträgt 8 - 12 μm . Die Schneidetemperatur betrug -18° bis -25°C . Die Schnitte wurden mit einem angefeuchteten Pinsel vom Messer abgenommen und zur Streckung in VE-Wasser überführt. Die Gefrierschnitte wurden in die Färbelösung eingetaucht, bewegt (schwimmend angefärbt) und anschließend aufgezogen. Die gefärbten Präparate wurden eingedeckt. Zusätzliche Schnitte zur Färbekontrolle wurden auf Anweisung des Pathologen mitgeführt. Die Herstellung der Färbelösung und die Durchführung der Färbung ist in den folgenden Schritten zusammengefasst.

Es wurde eine Hämatoxylin-Lösung nach Mayer (Medite®) genutzt. Die gebrauchsfertige Lösung wurde durch Einwaage von 500 g Hämatoxylin-Lösung nach Mayer (Medite®) und Zugabe von 500 mL VE-Wasser hergestellt. In einem zweiten Schritt wurde die Oelrot-O-Lösung angesetzt. Hierzu wurden zu 60 mL Triethylphosphat 40 mL VE-Wasser zugeben und 1 g Oelrot-O hinzugefügt. Die Oelrot-O-Lösung wurde auf dem Magnetrührer 5 Minuten gekocht. Anschließend wurde die Lösung erst heiß und noch einmal kalt filtriert.

Die Proben wurden manuell gefärbt. Hierzu wurden die Gefrierschnitte in VE-Wasser eingetaucht und anschließend mit 60%igen Triethylphosphat gespült. Anschließend wurde die Schnitte in Oelrot-Lösung eingetaucht und bewegt, dadurch wurde ein optimales Färbeergebnis erzielt. Nach dem Färbevorgang wurde erneut zweimal mit 60%igen Triethylphosphat gespült. Nach spülen der Schnitte mit VE-Wasser wurde eine Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer durchgeführt. Die Schnitte wurden zweimal mit Leitungswasser gespült und anschließend mit VE-Wasser. Nach aufziehen der Schnitte auf den Objektträger wurden mit Glyceringelantine eingedeckt. Die Arbeitsschritte zur Färbung wurden in Tabelle 28 zusammengefasst. Als Ergebnis zeigten sich unter dem Mikroskop gefärbte Lipide rot und Zellkerne blau.

Tabelle 28 Färben von fixierten Gefrierschnitten.

Arbeitsschritt	Beschreibung	Dauer
1.	Gefrierschnitte in VE-Wasser bringen	
2.	Spülen in 60 %igem Triethylphosphat	
3.	Färben in Oelrot-O-Lösung	15 min
4.	2x spülen in 60 %igem Triethylphosphat	je 15 sec
5.	Spülen in VE-Wasser	
6.	Kernfärbung in Hämatoxylin-Lösung nach Mayer	
7.	2x spülen in Leitungswasser	
8.	Spülen in VE-Wasser	
9.	Aufziehen der Schnitte auf Objektträger (Schnitte dürfen nicht austrocknen!)	
10.	Eindecken mit Glyceringelatine	

2.10 Instrumentelle Analytik

2.10.1 Allgemeine Beschreibung zur Gallensäure-Quantifizierung

Die quantitative Analytik erfolgte nach der Methode von der Biocrates Lifescience AG und wurde für die im Folgenden beschriebenen Matrices etabliert und validiert. Bei der Methode des quantitativen Nachweises von endogenen Gallensäuren aus den Proben der tierexperimentellen Studien wurde die Konzentration von 20 individuellen Gallensäuren (Tabelle 32) in verschiedenen Matrices (Plasma, Leber, Zellkulturmedium) quantitativ bestimmt. Für die Analyse in verschiedenen Matrices (Plasma, Lebergewebe, Zellkulturüberstand) wurden die Gallensäuren durch Flüssigkeitschromatographie auf einer Trennsäule mit einer Umkehrphase (Biocrates Lifescience AG, Art. Nr. 9120052120868) und hohem Systemdruck (> 400 bar) aufgetrennt. Im Massenspektrometer wurden mittels *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), für jeden Analyten 2 spezifische Übergänge für jede zur Detektion genutzt.

In den folgenden Abschnitten werden die Systemkonfigurationen der LC-MS/MS Methode näher erläutert. Zur Generierung verlässlicher Analysedaten erfolgte eine Validierung der quantitativen Methode zur Analyse von individuellen Gallensäuren im Lebergewebe, Plasma und Zellkulturmedium. 100 µL Plasma wurde von jeweils fünf männlichen und weiblichen Han-Wistar-Ratten gewonnen. Zur Validierung der Matrix Leber wurde ein Teil des linken Leberlappens verwendet. Für das *In-vitro*-Zellkultursystem der primären Rattenhepatozyten in *Sandwich*-Kulturen diente konditioniertes William's Medium E (Zellkulturüberstände) als Matrix für die Validierung.

Für die LC-MS/MS-Analysen wurden die Proben in eine 96 *Deep-Well*-Platte (Nunc® 96 DeepWell™, Biocrates Lifescience AG, Innsbruck) mit einer installierten Kombifilterplatte gegeben, die nach der Aufarbeitung entfernt wurde. Die versiegelte Platte wurde für die Analyse verwendet (Abbildung 19).

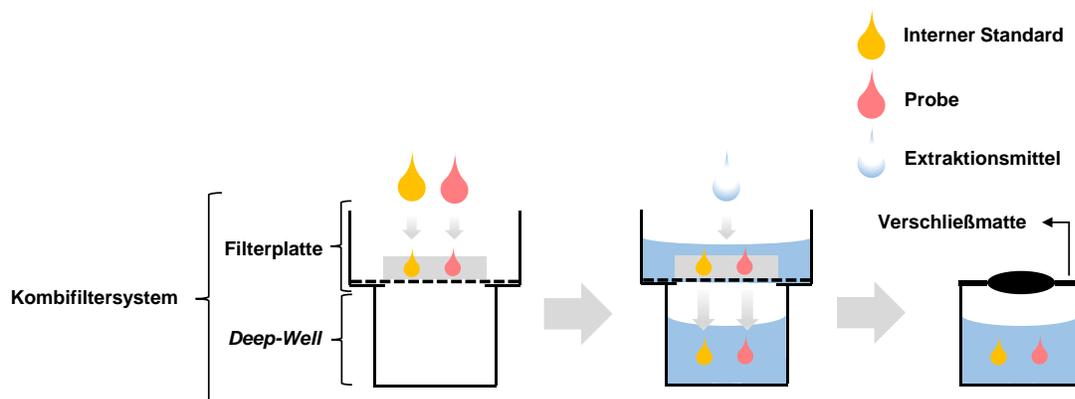


Abbildung 19 Prinzip des Kombifiltersystems einer 96-Deep Well Platte.

2.10.2 Chromatographie und Konfiguration des Massenspektrometers

Für die Trennung individueller Gallensäuren wurde eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie (UPLC) an zwei UPLC-Systemen (Shimadzu Nexera X2, Agilent Infinity 1290) durchgeführt. Die Trennsäule (Biocrates Lifescience AG, Art. Nr. 9120052120868) wurde mit einer Vorsäule von Phenomenex (SecurityGuard™ ULTRA Cartridges UHPLC C18 2,1 mm) verwendet. Als Laufmittel A (500 mL) diente eine Mischung aus 475 mL MiliQ Wasser, 25 mL einer 200 mM Ammoniumacetatlösung und 75 µL Ameisensäure. Laufmittel B bestand aus 150 mL Methanol, 325 mL Acetonitril, 25 mL einer 200 mM Ammoniumacetatlösung und 75 µL Ameisensäure. Um Kontaminationen oder Verschleppungen während der Analysen zu vermeiden, wurde eine 500 mL Waschlösung für den Autosampler aus Acetonitril/Methanol/Isopropanol/Wasser (1:1:1:1) hergestellt. Der Gradient ist in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29 Gradient der Laufmittelzusammensetzung zur chromatographischen Trennung der Gallensäuren.

Zeit (min)	Flussrate (mL/min)	A (%)	B (%)
0,00	0,50	65	35
0,00	0,50	65	35
0,25	0,50	65	35
0,35	0,50	60	40
1,90	0,80	55	45
2,10	0,80	45	55
3,30	1,00	35	65
3,50	1,00	0	100
4,00	1,00	0	100
4,10	0,90	65	35
5,00	0,50	65	35

Das UPLC-System wurde mit einem Massenspektrometer (ABSciex 5500 QTrap, Darmstadt, Deutschland) gekoppelt. Die einzelnen Ionenquellenparameter wurden in Tabelle 30 zusammengefasst. Es wurde im *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) gemessen (Tabelle 31).

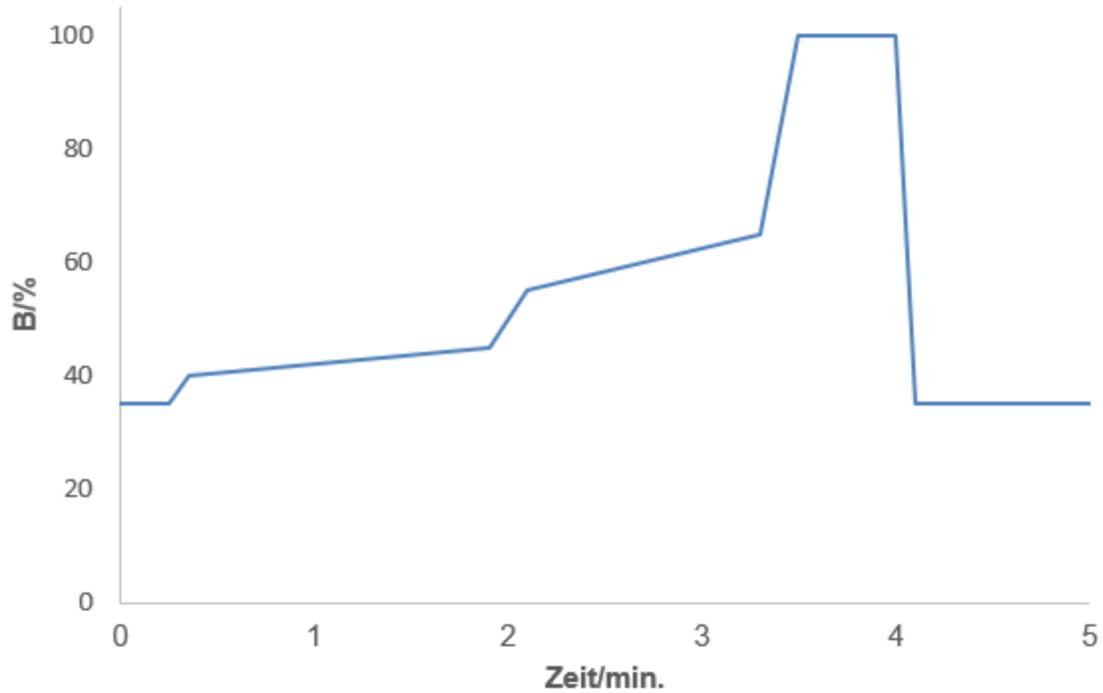


Abbildung 20 Laufmittel-Gradient am Beispiel von Laufmittel B (unpolar) über die Trennzeit von 5 min.

Tabelle 30 Ionenquellen-Parameter des 5500 SCIEX QTrap Massenspektrometers.

Ionenquellen-Parameter	
Entrance Potential (EP)	-10
Curtain Gas (CUR)	30
Collision Gas (CAD)	Medium
IonSpray Voltage (IS)	-4500
Temperature (TEM)	600
Ion Source Gas (GS1)	60
Ion Source Gas (GS2)	40
Interface Heater (ihe)	On

Tabelle 31 Übergänge aller Gallensäuren im *Multiple Reaction Monitoring*.

Q1 Masse (Da)	Q3 Masse (Da)	RT	ID	DP	EP	CE	CXP
375.3	375.3	3.8	LCA	-135	-10	-12	-13
379.3	379.3	3.8	d4-LCA	-135	-10	-12	-13
391.3	345.3	3.4	DCA_3	-125	-10	-46	-11
391.3	391.3	3.4	CDCA/DCA	-125	-10	-14	-3
391.4	391.3	2.6	UDCA/HDCA	-130	-10	-14	-13
395.3	395.3	2.6	d4-HDCA(b)	-130	-10	-14	-13
396.3	396.3	3.3	d5-CDCA	-125	-10	-14	-3
407.3	343.3	2.7	CA_2	-130	-10	-46	-11
407.3	407.3	2.1	MCA	-130	-10	-18	-13
407.4	407.3	2.7	CA	-130	-10	-12	-13
412.3	348.3	2.7	d5-CA_2	-130	-10	-46	-11
412.3	412.3	2.7	d5-CA	-130	-10	-12	-13
432.3	74	2.9	GLCA_2	-120	-10	-64	-13
432.3	432.3	2.9	GLCA	-120	-10	-14	-13
435.3	375.3	3.8	LCA_2	-40	-10	-34	-11
436.3	74	2.9	d4-GLCA_2	-120	-10	-64	-13
436.3	436.3	2.9	d4-GLCA	-120	-10	-16	-13
439.3	379.3	3.8	d4-LCA_2	-40	-10	-34	-11
448.3	74	2.5	GCDCA_2/GDCA_2	-120	-10	-64	-13
448.3	448.3	2.5	GCDCA/GDCA	-120	-10	-14	-13
448.4	74	1.4	GUDCA_2	-120	-10	-64	-5
448.4	448.3	1.4	GUDCA	-120	-10	-12	-15
451.3	391.3	3.4	CDCA_2/DCA_2	-35	-10	-14	-13
451.4	391.3	2.6	UDCA_2/HDCA_2	-35	-10	-34	-13
452.3	74	1.4	d4-GUDCA_2	-120	-10	-64	-5
452.3	452.3	1.4	d4-GUDCA	-120	-10	-12	-15
455.4	395.3	2.6	d4-HDCA(b)_2	-35	-10	-34	-13
456.3	396.3	3.3	d5-CDCA_2	-35	-10	-14	-3
464.3	74	1.6	GCA_2	-120	-10	-70	-3
464.3	464.3	1.6	GCA	-120	-10	-16	-29
467.3	407.3	2.1	MCA_2	-50	-10	-32	-13
469.3	74	1.6	d5-GCA_2	-120	-10	-70	-3

Tabelle 31 Übergänge aller Gallensäuren im *Multiple Reaction Monitoring* (weitergeführt).

Q1 Masse (Da)	Q3 Masse (Da)	RT	ID	DP	EP	CE	CXP
469.3	469.3	1.6	d5-GCA	-120	-10	-12	-17
482.3	80	2.9	TLCA_2	-175	-10	-104	-7
482.3	482.3	2.9	TLCA	-175	-10	-16	-17
498.3	80	2.5	TCDCA_2/TDCA_2	-180	-10	-105	-10
498.3	498.3	2.5	TCDCA/TDCA	-180	-10	-14	-17
498.4	80	1.4	TUDCA_2	-180	-10	-100	-15
498.4	498.3	1.4	TUDCA	-180	-10	-14	-17
503.3	80	2.4	d5-TCDCA_2	-180	-10	-105	-10
503.3	503.3	2.4	d5-TCDCA	-180	-10	-14	-17
503.4	80	1.4	d5-TUDCA_2	-180	-10	-100	-15
503.4	503.3	1.4	d5-TUDCA	-180	-10	-14	-17
514.3	80	1.6	TCA_2	-180	-10	-105	-10
514.3	514.3	1.6	TCA	-180	-10	-18	-19
514.4	80	0.9	TMCA(a+b) 2	-180	-10	-105	-10
514.4	514.3	0.9	TMCA(a+b)	-180	-10	-18	-19
519.3	80	1.6	d5-TCA_2	-180	-10	-105	-10
519.3	519.3	1.6	d5-TCA	-180	-10	-18	-19

2.10.3 Kalibrierung mit Standardlösungen und internem Standard

Eine Kalibrierung wurde mittels sieben unterschiedlich konzentrierter Gallensäure-Standardlösungen durchgeführt. Hierzu wurden gebrauchsfertige Standards verwendet. Für die Berechnung der Gallensäure-Konzentrationen wurden Isotopen-markierte interne Standards genutzt (Tabelle 32). Die errechneten Verhältnisse der *Peak*-Flächen von Analyten (Gallensäure) und internem Standard wurden gegen die bekannten Konzentrationen der Analyten aufgetragen. Für die Experimente wurde eine Mischung aus internen Standards in 1200 µL Methanol gelöst und für 10 s auf dem Vortex durchmischt. In jedes der sieben Kalibriergefäße wurden 200 µL einer Mischung aus Methanol/Wasser (50:50) zugegeben und 10 s mit dem Vortex durchmischt. Alle Röhrchen wurden für 10 min bei 650 rpm auf dem Eppendorf Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) geschüttelt. Die genutzte quadratische Kalibrierfunktion für die Gallensäuren-Bestimmung spiegelt das Kalibriermodell der Methode wider (Tabelle 32).

Tabelle 32 Kalibrierreihe der Standards und internen Standards für die Gallensäure-Quantifizierung.
Abkürzungen: Cal1-Cal 7: Kalibrierstandardkonzentration 1-7 in $\mu\text{mol/L}$, RT: Retentionszeit.

Gallensäuren	RT/min	Konzentration/ $\mu\text{mol/L}$							Interner Standard	Regression
		Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6	Cal7		
CA	2,65	0,03	0,06	0,3	3,75	15	37,5	75	CA-d5	quadratisch (1/x)
CDCA	3,30	0,02	0,04	0,2	1,5	6	15	30	CDCA-d5	quadratisch (1/x)
DCA	3,40	0,02	0,04	0,2	0,5	2	5	10	CDCA-d5	quadratisch (1/x)
GCA	1,50	0,03	0,06	0,3	3,75	15	37,5	75	GCA-d5	quadratisch (1/x)
GCDCA	2,30	0,02	0,04	0,2	1	4	10	20	GLCA-d4	quadratisch (1/x)
GDCA	2,45	0,01	0,02	0,1	0,5	2	5	10	GLCA-d4	quadratisch (1/x)
GLCA	2,85	0,01	0,02	0,1	0,25	1	2,5	5	GLCA-d4	quadratisch (1/x)
GUDCA	1,25	0,01	0,02	0,1	0,5	2	5	10	GUDCA-d4	quadratisch (1/x)
HDCA	2,65	0,01	0,02	0,1	0,25	1	2,5	5	HDCA(b)-d4	quadratisch (1/x)
LCA	3,80	0,01	0,02	0,1	0,25	1	2,5	5	LCA-d4	quadratisch (1/x)
MCA(a)	1,90	0,005	0,01	0,05	0,25	1	2,5	5	CA-d5	quadratisch (1/x)
MCA(b)	2,10	0,01	0,02	0,1	0,5	2	5	10	CA-d5	quadratisch (1/x)
MCA(o)	1,85	0,005	0,01	0,05	0,25	1	2,5	5	CA-d5	quadratisch (1/x)
TCA	1,50	0,02	0,04	0,2	2,5	10	25	50	TCA-d5	quadratisch (1/x)
TCDCa	2,35	0,01	0,02	0,1	1	4	10	20	TCDCa-d5	quadratisch (1/x)
TDCA	2,45	0,01	0,02	0,1	0,5	2	5	10	TCDCa-d5	quadratisch (1/x)
TLCA	2,85	0,01	0,02	0,1	0,25	1	2,5	5	GLCA-d4	quadratisch (1/x)
TMCA(a+b)	0,85	0,01	0,02	0,1	0,5	2	5	10	TUDCA-d5	quadratisch (1/x)
TUDCA	1,30	0,01	0,02	0,1	0,75	3	7,5	15	TUDCA-d5	quadratisch (1/x)
UDCA	2,60	0,02	0,04	0,2	1,5	6	15	30	HDCA(b)-d4	quadratisch (1/x)

2.10.4 Analytische Qualitätssicherung

Für eine Absicherung der Qualität der analytischen Methode wurden Qualitätskontrollen (QC) in die Analyse integriert. Hierbei handelt es sich um drei gebrauchsfertige Gallensäure-Proben (QC1 – QC3) mit von den Kalibrierstandards abweichenden Konzentrationen (Tabelle 33). Zu den QC-Proben wurden jeweils 150 μL VE-Wasser pipettiert und für 10 s auf dem Vortex durchmischt. Danach wurden die QCs für 10 min bei 650 rpm auf dem Eppendorf Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) geschüttelt.

Tabelle 33 Konzentration der biologischen Qualitätskontrollen (QC) für die individuellen Gallensäuren.

Gallensäuren	Konzentration/ $\mu\text{mol/L}$			Gallensäuren	Konzentration/ $\mu\text{mol/L}$		
	QC1	QC2	QC3		QC1	QC2	QC3
CA	0,142	3,68	34,5	MCA(a)	0,024	0,24	2,2
CDCA	0,090	1,41	14,6	MCA(b)	0,045	0,47	4,5
DCA	0,093	0,47	4,8	MCA(o)	0,024	0,25	2,2
GCA	0,138	3,37	31,7	TCA	0,096	2,45	21,9
GCDCA	0,090	0,93	9,6	TCDCa	0,045	0,94	9,4
GDCA	0,057	0,50	5,3	TDCA	0,041	0,47	5,1
GLCA	0,049	0,23	2,5	TLCA	0,048	0,23	2,4
GUDCA	0,047	0,48	4,8	TMCA(a+b)	0,039	0,40	4,6
HDCA	0,049	0,24	2,6	TUDCA	0,044	0,71	6,9
LCA	0,036	0,23	2,4	UDCA	0,087	1,43	16,2

2.10.5 Probenaufarbeitung und Vorbereitung für die UHPLC-MS/MS

2.10.5.1 Plasma

1mL Vollblut wurde von jeweils fünf männlichen und fünf weiblichen Han-Wistar-Ratten in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen abgenommen und direkt auf Eis (4 °C) gelagert. Nach Zentrifugation (2750 rpm, 5 min) der Vollblutproben wurde der Überstand, ca. 800 μL Plasma, abgenommen. Es wurden jeweils 3 Aliquote von Plasmapools (je 1 mL) aus den gewonnenen Proben erstellt. Hierzu wurden jeweils 100 μL von jeder Rattenplasmaprobe (5 Männchen, 5 Weibchen) gemischt. Durch Aufstockung des Plasmapools mit Standardkonzentrationen (Cal 3- Cal 5, Tabelle 32) wurde die Reproduzierbarkeit der Methode sichergestellt. Die drei erzeugten Aliquote wurden bis zum Analysetag bei -80 °C eingelagert. Für die Analyse wurden die Aliquote langsam auf Eis (4 °C) aufgetaut und bei 4400 rpm 2 min (4 °C) zentrifugiert. Danach waren die Plasmaproben bereit für die LC-MS/MS-Messungen. Ein Zyklus-Test zur Gefrier- bzw. Auftaustabilität wurde nicht durchgeführt. Dieser wurde bereits durch den Hersteller ausgeführt. Eine Stabilität der Gallensäuren in biologischen Proben wurde hierzu über 3 Gefrier-/ Auftauzyklen gewährleistet. Des Weiteren wurden keine signifikanten Konzentrationsveränderungen bei einer Lagerzeit von 72 Stunden bei 4°C ermittelt. Nach einer Lagerzeit von 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde ebenfalls keine Konzentrationsveränderungen festgestellt.

2.10.5.2 Lebergewebe

Zur Analyse des Lebergewebes wurde unbehandelten Ratten während der Sektion der linke und mittlere Leberlappen entfernt, gewogen und direkt in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren. Für die Extraktion wurde das Gewebe mit einem Extraktionsmittel versetzt (6 µL Methanol/Wasser (80:20) pro mg Gewebe). Für die standardisierte Homogenisierung (dreifacher Homogenisier-Zyklus (30 s, 7500 rpm) mit Interim-Kühlphasen (2 min) auf Trockeneis (-80 °C)) wurde ein *Precellys Evolution Tissue Homogenizer* (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) genutzt. Nach der Homogenisierung wurde das Leberextrakt bei 4400 rpm 5 min (4 °C) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein Eppendorf-Röhrchen transferiert. Wie bei den Plasmaproben wurde auch bei den Leberextrakten (700 µL) ein Proben-*Pool* aus allen Ratten erstellt, auf drei Aliquote aufgeteilt und bis zum Analysentag bei -80 °C eingelagert. Für die Analyse wurde ein Aliquot langsam auf Eis (4 °C) aufgetaut und bei 4400 rpm 5 min (4 °C) zentrifugiert. Danach waren die Extrakte bereit für die LC-MS/MS-Messungen.

2.10.5.3 Zellkulturmedium

Als Zellkulturmedium wurde Williams' Medium E (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) benutzt. Mehrere Aliquote (500 µL) wurden für 1 h bei -80 °C gelagert und im Anschluss für mindestens 24 h gefriergetrocknet. Nach Trocknung der Flüssigkeit wurde der Rückstand in 100 µL Methanol gelöst, 10 s auf dem Vortex durchmischt und im Anschluss auf dem Eppendorf-Thermomixer 10 min geschüttelt. Der gelöste Rückstand wurde danach bei 8000 rpm 5 min (4 °C) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen pipettiert. Die Proben wurden bis zum Analysetag bei -80 °C eingelagert.

2.10.6 Experimentelle Vorbereitung UHPLC-MS/MS Analyse

Es wurde eine 96-*Well* Kombifilterplatte für die Probenaufarbeitung genutzt. Hierzu wurden jeweils 10 µL interner Standardmix auf die Filter der 96-*Well*-Platte pipettiert, mit Ausnahme des *Blank* (A1). Anschließend wurde die Platte unter Stickstoffstrom für 5 min getrocknet (*Waters Positiv Pressure*, 40 psi). Danach erfolgte das Pipettieren von jeweils 10 µL Probenflüssigkeit (*Blank*, *Zero Blank*, Standards (CAL), QCs, Plasmaproben, Gewebeextrakte, Zellkulturmedium) nach vorheriger Festlegung der Position (Tabelle 5). Die aufgetragenen Proben wurden erneut unter Stickstoffstrom (*Waters Positiv Pressure*, 40 psi) für 20 min getrocknet. Danach wurden 100 µL Extraktionsmittel (Methanol 100%) pro Filterwell aufgetragen. Nach einer Durchmischung (20 min, 650 rpm, Eppendorf ThermoMixer) wurden die Extrakte mittels Stickstoffstrom in die

darunterliegende *Deep-Well*-Platte eluiert (*Waters Positive Pressure*, 12 psi). Die Platte wurde versiegelt und für 5 min bei 450 rpm (Eppendorf ThermoMixer) geschüttelt. Abschließend wurde die *Deep-Well*-Platte im *Autosampler* positioniert und die Proben analysiert.

2.10.7 Probenvorbereitung der Matrixvalidierung für Gallensäuren

Für die Etablierung einer reproduzierbaren und verlässlichen Methode zur Quantifizierung einzelner Gallensäuren wurden drei Matrices (Plasma, Lebergewebe, Zellkulturüberstand) validiert. Eine genaue Beschreibung der Validierung nach EMEA-Richtlinie ist im Anhang angefügt (Abschnitte 9.1.1 – 9.1.6). Hierbei wurde für alle Matrices das gleiche Schema auf der *96-DeepWell* Platte genutzt (Tabelle 34).

Für die Bestimmung des Kalibriermodells der Messmethode wurde eine Kalibriergerade mit 7 Kalibrierstandards (Tabelle 32) gemäß Methodenvorschrift (Abschnitt 2.10.3) erstellt. Es wurden mindestens 3 Injektionen aller Kalibrierstandards durchgeführt. Die erhaltenen Peakflächen (Areas) wurden gegen die Konzentration aufgetragen. Mittels quadratischer Regression wurde die Kalibriergerade ermittelt. Der Y-Achsenabschnitt, die Steigung und das Bestimmtheitsmaß (R^2) wurden berechnet. Außerdem wurde die tatsächliche Konzentration der einzelnen Standards rückberechnet. Folgende Akzeptanzkriterien wurden für die Kalibriergerade festgelegt,

- Bestimmtheitsmaß (R^2) $\geq 0,990$.
- Abweichung der rückberechneten Konzentrationswerte von der tatsächlichen Konzentration um weniger als $\pm 20\%$ für Standard 1 und $\pm 15\%$ für Standard 2 -7. Es müssen mindestens 5 Standardkonzentrationen zur Bestimmung verwendet werden.

Für die Richtigkeit und Präzision der verwendeten Qualitätskontrollen (QC1-QC3) innerhalb einer Messung wurden die QC-Lösungen (Tabelle 33) gemäß Methodenvorschrift (Abschnitt 2.10.4) erstellt. Es wurden mindestens 3 Injektionen aller Qualitätskontrollen durchgeführt. Die tatsächliche Konzentration der einzelnen QCs wurde rückberechnet. Folgende Akzeptanzkriterien wurden für die Qualitätskontrollen festgelegt,

- Die Mittelwerte der Wiederfindung sollen bei 80%-120% (QC1) und 15%-115% (QC2/QC3) der nominalen Konzentration liegen.
- Die relative Standardabweichung vom Mittelwert der Mehrfachbestimmung soll $\leq 20\%$ (QC1) und $\leq 15\%$ (QC2/QC3) sein.

Es wurden Verdünnungen (1:2, 1:5) gepoolter Proben durchgeführt, um zu zeigen, dass eine Messprobe, die eine Messkonzentration außerhalb des validierten Bereichs aufweist, durch eine bestimmte Verdünnung in den messbaren Bereich gebracht werden kann. Es wurden mindesten

5 Injektionen gepoolter Proben durchgeführt. Folgende Akzeptanzkriterien wurden für die Verdünnungen festgelegt,

- Die Mittelwerte der Wiederfindung sollen bei 15%-115% (Pool 1:2, Pool 1:5) der nominalen Konzentration liegen.
- Die relative Standardabweichung vom Mittelwert der Mehrfachbestimmung $\leq 15\%$ (Pool 1:2, Pool 1:5) sein.

Für die Richtigkeit, Präzision und Selektivität wurden Plasmapoolproben mit Kalibrierkonzentrationen (Cal 2- Cal 5, Tabelle 32) aufgestockt. Es wurden 4 Injektionen pro Plasmapool mit Kalibrierstandard durchgeführt. Die tatsächliche Konzentration der einzelnen Plasmapools mit Kalibrierstandard wurde rückberechnet. Folgende Akzeptanzkriterien wurden für die Richtigkeit und Präzision festgelegt,

- Die Mittelwerte der Wiederfindung soll für alle gemessenen Proben bei 15%-115% der nominalen Konzentration liegen.
- Die relative Standardabweichung vom Mittelwert der Mehrfachbestimmung soll $\leq 15\%$ sein.
- Die Spezifität der Messmethode ist durch die Einhaltung der oben definierten Akzeptanzkriterien erfüllt.

Die Bestimmungsgrenze wurde bereits durch den Hersteller ermittelt und ergibt sich aus dem kleinsten Standard der Kalibrierkurve. Das Akzeptanzkriterium für die Bestimmungsgrenze ist erfüllt, wenn der Standard 1 mit ausreichender Richtigkeit (80%-120% Wiederfindung) und Präzision ($RSD \leq 20\%$) bestimmt werden kann. Die Bestimmungsgrenze wurde auf den nächst höheren Standard angepasst, wenn das Akzeptanzkriterium von Standard 1 nicht erfüllt wurde. Zum Beleg der Reproduzierbarkeit und analytischen Verlässlichkeit der Messmethode wurden die Validierungsexperimente an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

Tabelle 34 Pipettierschema einer 96-Deep-Well-Platte zur Validierung der Gallensäure-haltigen Matrices.

96 well-plate							
	1	2	3	4	5	6	7
A	Blank	Cal 7	Pool	Pool (1:5)	QC 2	Pool + Cal 3	Pool + Cal 4
B	Methanol	QC 1	Pool	Pool (1:5)	Pool + Cal 2	Pool + Cal 3	Pool + Cal 5
C	Cal 1	QC 2	Pool (1:2)	Pool (1:5)	Pool + Cal 2	Pool + Cal 3	Pool + Cal 5
D	Cal 2	QC 3	Pool (1:2)	Pool (1:5)	Pool + Cal 2	Pool + Cal 4	Pool + Cal 5
E	Cal 3	Pool	Pool (1:2)	Pool (1:5)	Pool + Cal 2	Pool + Cal 4	Pool + Cal 5
F	Cal 4	Pool	Pool (1:2)	Pool (1:5)	Pool + Cal 3	Pool + Cal 4	QC 2
G	Cal 5	Pool	Pool (1:2)	Pool + Cal 2	Pool + Cal 3	Pool + Cal 4	Pool + Cal 5
H	Cal 6	Pool	Pool (1:2)	Pool + Cal 2	Pool + Cal 3	Pool + Cal 4	Pool + Cal 5

2.11 Quantifizierung von RNA mittels QuantiGene® *Multiplex Assay*

2.11.1 Herangehensweise und Auswahl der Gene

Für die Analyse der Expression von Genen, die essentielle Funktionen im Metabolismus von Gallensäuren übernehmen, wurde Lebergewebe von mit Hepatotoxinen behandelten männlichen und weiblichen Ratten mit Hilfe des QuantiGene® *Plex Assay* (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA) untersucht. Mit der Methode können bis zu 80 Messenger RNA-(mRNA) Spezies in jedem der 96 *Wells* auf einer Platte bestimmt werden. Zur Auswahl der Gene wurde im Vorfeld eine Literaturrecherche durchgeführt. Die Auswahlkriterien wurden für die Analyse der Gene auf drei generelle Funktionen, die Biosynthese, die Regulation und den Transport von Gallensäuren festgelegt. Die Biosynthese wurde u. a. mit Enzymen, die z. B. bei der Bildung von primären Gallensäuren von essentieller Bedeutung sind, wie CYP7A1, CYP27A1, CYP7B1 und CYP8B1 näher untersucht. Die Regulation der Homöostase von Gallensäurekonzentrationen im Hepatozyten durch Einflüsse auf die Biosynthese und die Transportwegen von Gallensäuren wurde u.a. über FXR, LXR und CAR näher untersucht (Tabelle 35). Die Transportsysteme, die den Efflux aus dem Hepatozyten, sowie die Aufnahme von Gallensäuren in den Hepatozyten übernehmen, wurden u. a. über die Familie der MDR- und MRP-Transporter näher erforscht. Zusammen wurden für die Analyse des Leberhomogenat 37 Gene ausgewählt (Tabelle 35).

2.11.2 Allgemeines Funktionsprinzip eines *Multiplex Assays*

Die *Multiplex*-Technologie des QuantiGene *Plex Assays* ermöglicht eine simultane Analyse von verschiedenen RNA-Molekülen aus einem kleinen Probenvolumen auf einer 96-*Well*-Platte. Zur Markierung der RNA-Moleküle werden Mikrosphären mit individueller Eigenfluoreszenz verwendet (*Capture Beads*). Durch abgestufte Mischverhältnisse fluoreszierender Farbtöne entstehen 80 farblich unterschiedliche Mikrosphären, die gemeinsam in einer Probe verwendet werden können. An diese Mikrosphären (*Capture Beads*) können über *Capture Probes* (CPs) spezifische RNA-Moleküle binden. Ein spezielles SONDENSET (*Probe Set*) bestehend aus synthetischen Oligonukleotiden unterstützt die Hybridisierungsreaktion im Aufarbeitungsprozess. Dabei werden drei Arten von Sonden verwendet, deren Sequenz auf der Basis der Ziel-RNA beruht. Um die Ziel-RNA auf den *Capture Probes* (CP) zu immobilisieren, binden *Capture Extender* (CE) zu einer Hälfte sequenzspezifisch die Ziel-RNA, zur anderen Hälfte *Capture Probes* (CP). Zusätzlich binden *Label Extender* (LE) erneut komplementär einen Teil der Ziel-RNA und zur anderen Hälfte Signalverstärker (*Pre-Amplifier*).

Tabelle 35 Ausgewählte Gene mit wichtiger Funktion im Gallensäure-Metabolismus.

Gen	Beschreibung	Funktion	Literatur
ABCD3	<i>ATP-binding cassette, sub-family D, member 3</i>	Biosynthese	(Baes <i>et al.</i> , 2016; Hylemon <i>et al.</i> , 2017)
ACOT8	<i>Acyl-CoA Thioesterase 8</i>	Biosynthese	(Baes, <i>et al.</i> , 2016)
ACOX2	<i>Acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain</i>	Biosynthese	(Baes, <i>et al.</i> , 2016)
AMACR	<i>Alpha-methylacyl-CoA-Racemase</i>	Biosynthese	(Baes, <i>et al.</i> , 2016)
BAAT	<i>Bile acid-CoA: amino acid N-acyltransferase</i>	Biosynthese	(Baes, <i>et al.</i> , 2016)
CYP27A1	<i>Cytochrom P450, family 27, sub-family a, polypeptide 1</i>	Biosynthese	(Hylemon, <i>et al.</i> , 2017; Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
CYP7a1	<i>Cytochrom P450, family 7, sub-family a, polypeptide 1</i>	Biosynthese	(Hylemon, <i>et al.</i> , 2017; Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
CYP7b1	<i>Cytochrom P450, family 7, sub-family b, polypeptide 1</i>	Biosynthese	(Hylemon, <i>et al.</i> , 2017; Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
CYP8b1	<i>Cytochrom P450, family 8, sub-family b, polypeptide 1</i>	Biosynthese	(Hylemon, <i>et al.</i> , 2017; Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
SCPx	<i>Sterol carrier protein x</i>	Biosynthese	(Baes, <i>et al.</i> , 2016)
HNF4	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha</i>	Regulation	(Cariello <i>et al.</i> , 2017; Lickteig <i>et al.</i> , 2016)
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>	Regulation	(Lickteig, <i>et al.</i> , 2016; Schaap <i>et al.</i> , 2014)
FXR	<i>Farnesoid-X-Rezeptor</i>	Regulation	(Cariello, <i>et al.</i> , 2017; Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
LXR	<i>Liver X receptor</i>	Regulation	(Nemes <i>et al.</i> , 2016)
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>	Regulation	(Begrliche, <i>et al.</i> , 2011)
PPAR α	<i>Peroxisome proliferator activated receptor alpha</i>	Regulation	(Baes, <i>et al.</i> , 2016; Zhao <i>et al.</i> , 2017)
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>	Regulation	(Begrliche, <i>et al.</i> , 2011; Schaap, <i>et al.</i> , 2014)
SHP	<i>Small heterodimer partner</i>	Regulation	(Schaap, <i>et al.</i> , 2014)
Srebp1c	<i>Sterol regulatory element-binding transcription factor 1</i>	Regulation	(Begrliche, <i>et al.</i> , 2011)
ABCG5	<i>ATP-binding cassette, sub-family G, member 5</i>	Transport	(Hylemon, <i>et al.</i> , 2017)
ABCG8	<i>ATP-binding cassette, sub-family G, member 8</i>	Transport	(Hylemon, <i>et al.</i> , 2017)
ASBT	<i>Apical sodium–bile acid transporter</i>	Transport	(Cariello, <i>et al.</i> , 2017; Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>	Transport	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
BSEP	<i>Bile Salt Export Pump</i>	Transport	(Cariello, <i>et al.</i> , 2017; Cepa <i>et al.</i> , 2018; Hylemon, <i>et al.</i> , 2017)
MDR1a	<i>Multidrug-Resistance-Protein 1a</i>	Transport	(Cariello, <i>et al.</i> , 2017; Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
MDR1b	<i>Multidrug-Resistance-Protein 1b</i>	Transport	(Cariello, <i>et al.</i> , 2017; Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
MDR2/3	<i>Multidrug-Resistance-Protein 2/3</i>	Transport	(Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
MRP2	<i>Multidrug Resistance-Related Protein 2</i>	Transport	(Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
MRP3	<i>Multidrug Resistance-Related Protein 3</i>	Transport	(Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
MRP4	<i>Multidrug Resistance-Related Protein 4</i>	Transport	(Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
NTCP	<i>Sodium/taurocholate cotransporting polypeptide</i>	Transport	(Cariello, <i>et al.</i> , 2017; Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
OATP1	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide 1</i>	Transport	(Zhao, <i>et al.</i> , 2017)
OATP2	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide 2</i>	Transport	(Ferdinandusse <i>et al.</i> , 2006)
OATP4	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide 4</i>	Transport	(Zhao, <i>et al.</i> , 2017)
OATPB	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide b</i>	Transport	(Slijepcevic <i>et al.</i> , 2017)
OSTalpha	<i>Organic Solute Transporter alpha</i>	Transport	(Cariello, <i>et al.</i> , 2017; Schadt, <i>et al.</i> , 2016)
OSTbeta	<i>Organic Solute Transporter beta</i>	Transport	(Cariello, <i>et al.</i> , 2017; Schadt, <i>et al.</i> , 2016)

Um sequenzspezifische Bindungen zu verhindern bzw. unspezifische Hybridisierungen zu reduzieren, binden Blockierungssonden (*Blocker Probe*, BP) an umgebende Sequenzen der RNA und werden nicht von den CEs und LEs erkannt. Für die Signalamplifikation werden *Amplifier* und biotinylierte Sonden genutzt, die durch Bindung an die *Label Extender* (LE) vermitteln (bDNA). Jede Amplifikationseinheit enthält Bindungsstellen für die biotinylierten Sonden (*Label Probe*), die das Substrat von Phycoerythrin-gekoppeltem Streptavidin (SAPE) binden (Abbildung 21). Die durchflusszytometrische Analyse erfolgt an einem *Multiplex-Array-Luminex*-Durchflussanalysegerät (Luminex Bio-Plex 200) mit zwei Lasern. Der erste Laser detektiert das Phycoerythrin-Signal des SAPE (Quantität), der zweite die Eigenfluoreszenz der Mikrosphären (Qualität), sodass beide Signale einander zugeordnet werden können. Durch das Mischungsverhältnis der Farbtöne können die Mikrosphären und damit die SAPE-Signale individuell detektiert werden.

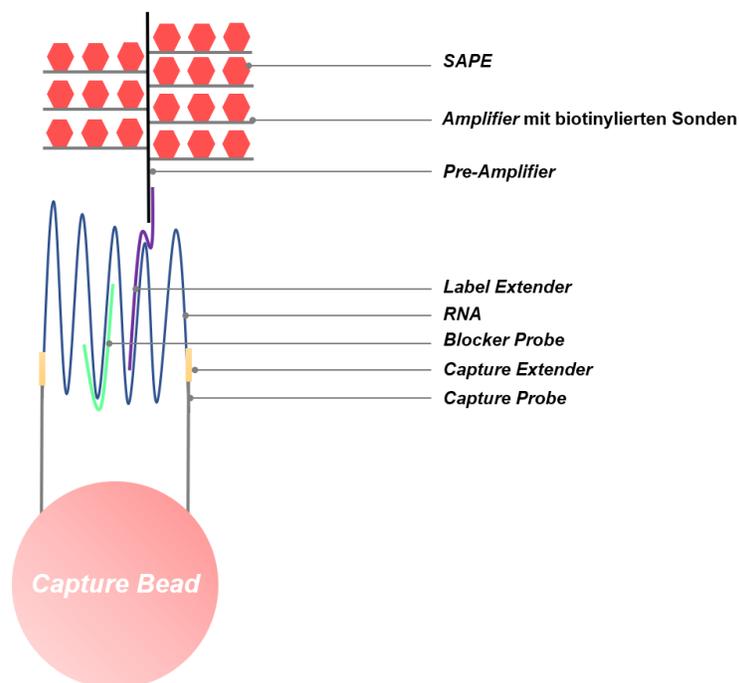


Abbildung 21 Prinzip des QuantiGene Plex Assay, angelehnt an (ThermoFischer, 2018).

2.11.3 Vorbereitung der Leberhomogenate zur Extraktion der RNA

Für die Quantifizierung der Genexpression wurden 10 mg Leber pro Ratte in ein Probenröhrchen (Typ: FastPrep™ *Lysing Matrix D*, MP Biomed, 6913-1000) eingewogen. Anschließend wurde eine Arbeitslösung (260 µL Homogenisierungslösung und 40 µL Proteinase K) zugegeben und

die Proben wurden durch einen Homogenisierer (Typ: Precellys Evolution, bertin Technologies) automatisch bei 8500 rpm 30 s homogenisiert. Danach wurden die Proben kurz auf Trockeneis gekühlt und erneut homogenisiert. Nach insgesamt drei Zyklen wurde das Homogenat bei 13300 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Probenröhrchen pipettiert und bei 65 °C 30 min bei 400 rpm (Eppendorf ThermoMixer C) inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Homogenat erneut bei 13300 rpm 15 min zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Probenröhrchen transferiert. Das Homogenat wurde bis zur Verwendung bei -80 °C eingelagert.

2.11.4 Hybridisierungsreaktion spezifischer RNA

Die eingefrorenen Homogenate wurden aufgetaut und für 30 min bei 37°C (Eppendorf ThermoMixer C) inkubiert. Währenddessen wurde der Mikroplatteninkubator (VorTemp™ 56, Labnet International) auf 54°C temperiert. Die Arbeitslösung mit allen Reagenzien für die Inkubationsphase (nukleasefreies Wasser, Lysepuffer (bei 37 °C für 30 min im Wasserbad vorgewärmt), *Blocking Reagent*, Proteinase K, Mikrosphären und *Probe Set*) wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Die Arbeitslösung wurde vor dem Pipettieren für 10 s auf dem Vortex geschüttelt. In jedes der 96 *Wells* der Hybridisierungsplatte wurden 60 µL Arbeitslösung und 40 µL Proben gegeben. Die Platte wurde versiegelt und für 22 h bei 54 °C (600 rpm) im VorTemp™ inkubiert.

2.11.5 Signalamplifikation spezifischer RNA

Vor der Messung wurden die Signale amplifiziert. Die *Pre-Amplifier*, *Amplifier* und *Label-Probe*-Lösung wurden bei 37 °C 30 min im Wasser vorgewärmt, um mögliche Präzipitate zu lösen. Das SAPE-Lösungsmittel wurde auf Raumtemperatur gebracht. Eine Waschpufferlösung aus 0,6 mL Pufferkomponente 1, 10 mL Pufferkomponente 2 und 189 mL nukleasefreiem Wasser wurde erstellt. Die Hybridisierungsplatte wurde aus dem VorTemp™ entfernt und der Inkubator wurde neu temperiert (50 °C). Um die magnetischen Mikrosphären in den *Wells* möglichst verlustfrei zu waschen, wurde die Hybridisierungsplatte abgekühlt, bei 240 x g 1 min zentrifugiert, in eine magnetische Separationsplatte eingesetzt und dann entsiegelt. Nach 1 min hatten sich die magnetischen Mikrosphären sichtbar am Plattenboden angereichert. Das Reagenz wurde durch schnelles Invertieren der eingespannten Platte entfernt. Danach wurden die *Wells* mit 100 µL Waschpufferlösung gewaschen. Nach einer Absetzzeit von 15 s wurde die Waschlösung wieder durch Invertieren der Platte entfernt. Dieser Waschvorgang wurde dreimal durchgeführt. Danach wurden 100 µL *Pre-Amplifier* pro *Well* zugegeben. Nach der Versiegelung wurde die

Hybridisierungsplatte von der magnetischen Separationsplatte entfernt. Die Platte wurde bei 800 rpm 1 min bei Raumtemperatur (Eppendorf ThermoMixer C) geschüttelt und im Anschluss für 1 h im neu temperierten VorTemp™ (50 °C) bei 600 rpm inkubiert. Danach wurde die Platte erneut dreimal gewaschen. Die Inkubationen mit dem *Amplifier* und anschließend der *Label-Probe Lösung* erfolgten inklusive der Waschschriffe nach dem beim *Pre-Amplifier* beschriebenen Muster. Währenddessen wurde das SAPE-Reagenz (36 µL SAPE gelöst in 12 mL SAPE Verdünnungsreagenz) vorbereitet und lichtgeschützt aufbewahrt. Die Bedingungen der folgenden Inkubation mit dem SAPE-Reagenz entsprachen wiederum den Abläufen bei der *Pre-Amplifier*-Inkubation. Allerdings wurde beim Waschschriff SAPE-Waschpuffer anstatt Waschpuffer verwendet. Anschließend wurde 180 µL SAPE-Waschpuffer pro *Well* hinzugegeben. Die versiegelte Platte wurde vom magnetischen Plattenhalter entfernt und bei 800 rpm (Eppendorf ThermoMixer C) und Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Platte im 96-Well-Mikroplatten-Reader (Bio-Plex® 200 System, Bio-Rad) gemessen.

2.11.6 Visualisierung der MultPlex Daten

Für die Ermittlung der Genexpression wurde ein *Fold Change* berechnet. Dazu wurde für jede Einzelbestimmung innerhalb einer Behandlungs- bzw. Vehikelgruppe das arithmetische Mittel des Detektionssignals gebildet und dieses vom arithmetischen Mittel des Hintergrundsignals (*Blank*) für jedes einzelne Gen substrahiert. Zur Normalisierung der RNA-Mengen wurden spezifische *Housekeeper*-Gene (POLR2A, ACTB) verwendet. Die Signale der biologischen Proben, die bereits auf den *Blank* korrigiert waren, wurden auf die Referenzgene normalisiert. Anschließend wurden die normalisierten Werte für die Behandlungsgruppen durch die normalisierten Werte der Vehikelgruppen dividiert, um den *Fold Change* zu ermitteln. Damit eine Bewertung relevanter Gene im Metabolismus von Gallensäure durchgeführt werden kann, wurden die Expressionen der Gene in Bezug auf Veränderung folgendermaßen definiert:

- Das Gen ist vermehrt exprimiert (> 1) gegenüber der Kontrolle.
- Das Gen ist vermindert exprimiert (< 1) gegenüber der Kontrolle.

Die erzielten Ergebnisse der detektierten Gene wurden in der Form von *Heat Maps* dargestellt. Die *Heat Maps* wurden mit Hilfe von Microsoft EXCEL erstellt.

2.12 Analyse der Genexpression mittels Affymetrix Microarrays

2.12.1 Herangehensweise und Auswahl der Gene

Die Daten zur Genexpression basieren auf einer Studie der Bayer AG an männlichen Wistar-Ratten. Hierbei wurde durch die Verabreichung von Methapyrilen (Geschäftszeichen G0259/05) eine Lebernekrose mit einhergehenden hepatobiliärer Schädigungen induziert (Pavkovic, 2014). Für die Analyse der Genexpression im Gewebe wurde ein RAE230_2.0 GeneChip® Microarray von Affymetrix genutzt. Diese Chips enthalten über 28000 annotierte Ratten Gene. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Genexpressionsdaten hinsichtlich der Metapyrilen-induzierten Wirkung auf die Expression von essentiellen Genen des Gallensäuremetabolismus untersucht. Dabei wurden in dem vorhandenen Datensatz relevante Gene der Biosynthese, des Transports und der hepatischen Regulation von Gallensäuren (Tabelle 35) gesucht.

2.12.2 Durchführung der Analyse der Genexpression im Lebergewebe

Damit die isolierte mRNA mittels Microarrays gemessen werden konnte, musste sie zunächst eine reverse Transkription durchlaufen, bei der eine cDNA synthetisiert und ein T7Promotor eingebaut wurde. Anschließend ermöglichte dieser Schritt eine *In-vitro* Transkription (IVT), welche Biotin-markierte amplifizierte RNA (aRNA) produzierte. Es erfolgte eine Aufreinigung und Fragmentierung der aRNA und im Anschluss wurde diese auf einen Microarray aufgetragen. Auf dem Microarray wurde die aRNA mit den entsprechenden Oligonukleotide hybridisiert. Die Hybridisierung wurde mittels Phycoerythrin-gekoppelten Streptavidin Antikörper-Färbung und Fluoreszenzlasermessung nachgewiesen (Pavkovic, 2014).

Für die reverse Transkription wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Die Gesamt-RNA wurde bei -80°C eingefroren, für 20 min. gefriergetrocknet und anschließend in 3 µL RNase freiem Wasser gelöst. Als Labelling-Kontrolle wurde 2 µL einer 1:100000 verdünnten Poly-A-RNA-Kontrolle hinzugegeben. Gemäß Affymetrix Protokoll wurde eine Einzelstrangsynthese bei 42°C über 2 Stunden (Tabelle 36), gefolgt von einer Doppelstrangsynthese bei 16°C über eine Stunde sowie für 10 min. bei 68°C (Tabelle 37) durchgeführt (Pavkovic, 2014).

Tabelle 36 Pipettierschema für die Einzelstrangsynthese der reversen Transkription vor der *In-vitro* Transkription.

Komponenten	Ansatz [μ l]
„1st Strand“ Puffer-Mix	4
„1st Strand“ Enzym-Mix	1
Poly-A-RNA-Kontrolle (1:100000)	2
500 ng RNA	3
Total	10

Tabelle 37 Pipettierschema für die Doppelstrangsynthese der reversen Transkription vor der *In-vitro* Transkription.

Komponenten	Ansatz [μ l]
„2nd Strand“ Puffer-Mix	5
„2nd Strand“ Enzym-Mix	2
H ₂ O	13
Einzelstrangsynthese Produkt	10
Total	30

Für die *In-vitro* Transkription wurde gemäß Herstellerprotokoll bei Raumtemperatur ein Komponenten-Mix erstellt (Tabelle 38) und für 4 Stunden bei 40°C inkubiert. Während der Inkubation findet der Einbau von Biotin-markierten Nukleotiden durch die T7-Polymerase statt. Die aus der Inkubation resultierende aRNA wurde mithilfe von Streptavidin-markierter *Beads* und eines Magnet-Standes (Tabelle 39) aufgereinigt. Die gereinigte aRNA wurde in 50 μ L vorgewärmter (50 – 60°C) Elutionslösung eluiert und die Quantität sowie Qualität gemäß Herstellerprotokoll bestimmt (Pavkovic, 2014).

Tabelle 38 Pipettierschema für die *In-vitro* Transkription (IVT).

Komponenten	Ansatz [μ l]
IVT Biotin Label	4
IVT Labeling Puffer	20
IVT Enzym Mix	6
Doppelstrangsynthese Produkt	30
Total	60

Tabelle 39 Pipettierschema für die aRNA Aufreinigung.

Komponenten	Ansatz [μ l]
aRNA Binding Beads	10
aRNA Binding Puffer	50
aRNA Probe	60
Total	120

Für die Hybridisierung auf je einem Genchip wurde die aRNA vorher fragmentiert und entsprechend Herstellerangaben in einem Hybridisierungsmix (Tabelle 40) bei 99°C für 5 min. sowie anschließend bei 45°C für 5 min. inkubiert. Dazu wurden die Genchips parallel mit 200 µL Prä-Hybridisierungspuffer (MES-Puffer) befüllt. Diese wurde bei 45°C für 10 min. mit 60 rpm im Hybridisierungsofen prä-hybridisiert (Pavkovic, 2014).

Tabelle 40 Ansatzschema der Hybridisierungsreaktion der RAE230_2.0 Arrays.

Komponenten	Ansatz [µl]
H ₂ O	50
3 nM B2 Kontroll-Oligo	4
20x Hybridisierungs Kontrolle	13
2x Hybridisierungs Mix	125
DMSO	25
Fragmentierte aRNA (12,5 µg)	33
Total	250

Nach diesem Schritt wurde der MES-Puffer gegen 200 µL Hybridisierungsansatz ausgetauscht. Die Genchips wurden bei 45°C und 60 rpm über 16 Stunden im Hybridisierungsofen hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde der Hybridisierungsansatz entfernt und die Genchips mit Waschpuffer befüllt (Pavkovic, 2014).

Es wurde eine GeneChips® Fluidics Station 450 für die Wasch- und Färbeschritte gemäß Herstellerprotokoll genutzt. Streptavidin wurde für die Färbung genutzt, dieses bindet an das eingebaute Biotin. Ein Antikörperpuffer, welcher biotinylierte Antikörper gegen Streptavidin aufweist, führt zu einer Signalverstärkung. Die Analyse erfolgte in einem GeneChip® Scanner 3000. Hierbei wurde mittels eines Argonlasers der Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin, welcher an das Streptavidin gebunden ist, angeregt. Dadurch wurde eine Emission bei 570 nm gemessen (Pavkovic, 2014).

2.12.3 Statistische Auswertung der Genexpression

Als statistisches Verfahren wurde ein t-Test genutzt, um die Signifikanz von Gruppenunterschieden zu evaluieren. Hierbei wurden nur zwei Datengruppen, z.B. behandelte und unbehandelte Tiere, miteinander verglichen. Für die Bestimmung des Deregulation-Ausmaßes wurde das Verhältnis zwischen den Mittelwerten zweier Datengruppen berechnet. Dieses diente hier der Auswahl von Genen, die im Vergleich zur Kontrollgruppe ein höheres Ausmaß an Deregulierung (hoch oder runter) aufzeigten: Quotient > 1 stellte eine erhöhte Expression des Gens dar und Quotient < 1 stellte eine verminderte Expression des Gens dar (Pavkovic, 2014).

2.13 Hepatozyten-Kultivierung zwischen zwei Kollagenmatrices

Die Herstellung der Hepatozytenkulturen wurde durch die technischen Mitarbeiter des Labors der DMPK (*Drug Metabolism and Pharmacokinetics*) der Bayer AG durchgeführt.

Die Hepatozyten-Kultivierung zwischen zwei Kollagenmatrices erfolgte nach der Methode von Draheim et al. (Draheim, et al., 2010).

Die Isolierung der primären Hepatozyten aus dem Leberparenchym von Han-Wistar-Ratten (~200 g) (Charles River, Berlin Buch, Deutschland) wurde mit Hilfe einer zweistufigen Kollagenase-Perfusion (LeCluyse *et al.*, 1996a; LeCluyse *et al.*, 1996b) durchgeführt. Hierfür wurden in einem ersten Schritt die Calcium-abhängigen Adhäsionsfaktoren durch den Entzug von Calciumionen, der über eine Komplexbildung durch Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N', -tetraessigsäure (EGTA) erreicht wurde, gelöst. Damit wurden alle Calcium-abhängigen *cell junctions*, wie u.a. die *tight junctions* zwischen den Zellen gelöst. In einem zweiten Schritt wurde Kollagenase eingesetzt, um das kollagenhaltige Bindegewebe aufzulösen. Dadurch wurden die Zellen des Leberparenchyms vereinzelt.

Die Ratten wurden mit einem geeigneten Narkotikum (Rompun 2%, Ketavet 100 mg/ml, 1:1) intraperitoneal narkotisiert. Der Bauchraum wurde geöffnet und die Portalvene mit einer Braunüle katheterisiert. Mithilfe einer Pumpe wurde die Portalvene schrittweise perfundiert. Die Leber wurde anschließend entnommen und in eine Petrischale mit kaltem WME überführt. Die Leberkapsel wurde eingeritzt und die Hepatozyten wurden herausgeschüttelt. Um Gewebereste und größere Zellaggregate zu entfernen, wurde die erhaltene Zellsuspension durch einen sterilen Verbandmull in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert.

Anschließend wurden die isolierten Hepatozyten bei 4°C aufgereinigt. Dafür wurde eine Dichtezentrifuge genutzt, die es ermöglichte, die Hepatozyten von Zellfragmente, tote Zellen und Nicht-parenchymzellen zu trennen (Draheim, et al., 2010). Dafür wurden die Hepatozyten zunächst bei 50 x g und 4°C für 3 min. zentrifugiert und das resultierende Zellpellet in 4°C kaltem WME-Puffer resuspendiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit dem Gradientenmedium Percoll® aufgereinigt, indem in je 6 Ansätzen 9 Teile Percoll®-Lösung mit einem Teil 37 mg/ml NaHCO₃-haltigem DMEM (Dulbeccos' Modified Eagles 10-fach Medium) verdünnt wurden, zu denen dann zu gleichen Teilen die resuspendierte Zellsuspension zugegeben und vermischt wurde. In einer anschließenden Dichtegradientenzentrifugation bei 100 x g und 4°C für 4 min. wurden die Hepatozyten pelletiert und die im Überstand befindlichen Nichtparenchymzellen, toten Zellen und Zellfragmente mit dem Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 40 mL Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde zur Entfernung des Percoll® eine 3-

minütige Zentrifugation bei 50 x g durchgeführt. Das Hepatozyten-Pellet wurde anschließend in 30 ml 37 °C warmem 5% FCS-haltigem Zellkulturmedium resuspendiert.

Die Zellzahl wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellvitalität wurde durch Trypanblaufärbung bestimmt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Probe der Zellsuspension 1:10 mit PBS-Puffer verdünnt (pH 7,4) und 1:2 mit 0,1 %-iger Trypanblau-Lösung versetzt. 20 µL wurden auf beide Kammerhälften der Neubauer-Zählkammer ausgebracht. Es wurden vier Großquadrate, entsprechend 128 Kleinquadraten, ausgezählt. Die Lebendzellzahl wurde über die folgende Gleichung berechnet:

$$\text{Zellzahl/mL} = \frac{\sum \text{Zellen} * 10000 \text{ (Kammerfaktor)} * 20 \text{ (Verdünnungsfaktor)}}{8} \quad (1)$$

Für weitere Aufarbeitungsprozesse der Zellen wurde eine Zellvitalität von mindestens 90 % festgelegt.

Die Hepatozyten wurden mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro mL auf 12-Well Kollagentyp I Platten (BD Biosciences, Heidelberg) ausgesät und in Williams' Medium E (Sigma Aldrich, Steinheim) mit 5 % fetalem Kälberserum, 100 nM Dexamethason und 100 nM Insulin (Tabelle 41) kultiviert. Nach einer Inkubation bei 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C von 4–6 h wurde das Kulturmedium mit den nicht angehefteten Zellen und Zell-Debris entfernt und ein Waschschrift mit FCS-freiem Kulturmedium durchgeführt.

Tabelle 41 WME-Additiva.

Additiva	Konzentration im Ansatz
FCS	2-5 %
Penicillin	250 U/mL
Streptomycin	250 µg/mL
L.Alanyl-L-Glutamin (GlutaMax™ I-Supplement	8 mM
Insulin	0,01 mg/mL
Glukagon	40 ng/mL
Dexamethason	0,1 µM

Zur Präparation der *Sandwich*-Kulturen wurde 24 Stunden nach der Zellaussaat eine neutralisierte Lösung von Kollagen (0,2 ml pro well, 3–4 mg/ml, pH 7,4; BD Biosciences, siehe Tabelle 42) auf die Hepatozytenmonolage ($0,5 \times 10^6$ Zellen), die auf einer Einzelkollagenschicht ausgesät worden war, aufgetragen. Durch Schwenkung der Platten wurde eine homogene Verteilung erreicht, bevor die Zellkulturplatten für eine Stunde bei 37°C zur Verfestigung des Kollagens inkubiert wurden. Danach wurde das Zellkulturmedium mit 5 % FCS (Tabelle 41) zugegeben und die Ansätze im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 42 Zusammensetzung der Kollagenlösung zur Überschichtung der Hepatozytenmonolage.

Komponente	Ansatz [mL]
Rattenschwanzkollagenlösung 3,5 mg/mL	5,0
DMEM 10-fach (+ 37 mg/mL NaHCO ₃)	0,625
Essigsäure 0,02 N	<i>quantum satis</i>
Natronlauge 0,1 N	<i>quantum satis</i>

Die Lösungen in Williams' Medium E (Sigma Aldrich, Steinheim) wurden ab Tag 3 mit 2 % fetalem Kälberserum weiterkultiviert. Das Kulturmedium wurde täglich gewechselt. Am fünften Tag der Kultivierung konnte mikroskopisch (Axiovert S100) ein umfangreiches Netzwerk aus *Canaliculi biliferi* zwischen den Hepatozyten bestimmt werden. Dieser mikroskopische Befund zeigte, dass ein funktionales Transporternetzwerk zwischen den Hepatozyten und den Gallengängen ausgebildet wurde, wodurch die Kulturen für die geplanten *In-vitro*-Studien eingesetzt werden konnten. Für die Analytik wurden Proben des verwendeten Kulturmediums aus den durchgeführten Experimenten zur Verfügung gestellt.

2.13.1 Experimentelles Design des Gallensäure-Profilings

Um die Konzentration von Gallensäuren in Zellkulturüberständen zu quantifizieren, wurde der Überstand (500 µL) bereits am ersten Tag nach der Aussaat der Hepatozyten abgenommen und mit frischem Zellkulturmedium ersetzt. Dieser Prozess wurde an den darauffolgenden fünf Tage der Anzucht der kultivierten Hepatozyten zwischen zwei Kollagenmatrices wiederholt. Ab dem fünften Tag wurde das ausgereifte Testsystem an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit täglich wechselndem Kulturmedium exponiert, das keine Wirkstoffe enthielt (Abbildung 22).

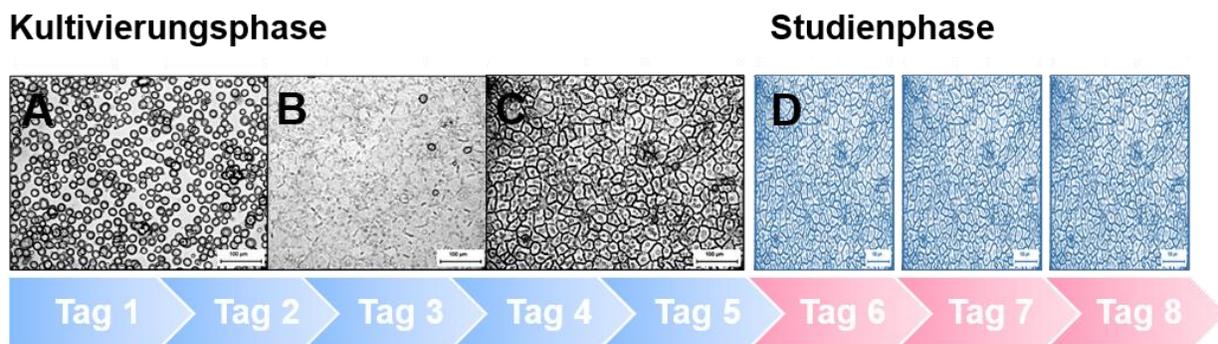


Abbildung 22 Studiendesign des *In-vitro*-Versuchs mit Sandwich-Kulturen von Rattenhepatozyten. 12 Well-Platte mit kultivierten Hepatozyten: 3 Tage wurden in jeweils 2 Wells verschiedene Substanzen aufgetragen: Kontrolle [Williams Medium], (A-D) Lichtmikroskopische Aufnahmen kultivierter Rattenhepatozyten (100 µm). (A) Tag 1 – Tag 2 liegen die Hepatozyten in abgerundeter Form vor. (B) Tag 3 Ausbildung einer konfluenten Zellmonolage. (C) Tag 4 - 5 Ausgebildetes Netzwerk aus Gallengängen. (D) Ausgereiftes Testsystem wird in Routine-Studien für drei Tage täglich mit Modelltoxin im Kulturmedium exponiert. Alle 24 h wird das Kulturmedium gewechselt.

Für die Bestimmung der metabolischen Aktivität der Hepatozyten wurden in einem zweiten Experiment die bereits kultivierten Hepatozyten an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit Kulturmedium exponiert, das die primären Gallensäuren CA und CDCA enthielt. Dabei wurde eine Konzentration von 25 µM für die beiden primären Gallensäuren verwendet. Die Zellkulturüberstände (500 µL) wurden täglich gesammelt und durch frisches Medium ersetzt.

Um den Effekt einer Hepatotoxizität mittels Gallensäure-Profil in *Sandwich*-Hepatozyten zu bestimmen, wurde Troglitazon als Modellsubstanz ausgewählt. Troglitazon ist ein bekannter BSEP-Inhibitor (Funk, et al., 2001; Yang, et al., 2014). Das Profil von Gallensäuren im Kulturmedium von *Sandwich*-Hepatozyten wurde näher untersucht, indem das Testsystem mit 10 µM Troglitazon behandelt wurde. Das ausgereifte Modellsystem wurde drei Tage lang mit dem Hepatotoxin behandelt, mit täglichem Wechsel des Mediums.

In einem weiteren Experiment wurde mit dem Hepatotoxin Methapyrilen an dem etablierten *In-vitro*-Testsystem zur Kultivierung von Rattenhepatozyten im Sandwichdesign eine erste Untersuchung zur Übertragbarkeit der erzielten *In-vivo*-Ergebnisse zum Gallensäure-Profilung, durchgeführt. Dazu wurden die *In vivo* Dosierungen in adäquate *In-vitro*-Konzentrationen für das

Zellkultursystem umgewandelt. Dadurch wurde geprüft, ob vergleichbare Gallensäure-Konzentrationsveränderungen im Plasma von behandelten Tieren und im Kulturmedium des Testsystems auftreten. Zur Konzentrationsberechnung einer adäquaten *In-vitro*-Konzentration wurde auf der Basis von pharmakokinetischen Studien die maximale Blutkonzentration ($C_{\max} = 2,1 \mu\text{M}$) in der Portalvene der Ratte verwendet (Heise, et al., 2012). In der tierexperimentellen Studie mit Ratten wurde Methapyrilen in zwei Dosierungen (Niedrig: 30 mg/kg KG, Hoch: 80 mg/kg KG) verabreicht. Daraus wurde für die *In-vitro*-Studie ein Konzentrationsbereich von 1,5 μM , 5 μM und 15 μM abgeleitet. Vor der Behandlung der Hepatozytenkulturen wurden während des 5-tägigen Reifungsprozesses die primären Gallensäuren CA und CDCA mit einer Konzentration von jeweils 25 μM in das Zellkulturmedium gegeben. Ab dem fünften Tag startete die Behandlung mit Methapyrilen über 5 Tage mit täglichem Wechsel des Mediums.

2.14 Statistische Auswertung

Aus den Konzentrationen individueller Gallensäuren im Plasma, im Lebergewebe und im Zellkulturüberstand wurde das arithmetische Mittel mit Standardabweichung ($MW \pm SD$) gebildet. Zur Darstellung der Verteilung der Gallensäure-Konzentrationen und zur Überprüfung der Normalverteilung in den Dosisgruppen wurden Box-Whisker-Diagramme der logarithmisierten Daten erstellt. Die normalverteilten Datensätze aus den tierexperimentellen Studien wurden mit dem Dunnett-Test ausgewertet. Dieser Post-Hoc-Test dient zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten einer einzelnen Kontrollgruppe und den Mittelwerten der verbleibenden Behandlungsgruppen. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde das nicht-parametrische Testverfahren nach Mann Whitney mit Bonferroni Adjustierung durchgeführt. Mit den Tests wurden potentielle Unterschiede der MW der Konzentrationen zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe ermittelt. Als statistisch signifikant galten p-Werte $< 0,05$. In der Präklinik wird mit Hilfe von Referenzwerten auf der Basis von historischen Daten von Kontrolltieren der Normalzustand eines Messparameters im Rahmen seiner biologischen Variabilität beschrieben. Für die Erstellung von Referenzwerten wurde das arithmetische Mittel der Konzentration jeder individuellen Gallensäure in Vehikeltieren berechnet. Im Bereich $MW \pm$ zweifache SD befinden sich bei einer Normalverteilung etwa 96 % aller Messwerte, im Bereich $MW \pm$ dreifache SD fast 99 %.

Zusätzlich zur univariaten Datenanalyse wurde eine multivariate Datenanalyse mit SIMCA 14 (MKS Data Analytics Solutions, Umeå, Schweden) durchgeführt. Dabei wurde die Variation der Daten mittels Hauptkomponenten-Analyse (engl. *Principal Component Analysis*, PCA)

visualisiert, um Trends zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppen besser identifizieren zu können. Durch die Strukturierung der Datensätze mittels PCA konnten die Daten auf mögliche Korrelationen zwischen den Gallensäure-Profilen und den Metadaten (z. B. Geschlecht, Ernährungsstatus, Behandlungsgruppe) der einzelnen Tiere untersucht werden. Jeder Punkt im *Score Scatter Plot* repräsentiert ein einzelnes Tier mit seinem spezifischen Gallensäuren- und Metadaten-Profil. Die Geschlechter bzw. Behandlungsgruppen innerhalb eines Geschlechts wurden farblich gekennzeichnet, um mögliche Unterschiede in der Streuung der Daten besser erkennen und *Cluster* von Versuchstieren mit ähnlichen Profilen identifizieren zu können. Daneben wurde ein *Loading Scatter Plot* erstellt, der alle analysierten Gallensäuren anzeigt. Die Lokalisation der Gallensäuren im zweidimensionalen Raum lässt Rückschlüsse auf ihre Konzentration in den Versuchstieren des zugehörigen *Score Scatter Plots* zu. Beim Auftreten von *Clustern* oder Separationen einzelner Versuchstiere im *Score Scatter Plot* können durch die Analyse des *Loading Scatter Plots* die verantwortlichen Gallensäuren ermittelt werden. Ein Koeffizient ($p[n]$) zeigt an, wie stark dieser Einfluss ist ($p[n] < 0,5$ = moderater Einfluss, $p[n] > 0,5$ erhöhter Einfluss). Weiter wurden mit der OPLS-DA ein Einfluss des Ernährungszustandes, sowie der Behandlungsgruppen untersucht. Hierbei wird im Gegensatz zur PCA eine Klassenzugehörigkeit der einzelnen Versuchstiere durchgeführt. Dabei werden die Versuchstiere innerhalb einer Vehikel- bzw. Behandlungsgruppe für die Modellrechnungen definiert und die dazugehörigen jeweiligen Gallensäure-Plasmakonzentrationsprofile mitberücksichtigt. Somit können gezielt signifikante Unterschiede im Gallensäure-Plasmakonzentrationsprofil ermittelt werden, die sich durch die Klassenzugehörigkeit wie Geschlechts- oder Ernährungsstatus, Vehikel- oder Behandlungsgruppe ergeben. Dabei wird statistisch geprüft, ob es sich auf Basis der definierten Daten und Klassifizierungen um ein valides Modell handelt. Ein Modell gilt als statistisch signifikant, wenn $p < 0,05$ ist.

3 Ergebnisse & Diskussion

3.1 Rationale für die Wirkstoffauswahl der tierexperimentellen Studien

Mit dem Ziel geeignete Arzneimittelwirkstoffe als Modellsubstanzen für die Durchführung der im Rahmen dieser Arbeit geplanten tierexperimentellen Studien auszuwählen, die gezielt hepatozelluläre und hepatobiliäre Leberschäden induzieren würden, wurde eine umfassende Literaturrecherche durchgeführt. Nachfolgend sind die Durchführung der Literaturrecherche, der Selektionsprozess der Modellsubstanzen sowie die publizierten Ergebnisse für die einzelnen Substanzen dargestellt.

Zunächst wurde eine umfangreiche Literaturrecherche auf *LiverTox.nih.gov* durchgeführt, welche human-klinischen Daten zu ca. 1200 Arzneimittelwirkstoffen zur Verfügung stellt. Darauf basierend wurden in einem nächsten Schritt durch eine erweiterte Recherche diejenigen Substanzen selektiert, für die Daten aus präklinischen Studien an Ratten verfügbar waren. Substanzen, die Angaben von humanklinischen sowie präklinischen Daten aufwiesen, erfüllten auf Basis dieser Herangehensweise das erste Auswahlkriterium (siehe Tabelle 43). Durch dieses Auswahlkriterium reduzierte sich die Auswahl möglicher hepatotoxischer Modellsubstanzen auf 85 Verbindungen. Diese potentiellen Modellsubstanzen erzeugen beim Menschen als auch in Studien an Ratte verschiedene hepatotoxische Endpunkte, die in einem nächsten Auswahlschritt zur weiteren Selektion genutzt wurden.

Tabelle 43 Erste Auswahl potentieller Hepatotoxine für tierexperimentelle Studien.

Spezies	Anzahl der Substanzen	Hepatoxizität
Ratte und Mensch	85	Hepatozellulär, Cholestase, Phospholipidose/Steatose, multiple Ausprägungen

Ein weiteres Auswahlkriterium bildete die Art der spezifischen Leberschädigungen, die durch die hepatotoxischen Modellsubstanzen hervorgerufen wird, wie beispielsweise eine hepatozelluläre Nekrose, Cholestase oder Steatose. Die Kategorisierung der Modellsubstanzen nach Art der Leberschädigung ermöglichte es im experimentellen Design Stoffe mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen einzubeziehen und darüber die Eignung und Spezifität des Gallensäure-Profiling mittels LC-MS/MS für die Differenzierung der verschiedenen Leberschäden näher zu untersuchen.

Die 85 potentiellen Modellsubstanzen lassen sich basierend auf diesen Daten in folgenden Proportionen den verschiedenen Arten der Leberschädigung zuordnen (siehe Tabelle 44).

Tabelle 44 Art der Leberschädigungen der potentiellen Modellsubstanzen auf Basis von Humandaten.

Hepatotoxizität	Anzahl der Substanzen
Cholestase	50
Multiple Ausprägungen (inkl. Hepatozelluläre Nekrose)	10
Steatose	25

Da klinisch-chemische Biomarker in der Routine-Diagnostik als Verlaufskontrolle zur Detektion einer Leberschädigung eingesetzt werden, wurde eine beschriebene Differentialdiagnostik der Hepatotoxizität durch klinisch-chemische Biomarker als ein weiteres Auswahlkriterium festgelegt. Dabei wurden klinische sowie präklinische Daten auf Veränderungen von leberspezifischen Enzymen und Substraten recherchiert.

Neben diesem Auswahlkriterium mussten verschiedene histopathologische Endpunkte einer Cholestase, Steatose sowie einer hepatozellulären Nekrose für das Tiermodell Ratte zur Verfügung stehen. Die histopathologische Befunde wurden somit als ein weiteres Auswahlkriterium festgelegt.

Die Auswahlkriterien der hepatotoxischen Substanzen wurden weiter verfeinert, indem festgelegt wurde, dass die Wirkstoffkandidaten neben einem hepatotoxischen Risiko gleichzeitig eine aktuelle Marktzulassung besitzen sollten, oder besaßen und aufgrund ihrer unerwünschten hepatotoxischen Wirkung bereits vom Markt genommen werden mussten.

Als letztes und essentielles Auswahlkriterium wurde festgelegt, dass für die publizierten Rattenstudien ein Dosisbereich berichtet wurde, der als Grundlage für die Dosiswahl in den geplanten Rattenstudien genutzt werden konnte. Dadurch konnten Dosis-Findungsstudien vermieden und somit die notwendige Tieranzahl im Experiment verringert werden, was nicht zuletzt dem Tierschutz zugutekommt. Darauf basierend wurden drei Dosierungen für die tierexperimentellen Studien abgeleitet. Dabei sollte die hohe Dosis der Modellsubstanz der jeweiligen Effektdosis entsprechen, bei der klinische und histologische Befunde der Leberschädigung induziert werden. Die niedrige Dosis sollte keine klinischen und pathologischen Befunde verursachen und die mittlere Dosis sollte zur besseren Charakterisierung der Dosis-Wirkungsbeziehung dienen. Auf Basis dieser Herangehensweise konnten als Ergebnis 10 potentielle Substanzkandidaten für die geplanten tierexperimentellen Studien herausgefiltert werden (Tabelle 45).

Tabelle 45 Zehn potentielle Substanzkandidaten für die geplanten tierexperimentellen Studien.

Substanz	Hepatoxizität	Literatur
Amitriptylin	Steatose	Voican <i>et al.</i> , 2014; Sahini, <i>et al.</i> , 2014
Diclofenac	Cholestase	Sriuttha <i>et al.</i> , 2018; Tomic <i>et al.</i> , 2008
Diltiazem	Multiple Ausprägungen	Amacher, <i>et al.</i> , 2014; Sahini, <i>et al.</i> , 2014
Flutamid	Cholestase	Giorgetti <i>et al.</i> , 2017; Yamazaki, <i>et al.</i> , 2013
Ketoconazol	Cholestase	Rodriguez <i>et al.</i> , 2003; Shin <i>et al.</i> , 2006
Methapyrilen	Multiple Ausprägungen	Mercer <i>et al.</i> , 2009; Pavkovic, 2014
Methotrexat	Hepatozellular	Bath <i>et al.</i> , 2014; Mattes, <i>et al.</i> , 2014
Troglitazon	Cholestase	Aleo <i>et al.</i> , 2014; Funk, <i>et al.</i> , 2001
Valproinsäure	Steatose	Mindikoglu <i>et al.</i> , 2011; Mattes, <i>et al.</i> , 2014
Zidovudin	Steatose	Amacher, <i>et al.</i> , 2014; Mattes, <i>et al.</i> , 2014

Durch die definierten Auswahlkriterien sowie die kommerzielle Verfügbarkeit wurden sechs Substanzen für die tierexperimentellen Studien festgelegt, die in den folgenden Abschnitten 3.1.1 bis 3.1.6 näher erläutert wurden. Hierfür wurde im Einzelnen die Rationale der Auswahl für jede Substanz kurz vorgestellt und durch die Darstellung der bereits vorhandenen Ergebnisse aus humanen sowie tierexperimentellen Untersuchungen näher erläutert.

Die auf Basis der Literatur ausgewählten Substanzen und Dosierungen für die tierexperimentellen Studien sind in Tabelle 46 zusammengefasst. Anhand der beschriebenen Kriterien wurden sechs Modellsubstanzen festgelegt. Um zu ermitteln, ob im Tierversuch humanrelevante Dosierungen gewählt wurden, wurde basierend auf den Wirkstoffdosierungen aus den tierexperimentellen Studien für jede Modellsubstanz die humane Äquivalenzdosis (HED, engl. *human equivalent dose*) entsprechend der Empfehlung der FDA berechnet (FDA, 2005; Nair *et al.*, 2016). Unter Zugrundelegung eines Körpergewichtes von 60 kg für erwachsene Patienten wurde die tägliche Einnahmemenge der Wirkstoffe extrapoliert, die der Dosierung im Tierversuch entspricht. Den extrapolierten täglichen Einnahmemengen im Menschen wurden die gängigen therapeutischen Einnahmemengen gegenübergestellt (Tabelle 47). Die extrapolierten Einnahmemengen wurden in der Tabelle 47 fett gedruckt dargestellt, wenn sie in einem ähnlichen Bereich wie die für humane Therapien gängigen Einnahmemengen liegen.

Tabelle 46 Ausgewählte Hepatotoxine für die tierexperimentellen Studien.

Wirkstoff	Route	Vehikel	Dosisgruppe/mg/kg KG Tag			
			Kontrolle	Niedrig	Mittel	Hoch
Diclofenac	peroral	Wasser	0	2,5	5	9
Methotrexat	intraperitoneal	0,9% NaCl-Lösung	0	0,05	0,15	0,5
Flutamid	peroral	Maiskeimöl	0	50	100	150
Valproinsäure	peroral	0,9% NaCl-Lösung	0	80	200	500
Amitriptylin	peroral	Wasser	0	30	75	150
Methapyrilen	peroral	0,5% Carboxymethylcellulose	0	30	-	80

Tabelle 47 Gegenüberstellung der Dosierungen der Wirkstoffe im Tierexperiment an Ratten mit den äquivalenten Dosierungen im Menschen. Abkürzungen: HD: Hochdosis, MD: mittlere Dosis, LD: Niedrigdosis, HED äquivalente Dosis beim Menschen (HED, engl. *human equivalent dose*). Humane extrapolierte Dosierungen, die außerhalb der therapeutischen Menge liegen sind orange markiert.

Arzneimittel	Ratte		Mensch		
	Dosislevel im Tierversuch	Dosis [mg/kg KG]	HED [mg/kg KG]	Extrapolierte Dosis [mg/Tag]	Therapeutische Dosis [mg/Tag]
Diclofenac	LD	2,5	0,4	24	50 – 150 (Fachinfo-Service, 2018a)
	MD	5	0,8	48	
	HD	9	1,5	87	
Methotrexat	LD	0,05	0,01	0,5	0,35 – 1,4 (Fachinfo-Service, 2018b)
	MD	0,15	0,02	1,5	
	HD	0,5	0,08	4,8	
Flutamid	LD	50	8,1	484	750 (Retz <i>et al.</i> , 2010)
	MD	100	16,1	968	
	HD	150	24,2	1452	
Valproinsäure	LD	80	12,9	774	1000 – 2500 (Fachinfo-Service, 2018c)
	MD	200	32,2	1935	
	HD	500	80,6	4839	
Amitriptylin	LD	30	4,8	290	50 – 300 (Fachinfo-Service, 2015)
	MD	75	12,1	726	
	HD	150	24,2	1452	
Methapyrilen	LD	30	4,8	290	70 – 350 (Shapiro, 1956)
	MD	-	-	-	
	HD	80	12,9	774	

Die Ergebnisse der histopathologischen Auswertungen der ausgewählten Substanzen werden in eigenen einzelnen Kapiteln 3.4 bis 3.9 vorgestellt und diskutiert.

3.1.1 Hintergrundinformationen zur Substanzauswahl von Amitriptylin

Amitriptylin ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der trizyklischen Antidepressiva, der in erster Linie zur Behandlung von Depressionen, depressiver Verstimmung mit Erregtheit und ängstlicher Unruhe verschrieben wird. Amitriptylin blockiert die neuronale Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin. Neben dieser Wirkung blockiert Amitriptylin u. a. auch muscarinische Acetylcholin-, Histamin-, Serotonin- und α -adrenerge Rezeptoren (Bäumel *et al.*, 2009).

Das Antidepressivum kann bereits in therapeutischen Dosierungen beim Menschen eine unerwünschte Lebertoxizität induzieren (Voican *et al.*, 2014). Observationsstudien der Arzneimittelsicherheit in der Psychiatrie über einen Zeitraum von 1993 bis 2011 konnten zeigen, dass bei einer Therapie mit Amitriptylin, bei einer durchschnittlichen Dosierung von 150 mg pro Tag, in 10 von 12.347 (0,08 %) behandelten Patienten eine Amitriptylin-induzierte Lebertoxizität auftritt (Konstantinidis *et al.*, 2015). Die Amitriptylin-induzierte Lebertoxizität kann sich beim Menschen in der Form einer cholestatischen Hepatitis bis hin zum akuten Leberversagen manifestieren (livertox.nlm.nih.gov, 2017).

Amitriptylin verursacht in Studien an männlichen Ratten über einen Zeitraum von 28 Tagen bei täglicher oraler Applikation von bis zu 150 mg/kg KG eine histopathologisch nachgewiesene schwere Steatose (Sahini, et al., 2014). In dieser Studie wurden keine klinisch-chemischen Serummarker bestimmt und die behandelten Ratten überlebten die Studiendauer bis zur Sektion. Auf Basis der tierexperimentellen Daten wurde für Amitriptylin eine hohe Dosis von 150 mg/kg KG bei männlichen und weiblichen Ratten als Effektdosis festgelegt, bei der klinische und histologische Befunde einer Steatose induziert werden sollten. Die mittlere Dosis von 75 mg/kg KG wurde zur besseren Charakterisierung der Dosis-Wirkungsbeziehung festgelegt. Bei dieser Dosis wurden das Auftreten von ersten Anzeichen einer Leberschädigung anhand einer leichten Erhöhung der Aktivität und Konzentration von klinisch-chemischen Serummarkern sowie erste histopathologische Veränderungen erwartet. Die niedrige Dosis von 30 mg/kg KG wurde festgelegt, um keine klinischen und pathologischen Befunde zu erzeugen.

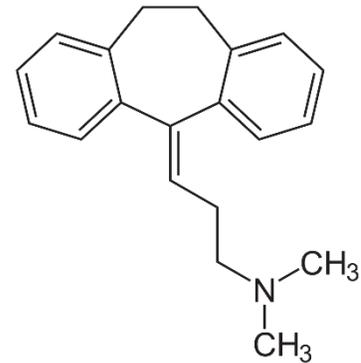


Abbildung 23 Strukturformel von Amitriptylin.

3.1.2 Hintergrundinformationen zur Substanzauswahl von Diclofenac

Diclofenac ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Nichtopioid-Analgetika mit schmerzlindernder und entzündungshemmender Wirkung und es wird u. a. bei der Therapie von Rheuma, Prellungen und Arthrose eingesetzt. Diclofenac inhibiert die Tromboxan-Synthese durch Acetylierung der Cyclooxygenase (COX 1) und damit die Prostaglandinsynthese (Gressner *et al.*, 2013).

Seit der Zulassung des Arzneistoffes wurde Diclofenac von mehr als einer Milliarde Patienten genutzt und es ist eines der am häufigsten verkauften Arzneimittel weltweit (Gottlieb, 1985; McGettigan *et al.*, 2013; Moore *et al.*, 2004). Schon bei gängigen therapeutischen Konzentrationen von Diclofenac wurden beim Menschen lebertoxische Effekte beobachtet (Mennecozi *et al.*, 2015; Sriuttha *et al.*, 2018). Bei Patienten mit einer regelmäßigen Einnahme von Diclofenac konnte eine erhöhte Aktivität der Transaminasen ALAT und ASAT nachgewiesen werden (Dragovic *et al.*, 2016). Die Erhöhung der Aktivität der Transaminasen kann den Referenzbereich um mehr als das 3-fache übersteigen (Laine *et al.*, 2009). Die Inzidenz einer Diclofenac-induzierten Lebertoxizität liegt bei 6,3 pro 100.000 Patienten (Dragovic, et al., 2016).

In einer tierexperimentellen Studie wurde Ratten täglich Diclofenac über einen Zeitraum von 91 Tagen oral verabreicht. Dabei wurden drei verschiedene Dosierungen, 0,5, 2,5 und 5,0 mg/kg KG, untersucht. Makro-pathologische Befunde der Leber traten bei einer Dosierung von 5,0 mg/kg KG in Form einer Reduktion der absoluten und relativen Lebergewichte in männlichen Ratten auf. Bei den niedrigeren Dosierungen wurden keine adversen oder toxischen Effekte festgestellt (EMA, 2003). In einer weiteren Studie wurde weiblichen Ratten Diclofenac in Dosierungen von 2,5, 5,0 und 10 mg/kg KG über einen Zeitraum von 10 Tagen verabreicht. Am Ende der 10-tägigen Studiendauer trat bei vier Ratten Mortalität aufgrund von toxischen Effekten im Gastrointestinal-Trakt auf (EMA, 2003).

Auf Basis der tierexperimentellen Daten wurde für Diclofenac eine hohe Dosis von 9 mg/kg KG bei männlichen und weiblichen Ratten als Effektdosis festgelegt, bei der klinische und histologische Befunde einer Cholestase induziert werden sollten. Als mittlere Dosis wurden 5 mg/kg KG gewählt, bei der erste Veränderungen der klinisch-chemischen Serummarker und leichte histopathologische Befunde auftreten sollen. Die niedrige Dosis von 2,5 mg/kg KG wurde festgelegt, um keine klinischen und pathologischen Befunde zu erzeugen.

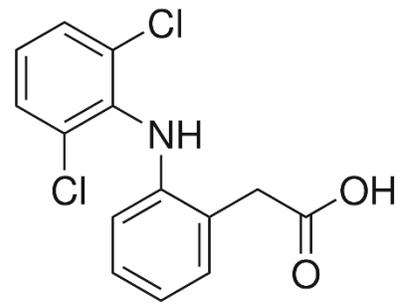


Abbildung 24 Strukturformel von Diclofenac.

3.1.3 Hintergrundinformationen zur Substanzauswahl von Flutamid

Flutamid ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Antiandrogene zur Behandlung eines fortgeschrittenen Prostatakarzinoms. Die Wirkung von Flutamid basiert darauf, dass es als nicht-steroidales Antiandrogen die Testosteron-Rezeptoren in der Prostata hemmt und dadurch das Wachstum hormonabhängiger Tumorzellen unterdrückt (Lüllmann *et al.*, 2006).

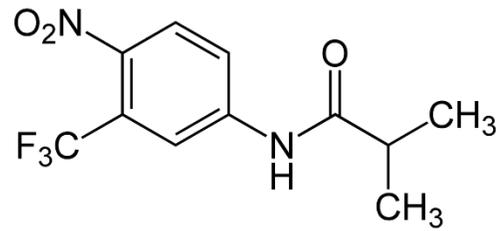


Abbildung 25 Strukturformel von Flutamid.

Eine therapeutische Behandlung mit Flutamid kann beim Menschen zu einer Leberschädigung führen. Als pathologische Befunde zeigen sich bei Patienten induzierte Leberzellnekrosen mit einhergehender Cholestase (Giorgetti *et al.*, 2017). Die hepatotoxische Wirkung kann im fortschreitenden Verlauf eine Hepatitis auslösen. In einzelnen Fällen wurde über starke Leberschädigungen mit letalem Ausgang berichtet (LiverTox, 2015a).

In einer 28-tägigen Studie mit wiederholter peroraler Gabe von Flutamid wurde die hepatotoxische Wirkung in männlichen und weiblichen Ratten mittels *metabolite profiling* im Plasma untersucht. Auf Grundlage der ermittelten Profile korrelieren die Ergebnisse bei einer Dosis von 100 mg/kg KG Flutamid mit einer Lebertoxizität, die u. a. mit einer Cholestase in den Tieren assoziiert wird (Mattes *et al.*, 2014). In der tierexperimentellen Studie überlebten die behandelten Ratten die Studiendauer bis zur Sektion. Yamazaki *et al.* hatten in einer 5-tägigen Studie mit wiederholter peroraler Gabe von Flutamid bei männlichen Ratten die frühzeitigen Zeichen einer Lebertoxizität untersucht. Der Wirkstoff wurde in einer Dosis von 50 mg/kg KG und 150 mg/kg KG appliziert, um eine Cholestase zu induzieren (Yamazaki, *et al.*, 2013). In der tierexperimentellen Studie wurden die Ergebnisse der klinisch-chemischen Marker und der Histopathologie der Leber nicht näher beschrieben. Die behandelten Ratten überlebten die Studiendauer bis zur Sektion.

Auf Basis der tierexperimentellen Daten wurde für Flutamid eine Hochdosis von 150 mg/kg KG bei männlichen und weiblichen Ratten als Effektdosis ausgewählt, bei der deutliche klinische und histologische Befunde einer Cholestase induziert werden sollten. Eine mittlere Dosis von 100 mg/kg KG sollte zur besseren Charakterisierung der Dosis-Wirkungsbeziehung dienen, indem geringfügigere Veränderungen der klinisch-chemischen Serummarker und der Histopathologie ausgelöst werden. Die niedrige Dosis von 50 mg/kg KG wurde festgelegt, um keine klinischen und pathologischen Befunde zu erzeugen.

3.1.4 Hintergrundinformationen zur Substanzauswahl von Methapyrilen

Die hepatotoxische Wirkung von Methapyrilen wurde mittlerweile eingehend charakterisiert. Methapyrilen wurde in den 1940er Jahren als Antihistaminikum in den USA entwickelt und patentiert (Lijinsky *et al.*, 1980). Aufgrund seiner hepatokanzerogenen Wirkung wurde Methapyrilen Ende der 1970er Jahre vom Markt genommen (Graichen *et al.*, 1985). Eine erste mögliche Erklärung für die Zytotoxizität von Methapyrilen lieferte der Nachweis eines toxischen Intermediats in Mikrosomen primärer

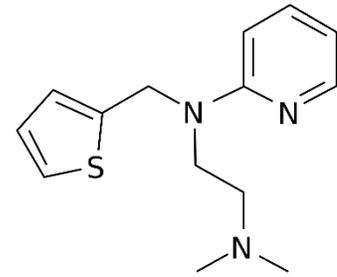


Abbildung 26 Strukturformel von Methapyrilen.

Rattenhepatozyten, dass durch die Bioaktivierung von Methapyrilen am Thiophenring entsteht. Der Thiophenring-Substituent in Hepatozyten wurde als ein bioaktivierungsabhängiger Toxophor identifiziert (Graham *et al.*, 2008; Mercer *et al.*, 2009). Methapyrilen löst neben einer hepatozellulären Nekrose im periportalen Bereich auch Vakuolisierungen, Entzündungen mit einer Infiltration von mononukleären Zellen sowie Hyperplasien der Gallengänge aus (Hamadeh *et al.*, 2002).

Anmerkung: Für Methapyrilen existierten bereits Proben aus einer 14tägigen tierexperimentellen Studie der Bayer AG aus dem Jahr 2010, in der die hepatotoxische Wirkung bei männlichen Ratten untersucht wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die vorhandenen Plasma- und Leberproben in einer Machbarkeitsstudie zur quantitativen Analyse von Gallensäuren genutzt, um damit die Lebertoxizität besser zu charakterisieren. Außerdem wurden vorhandene Daten eines Genexpression-Profilings (Microarray) aus der genannten Studie genutzt und das Expressionsmuster von Genen mit potenziell wichtigen Funktionen im Metabolismus von Gallensäuren ausgewertet. In der Studie wurden die Ratten mit einer hohen Dosis von 80 mg/kg KG Methapyrilen behandelt, die als Effektdosis klinische und histologische Befunde einer Leberzellnekrose ausgelöst hat. Die niedrigere Dosis von 30 mg/kg KG zeigte erste Anzeichen einer leichten Erhöhung der Aktivitäten und der Konzentration von klinisch-chemischen Serummarkern sowie erste histopathologische Veränderungen (Pavkovic, 2014).

3.1.5 Hintergrundinformationen zur Substanzauswahl von Methotrexat

Methotrexat ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Zytostatika und Immunsuppressiva, der zur Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen und verschiedener Krebsarten eingesetzt wird. Die Wirkung beruht auf der Hemmung der Dihydrofolsäure-Reduktase,

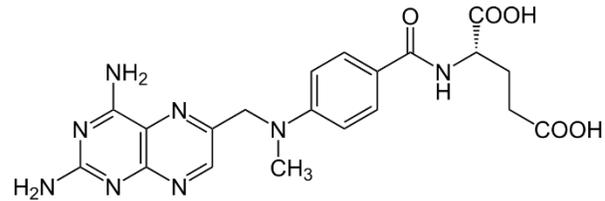


Abbildung 27 Strukturformel von Methotrexat.

einem Schlüsselenzym in der Biosynthese der Folsäure, die für die RNA- und DNA-Synthese benötigt wird. Methotrexat ist dafür bekannt, beim Menschen eine Erhöhung der Serum-Aminotransferasen (ALAT, ASAT) zu verursachen und bei Anwendung in Langzeittherapie Fettlebererkrankungen, Leberfibrose und sogar -zirrhose auszulösen. Die hepatotoxische Wirkung ist stark davon abhängig, in welcher Dosierung und welchem Dosis-Regimen Methothrexat angewendet wird, sowie von der Behandlungsdauer (Al-Motabagani, 2006; Bath *et al.*, 2014; LiverTox, 2015b).

In einer 28-tägigen Studie an männlichen und weiblichen Ratten mit wiederholter intraperitonealer Gabe von 1 mg/kg KG Methotrexat wurde die hepatotoxische Wirkung mittels *metabolite profiling* untersucht. Die Ergebnisse des *metabolite profilings* konnte keine Leberschädigung nachweisen (Mattes, *et al.*, 2014). In der tierexperimentellen Studie musste bei den behandelten Ratten aufgrund reduzierter Körpergewichte der weiblichen Tieren und verminderter Futterraufnahmen der Ratten die Hochdosis von 1 mg/kg KG Methotrexat nach 14 Tagen auf 0,5 mg/kg KG reduziert werden. Die männlichen Ratten wurden bereits nach 14 Tagen aus der Studie genommen und zur Sektion gegeben. Die Ergebnisse der klinisch-chemischen Marker und der Histopathologie der Leber wurden nicht näher beschrieben.

Auf Basis der tierexperimentellen Daten wurde für Methotrexat eine hohe Dosis von 0,5 mg/kg KG bei männlichen und weiblichen Ratten als Effektdosis festgelegt, bei der klinische und histologische Befunde einer Lebertoxizität induziert werden sollten. Als mittlere Dosis wurde 0,15 mg/kg KG festgelegt, weil bei dieser Dosis erste Anzeichen einer Leberschädigung in der klinischen Chemie und Histopathologie erwartet wurden. Die niedrige Dosis von 0,05 mg/kg KG wurde festgelegt, um keine klinischen und pathologischen Befunde zu erzeugen.

3.1.6 Hintergrundinformationen zur Substanzauswahl von Valproinsäure

Der Wirkstoff Valproinsäure zählt zur Gruppe der Antikonvulsiva und wird zur Behandlung der Epilepsie sowie zur Stimmungsstabilisierung bei bipolaren Störungen angewendet. Valproinsäure erhöht zum einen über die Blockade von spannungsabhängigen Natrium- und Calcium-Ionenkanälen die Reizschwelle

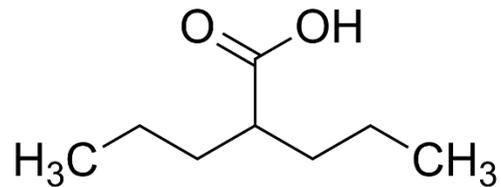


Abbildung 28 Strukturformel von Valproinsäure.

für die Auslösung von Aktionspotentialen, die für die Erregungsweiterleitung notwendig sind. Zudem verstärkt Valproinsäure die Wirkung des hemmenden Neurotransmitters GABA, der über den Einstrom von Chlorid-Ionen in Nervenzellen deren Erregbarkeit herabsetzt. Valproinsäure verstärkt die Wirkung des Neurotransmitters durch die Hemmung seines Abbaus und die Stimulation seiner Synthese (Krämer *et al.*, 1992).

Valproinsäure besitzt ein hepatotoxisches Potential und kann schwere progressive hepatozelluläre Schädigungen induzieren. Metaboliten von Valproinsäure bilden Coenzym-A-Ester, die die β -Oxidation in den Mitochondrien hemmen und eine mikrovesikuläre Steatose auslösen können. Medizinische Berichte zur Therapie mit Valproinsäure zeigen, dass eine Behandlung mit Valproinsäure bei Kindern zu einem akuten Leberversagen führen kann, dass eine Lebertransplantation erforderlich macht. In Einzelfällen wurde von einem letalen Ausgang berichtet (LiverTox, 2015c; Mindikoglu *et al.*, 2011; Teschke, 2001).

In einer 28tägigen Studie mit wiederholter peroraler Verabreichung wurde die hepatotoxische Wirkung von 500 mg/kg KG Valproinsäure bei männlichen und weiblichen Ratten mittels *metabolite profiling* untersucht. Über das Profiling konnte keine eindeutige hepatotoxische Wirkung festgestellt werden. Die klinische Pathologie verzeichnete einen Konzentrationsanstieg von Triglyzeriden und Bilirubin sowie eine leichte Konzentrationserhöhung von anorganischen Phosphaten im Serum (Mattes, et al., 2014).

Auf Basis der tierexperimentellen Daten wurde für Valproinsäure eine hohe Dosis von 500 mg/kg KG für männliche und weibliche Ratten als Effektdosis festgelegt, bei der klinische und histologische Befunde einer Steatose induziert werden sollten. Als mittlere Dosis wurde 200 mg/kg KG gewählt. Die niedrige Dosis von 80 mg/kg KG wurde festgelegt, um keine klinischen und pathologischen Befunde zu erzeugen.

3.2 Methodenvalidierung der quantitativen Analytik von Gallensäuren

Im folgenden Kapitel wird die analytische Verlässlichkeit der Methode zur Quantifizierung von Gallensäuren in verschiedenen Matrices durch die Validierungsparameter der Kalibrierung, die Bestimmungsgrenze, die Spezifität, die Stabilität des internen Standards, die Richtigkeit und Wiederholpräzision beschrieben. Der Prozess der Validierung wurde angelehnt an die EMEA-Richtlinie für bioanalytische Methoden.

3.2.1 Validierungsparameter der quantitativen Analyse von individuellen Gallensäuren

3.2.1.1 Kalibrierung

Die quantitative Analytik wurde über einen Kalibrierbereich von sieben Konzentrationspunkten abgesichert. Hierbei zeigte sich ein idealer Zusammenhang innerhalb des Arbeitsbereiches zwischen der quadratischen Kalibrierfunktion und der Signalintensität (Tabelle 48). Ein repräsentatives Beispiel zeigt die Kalibrierfunktion von TCA ($R^2 = 0.999$): Hierbei zeigt sich eine quadratische Regression zwischen den eingesetzten sieben Kalibrierkonzentrationen und den Messsignalen des Detektors (Abbildung 29). Idealerweise wird ein linearer Zusammenhang in der Analytik bevorzugt, dies war für die Gallensäuren nicht anwendbar. Grund für ein quadratischen Kurvenverlauf könnten zum einen die Sättigung des Detektors bei hohen Konzentrationen sein, sowie zum anderen die Ionisationseffizienz, durch eine erhöhte Konkurrenz zur Ionisation bei hoher Konzentration verschiedener individueller Gallensäuren in der ESI-Quelle (Nilsson *et al.*, 2012).

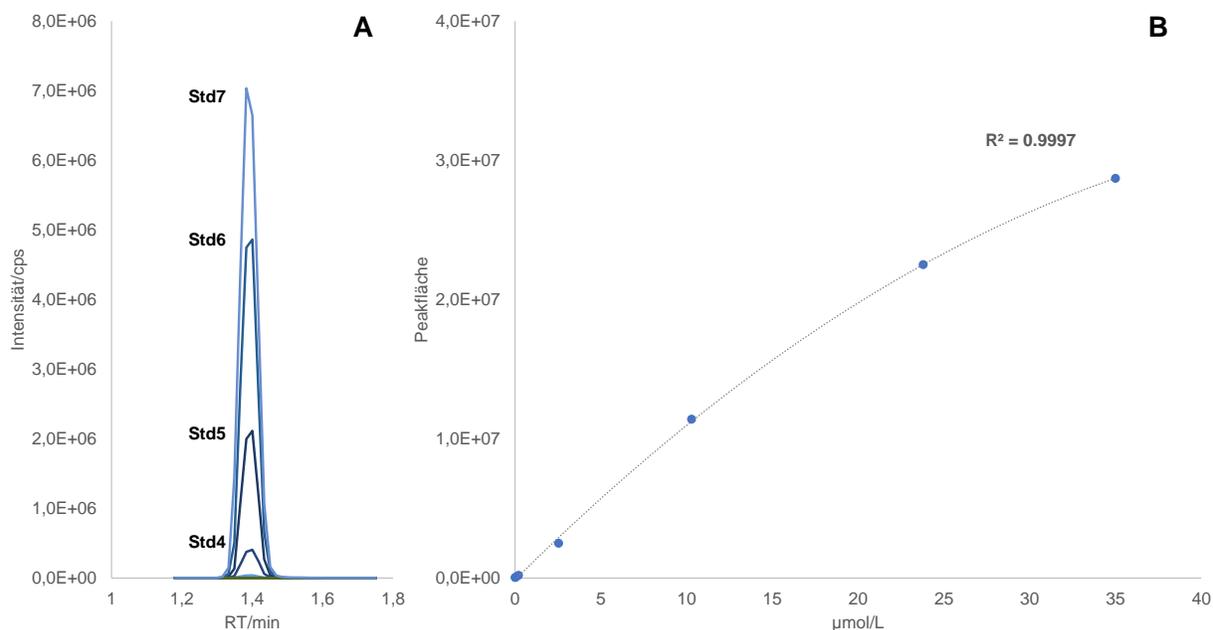


Abbildung 29 Kalibrierung von TCA im Konzentrationsbereich zwischen 0,02 und 50 µmol/L. (A) Chromatographie-Überlagerung der Messsignale der eingesetzten Kalibrierkonzentrationen von TCA (B) Linearer Zusammenhang des Detektorsignals und der definiert eingesetzten Konzentrationen von TCA. Abkürzungen: Std – Standard, RT – Retentionszeit, R^2 – Bestimmtheitsmaß.

Tabelle 48 Konzentrationsbereich der Kalibriergeraden individueller Gallensäuren. Abkürzungen: RT – Retentionszeit, R^2 – Bestimmtheitsmaß, Std – Standardkonzentration, iStd – interner Standard

Gallensäuren	RT/min	Konzentration/µmol/L							iStd	Regression	R^2
		Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7			
CA	2,65	0,03	0,06	0,3	3,75	15	37,5	75	CA-d5	quadratisch (1/x)	0,999
CDCA	3,30	0,02	0,04	0,2	1,5	6	15	30	CDCA-d5	quadratisch (1/x)	0,999
DCA	3,40	0,02	0,04	0,2	0,5	2	5	10	CDCA-d5	quadratisch (1/x)	0,999
GCA	1,50	0,03	0,06	0,3	3,75	15	37,5	75	GCA-d5	quadratisch (1/x)	0,999
GCDCA	2,30	0,02	0,04	0,2	1	4	10	20	GLCA-d4	quadratisch (1/x)	0,999
GDCA	2,45	0,01	0,02	0,1	0,5	2	5	10	GLCA-d4	quadratisch (1/x)	0,999
GLCA	2,85	0,01	0,02	0,1	0,25	1	2,5	5	GLCA-d4	quadratisch (1/x)	0,999
GUDCA	1,25	0,01	0,02	0,1	0,5	2	5	10	GUDCA-d4	quadratisch (1/x)	0,999
HDCA	2,65	0,01	0,02	0,1	0,25	1	2,5	5	HDCA(b)-d4	quadratisch (1/x)	0,999
LCA	3,80	0,01	0,02	0,1	0,25	1	2,5	5	LCA-d4	quadratisch (1/x)	0,998
MCA(a)	1,90	0,005	0,01	0,05	0,25	1	2,5	5	CA-d5	quadratisch (1/x)	0,999
MCA(b)	2,10	0,01	0,02	0,1	0,5	2	5	10	CA-d5	quadratisch (1/x)	0,999
MCA(o)	1,85	0,005	0,01	0,05	0,25	1	2,5	5	CA-d5	quadratisch (1/x)	0,999
TCA	1,50	0,02	0,04	0,2	2,5	10	25	50	TCA-d5	quadratisch (1/x)	0,999
TCDCa	2,35	0,01	0,02	0,1	1	4	10	20	TCDCa-d5	quadratisch (1/x)	0,999
TDCA	2,45	0,01	0,02	0,1	0,5	2	5	10	TCDCa-d5	quadratisch (1/x)	0,999
TLCA	2,85	0,01	0,02	0,1	0,25	1	2,5	5	GLCA-d4	quadratisch (1/x)	0,999
TMCA(a+b)	0,85	0,01	0,02	0,1	0,5	2	5	10	TUDCA-d5	quadratisch (1/x)	0,999
TUDCA	1,30	0,01	0,02	0,1	0,75	3	7,5	15	TUDCA-d5	quadratisch (1/x)	0,999
UDCA	2,60	0,02	0,04	0,2	1,5	6	15	30	HDCA(b)-d4	quadratisch (1/x)	1,000

3.2.1.2 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wurde durch die Ermittlung der Richtigkeit und Wiederholpräzision für den ersten und zweiten Standard der Kalibrierung durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass das Akzeptanzkriterium für die Richtigkeit oder die Wiederholpräzision für die Gallensäure GDCA, HDCA und MCA(o) im ersten Kalibrierstandard nicht erfüllt sind. Dadurch wird die Bestimmungsgrenze für diese Gallensäuren auf die Konzentration von 0,02 µmol/L für GDCA und HDCA sowie auf 0,01 µmol/L für MCA(o) bestimmt (Tabelle 49). Die Wiederholpräzision von LCA ist im zweiten Standard außerhalb des Akzeptanzkriteriums (Tabelle 49). Die Bestimmungsgrenze von LCA wurde aufgrund der hohen Variabilität der Wiederholpräzision (Tabelle 52) in den Messexperimenten auf 0,1 µmol/L (Tabelle 48), bestimmt.

Tabelle 49 Zusammenfassung der Bestimmungsgrenze für jede Gallensäure. Die Richtigkeit und Präzision wird durch den Variationskoeffizienten in % ausgedrückt. Die Konzentrationen der Standards sind in µmol/L angegeben.

Gallensäuren	Standard 1	Richtigkeit/%	Präzision/%	Standard 2	Richtigkeit/%	Präzision/%
CA	0,03	108,9	7,4	0,06	98,3	4,7
CDCA	0,02	102,5	12,8	0,04	105,8	8,9
DCA	0,02	109,2	10,4	0,04	95,8	8,7
GCA	0,03	114,4	6,0	0,06	100,6	2,8
GCDCA	0,02	115,8	7,6	0,04	98,8	9,6
GDCA	0,01	125,0	8,9	0,02	87,5	12,2
GLCA	0,01	103,3	15,5	0,02	95,8	7,0
GUDCA	0,01	120,0	9,6	0,02	98,3	9,1
HDCA	0,01	116,7	21,4	0,02	100,0	14,1
LCA	0,01	94,0	17,3	0,02	96,0	17,5
MCA(a)	0,005	100,0	16,3	0,01	110,0	13,9
MCA(b)	0,01	110,0	11,7	0,02	94,2	8,3
MCA(o)	0,005	103,3	23,5	0,01	101,7	13,2
TCA	0,02	97,5	11,0	0,04	96,3	4,7
TCDCA	0,01	113,3	9,8	0,02	97,5	11,4
TDCA	0,01	111,7	15,9	0,02	102,5	11,9
TLCA	0,01	110,0	7,4	0,02	95,0	6,1
TMCA(a+b)	0,01	100,0	11,5	0,02	100,0	5,0
TUDCA	0,01	116,7	4,0	0,02	100,8	6,7
UDCA	0,02	119,2	11,5	0,04	92,9	11,4

3.2.1.3 Selektivität

Eine analytische Methode ist selektiv, wenn unterschiedliche Komponenten einer Mischung nebeneinander und störungsfrei bestimmt werden können. Mit der etablierten Messmethode konnten 20 individuelle Gallensäuren chromatographisch getrennt werden (Abbildung 30). Durch die chromatographische Trennung konnten keine Interferenzen zwischen isobaren Strukturisomeren, wie beispielsweise bei CDCA, DCA oder MCA(a), MCA(b) und MCA(o) festgestellt werden. Eine Sicherstellung, dass keine Interferenzen in der Matrix vorhanden sind, zeigen die Ergebnisse der Richtigkeit und Präzision aus den Experimenten der aufgestockten Matrix mit ausgewählten Kalibrierstandards (Tabelle 53, Tabelle 54).

Eine chromatographische Trennung isobarer Komponenten und die dadurch resultierende Differenzierung ist essentiell für die Interpretation der Studienergebnisse. Strukturanaloga wie beispielsweise MCA(a) und MCA(b) sind primäre Gallensäuren und entstehen in der Leber durch die Umwandlung von primären CDCA, wohingegen MCA(o) eine sekundäre Gallensäure darstellt, die im Dünndarm durch das Mikrobiom entsteht. Abbildung 31 zeigt die chromatographische Trennung muricholierter Gallensäuren im Plasma.

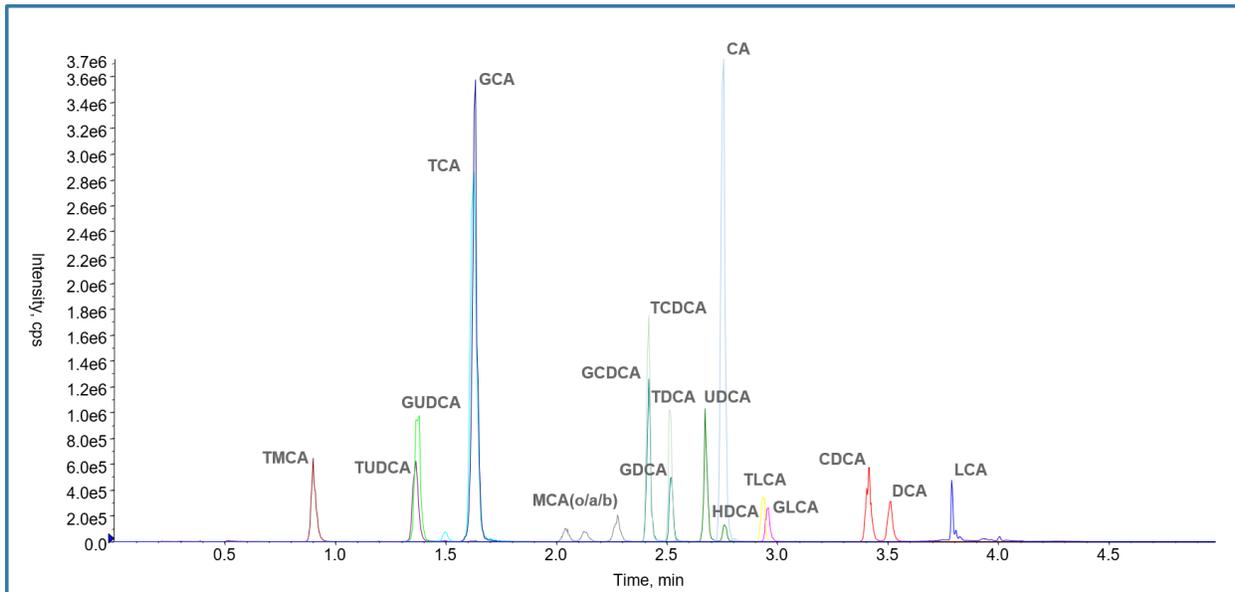


Abbildung 30 Chromatogramm 20 individueller Gallensäuren. Die Messung zeigt den Kalibrierstandard 7, der in 50% Methanol gelöst wurde.

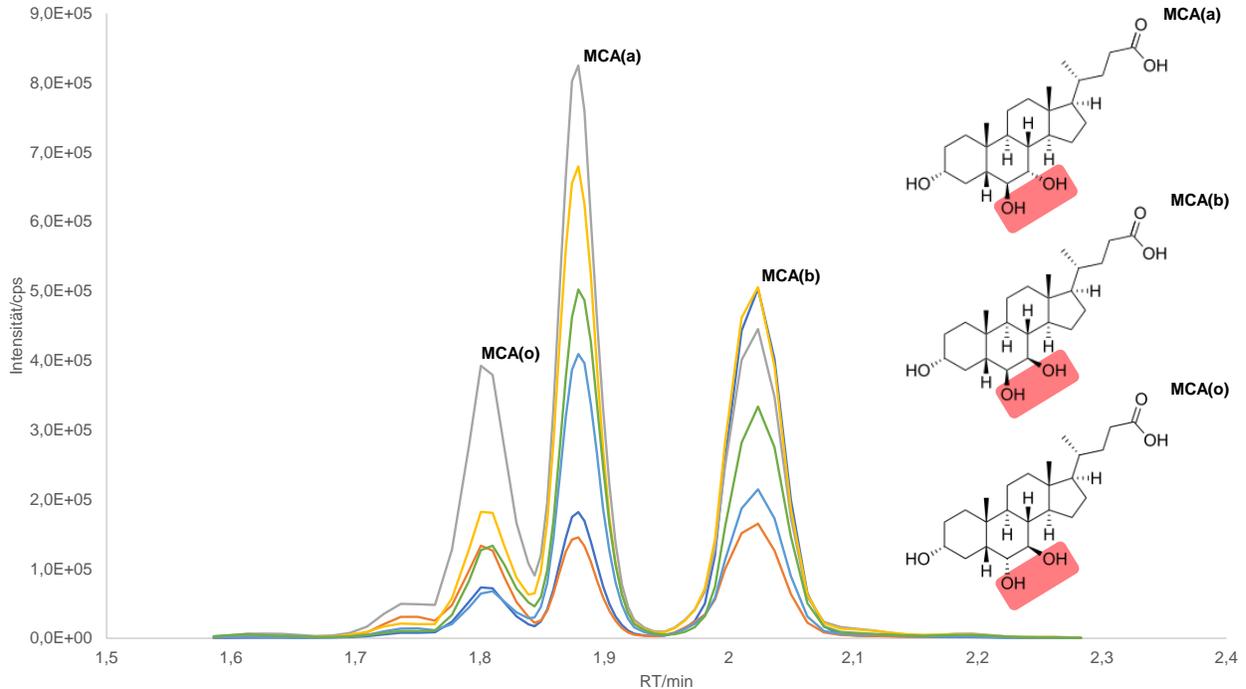


Abbildung 31 Chromatographie muricholierter Gallensäuren im Plasma von Ratten. In der Darstellung sind 6 chromatographische Trennungen von muricholierter Gallensäuren aus 6 verschiedenen Plasmaproben von Ratten übereinandergelegt. Die Strukturformeln von MCA(a), MCA(b) und MCA(o) unterscheiden sich in der Anordnung der Hydroxyl-Gruppen (rot markiert). Abkürzungen: RT – Retentionszeit.

3.2.1.4 Stabilität des internen Standards

Eine Kompensation von Matrixeffekten und systematischen Fehlern während der Probenvorbereitung ist durch interne Standards möglich. Diese sind matrixfremd und chemisch ähnlich zum Analyten. Es wird angenommen, dass sich bei einer Veränderung der Konzentration des internen Standards in gleicher Weise auch die Konzentration des Analyten verändert hat (Wieling, 2002).

Die bei dieser Messmethode verwendeten 10 deuterierten Gallensäuren weisen chemisch ähnliche Eigenschaften auf und erzeugen reproduzierbare Ergebnisse bei den Messungen (Tabelle 50). Die Chromatographie der internen Standards ist über mehrere Messzyklen in verschiedenen Messproben und Matrices sehr stabil und zeigt nur geringe Variationskoeffizienten der Messsignale am Detektor (Abbildung 32).

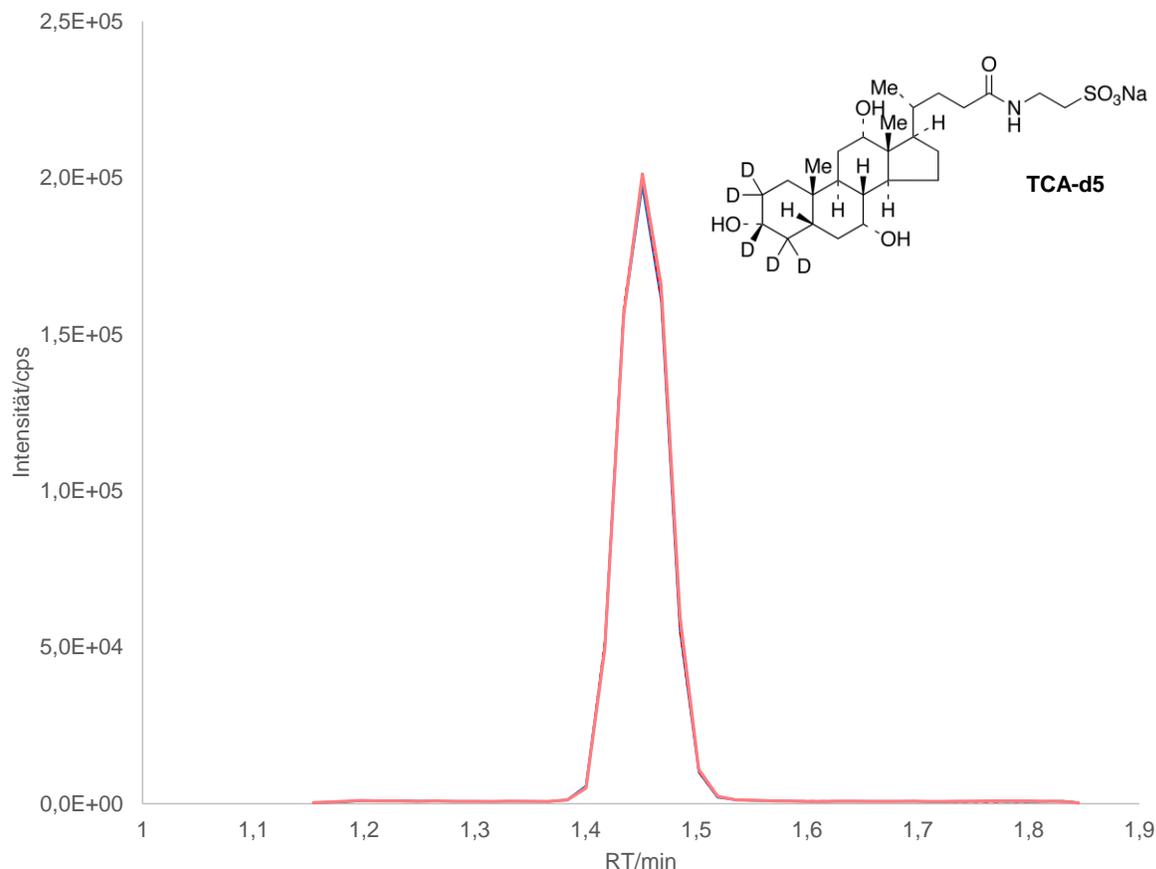


Abbildung 32 Repräsentative Chromatographie des isotopenmarkierten TCA-d5. Die Darstellung zeigt drei übereinandergelegte Chromatogramme aus drei verschiedenen Messproben. Abkürzungen: RT – Retentionszeit, cps – counts per seconds.

Tabelle 50 Zusammenfassung der Reproduzierbarkeit verwendeter interner Standards. Die Ergebnisse basieren auf 284 Messungen an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Abkürzungen: cps – counts per seconds, CV – Variationskoeffizient.

Interner Standard	Peakintensität/cps	CV/%	Retentionszeit/min	CV/%
CA-d5	355339 ± 37244	10,5	2.7 ± 0.01	0,4
CDCA-d5	121189 ± 14088	11,6	3.4 ± 0.01	0,4
GCA-d5	471466 ± 53151	11,3	1.6 ± 0.02	1,1
GLCA-d4	225558 ± 21778	9,7	2.9 ± 0.01	0,4
GUDCA-d5	394678 ± 45403	11,5	1.3 ± 0.01	1,0
HDCA-d4	206730 ± 23238	11,2	2.7 ± 0.16	6,0
LCA-d4	326332 ± 37730	11,6	3.8 ± 0.22	5,9
TCA-d4	497332 ± 78391	15,8	1.6 ± 0.02	1,2
TCDCa-d5	436159 ± 53617	12,3	2.4 ± 0.02	0,6
TUDCA-d5	444049 ± 62882	14,2	1.3 ± 0.02	1,3

3.2.1.5 Richtigkeit

Zusammenfassend zeigt die Analytik von allen individuellen Gallensäuren eine geringe Variabilität gegenüber dem wahren Wert mit Ausnahme von GDCA und TMCA(a). Weil eine erhöhte Abweichung vom wahren Wert (0,01 µmol/L) von GDCA ermittelt wurde (Tabelle 51), erfüllt diese Konzentration nicht das Akzeptanzkriterium, weshalb sie als nicht valide festgelegt wird. Daraus ergibt sich eine angepasste Bestimmungsgrenze von 0,02 µmol/L für GDCA (Tabelle 48). Die Konzentration von TMCA(a+b) ist bei der Qualitätskontrolle mit der höchsten Konzentration (QC3) in einem geringen Maße reproduzierbar. Es ist unklar, warum dieser Unterbefund vorliegt, da die Konzentration im Bereich von 2 – 5 µmol/L (Standard 5/6) liegt. Ein vergleichbarer Befund wurde bei beiden Standardkonzentrationen nicht beobachtet. Eine mögliche Erklärung könnte die unterschiedliche Matrix von Standards und QCs sein. Standards werden in Methanol 50 % gelöst und QCs sind eine Lyophilisat aus Humanplasma, das in Wasser gelöst wird. Hierbei könnte bei höheren Konzentrationen eine Matrixsuppression für TMCA(a+b) in den QC3 Proben auftreten, die gegenüber einer Kalibrierung mit Methanol als Lösungsmittel zu einer reduzierten Reproduzierbarkeit führen kann.

Tabelle 51 Richtigkeit (CV/%) 20 individueller Gallensäuren des Kalibrierbereichs und der Qualitätskontrollproben. Analyse mittels UPLC- MS/MS an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Abkürzungen: Std – Standard, QC - Qualitätskontrollprobe

Gallensäure	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7	QC1	QC2	QC3
CA	108,9	98,3	90,3	101,4	102,4	97,4	94,6	100,5	99,5	105,1
CDCA	102,5	105,8	93,4	97,7	99,5	101,0	99,4	100,3	100,0	102,2
DCA	109,2	95,8	95,7	99,3	100,6	100,1	99,9	96,3	95,7	97,1
GCA	114,4	100,6	85,6	98,4	100,4	100,5	99,4	94,9	90,6	98,9
GCDCA	115,8	98,8	85,8	100,2	100,0	100,8	99,8	108,9	101,7	105,8
GDCA	125,0	87,5	88,8	99,3	100,3	100,7	99,7	91,6	93,1	96,9
GLCA	103,3	95,8	99,8	103,3	100,6	99,2	100,2	96,8	102,4	105,2
GUDCA	120,0	98,3	85,3	94,8	102,1	100,3	99,7	103,6	101,6	103,4
HDCA	116,7	100,0	87,0	99,5	105,5	97,8	100,4	103,6	96,5	87,0
LCA	94,0	96,0	102,7	102,3	103,3	97,1	100,9	91,4	101,4	103,6
MCA(a)	100,0	110,0	88,7	103,5	100,7	99,3	100,2	80,6	95,0	95,1
MCA(b)	110,0	94,2	94,3	103,4	100,2	99,3	100,1	93,7	92,8	94,9
MCA(o)	103,3	101,7	88,3	104,7	100,0	99,5	100,2	88,4	95,1	102,6
TCA	97,5	96,3	102,3	103,3	102,8	96,3	84,7	104,8	94,5	104,6
TCDCA	113,3	97,5	92,5	95,3	99,4	102,1	98,8	91,7	89,7	99,6
TDCA	111,7	102,5	91,3	98,0	97,6	102,4	99,3	111,5	92,0	94,2
TLCA	110,0	95,0	92,0	102,5	100,2	100,0	100,0	96,9	96,8	99,2
TMCA(a+b)	100,0	100,0	93,2	104,6	103,7	96,8	100,6	97,1	94,1	79,3
TUDCA	116,7	100,8	86,0	96,9	100,4	100,9	99,8	97,6	97,0	103,7
UDCA	119,2	92,9	87,4	98,9	101,6	99,7	99,9	101,2	97,8	92,2

3.2.1.6 Wiederholpräzision

Grundsätzlich zeigen die Ergebnisse für die Wiederholpräzision überwiegend sehr gute Wiederfindungen nach mehreren Messungen von Replikaten. Die Auswertung zeigt, dass die Variabilität von LCA bei einer Konzentration von 0,02 $\mu\text{mol/L}$ (Standard 2) außerhalb des Akzeptanzkriteriums liegt (Tabelle 52). Eine mögliche Erklärung für die Variabilität von LCA im niedrigen Konzentrationsbereich könnte in der Chromatographie liegen. Im Gradienten eluiert LCA bei 100 % finaler organischer Phase und ist damit im Bereich des Spülvorgangs der Methode. Dadurch entsteht ein erhöhtes Signalrauschen, das nicht reproduzierbar für jede Messung erzeugt wird und somit zu Abweichungen bei der Wiederfindung führen könnte (Abbildung 33). Gleiches gilt auch für nicht reproduzierbare Wiederfindungen von HDCA und MCA(o), die nicht das Akzeptanzkriterium bei einer Konzentration von 0,005 $\mu\text{mol/L}$ (MCA[o]) bzw. 0,01 $\mu\text{mol/L}$ für HDCA (Standard1) erfüllen (Tabelle 52). Beide Gallensäuren sind isobare Analyten und werden durch die chromatographische Trennung nur minimal von ihrem benachbarten isobaren Pendant getrennt. Die erhöhte Variabilität des niedrigen Standards ist auf eine geringe Signalintensität zurückzuführen.

Tabelle 52 Wiederholpräzision (CV/%) 20 individueller Gallensäuren des Kalibrierbereichs und der Qualitätskontrollproben. Analyse mittels UPLC- MS/MS an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Abkürzungen: Std – Standard, QC - Qualitätskontrollprobe

Gallensäure	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7	QC1	QC2	QC3
CA	7,4	4,7	6,0	5,2	6,5	5,3	7,6	8,9	7,9	9,7
CDCA	12,8	8,9	7,2	6,1	4,0	3,3	0,8	11,1	8,7	8,0
DCA	10,4	8,7	11,1	3,7	2,8	2,1	0,6	10,6	9,3	6,9
GCA	6,0	2,8	4,6	4,7	3,7	3,3	1,2	8,2	8,4	7,8
GCDCA	7,6	9,6	8,6	9,2	4,9	3,8	0,8	8,6	10,0	8,2
GDCA	8,9	12,2	8,6	7,3	6,3	4,9	1,1	13,3	10,5	7,6
GLCA	15,5	7,0	8,3	4,5	5,5	3,9	0,8	7,7	8,3	7,8
GUDCA	9,6	9,1	4,5	7,1	3,8	3,6	0,7	9,4	9,4	9,6
HDCA	21,4	14,1	12,9	4,7	5,1	3,8	1,1	16,3	13,2	11,9
LCA	17,3	17,5	10,7	11,5	5,5	4,2	0,9	27,2	14,7	13,9
MCA(a)	16,3	13,9	11,8	8,8	4,5	2,2	0,4	18,4	10,9	10,9
MCA(b)	11,7	8,3	5,9	7,1	3,1	2,3	0,5	10,1	6,9	7,5
MCA(o)	23,5	13,2	13,2	6,6	3,6	2,6	0,7	17,0	8,1	9,4
TCA	11,0	4,7	4,6	3,6	4,3	4,6	8,3	8,3	8,2	8,1
TCDCA	9,8	11,4	9,2	8,5	5,7	5,2	1,6	8,0	8,7	8,3
TDCA	15,9	11,9	4,1	8,3	5,5	4,1	1,0	9,6	7,4	8,0
TLCA	7,4	6,1	5,5	6,0	3,8	2,4	0,5	9,6	9,3	7,8
TMCA(a+b)	11,5	5,0	8,1	7,2	4,1	3,8	0,8	13,2	15,2	11,4
TUDCA	4,0	6,7	3,7	6,2	3,7	2,8	0,7	8,6	9,2	9,4
UDCA	11,5	11,4	6,7	9,0	4,2	3,6	0,9	9,5	9,4	9,8

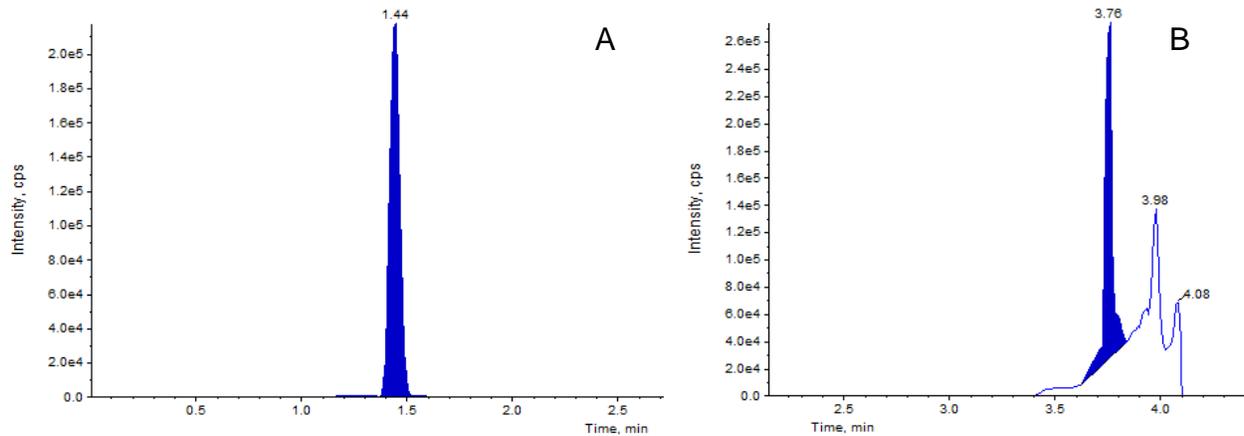


Abbildung 33 Vergleich der Chromatographie von (A) TCA-d5 und (B) LCA-d4 in Methanol.

3.2.2 Analyse individueller Gallensäuren im Plasma von Ratten

3.2.2.1 Richtigkeit

Da Plasma keine gallensäurefreie Matrix ist, wurde indirekt die Linearität zum einen anhand von Verdünnungen (1:2, 1:5) des Plasmas sowie durch Standardadditionsverfahren (sukzessive Zugabe von Standardkonzentrationen) untersucht. Da nur ein enger Kalibrierbereich abgedeckt wird, ist es wichtig zu demonstrieren, dass die Analyten von Interesse den Kalibrierbereich nicht überschreiten oder dass sie durch Verdünnung der Probe im validen Arbeitsbereich analysiert werden können. Grundsätzlich konnten GCDCA, GLCA und GUDCA mit der etablierten Probenvorbereitung im Plasma nicht bestimmt werden (Tabelle 53). Eine Ursache für diese erhöhte Variabilität könnten sehr geringe und schwankende Signalintensitäten in Plasma sein. Dennoch kann für diese drei Gallensäuren ein Konzentrationsanstieg ab einer Zugabe von 0,1 $\mu\text{mol/L}$ (Std3) sowie für GCDCA ab 0,04 $\mu\text{mol/L}$ (Std2) bestimmt werden (Tabelle 53). Dadurch ist es möglich, Effekte von Substanzen, die zu einer Erhöhung dieser Gallensäuren führen, nachzuweisen, obwohl die Gallensäuren unter physiologischen Bedingungen in dieser Matrix unterhalb der Nachweisgrenze vorhanden sind. Die sekundäre Gallensäure LCA zeigt bei Verdünnung der 1:2 und 1:5 gepoolten Proben eine erhöhte Variabilität zum wahren Wert (Tabelle 53). Weil das Signal – wie bereits erläutert – bei den chromatographischen Bedingungen ein erhöhtes Signal-Rausch-Verhältnis aufweist, sind vermutlich auch die endogenen Konzentrationen im Plasma sehr gering, womit sich die erhöhten Schwankungen in der Wiederfindung erklären lassen. Ein Konzentrationsanstieg ist ab einer Zugabe von 0,25 $\mu\text{mol/L}$

(Std4) zu erkennen (Tabelle 53). Durch die hohe Variabilität, die auch schon im unteren Kalibrierbereich aufgefallen ist und zur Anpassung der Bestimmungsgrenze geführt hat, ist LCA nur als semi-quantitativer Analyt zu betrachten. Somit kann ein Konzentrationsanstieg auf einen Effekt hindeuten, der aber nicht absolut mengenmäßig als Wiederfindung ausgedrückt, sondern nur über ein Verhältnis (Ratio) zur Kontrolle angegeben werden kann. Die sekundäre Gallensäure HDCA zeigt eine erhöhte Variabilität in aufgestockten gepoolten Proben mit Standard 4 und 5 (Tabelle 53). Die Befunde sind minimal für beide Proben, könnten aber mit der Auflösung der Peaks zusammenhängen. Weil die isobaren Gallensäuren UDCA und HDCA co-eluierten und nur minimal separiert sind, könnte es bei erhöhten Konzentrationen zur Überlagerung der Signale und somit zu einer erhöhten Variabilität kommen. Das müsste wiederum bei der Interpretation eines Substanzeffekts mit einhergehender Konzentrationserhöhung von HDCA beachtet werden, da eine analytische Streuung im Plasma im Bereich des Kalibrierstandards 4 auftreten könnte.

Tabelle 53 Richtigkeit (CV/%) 20 individueller Gallensäuren im Plasma. Analyse mittels UPLC- MS/MS an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Abkürzungen: Pool – gepoolte Plasmaprobe von 10 Ratten, Std – Standard. Rot markierte Werte erfüllen das Akzeptanzkriterium nicht.

Gallensäure	Pool	Pool (1:2)	Pool (1:5)	Pool + Std2	Pool + Std3	Pool + Std4	Pool + Std5
CA	101,0	96,5	102,5	90,2	89,7	96,7	96,5
CDCA	100,7	95,4	106,4	95,6	95,3	105,0	103,9
DCA	100,8	99,6	99,5	97,2	102,0	105,3	105,5
GCA	98,8	93,2	108,0	87,3	86,3	103,4	101,8
GCDCA	LOD	LOD	LOD	88,6	93,0	106,5	103,9
GDCA	60,6	64,8	LOD	76,6	82,4	103,8	104,8
GLCA	LOD	LOD	LOD	76,6	97,3	97,7	103,8
GUDCA	LOD	LOD	LOD	153,3	92,3	103,7	100,7
HDCA	104,5	99,2	96,3	102,3	105,5	117,3	122,9
LCA	85,5	73,2	135,5	72,2	80,1	97,8	106,4
MCA(a)	103,6	103,2	96,1	105,4	115,2	118,9	118,7
MCA(b)	99,6	95,9	104,5	89,5	94,4	104,0	93,8
MCA(o)	99,1	99,8	101,1	95,7	103,1	109,1	106,2
TCA	102,1	98,4	99,5	96,1	92,0	97,4	96,2
TCDCA	105,5	96,3	98,2	93,9	92,8	95,1	103,1
TDCA	106,8	88,8	104,4	82,3	85,9	88,0	89,5
TLCA	93,6	106,4	LOD	94,4	88,8	96,9	96,2
TMCA(a+b)	113,1	100,3	86,6	110,3	110,5	110,3	115,0
TUDCA	96,9	96,2	106,8	91,9	90,1	99,2	108,0
UDCA	98,9	101,1	LOD	87,7	90,6	104,9	104,0

3.2.2.2 Wiederholpräzision

Die Ergebnisse der Wiederholpräzision sind analog zu den Ergebnissen der Richtigkeit und unterstützen die oben genannten Erkenntnisse.

Tabelle 54 Wiederholpräzision (CV/%) 20 individueller Gallensäuren im Plasma. Analyse mittels UPLC- MS/MS an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Rot markierte Werte erfüllen das Akzeptanzkriterium nicht.

Gallensäure	Pool	Pool (1:2)	Pool (1:5)	Pool + Std2	Pool + Std3	Pool + Std4	Pool + Std5
CA	6,1	6,6	7,3	5,2	7,3	8,6	6,4
CDCA	7,0	9,4	14,7	6,5	7,4	9,0	6,4
DCA	8,1	6,5	10,2	6,0	9,7	11,2	7,7
GCA	7,6	4,8	9,9	5,6	7,3	9,6	6,7
GCDCA	LOD	LOD	LOD	13,2	11,1	10,0	7,4
GDCA	15,9	21,5	LOD	13,4	9,8	11,0	8,2
GLCA	LOD	LOD	LOD	11,8	13,4	7,2	5,4
GUDCA	LOD	LOD	LOD	30,8	11,4	6,8	3,8
HDCA	10,7	10,1	11,5	9,4	15,3	16,7	15,2
LCA	10,2	30,3	60,7	28,5	22,8	15,3	7,3
MCA(a)	9,4	10,4	14,0	10,3	14,4	14,8	11,7
MCA(b)	10,1	6,9	12,3	7,1	7,8	9,6	4,8
MCA(o)	8,5	6,8	10,0	7,3	12,0	11,8	8,5
TCA	7,3	5,9	8,9	6,8	6,2	8,3	5,7
TCDCA	8,4	4,3	11,4	7,1	5,8	8,1	11,5
TDCA	14,5	11,5	14,8	12,6	8,5	5,0	4,3
TLCA	10,3	14,2	LOD	7,8	8,0	7,9	4,4
TMCA(a+b)	11,5	12,6	13,1	7,4	13,6	15,5	14,6
TUDCA	8,3	4,8	9,3	10,0	7,6	10,7	6,1
UDCA	20,9	18,2	LOD	15,5	8,3	9,5	6,4

3.2.3 Analyse individueller Gallensäuren im Leberhomogenat von Ratten

3.2.3.1 Richtigkeit

Leberhomogenat ist wie Plasma keine gallensäurefreie Matrix. Die Bewertung der Validierung wurde analog wie beim Plasma durchgeführt. Die Gallensäuren CDCA, DCA, GLCA, HDCA, LCA und UDCA sind mit der etablierten Methode im Leberhomogenat nicht nachweisbar. Durch ein Anreichern der Proben mit Standardkonzentrationen kann für diese Gallensäuren ein Konzentrationsanstieg gezeigt werden (Tabelle 55). Hierbei zeigen CDCA und DCA ab einer Konzentration von 0,02 µmol/L (Std2) bereits valide Wiederfindungen, die vergleichbar sind mit dem wahren Wert. Danach folgen die Gallensäuren GUDCA und HDCA, die bei einer Konzentration von 0,1 µmol/L (Std3) eine marginal erniedrigte Variabilität aufweisen (Tabelle 55). Die Bestimmungsgrenze von LCA und UDCA ist bei einer Konzentration von 0,25 µmol/L (LCA) und 1,5 µmol/L (UDCA) (Tabelle 55). Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse könnte mit der Natur dieser Gallensäuren zusammenhängen. GUDCA, HDCA, LCA und UDCA sind

sekundäre Gallensäuren und entstehen im Mikrobiom des Dünndarms, daher könnten die physiologischen Konzentrationen in der Leber sehr gering sein. Ein zusätzlicher Matrixeffekt könnte die Analyse beeinträchtigen. Eine Ausnahme bildet hier DCA, bei der keinen Einfluss auf die Wiederfindung bei sukzessiver Zugabe von Standardkonzentrationen festzustellen ist. Die Wiederfindung von TCA liegt in gepoolten Proben oberhalb des Kalibrierbereichs (Tabelle 55). Erst ab einer Verdünnung von 1:2 liegt die Variabilität innerhalb des Akzeptanzkriteriums. Durch Anreichern der Proben mit Standardkonzentrationen erhöht sich die Variabilität bedeutend, weshalb für keine Probe das Akzeptanzkriterium erfüllt wird (Tabelle 55). Die Ergebnisse für TCA zeigen, dass es mit der aktuellen Methode keine Möglichkeit gibt, eine erhöhte Konzentration bestimmen zu können; deshalb ist TCA ungeeignet, um mit dieser Methode als Substanzeffekt im Leberhomogenat detektiert zu werden. Gleiches gilt für TMCA(a+b): Diese Gallensäure ist in allen Proben oberhalb des Kalibrierbereichs und kann somit nicht zur Bestimmung eines Substanzeffekts im Leberhomogenat herangezogen werden (Tabelle 55).

Tabelle 55 Richtigkeit (%) 20 individueller Gallensäuren im Leberhomogenat. Analyse mittels UPLC- MS/MS an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Abkürzungen: Std – Standard, QC – Qualitätskontrollprobe, > ULOQ – Oberhalb des Kalibrierbereichs. Rot markierte Werte erfüllen das Akzeptanzkriterium nicht.

Gallensäure	Pool	Pool (1:2)	Pool (1:5)	Pool + Std2	Pool + Std3	Pool + Std4	Pool + Std5
CA	94,4	100,1	105,7	100,4	94,2	100,3	100,4
CDCA	LOD	LOD	LOD	100,4	94,2	100,3	100,4
DCA	LOD	LOD	LOD	86,3	88,0	95,4	96,5
GCA	99,1	100,0	100,8	98,3	99,2	98,3	94,2
GCDCA	90,9	97,4	111,4	96,6	90,5	99,2	94,6
GDCA	95,8	96,2	107,9	96,1	91,3	97,5	95,1
GLCA	LOD	LOD	LOD	88,7	92,7	98,5	97,6
GUDCA	87,8	98,8	113,4	90,7	82,9	103,0	96,2
HDCA	115,2	LOD	LOD	105,9	80,3	94,6	98,3
LCA	LOD	LOD	LOD	84,6	119,3	93,4	104,6
MCA(a)	112,2	85,1	105,7	92	92,8	95,4	102,3
MCA(b)	96,9	98,9	104,5	99,1	91,4	101,0	99,1
MCA(o)	100,9	92,5	105,1	82,6	78,6	94,7	95,8
TCA	> ULOQ	101,4	98,6	155,7	149,3	153,8	132,4
TCDCA	100,7	98,7	100,3	99,9	100,1	101,6	98,0
TDCA	97,1	99,1	103,4	100,2	99,6	99,7	94,4
TLCA	99,2	98,9	102,0	95,2	90,9	98,2	95,3
TMCA(a+b)	> ULOQ	> ULOQ	> ULOQ	> ULOQ	> ULOQ	> ULOQ	> ULOQ
TUDCA	98,7	99,4	101,4	101,6	99,8	98,0	92,5
UDCA	LOD	LOD	LOD	82,7	78,3	98,0	94,5

3.2.3.2 Wiederholpräzision

Die Ergebnisse der Gallensäuren CDCA, GLCA und UDCA zeigen eine erhöhte Variabilität in gepoolten Proben mit einer zugegebenen Konzentration von 0,01 µmol/L (GLCA) und 0,02 µmol/L (CDCA/UDCA), die sich für UDCA weiterführt bis zur gepoolten Probe mit einer zugegebenen Konzentration von 0,04 µmol/L (Std3) (Tabelle 56). Weil beide Gallensäuren nicht nachweisbar sind, könnte ein erhöhtes Signalrauschen in dieser Matrix zur Variabilität bei den Wiederfindungen führen. Die Interpretation eines Substanzeffekts ist daher hier erst ab höheren Konzentrationen sicher möglich. Ein Vergleich mit den Ergebnissen des Parameters der Richtigkeit und mit denen der Wiederholpräzision zeigt, dass LCA für die Interpretation eines Substanzeffekts in der Leber durch einen Konzentrationsanstieg ungeeignet ist (Tabelle 56). Die Gallensäuren MCA(a) und MCA(o) zeigen eine erhöhte Variabilität für die gepoolten Proben und ihre Verdünnungen, sowie für die gepoolten Proben mit aufgestockten Konzentrationen von 0,01 µmol/L (Std2) und 0,05 µmol/L (Std3) (Tabelle 56). Für beide Gallensäuren kann eine Veränderung im Leberhomogenat bestimmt werden. Daher können beide Gallensäuren zumindest semi-quantitativ für die Bewertung eines Substanzeffekts genutzt werden.

Tabelle 56 Wiederholpräzision (CV%) 20 individueller Gallensäuren im Leberhomogenat. Analyse mittels UPLC- MS/MS an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Abkürzungen: Std – Standard, QC – Qualitätskontrollprobe, > ULOQ – Oberhalb des Kalibrierbereichs. Rot markierte Werte erfüllen das Akzeptanzkriterium nicht.

Gallensäure	Pool	Pool (1:2)	Pool (1:5)	Pool + Std2	Pool + Std3	Pool + Std4	Pool + Std5
CA	8,3	7,6	9,5	9,0	13,3	11,5	3,5
CDCA	LOD	LOD	LOD	28,6	12,5	7,6	3,3
DCA	LOD	LOD	LOD	15,2	12,9	8,7	3,3
GCA	6,1	5,0	6,2	6,7	11,3	8,3	4,9
GCDCA	8,6	7,5	9,0	9,0	10,8	15,1	6,0
GDCA	10,3	7,5	11,8	11,5	11,6	7,7	4,5
GLCA	LOD	LOD	LOD	43,6	14,1	7,8	4,9
GUDCA	11,4	13,2	12,7	11,7	12,4	9,4	8,6
HDCA	26,3	LOD	LOD	15,2	14,3	12,5	7,7
LCA	LOD	LOD	LOD	163,0	145,3	99,9	59,4
MCA(a)	27,0	23,0	68,9	30,4	26,1	9,1	4,4
MCA(b)	10,7	9,0	12,9	8,4	11,7	8,4	5,6
MCA(o)	38,1	30,4	21,7	25,6	33,2	14,9	6,1
TCA	> ULOQ	9,9	5,4	10,9	13,2	14,5	14,7
TCDCA	7,5	6,1	14,3	8,3	12,5	9,5	6,0
TDCA	8,5	8,4	10,3	10,8	13,3	10,5	7,4
TLCA	5,2	8,3	13,3	9,5	10,9	8,0	5,3
TMCA(a+b)	> ULOQ	> ULOQ	> ULOQ	> ULOQ	> ULOQ	> ULOQ	> ULOQ
TUDCA	9,4	8,5	9,0	10,3	12,5	8,7	4,0
UDCA	LOD	LOD	LOD	28,3	16,1	9,5	5,2

3.2.4 Validierungsparameter individueller Gallensäuren im Zellkulturmedium

3.2.4.1 Richtigkeit & Präzision

Das Zellkulturmedium ist frei von Gallensäuren, somit konnten sie direkt im Medium kalibriert werden. Zusammenfassend gibt es keine Auffälligkeiten für beide Validierungsparameter im Zellkulturmedium, alle Gallensäuren erfüllen das Akzeptanzkriterium (Tabelle 57, Tabelle 58).

Tabelle 57 Richtigkeit (%) 15 individueller Gallensäuren im Zellkulturmedium. Analyse mittels UPLC- MS/MS an drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Gallensäuren	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Standard 6	Standard 7
CA	100,0	99,4	94,5	105,1	104,1	93,5	93,6
CDCA	105,0	101,4	96,8	97,3	100,1	100,4	99,9
DCA	110,0	100,8	89,8	96,3	101,5	100,0	100,0
GCA	111,5	97,0	89,6	99,4	103,0	97,7	100,8
GCDCA	105,6	100,6	97,4	96,9	101,1	100,1	100,1
GDCA	95,6	103,3	103,6	97,4	101,4	99,4	100,1
GUDCA	96,7	97,8	100,4	103,4	103,3	96,8	100,6
MCA(b)	100,0	91,1	103,4	104,1	102,1	97,2	100,7
TCA	96,1	99,7	104,6	99,0	104,8	95,5	100,3
TCDCa	93,8	106,1	106,8	95,6	98,8	101,4	99,7
TDCA	96,7	104,4	100,4	98,6	99,4	100,3	100,0
TLCA	98,3	107,2	104,1	103,1	95,3	101,5	99,8
TMCA(a+b)	87,8	96,1	107,7	105,8	103,4	95,6	101,0
TUDCA	98,9	100,0	95,6	103,1	103,5	96,9	100,6
UDCA	106,3	97,8	94,7	101,2	104,9	96,6	100,9

Tabelle 58 Ermittelte Präzision (CV/%) 15 individueller Gallensäuren im Zellkulturmedium. Analyse mittels UPLC- MS/MS an drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Gallensäuren	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Standard 6	Standard 7
CA	13,1	10,8	10,3	7,9	3,0	5,8	4,4
CDCA	10,8	7,1	2,8	4,8	4,0	2,1	1,7
DCA	7,4	4,4	1,6	5,1	2,7	2,1	0,9
GCA	9,3	7,5	3,2	3,0	3,2	3,1	2,5
GCDCA	4,1	4,9	3,7	4,5	4,1	1,7	2,3
GDCA	14,1	9,7	4,0	5,4	3,6	3,1	3,0
GUDCA	14,6	10,8	6,6	4,6	3,0	2,1	1,7
MCA(b)	11,5	8,5	5,6	4,8	1,8	4,6	4,0
TCA	14,3	7,3	3,8	4,4	4,6	4,2	7,9
TCDCa	13,0	6,9	4,5	6,6	3,2	2,9	1,8
TDCA	8,4	5,7	5,0	6,3	3,5	2,9	2,0
TLCA	13,7	11,0	5,8	8,7	5,6	3,7	1,8
TMCA(a+b)	4,7	4,1	4,2	5,0	2,3	3,2	3,3
TUDCA	7,5	7,1	2,8	3,5	2,7	2,2	2,9
UDCA	13,7	9,1	4,8	3,3	4,3	7,5	6,5

3.2.5 Diskussion

Zur Untersuchung einer Lebertoxizität in verschiedenen Matrices ist die Validierung einer etablierten Messmethode von essentieller Bedeutung. Durch die Auswertung wichtiger Validierungsparameter wie Kalibrierung, Selektivität, Richtigkeit und Präzision kann die analytische Reproduzierbarkeit der endogenen Analyten überprüft werden. Dabei geht es darum, Einflussfaktoren wie z. B. die Vorbereitung der Messproben, die chromatographische Trennung der Analyten oder auch die Matrixeffekte besser erkennen zu können und die Methode ggfs. anzupassen, damit die vorgeschriebenen Akzeptanzkriterien für eine valide Analytik erreicht werden können. Auf diese Weise kann die analytische Variabilität eines jeden Analyten gezielt charakterisiert und für die Bewertung eines biologischen Effektes herangezogen werden.

In den durchgeführten Validierungsexperimenten wurde die quantitative Analytik individueller Gallensäuren in drei Matrices, Plasma, Leberhomogenat und Zellkulturmedium, überprüft. Die etablierte Messmethode ermöglichte eine selektive chromatographische Trennung von 20 individuellen Gallensäuren (Abbildung 30). Die Trennung von isobaren Gallensäuren mit ähnlicher Struktur und identischen molaren Massen, wie z. B. CDCA und DCA, konnte durch den angewandten Gradienten erzielt werden. Diese Bedingung ist essentiell, da die primäre Gallensäure CDCA im Hepatozyten entsteht, während DCA eine sekundäre Gallensäure darstellt, die im Dünndarm durch bakterielle Umwandlung aus CDCA gebildet wird (Abbildung 4). Ein ähnlicher Umwandlungsprozess findet auch bei den Gallensäuren MCA(a), MCA(b) (primäre Gallensäuren) und MCA(o) (sekundäre Gallensäure) statt. Diese Einflüsse sind wichtig für die Interpretation eines Leberschadens durch Gallensäure-Profile, da vor allem primäre Gallensäuren in der Leber entstehen und somit für eine Detektion eine höhere Aussagekraft besitzen können als sekundäre Gallensäuren.

Das Massenspektrometer bestimmt die Konzentration der Gallensäuren nicht direkt, sondern generiert zunächst ein der Analytkonzentration proportionales Messsignal. Die Quantifizierung der Messsignale erfolgt durch einen Vergleich mit Kalibrierstandardkonzentrationen, die mit den biologischen Proben aufgearbeitet und analysiert werden. Die Korrelation des Messsignals und die Richtigkeit der Analytkonzentration der eingesetzten Kalibrierstandards sind für die Quantifizierung der Gallensäuren in biologischen Matrices von entscheidender Bedeutung. Der Kalibrierbereich zeigt Korrelationen für ein quadratisches Modell der Kalibrierung für die eingesetzten Standardkonzentrationen und das Messsignal des Detektors (Abbildung 29). Deshalb können die ermittelten Konzentrationen der biologischen Proben innerhalb dieses Kalibrierbereichs eine reproduzierbare quantitative Analyse gewährleisten. Wegen der Verwendung einer quadratischen Kalibrierfunktion muss berücksichtigt werden, dass

Konzentrationen oberhalb des höchsten Kalibrierstandards nicht valide berechnet werden können. Dadurch werden keine Messwerte quantifiziert, die außerhalb des validen Arbeitsbereiches liegen.

Gallensäuren sind u. a. isobare Verbindungen, weshalb die Selektivität der Messmethode essentiell ist, um endogene Konzentrationswerte der Gallensäuren richtig erfassen zu können. Die Selektivität der Methode wurde erfolgreich überprüft und es kann davon ausgegangen werden, dass keine Begleitkomponenten in der Matrix, wie z. B. co-eluierende Gallensäuren oder andere endogene Substanzen, die Interpretation eines biologischen Effekts beeinflussen. Die Messmethode zeigt auch hier reproduzierbare Ergebnisse, vor allem für isobare Gallensäuren, wie z. B. CDCA und DCA (Tabelle 52). Die Gallensäuren können chromatographisch voneinander getrennt werden. Es treten auch keine Co-Elutionen von anderen endogenen Substanzen auf. Das belegen u. a. indirekt die Ergebnisse der Richtigkeit und Wiederholpräzision der gepoolten Plasmaproben mit aufgestockten Standardkonzentrationen von Gallensäuren (Tabelle 53). Ein weiterer bedeutender Aspekt für eine hohe Selektivität der Messmethode ist die Biosynthese der Gallensäuren. Hierbei ist es wichtig, zwischen den primären Gallensäuren, wie z. B. CA und CDCA, sowie ihren Glycin- bzw. Taurinkonjugaten, und den sekundären Gallensäuren differenzieren zu können. Primäre und konjugierte Gallensäuren entstehen direkt in der Leber, während sekundäre Gallensäuren das Ergebnis einer bakteriellen Konvertierung von primären Gallensäuren im Mikrobiom des Dünndarms sind. Dieser Aspekt muss bei einer Untersuchung zur Lebertoxizität beachtet werden, da primäre Gallensäuren und ihre Konjugate für die Interpretation eines potentiellen Leberschadens in Betracht gezogen werden und Veränderungen bei sekundären Gallensäuren vielleicht auf parallele Effekte im Gastrointestinal-Trakt und seinem Mikrobiom hinweisen könnten (Behr *et al.*, 2019). Das zeigen u. a. Studien von mit Antibiotika behandelten Mäusen, deren Mikrobiom durch die Behandlung mit verschiedenen Antibiotika verändert wurde. Mäuse, die mit einer kombinierten Dosis von Vancomycin und Imipenem behandelt wurden, zeigten einen starken Konzentrationsabfall von sekundären Gallensäuren, wie z. B. DCA, HDCA und LCA im Serum (Zhang *et al.*, 2014).

Für die quantitativen Analysen wurden interne Standards zur Kompensation aufarbeitungs- und matrixbedingter Effekte eingesetzt. Stabile Isotopen-markierte Standards sind von analytischer Bedeutung, da sie eine wichtige Grundlage für die quantitative Analyse bilden. Die Messsignale der Kalibrierung und der Messproben werden auf das Messsignal des internen Standards normiert. Deuterium-markierte Standards neigen in wässrigen Matrices zum Austausch des ^2H mit Protonen, sodass das Stabilitätsverhalten des Standards berücksichtigt werden muss. Die verwendeten Deuterium-markierten Standards zeigten gute reproduzierbare Retentionszeiten

und Peakintensitäten über einen längeren Messzeitraum an verschiedenen Messtagen (Tabelle 50). Aufgrund dieser Ergebnisse und der Ergebnisse der Validierungsexperimente zeigen die internen Standards keine Hinweise auf eine Instabilität. Zusammenfassend dokumentiert die Validierung der Messmethode die analytische Variabilität und Reproduzierbarkeit der individuellen Gallensäuren in verschiedenen Matrices. Die Ergebnisse der folgenden tierexperimentellen Studien basieren auf dieser quantitativen Analytik.

3.3 Studien zur Gallensäure-Homöostase in Ratten

Arzneimittel-induzierte Lebertoxizität wird in der präklinischen Sicherheitsbewertung u. a. über tierexperimentelle Studien bestimmt. Die Bewertung bei den Tieren wird in makro-pathologische, histopathologische und klinisch-pathologische Untersuchungen eingeteilt. Gallensäure-Profiling mittels LC-MS/MS wurde in die präklinische Sicherheitsbewertung implementiert und evaluiert. Hierfür wurden Toxizitätsstudien durchgeführt, bei denen ein Leberschaden bei behandelten Ratten induziert wurde. Wesentliches Ziel ist es dabei zu zeigen, dass die Ergebnisse der Untersuchung der individuellen Gallensäuren einen wertvollen Beitrag zu einer Verbesserung der Bewertung einer Hepatotoxizität leisten können.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Gallensäure-Quantifizierung und der RNA-Analyse spezifischer Gene des Gallensäure-Metabolismus aus den *In vivo* Studien dargestellt. Zusätzlich dienen die histopathologischen Befunde einer phänotypischen Verankerung dieser Ergebnisse. Zudem werden die Ergebnisse den in der Präklinik etablierten Serummarkern für den Nachweis einer Hepatotoxizität vergleichend gegenübergestellt.

3.3.1 Variabilität der Konzentrationen von Gallensäuren in unbehandelten Ratten

3.3.1.1 Einfluss des Geschlechts und des Ernährungsstatus auf die Gallensäure-Plasmakonzentrationen

Studien belegen, dass der Ernährungszustand bzw. die Nahrungsaufnahme den physiologischen Status der Leber und damit auch die Gallensäure-Konzentrationen im Plasma beeinflusst. Bei einer *ad libitum* Futtergabe sind die Gallensäure-Konzentrationen im Plasma deutlich niedriger als nach einer zwölfstündigen Nahrungskarenz. (Yang *et al.*, 2017).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente (Studiendesign Abschnitt 2.7.3), zeigt die multivariate Datenanalyse, dass sich innerhalb der PCA verschiedene Gallensäure-

Profil-Cluster für männliche und weibliche Ratten ergaben (Abbildung 34 A). Im *Loading Scatter Plot* ließen sich die Konzentrationsunterschiede zwischen männlichen und weiblichen Ratten auf eine deutlich höhere Plasmakonzentration von MCA(b), MCA(o) und GDCA bei männlichen Ratten und deutlich niedrigere Plasmakonzentrationen von TCA, TCDCa und TMCA(a+b) bei weiblichen Ratten zurückführen (Abbildung 34 B).

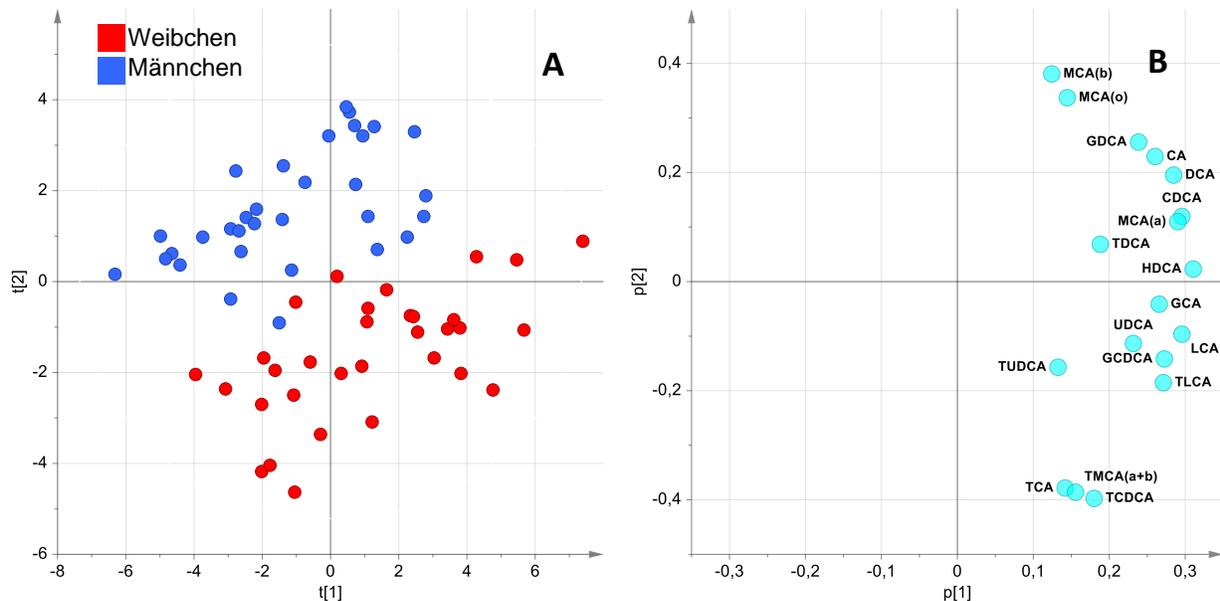


Abbildung 34 Hauptkomponenten-Analyse (PCA) basierend auf Gallensäure-Profilen im Plasma männlicher und weiblicher Ratten. (A) *Score Scatter Plot*: Männchen [blau], Weibchen [rot]. (B) *Loading Scatter Plot* der quantifizierten Gallensäuren, die für die Verteilung der Versuchstiere im *Score Scatter Plot* (A) verantwortlich sind.

Außerdem ließ sich mit der OPLS-DA ein Einfluss des Ernährungszustandes feststellen (Abbildung 35). In den Ergebnissen der OPLS-DA hatte der Ernährungszustand bei männlichen Ratten einen moderaten Einfluss auf die Gallensäure-Plasmakonzentrationen. Eine Klassifizierung in primäre oder konjugierte Gallensäuren der Ratten war über die Gallensäure-Plasmaprofile nicht möglich. Die Tiere lagen im *Score Scatter Plot* nicht eindeutig getrennt vor (Abbildung 35 A). Dennoch konnte im *Loading Scatter Plot* bei einzelnen Gallensäuren (z. B. CDCA, GCA, GDCA, DCA) durch die Nahrungskarenz ein deutlicher Konzentrationsanstieg gezeigt werden (Abbildung 35 A1), wobei dieser aber möglicherweise auch durch die physiologische Variabilität der Tiere erklärt werden kann (Abbildung 35 A). Im Vergleich zu den Männchen hatte der Ernährungszustand der Weibchen einen stärkeren Einfluss auf die Gallensäure-Plasmakonzentrationen. Auch hier war keine eindeutige Klassifizierung möglich, dennoch waren die *Cluster* der Konzentrationsprofile im *Score Scatter Plot* deutlicher (Abbildung 35 B). Die konjugierte sekundäre Gallensäure TDCa zeigte im *Loading Scatter Plot* bei

Nahrungskarenz erkennbar erhöhte Plasmakonzentration ($pq [1] > 0,5$). Damit ist ein *Bias* durch eine verminderte Futteraufnahme bei weiblichen Tieren bei der Analyse des Einflusses von Arzneimitteln auf TDCA-Plasmakonzentration möglich (Abbildung 35 B). Die unterschiedliche Dauer der Karenzphase hatte keinen Einfluss auf die Gallensäure-Plasmakonzentrationen und wurde daher in den Abbildungen nicht markiert.

3.3.1.2 Einfluss des Vehikels auf die Plasmakonzentrationen von Gallensäure

Vehikel können von den Ratten verstoffwechselt werden und führen zu keinen histopathologischen Befunden. Dennoch können sie das Gallensäure-Profil potentiell beeinflussen (Gad *et al.*, 2016; Thackaberry, 2013; York, 2017). Im Sinne des 3R-Prinzips wurden für die Evaluation des Einflusses des Vehikels (Maiskeimöl, NaCl, Wasser) auf die Plasmakonzentrationen der Gallensäuren, die Profile der Kontrolltiere aus den tierexperimentellen Studien verwendet. Die Versuchsdesigns werden in den Kapiteln zur substanz-spezifischen Prüfung genauer beschrieben.

Die Gallensäureanalysen im Plasma männlicher und weiblicher Ratten zeigten bei der PCA ein eindeutiges geschlechter-spezifisches Muster (Abbildung 34). Deshalb wurden bei den Ergebnissen die Daten der männlichen und weiblichen Tiere bei der PCA getrennt analysiert. Die Separationen der Tiere in der PCA lassen sich möglicherweise auf die verschiedenen Vehikel zurückführen. Stark erhöhte Gallensäure-Plasmakonzentrationen (*Score Scatter Plot* $t[1]$) traten primär durch das Vehikel Maiskeimöl auf (Abbildung 36/36 A). Die Streuung auf der $t[2]$ -Achse wurde durch die Variabilität der Konzentration innerhalb eines Vehikel-Kollektivs hervorgerufen. Die *Cluster*-Bildung der Vehikel-Gruppen im dreidimensionalen Raum zeigt deutlich, dass die Gallensäure-Profile vehikelspezifisch sind, da sich keine Vehikelgruppe überschneidet (Abbildung 36/36 C). Bei beiden Geschlechtern sind eindeutig die primären Gallensäuren CA und CDCA, muricholierte Gallensäuren, sowie DCA und alle Glycin-Konjugate (GCA, GCDCA, GDCA) betroffen. Diese Gallensäuren zeigen einen erhöhten Plasmakonzentrationsspiegel für das Vehikel Maiskeimöl im Vergleich zu den anderen Vehikeln (Abbildung 36/36 D).

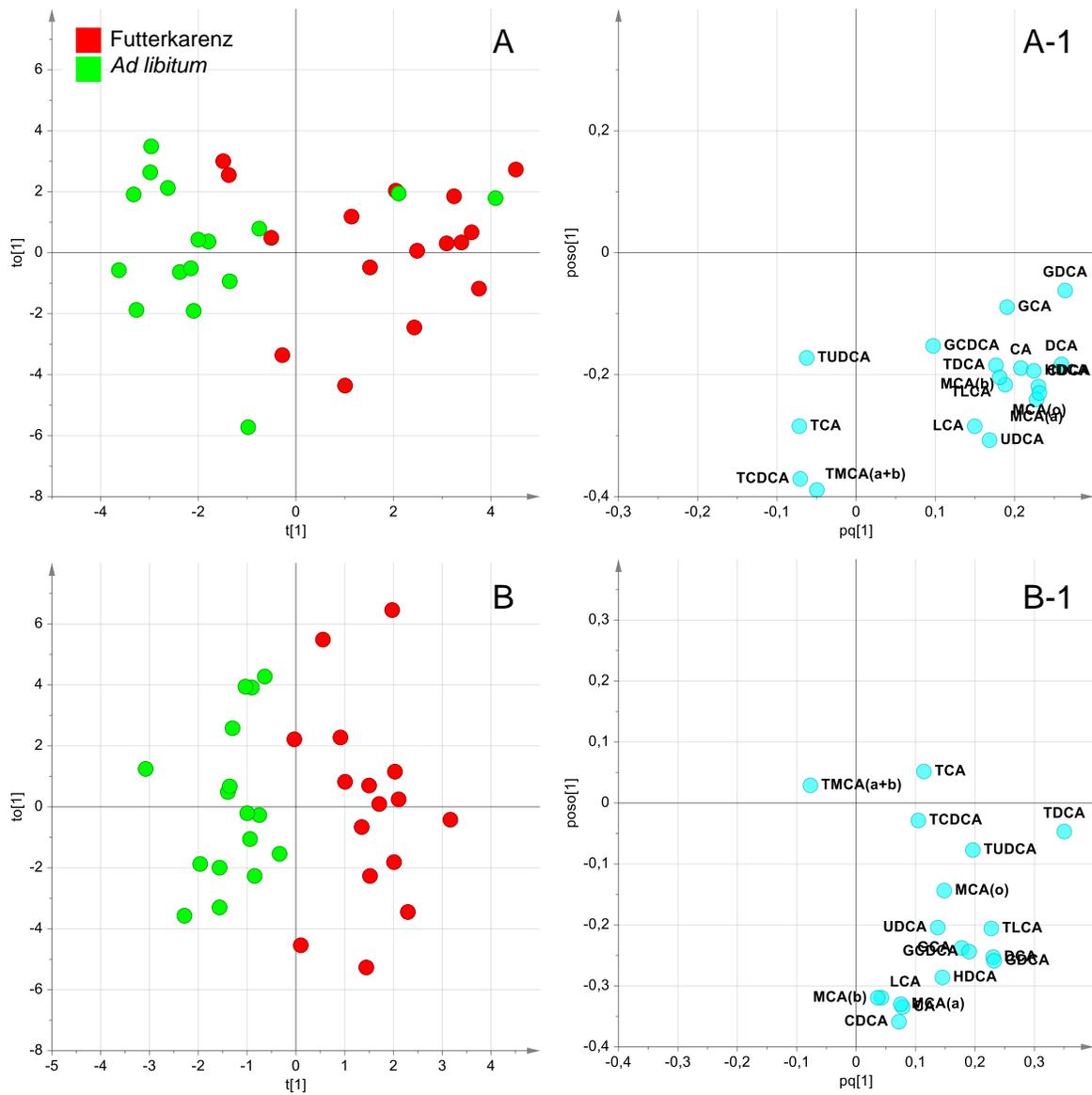


Abbildung 35 Diskriminanzanalyse (OPLS-DA) basierend auf Gallensäure-Profilen im Plasma männlicher (oben) und weiblicher (unten) Ratten. (A, B) Score Scatter Plot grün: *Ad libitum* Futter, rot: Futterkarenz. (A-1, B-1) Loading Scatter Plot der quantifizierten Gallensäuren, die für die Verteilung der Versuchstiere im Score Scatter Plot verantwortlich sind.

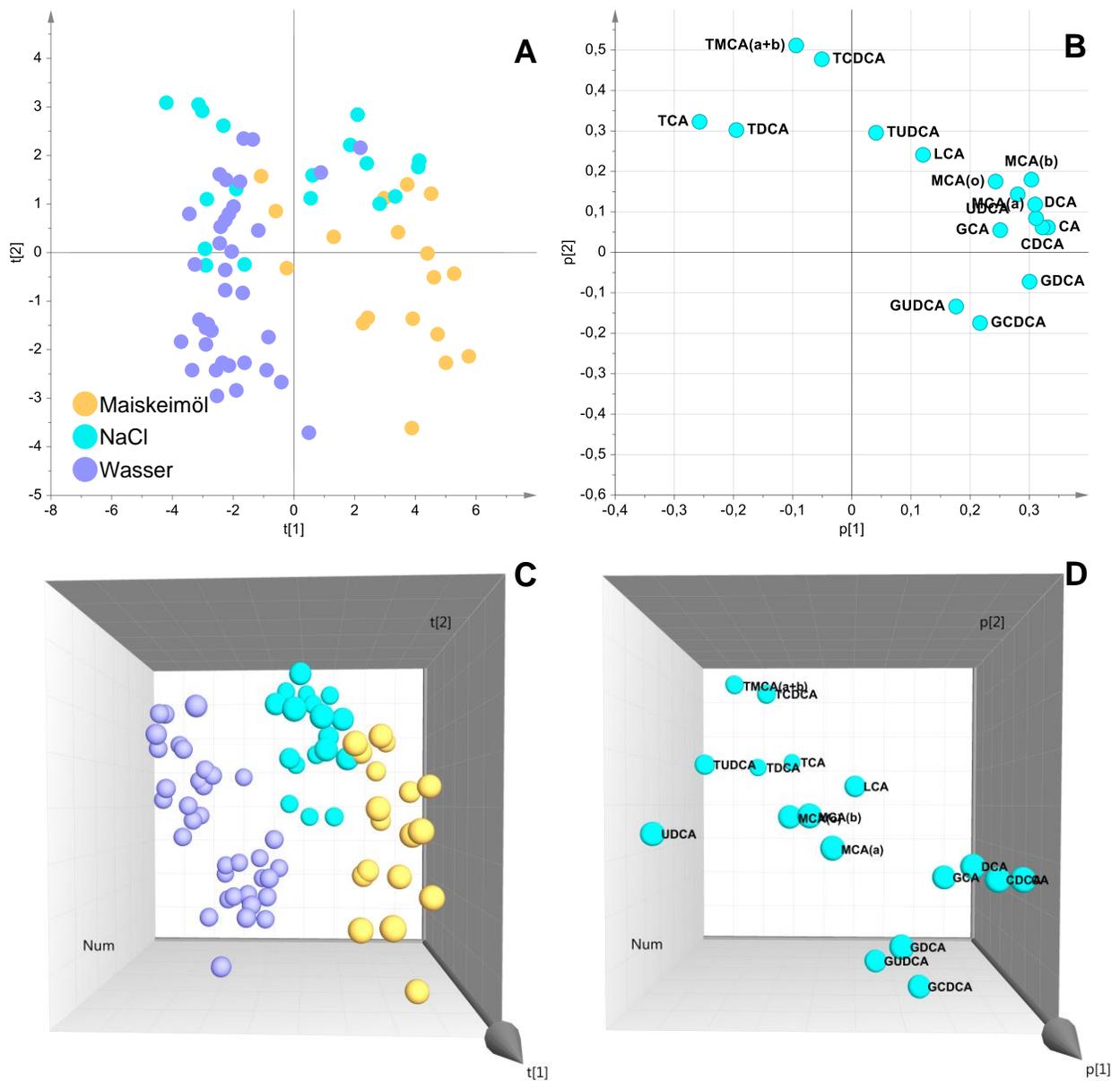


Abbildung 36 Hauptkomponenten-Analyse (PCA) basierend auf Gallensäure-Plasmaprofilen männlicher Ratten nach Behandlung mit verschiedenen Vehikeln. (A) Score Scatter Plot für die Vehikel Maiskeimöl [orange], NaCl [hellblau], Wasser [blau], (B) Loading Scatter Plot der Gallensäuren, die für die Verteilung der Versuchstiere im Score Scatter Plot (A) verantwortlich sind. (C) dreidimensionaler Score Scatter Plot, (D) dreidimensionaler Loading Scatter Plot.

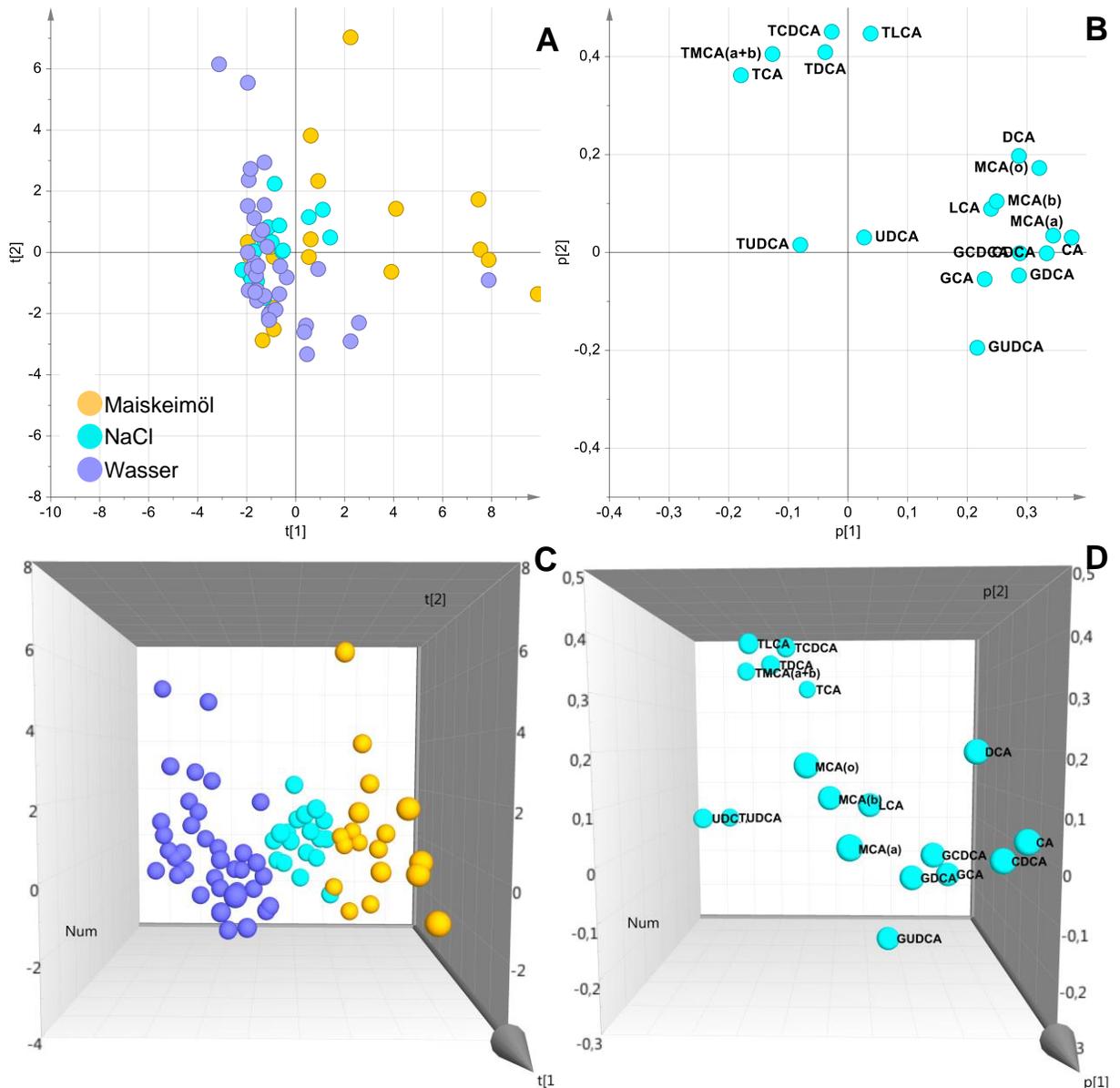


Abbildung 37 Hauptkomponenten-Analyse (PCA) basierend auf Gallensäure-Plasmaprofilen weiblicher Ratten nach Behandlung mit verschiedenen Vehikeln. (A) *Score Scatter Plot* für die Vehikel Maiskeimöl [orange], NaCl [hellblau], Wasser [blau], (B) *Loading Scatter Plot* der Gallensäuren, die für die Verteilung der Versuchstiere im *Score Scatter Plot* (A) verantwortlich sind. (C) dreidimensionaler *Score Scatter Plot*, (D) dreidimensionaler *Loading Scatter Plot*.

3.3.1.3 Referenzwerte von Gallensäure-Konzentrationen im Plasma von Ratten

In der Präklinik wird mit Hilfe von Referenzwerten auf der Basis von historischen Daten von Kontrolltieren der Normalzustand eines Messparameters im Rahmen seiner biologischen Variabilität beschrieben. Referenzwerte beruhen auf Schätzwerten für die durchschnittliche Merkmalsausprägung in einer gesunden Population unter Berücksichtigung der SD als Maß für dessen Streuung. Mithilfe von Referenzwerten können in präklinischen Studien tatsächliche Störungen des biologischen Systems (z. B. Organschädigungen) von normalen Merkmalsausprägungen differenziert werden (Haber *et al.*, 2017; Otto *et al.*, 2016).

Im Rahmen der vorliegenden Experimente wurde daher versucht, erste Referenzwerte für Gallensäuren festzulegen (Abbildung 38). Da sich, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, verschiedene Parameter (Ernährung, Geschlecht, Wahl des Vehikels) auf das Gallensäure-Profil auswirken, müssen die Referenzwerte für konkrete experimentelle Szenarien einzeln definiert werden. Außerdem sind mindestens zwei unabhängige Studien mit einem übereinstimmenden experimentellen Aufbau notwendig, um Referenzwerte sinnvoll ableiten zu können. Die nachfolgende Ableitung beruht auf zwei unabhängigen Studien mit oraler Applikation und Nutzung des Vehikels „Wasser“. Durch einfache Statistikverfahren (siehe Kapitel 2.12. Statistische Auswertung) wurde der Referenzbereich der einzelnen Gallensäuren im Plasma separat für männliche und weibliche Ratten als \pm dreifache SD vom arithmetischen Mittelwert bestimmt (Tabelle 59).

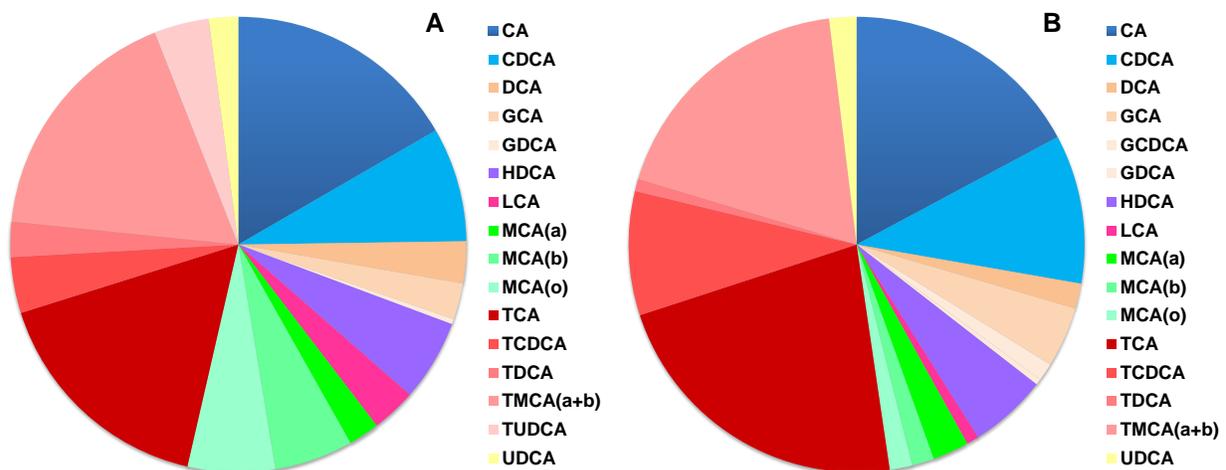


Abbildung 38 Prozentuale Verteilung individueller Gallensäuren im Plasma von männlichen und weiblichen Ratten bei der Nutzung des Vehikels Wasser. Festlegung der Prozentwerte basierend auf dem arithmetischen ($n=12$ pro Geschlecht). (A) Männchen: CA 17%, CDCA 8%, DCA 3%, GCA 3%, GDCA 0%, HDCA 6%, LCA 3%, MCA(a) 2%, MCA(b) 6%, MCA(o) 6%, TCA 17%, TCDCA 4%, TDCA 2%, TMCA(a+b) 17%, TUDCA 4%, UDCA 2%. (B) Weibchen: CA 17%, CDCA 11%, DCA 2%, GCA 4%, GCDCA 1%, GDCA 0%, HDCA 6%, LCA 1%, MCA(a) 3%, MCA(b) 2%, MCA(o) 2%, TCA 22%, TCDCA 9%, TDCA 1%, TMCA(a+b) 18%, UDCA 2%.

Tabelle 59 Gallensäure-Referenzkonzentrationen im Plasma ($\mu\text{mol/L}$) männlicher und weiblicher Ratten bei der Nutzung des Vehikels Wasser. Festlegung der Referenzwerte als MW \pm dreifache SD ($n=12$). Das gesamte Gallensäure-Profil beider Geschlechter ist im Anhang hinterlegt (**Anhang-Tabelle A 1** und **Anhang-Tabelle A 2**).

Männliche Ratten		Weibliche Ratten	
Gallensäuren	Referenzbereich	Gallensäuren	Referenzbereich
CA	0.93 – 10,17	CA	1.79 – 12.07
CDCA	0.45 – 4,71	CDCA	1.10 – 7.56
DCA	0.17 – 0,35	DCA	0.19 – 0.36
GCA	0.14 – 0,53	GCA	0.45 – 2.31
GDCA	0.02 – 0,03	GCDCA	0.12 – 0.62
HDCA	0.32 – 1,41	GDCA	0.03 – 0.14
LCA	0.18 – 0,63	HDCA	0.58 – 2.19
MCA(a)	0.12 – 0,86	LCA	0.09 – 0.19
MCA(b)	0.31 – 1,17	MCA(a)	0.27 – 1.58
MCA(o)	0.34 – 0,96	MCA(b)	0.16 – 0.57
TCA	0.92 – 1,13	MCA(o)	0.17 – 0.40
TCDCA	0.22 – 0,32	TCA	2.32 – 4.24
TDCA	0.14 – 0,16	TCDCA	0.92 – 1.50
TMCA(a+b)	0.97 – 1,62	TDCA	0.09 – 0.15
TUDCA	0.22 – 1,10	TMCA(a+b)	1.91 – 3.88
UDCA	0.12 – 0,74	UDCA	0.20 – 0.57

3.3.2 Diskussion

In der Klinischen Chemie ist bei der Bestimmung von Serummarkern für einzelne Parameter wie u. a. Glukose, Triglyzeride und Bilirubin eine Nahrungskarenz über Nacht durchzuführen. Der Hauptgrund für diese Vorgehensweise besteht darin, unter standardisierten Bedingungen eine erhöhte Variabilität der Messwerte sowie subtil maskierte Effekte zu vermeiden. Andererseits kann eine Nahrungskarenz den allgemeinen Stoffwechsel der Tiere beeinträchtigen und insbesondere die tägliche Exposition der Testsubstanz bei Fütterungsstudien beeinflussen (OECD, 2008; Simundic *et al.*, 2014).

Bei den durchgeführten tierexperimentellen Studien zur Bewertung einer Lebertoxizität durch Gallensäure-Profilung wurde auf eine 12-stündige Nahrungskarenz bei den Tieren verzichtet und eine *ad libitum* Fütterung durchgeführt. Neben der bereits entstehenden Belastung durch die

Exposition mit den Hepatotoxinen stellt eine Nahrungskarenz eine zusätzliche Belastung für die Tiere dar, weshalb auf eine Nahrungskarenz verzichtet wurde.

In der vorliegenden Studie wurde daher zunächst untersucht, ob die Futterbedingungen (*ad libitum* versus Nahrungskarenz) das physiologische Gallensäure-Profil im Plasma von Ratten beeinflussen. Verschiedene Studien konnten bereits Unterschiede bei der Zusammensetzung des Gallensäure-Pools in Abhängigkeit vom Geschlecht und vom Ernährungszustand bei Menschen und Nagern identifizieren (Bennion *et al.*, 1978; Turley *et al.*, 1998). Die geschlechtsspezifischen und ernährungsbedingten Unterschiede konnten in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Männliche Ratten wiesen im Vergleich zu weiblichen Tieren eine höhere Konzentration der primären Gallensäure CA und der Muricholate MCA(b) und MCA(o) auf, weibliche Ratten höhere Konzentrationen an TCA, TMCA(a+b), sowie TCDCA. Wenn den Tieren das Futter entzogen wurde, stiegen die Plasmakonzentrationen von CDCA und der Muricholate (MCA[a], MCA[b], MCA[o]) bei beiden Geschlechtern an. Zusätzlich zeigten männliche Ratten eine erhöhte Konzentration von mit Taurin konjugierten Gallensäuren. Möglicherweise besitzen Tiere unter Nahrungskarenz eine höhere physiologische Konzentration an Gallensäuren, da diese unter Nahrungskarenz nicht benötigt werden und somit zum Schutz der Hepatozyten ins Blut abgegeben werden. Bei Nahrungsaufnahme begünstigen Gallensäuren die Micellenbildung und sorgen so dafür, dass Fette besser aus der Nahrung aufgenommen werden können (Houten *et al.*, 2008). Bei einer *ad libitum* Futtergabe sinkt daher die Konzentration an freien Gallensäuren im Plasma.

Die oben beschriebenen Effekte müssen bei der Evaluierung der Lebertoxizität beachtet werden, um Fehldiagnosen zu vermeiden. Ein wichtiges Kriterium für eine korrekte Interpretation ist das *Monitoring* des Ernährungszustands der Versuchstiere. Dazu zählt die Überwachung der Futteraufnahme (z. B. Wiegen der (nicht aufgenommenen) Pellets) und die regelmäßige Bestimmung des Körpergewichts der Tiere. Dabei sollte in Betracht gezogen werden, dass Tiere, die aufgrund einer allgemeinen Toxizität keine Nahrung aufnehmen, erhöhte Plasmakonzentrationen von individuellen Gallensäuren aufweisen können. Bei den Untersuchungen zur Hepatotoxizität verschiedener Lebertoxine wurde die Gallensäure-Homöostase der Tiere durch eine mitgeführte Kontrolle überwacht (Tabelle 46).

In weiteren Untersuchungen wurde analysiert, ob verschiedene Vehikel die Gallensäure-Konzentration im Plasma verändern. Dabei ergaben sich bei Tieren, die mit Maiskeimöl behandelt wurden, stark erhöhte Plasmakonzentrationen von primären Gallensäuren wie z.B. CA/CDCA und Glycin-konjugierten Gallensäuren wie beispielsweise GCA, GCDCA und GDCA im Vergleich zu mit den Vehikeln Wasser und NaCl behandelten Tiere. Die orale Applikation mit Wasser ergab

die geringsten Konzentrationsveränderungen. Des Weiteren könnte durch Aufnahme des nährstoffreichen Vehikels Maiskeimöl (5 mL Applikationsvolumen) der Appetit der Tiere und somit die Nahrungsaufnahme sinken (Abbildung 39).

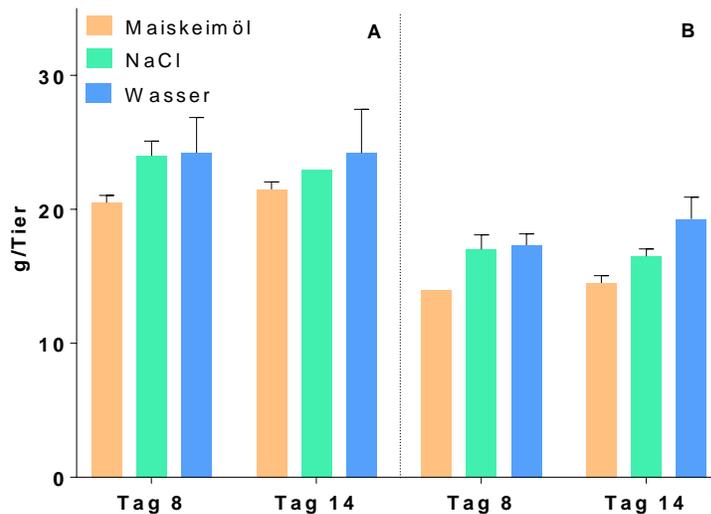


Abbildung 39 Futtermenge der Vehikel-Tiere die mit unterschiedlichen Vehikeln behandelt wurden. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung. Die Aufnahme errechnet sich durch Rückwaage der Futtermenge pro Käfig mit gehaltenen Ratten (n=3). (A) Männliche Ratten (B) Weibliche Ratten

Für ein standardisiertes Studiendesign scheint es daher am besten, alle Tiere vor der Blutentnahme auf Nahrungskarenz zu setzen, um die Amplitude der Gallensäurekonzentrationen im Plasma zu minimieren. Eine andere Möglichkeit besteht in der Erstellung von Referenzwerten, wie sie u.a. für das Vehikel Wasser durchgeführt wurde (Tabelle 59). Der Referenzbereich, der die Variabilität individueller Gallensäuren von *ad libitum* gefütterten männlichen und weiblichen Tiere berücksichtigen sollte, lässt sich durch einfache statistische Methoden (z.B. $MW \pm$ dreifache SD) definieren. Mit Hilfe eines solchen Referenzbereiches ist die Einschätzung des Beitrags individueller Veränderungen einzelner Tiere auf die statistische Analyse potentieller Effekte von Lebertoxinen eher möglich.

3.4 Einfluss von Methapyrilen auf das Gallensäure-Profil in Ratten

In einer Studie der Bayer AG an männlichen Wistar-Ratten wurde durch die Verabreichung von Methapyrilen eine Lebernekrose mit einhergehenden hepatobiliärer Schädigungen induziert (Pavkovic, 2014). In einer darauf aufbauenden Konzeptstudie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand des vorliegenden Probenmaterials untersucht, ob durch eine zusätzliche Erfassung von Gallensäuren eine Verbesserung in der Diagnostik der Leberschädigung erzielt werden kann. Dafür wurden mittels LC-MS/MS 20 spezifische Gallensäuren im Plasma und im Lebergewebe quantitativ bestimmt und in Verbindung mit den vorhandenen histopathologischen und klinischen Befunden interpretiert. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Konzeptstudie dargestellt und diskutiert. Diese wurden auch bereits publiziert (Slopianka *et al.*, 2017).

3.4.1 Histopathologie

Die histopathologische Bewertung der männlichen Ratten ergab schon bei der niedrigsten Dosis-Gruppe (30 mg/kg KG) ab Tag 3 minimale Befunde einer Leberschädigung, die sich bei einzelnen Tieren in Form von Nekrosen und Vakuolen im Lebergewebe sowie von Hyperplasien der Gallengänge darstellten (Tabelle 60). In der hohen Dosis (80 mg/kg KG) waren alle Tiere von den genannten histopathologischen Veränderungen, mit stärker ausgeprägten Befunden, betroffen. Mit fortschreitender Expositionsdauer konnten progrediente Veränderungen, v.a. bei nekrotischen Veränderungen, im Lebergewebe beobachtet werden (Abbildung 40 B-D). Dabei nahm zum einen der Schweregrad der Befunde zu, zum anderen traten zusätzlich neue Befunde auf, wie z. B. Ablagerungen von Pigmenten der Galle. Auch die Anzahl der betroffenen Tiere nahm zu, je länger die Exposition andauerte. So zeigten an Tag 14 der Studie fünf von sechs Tieren der Niedrig-Dosis-Gruppe (30 mg/kg KG) minimale Befunde einer periportalen Nekrose und Hyperplasie der Gallengänge. Alle Tiere hatten Vakuolen ausgebildet (Tabelle 60). Die mikroskopischen Befunde wurden als behandlungsabhängig eingestuft. Basierend auf der Art der histopathologischen Befunde wurde in männlichen Ratten eine Methapyrilen-induzierte Leberzellnekrose mit hepatobiliärer Schädigung diagnostiziert.

Nach einer 10-tägigen Recovery-Phase konnte ein Rückgang des Schweregrads und bei der Häufigkeit bestimmter Leberzellveränderungen, z. B. bei der Ausbildung von Nekrosen und Vakuolen, festgestellt werden. Hepatobiliäre Veränderungen wie die Hyperplasie der Gallengänge und die Ablagerung von Pigmenten der Galle im Leberparenchym erwiesen sich jedoch als persistent (Abbildung 40 E). Für die Hyperplasie der Gallengänge konnte nur ein

leichter Rückgang verzeichnet werden, wohingegen sich der Schweregrad der Ablagerung von Gallen-Pigmenten im Leberparenchym sogar noch erhöhte.

Tabelle 60 Häufigkeit und Schweregrad hepatozellulärer Veränderungen in männlichen Ratten nach Behandlung mit Methapyrilen.

Zeitpunkt Dosierungen/mg/kg KG	Tag 3			Tag 7			Tag 14			Tag 24		
	0	30	80	0	30	80	0	30	80	0	30	80
Tiere pro Dosisgruppe	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Histologische Befunde												
Periportale Nekrose												
Anzahl der Tiere	0	1	6	0	1	6	0	5	6	0	0	1
Arithmetische Mittel des Schweregrads	-	1,0	1,2	-	1,0	1,8	-	1,0	2,3	-	-	1,0
Vakuolen: Periportal												
Anzahl der Tiere	0	1	6	0	4	6	0	6	6	0	0	1
Arithmetische Mittel des Schweregrads	-	1,0	2,0	-	1,5	2,2	-	1,3	1,8	-	-	1,0
Hyperplasie Gallengänge												
Anzahl der Tiere	0	1	6	0	3	6	0	5	6	0	6	6
Arithmetische Mittel des Schweregrads	-	1,0	1,8	-	1,0	1,8	-	1,0	1,7	-	1,0	1,5
Ablagerung von Gallepigmenten												
Anzahl der Tiere	0	0	0	0	0	0	0	1	6	0	6	6
Arithmetische Mittel des Schweregrads	-	-	-	-	-	-	-	1,0	1,6	-	1,0	2,0

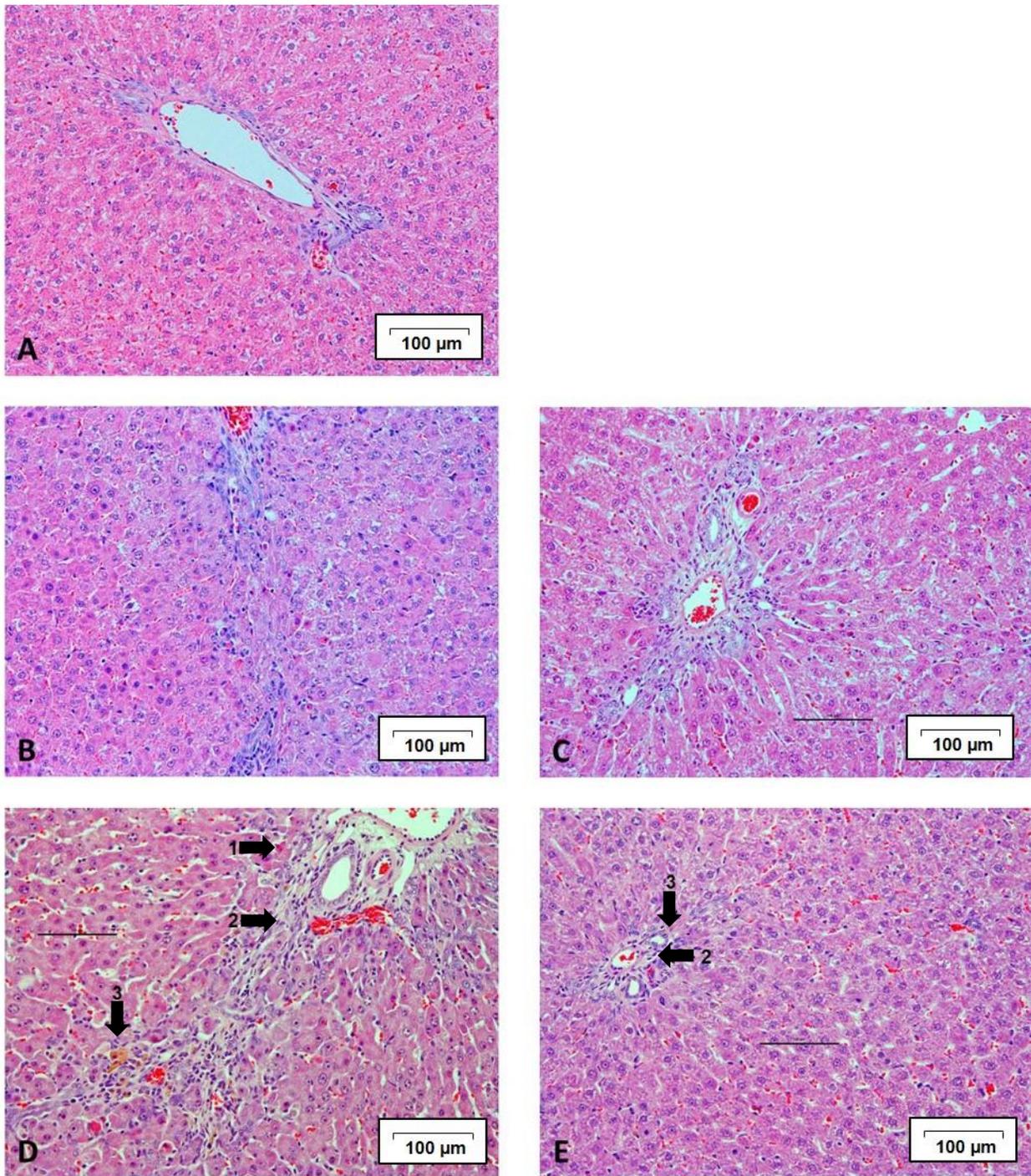


Abbildung 40 Leberschnitte von männlichen Ratten nach Hämatoxylin-Eosin Färbung. (A) Kontroll-Gruppe: keine Veränderung (B-E) Hochdosis-Gruppe (80 mg/kg KG): (B) Tag 3, (C) Tag 7, (D) Tag 14, (E) Tag 10 der Recovery. Die Methapyrilen-induzierten Leberzellschädigungen sind mit Pfeilen markiert. [1] Nekrotischer Hepatozyt, [2] Proliferation der Gallengänge, [3] Ablagerung von Gallenpigmenten, Skalierung: 100 µm.

3.4.2 Klinische Chemie

Hepatobiliäre und hepatozelluläre Effekte der Methapyrilen-Behandlung konnten bei Versuchstieren der Hochdosis-Gruppe (80 mg/kg KG) ab Tag 7 auch anhand der klinischen Serummarker ALAT, ASAT, AP, γ GT, TBIL und BAs-t als Summenparameter von Gallensäuren nachgewiesen werden (Tabelle 61). Die signifikant erhöhte Aktivität dieser Marker war auch am Ende der Expositionsphase an Tag 14 nachweisbar (Tabelle 61). Nach einer 10-tägigen Recovery-Phase waren die Aktivitäten der Leberenzyme sowie die Konzentration von BAs-t wieder im Referenzbereich. Einzig die Konzentration von TBIL war am Ende der Recovery-Phase immer noch signifikant erhöht (Tabelle 61). In Proben der Niedrig-Dosis-Gruppe (30 mg/kg KG) konnte zu keinem Testzeitpunkt eine signifikante Veränderung in der Aktivität der Serummarker nachgewiesen werden. Mit Hilfe der klinischen Parameter konnten für diese Tiere keine hepatozellulären und hepatobiliären Effekte festgestellt werden (Tabelle 61), obwohl zumindest am Ende der Expositionsphase alle Tiere nachweisbare histopathologische Befunde aufwiesen (Tabelle 60).

Tabelle 61 Klinische Chemie männlicher Ratten nach Behandlung mit Methapyrilen. Die Aktivitäten und Konzentrationen der einzelnen Serummarker sind als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD) dargestellt. Die Signifikanz der Veränderungen der Serummarker in den Proben der Dosis-Gruppen bezogen auf die zeitlich zugeordneten Kontrollgruppen wurde mittels Dunnett's Test (* $p < 0,05$) oder Mann Whitney Test mit Bonferroni Adjustierung (* $p < 0,05$) bestimmt.

Dosierung mg/kg KG	Tag	ALAT U/L	ASAT U/L	AP U/L	GLDH U/L	γ GT U/L	TBIL μ mol/L	BAs-t μ mol/L
0	3	62,3 \pm 15,1	103,0 \pm 28,8	242,8 \pm 48,9	16,2 \pm 14,5	0	0,20 \pm 0,19	22,8 \pm 6,1
	7	54,5 \pm 10,9	102,7 \pm 15,8	256,0 \pm 50,5	7,5 \pm 4,6	0,2 \pm 0,4	0,20 \pm 0,2	24,5 \pm 7,3
	14	61,5 \pm 5,5	102,5 \pm 118,9	251,0 \pm 57,6	18,12 \pm 5,9	0	0,02 \pm 0,04	23,9 \pm 4,7
	24	51,0 \pm 14,0	105,0 \pm 20,0	193,0 \pm 62,9	9,40 \pm 11,1	0	0,30 \pm 0,3	32,8 \pm 6,8
30	3	73,3 \pm 28,6	116,3 \pm 50,2	250,7 \pm 50,5	11,1 \pm 4,3	0	0,40 \pm 0,4	35,2* \pm 7,8
	7	62,2 \pm 16,2	101,3 \pm 21,3	310,2 \pm 49,7	10,3 \pm 4,6	10,3 \pm 4,6	0,40 \pm 0,3	25,7 \pm 4,7
	14	137,7 \pm 58,8	124,7 \pm 19,7	261,7 \pm 40,0	13,4* \pm 4,3	0	0,05 \pm 0,05	32,6* \pm 7,1
	24	48,20 \pm 10,6	116,0 \pm 15,3	208,5 \pm 36,9	9,8 \pm 7,9	0	0,40 \pm 0,1	25,5 \pm 6,8
80	3	167,3 \pm 8,41	248,3 \pm 126,9	314,8* \pm 35,5	153,9 \pm 138,1	0,7 \pm 0,8	0,50 \pm 0,4	56,9* \pm 14,4
	7	122,0* \pm 6,3	194,2* \pm 63,5	362,0* \pm 82,8	173,8 \pm 208,7	4,5* \pm 1,9	1,50* \pm 0,6	41,2* \pm 6,4
	14	103,2* \pm 25,6	248,7* \pm 106,1	350,3* \pm 134,8	73,13 \pm 61,4	3,5* \pm 1,6	1,32* \pm 1,0	58,5* \pm 15,4
	24	48,5 \pm 4,7	107,0 \pm 15,7	183,8 \pm 39,4	6,8 \pm 1,5	0,2 \pm 0,4	0,90* \pm 0,17	34,4 \pm 6,9

3.4.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber

Die univariate Datenanalyse von Gallensäuren zeigte für beide Dosis-Gruppen bereits ab Tag 3 signifikant erhöhte Konzentrationen für MCA(a), MCA(b) und TCA an. In der Hochdosis-Gruppe (80 mg/kg KG) konnte zusätzlich eine signifikante Erhöhung von CA, GCDCA, GDCA, GUDCA und TCDCA verzeichnet werden (Tabelle 62). Diese Veränderungen waren im Einklang mit den dosisabhängigen Veränderungen der Histopathologie und klinischen Chemie (Tabelle 60, Tabelle 61). Am Ende der 14-tägigen Behandlungsperiode waren in der Hochdosis-Gruppe (80 mg/kg KG) die Konzentrationen von elf Gallensäuren signifikant erhöht (Tabelle 62). Auch hier waren die Veränderungen im Gallensäureprofil konsistent mit den Befunden der Serummarker und der Histopathologie, über die ausgeprägte hepatotoxischen Effekte detektiert werden konnten. Nach einer Recovery-Phase von zehn Tagen konnten in der niedrigen Dosis-Gruppe (30 mg/kg KG) immer noch Konzentrationsveränderungen für CA, GCA, MCA(b) und MCA(o) festgestellt werden (Tabelle 62). Im Einklang damit wurden histopathologisch am Ende der Recovery-Phase persistierende Effekte wie leichte Hyperplasien der Gallengänge und Ablagerungen von Galle-Pigmenten im Leberparenchym nachgewiesen (Tabelle 62).

Tabelle 62 Gallensäure-Profile im Lebergewebe von behandelten Ratten nach Methapyrilen-Behandlung. Die dargestellten Werte geben das Verhältnis (*Ratio*) der mittleren Konzentrationen der Dosis-Gruppen zu ihren jeweiligen zeitlich zugeordneten Kontrollgruppen an. Werte < 1 repräsentieren erniedrigte Konzentrationswerte in den Dosis-Gruppen gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. Analog repräsentieren Werte > 1 Konzentrationsanstiege relativ zur Kontrolle. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines generalisierten linear gemischten Modells (Signifikanz: *p < 0,05) ermittelt. Abkürzung: < LOD – unterhalb Nachweisgrenze.

Lebergewebe								
Dosierung [mg/kg KG]	30				80			
Gallensäuren	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 24	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 24
CA	16,5	0,7	116,3*	65,0*	9,6*	16,2*	2,0*	5,0*
CDCA	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
DCA	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
GCA	2,1	1,0	0,9	0,2*	4,9	2,8*	2,8	1,4*
GCDCA	1,5	0,8	1,3	0,7*	8,7*	8,9*	8,5*	0,7*
GDCA	1,3	0,6*	1,3	0,9	11,2*	6,6*	7,4*	0,6
GUDCA	3,8	0,5	1,0	0,4	1,8*	3,2	4,7*	0,6*
HDCA	4,1	0,5	11,1	12,8	1,1	11,9	2,0*	2,1*
LCA	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
MCA(a)	14,0*	0,3	130,0	< LOD	8,2*	38,0	2,3*	2,2*
MCA(b)	5,9*	0,3	17,8	63,0*	9,4*	9,0	1,8*	6,9*
MCA(o)	1,9	0,8	2,9	15,5*	5,1	1,9	2,5	4,0*
TCA	1,8*	1,4	1,5	0,8	1,4*	1,5*	1,4*	1,7
TCDCA	1,2	0,9	1,2	0,7	1,3*	2,3*	2,1*	1,2
TDCA	1,3	0,8	1,0	1,0	1,9	1,5	2,2*	1,0
TLCA	1,0	0,6	0,7	1,0	1,3*	1,3	1,6	0,6
TMCA(a+b)	1,1	1,0	0,8	0,8	1,0	1,3*	1,6	1,6
TUDCA	1,4	0,4	1,6	0,8	0,8	0,9	1,6	1,0
UDCA	0,7	0,4*	4,7	2,4	6,0	1,0	2,3*	1,5*

3.4.4 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma

Die univariate Datenanalyse von Gallensäuren im Plasma zeigte bereits an Tag 3 der Methapyrilen-Behandlung für beide Dosis-Gruppen erhöhte Konzentrationen für CDCA, MCA(a) und MCA(b) an. In der Hochdosis-Gruppe (80 mg/kg KG) konnten zu diesem Zeitpunkt signifikante Anstiege der Konzentrationen für 14 von 20 individuellen Gallensäuren nachgewiesen werden (Tabelle 63). Nach einer 14-tägigen Behandlungsperiode waren in der Hochdosis-Gruppe (80 mg/kg KG) die Konzentrationen von 13 Gallensäuren erhöht (Tabelle 63). Die Veränderungen der mittleren Konzentrationen der einzelnen Gallensäuren in den Behandlungs-Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen waren im Zeitverlauf deutlich größer. Nach einer Recovery-Phase von 10 Tagen konnten bei der niedrigen Dosis (30 mg/kg KG) immer noch Veränderungen in der Konzentration von CA, CDCA, DCA, GCDCA, GDCA, LCA und TCDCA festgestellt werden (Tabelle 63). In der Hochdosis-Gruppe konnten signifikante Erhöhungen der Konzentrationen von LCA, TCA, TCDCA, TDCA und UDCA festgestellt werden. Insgesamt waren die festgestellten Veränderungen bei den Konzentrationen der einzelnen Gallensäuren im Plasma in ihrer Dosis- und Zeitabhängigkeit konsistent mit den Veränderungen der Gallensäuren in der Leber sowie den histologischen und klinisch-chemischen Befunden (Tabelle 62, Tabelle 60, Tabelle 61). Im Vergleich zum Lebergewebe wurden im Plasma deutlich stärkere Änderungen der Gallensäurekonzentrationen beobachtet (Tabelle 62, Tabelle 63).

Tabelle 63 Gallensäure-Profile im Plasma von behandelten Ratten nach Methapyrilen-Behandlung. Die dargestellten Werte geben das Verhältnis (Ratio) der mittleren Konzentrationen der Dosis-Gruppen zu ihren jeweiligen zeitlich zugeordneten Kontrollgruppen an. Werte < 1 repräsentieren erniedrigte Konzentrationswerte in den Dosis-Gruppen gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. Analog repräsentieren Werte > 1 Konzentrationsanstiege relativ zur Kontrolle. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines generalisierten linear gemischten Modells (Signifikanz: *p < 0,05) ermittelt. Abkürzung: < LOD – unterhalb Nachweisgrenze.

Plasma								
Dosierung [mg/kg KG]	30				80			
Gallensäuren	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 24	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 24
CA	9,4	7,9	25,0*	27,4*	65,9*	17,3*	126,2*	98,9
CDCA	10,7*	3,6	30,7*	49,1*	49,9*	10,1	152,7*	134,7
DCA	1,6	1,5	2,3	8,5*	7,8*	3,0*	16,9*	26,6
GCA	1,8	2,3	1,0	1,2	13,8*	5,8	19,7*	8,7
GCDCA	1,0	3,1	0,9	2,1*	6,1*	4,2*	22,4*	75,3
GDCA	1,3	3,6	1,0	2,2	14,3*	3,3*	28,7*	48,7
GUDCA	4,2	0,8	2,8	24,7*	8,5*	1,0	60,0*	47,8
HDCA	5,0	0,3	34,3*	7,9	3,0	2,0	34,7	65,2
LCA	1,0	1,2	1,6	2,5*	2,2	1,4	4,2*	6,0*
MCA(a)	14,6*	9,5	19,9*	18,9	95,1*	19,9	78,6	5,8
MCA(b)	5,6*	3,5	8,6	9,0	26,9	15,9	45,1	6,6
MCA(o)	1,3	1,8	1,8	2,5	7,9*	3,0*	8,5*	6,1
TCA	1,5	1,6	0,8	1,9	7,7*	8,3*	28,1*	6,7*
TCDCA	0,9	1,5	0,7	2,6*	2,8*	3,9*	12,7*	18,8*
TDCA	0,9	1,2	0,7	1,8	5,0*	3,0*	15,5*	11,1*
TLCA	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
TMCA(a+b)	1,2	1,4	0,6	2,2	3,5*	4,2*	12,5	4,2
TUDCA	0,9	0,2	2,9*	16,6	1,3	0,3	34,1*	10,3
UDCA	1,9	1,9	1,5	34,4	8,8*	11,6	25,0	109,0*

3.4.5 Untersuchung der Genexpression des Gallensäure-Metabolismus im Lebergewebe

Durch die Behandlung männlicher Ratten mit Methapyrilen konnte eine stark veränderte Homöostase des Metabolismus von individuellen Gallensäuren mittels quantitativer Analyse identifiziert werden. Neben den bereits durchgeführten Untersuchungen wurde eine Transkriptionsanalyse durchgeführt, um die Expression von Genen, die essentielle Funktionen im Metabolismus von Gallensäuren übernehmen, näher zu untersuchen.

Unter Methapyrilen-Exposition zeigten männliche Ratten Veränderungen im Expressionsprofil von Genen der Gallensäure-Biosynthese und der Gallensäure-Transportsysteme. Die statistische Analyse der Genexpression zeigt bereits ab Tag 3 der Behandlung mit Methapyrilen signifikante Veränderungen bei der Transkription von Genen, die sich über den Zeitraum der Behandlung immer deutlicher ausbildeten (Tabelle 64).

Für AMACR, BAAT und ACOX2, die bei der Biosynthese von Gallensäuren eine wichtige Rolle spielen, konnte in der Hochdosis-Gruppe (80 mg/kg KG) über den Behandlungszeitraum von 14 Tagen eine progrediente Verminderung der Expression beobachtet werden (Tabelle 64). Neben

Enzymen der Biosynthese zeigten auch mehrere Transportsysteme OATP1, OATP4, NTCP, MOAT1, MRP2 und MRP4 signifikante Veränderungen. So war die Expression des Transporters MRP2, der Gallensäuren aus den Hepatozyten ins biliäre System schleust, stark erhöht. Parallel dazu war die Expression von MRP4, der Gallensäuren aus dem Hepatozyten ins Blut führt, stark erhöht (Tabelle 64, Abbildung 41). Im Gegensatz dazu war über den Expositionszeitraum eine progrediente Verminderung der Expression von OATP1, OATP4, NTCP zu verzeichnen, die die Gallensäuren in den Hepatozyten transportieren (Tabelle 64, Abbildung 41).

Nach der 10-tägigen Recovery-Phase unterschieden sich die Expressionsraten der meisten Gene in der Hochdosis-Gruppe nicht mehr von denen der entsprechenden Kontrolle. Die Ausnahme bildeten hierbei OATP1, OATP4 sowie MOAT1, die in der Hochdosis-Gruppe noch leicht veränderte Expressionsraten zeigten (Tabelle 64).

Tabelle 64 Transkriptions-Profile im Lebergewebe von behandelten Ratten nach Methapyrilen-Behandlung. Die dargestellten Werte geben das Verhältnis (Ratio) der mittleren Genexpressionsraten der Dosis-Gruppen zu ihren jeweiligen zeitlich zugeordneten Kontrollgruppen an. Werte < 1 repräsentieren eine erniedrigte Transkription in den Dosis-Gruppen gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. Analog repräsentieren Werte > 1 eine erhöhte Transkription relativ zur Kontrolle. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines Dunnett's Test (Signifikanz: *p < 0,05) ermittelt. Abkürzung: n/s – nicht signifikant.

Gene Title	Funktion	Zeitpunkt			
		Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 24 [Recovery]
OATP1	Transport	0,73*	0,49*	0,35*	0,82*
NTCP	Transport	0,73*	0,41*	0,28*	n/s
OATP4	Transport	0,77*	0,57*	0,46*	1,18*
MOAT1	Transport	0,62*	0,64*	0,31*	0,71*
AMACR	Biosynthese	0,70*	0,46*	0,30*	n/s
BAAT	Biosynthese	0,91	0,60*	0,43*	n/s
ACOX2	Biosynthese	0,71*	0,49*	0,34*	n/s
ABCG5	Transport	0,54*	0,35*	0,19*	n/s
MRP2	Transport	1,51*	1,88*	2,23*	n/s
MRP4	Transport	1,95*	3,89*	7,41*	n/s

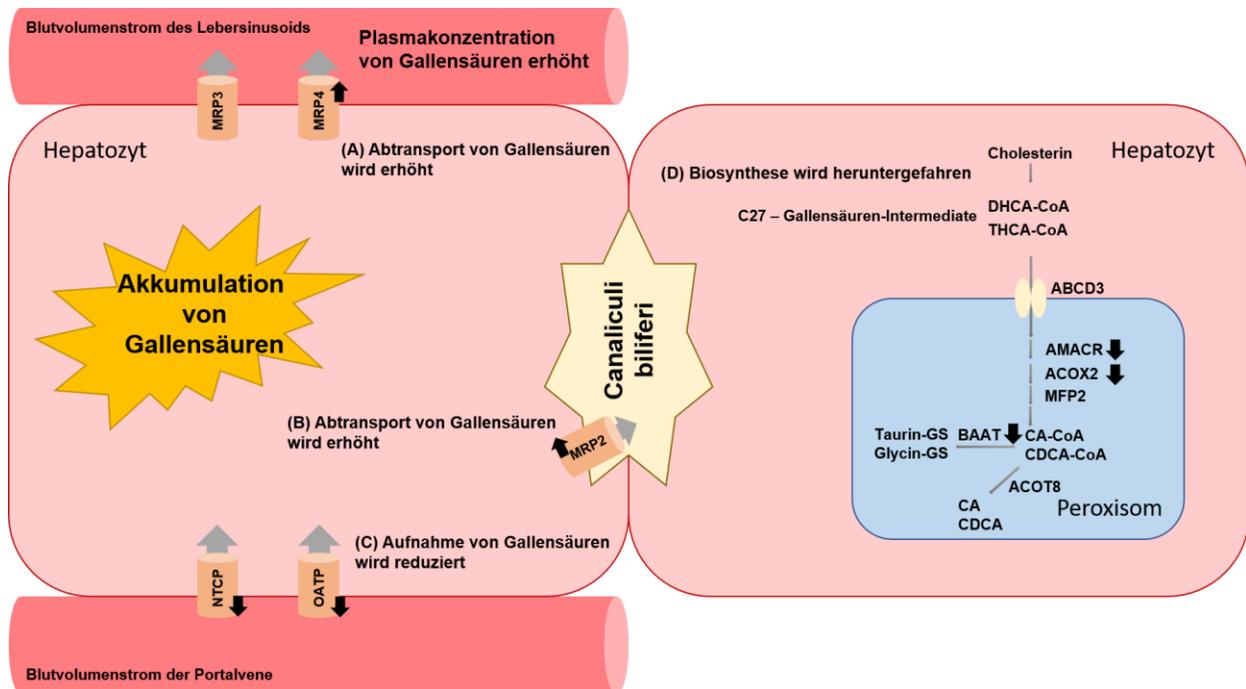


Abbildung 41 Schematische Darstellung der Biosynthese und des Transports von Gallensäuren im Hepatozyten nach 14-tägiger Behandlung mit Methapyrilen. Die Abbildung spiegelt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und des Gallensäure-Profilings der Hochdosis-Gruppe (80 mg/kg KG) wider. Hierbei wurde auf der rechten Seite der peroxisomale Biosyntheseschritt von Gallensäuren vereinfacht dargestellt und diejenigen Gene wurden mit einem schwarzen Pfeil markiert, deren Transkription signifikant erhöht oder erniedrigt war. Die Richtung des Pfeils symbolisiert dabei den Anstieg oder die Erniedrigung der Transkriptionsrate. Analog sind auf der linken Seite die Transportsysteme vereinfacht dargestellt. Auszüge dieser Darstellung sind angelehnt an (Baes, et al., 2016; Ferdinandusse, et al., 2006). Abkürzungen: DHCA – Dihydroxycholestansäure, THCA – Trihydroxycholestansäure, CoA – Coenzyme A.

3.4.6 Diskussion

Im Modell der Methapyrilen-induzierten Leberschädigung in Ratten wurden mittels LC-MS/MS 20 spezifische Gallensäuren im Plasma und im Lebergewebe quantitativ bestimmt. Ziel war es, zu untersuchen, ob durch die zusätzliche Erfassung von Gallensäuren eine Verbesserung der präklinischen Sicherheitsbewertung hinsichtlich einer Leberschädigung erzielt werden kann. Methapyrilen wurde männlichen Ratten täglich in Dosierungen von 30 und 80 mg/kg KG über 14 Tage verabreicht. Im Anschluss an die Expositionsphase erfolgte eine Erholungsphase von 10 Tagen. Die histopathologische Auswertung ergab eine hepatozelluläre oder hepatobiliäre Schädigung, die mit signifikanten Veränderungen der Serummarker ALAT, ASAT, APh, γ GT, Bilirubin und Gallensäuren (gesamt) einherging. Konsistent dazu konnten auch über eine Analyse der individuellen Gallensäuren signifikante Anstiege der Konzentrationen von Gallensäuren im Plasma und Lebergewebe der behandelten Tiere nachgewiesen werden.

Im Lebergewebe der Hochdosis-Gruppe (80 mg/kg KG) waren nach 14-tägiger Methapyrilen-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe vor allem die Konzentrationen der Glycin-konjugierten Gallensäuren GCDCA, GDCA, GUDCA und der Taurin-konjugierten Gallensäuren TCA, TCDCA und TDCA erhöht. Außerdem konnten Anstiege der Konzentrationen von CA, HDCA, MCA(a), MCA(b) und UDCA beobachtet werden. Die Ergebnisse des Gallensäure-Profilings im Lebergewebe weisen darauf hin, dass durch die Methapyrilen-Behandlung eine hepatozelluläre Akkumulation von Gallensäuren induziert wurde.

Im Plasma der Hochdosis-Gruppe (80 mg/kg KG) konnten nach 14-tägiger Methapyrilen-Behandlung die stärksten Anstiege der Konzentration von primären Gallensäuren CA und CDCA verzeichnet werden. Allerdings wiesen die Ergebnisse der Plasma-Untersuchung auf eine Störung der gesamten Gallensäure-Homöostase hin, denn für alle der 20 untersuchten Gallensäuren konnten am Ende der Expositionszeit eine Erhöhung der Konzentrationen im Plasma vermerkt werden, wobei signifikante Veränderungen für 13 der 20 Gallensäuren nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse des Gallensäure-Profilings im Plasma geben Grund zur Annahme, dass der durch Methapyrilen induzierte hepatozelluläre Schaden mit einer Störung der Homöostase der Gallensäuren einhergeht und dass Gallensäure-Profile als Marker genutzt werden können, um die Hepatotoxizität an den Ratten nachweisen zu können.

Störungen der Gallensäure-Homöostase waren bei einer täglichen Dosis von 30 mg/kg KG Methapyrilen bereits ab Behandlungstag 3 nachweisbar. Damit waren die Ergebnisse der Gallensäuren-Analyse empfindlicher als die traditionellen klinischen Serummarker im Hinblick darauf, frühe Substanz-induzierte Veränderungen an der Leber anzuzeigen. Während sich die Serummarker in der Erholungsphase normalisierten, blieben die Gallensäure-Konzentrationen im Plasma und im Lebergewebe auch in dieser Phase signifikant erhöht, was mit den anhaltenden histopathologischen Befunden der Gallenganghyperplasie (BDH) und Gallenpigmentablagerung korrelierte.

Die über das Gallensäure-Profilings nachgewiesene Akkumulation von Gallensäuren im Lebergewebe wurde anhand der Analyse hepatischer Genexpressionsprofile mechanistisch untersucht. Dabei konnte nach Methapyrilen-Behandlung eine verminderte Expression von Genen festgestellt werden die für Proteine mit einer Funktion in der Gallensäure-Synthese (AMACR, BAAT, ACOX2) sowie der hepatozellulären Gallensäure-Aufnahme (NTCP, OATPs) codieren. Im Gegensatz dazu konnte nach Methapyrilen-Behandlung eine gesteigerte Expression von Efflux-Transportern (MRP2, MRP4) verzeichnet werden. Insgesamt weist das Methapyrilen-induzierte Genexpressions-Profil auf einen adaptiven hepatozellulären Schutzmechanismus gegen eine zytotoxische Gallensäure-Akkumulation hin (Abbildung 41). Zusammenfassend legen

die Daten aus der Methapyrilen-Studie nahe, dass die Implementierung spezifischer Gallensäuren als zusätzliche Biomarker für hepatozelluläre und hepatobiliäre Schäden in präklinischen Ratten-Studien vorteilhaft sein könnte, um frühzeitige Anzeichen eines Leberschadens zu ermitteln und zusätzliche mechanistische Informationen gewinnen zu können.

3.5 Einfluss von Valproinsäure auf das Gallensäure-Profil in Ratten

In der folgenden tierexperimentellen Studie wurde Valproinsäure als Modellsubstanz zur Induktion einer mikrovesikulären Steatose in Ratten benutzt. Männliche und weibliche Han-Wistar-Ratten wurden 14 Tage täglich oral mit Valproinsäure (150 mg/kg KG, 300 mg/kg KG, 500 mg/kg KG) oder 0,9 %iger Kochsalzlösung (Vehikel) behandelt. Für jeweils drei Tiere aus der Hochdosis-Gruppe schloss sich eine zweiwöchige Erholungsphase an. An den Tagen 2, 9 und 14 wurde allen Tieren zur Bestimmung der Serummarker und der Gallensäure-Plasmakonzentrationen Blut abgenommen. An Tag 14 bzw. Tag 28 (*Recovery*-Gruppe) wurden alle Tiere seziiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Behandlungsphase gezeigt. Die nach der Erholungsphase untersuchten Ratten zeigten weder histologisch noch klinisch-chemisch Evidenzen für hepatozelluläre Veränderungen (Anhang-Tabelle A 4).

3.5.1 Histopathologie

Auf Basis von Literaturstudien zu Valproinsäure, die zur Auswahl der Dosis und des Behandlungszeitraums herangezogen wurden, war eine zunehmende Akkumulation von kleinen Vakuolen mit Einlagerungen von Triglyzeriden im Hepatozyten (mikrovesikuläre Steatose) von behandelten Ratten zu erwarten (LiverTox, 2015c; Mindikoglu *et al.*, 2011; Teschke, 2001).

Die histopathologische Bewertung der männlichen Ratten ergab geringfügige hepatozelluläre Veränderungen in Form einer hepatozellulären Hypertrophie, beginnend in der Gruppe mit der mittleren Dosis, sowie einer moderat ausgeprägten Hypertrophie bei Tieren der Hochdosis-Gruppe mit zusätzlicher minimaler Ausbildung von Vakuolen (Tabelle 65). Bei den weiblichen Ratten wurde ein adaptiver hepatozellulärer Mechanismus durch leichte bis minimale Befunde von Vakuolen bei den Tieren der Hochdosis-Gruppe beobachtet (Tabelle 65, Abbildung 42). Histologische Lebergewebsschnitte von Ratten mit Vakuolen wurden mit dem Lipidfarbstoff Ölrot behandelt, um eingelagerte Lipide in den Vakuolen nachzuweisen. Die Befunde waren für alle Tiere negativ. Nach der zweiwöchigen Erholungsphase waren keine histopathologischen Veränderungen mehr feststellbar, was auf eine Reversibilität der Valproinsäure-induzierten Schädigung hinweist.

Tabelle 65 Häufigkeit hepatozellulärer Veränderungen bei männlichen und weiblichen Ratten nach 14-tägiger Behandlung mit Valproinsäure (Männlich: ♂, Weiblich: ♀).

Dosis		200 mg/kg KG		500 mg/kg KG	
Geschlecht		♂	♀	♂	♀
Anzahl der Tiere		6	6	6	6
Hypertrophie					
Grad 1	Leicht	5	1		1
Grad 2	Minimal			1	1
Grad 3	Moderat			5	
Vakuolisierung					
Grad 1	Leicht			1	2
Grad 2	Minimal			3	2

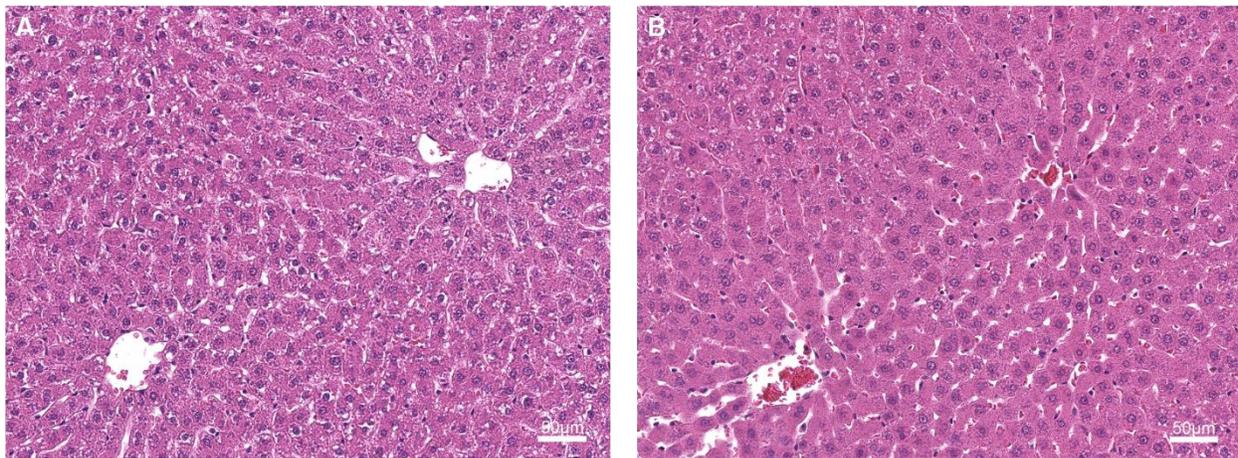


Abbildung 42 Leberschnitte von männlichen Ratten nach Hämatoxylin-Eosin Färbung. (A) Kontroll-Gruppe: keine Veränderungen, (B) Hochdosis-Gruppe (500 mg/kg KG): Leberzellhypertrophie. Die Aufnahmen wurden 20-fach vergrößert mit einer Skalierung von 50 µm.

3.5.2 Klinische Chemie

Die Aktivitätsmessungen von etablierten Serummarkern für Lebertoxizität wiesen, wie in Abbildung 43 anhand der Alanin-Aminotransferase (ALAT) gezeigt, in beiden Geschlechtern, bei allen Dosierungen und zu keinem Messzeitpunkt signifikante Veränderungen auf und lieferten somit keinen Hinweis für hepatozelluläre Veränderungen (Anhang-Tabelle A 3). Die anderen Marker-Enzyme für Leberzellschädigung, wie ASAT, APh, GLDH und γ GT, waren in beiden Geschlechtern ebenfalls unauffällig (Anhang-Tabelle A 3). Auch eine Analyse von Triglyzeriden im Serum zeigte keine Veränderungen.

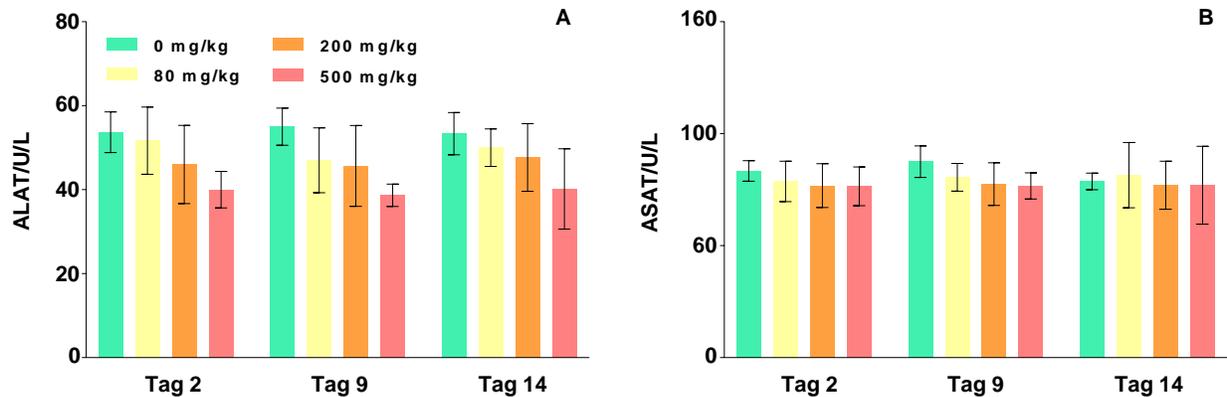


Abbildung 43 Aktivität der Alanin-Aminotransferase (ALAT) nach Behandlung mit Valproinsäure. (A) Männchen (B) Weibchen. Dargestellt sind die MW \pm SD (n=6 pro Gruppe) für die einzelnen Zeitpunkte.

Zusammenfassend gibt es auf einer Basis der derzeitigen präklinischen Sicherheitsbewertung histopathologische Hinweise für hepatozelluläre Veränderungen bei männlichen und weiblichen Ratten nach der Valproinsäure-Exposition. Die etablierten Serummarker zeigt jedoch keine hepatozellulären Veränderungen an und würden als alleinige Marker eine Valproinsäure-induzierte Leberschädigung nicht detektieren. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse des LC-MS/MS basierten Gallensäure-Profilings im Plasma und Lebergewebe sowie die Expressionsanalyse von Genen der Gallensäure-Homöostase vorgestellt, um deren Nutzen für den Nachweis von Valproinsäure-induzierten Leberschädigungen und für die Aufklärung des Mechanismus zu untersuchen.

3.5.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber von Ratten

Nach Valproinsäure-Applikation zeigten männliche Ratten der Hochdosis-Gruppe einen statistisch signifikanten Anstieg der GCA-Konzentration im Lebergewebe. Gleichzeitig sanken die TDCA- und TUDCA-Konzentrationen. Bei den weiblichen Ratten kam es zu einem signifikanten Anstieg der primären Gallensäuren CA und CDCA und der Glycin-Konjugate (GCA, GCDCA, GDCA, GUDCA) (Abbildung 44 A-D).

Um die gemessenen Gallensäuren nicht nur einzeln, sondern auch als Profil zu analysieren und mögliche Korrelationen mit den anderen Metadaten der Studie (z. B. Serummarker, histopathologische Befunde) zu identifizieren, wurde eine PCA durchgeführt. Der *Score Scatter Plot* zeigte eine dosisabhängige Veränderung des Gallensäure-Profiles männlicher Ratten beginnend ab der mittleren Dosis (Abbildung 45 A). Besonders starke Abweichungen im Gallensäure-Profil im Vergleich zur Kontrolle wiesen Tiere mit histopathologischen Veränderungen in der Leber auf (Abbildung 45 A, Umrandung). Der zugehörige *Loading Scatter Plot* (Abbildung 45 B) belegt, dass GCA für die Verschiebung in Abbildung 45 A verantwortlich ist und mit $p[2] > 0,5$ den größten Anteil an dem durch Valproinsäure veränderten Profil hat. Weibliche Ratten zeigten ausschließlich in der Hochdosis-Gruppe histopathologische Veränderungen in der Leber (Abbildung 45 C, Markierung). Im Gegensatz zu den männlichen Tieren waren bei den weiblichen Tieren Veränderungen bei den primären Gallensäuren CA und CDCA und bei den Glycin-Konjugaten (GCA, GCDCA, GDCA) ursächlich für das veränderte Gallensäure-Profil ($p[1] \geq 0,3$) (Abbildung 45 D). Die Ergebnisse der univariaten und multivariaten statistischen Analyse korrelierten miteinander. Die PCA verdeutlichte, dass die größten Veränderungen bei Tieren mit einem histologischen Befund auftraten. Somit bestand eine Korrelation zwischen Profiling und Histologie. *Non-Responder* (mittlere und hohe Dosis) ohne histologischen Befund zeigten nur geringfügig veränderte Gallensäure-Profile.

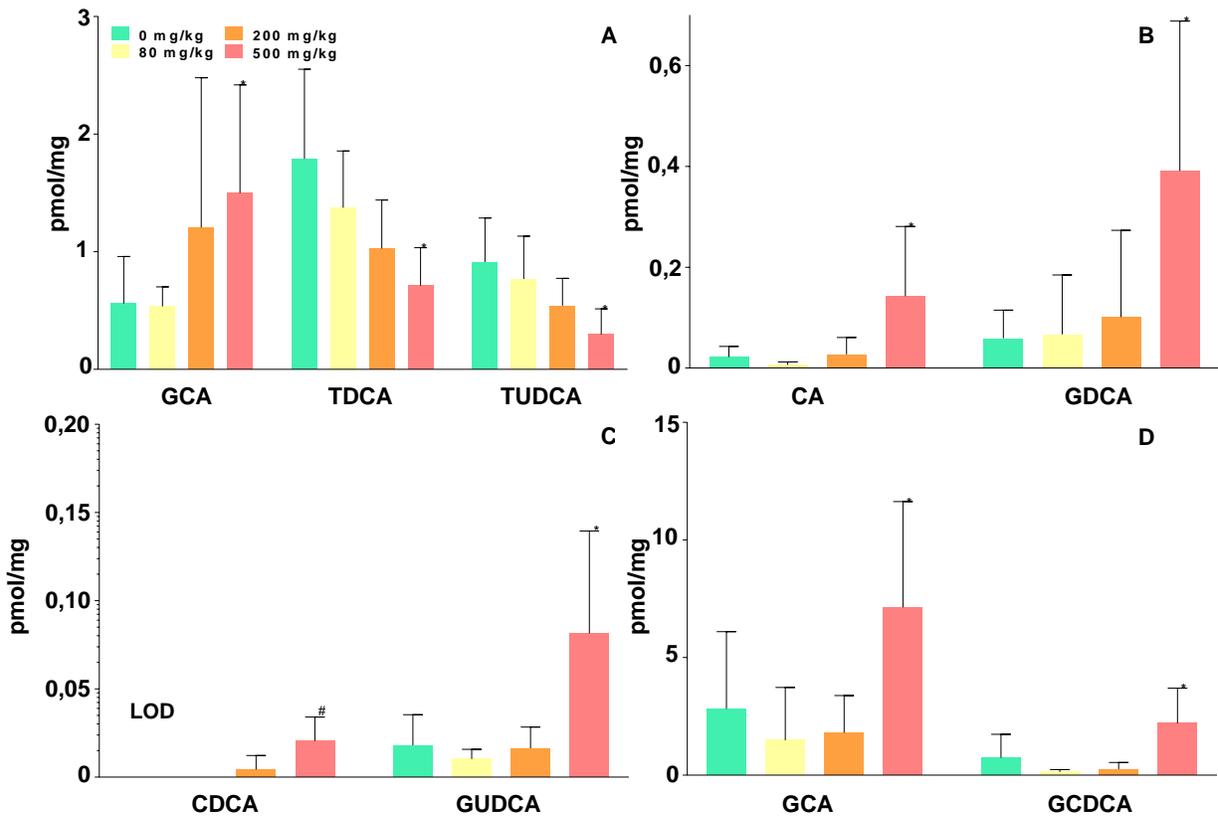


Abbildung 44 Gallensäure-Konzentration im Lebergewebe männlicher (A–B) und weiblicher (C–D) Ratten Valproinsäure-Exposition (Tag 14). Dargestellt sind MW \pm SD (n=6 pro Gruppe). Die Signifikanztestung mittels Dunnett's Test bezieht sich auf die jeweilige Kontrollgruppe: *p < 0,05 (parametrisch), #p < 0,05 (nicht-parametrisch), < LOD: unterhalb der Bestimmungsgrenze.

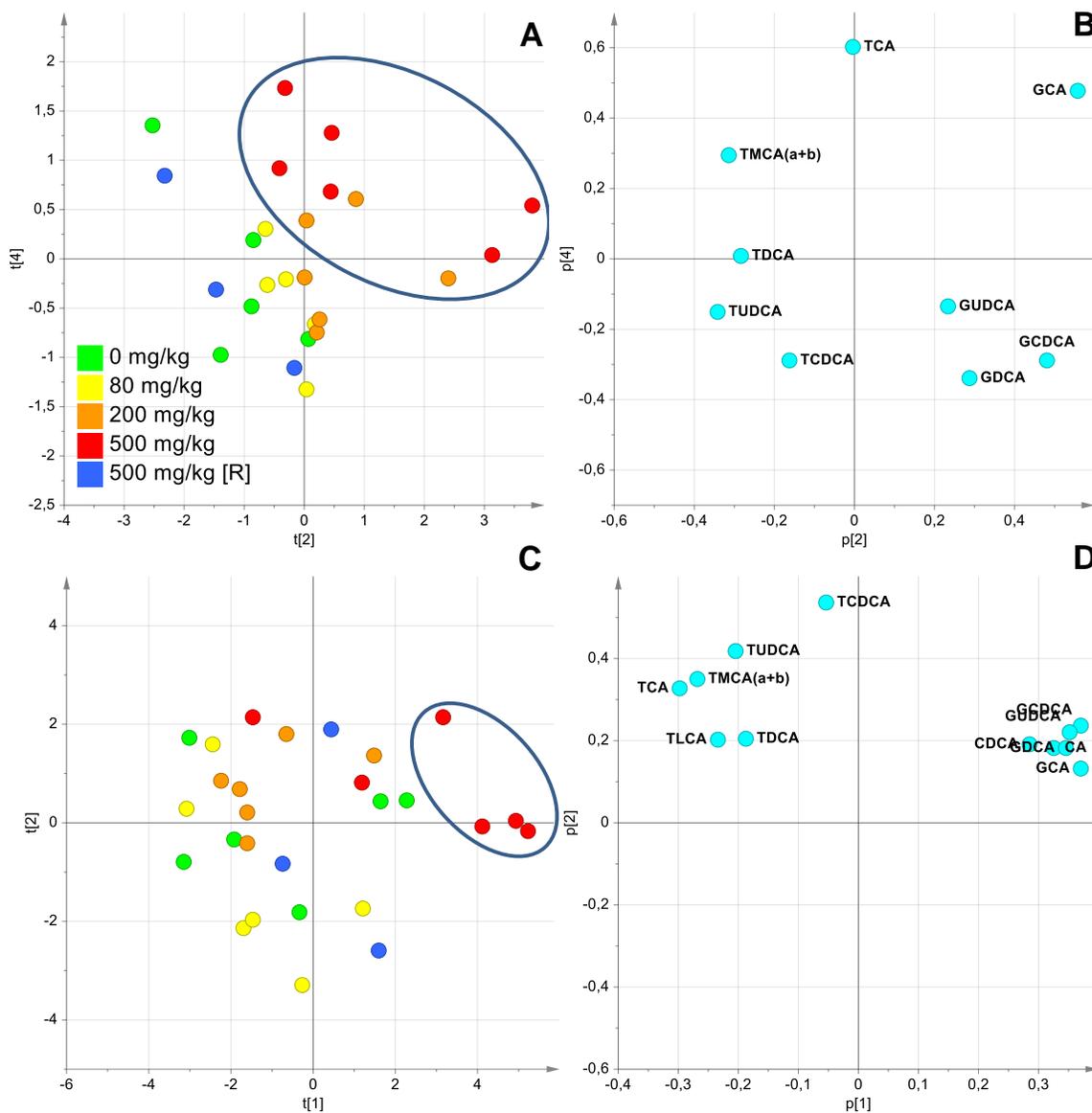


Abbildung 45 Hauptkomponenten-Analyse (PCA) basierend auf Gallensäure-Profilen im Lebergewebe unter Valproinsäure-Exposition nach 14 Tagen. *Score Scatter Plot* der (A) männlichen und (C) weiblichen Tiere der unterschiedlichen Dosisgruppen [grün] Kontrolle, [gelb] 30 mg/kg KG, [orange] 200 mg/kg KG, [rot] 500 mg/kg KG, [blau] *Recovery*-Gruppe 500 mg/kg KG. *Loading Scatter Plot* der quantifizierten Gallensäuren der (B) männlichen und (D) weiblichen Tiere, die für die Verteilung im korrespondierenden *Score Scatter Plot* verantwortlich sind.

3.5.4 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma von Ratten

Die Untersuchung des Plasmas männlicher Ratten zeigte lediglich für GCA und ausschließlich für die Tiere der Hochdosis-Gruppe beginnend ab Tag 9 einen signifikanten Konzentrationsanstieg (Abbildung 46 A), alle anderen Gallensäuren waren nicht signifikant verändert (Anhang-Tabelle A 7 und Anhang-Tabelle A 8). Weibliche Ratten zeigten in der Hochdosis-Gruppe einen signifikanten Anstieg mehrerer Gallensäuren, jedoch nur an Tag 14. Betroffen waren die primären Gallensäuren (CA/CDCA/MCA(a)) und Glycin-konjugierte Gallensäuren (z. B. GCA/GCDCA/ GDCA). Die größte Veränderung wiesen CA und MCA(a) auf (Abbildung 46 B).

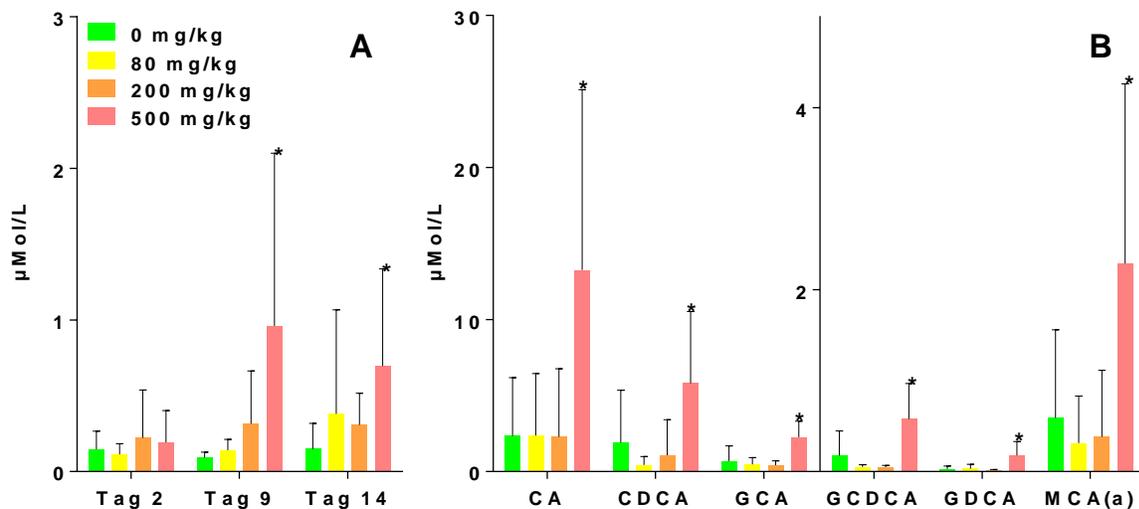


Abbildung 46 (A) Konzentrationsverlauf von GCA im Plasma männlicher Ratten und (B) von verschiedenen Gallensäuren im Plasma weiblicher Ratten an Tag 14 unter Valproinsäure-Exposition. Dargestellt sind MW \pm SD (n=6 pro Gruppe). Die Signifikanztestung mittels Dunnett's Test bezieht sich auf die jeweilige Kontrollgruppe: *p < 0,05

Die multivariate Datenanalyse mittels PCA ergab keine eindeutigen Hinweise für dosis-abhängige Effekte von Valproinsäure auf das Gallensäure-Plasmaprofil männlicher Ratten. Um über den direkten Vergleich von Kontroll- und Hochdosis-Proben aller Zeitpunkte gezielt substanz-spezifische Effekte zu identifizieren, wurde eine OPLS-DA durchgeführt.

Auf der Basis der vorhandenen Daten ließ sich ein statistisch signifikantes Modell erstellen ($p < 0,05$), in dem die Gallensäure-Profile der Kontroll- und Hochdosis-Gruppe klar unterscheidbar waren. In diesem Modell zeigte GCA nicht nur den stärksten Anteil an der Diskriminierung, sondern sie besaß auch die beste Vorhersagekraft für histopathologische Veränderungen bezüglich Hypertrophie und Ausbildung von Vakuolen in der Leber. Diese Ergebnisse korrelierten mit den Resultaten der univariaten Analyse (Abbildung 46).

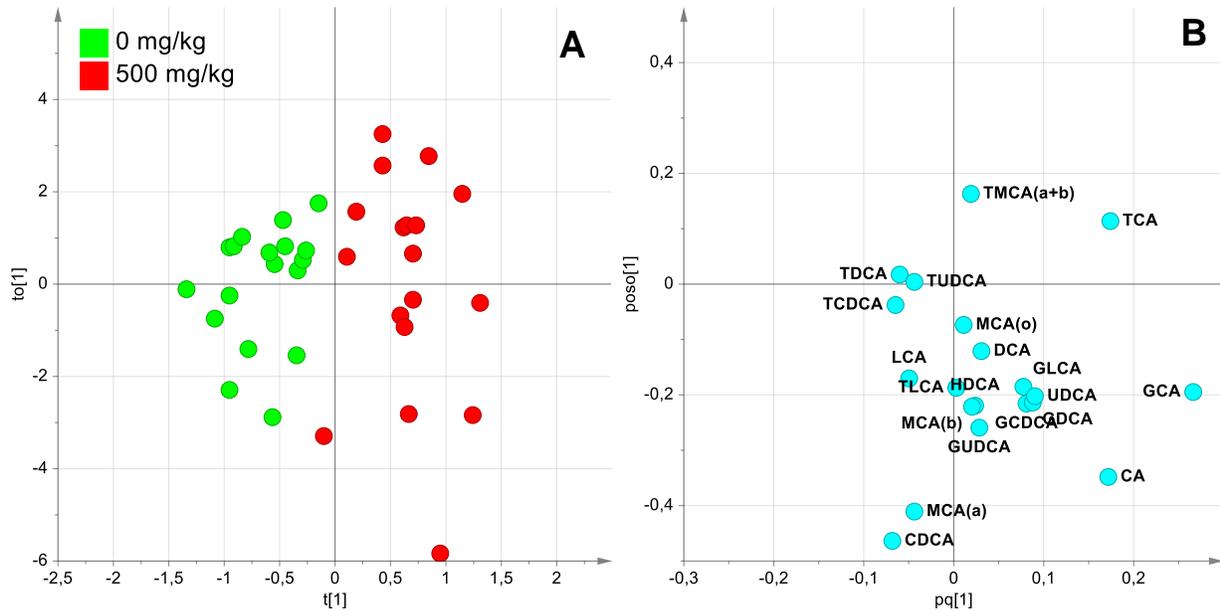


Abbildung 47 OPLS-DA der Gallensäure-Profile im Plasma männlicher Ratten unter Valproinsäure-Exposition. Verglichen wurden die Proben der Kontroll- [grün] und Hochdosis-Gruppe [rot] für alle Probenahmezeitpunkte. (A) *Score Scatter Plot* und (B) *Loading Scatter Plot* belegen die hohe Vorhersagekraft ($p < 0,05$) von GCA ($p < 0,05$) für die Trennung beider Gruppen in diesem Modell.

Auch die Gallensäure-Profile im Plasma der weiblichen Ratten wurden über multivariate Analysen untersucht. Nach der PCA der Plasmaproben an Tag 9 hatte Valproinsäure keinen Effekt auf die Gallensäure-Profile. Vielmehr ließ sich eine große Variabilität in der Kontrollgruppe anhand einer starken Streuung entlang der $p[1]$ -Achse beobachten, die auf eine höhere biologische Varianz hinweist und eine subtile Valproinsäure-induzierte Beeinflussung der Gallensäure-Profile maskieren könnte (Abbildung 48 A). An Tag 14 zeigte die Mehrzahl der Tiere der Hochdosis-Gruppe deutlich veränderte Gallensäure-Profile (Abbildung 48 C, Kreis). Interessanterweise wiesen die Tiere mit dem größten Unterschied zur Kontrolle auch klare histopathologische Befunde (Hypertrophie und Ausbildung von Vakuolen) in der Leber auf (Tabelle 65).

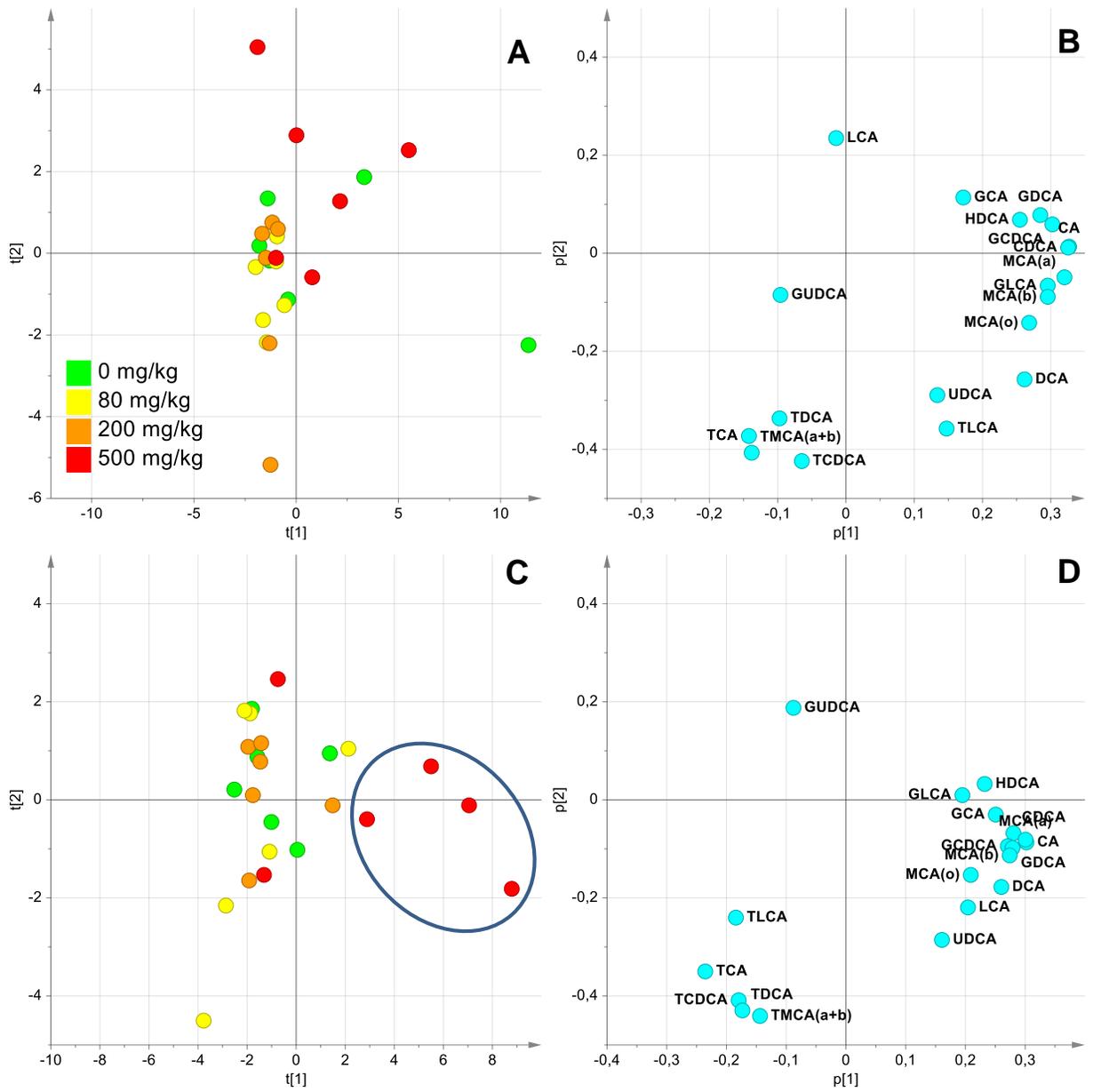


Abbildung 48 PCA der Gallensäure-Profile im Plasma weiblicher Ratten unter Valproinsäure-Exposition. (A) Score Scatter Plot und (B) Loading Scatter Plot an Versuchstag 9, (C) Score Scatter Plot und (D) Loading Scatter Plot an Versuchstag 14. Kontrollgruppe [grün], niedrige [gelb], mittlere [orange] und hohe Dosis [rot].

3.5.5 Untersuchung der Genexpression des Gallensäure-Metabolismus im Lebergewebe

Durch die Behandlung männlicher und weiblicher Ratten mit Valproinsäure zeigten veränderte Profile von Gallensäuren erste Hinweise auf einen veränderten Metabolismus von individuellen Gallensäuren. Die Untersuchung relevanter Gene der Gallensäure-Homöostase wurden mittels MultiPlex Assay durchgeführt, um weitere Erkenntnisse zu den veränderten Gallensäure-Profilen in Ratten zu gewinnen. Zur Normalisierung der quantifizierten RNA wurden spezifische *Housekeeper*-Gene verwendet. Die Genexpression in der Leber wurde an Tag 14 untersucht. Die Ergebnisse wurden in Form einer *Heat Map* dargestellt. Vermehrt oder vermindert exprimierte Gene wurden farblich gekennzeichnet. Unter Valproinsäure-Exposition zeigten männliche Ratten Veränderungen im Expressionsprofil von Genen der Gallensäure-Biosynthese, der Transportsysteme und der Regulation des Gallensäure-Metabolismus.

Das Gen Acyl-CoA Thioesterase 8 (ACOT8), das bei der Gallensäure-Biosynthese die Hydrolyse von CA-CoA und CDCA-CoA katalysiert, war in der Hochdosis-Gruppe geringfügig stärker exprimiert. Auch die Gene der für die Synthese der primären Gallensäuren CA und CDCA zuständigen Enzyme der CYP-Familie (z. B. CYP7A1, CYP8b1, und CYP27A1) wurden vermehrt exprimiert, insbesondere CYP7A1 (Abbildung 49, Abbildung 50).

Eine verstärkte Genexpression wurde auch für Effluxtransporter MDR1 und MRP4 ermittelt, die für den Transport von Gallensäuren zuständig sind. Dagegen zeigte sich eine verminderte Genexpression des Efflux-Transporters MDR3, der Gallensäuren in die Gallengänge (*Canaliculi biliferi*) transportiert. Eine erhöhte Transkription wurde für den Transporter *Apical sodium-bile acid transporter* (ASBT) bestimmt, der für die Aufnahme von sekundären Gallensäuren in die Hepatozyten zuständig ist (Abbildung 49, Abbildung 50).

Bei den regulatorischen Genen war das Gen, das für den nuklearen Rezeptor *Small Heterodimer Partner* (SHP) codiert, geringfügig stärker exprimiert. Seine Aufgabe besteht in der Inhibition der Verstoffwechslung von Cholesterin zu Gallensäuren durch das Enzym 7 α -Hydroxylase (CYP7A1) (Miao *et al.*, 2009). Der *Pregnane-X-Receptor* (PXR), der u.a. verschiedene Funktionen, wie z.B. Synthese, Konjugation oder den Transport von Gallensäure reguliert (Li *et al.*, 2013), wurde ebenfalls geringfügig stärker exprimiert. Gleiches galt auch für das Gen des *Hepatocyte Nuclear Factor-4-alpha* (HNF4 α). HNF4 α spielt bei der Gallensäure-Synthese eine wichtige Rolle, da dieser Gen-Transkription von CYP7A1 reguliert und eine funktionelle Kaskade mit PXR bildet (Abbildung 49, Abbildung 50).

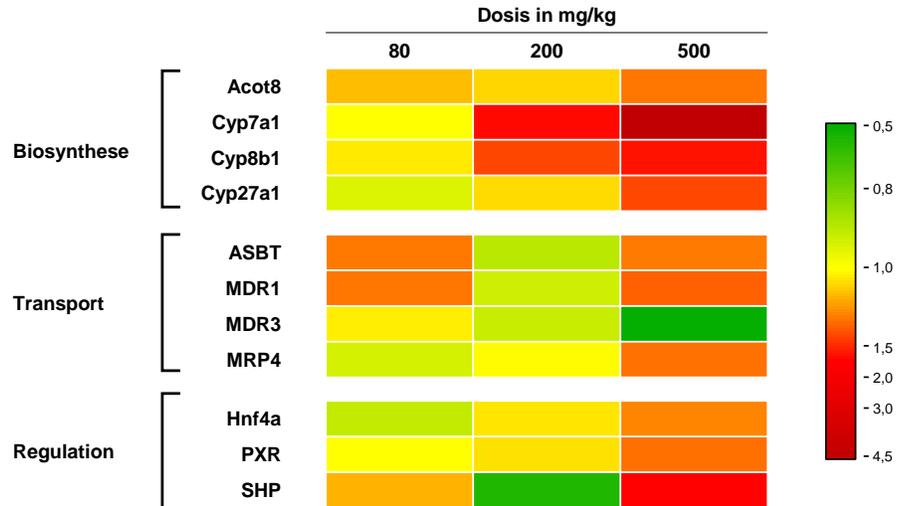


Abbildung 49 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Valproinsäure-Exposition in männlichen Ratten (n=6 pro Gruppe) 0 mg/kg KG [Kontrolle], 80 mg/kg KG [niedrige Dosis], 200 mg/kg KG [mittlere Dosis], 500 mg/kg KG [hohe Dosis]. In der Heat Map ist das arithmetische Mittel der relativen Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) dargestellt.

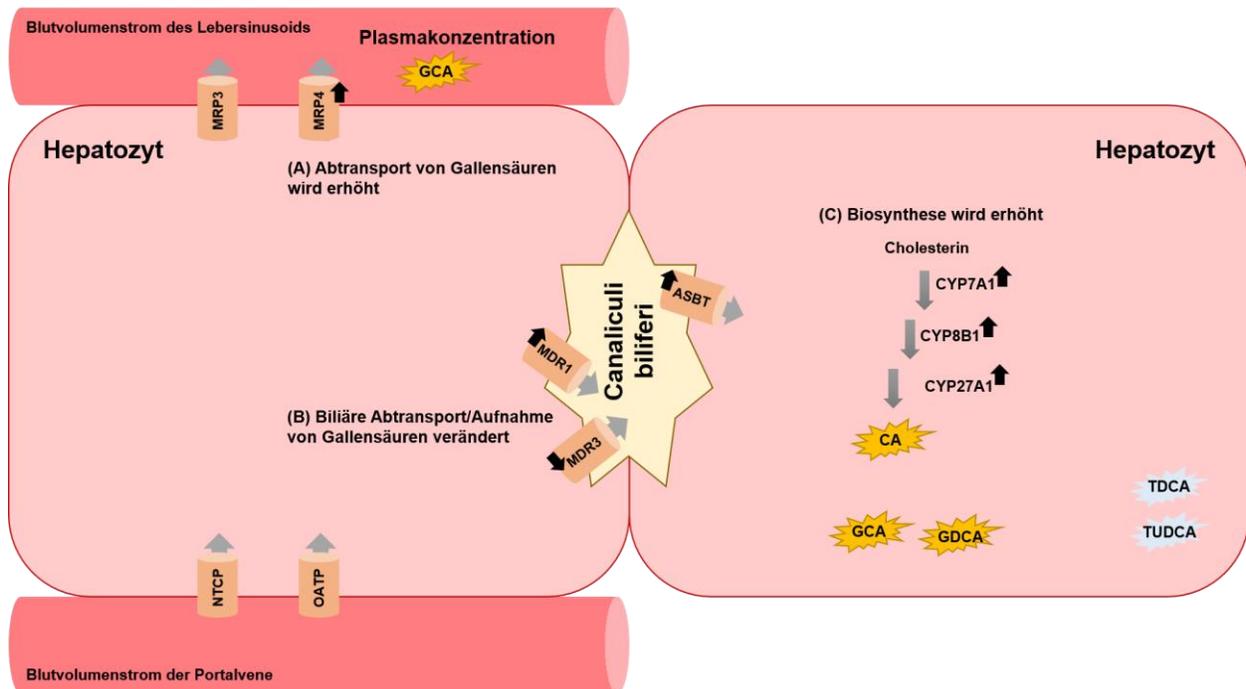


Abbildung 50 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Valproinsäure in männlichen Ratten. Die Abbildung spiegelt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und des Gallensäure-Profilings der Hochdosis-Gruppe (500 mg/kg KG) wider. Hierbei wurde auf der rechten Seite der Biosyntheseschritt von Gallensäuren vereinfacht dargestellt und diejenigen Gene wurden mit einem schwarzen Pfeil markiert, deren Transkription signifikant erhöht oder erniedrigt war. Die Richtung des Pfeils symbolisiert dabei den Anstieg oder die Erniedrigung der Transkriptionsrate. Analog sind auf der linken Seite die Transportsysteme vereinfacht dargestellt. Gelb-markierte Gallensäuren stellen einen analytisch nachgewiesenen Konzentrationsanstieg der jeweiligen Gallensäuren dar. Blau-markierte Gallensäuren verweisen auf eine analytisch bestätigte Konzentrationserniedrigung dieser Gallensäuren. Auszüge dieser Darstellung sind angelehnt an (Baes, et al., 2016; Ferdinandusse, et al., 2006).

Die meisten Veränderungen in der Expression von Genen, die im Gallensäure-Metabolismus (Biosynthese, Transporter) involviert sind, traten bei den weiblichen Ratten in der Hochdosis-Gruppe auf. Eine erhöhte Expression zeigte das CYP8b1-Gen, was auf eine gesteigerte Synthese von primären Gallensäuren im Hepatozyten hinweist. Die verstärkte Expression der Transporter MDR3 und MDR1 deutet auf einen gesteigerten Efflux von Gallensäuren aus den Leberzellen in die *Canaliculi biliferi* hin (Mennone *et al.*, 2010), die erhöhte Expression von MRP4 dagegen auf einen verstärkten basolateralen Export von Gallensäuren aus den Hepatozyten ins Blut (Abbildung 51, Abbildung 52).

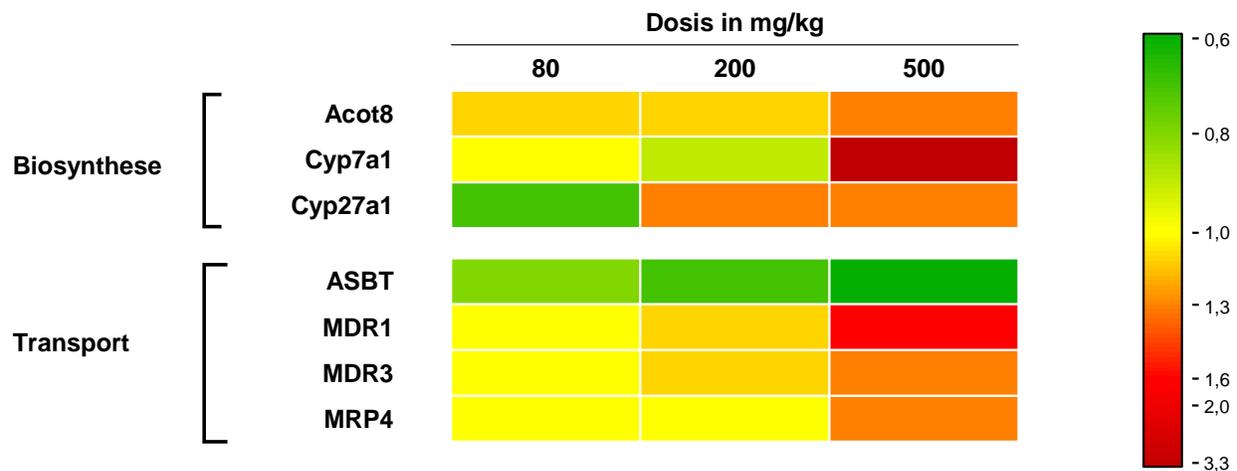


Abbildung 51 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Valproinsäure-Exposition in weiblichen Ratten (n=6 pro Gruppe). 0 mg/kg KG [Kontrolle], 80 mg/kg KG [niedrige Dosis], 200 mg/kg KG [mittlere Dosis], 500 mg/kg KG [hohe Dosis]. In der *Heat Map* ist das arithmetische Mittel der relativen Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) dargestellt.

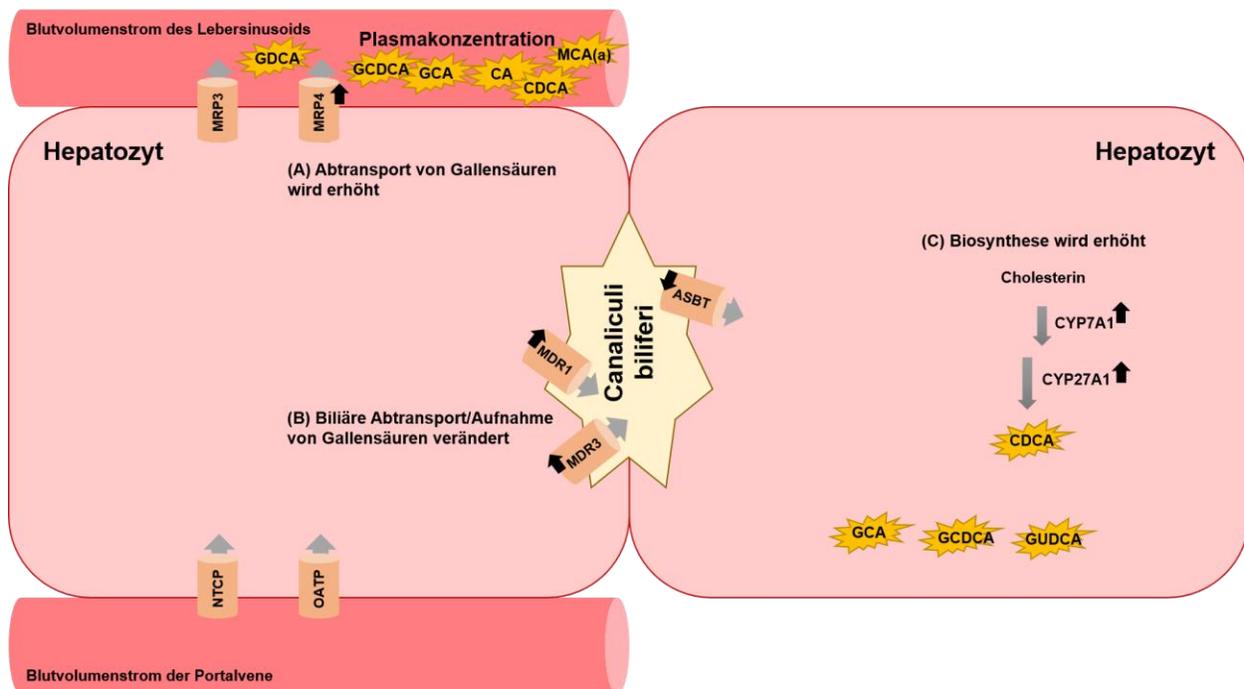


Abbildung 52 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Valproinsäure in weiblichen Ratten. Die Abbildung spiegelt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und des Gallensäure-Profilings der Hochdosis-Gruppe (500 mg/kg KG) wider. Hierbei wurde auf der rechten Seite der Biosyntheseschritt von Gallensäuren vereinfacht dargestellt und diejenigen Gene wurden mit einem schwarzen Pfeil markiert, deren Transkription signifikant erhöht oder erniedrigt war. Die Richtung des Pfeils symbolisiert dabei den Anstieg oder die Erniedrigung der Transkriptionsrate. Analog sind auf der linken Seite die Transportsysteme vereinfacht dargestellt. Gelb-markierte Gallensäuren stellen einen analytisch nachgewiesenen Konzentrationsanstieg der jeweiligen Gallensäuren dar. Auszüge dieser Darstellung sind angelehnt an (Baes, et al., 2016; Ferdinandusse, et al., 2006).

3.5.6 Diskussion

Die hepatotoxische Wirkung von Valproinsäure beruht auf der Inhibition der mitochondrialen β -Oxidation, wodurch Fettsäuren in den Hepatozyten akkumulieren und eine Steatose begünstigen (Begriffe, et al., 2011). Die Diagnose einer Wirkstoff-induzierten Steatose ist schwierig. Die am häufigsten verwendeten Methoden sind die Bestimmung der ASAT-Aktivität und die Histopathologie. Aktuell fehlen spezifische Biomarker; verschiedene Biomarkerkandidaten wie u. a. die Malatdehydrogenase (MDH) oder spezifische Formen von microRNAs befinden sich derzeit in der Erprobung (Amacher, 2011; Aubrecht, et al., 2013).

In der vorliegenden Studie wurde Valproinsäure in drei Dosierungen (niedrige Dosis: 150 mg/kg KG, mittlere Dosis: 300 mg/kg KG, hohe Dosis: 500 mg/kg KG) verabreicht. Laut histologischer Auswertung kam es bei fünf mit 200 mg/kg KG Valproinsäure behandelten männlichen Ratten zu minimalen hepatozellulären Veränderungen in der Form einer Hypertrophie. Weibliche Ratten waren in diesem Dosisbereich weniger sensitiv, lediglich bei einer Ratte wurde eine leichte

Hypertrophie diagnostiziert. Die Behandlung mit 500 mg/kg KG Valproinsäure erzeugte eine verstärkte Hypertrophie bei allen männlichen Ratten bis zu moderaten Befunden. Außerdem zeigten vier von sechs Tieren minimale Ausprägungen von Vakuolen. Erneut erwiesen sich weibliche Ratten auch in diesem Dosisbereich als weniger sensitiv; lediglich vier von sechs Tieren wiesen minimale Ausprägungen einer Hypertrophie und einer Vakuolenbildung auf. Die durch Valproinsäure ausgelöste Hypertrophie bei Ratten wurde mit einer mikrosomalen Enzyminduktion assoziiert (Maronpot, 2014). Die Ausbildung von Vakuolen ist ein erstes Indiz für eine Störung des Lipidmetabolismus in der Leber. Aufgrund der mild ausgeprägten Pathologie war eine klare Diagnose einer induzierten Steatose in dieser Studie jedoch nicht möglich (Thoolen *et al.*, 2010a). Die Analyse etablierter Serummarker ergab bei beiden Geschlechtern keinen Hinweis auf eine Leberschädigung. Die Befunde belegen das Fehlen einer Korrelation zwischen der klinischen Pathologie und Histologie. Die ausgewählte Valproinsäure-Dosierung erlaubte keine eindeutige histopathologische Verifizierung einer Steatose. Außerdem deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die etablierten Serummarker keine ausreichende Sensitivität für den Nachweis einer Lebertoxizität besitzen.

Die Analyse individueller Gallensäuren deckte einen signifikanten Anstieg der Lebergewebe-Konzentrationen von primären und konjugierten Gallensäuren in männlichen und weiblichen mit 500 mg/kg KG Valproinsäure behandelten Ratten auf. Diese Befunde korrelierten mit den histologischen Daten. Männliche Ratten zeigten einen signifikanten Anstieg von CA, GCA und GDCA im Lebergewebe. Gleichzeitig sanken die Gewebekonzentrationen von TDCA und TUDCA, was im Zusammenhang mit einer Akkumulation der primären und Glycin-konjugierten Gallensäuren auf einen erhöhten Abtransport dieser Konjugate hindeutet. Bei weiblichen Ratten stiegen die Gewebekonzentrationen von CDCA, GCA, GUDCA und GCDCA an. Ein Vergleich der GCA-Gewebekonzentrationen bei hohen Dosen von Valproinsäure und Amitriptylin (1,5 $\mu\text{mol/L}$ vs. 17 $\mu\text{mol/L}$) zeigt, dass die Valproinsäure-induzierte Lebertoxizität nur von einem minimalen Gallensäure-Konzentrationsanstieg begleitet wurde.

Die Analyse individueller Gallensäuren im Plasma ergab einen signifikanten Anstieg von GCA bei männlichen Ratten ab Tag 9 der Behandlung mit 500 mg/kg KG Valproinsäure. Dieses Ergebnis korrelierte gut mit den histologischen Befunden und der GCA-Gewebekonzentration bei den Tieren. Vermutlich führt die Valproinsäure-induzierte Leberzellschädigung zu einer Anreicherung von GCA im Lebergewebe und über einen vermehrten Abtransport auch zu erhöhten Plasmakonzentrationen. Die lediglich geringen bis moderaten hepatozellulären Veränderungen sind möglicherweise die Ursache dafür, warum Im Behandlungszeitraum in beiden Kompartimenten nur GCA eine signifikante Veränderung aufwies. Die weiblichen Ratten erwiesen

sich als sensitiver im Gallensäure-Plasma-*Profiling*. Weibliche Tiere zeigten signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von CA, CDCA, GCA, GCDCA, GDCA und MCA(a) an Tag 14. Dieser Befund ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, dass weibliche Tiere mildere histopathologische Befunde als die männlichen Ratten aufwiesen. Dennoch korrelierten die Ergebnisse der Plasmaanalyse mit den histologischen Befunden und den Gewebekonzentrationen von CDCA, GCA und GCDCA.

Die mit 500 mg/kg KG Valproinsäure behandelten männlichen Ratten zeigten diverse Veränderungen der Expression von den für die Gallensäure-Homöostase relevanten Genen. Bei den für die Gallensäure-Biosynthese essentiellen Genen fiel insbesondere die erhöhte Expression der Enzyme CYP7A1 sowie CYP8B1 und CYP27A1 auf. Im klassischen Gallensäure-Stoffwechselweg katalysiert CYP7A1 die 7 α -Hydroxylierung von Cholesterol. Dadurch entstehen die primären Gallensäuren CA und CDCA, wobei die Synthese von CA eine zusätzliche Hydroxylierung durch CYP8B1 am Steroidring erfordert. Die Aktivität von CYP8B1 bestimmt somit das Verhältnis von CA zu CDCA. Die Seitenkette der beiden primären Gallensäuren wird durch CYP27A1 oxidiert und gespalten (Schadt, et al., 2016). Zusätzlich führte die Valproinsäure-Exposition auch zu einer gesteigerten Expression des Enzyms ACOT8, das eine wichtige Rolle im peroxisomalen Metabolismus primärer Gallensäuren spielt und hier die Hydrolyse von CA-CoA und CDCA-CoA katalysiert (Hunt *et al.*, 2012). Bei den biliären Efflux-Transportern fiel eine verminderte Expression von MDR1 auf, woraus ein verminderter Gallensäure-Abtransport in die *Canaliculi biliferi* resultiert (Halilbasic *et al.*, 2013b). Gleichzeitig zeigte sich eine erhöhte Expression von ASBT. Dieser Transporter ist für die Gallensäure-Wiederaufnahme in die Hepatozyten zuständig (Schadt *et al.*, 2016). Die veränderte Expression der Gallensäure-Transporter passt zu dem Befund der Gallensäure-Anreicherung in den Hepatozyten (Abbildung 50). Bemerkenswert in diesem Kontext ist aber auch die gesteigerte Expression weiterer Efflux-Transporter wie MDR1 (biliärer Efflux) und MRP4 (basolateraler Efflux) unter Valproinsäure-Einfluss (Boyer, 2013). Eine mögliche Erklärung für diesen Befund besteht darin, dass die Hepatozyten das MDR3-Defizit und das ASBT-Überangebot durch eine verstärkte Expression anderer Efflux-Transporter auszugleichen versuchen, um einer Gallensäure-Anreicherung im Gewebe entgegenzuwirken. Konsistent zur erhöhten Expression von MRP4 wurden erhöhte Konzentrationen von GCA im Plasma nachgewiesen (Abbildung 50). Darüber hinaus war die Expression verschiedener Rezeptoren erhöht, die für die Gallensäure-Homöostase im Hepatozyten wichtig sind, wie PXR, SHP und HNF4 α . PXR inhibiert die Gallensäure-Biosynthese, SHP und HNF4 α regulieren die Expression von CYP7A1 (Schaap, et al., 2014).

Bei weiblichen, mit 500 mg/kg KG Valproinsäure behandelten Ratten traten in der Expressionsstudie weniger Veränderungen auf als bei den männlichen Tieren. Die detektierten Veränderungen betrafen Enzyme der Gallensäure-Biosynthese und der Efflux-Transporter. Wie bei männlichen Ratten zeigte sich eine gesteigerte Expression von CYP7A1 und CYP8B1 und zusätzlich von ACOX2. ACOX2 befindet sich im peroxisomalen Kompartiment der Hepatozyten und oxidiert den CoA-Ester am C27-Gallensäure-Intermediat (Ferdinandusse, et al., 2006). Die erhöhte Expression von Genen mit einer Rolle in der Biosynthese von Gallensäuren ist konsistent zur analytisch nachgewiesenen erhöhten Gewebekonzentration von CDCA, GCA, GCDCA und GUDCA (Abbildung 52). Die Expression des biliären Efflux-Transporter MDR1 war dagegen dosisabhängig gehemmt. Die daraus resultierende Reduktion des Gallensäure-Abtransports in die *Canaliculi biliferi* korrespondiert mit der Anreicherung verschiedener Gallensäuren im Lebergewebe der Weibchen (Abbildung 52). Die erhöhte Expression der Efflux-Transporter BCRP, MRP3 und MRP4 deutet auf einen Versuch des Organismus hin, der Gallensäure-Anreicherung im Lebergewebe entgegenzuwirken. Konsistent damit ist eine Konzentrationserhöhung von Gallensäuren im Plasma wie z. B. von CA, CDCA, GCA (Abbildung 52).

In der tierexperimentellen Studie wurde Valproinsäure als Modellsubstanz zur Induktion einer mikrovesikulären Steatose in männlichen und weiblichen Ratten benutzt. Zusammenfassend wurde durch die Applikation von Valproinsäure eine histopathologisch nachgewiesene Hypertrophie in den behandelten Tieren induziert. Die klinisch-chemischen Biomarker konnten diese Veränderungen in der Leber nicht detektieren. Die quantitative Analyse von Gallensäuren in Plasma und Leberhomogenat zeigte signifikante Veränderungen in beiden Geschlechtern und damit gleichzeitig eine höhere Sensitivität als die klinisch-chemischen Biomarker. Die Transkriptionsanalyse von relevanten Genen des Metabolismus von Gallensäuren zeigte Veränderungen in der Genexpression, die mit den veränderten Gallensäure-Profilen korrelierten.

3.6 Einfluss von Amitriptylin auf das Gallensäure-Profil in Ratten

In der folgenden tierexperimentellen Studie wurde Amitriptylin als Modellsubstanz für die Induktion einer makrovesikulären Steatose in Ratten benutzt. Männliche und weibliche Han-Wistar-Ratten wurden 14 Tage täglich oral mit Amitriptylin (30 mg/kg KG, 75 mg/kg KG, 150 mg/kg KG) oder 0,9 %iger Kochsalzlösung (Vehikel) behandelt.

Die Behandlung mit Amitriptylin erfolgte ursprünglich in den Dosierungen 30 mg/kg KG (niedrige Dosis), 75 mg/kg KG (mittlere Dosis) und 150 mg/kg KG (hohe Dosis). Bedingt durch starke Nebenwirkungen in der Hochdosis-Gruppe der weiblichen Ratten, die im Sinne des Tierwohls den Ausschluss einzelner weiblicher Tiere aus der Studie verlangte, wurde die Behandlung in der Hochdosis-Gruppe auch für die männlichen Tiere kurzzeitig (2 Tage) ausgesetzt und anschließend wie geplant fortgeführt. In der Hochdosis-Gruppe der Weibchen wurde nach dem Auftreten der Nebenwirkungen an Tag 2 die Dosis von 150 auf 50 mg/kg KG reduziert. Somit ergab sich bei den weiblichen Ratten ab Tag 2 ein Behandlungsschema von 30 mg/kg KG (niedrige Dosis), 50 mg/kg KG (mittlere Dosis) und 75 mg/kg KG (hohe Dosis). Ausgewertet wurden bei den weiblichen Ratten ausschließlich die Ergebnisse mit 30 mg/kg KG und 75 mg/kg KG Amitriptylin, da hier eine kontinuierliche Dosierung vorlag.

Aufgrund der starken Effekte in der Hochdosis-Gruppe der männlichen Ratten wurden die Tiere bereits an Tag 9 vorzeitig seziiert. Aufgrund der vorzeitigen Beendigung der Hochdosis-Gruppen wurde keine *Recovery*-Gruppe gebildet. An den Behandlungstagen 2, 9 und 14 wurde den Tieren zur Bestimmung der Serummarker und der Gallensäure-Plasmakonzentrationen Blut entnommen. An Tag 14 wurden die restlichen Tiere seziiert. Bis auf die beschriebenen Unterbrechungen wurde Amitriptylin über 14 Tage täglich oral appliziert.

3.6.1 Histopathologie

Aufgrund der Literaturstudien zu Amitriptylin, die zur Auswahl der Dosis und des Behandlungszeitraums herangezogen wurden, war eine zunehmende Akkumulation von Vakuolen in den Hepatozyten (Steatose) der behandelten Ratten zu erwarten (Sahini, et al., 2014).

Die histopathologische Bewertung ergab bei den männlichen Ratten schon unter Niedrigdosis-Exposition minimale Befunde einer Akkumulation von Vakuolen im Hepatozyten. Bei der mittleren Dosis waren doppelt so viele Tiere betroffen. Bei den Ratten aus der Hochdosis-Gruppe waren die Befunde am deutlichsten – alle Tiere hatten Einlagerungen von Vakuolen in Hepatozyten (Tabelle 66). Die mikroskopischen Befunde wurden als behandlungsabhängig eingestuft. Bei den

weiblichen Ratten bildeten sich lediglich in der Hochdosis-Gruppe in drei von sechs Tieren Vakuolen (Tabelle 66). Das Lebergewebe von Ratten wurde nachträglich mit dem Lipidfarbstoff Ölrot behandelt, um potentiell eingelagerte Triglyzeride in den Vakuolen nachzuweisen. Dabei zeigten alle untersuchten Tiere einen positiven Befund (Abbildung 53). Auf der Grundlage der Befunde konnte in männlichen Ratten eine Amitriptylin-induzierte makrovesikuläre Steatose diagnostiziert werden. Bei den weiblichen Tieren gab es bei der Behandlung mit 75 mg/kg KG Amitriptylin erste Anzeichen einer Lipideinlagerung in der Leber. Aufgrund des fehlenden Dosiseffekts konnte keine abschließende Einstufung erfolgen. Abbildung 53 zeigt exemplarisch mikroskopische Leber-Ausschnitte von männlichen Tieren aus der Kontroll- und Hochdosis-Gruppe.

Tabelle 66 Häufigkeit hepatozellulärer Veränderungen (Steatose) in männlichen und weiblichen Ratten nach der Behandlung mit Amitriptylin (Männlich: ♂, Weiblich: ♀).

Dosis	♂				♀			
	0 KG	mg/kg 30 KG	mg/kg 75 KG	mg/kg 150 KG	mg/kg 0 KG	mg/kg 30 KG	mg/kg 75 KG	mg/kg KG
Anzahl der Tiere	6	6	6	6	6	6	6	
Grad 1	-	2	1	-	-	-	2	
Grad 2	-	-	2	-	-	-	1	
Grad 3	-	-	1	4	-	-	-	
Grad 4	-	-	-	2	-	-	-	
Inzidenz	-	2	4	6	-	-	3	
Grad (arithmetisches Mittel)	-	1,0	2,0	3,3	-	-	1,3	

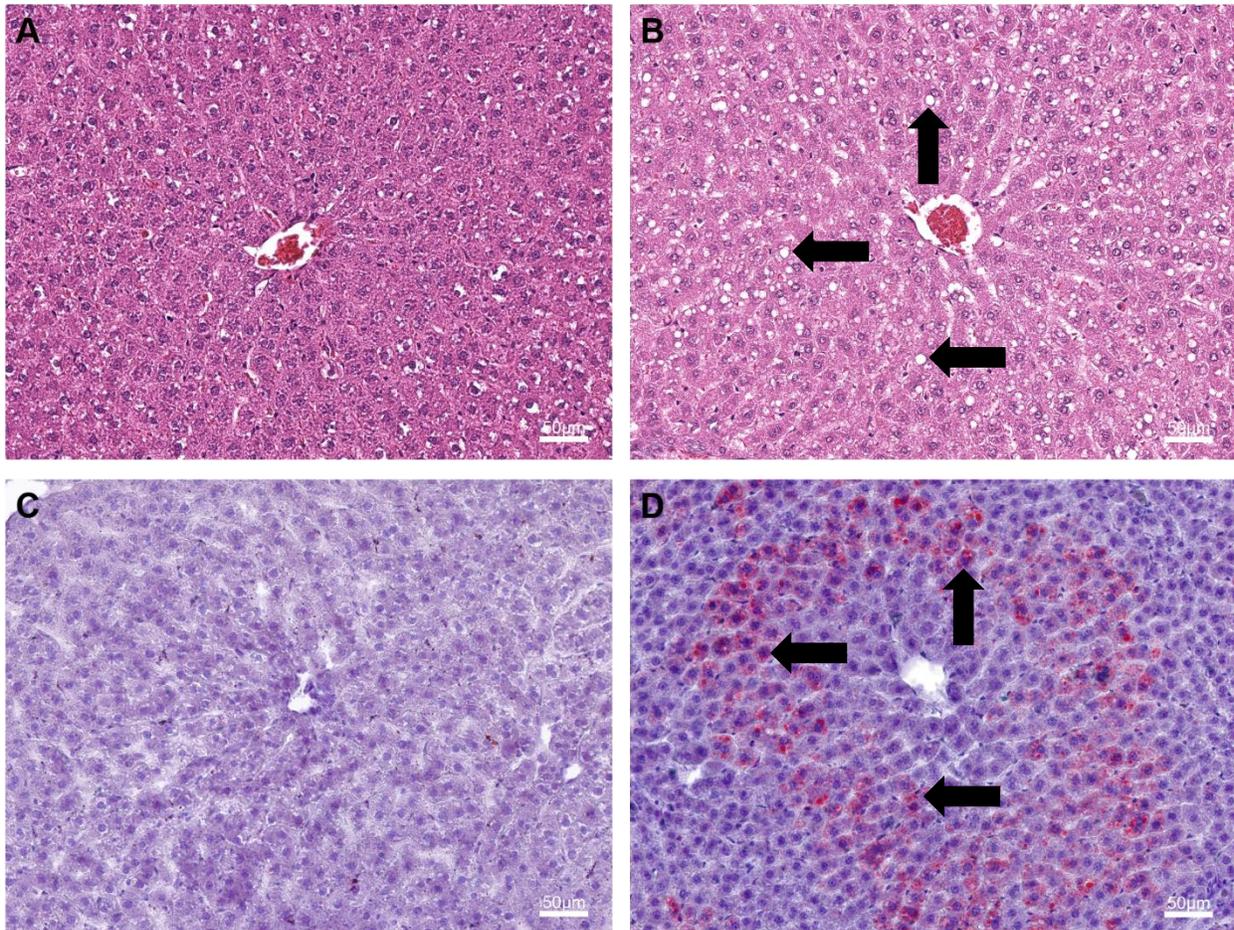


Abbildung 53 Leberschnitte von männlichen Ratten nach Hämatoxylin-Eosin Färbung (A-B) und Ölrot-Färbung (C-D). (A) Kontroll-Gruppe: keine Veränderungen (HE), (B) Hochdosis-Gruppe (150 mg/kg KG): Vakuolen mit Pfeilen markiert (HE), (C) Kontroll-Gruppe: keine Veränderung (Ölrot), (D) Hochdosis-Gruppe (150 mg/kg KG): Einlagerung von Lipiden mit Pfeilen markiert (makrovesikuläre Steatose) (Ölrot). Die Aufnahmen wurden 20-fach vergrößert mit einer Skalierung von 50 µm. Abkürzung: HE - Hämatoxylin-Eosin.

3.6.2 Klinische Chemie

Die Aktivitätsmessung der etablierten Serummarker für Lebertoxizität zeigte keinen Hinweis für eine hepatozelluläre Schädigung. Die Enzyme ASAT und APh waren bei den Männchen in der Hochdosis-Gruppe an Tag 9 (Versuchsende, siehe oben) signifikant erniedrigt, wohingegen bei den Weibchen in der höchsten Dosis an Tag 14 eine signifikante Erhöhung von ALAT zu beobachten war (Abbildung 54). Eine Korrelation mit den histologischen Befunden war nicht erkennbar. Auch die Analyse von Triglyzeriden im Serum zeigte keine signifikanten Veränderungen nach der Amitriptylin-Behandlung (Anhang-Tabelle A 12).

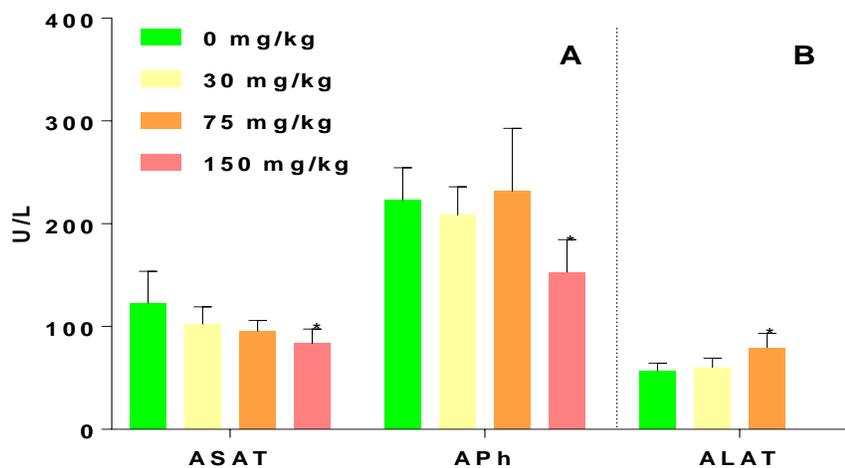


Abbildung 54 Serummarker in (A) männlichen und (B) weiblichen Ratten nach Behandlung mit Amitriptylin. Die Ergebnisse sind als MW \pm SD dargestellt (n=6 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

3.6.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber

Die Amitriptylin-Behandlung führte bei allen männlichen Ratten zu einem statistisch signifikanten, dosis-abhängigen Anstieg der Konzentration von GCA und GCDCA. Für GDCA konnte eine signifikant erhöhte Konzentration in den Behandlungsgruppen 30 mg/kg KG und 150 mg/kg KG detektiert werden (Abbildung 55). Dagegen sank die Konzentrationen von MCA(a) signifikant in der Hochdosis-Gruppe (Abbildung 55).

Die Ergebnisse der multivariaten Datenanalyse korrelierten mit den Resultaten der univariaten Auswertung. Bei den Tieren mit histopathologisch bestätigter makrovesikulärer Steatose (Abbildung 56 A) war eine Erhöhung der Gallensäure-Konzentration (GCA, GCDCA und GDCA) erkennbar (Abbildung 56 B). In der univariaten Analyse zeigten die Taurocholate (TUDCA, TLCA und TCDCA) keine signifikanten Veränderungen. In der multivariaten Analyse bei Berücksichtigung des Gesamtprofils war dagegen die Veränderung einzelner Taurocholate nach der Amitriptylin-Behandlung deutlich erkennbar (Abbildung 56 A und B).

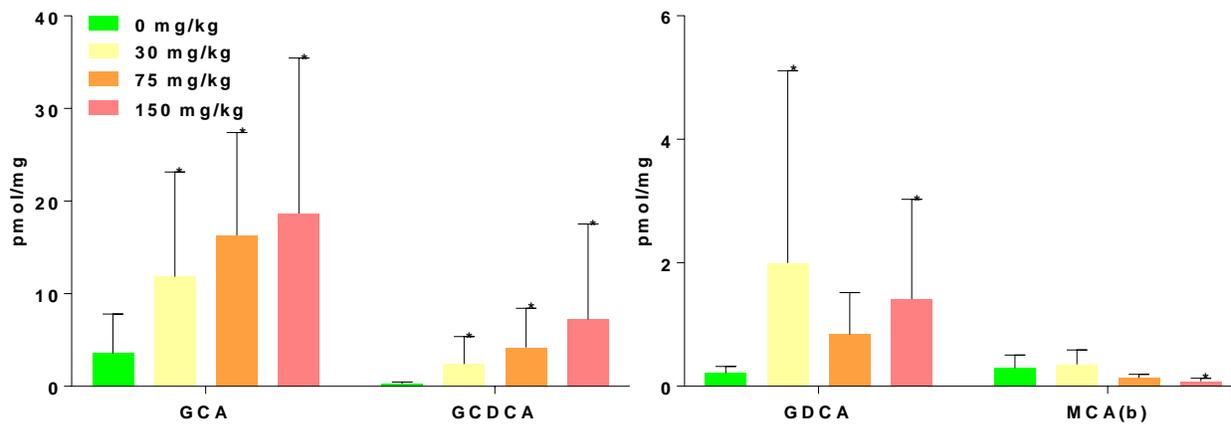


Abbildung 55 Gallensäure-Konzentrationen im Lebergewebe männlicher Ratten unter Amitriptylin-Exposition (Tag 9). Dargestellt sind MW \pm SD (n=6 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05

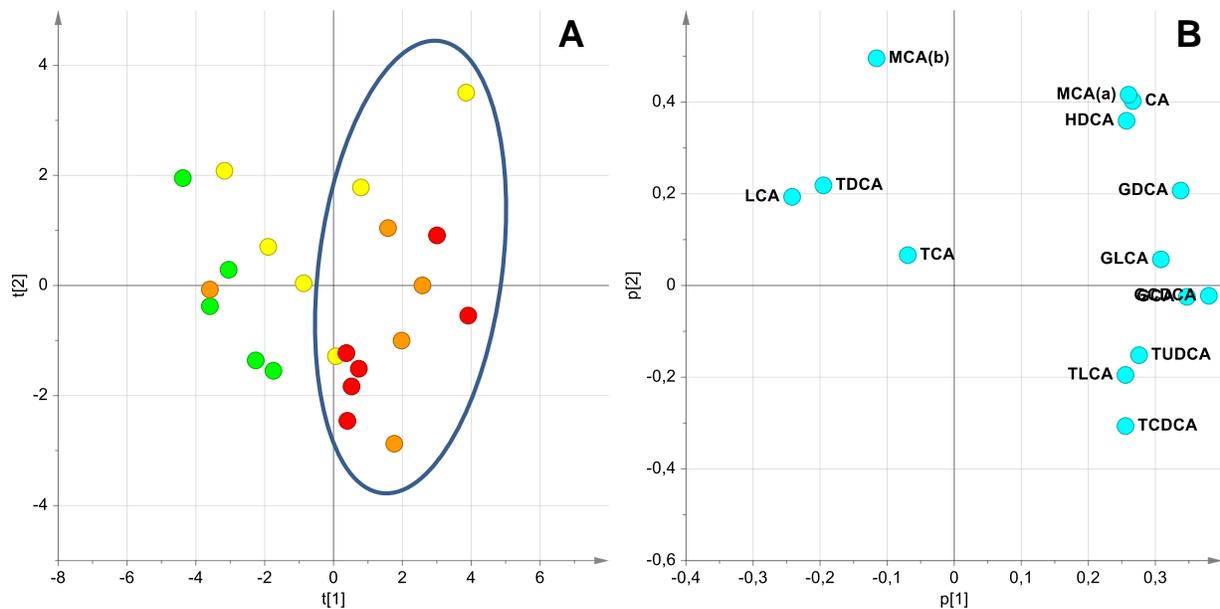


Abbildung 56 PCA der Gallensäure-Profile im Lebergewebe männlicher Ratten nach Amitriptylin-Exposition. (A) Score Scatter Plot mit [grün] Kontrolle, [gelb] 30 mg/kg KG, [orange] 75 mg/kg KG an Versuchstag 14 und [rot] 150 mg/kg KG an Versuchstag 9 und (B) Loading Scatter Plot der Gallensäure-Konzentrationen, die für die Verteilung der Versuchstiere im Score Scatter Plot verantwortlich sind. Umrandung weist auf Ratten mit dem histopathologischen Befund einer makrovesikulären Steatose hin.

Unter Amitriptylin-Exposition wurde bei weiblichen Ratten eine dosis-abhängige Erhöhung der Konzentrationen der primären Konjugate GCA und GCDCA sowie ein Abfall der Konzentrationen von TCA und TCDCA ermittelt. Gleichzeitig zeigten sich auch erhöhte LCA-Konzentrationen in der Hochdosis-Gruppe im Lebergewebe. Für die Glycin-konjugierte Form GLCA wurde ein dosis-

abhängiger Anstieg verzeichnet und für TLCA ein dosis-abhängiger Abfall (Abbildung 57 B). Auch weitere Glycin- und Taurin-konjugierte Formen der sekundären Gallensäuren DCA zeigten eine analoge dosis-abhängige Erhöhung bzw. Erniedrigung (Abbildung 57 B-1). Alle beschriebenen Änderungen erreichten in der Hochdosis-Gruppe statistische Signifikanz.

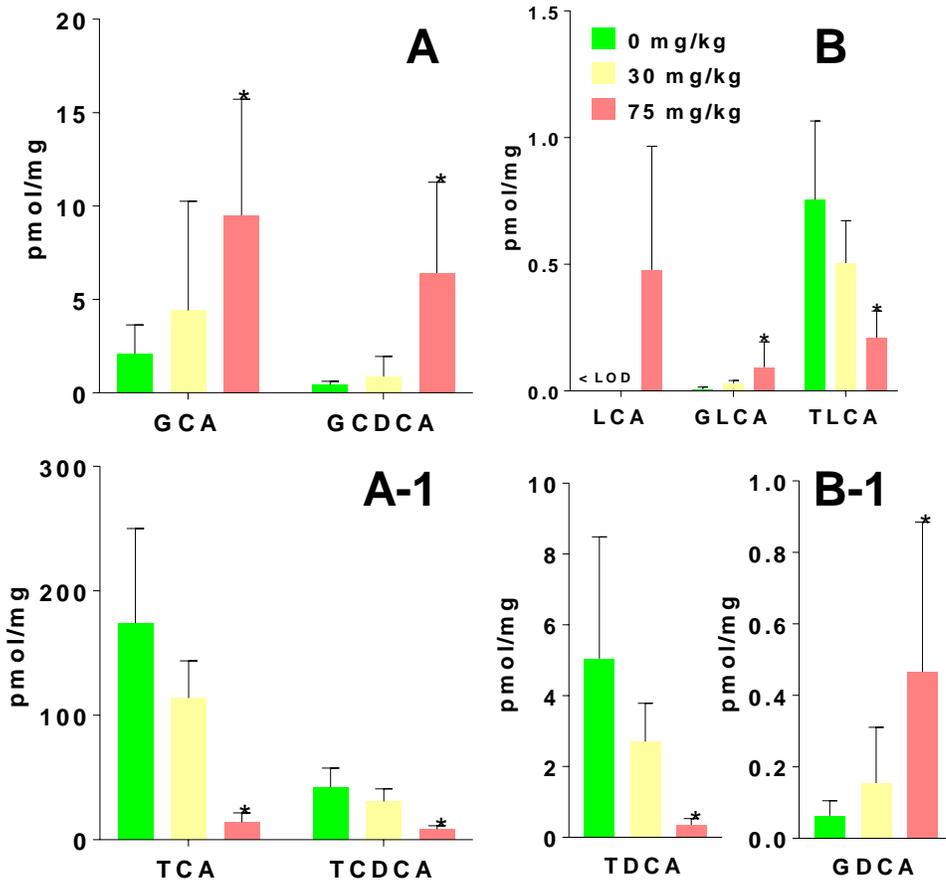


Abbildung 57 Gallensäure-Konzentrationen im Lebergewebe weiblicher Ratten unter Amitriptylin-Exposition (Tag 14). Dargestellt sind MW \pm SD (n=6 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: *p < 0,05.

Die Ergebnisse der multivariaten Datenanalyse der Gallensäure-Profile im Lebergewebe weiblicher Ratten stimmten mit den Resultaten der univariaten Statistik überein. Im *Score Scatter Plot* waren ein deutliches *Clustering* der einzelnen Versuchsgruppen und eine leichte Dosis-Abhängigkeit zu erkennen. Die größte Varianz war anhand der Streuung entlang t[1] zwischen der Kontroll- und Hochdosis-Gruppe sichtbar. Aus dem *Loading Scatter Plot* konnte entnommen werden, dass für die Separation der beiden Gruppen vor allem die Erhöhung der Glycin-konjugierten Gallensäuren GDCA > GCA > GDCA > GLCA und die Erniedrigung der Taurin-

konjugierten Gallensäuren TDCA>TCA>TCDCA>TLCA verantwortlich waren (Anhang-Abbildung A1).

3.6.4 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma

Die Behandlung männlicher Ratten mit Amitriptylin hatte vor allem in der Hochdosis-Gruppe (150 mg/kg KG) eine starke Veränderung der Gallensäure-Homöostase zur Folge. Abbildung 58 zeigt exemplarisch die erhöhten Konzentrationen der zwei am stärksten durch eine Amitriptylin-Exposition veränderten Gallensäuren CA und CDCA zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten. Signifikant erhöhte Konzentrationen von CA und CDCA traten ab Tag 2 in der Hochdosis-Gruppe, ab Tag 9 in der Gruppe mit der mittleren Dosis und an Tag 14 in der Niedrigdosis-Gruppe auf (Abbildung 58). Gleichzeitig waren erhöhte Konzentrationen ab Tag 9 bei GCA, GCDCA und GDCA zu verzeichnen, die parallel mit einer Erniedrigung der Konzentrationen von TCA und TDCA einhergingen und in der Hochdosis-Gruppe am stärksten ausgeprägt waren (Abbildung 59).

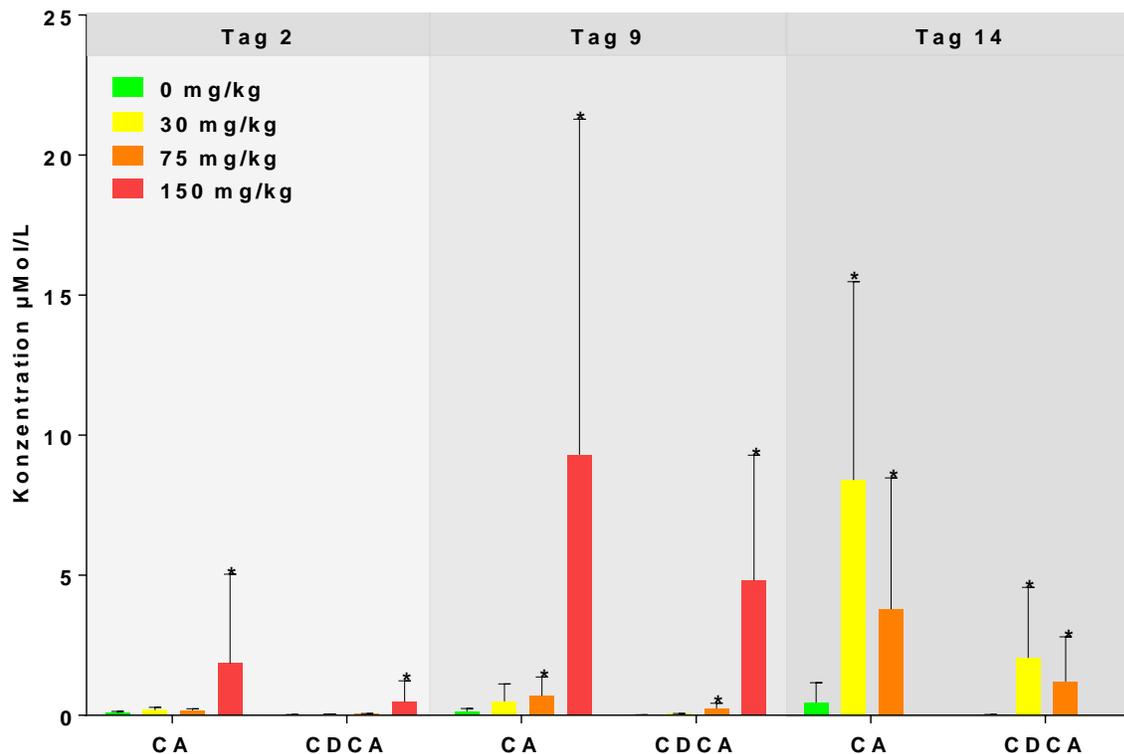


Abbildung 58 Plasmakonzentrationen der primären Gallensäuren CA und CDCA bei männlichen Ratten unter Amitriptylin-Exposition. Dargestellt sind MW \pm SD (n=5 bzw. 6 pro Gruppe) für die Studientage 2, 9 und 14. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

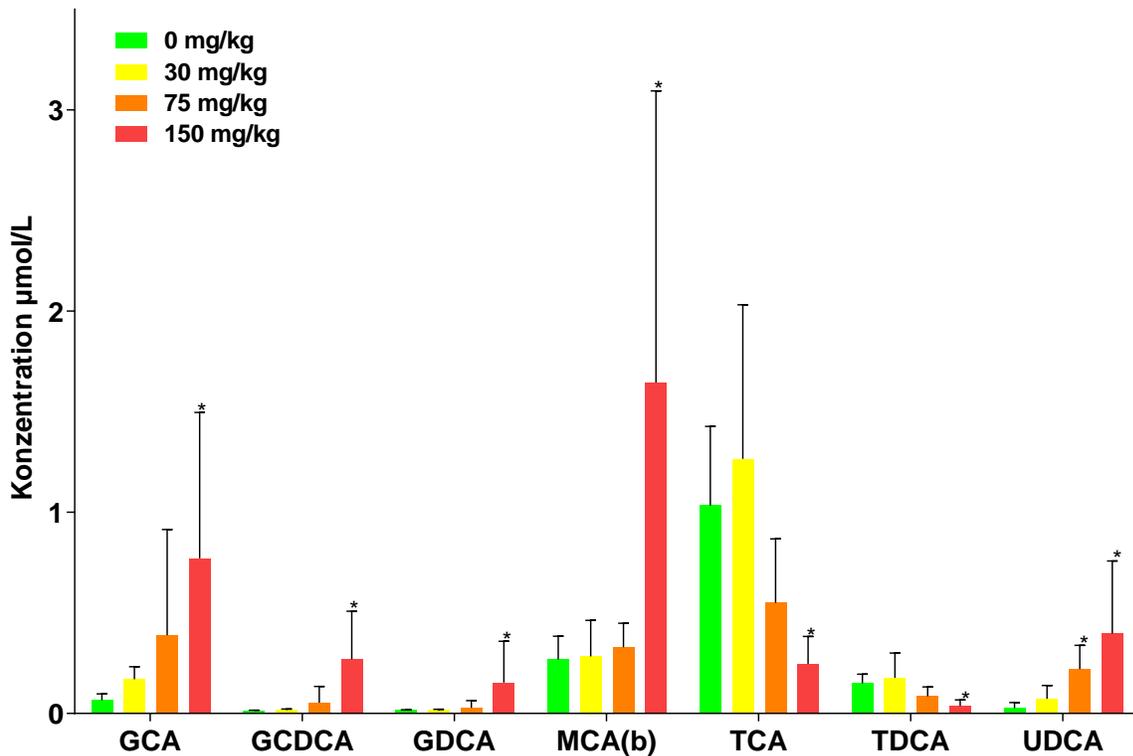


Abbildung 59 Plasmakonzentrationen der konjugierter Gallensäuren und MCA(b) bei männlichen Ratten unter Amitriptylin-Exposition. Dargestellt sind MW \pm SD (n=5 bzw. 6 pro Gruppe) für die Studientag 9. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

Bei weiblichen Ratten erzeugte vor allem die Applikation von 75 mg/kg KG Amitriptylin eine starke Veränderung der Gallensäure-Homöostase. In Abbildung 60 ist der zeitliche Verlauf der Zunahme der Gallensäuren CA/CDCA dargestellt. Gleichzeitig war ein Konzentrationsanstieg ab Tag 9 bei GCA, GCDCA und GDCA zu verzeichnen und eine Erniedrigung der Konzentrationen von TCA und TMCA(a+b) bei der Behandlung mit 75 mg/kg KG Amitriptylin (Abbildung 60). Die Gallensäure-Profile beider Geschlechter wiesen deutliche Parallelen auf.

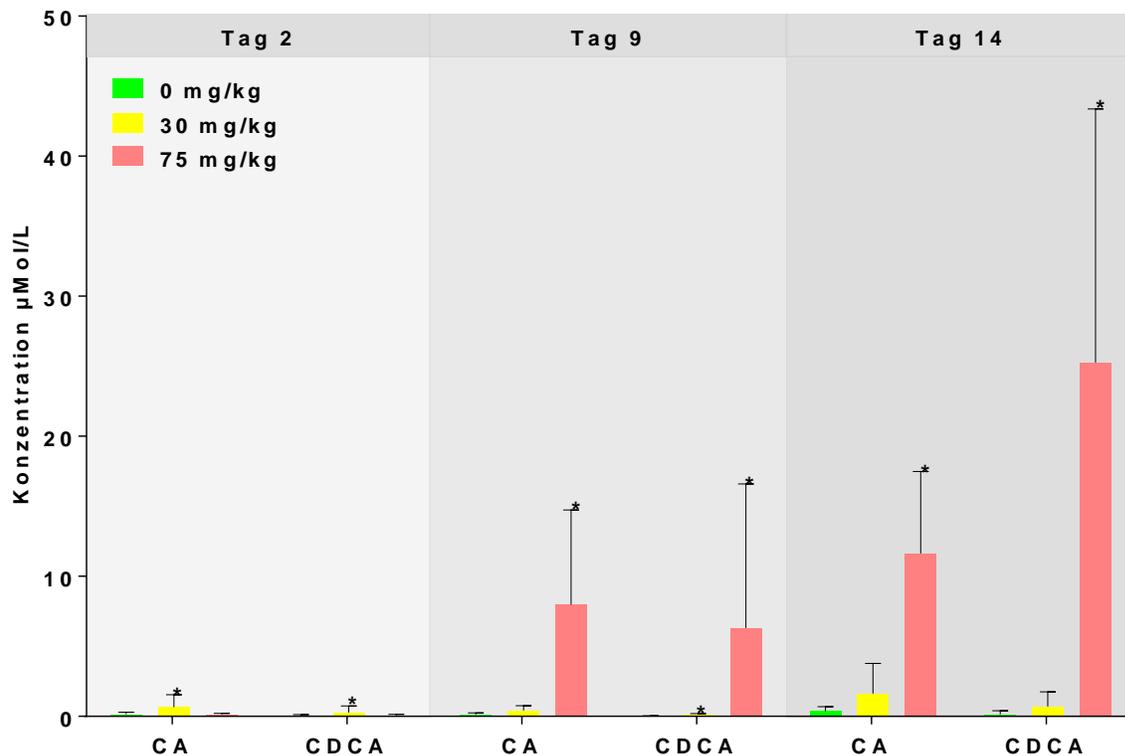


Abbildung 60 Plasmakonzentrationen der primären Gallensäuren CA und CDCA bei weiblichen Ratten unter Amitriptylin-Exposition. Dargestellt sind MW \pm SD (n=6 pro Gruppe) für die Studientage 2, 9 und 14. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

Auch bei der PCA der Daten aus männlichen Ratten waren die veränderten Gallensäure-Konzentrationen unter Amitriptylin-Exposition besonders an Tag 9 gut zu erkennen (Abbildung 61 A). Der Anstieg betraf GCA, GCDCA und GDCA und weitere Gallensäuren wie CA, CDCA und MCA(a) (Abbildung 61 B). Die Ergebnisse der multivariaten Datenanalyse der weiblichen Ratten korrelierten mit den Resultaten der univariaten Statistik. Beide Geschlechter zeigten vergleichbare Gallensäure-Profile (Anhang-Abbildung A1 und Anhang-Abbildung A3).

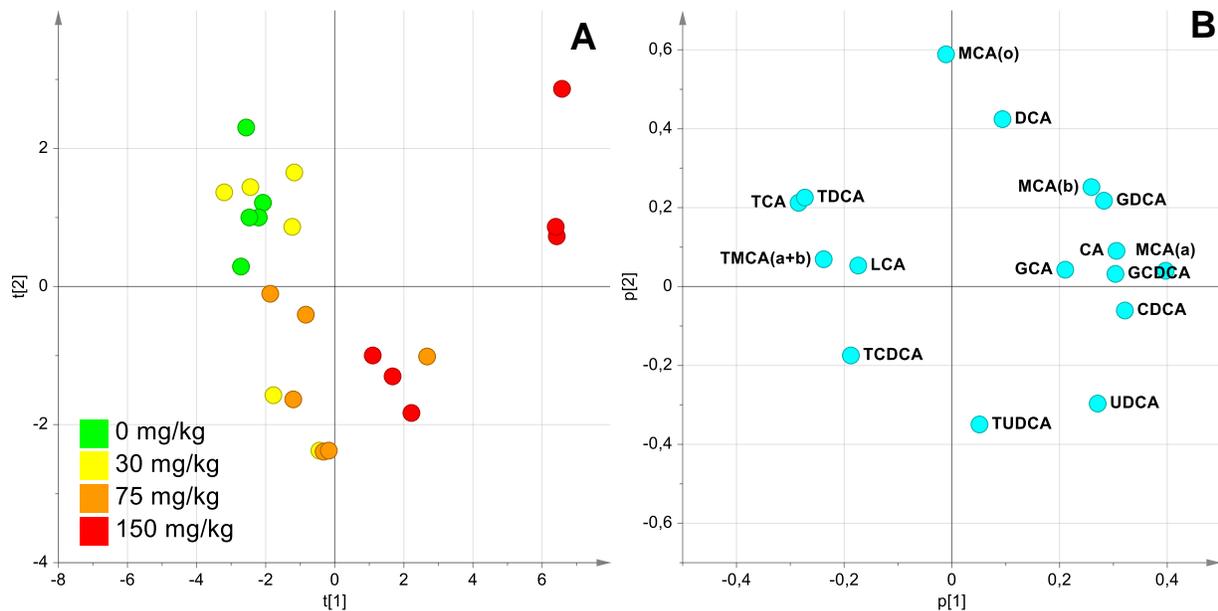


Abbildung 61 PCA der Gallensäure-Profile im Plasma männlicher Ratten unter Amitriptylin-Exposition an Tag 9 (A, B). (A) *Score Scatter Plots* [grün] Kontrolle, [gelb] 30 mg/kg KG, [orange] 75 mg/kg KG, [rot] 150 mg/kg KG, Tag 2 (B) *Loading Scatter Plots* der Gallensäure-Konzentrationen, die für die Verteilung der Versuchstiere in den *Score Scatter Plots* verantwortlich sind.

3.6.5 Untersuchung der Genexpression des Gallensäure-Metabolismus im Lebergewebe

Die Daten der Expressionsanalyse von Genen, die wichtig für die Gallensäure-Homöostase sind, wurden in der Form einer *Heat Map* dargestellt. Männliche Ratten, die mit einer Dosis von 75 mg/kg KG Amitriptylin behandelt wurden, zeigten eine erhöhte Expression der Gene, die für die Gallensäure-Efflux-Transporter MDR1 (erhöhter Efflux in die *Canaliculi biliferi*) und MRP3 (erhöhter Abtransport ins Blut) codieren. Bei mit 150 mg/kg KG Amitriptylin behandelten Ratten trat eine geringfügig gesteigerte Expression von Genen, die in die Gallensäure-Biosynthese (AMACR, CYP7A1, CYP8B1) involviert sind, auf. Die Expression von Genen des Gallensäure-Transports (MDR1, MRP3) war in der Gruppe massiv erhöht. Dagegen war die Genexpression des Transportproteins ASBT deutlich reduziert. Auch die Expression des Effluxtransporters in die *Canaliculi biliferi*, BCRP, war in der 150 mg/kg KG Behandlung leicht geringer (Abbildung 62, Abbildung 63).

Bei den mit 30 mg/kg KG Amitriptylin behandelten weiblichen Ratten zeigte eine minimale Abnahme der Expression von BCRP eine Veränderung im Gallensäure-Transport in die *Canaliculi biliferi* an. Bei den Tieren der Hochdosis-Gruppe (75 mg/kg KG) kam es zu einer leichten Induktion der Expression von Genen mit regulatorischen Funktionen in der Gallensäure-Biosynthese und

im Gallensäure-Transport (PPAR α , PPAR γ). Auch die erhöhte Expression des Gens SHP gibt erste Hinweise für einen Effekt von Amitriptylin auf die Gallensäure-Biosynthese (Abbildung 64, Abbildung 65).

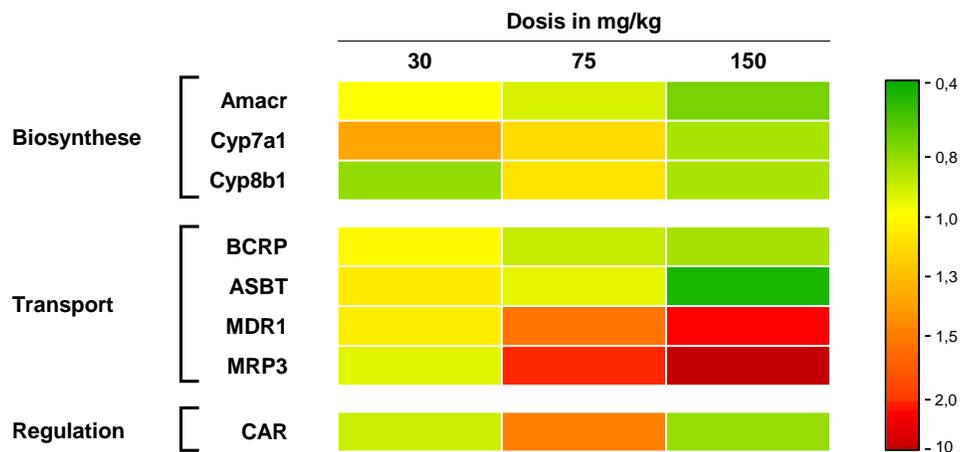


Abbildung 62 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Amitriptylin-Exposition in männlichen Ratten (n=6 pro Gruppe). 0 mg/kg KG [Kontrolle], 30 mg/kg KG [niedrige Dosis], 75 mg/kg KG [mittlere Dosis], 150 mg/kg KG [hohe Dosis]. In der *Heat Map* ist das arithmetische Mittel der relativen Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) dargestellt.

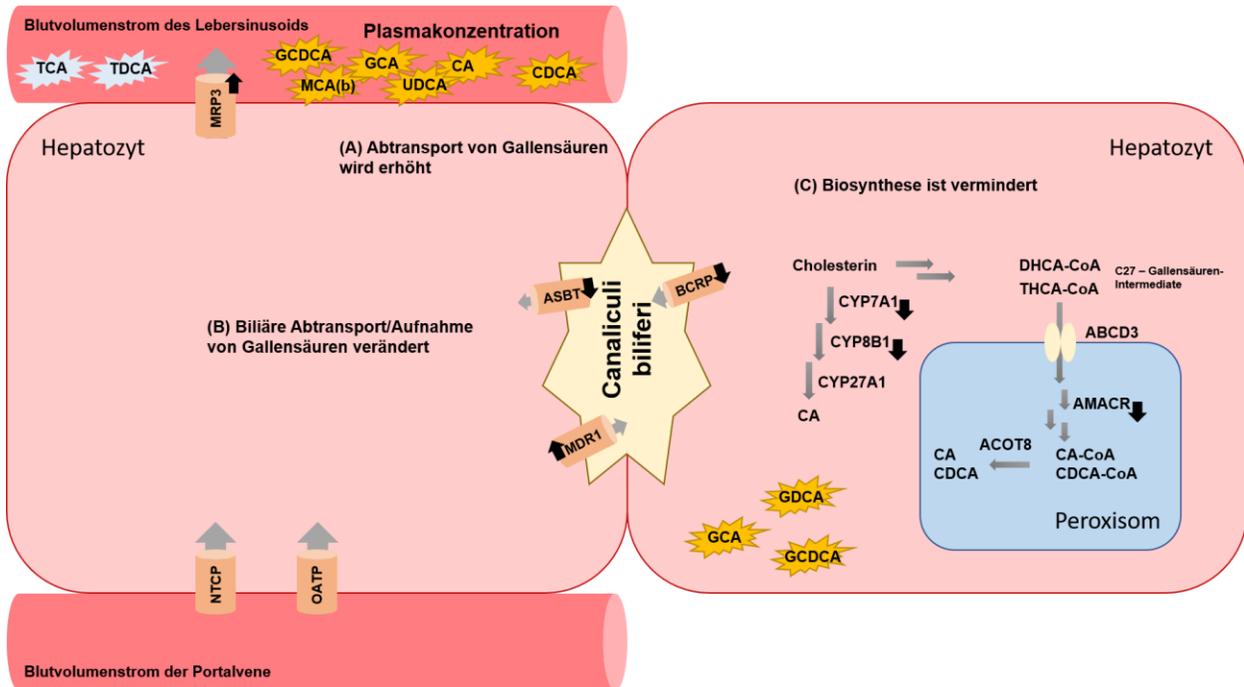


Abbildung 63 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Amitriptylin in männlichen Ratten. Die Abbildung spiegelt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und des Gallensäure-Profilings der Hochdosis-Gruppe (150 mg/kg KG) wider. Hierbei wurde auf der rechten Seite der peroxisomale Biosyntheseschritt von Gallensäuren vereinfacht dargestellt und diejenigen Gene wurden mit einem schwarzen Pfeil markiert, deren Transkription signifikant erhöht oder erniedrigt war. Die Richtung des Pfeils symbolisiert dabei den Anstieg oder die Erniedrigung der Transkriptionsrate. Analog sind auf der linken Seite die Transportsysteme vereinfacht dargestellt. Gelb-markierte Gallensäuren stellen einen analytisch nachgewiesenen Konzentrationsanstieg der jeweiligen Gallensäuren dar. Auszüge dieser Darstellung sind angelehnt an (Baes, et al., 2016; Ferdinandusse, et al., 2006).

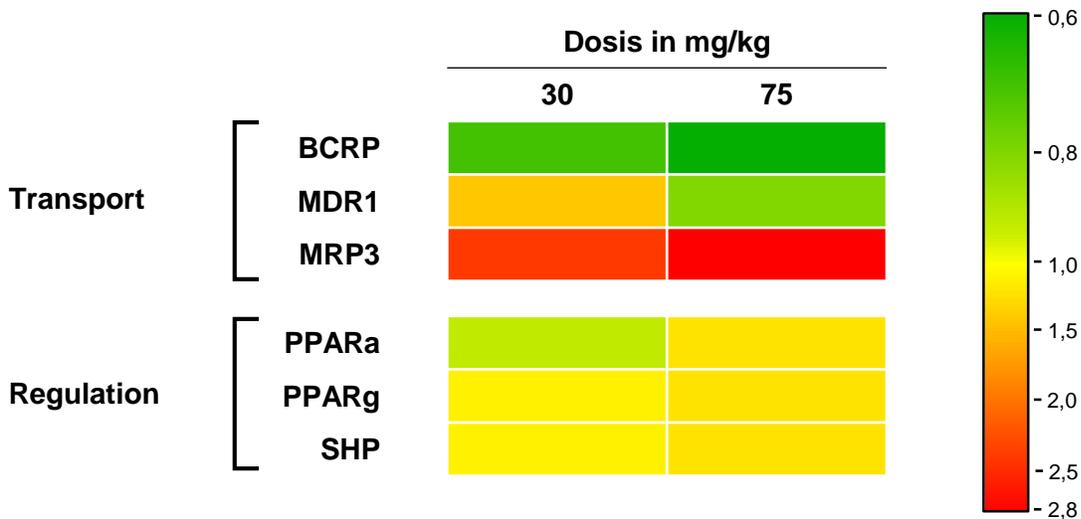


Abbildung 64 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Amitriptylin-Exposition in weiblichen Ratten (n=6 pro Gruppe). 0 mg/kg KG [Kontrolle], 30 mg/kg KG [niedrige Dosis], 75 mg/kg KG [mittlere Dosis], 150 mg/kg KG [hohe Dosis]. In der Heat Map ist das arithmetische Mittel der relativen Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) dargestellt.

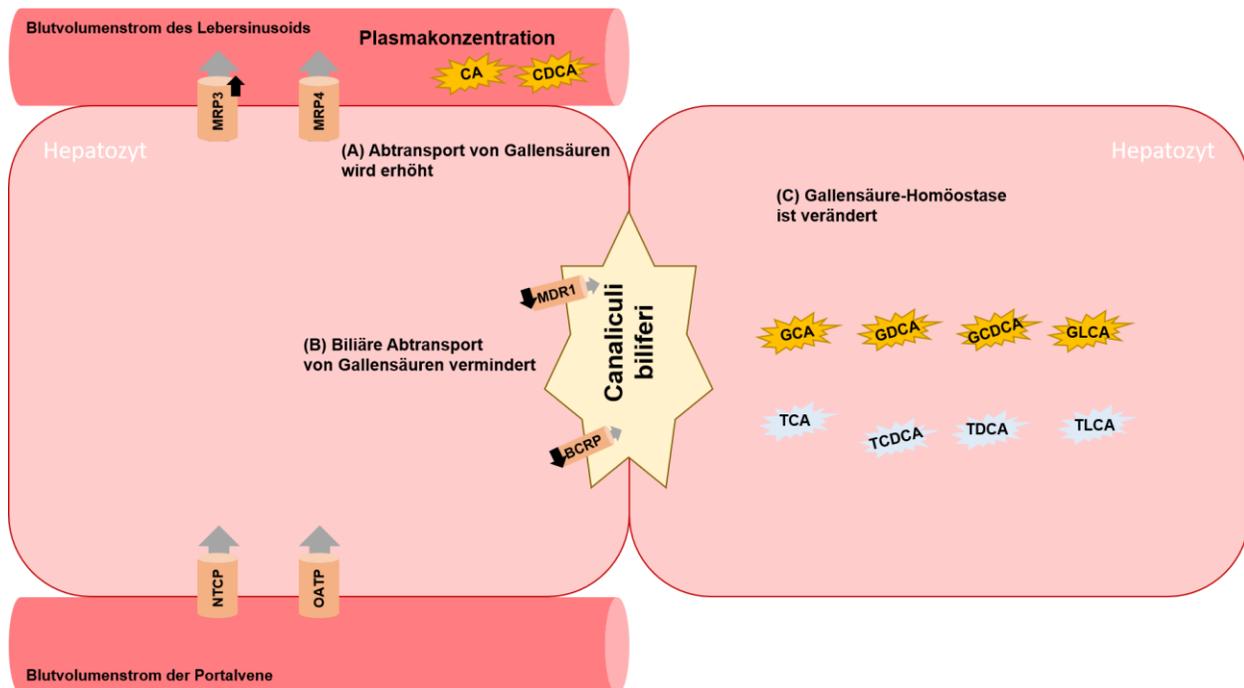


Abbildung 65 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Amitriptylin in weiblichen Ratten. Die Abbildung spiegelt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und des Gallensäure-Profilings der Hochdosis-Gruppe (150 mg/kg KG) wider. Hierbei wurde auf der rechten Seite der peroxisomale Biosyntheseschritt von Gallensäuren vereinfacht dargestellt und diejenigen Gene wurden mit einem schwarzen Pfeil markiert, deren Transkription signifikant erhöht oder erniedrigt war. Die Richtung des Pfeils symbolisiert dabei den Anstieg oder die Erniedrigung der Transkriptionsrate. Analog sind auf der linken Seite die Transportsysteme vereinfacht dargestellt. Gelb-markierte Gallensäuren stellen einen analytisch nachgewiesenen Konzentrationsanstieg der jeweiligen Gallensäuren dar. Blau-markierte Gallensäuren verweisen auf eine analytisch bestätigte Konzentrationserniedrigung dieser Gallensäuren. Auszüge dieser Darstellung sind angelehnt an (Baes, et al., 2016; Ferdinandusse, et al., 2006).

3.6.6 Diskussion

Die hepatotoxische Wirkung des Antidepressivum Amitriptylin ist bislang noch nicht ausreichend untersucht. Der Wirkstoff wird hepatisch metabolisiert und schädigt die Leber möglicherweise über ein toxisches Arenoxid-Intermediat (Wen *et al.*, 2008; livertox.nlm.nih.gov, 2017). Wie bereits bei Valproinsäure beschrieben, ist eine Steatose klinisch schwer zu diagnostizieren. Daher ist die Evaluation von Gallensäuren als potentielle klinische Marker für Steatose von großer Bedeutung. In der vorliegenden Studie wurde Amitriptylin in drei Dosierungen (niedrige Dosis: 30 mg/kg KG, mittlere Dosis: 75 mg/kg KG, hohe Dosis: 150 mg/kg KG) verabreicht. Die histologische Auswertung ergab, dass der Arzneistoff dosisabhängig bei männlichen Tieren eine makrovesikuläre Steatose induziert. Weibliche Ratten zeigten dagegen nur minimale Veränderungen (Lipideinlagerung) bei hoher Dosierung (75 mg/kg KG). Von den etablierten Serummarkern reagierten in männlichen Ratten ASAT und APh bei 150 mg/kg KG Amitriptylin

mit einer signifikanten Abnahme. Weibchen zeigten eine signifikant erhöhte ALAT-Aktivität bei einer Behandlung mit 75 mg/kg KG. Der Vergleich mit historischen Referenzwerten aus der Datenbank der klinischen Pathologie ergab, dass die analysierten Veränderungen der Serummarker innerhalb der physiologischen Variabilität lagen. Damit bestand keine Korrelation zwischen den klinisch pathologischen und histopathologischen Befunden.

Der dosis-abhängige signifikante Anstieg der GCA- und GCDCA-Gewebekonzentrationen in männlichen Ratten korrelierte dagegen mit den histopathologischen Befunden. Damit sind GCA und GCDCA vielsprechende Kandidaten für die Diagnose einer Wirkstoff-induzierten Steatose. Andere Gallensäuren, wie GDCA und MCA(b), zeigten signifikante Veränderungen der Konzentrationen im Lebergewebe einzelner Behandlungsgruppen, aber keine klare Dosis-Abhängigkeit. Dennoch sind auch diese Gallensäuren als potentielle Kandidaten für eine Beurteilung der Wirkstoff-induzierten Steatose zu betrachten. Bei weiblichen Ratten stiegen die Gewebekonzentrationen Glycin-konjugierter Gallensäuren, wie GCA, GCDCA, GDCA und GLCA, dosis-abhängig an; gleichzeitig sanken die Konzentrationen von TCA, TCDCA, TDCA und TLCA dosis-abhängig ab. Beide Effekte waren bei 75 mg/kg KG Amitriptylin signifikant. Außerdem zeigte sich ein LCA-Anstieg im Lebergewebe der Hochdosisgruppe. LCA gehört zu den sekundären Gallensäuren, die im Gastrointestinaltrakt durch das Mikrobiom gebildet werden (Schadt *et al.*, 2016). In der Leber zirkulieren nur geringe Konzentrationen, die umgehend sulfatiert und in die *Canaliculi biliferi* abtransportiert werden (Chiang, 2013). LCA wirkt in höheren Konzentrationen hepatotoxisch und karzinogen, sodass das hepatobiliäre System durch eine Akkumulation erheblich beeinträchtigt werden kann (Alnouti, 2009). Aufgrund des nicht erfüllten Akzeptanzkriteriums zur Präzision und der höheren Variabilität in den unteren Standardkonzentrationen ist LCA im Leberhomogenat für eine quantitative Aussage zu einem biologischen Effekt ungeeignet. Die erhöhten Konzentrationen von LCA im Leberhomogenat sind eine interessante Beobachtung, da LCA in experimentellen Studien selten eine Veränderung zeigte. Durch eine optimierte Chromatographie für LCA könnte in Zukunft eine bessere Aussage zu veränderten Gewebekonzentrationen in der Leber getroffen werden.

Die Ergebnisse der Gallensäure-Profile im Plasma beider Geschlechter zeigten parallele Anstiege von Konzentrationen primärer Gallensäuren CA und CDCA ab Tag 2 der Behandlung. Die Konzentrationen Glycin-konjugierter Gallensäuren, wie GCA, GCDCA und GDCA, erhöhten sich ebenfalls im Plasma bei beiden Geschlechtern dosis-abhängig. Dagegen nahmen Taurin-konjugierte Gallensäuren, wie TCA, TDCA (Männchen) und TCA, TMCA(a+b) (Weibchen), im Plasma ab.

Möglicherweise ist daher am ehesten eine Kombination von primären und konjugierten Gallensäuren geeignet, eine Steatose zu identifizieren. Von besonderer Relevanz ist in diesem Kontext das spezifische Muster der konjugierten Gallensäuren, dass sich durch einen Anstieg der Konzentrationen von Glycin-konjugierten Gallensäuren und einer Senkung der Konzentrationen von Taurin-konjugierten Gallensäuren verzeichnet. Aufgrund dieses Musters sind Gallensäuren den konventionellen Serummarkern bei der Diagnose einer Steatose möglicherweise überlegen. Die mit 150 mg/kg KG Amitriptylin behandelten männlichen Ratten zeigten diverse Veränderungen der Expression von für die Gallensäure-Homöostase relevanten Genen. Neben einer erniedrigten Expression der Enzyme CYP7A1 und CYP8B1, die für die Synthese der primären Gallensäuren CA und CDCA zuständig sind, sank auch die AMACR-Expression ab. Dieses Enzym verkürzt im Rahmen der Biosynthese die Seitenketten von Gallensäure-Intermediaten, wodurch ausgereifte Gallensäuren entstehen (Autio *et al.*, 2014). Gleichzeitig wurde die hepatozelluläre Aufnahme von Gallensäuren durch eine verminderte Expression von ASBT reduziert, möglicherweise um eine weitere Anreicherung von Gallensäuren im Lebergewebe zu verhindern. Diese These wird durch die gesteigerte Expression von Transportern des biliären Efflux (MDR1) und des basolateralen Efflux (MRP3, ab 75 mg/kg KG Amitriptylin) ins Blut unterstützt. Die Expression des Rezeptors CAR erhöhte sich unter der Behandlung mit 75 mg/kg KG Amitriptylin leicht und sank bei der Erhöhung auf 150 mg/kg KG wieder ab. CAR übernimmt im Rahmen der Gallensäure-Homöostase verschiedene Funktionen, dazu zählen die Elimination über MRP2 und MRP3 und die Regulation des Lipidmetabolismus. Gallensäuren fungieren als inverse Agonisten von CAR, die die CAR-Aktivität unterdrücken (Schaap, *et al.*, 2014). Konsistent mit der erhöhten Expression von MRP3 und dem damit verbundenen Export von Gallensäuren aus dem Hepatozyten ins Blut wurden auch erhöhte Konzentrationen von u. a. CA und CDCA im Plasma nachgewiesen (Abbildung 63). Aufgrund der hohen Gallensäure-Konzentrationen im Lebergewebe und Plasma von männlichen Ratten könnten die Inhibierung der Biosynthese und der hepatozellulären Aufnahme sowie die Steigerung des Abtransports in das hepatobiliäre System als adaptive Antwort des Organismus gewertet werden, die darauf abzielt, zytotoxische Gallensäure-Konzentrationen aus den Zellen zu eliminieren (Baes *et al.*, 2016).

Bei den weiblichen Ratten konnte keine Veränderung der untersuchten Gene mit einer Rolle bei der Biosynthese von Gallensäuren ermittelt werden. Die Expression des biliären Efflux-Transporters MDR1 und die von BCRP waren erniedrigt. Das könnte erklären, warum trotz gleichbleibender Expression von Genen der Biosynthese eine Akkumulation von Glycin-konjugierten Gallensäuren im Leberparenchym nachgewiesen wurde (Abbildung 65). Die

Expression des basolateralen Transporters MRP3 stieg dosis-abhängig an. Damit bestand bei weiblichen Ratten die adaptive Antwort gegen die Akkumulation von Gallensäuren im Lebergewebe ausschließlich aus einer erhöhten Expression von MRP3. Konsistent mit der erhöhten Expression von MRP3 wurden erhöhte Konzentrationen von CA und CDCA im Plasma nachgewiesen (Abbildung 65). Die Expression von PPAR α und PPAR γ war bei 75 mg/kg KG Amitriptylin erhöht. Eine erhöhte PPAR γ -Expression kann zu einer erhöhten Lipid-Akkumulation in Hepatozyten führen. Eine erhöhte PPAR α -Expression steht im Zusammenhang mit einer induzierten Steatose (Amacher, et al., 2014). Die Befunde deuten an, dass sich das hepatozelluläre System der Gallensäure-Regulation bei weiblichen Tieren in einem früheren Stadium der Progression befand, obwohl ein stark erhöhter Abtransport ins periphere Blut auftrat. Warum im Lebergewebe und Plasma bei beiden Geschlechtern zwar erhöhte Konzentrationen von Glycin-konjugierten Gallensäuren, aber erniedrigte Konzentrationen von Taurin-konjugierten Gallensäuren nachgewiesen wurden, konnte durch die angewandten Methoden nicht ermittelt werden.

In der tierexperimentellen Studie wurde Amitriptylin als Modellsubstanz zur Induktion einer makrovesikulären Steatose in männlichen und weiblichen Ratten benutzt. Zusammenfassend wurde durch die Applikation von Amitriptylin eine histopathologisch nachgewiesene makrovesikuläre Steatose in den behandelten Tieren induziert. Die klinisch-chemischen Biomarker konnten diese Veränderungen in der Leber nicht detektieren. Die quantitative Analyse von Gallensäuren in Plasma und Leberhomogenat zeigte signifikante Veränderungen, die sich als spezifisches Muster manifestierten. Die veränderten Gallensäure-Profile konnten in beiden Geschlechtern ermittelt werden und zeigten gleichzeitig eine höhere Sensitivität als die klinisch-chemischen Biomarker. Die Transkriptionsanalyse von relevanten Genen des Metabolismus von Gallensäuren zeigte Veränderungen in der Genexpression, die mit den veränderten Gallensäure-Profilen korrelierten.

3.7 Einfluss von Diclofenac auf das Gallensäure-Profil in Ratten

Aufgrund von Literaturstudien zu Diclofenac, die zur Auswahl der Dosis und des Behandlungszeitraums herangezogen wurden, war im Rahmen der durchgeführten Studie Lebertoxizität mit einhergehender Cholestase zu erwarten (Menecozzi *et al.*, 2015; Sriuttha *et al.*, 2018, EMEA, 2003).

Männliche Ratten erhielten 2,5 mg/kg KG (niedrige Dosis), 5 mg/kg KG (mittlere Dosis), 9 mg/kg KG (hohe Dosis) Diclofenac. Massive toxische Effekte im Gastrointestinal-Trakt in der Hochdosis-Gruppe der weiblichen Ratten führten zum Ausschluss einzelner weiblicher Tiere. Daher wurde die Hochdosis-Gruppe für 3 Tage ausgesetzt und anschließend fortgeführt. Die weiblichen Ratten in der Hochdosis-Gruppe zeigten trotz der Erholungspause signifikante Gewichtsverluste und mussten vorzeitig seziiert werden. Daher konnten bei weiblichen Ratten nur Daten der 2,5 mg/kg KG und 5 mg/kg KG Dosierungen ausgewertet werden. An den Tagen 2, 9 und 14 wurde zur Bestimmung der Serummarker und der Gallensäure-Plasmakonzentrationen Blut abgenommen. An Tag 9 (Interim) und 14 wurden die Tiere seziiert.

3.7.1 Histopathologie

Die histopathologische Analyse der männlichen Ratten zeigte bei einigen Tieren geringfügige hepatozelluläre Veränderungen in Form einer minimalen bis leichten Hypertrophie ab einer Behandlung mit 5 mg/kg KG Diclofenac (Tabelle 67, Abbildung 66 B). Neben den Leberbefunden traten auch Entzündungsreaktionen des Dünndarmgewebes, sowie Erweiterungen des Dickdarmgewebes auf. Bei den weiblichen Ratten trat bei dieser Dosierung ebenfalls eine minimale bis leichte hepatozelluläre Hypertrophie auf (Tabelle 67). Neben den Leberbefunden wurde auch bei weiblichen Ratten schwer entzündliches Dünndarmgewebe mit Geschwüren (Ulcus) diagnostiziert (Abbildung 66 D). Die Effekte der Hochdosis-Gruppe (9 mg/kg KG) waren so massiv, dass weibliche Ratten dieser Dosis-Gruppe vorzeitig aus der Studie genommen werden mussten. Gastrointestinale Blutungen, Ulzera oder Perforationen des Darmepithels, auch mit letalem Ausgang, sind bekannte unerwünschte Nebenwirkungen von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR), einschließlich Diclofenac. Die gastrointestinale Toxizität kann ohne vorherige Warnsymptome auftreten, so dass schwerwiegende gastrointestinale Ereignisse zu jedem Zeitpunkt der Studie möglich sind. Das Risiko gastrintestinaler Blutungen, von Ulzeration oder Perforation steigt mit einer höheren Dosis von Diclofenac (Fachinfo-Service, 2018a).

Tabelle 67 Häufigkeit hepatozellulärer Veränderungen bei männlichen und weiblichen Ratten nach der Behandlung mit Diclofenac (Männlich: ♂, Weiblich: ♀).

Dosis/mg/kg KG	0 mg/kg KG		2.5 mg/kg KG		5 mg/kg KG		9 mg/kg KG
Geschlecht	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Anzahl der Tiere	6	6	6	6	5	6	6
Hypertrophie							
Grad 1	-	-	-	-	3	4	2
Grad 2	-	-	-	-	2	-	2
Inzidenz	-	-	-	-	5	4	4
Grad (arithmetisches Mittel)	-	-	-	-	1.0	1.0	1.5

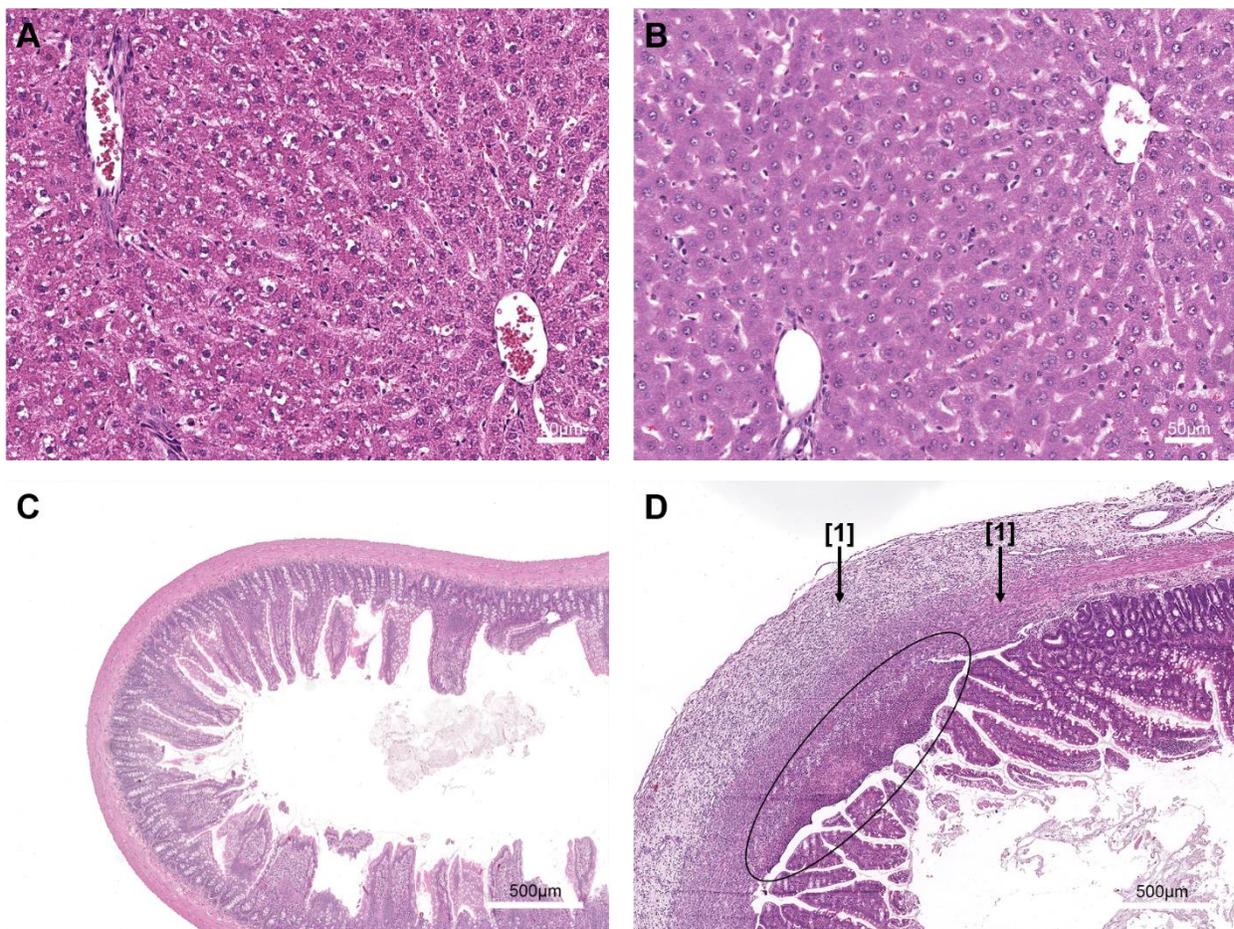


Abbildung 66 Histopathologische Befunde von männlichen und weiblichen Ratten nach Hämatoxylin-Eosin Färbung. (A-B) Leberbefund männliche Ratte: (A) Kontroll-Gruppe: keine Veränderungen, (B) Hochdosis-Gruppe (9 mg/kg KG): Hypertrophie. (C-D) Darmbefund weibliche Ratte: (C) Kontroll-Gruppe: keine Veränderung, (D) Hochdosis-Gruppe (9 mg/kg KG): Schwerer Befund (Grad 4), [1] Inflammation des Darmgewebes, Umrandetes Gewebe: Geschwür (Ulcus). Die Aufnahmen wurden 20-fach vergrößert mit einer Skalierung von 50 µm.

3.7.2 Klinische Chemie

Weibliche Ratten zeigten ausschließlich signifikant erniedrigte Enzymaktivitäten der APh beginnend ab Tag 9 der Behandlung (Abbildung 67). Die Messung etablierter Serummarker bei mit 9 mg/kg KG Diclofenac behandelten männlichen Ratten ergab bereits am Tag 2 signifikante Abnahme der Aktivität für ALAT, ASAT, APh und GLDH. An Tag 9 war die Abnahme der Aktivität von ALAT bereits bei einer mittleren Dosis und von ASAT schon bei einer niedrigen Dosis signifikant (APh, GLDH nur in der Hochdosis-Gruppe). An Tag 14 blieben die erniedrigten Enzymaktivitäten nur in der Hochdosis-Gruppe signifikant (Abbildung 68). Das Substrat der Gallensäure-Biosynthese, Cholesterol, zeigte dosis-abhängig signifikant erhöhte Konzentrationen bei männlichen Ratten am Tag 14 in allen Behandlungsgruppen (Tabelle 68).

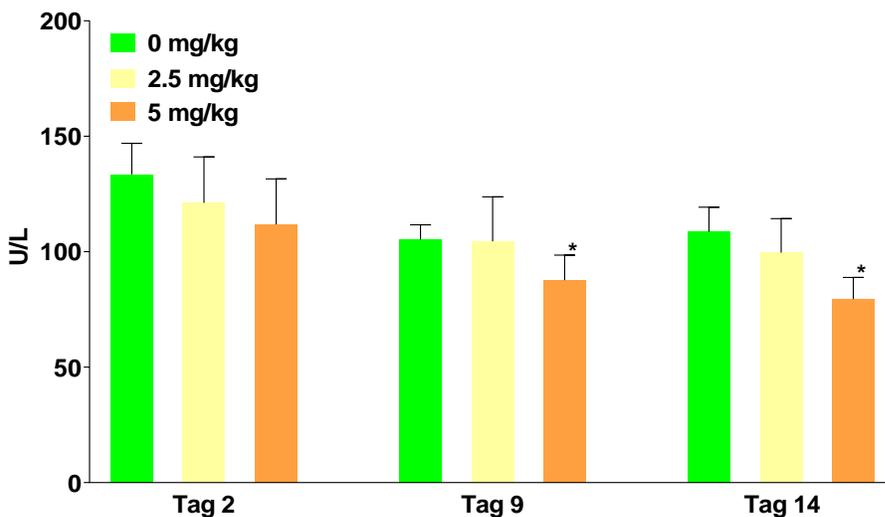


Abbildung 67 Aktivität der Alkalischen Phosphatase (APh) bei weiblichen Ratten nach der Behandlung mit Diclofenac. Dargestellt sind die MW \pm SD (n=6 pro Gruppe) für die einzelnen Zeitpunkte. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

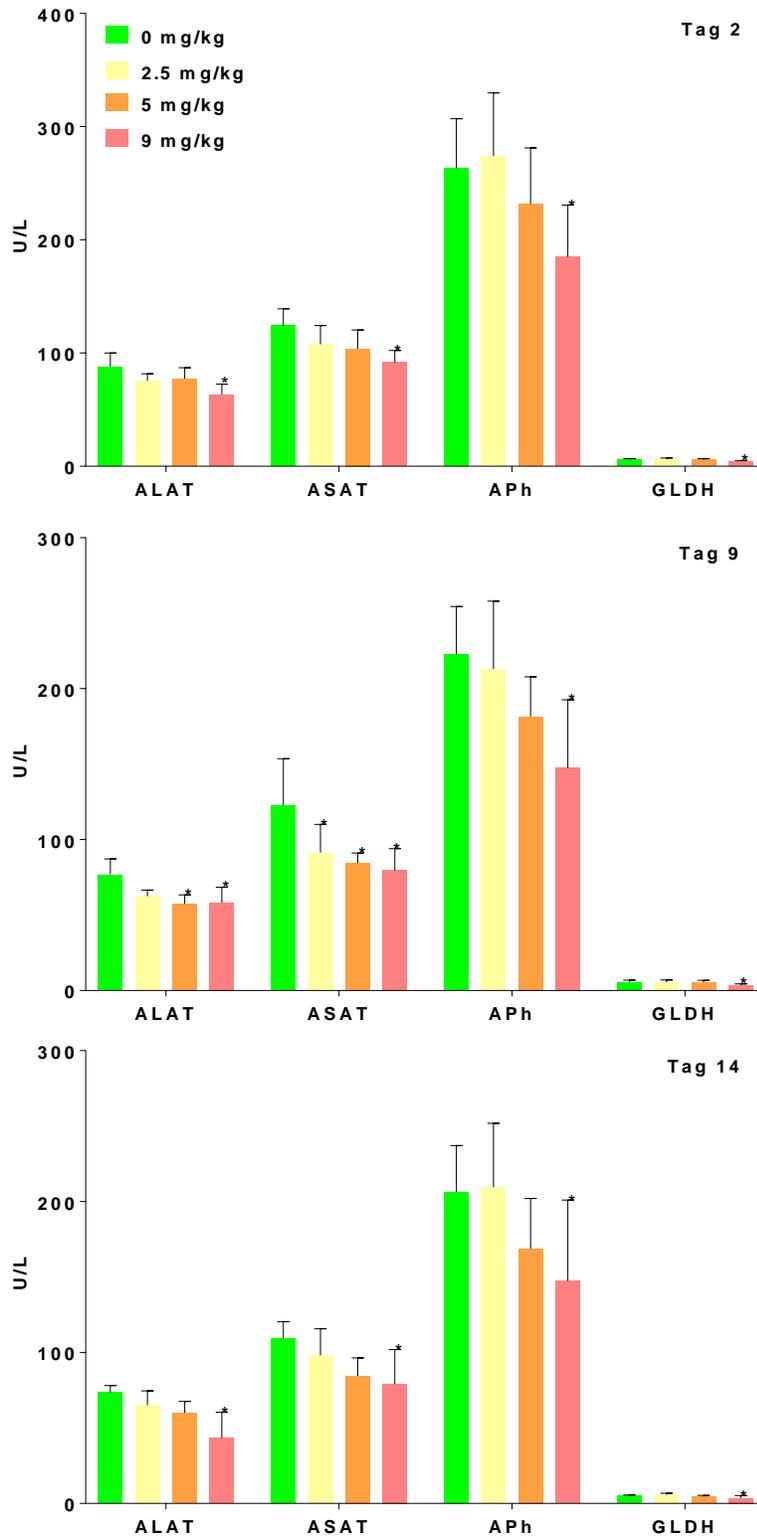


Abbildung 68 Aktivitäten der Serummarker bei männlichen Ratten nach Behandlung mit Dicofenac. Dargestellt sind die MW ± SD (n=6 pro Gruppe) für die einzelnen Zeitpunkte. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05

Tabelle 68 Serumkonzentrationen von Cholesterin (mmol/L) männlicher und weiblicher Ratten. Dargestellt ist das arithmetische Mittel (MW) mit dazugehöriger Standardabweichung (SD). Die statistische Signifikanz wurde bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe mittels Dunnett's Test ermittelt: * p < 0.05.

Geschlecht		Männchen				Weibchen		
Dosis/mg/kg KG		0	2.5	5	9	0	2.5	5
Tag 2	Mean	1.9	2.1	2.2	2.1	1.6	1.6	1.5
	± SD	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1	0.1	0.6
Tag 9	Mean	1.8	2.1	2.3*	1.9	1.5	1.5	1.5
	± SD	0.3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2
Tag 14	Mean	1.6	2.0*	2.2*	2.3*	1.6	1.5	1.9
	± SD	0.3	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.3

3.7.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber

Die Behandlung mit 9 mg/kg KG Diclofenac führte bei männlichen Ratten zu einem signifikanten Anstieg der GCA- und GDCA-Konzentration im Lebergewebe. Die Gewebekonzentration von TUDCA stieg bereits bei 5 mg/kg KG Diclofenac an (Abbildung 69 A).

Weibliche Tiere zeigten unter Diclofenac-Behandlung signifikante Veränderungen verschiedener Gallensäure-Konzentrationen. Exemplarisch dargestellt sind die beiden am deutlichsten erniedrigten Konzentrationen der Taurin-Konjugate TCA und TCDCA (Abnahme bei 2,5 mg/kg KG sowie 5 mg/kg KG Diclofenac) (Abbildung 69 B). Weitere signifikante Erniedrigungen traten bei TDCA, TLCA und TUDCA sowie CA bei beiden Dosierungen und bei GCA, GCDCA, GDCA und HDCA in der Niedrigdosis-Gruppe auf (Anhang-Abbildung A4).

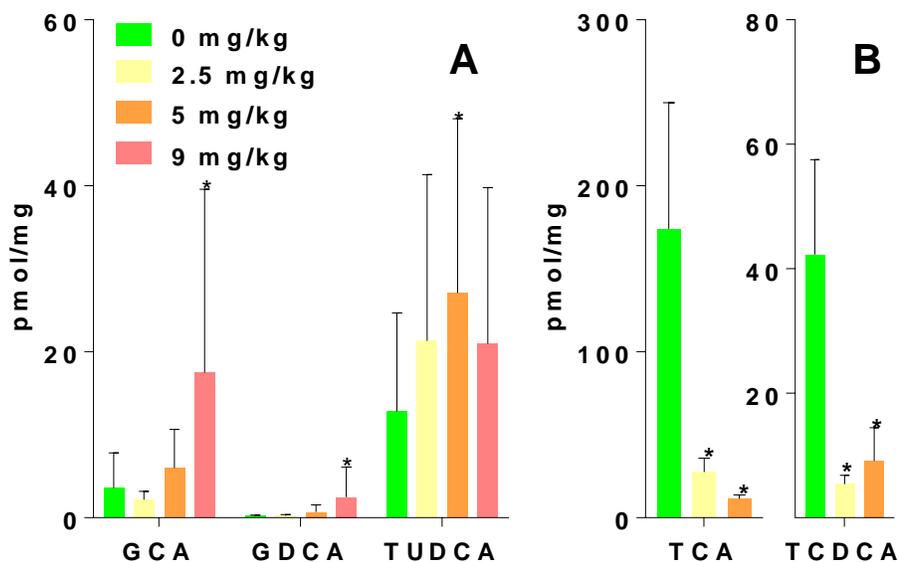


Abbildung 69 Gallensäure-Konzentration im Lebergewebe männlicher (A–B) Ratten unter Diclofenac-Exposition (Tag 14). Dargestellt sind MW ± SD (n=6 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

Die multivariate Datenanalyse (PCA) bestätigte für männliche Tiere die Veränderungen der Gallensäure-Gewebekonzentrationen. Der erhöhte Konzentration von GCA, GCDCA und GDCA (rot markiert) führte bei einer Behandlung mit 9 mg/kg KG Diclofenac zu einer beginnenden Trennung der Gruppen (Abbildung 70). Zu beachten ist, dass aber nicht alle mit Diclofenac behandelten Tiere (Abbildung 70 A) einen histopathologischen Befund aufwiesen.

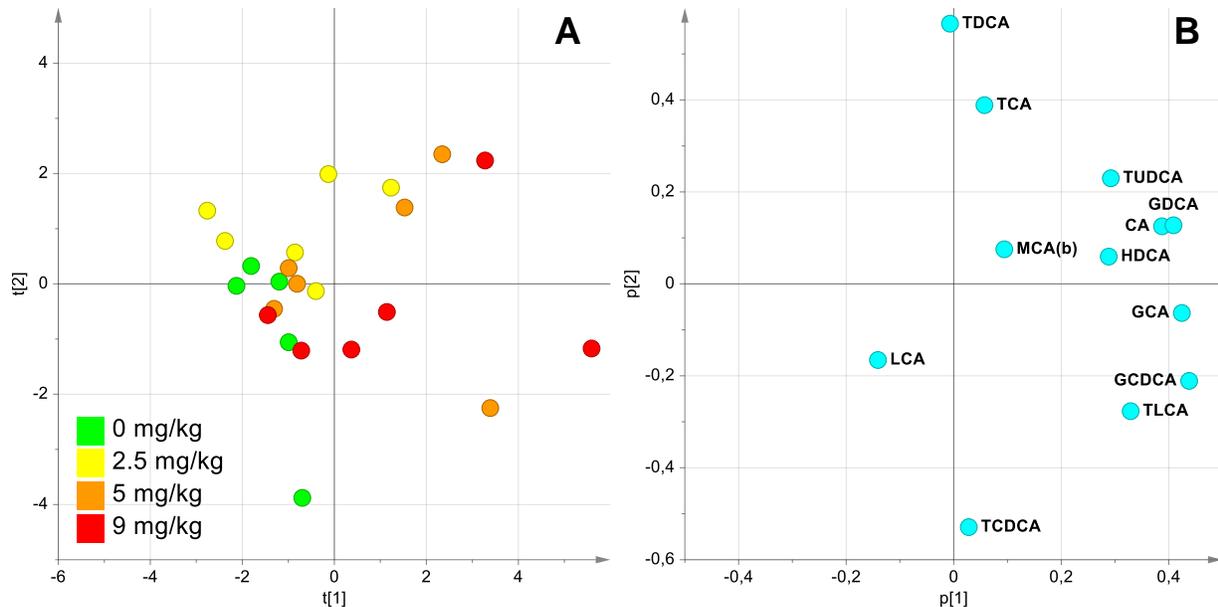


Abbildung 70 PCA der Gallensäure-Profile im Lebergewebe männlicher Ratten unter Diclofenac-Exposition an Tag 9. (A) *Score Scatter Plot* [grün] Kontrolle, [gelb] 2,5 mg/kg KG, [orange] 5 mg/kg KG, [rot] 9 mg/kg KG, (B) *Loading Scatter Plot* der Gallensäure-Konzentrationen, die für die Verteilung der Versuchstiere in dem *Score Scatter Plot* verantwortlich sind.

Bei den weiblichen Ratten zeigte sich im *Score Scatter Plot* eine deutliche *Cluster*-Bildung für die verschiedenen Dosisgruppen. Die Konzentrationen von TUDCA, TCA und TMCA(a+b) ($p[2] > -0,25$) waren im Lebergewebe der behandelten Tiere geringer als in der Kontrollgruppe. Tiere, die mit 5 mg/kg KG Diclofenac behandelt wurden, zeigten eine gesteigerte Konzentration von GCA, GCDCA und GDCA ($p[2] > 0,35$) im Lebergewebe gegenüber den Tieren, die mit 2,5 mg/kg KG Diclofenac behandelt wurden (Abbildung 71 B).

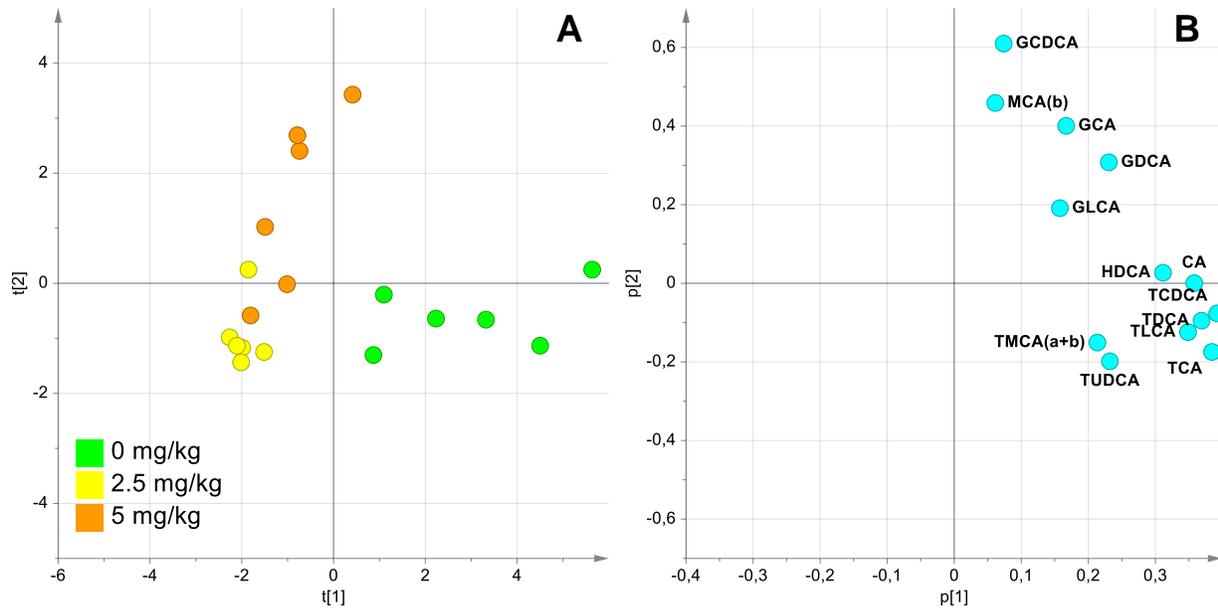


Abbildung 71 PCA der Gallensäure-Profile im Lebergewebe weiblicher Ratten unter Diclofenac-Exposition an Tag 14. (A) *Score Scatter Plot* [grün] Kontrolle, [gelb] 2,5 mg/kg KG, [orange] 5 mg/kg KG, (B) *Loading Scatter Plot* der Gallensäure-Konzentrationen, die für die Verteilung der Versuchstiere in dem *Score Scatter Plot* verantwortlich sind.

3.7.4 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma

Mit 5 mg/kg KG und 9 mg/kg KG Diclofenac behandelte männliche Ratten zeigten vor allem signifikant erhöhte Konzentrationen der primären Gallensäuren CA und CDCA im Plasma beginnend ab Tag 2. Im Behandlungszeitraum von 14 Tagen stieg die Konzentration für CA im Plasma progressiv an (Abbildung 72). Gleichzeitig gab es signifikant erhöhte Konzentrationen der sekundären Gallensäure UDCA sowie ihres Konjugats TUDCA (Abbildung 73).

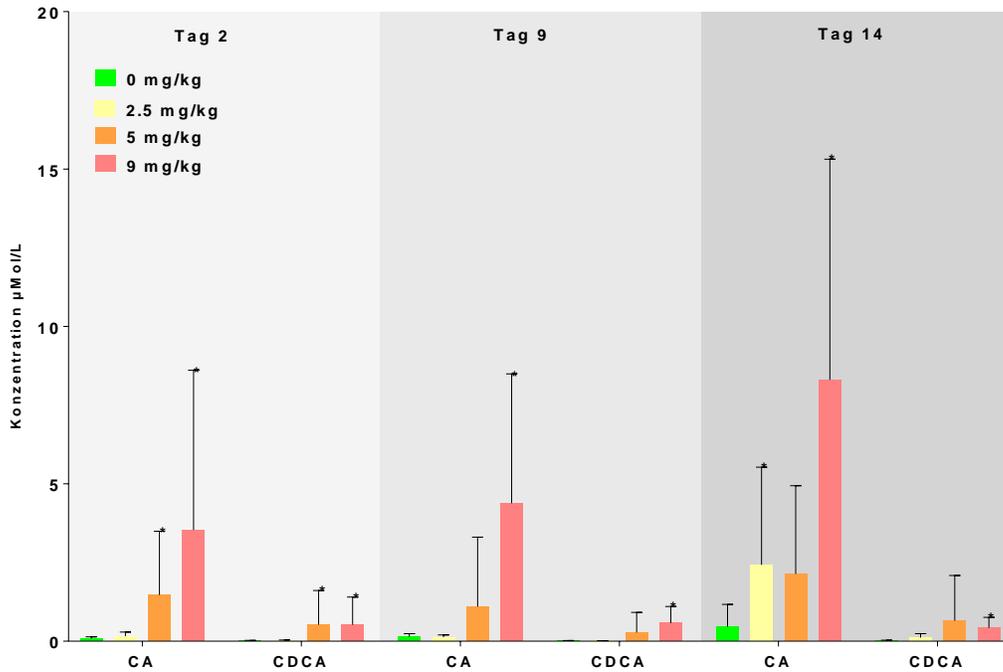


Abbildung 72 CA- und CDCA-Konzentrationen im Plasma männlicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Diclofenac-Exposition. Dargestellt sind MW ± SD (n=5/6 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

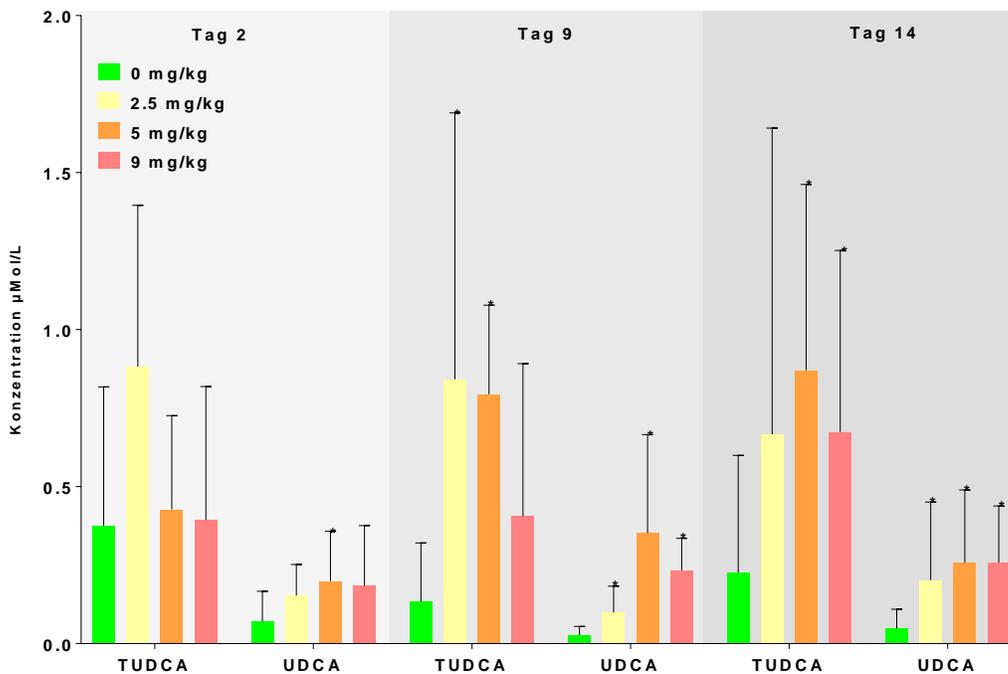


Abbildung 73 UDCA- und TUDCA-Konzentrationen im Plasma männlicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Diclofenac-Exposition. Dargestellt sind MW ± SD (n=5/6 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

Weitere Veränderungen der Gallensäure-Homöostase betrafen MCA(a) (5 mg/kg KG Diclofenac ab Tag 2), und MCA (b) (9 mg/kg KG Diclofenac ab Tag 9). Die Auswertung der Gallensäure-Plasmakonzentrationen mittels multivariater Datenanalyse ergab vergleichbare Ergebnisse. Männliche Ratten, die mit 9 mg/kg KG Diclofenac behandelt wurden, zeigten einen ausgeprägten dosis-abhängigen Konzentrationsanstieg von individuellen Gallensäuren im Plasma (Anhang-Abbildung A6 A). Die Gruppe der mit 5 mg/kg KG Diclofenac behandelten Ratten zeigte einen durch die Behandlung erzielten Einfluss auf die Gallensäure-Profile im Plasma, der allerdings nur minimal ausgeprägt war im Vergleich zu der mit 9 mg/kg KG Diclofenac behandelten Gruppe (Anhang-Abbildung A6 A). Gallensäuren mit einem starken Einfluss auf den dosis-abhängigen Trend waren CA > CDCA > UDCA > TUDCA > MCA(a) > MCA(b) > MCA(o) (Anhang-Abbildung A6 B).

Die univariate Datenanalyse ergab für weibliche Ratten signifikant erhöhte Konzentrationen der Gallensäuren CA und CDCA an Tag 9, in der mit 5 mg/kg KG Diclofenac behandelten Gruppe. Parallel kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentration von TCA (Abbildung 74). In der PCA zeigte sich eine klare Trennung zwischen den Kontrolltieren und den mit 5 mg/kg KG Diclofenac behandelten Tieren (Anhang-Abbildung A7 A). Verantwortlich für diese Trennung waren erhöhte Konzentrationen in der Behandlungsgruppe (5 mg/kg KG Diclofenac) von CA, CDCA, GCA, GCDCA, GDCA und MCA(a+b) (Anhang-Abbildung A7 B). TLCA und TUDCA zeigten bereits an Tag 2 in dieser Gruppe signifikante Erhöhungen (Anhang-Abbildung A7). Weitere signifikante Veränderungen ab Tag 9 betrafen TMCA(a+b). GCA, GCDCA, GDCA, MCA(a) und TUDCA waren auch an Tag 14 erhöht (Anhang-Abbildung A7).

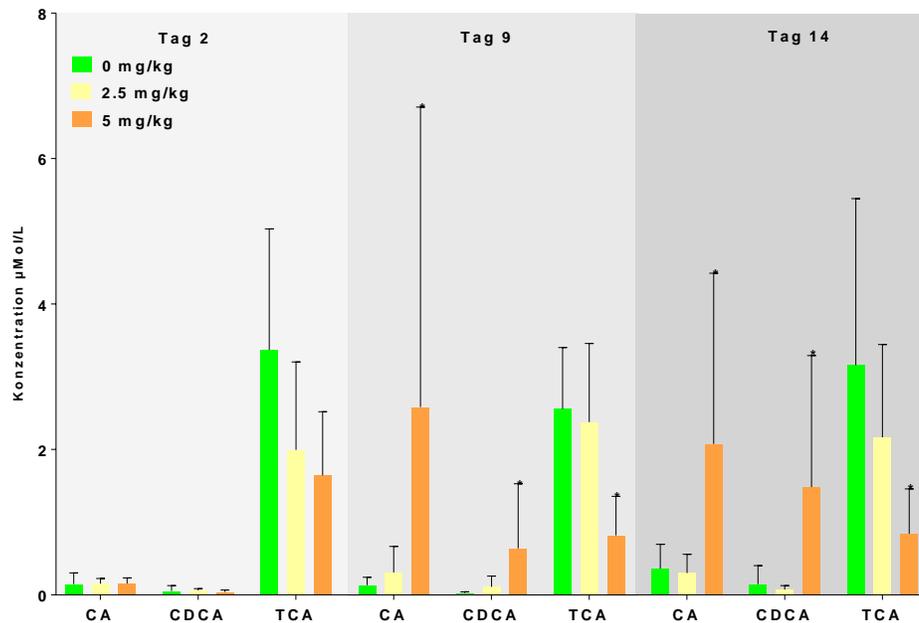


Abbildung 74 CA- und CDCA-Konzentrationen im Plasma weiblicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Diclofenac-Exposition. Dargestellt sind MW \pm SD (n=5/6 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

3.7.5 Untersuchung der Genexpression des Gallensäure-Metabolismus im Lebergewebe

Das Expressionsprofil männlicher Ratten zeigte unter Diclofenac-Behandlung Veränderungen in allen Dosisgruppen bei Genen der Gallensäure-Biosynthese (erhöhte Expression von CYP7A1 und *Sterol carrier protein x* (SCPx)) in der 9 mg/kg KG Dosisgruppe und eine dosis-abhängig erniedrigte Expression von ACOT8, AMACR, CYP8b1) (Abbildung 75). Die stärkste Dysregulation betraf die Transporter-Gene. Bis auf MRP2 werden alle Transporter verstärkt exprimiert (MDR1a, MDR3 bereits in der Niedrigdosis-Gruppe) (Abbildung 75). Gene, die für die Steuerung des Gallensäure-Metabolismus verantwortlich sind (PPAR α , PPAR γ), zeigten dosis-abhängig erhöhte Expressionen in allen Behandlungsgruppen.

Bei den weiblichen mit Diclofenac behandelten Ratten traten im Vergleich zu den männlichen Tieren weniger Veränderungen in der Expression von Genen des Gallensäure-Metabolismus auf. Bemerkenswert waren eine erhöhte MDR1b-Expression (biliärer Gallensäure-Efflux) in beiden Dosisgruppen, eine leicht verminderte Expression von BCRP (biliärer Gallensäure-Efflux) und eine verminderte Expression von ASBT und OATP (hepatozelluläre Gallensäure-Aufnahme). Bei den für die Gallensäure-Biosynthese wichtigen Genen waren CYP7A1 und SCPx von einer verminderten Expression betroffen (Abbildung 77).

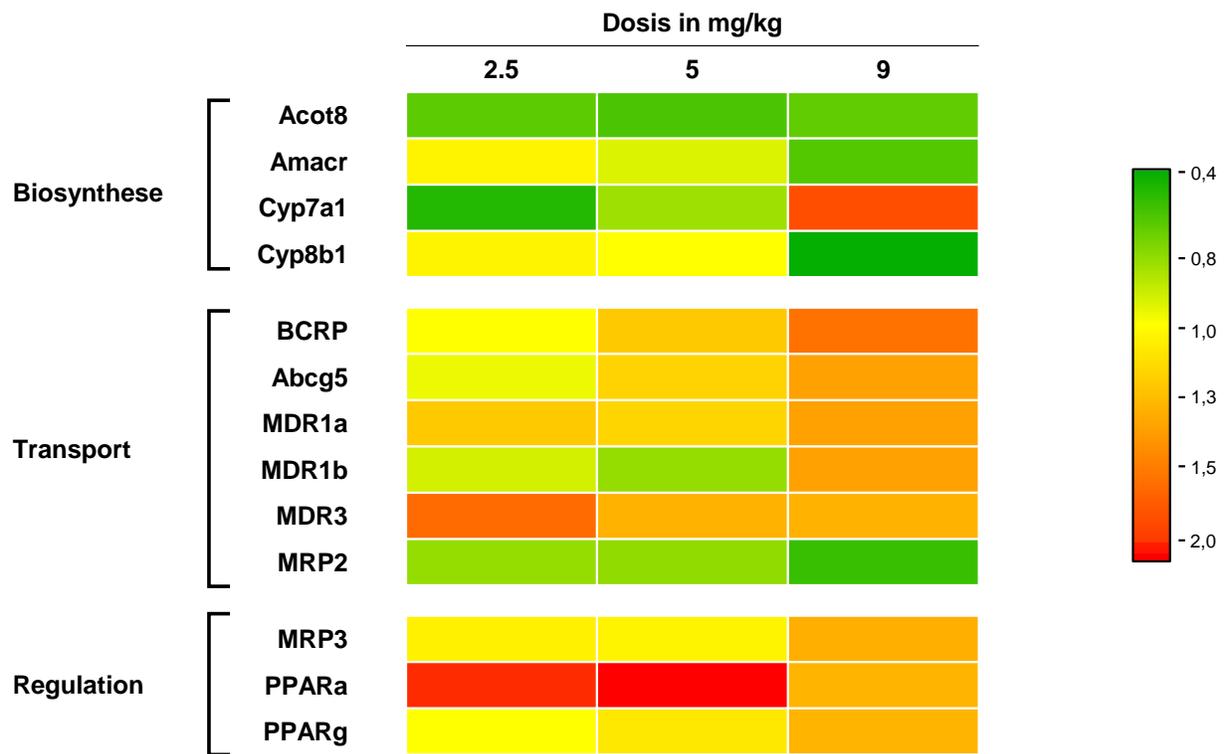


Abbildung 75 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Diclofenac-Exposition in männlichen Ratten (n=6 pro Gruppe). 0 mg/kg KG [Kontrolle], 2,5 mg/kg KG [niedrige Dosis], 5 mg/kg KG [mittlere Dosis], 9 mg/kg KG [hohe Dosis]. In der *Heat Map* ist das arithmetische Mittel der relativen Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) dargestellt.

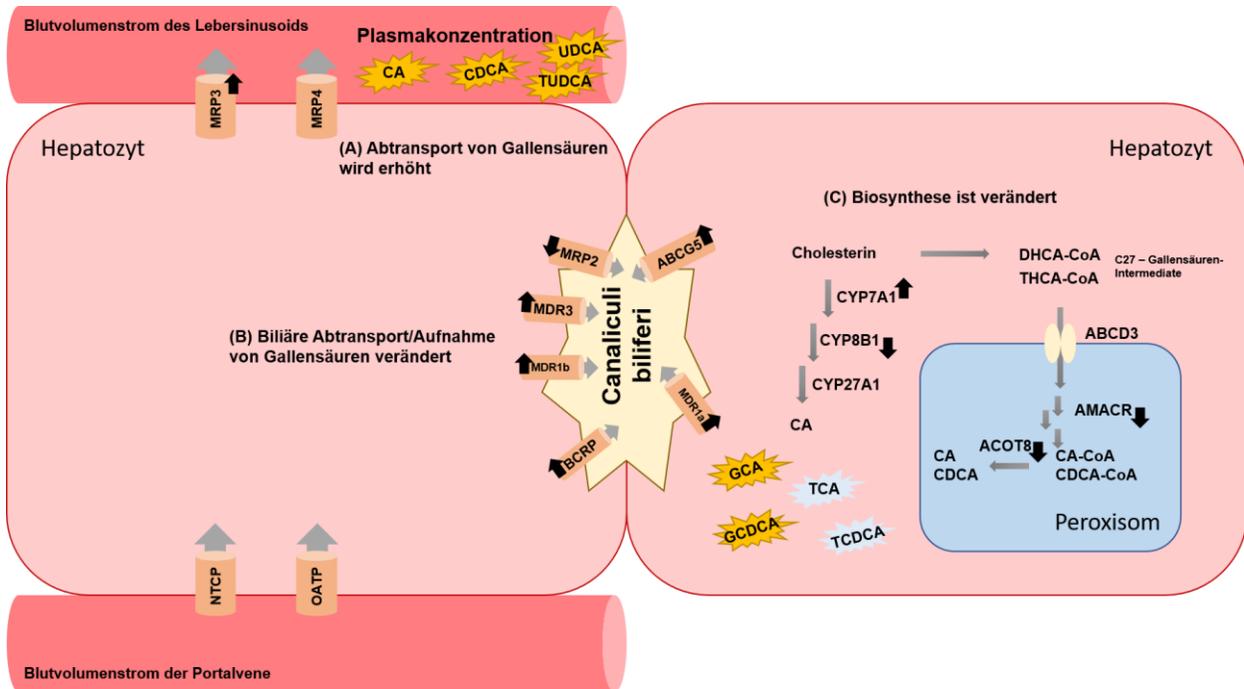


Abbildung 76 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Diclofenac in männlichen Ratten. Die Abbildung spiegelt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und des Gallensäure-Profilings der Hochdosis-Gruppe (9 mg/kg KG) wider. Hierbei wurde auf der rechten Seite der peroxisomale Biosyntheseschritt von Gallensäuren vereinfacht dargestellt und diejenigen Gene wurden mit einem schwarzen Pfeil markiert, deren Transkription signifikant erhöht oder erniedrigt war. Die Richtung des Pfeils symbolisiert dabei den Anstieg oder die Erniedrigung der Transkriptionsrate. Analog sind auf der linken Seite die Transportsysteme vereinfacht dargestellt. Gelb-markierte Gallensäuren stellen einen analytisch nachgewiesenen Konzentrationsanstieg der jeweiligen Gallensäuren dar. Blau-markierte Gallensäuren verweisen auf eine analytisch bestätigte Konzentrationserniedrigung dieser Gallensäuren. Auszüge dieser Darstellung sind angelehnt an (Baes, et al., 2016; Ferdinandusse, et al., 2006).

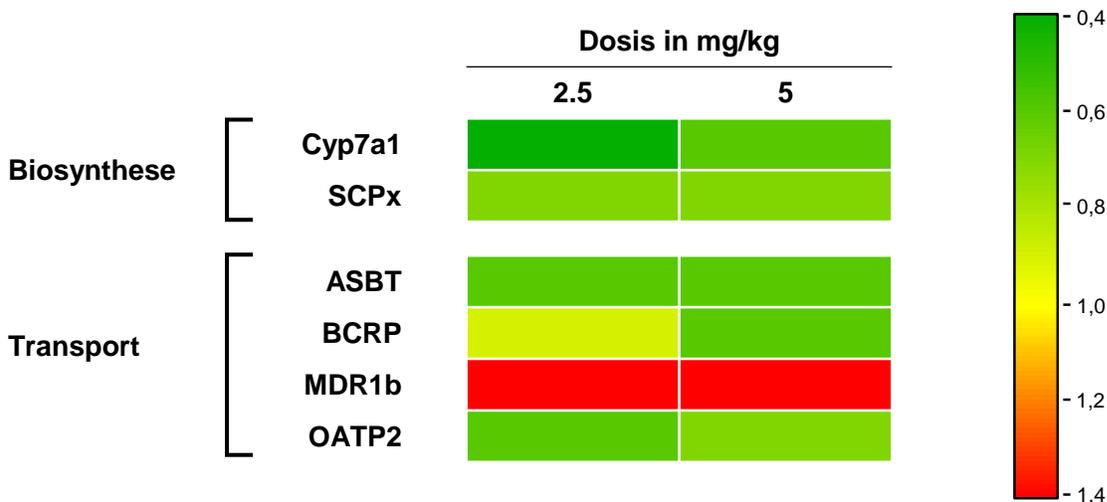


Abbildung 77 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Diclofenac-Exposition in weiblichen Ratten (n=6 pro Gruppe). 0 mg/kg KG [Kontrolle], 2,5 mg/kg KG [niedrige Dosis], 5 mg/kg KG [mittlere Dosis]. In der Heat Map ist das arithmetische Mittel der relativen Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) dargestellt.

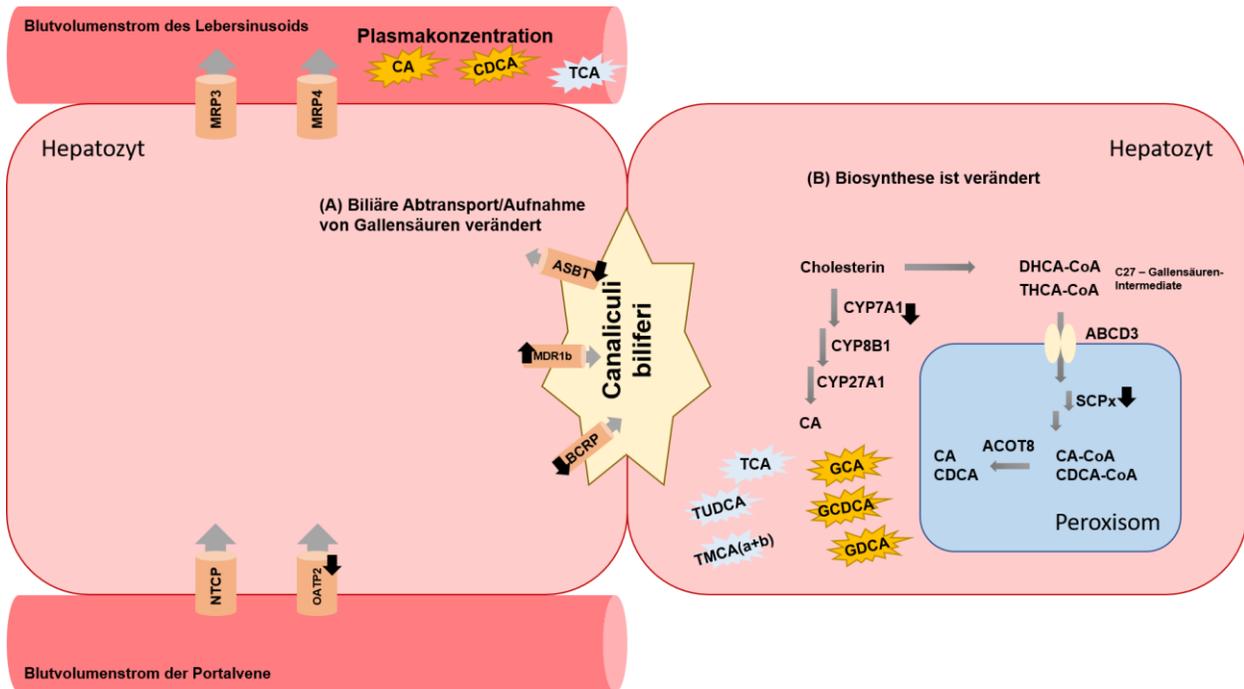


Abbildung 78 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Diclofenac in weiblichen Ratten. Die Abbildung spiegelt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und des Gallensäure-Profilings der Hochdosis-Gruppe (5 mg/kg KG) wider. Hierbei wurde auf der rechten Seite der peroxisomale Biosyntheseschritt von Gallensäuren vereinfacht dargestellt und diejenigen Gene wurden mit einem schwarzen Pfeil markiert, deren Transkription signifikant erhöht oder erniedrigt war. Die Richtung des Pfeils symbolisiert dabei den Anstieg oder die Erniedrigung der Transkriptionsrate. Analog sind auf der linken Seite die Transportsysteme vereinfacht dargestellt. Gelb-markierte Gallensäuren stellen einen analytisch nachgewiesenen Konzentrationsanstieg der jeweiligen Gallensäuren dar. Blau-markierte Gallensäuren verweisen auf eine analytisch bestätigte Konzentrationserniedrigung dieser Gallensäuren. Auszüge dieser Darstellung sind angelehnt an (Baes, et al., 2016; Ferdinandusse, et al., 2006).

3.7.6 Diskussion

Initiale Studien zur hepatotoxischen Wirkung belegen, dass Diclofenac die mitochondriale Adenosintriphosphat-(ATP)-Synthese beeinträchtigt. Allelische Varianten metabolisierender Enzyme, wie UGT2B7 (UDP-Glucuronosyltransferase-2B7) und CYP2C8, sowie des Transporters MRP2 führen vermutlich zu einem Anstieg von zytotoxischen Metaboliten und begünstigen eine Cholestase (Bort *et al.*, 1999; Padda, et al., 2011; Ponsoda *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Studie wurde Diclofenac in drei Dosierungen (niedrige Dosis: 2,5 mg/kg KG, mittlere Dosis: 5 mg/kg KG, hohe Dosis: 9 mg/kg KG) verabreicht. Neben histopathologischen Befunden in der Leber traten auch massive Befunde im Gastrointestinaltrakt der behandelten Tiere auf. Weibliche Ratten reagierten wesentlich sensitiver, was zu einem vorzeitigen Ausschluss der mit 9 mg/kg KG Diclofenac behandelten Tiere führte. Möglicherweise entsteht in

weiblichen Ratten ein reaktiver Metabolit, der den Dünndarm der Tiere schwer beschädigt (Seitz *et al.*, 1998). Die Lebern von männlichen und weiblichen Ratten wiesen nach der Behandlung mit 5 mg/kg KG Diclofenac minimale Hypertrophien auf. Bei männlichen Ratten trat zusätzlich unter Behandlung mit 9 mg/kg KG Diclofenac ein erhöhter Schweregrad (Grad 2) der Hypertrophie auf. Die APh-Aktivität in weiblichen Ratten war bereits ab Tag 2 der Behandlung mit 5 mg/kg KG Diclofenac signifikant erniedrigt. Bei den männlichen Ratten waren in der Hochdosis-Gruppe die Aktivitäten von ALAT, ASAT, APh und GLDH erniedrigt. Vereinzelt sank auch die Aktivität von Leberenzymen bei 2,5 mg/kg KG (ASAT) und 5 mg/kg KG Diclofenac (ALAT, ASAT). Die klinischen Serummarker korrelierten mit den histopathologischen Befunden in den verschiedenen Dosisgruppen.

In männlichen Ratten kam es unter Diclofenac zu signifikanten Anstiegen der Gallensäure-Gewebekonzentration. Dies betraf GCA und GDCA bei 9 mg/kg KG Diclofenac und TUDCA bei 5 mg/kg KG Diclofenac. Diese Veränderungen zeigten eine Gallensäure-Akkumulation im Lebergewebe an. Allerdings ergab die multivariate Datenanalyse, dass nicht alle Ratten mit erhöhten Konzentrationen histopathologische Befunde einer hepatozellulären Veränderung aufwiesen (Abbildung 70). Der Anstieg der metabolischen Leistung in der Leber ist somit keine klare Evidenz für die Existenz eines Leberschadens. Bei weiblichen Ratten sanken die Gewebekonzentrationen von TCA und TCDCA bei 2,5 mg/kg KG und 5 mg/kg KG signifikant. Die histopathologischen Evidenzen waren geringer ausgeprägt als bei männlichen Ratten. Auch die multivariate Datenanalyse ergab kein spezifisches Gallensäure-Profil. Trotz der *Cluster*-Bildung der Tiere der verschiedenen Behandlungsgruppen ließen sich die Gallensäuren, die für diese Einordnung verantwortlich waren, nicht identifizieren (Abbildung 71). Die Variabilität der Tiere ließ sich ausschließlich über erhöhte GCA- und GDCA- sowie erniedrigte TCA- und TMCA(a+b) - Konzentrationen beschreiben. Diese Ergebnisse waren nicht konsistent mit der univariaten Statistik. Der Anstieg der metabolischen Leistung in der Leber konnte somit nicht eindeutig einem Leberschaden durch Gallensäuren im Gewebe zugeordnet werden.

Die univariate und die multivariate Analyse der Plasmakonzentrationen von männlichen Ratten ergaben signifikante Anstiege der primären Gallensäuren CA/CDCA. Die muricholierten Gallensäuren MCA(a) und MCA(b) zeigten nur bis zum Tag 9 signifikante Unterschiede. Wie bereits diskutiert wurde, scheinen primäre Gallensäuren bei einer gesteigerten metabolischen Leistung der Leber anzusteigen, ohne dass zwingend ein spezifischer Leberschaden vorliegen muss. Anders als bei den anderen Hepatotoxinen war bei Diclofenac auch der Gastrointestinaltrakt von der Toxizität betroffen. Aufgrund des enterohepatischen Kreislaufs könnte dies auch die Gallensäure-Plasmakonzentrationen beeinflusst haben (Martínez-Augustin

et al., 2008). Bei einer Behandlung von männlichen Ratten mit Diclofenac war die Plasmakonzentration der sekundären Gallensäure UDCA sowie ihres Taurin-Konjugats TUDCA in allen Behandlungsgruppen erhöht. Studien belegen, dass hohe UDCA- und TUDCA-Konzentrationen die Leberfunktion durch eine Stabilisierung der mitochondrialen Membran verbessern können (Amaral *et al.*, 2009). Des Weiteren zeigen Studien zur Verbesserung der Zellvitalität durch erhöhte Konzentrationen von UDCA erste Hinweise zu einem assoziierten anti-apoptotischen Effekt. Dieser wird durch UDCA über Regulation von essentiellen Genen (Bcl-2/Bax), die den Zyklus des programmierten Zelltods steuern, erzielt (Chen *et al.*, 2011). Die Gallensäure-Profile männlicher Ratten in der vorliegenden Studie geben erste Hinweise darauf, dass über unterschiedlich erhöhte Konzentrationen primärer und sekundärer Gallensäuren zwischen verschiedenen Schädigungen des enterohepatischen Kreislaufs differenziert werden könnte. Weibliche Ratten zeigten ab Tag 9 der Behandlung mit 5 mg/kg KG Diclofenac erhöhte CA- und CDCA-Plasmakonzentrationen mit gleichzeitig erniedrigter TCA-Plasmakonzentration. An Tag 14 waren zusätzlich auch die Konzentrationen von MCA(a), MCA(b), GCA, GCDCA und GDCA erhöht. Die multivariate Analyse erbrachte keine weiteren Erkenntnisse. Trotz einer *Cluster*-Bildung der Tiere konnten die verantwortlichen Gallensäuren nicht klar identifiziert werden.

Die Genexpressionsanalyse zeigte eine verminderte Expression von Enzymen des peroxisomalen Biosynthesewegs (ACOT8, AMACR) bei den männlichen Ratten. Dies könnte als Indiz für einen Schutzmechanismus gegenüber erhöhten Konzentrationen von Gallensäuren gewertet werden. Im Gegensatz dazu wurde eine Akkumulation von GCA und GCDCA nachgewiesen, was darauf hinweisen könnte, dass die Hemmung der Gallensäuresynthese noch nicht ausreichend war, um der Akkumulation entgegenzuwirken (Abbildung 76). Weitere Expressionsänderungen, die die erhöhten Gallensäure-Konzentrationen im Plasma erklären können, betrafen MDR1a und MDR3 (Steigerung ab 2,5 mg/kg KG Diclofenac). Die Expression des biliären Efflux-Transporters BCRP erhöhte sich ab einer Dosierung von 5 mg/kg KG Diclofenac. Die Expression von MRP2 war ab einer Dosis von 9 mg/kg KG Diclofenac erniedrigt. Mit einer Zunahme der Dosierung waren zunehmend mehr Transporter von einer dysregulierten Expression betroffen, wodurch möglicherweise ein gesteigerter Gallensäure-Abtransport ins Blut und in die *Canaliculi biliferi* gewährleistet werden sollte. Diese These korrelierte mit der erhöhten Expression von MRP3 und den gemessenen Plasmakonzentrationen von CA, CDCA, TUDCA und UDCA bei den mit Diclofenac behandelten Tieren der Hochdosis-Gruppe (9 mg/kg KG) an Tag 14 (Abbildung 76). Über den Efflux-Transporter ABCG5 wird Cholesterol, dass für die Gallensäure-Bildung in Hepatozyten essentiell ist, in die *Canaliculi biliferi* transportiert (Nemes,

et al., 2016; Yang, et al., 2013). Bei männlichen Ratten korrelierten die ansteigenden Cholesterols-Serumkonzentrationen (Tabelle 68) mit den Expressionsraten von ABCG5 (Abbildung 75). Unter den Genen, die für die Regulation der Gallensäure-Homöostase zuständig sind, zeigten PPAR α (alle Behandlungsgruppen) und PPAR γ (9 mg/kg KG Diclofenac) erhöhte Expressionsraten. Eine Aktivierung dieser Gene beeinflusst die Gallensäure-Transportsysteme und löst Veränderungen in der Cholesterols-Synthese aus (Li *et al.*, 2009).

Weibliche Ratten zeigten im Vergleich zu den männlichen Tieren geringere Veränderungen im Gallensäure-Metabolismus. Die erniedrigte Expression von CYP7A1 und SCPx (2.5 mg/kg KG und 5 mg/kg KG) wirkte sich negativ auf die Biosynthese der primären Gallensäuren CA und CDCA aus. Dagegen führte eine verringerte Expression von ASBT und OATP2 zu einer Abnahme der Gallensäure-Aufnahme in die Hepatozyten. Diese adaptiven Mechanismen resultierten in einer Senkung der Gallensäure-Gewebekonzentrationen weiblicher Ratten. Die gleichzeitig erhöhte Expression von MDR1b in beiden Behandlungsgruppen deutet auf einen gesteigerten biliären Gallensäure-Efflux hin. Die Abnahme der Expression von BCRP (5 mg/kg KG Diclofenac) könnte als Indiz für einen verminderten Gallensäure-Abtransport in die Gallengänge gedeutet werden.

Aufgrund des minimalen Effektes in der Leber und des deutlichen Effekts auf das Gastrointestinal-System ist Diclofenac als Modellsubstanz zur Analyse der Lebertoxizität ungeeignet. Obwohl weibliche Ratten sensibler sind als männliche Ratten, stellen sie zusammen mit Diclofenac unter den gewählten Bedingungen kein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung einer Lebertoxizität dar. Mögliche Anpassungen wären die Verlängerung des Behandlungszeitraums sowie die Anpassung der Dosis oder der Art der Applikation. Die Gallensäure-Profile in weiblichen und männlichen Ratten zeigten Korrelationen mit histopathologischen Befunden, den etablierten Serummarkern und der Genexpression. Im Rahmen einer präklinischen Diagnose konnten sie keine hinreichende Evidenz für eine Diclofenac-induzierte Cholestase liefern.

3.8 Einfluss von Flutamid auf das Gallensäure-Profil in Ratten

Aufgrund der Literaturstudien zu Flutamid, die zur Auswahl der Dosis und des Behandlungszeitraums herangezogen wurden, war eine Lebertoxizität mit einhergehender Cholestase von behandelten Ratten zu erwarten (Mattes *et al.*, 2014; Yamazaki, *et al.*, 2013).

Männliche und weibliche Han-Wistar-Ratten wurden 14 Tage täglich oral mit Flutamid (Vehikel: Maiskeimöl, niedrige Dosis: 30 mg/kg KG, mittlere Dosis: 60 mg/kg KG, hohe Dosis: 120 mg/kg KG) behandelt. Jeweils drei Tiere durchliefen nach einer Hochdosis-Behandlung von 120 mg/kg KG zusätzlich eine anschließende *Recovery*-Phase von 14 Tagen. An den Tagen 2, 9 und 14 wurde allen Tieren zur Bestimmung der Serummarker und der Gallensäure-Plasmakonzentrationen Blut abgenommen. An Tag 14 und an Tag 28 wurden die Tiere seziert.

3.8.1 Histopathologie

Bei der Sektion zeigten männliche Ratten ab 60 mg/kg KG Flutamid und weibliche Ratten ab 30 mg/kg KG Flutamid eine vergrößerte Leber. Absolute Lebergewichte waren in beiden Geschlechtern in allen Dosisgruppen erhöht (Tabelle 69). Die mikroskopische Auswertung ergab bei beiden Geschlechtern eine hepatozelluläre Hypertrophie ab einer mittleren Dosis von 60 mg/kg KG. Der Schweregrad der Veränderung stieg mit der Dosis von Grad 1 (minimal) auf Grad 3 (moderat). Das Zytoplasma der hypertrophen Leberzellen war stärker basophil angefärbt. Dieser Befund trat bei Männchen ab einer Dosis von 30 mg/kg KG auf (Grad 1). Bei männlichen Tieren traten in allen Dosisgruppen zytoplasmatische Alterationen von Hepatozyten charakterisiert durch basophile Ansammlungen im Zytoplasma auf, bei weiblichen Tieren ab 60 mg/kg KG Flutamid (Tabelle 70). Hinsichtlich der Anzahl der betroffenen Tiere und des auftretenden Schweregrads waren weibliche Ratten geringfügig sensitiver als männliche Tiere. Die beschriebenen Befunde wurden als adaptiv eingestuft. Nach 14 Tagen Erholung wurden keine Veränderungen mehr festgestellt, alle Leberorgane waren vollständig regeneriert.

Tabelle 69 Absolute Lebergewichte unbehandelter und behandelter Ratten mit Flutamid. Gruppe 01 (0 mg/kg KG), Gruppe 02 (30 mg/kg KG), Gruppe 03 (60 mg/kg KG), Gruppe 04 (120 mg/kg KG). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05, **p < 0.01.

Geschlecht	Männchen				Weibchen				
	Gruppe	01	02	03	04	01	02	03	04
Tiere (n)	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert/g	11,06	11,51	13,53**	15,23**	7,10	8,15*	8,89**	10,39**	
± SD	0,777	0,744	0,357	1,18	0,324	0,929	0,703	0,358	

Tabelle 70 Histopathologische Leberbefunde bei männlichen und weiblichen Ratten nach der Behandlung mit Flutamid.

Geschlecht	Männchen				Weibchen			
	0	30	60	120	0	30	60	120
Dosis/mg/kg KG								
Anzahl Tiere	6	6	6	6	6	6	6	6
Hypertrophie: hepatozellulär	-	-	6	6	-	-	6	6
Grad 1	-	-	4	-	-	-	2	-
Grad 2	-	-	2	3	-	-	4	1
Grad 3	-	-	-	3	-	-	-	5
Zytoplasmatische Alteration		1	3	6			6	6
Grad 1	-	1	1	2	-	-	1	-
Grad 2	-		2	4	-	-	4	1
Grad 3	-		-	-	-	-	1	4
Grad 4	-		-	-	-	-	-	1

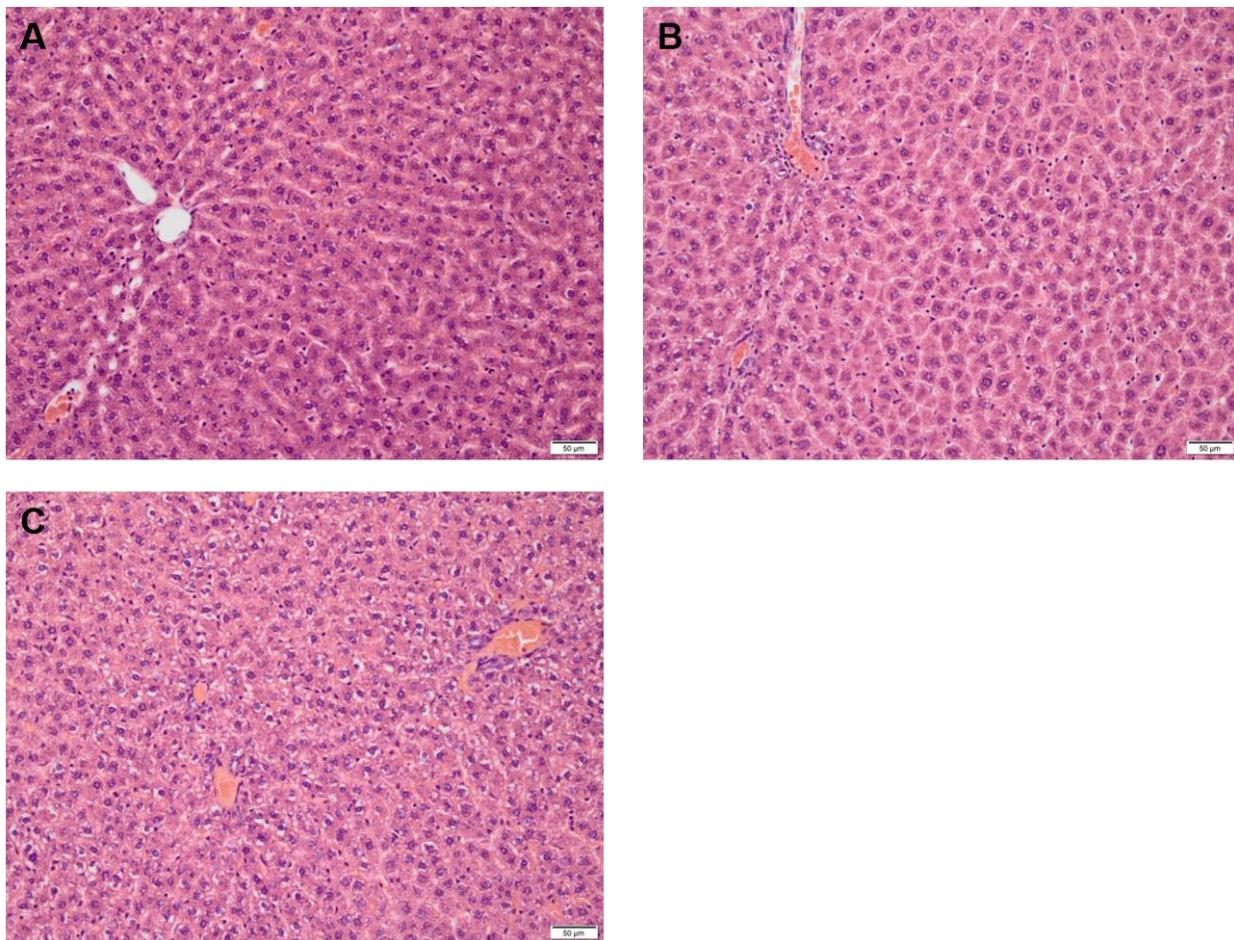


Abbildung 79 Leberschnitte von weiblichen Ratten nach Hämatoxylin-Eosin Färbung. (A) Kontrolle: keine Veränderungen, (B) Hochdosis-Gruppe (120 mg/kg KG): Leberzellhypertrophie (vergrößerte Hepatozyten), Zytoplasma-Veränderung und (C) Recovery: keine Veränderung. Die Aufnahmen wurden 20-fach vergrößert mit einer Skalierung von 50 µm.

3.8.2 Klinische Chemie

Männliche Ratten der Niedrig- und Hochdosis-Gruppe zeigten eine signifikant erhöhte γ GT-Aktivität ab Tag 9. Der dosis-abhängige Anstieg der γ GT-Aktivität an Tag 14 war in der 60 mg/kg KG- und der 120 mg/kg KG-Gruppe signifikant (Abbildung 80 A). Bei den anderen Serumenzymen kam es zu keinen signifikanten Veränderungen während der Behandlung (Anhang-Abbildung A8). Bei den weiblichen Ratten der Hochdosis-Gruppe erhöhte sich die Aktivität der γ GT signifikant ab Tag 9 (Abbildung 80 B). Andere Serummarker zeigten keine auffälligen Veränderungen während der Behandlung (Anhang-Abbildung A9).

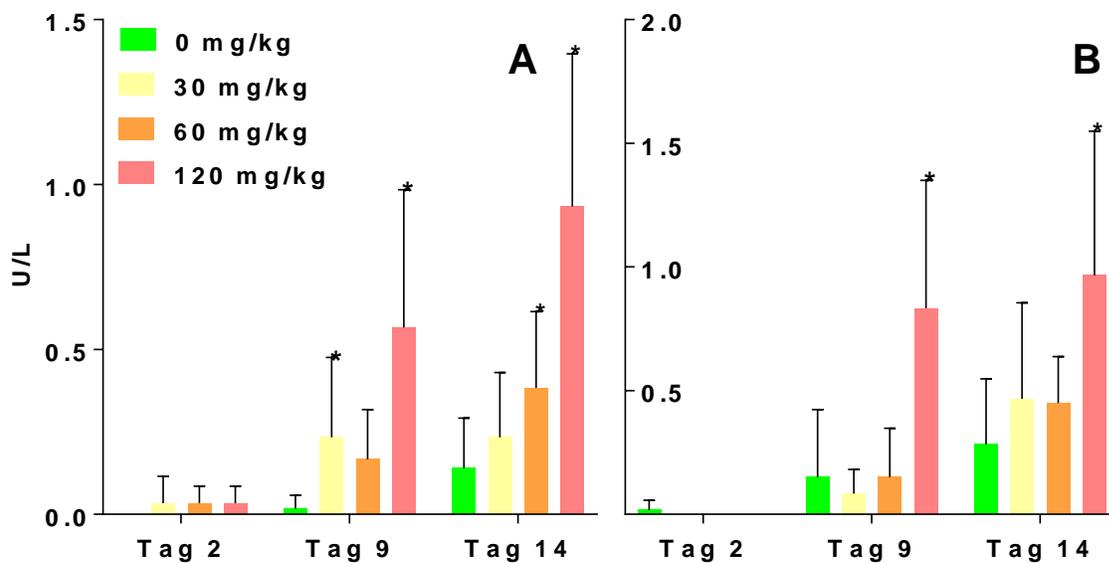


Abbildung 80 Aktivitäten der γ GT bei männlichen (A) und weiblichen Ratten (B) nach Behandlung mit Flutamid. Dargestellt sind die MW \pm SD (n=6 pro Gruppe) für die einzelnen Zeitpunkte. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

Daneben kam es bei den männlichen Ratten zu einem signifikanten Anstieg von Cholesterin ab Tag 2 in der Niedrig- und Hochdosis-Gruppe. An Tag 9 war Cholesterin nur noch in der Hochdosis-Gruppe signifikant erhöht. An Tag 14 war der Unterschied nicht mehr statistisch signifikant. Die Triglyzeride waren ab Tag 2 in den mit 30 mg/kg KG und den mit 60 mg/kg KG Flutamid behandelten Tieren signifikant erhöht. Dagegen wurden an Tag 9 (hohe Dosis) und an Tag 14 (mittlere und hohe Dosis) signifikant erniedrigte Triglycerid-Konzentrationen gemessen (Abbildung 81).

Bei den weiblichen Ratten gab es, mit Ausnahme des signifikanten Anstiegs der γ GT-Aktivität, keine Auffälligkeiten im klinischen Profil (Anhang-Abbildung A9).

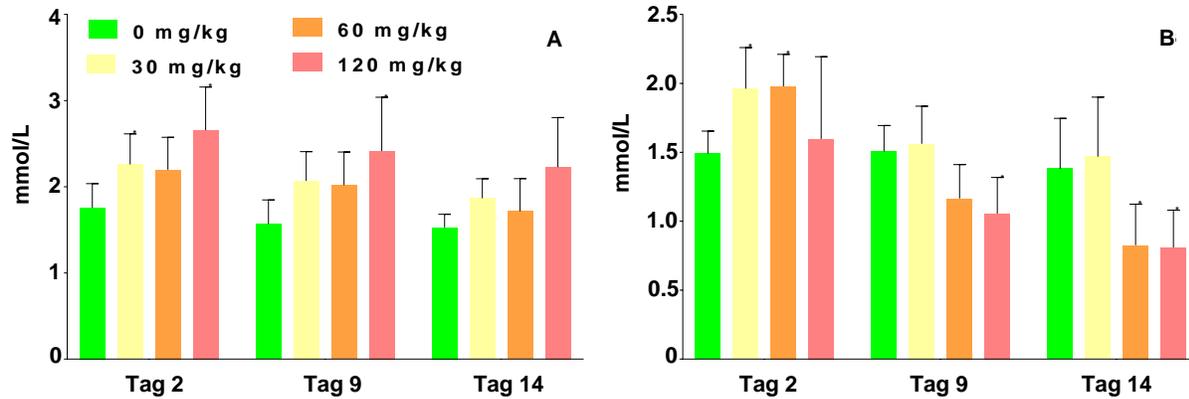


Abbildung 81 Serumkonzentration von Cholesterin (A) und Triglyceriden (B) in männlichen Ratten unter Flutamid-Exposition. Dargestellt sind die MW \pm SD (n=6 pro Gruppe) für die einzelnen Zeitpunkte. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

3.8.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber

Männliche Ratten der Hochdosis-Gruppe zeigten signifikant erhöhte Gewebekonzentrationen von MCA(a), MCA(b) und MCA(o). Nach der Erholungsphase sanken die Konzentrationen wieder auf Basalwerte ab (Abbildung 82 A). Bei anderen Gallensäuren traten in keiner Dosisgruppe Veränderungen im Lebergewebe auf (Anhang-Abbildung A10 A). Nach der Erholungsphase kam es zu einem signifikanten Abfall der Konzentrationen von GCA, GCDCA, GDCA und GUDCA (Anhang-Abbildung A10 B). Bei den weiblichen Ratten betrafen die signifikanten Erniedrigungen lediglich TCA und TMCA(a+b) (mittlere Dosis und hohe Dosis nach *Recovery*) (Abbildung 82 A). Weitere Gallensäuren zeigten keine Veränderungen gegenüber der Kontrolle.

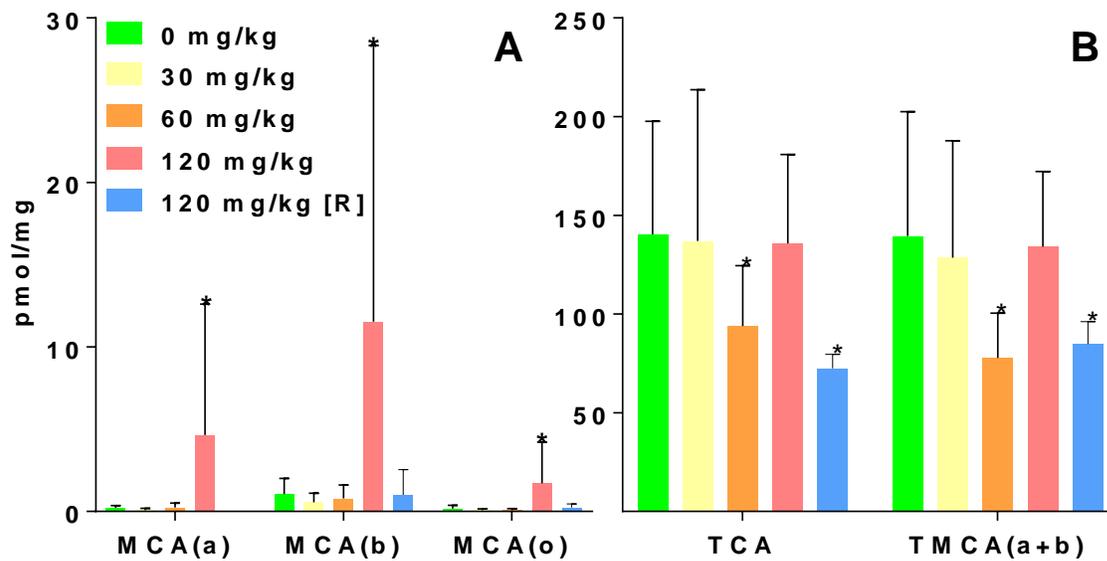


Abbildung 82 Gallensäure-Konzentrationen im Lebergewebe männlicher (A) und weiblicher (B) Ratten (an Tag 2, 9 und 14) unter Flutamid-Exposition und nach einer 14-tägigen *Recovery-Phase* (R). Dargestellt sind MW \pm SD (n=6 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

3.8.4 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma

Die deutlichste signifikante Veränderung im Plasma männlicher Ratten betraf CA. Die ersten signifikant erhöhten Konzentrationen traten ab Tag 2 in der Niedrig- und Hochdosis-Gruppe auf. An Tag 9 waren die Werte in der Niedrig- und Hochdosis-Gruppe signifikant erhöht und an Tag 14 in der Gruppe mit der mittleren Dosis (Abbildung 83). Weitere signifikante Erhöhungen betrafen CDCA (Tag 2 Niedrig- und Hochdosis-Gruppe) und MCA(a) (Tag 2 Hochdosis-Gruppe) (Anhang-Abbildung A12). Darüber hinaus wurden keine weiteren Veränderungen der Gallensäure-Plasmakonzentrationen verzeichnet. Nach der *Recovery-Phase* von 14 Tagen war die CA- Plasmakonzentration signifikant erniedrigt (Anhang-Abbildung A13). Durch die multivariate Datenanalyse konnten keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden.

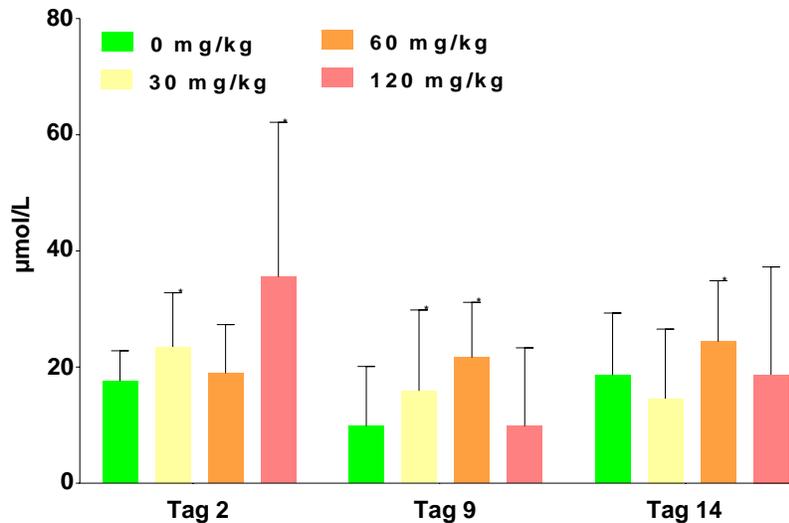


Abbildung 83 CA-Konzentrationen im Plasma männlicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Flutamid-Exposition. Dargestellt sind MW \pm SD (n=5/6 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

Bei weiblichen Ratten zeigten die Gallensäure-Plasmakonzentrationen bereits ab Tag 2 der Behandlung mit Flutamid signifikante Veränderungen auf. Betroffen war CA ab Tag 2 mit einem Abfall der Konzentration bei niedriger und hoher Dosierung. An Tag 9 erhöhten sich die Konzentrationen bei allen Dosierungen und an Tag 14 zeigten sich erhöhte Konzentrationen bei mittlerer und hoher Dosierung. Die Konzentrationen von CDCA erhöhten sich bei hoher Dosierung an Tag 9 und 14 (Abbildung 84). Weitere Veränderungen traten unter Flutamid oder nach der *Recovery*-Phase nicht auf. Durch die multivariate Datenanalyse konnten keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden.

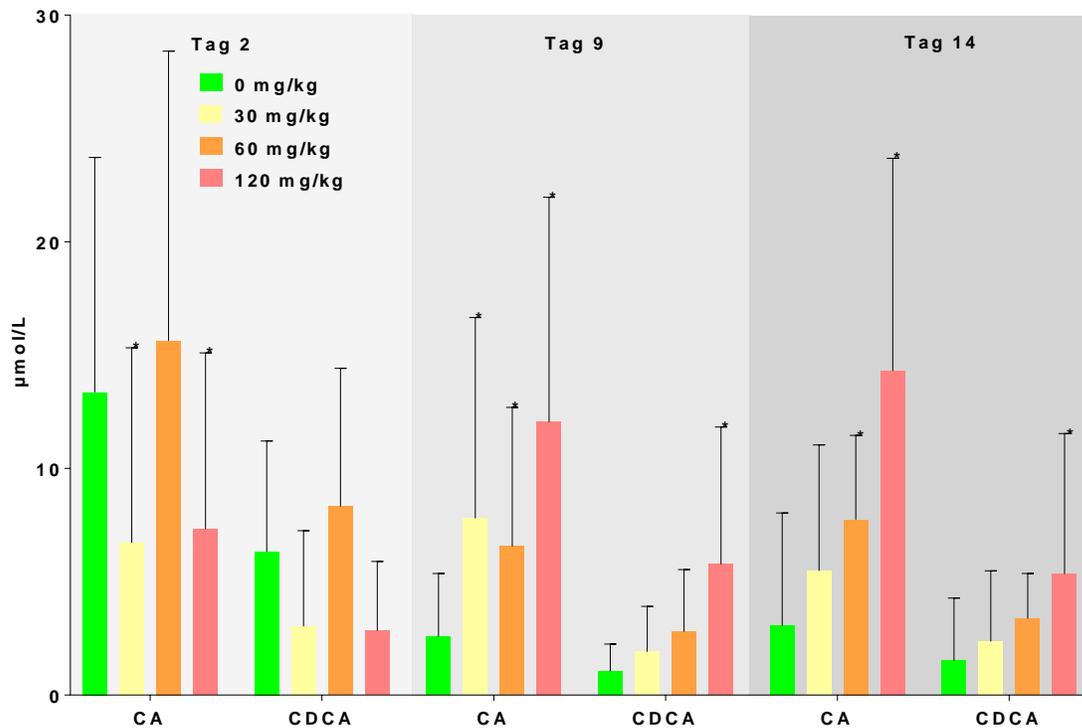


Abbildung 84 Gallensäure-Konzentrationen im Plasma weiblicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Flutamid-Exposition. Dargestellt sind MW \pm SD (n=5/6 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

3.8.5 Untersuchung der Genexpression des Gallensäure-Metabolismus im Lebergewebe

Die Flutamid-Behandlung männlicher Ratten führte zu verschiedenen Veränderungen der Expression von für die Gallensäure-Biosynthese wichtigen Genen. Betroffen waren CYP8b1 (dosis-abhängige Induktion), CYP7b1 (Hemmung ab 60 mg/kg KG Flutamid), ACOT8 und CYP7A1 (Abbildung 85). Der stärkste Effekt trat bei den Transportern auf. Veränderungen betrafen MRP3 (dosis-abhängige Induktion), NTCP (dosis-abhängige Hemmung), ABCG5/ABCG8 (dosis-abhängige Induktion) und MDR1b (Induktion in der Hochdosis-Gruppe). Veränderungen in der Expression von Genen, die bei der Regulation der Gallensäure-Homöostase eine Rolle spielen, waren bei SHP (Hemmung ab 60 mg/kg KG Flutamid) detektierbar. Nach einer 14-tägigen Recovery-Phase erhöhte sich die Expression von CYP7A1 und CYP8B1. Die Expression der Gene normalisierte sich wieder, mit Ausnahme von SHP, dessen Expression erniedrigt blieb (Abbildung 85).

Bei weiblichen Ratten führte eine Flutamid-Behandlung zu Expressionsänderungen bei CYP7A1 (Hemmung bei 60 mg/kg KG Flutamid, Induktion bei 120 mg/kg KG Flutamid). Bei den Transportern wurde die Expression von MRP3 (wie bei den männlichen Tieren), MDR1b und MRP4 dosis-abhängig induziert. Bei den Genen, die für die Regulation der Gallensäure-Homöostase zuständig sind, zeigte sich ein dosis-abhängiger Anstieg der Expression von PPAR γ (Abbildung 87).

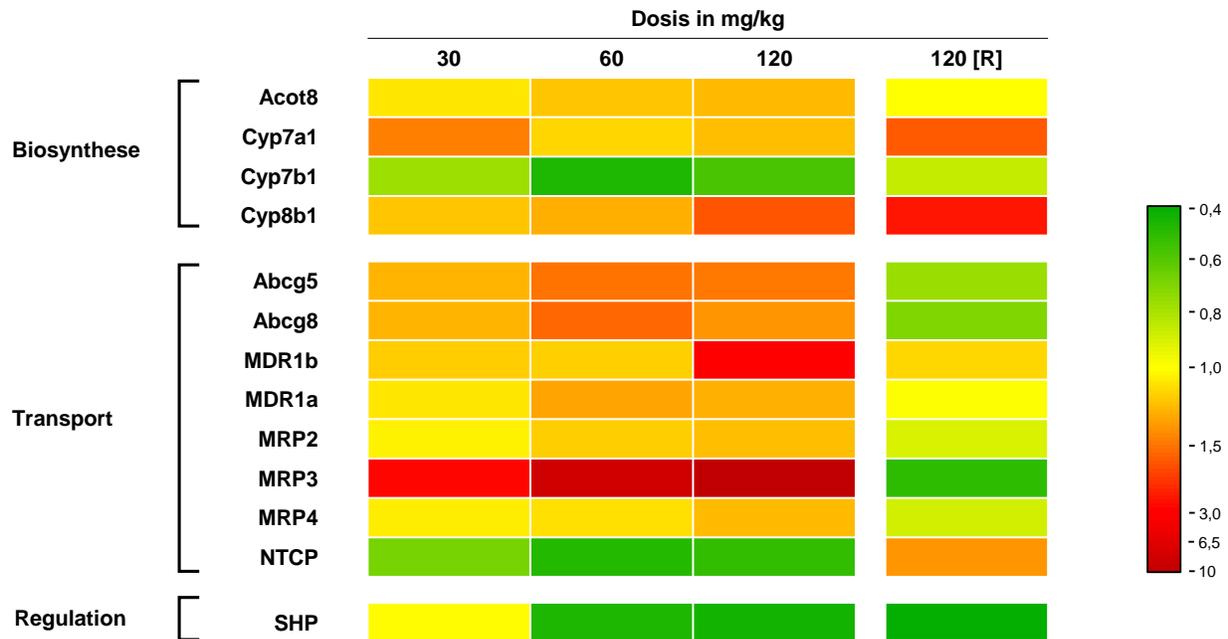


Abbildung 85 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Flutamid-Exposition (n=6 pro Gruppe) und nach einer 14-tägigen *Recovery-Phase* (R, n=3) in männlichen Ratten. 0 mg/kg KG [Kontrolle], 30 mg/kg KG [niedrige Dosis], 60 mg/kg KG [mittlere Dosis], 120 mg/kg KG [hohe Dosis]. In der *Heat Map* ist das arithmetische Mittel der relativen Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) dargestellt.

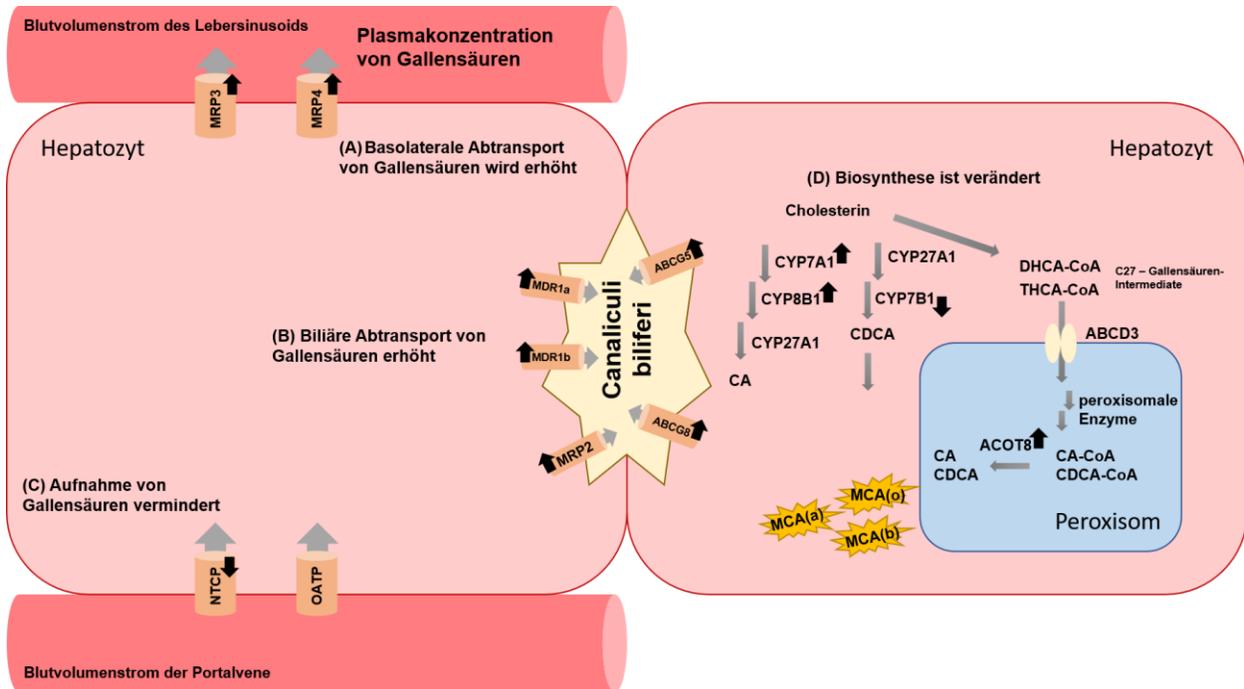


Abbildung 86 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Flutamid in männlichen Ratten. Die Abbildung spiegelt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und des Gallensäure-Profilings der Hochdosis-Gruppe (150 mg/kg KG) wider. Hierbei wurde auf der rechten Seite der peroxisomale Biosyntheseschritt von Gallensäuren vereinfacht dargestellt und diejenigen Gene wurden mit einem schwarzen Pfeil markiert, deren Transkription signifikant erhöht oder erniedrigt war. Die Richtung des Pfeils symbolisiert dabei den Anstieg oder die Erniedrigung der Transkriptionsrate. Analog sind auf der linken Seite die Transportsysteme vereinfacht dargestellt. Gelb-markierte Gallensäuren stellen einen analytisch nachgewiesenen Konzentrationsanstieg der jeweiligen Gallensäuren dar. Auszüge dieser Darstellung sind angelehnt an (Baes, et al., 2016; Ferdinandusse, et al., 2006).

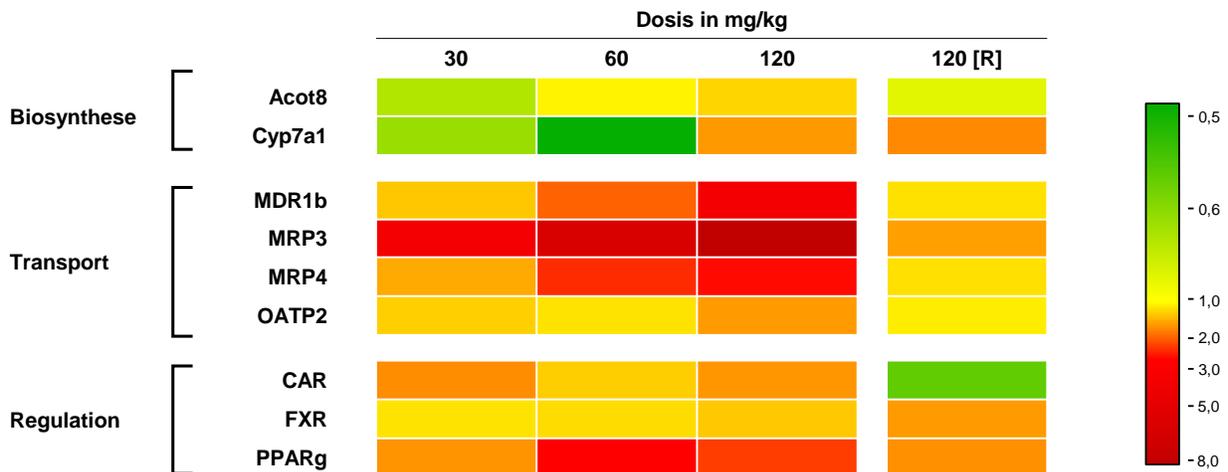


Abbildung 87 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Flutamid-Exposition (n=6 pro Gruppe) und nach einer 14-tägigen Recovery-Phase (R, n=3) in weiblichen Ratten. 0 mg/kg KG [Kontrolle], 30 mg/kg KG [niedrige Dosis], 60 mg/kg KG [mittlere Dosis], 120 mg/kg KG [hohe Dosis]. In der Heat Map ist das arithmetische Mittel der relativen Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) dargestellt.

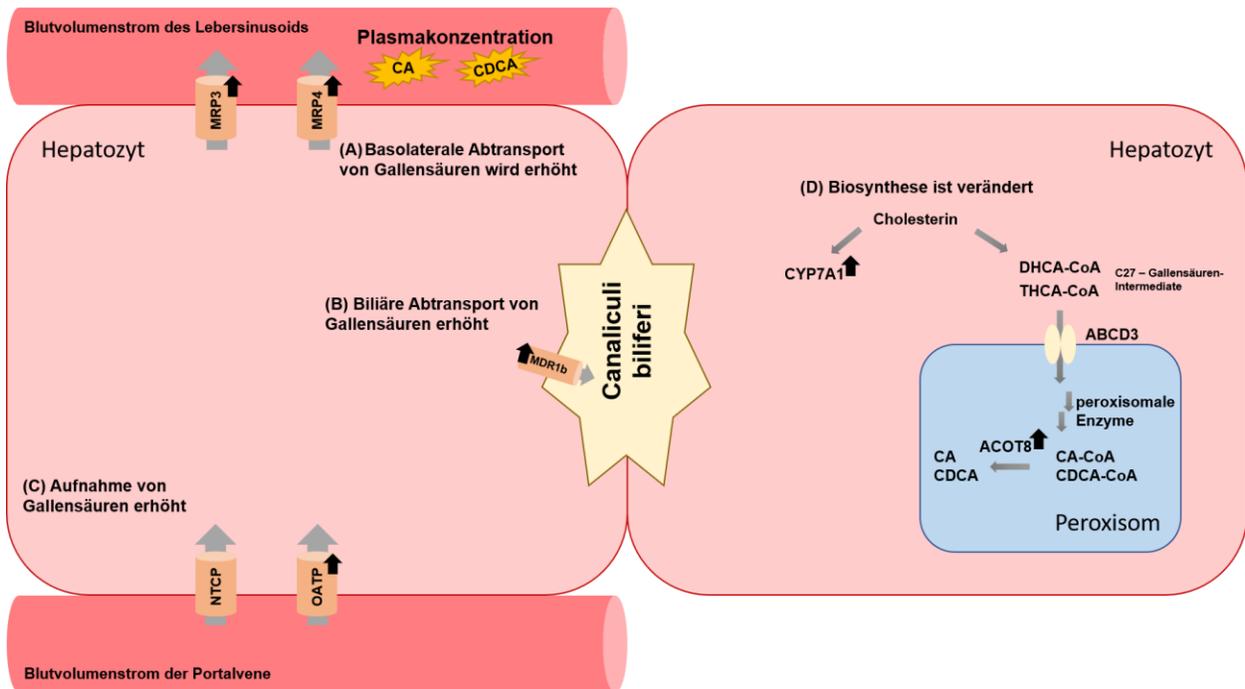


Abbildung 88 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Flutamid in weiblichen Ratten. Die Abbildung spiegelt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und des Gallensäure-Profilings der Hochdosis-Gruppe (150 mg/kg KG) wider. Hierbei wurde auf der rechten Seite der peroxisomale Biosyntheseschritt von Gallensäuren vereinfacht dargestellt und diejenigen Gene wurden mit einem schwarzen Pfeil markiert, deren Transkription signifikant erhöht oder erniedrigt war. Die Richtung des Pfeils symbolisiert dabei den Anstieg oder die Erniedrigung der Transkriptionsrate. Analog sind auf der linken Seite die Transportsysteme vereinfacht dargestellt. Gelb-markierte Gallensäuren stellen einen analytisch nachgewiesenen Konzentrationsanstieg der jeweiligen Gallensäuren dar. Auszüge dieser Darstellung sind angelehnt an (Baes, et al., 2016; Ferdinandusse, et al., 2006).

3.8.6 Diskussion

Der hepatotoxische Mechanismus von Flutamid ist nicht hinreichend verstanden. Flutamid wird hepatisch metabolisiert, wobei möglicherweise über CYP3A4 ein toxisches Intermediat gebildet wird (LiverTox, 2015a). Vermutlich begünstigt die hepatotoxische Wirkung des Flutamids eine Cholestase (Cicognani *et al.*, 1996; Iwanaga *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 1996). Zur Induktion einer Cholestase wurde Flutamid in der vorliegenden Studie in drei Dosierungen (niedrige Dosis: 30 mg/kg KG, mittlere Dosis: 60 mg/kg KG, hohe Dosis: 120 mg/kg KG) verabreicht.

Laut den histopathologischen Befunden induziert Flutamid in den Ratten eine adaptive metabolische Leistungssteigerung der Leber. Diese Effekte sind nicht ungewöhnlich bei Applikationen von Xenobiotika und werden meist in Verbindung mit weiteren hepatischen Effekten (z. B. Proliferation des endoplasmatischen Retikulums) diskutiert (Greaves, 2012; Thoolen, *et al.*, 2010b), die in der vorliegenden Studie nicht auftraten. Die gesteigerten Aktivitäten der γ GT im Serum der Ratten waren das einzige Indiz, dass ein frühes Stadium einer intrahepatischen Cholestase beschreiben könnte. Das Enzym ist jedoch allein nicht ausreichend spezifisch, um eine Cholestase zu identifizieren (Padda, *et al.*, 2011).

Männliche Ratten zeigten ansteigende Gewebekonzentrationen muricholierter Gallensäuren bei 120 mg/kg KG Flutamid. In dieser Gruppe traten auch die stärksten histopathologischen und klinischen Befunde auf. In den *Recovery*-Tieren waren die Konzentrationen der Glycin-Konjugate trotz fehlender klinischer und histologischer Befunde signifikant erniedrigt. Eine mögliche Erklärung dafür besteht darin ist, dass das Vehikel Maiskeimöl die Gewebekonzentrationen Glycin-konjugierter Gallensäuren zusätzlich beeinflusst und die hepatotoxische Wirkung des Flutamids kumulativ erhöht hat. Weibliche Ratten wiesen bei fehlender Dosis-Abhängigkeit (kein Effekt bei 120 mg/kg KG Flutamid) erniedrigte Gewebekonzentrationen von TCA und TMCA(a+b) auf. Auch die *Recovery*-Tiere zeigten signifikant erniedrigt Werte im Vergleich zur Kontrolle, möglicherweise wiederum aufgrund der ausgesetzten Applikation von Maiskeimöl. Bei weiblichen Ratten traten ebenfalls keine klinischen und histologischen Auffälligkeiten auf.

In männlichen Ratten zeigte bei fehlender Dosis-Abhängigkeit ausschließlich CA eine signifikant veränderte Plasmakonzentration unter Flutamid-Exposition (Abbildung 83). In weiblichen Ratten kam es unter Flutamid zu einem Anstieg von CA und CDCA im Plasma. Der Effekt zeigte eine bessere Relation zur applizierten Dosis (signifikante Anstiege für die mittlere Dosis ab Tag 9 und für die hohe Dosis ab Tag 2) (Abbildung 84). Weibliche Tiere erwiesen sich im Vergleich zu männlichen bezüglich mikroskopischen Befunden und Veränderungen der primären Gallensäuren als geringfügig sensitiver. Die Flutamid-Behandlung führte in der vorliegenden Studie nicht zu einem spezifischen Endpunkt einer Nekrose, Cholestase oder Steatose. Bei

solchen Befunden zeigten in anderen Studien konjugierte Gallensäuren einen signifikanten Anstieg (Lou *et al.* 2014; Slopianka *et al.*, 2017; Yamazaki *et al.*, 2013). Wie schon bei Diclofenac stiegen die Plasmakonzentrationen primärer Gallensäuren dennoch stark an. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass die Veränderung primärer Gallensäuren im Plasma geeignet ist, eine Hypertrophie anzuzeigen, bevor u. a. Leberzellnekrosen oder Cholestase erreicht werden.

Die mit Flutamid behandelten männlichen Ratten zeigten diverse Veränderungen der Expression von für die Gallensäure-Homöostase relevanten Genen. Von einer Expressionssteigerung betroffen waren Gene des klassischen Synthesewegs (CYP7A1, CYP8B1), der peroxisomalen Reifung (ACOT8) sowie des alternativen Metabolismus primärer Gallensäuren CYP7B1 (Chiang, 2017). Die dosis-abhängige Erhöhung der Expression von MDR1a/b und MRP2 sowie von MRP3 und MRP4 weisen auf einen verstärkten biliären und basolateralen Efflux von Gallensäuren aus dem Hepatozyten hin. Gleichzeitig wurde die Gallensäure-Aufnahme in den Hepatozyten dosis-abhängig durch eine verringerte Expression von NTCP reduziert. Die dosis-abhängige Abnahme der Expression des SHP-Gens führte zu einer gesteigerten Expression des Enzyms CYP7A1. Die erhöhten Cholesterin-Werte im Serum könnten auf einer erhöhten Expression der Efflux-Transporter ABCG5 und ABCG8 beruhen, die das Cholesterin in die Gallengänge abtransportieren.

Die Analyse der Genexpression von weiblichen Ratten gab ebenfalls Hinweise auf eine auf verschiedenen Ebenen dysregulierte Gallensäure-Homöostase. Leicht betroffen war u. a. die peroxisomale Reifung von Gallensäure-Intermediaten durch eine verstärkte Expression des ACOT8-Gens. Die bei der niedrigen und mittleren Dosis gesunkene und bei der hohen Dosis gesteigerte Expression von CYP7A1 wirkt sich auf die Synthese primärer Gallensäuren aus. In der Hochdosis-Gruppe zeigten die weiblichen Tiere nicht signifikant erhöhte CA-Konzentrationen in der Leber (Anhang-Abbildung A11). Die Aufnahme von Gallensäuren in die Hepatozyten konnte in der Hochdosis-Gruppe aufgrund einer erhöhten Expression von OATP2 nicht nachgewiesen werden. Der biliäre Gallensäure-Efflux über MDR1b und der basolaterale Abtransport ins Blut über MRP3/4 waren dosis-abhängig erhöht, was mit den dosis-abhängig erhöhten Plasmakonzentrationen von CA und CDCA an Tag 14 korrelierte (Abbildung 88). Eine dosis-abhängige Steigerung der FXR-Expression trat bei weiblichen Tieren nicht auf. Dieser Rezeptor ist die zentrale Steuereinheit der Gallensäure-Homöostase in Hepatozyten. FXR bindet Gallensäuren mit unterschiedlichen Affinitäten (Ding *et al.*, 2015). Studien an cholestatichen Ratten ergaben, dass eine Aktivierung des Rezeptors die Gallensäure-Biosynthese inhibiert und den Gallensäure-Efflux aus Hepatozyten erhöht (Cariello, *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2014a). Die erhöhte Expression des PPAR γ -Gens in allen Behandlungsgruppen verweist auf einen Einfluss

von Funktionen im Lipid-Metabolismus (Souza-Mello, 2015). Die Expression des Rezeptors CAR war in allen Behandlungsgruppen erhöht. Dabei handelt es sich möglicherweise um einen adaptiven Mechanismus: Der gesteigerte hepatische basolaterale Efflux soll die intrazellulär ansteigende Gallensäure-Konzentrationen ausgleichen (Halilbasic *et al.*, 2013a). Studien an Nagern mit induzierter Cholestase könnten diese Hypothese unterstützen, da eine Aktivierung der Expression des CAR-Rezeptors die Gallensäure-Gewebekonzentrationen erniedrigt (Lickteig, *et al.*, 2016). CAR wird durch Xenobiotika aktiviert, nicht aber durch eine Gallensäure-Akkumulation in Hepatozyten (Li, *et al.*, 2015). Die Ergebnisse der Gallensäure-Profile korrelierten mit den Resultaten der Genexpression. Daher stellen weibliche Ratten – trotz nicht induzierter Cholestase – ein gutes Modellsystem für die Analyse der Hepatotoxizität von Flutamid dar.

In der tierexperimentellen Studie wurde Flutamid als Modellsubstanz zur Induktion einer Cholestase in männlichen und weiblichen Ratten benutzt. Zusammenfassend wurde durch die Applikation von Flutamid eine histopathologisch nachgewiesene Hypertrophie in den behandelten Tieren induziert. Die klinisch-chemischen Biomarker konnten diese Veränderungen in der Leber teilweise detektieren. Die quantitative Analyse von Gallensäuren in Plasma und Leberhomogenat zeigte eindeutig signifikante Veränderungen bei den weiblichen Ratten. Die veränderten Gallensäure-Profile konnten in beiden Geschlechtern ermittelt werden und könnten zusammen mit klinisch-chemischen Biomarkern eine erhöhte Sensitivität zur Detektion einer Hypertrophie erzielen. Die Transkriptionsanalyse von relevanten Genen des Metabolismus von Gallensäuren zeigte Veränderungen in der Genexpression, die teilweise mit veränderten Gallensäure-Profilen korrelierten.

3.9 Einfluss von Methotrexat auf das Gallensäure-Profil in Ratten

Aufgrund von Literaturstudien zu Methotrexat, die zur Auswahl der Dosis und des Behandlungszeitraums herangezogen wurden, war eine Lebertoxizität mit hepatozellulären Nekrosen und einhergehender Steatose von behandelten Ratten zu erwarten (Mattes, et al., 2014).

Männliche und weibliche Han-Wistar-Ratten wurden 14 Tage lang täglich intraperitoneal mit Methotrexat (Vehikel: NaCl, niedrige Dosis: 0,05 mg/kg KG, mittlere Dosis: 0,15 mg/kg KG, hohe Dosis: 0,5 mg/kg KG) behandelt. Jeweils drei Tiere durchliefen nach einer Hochdosis-Behandlung zusätzlich eine anschließende *Recovery*-Phase von 14 Tagen. An den Tagen 2, 9 und 14 wurde allen Tieren zur Bestimmung der Serummarker und der Gallensäure-Plasmakonzentrationen Blut abgenommen. An Tag 14 und an Tag 28 wurden die Tiere seziiert.

3.9.1 Histopathologie

Die Methotrexat-Behandlung führte in beiden Geschlechtern nicht zu vergrößerten Organen. Auch die mikroskopischen Befunde waren unauffällig (Abbildung 89). Hepatozelluläre Veränderungen traten nicht auf. Die Befunde lassen vermuten, dass keine dosis-abhängigen Effekt in der Leber auftreten.

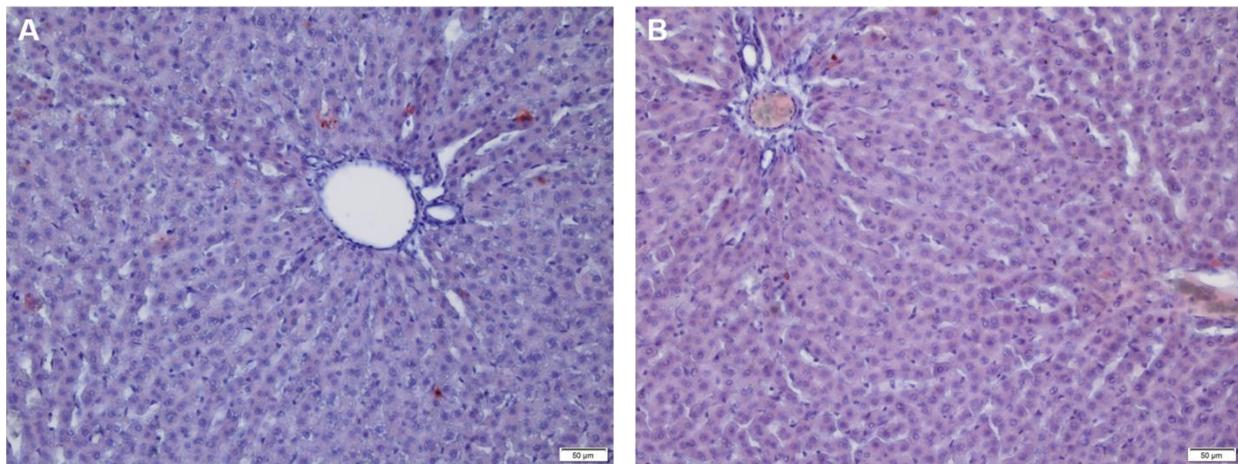


Abbildung 89 Histopathologische Befunde weiblicher Ratten unter Methotrexat-Exposition. Representative Leberschnitte nach Ölrot Färbung aus der (A) Kontrolle und (B) Hochdosis-Gruppe (0,5 mg/kg KG). Es gibt keine nachweisbare Fettablagerung in der Leber von behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolle. Die Ausschnitte wurden 20-fach vergrößert, mit einer Skalierung von 50 µm.

3.9.2 Klinische Chemie

Männliche Ratten zeigten eine signifikant erniedrigte APh-Aktivität in allen Dosisgruppen ab Tag 2 (Abbildung 90). Die anderen Serummarker zeigten keine Veränderungen unter Methotrexat. In der *Recovery*-Gruppe traten keine Veränderungen der Serummarker auf (Anhang-Abbildung A16). Bei den weiblichen Ratten kam es im Behandlungszeitraum und in der *Recovery*-Gruppe zu keinen Veränderungen der Serummarker (Anhang-Abbildung A17).

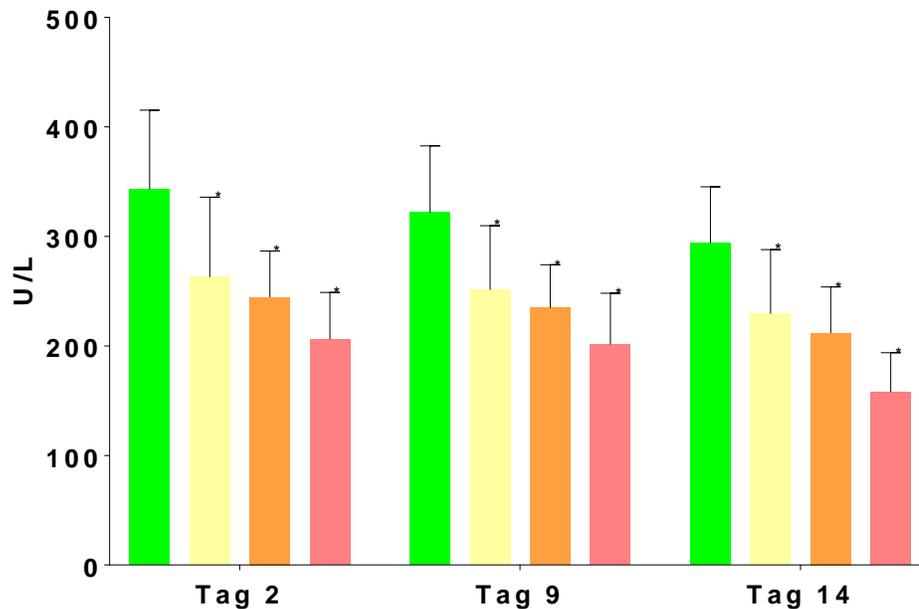


Abbildung 90 Aktivitäten der APh bei männlichen Ratten nach Behandlung mit Methotrexat. Dargestellt sind die $MW \pm SD$ ($n=6$ pro Gruppe) für die einzelnen Zeitpunkte. Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: * $p < 0.05$.

3.9.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber

Unter Methotrexat-Behandlung und nach der *Recovery*-Phase kam es weder bei männlichen noch bei weiblichen Ratten zu einer Veränderung der Gallensäure-Gewebekonzentrationen (Anhang-Abbildung A18, Anhang-Abbildung A19). Die multivariate Datenanalyse erbrachte keine neuen Erkenntnisse.

3.9.4 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma

Bei männlichen Ratten kam es unter Methotrexat-Behandlung zu keinen dosis-abhängigen Veränderungen der Gallensäuren im Plasma. Ausschließlich CA zeigte eine signifikante Erhöhung an Tag 2 in der Niedrig- und eine signifikante Abnahme an Tag 2 und 9 in der Hochdosis-Gruppe (Abbildung 91). An Tag 14 waren die Plasmakonzentrationen der behandelten Tiere nicht von der Kontrollgruppe zu unterscheiden (Abbildung 91). Durch die multivariate Datenanalyse konnten keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden.

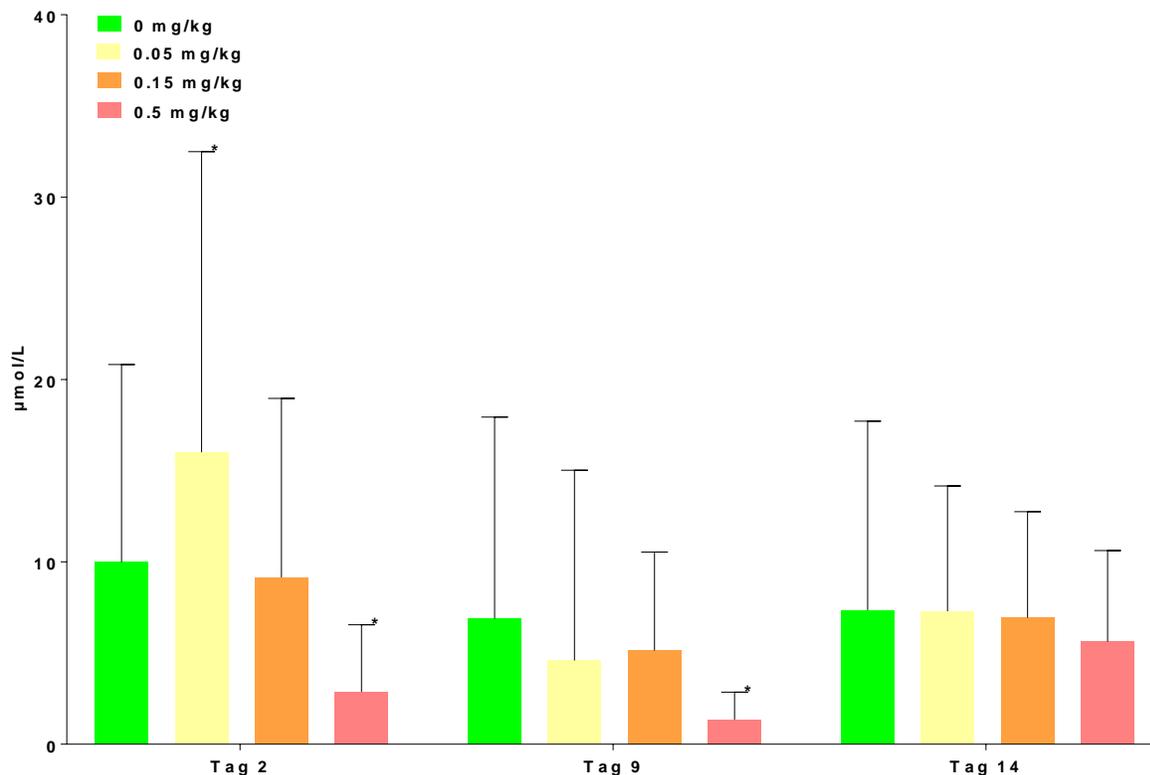


Abbildung 91 CA-Konzentrationen im Plasma männlicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Methotrexat-Exposition Dargestellt sind MW \pm SD (n=6 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05.

Bei weiblichen Ratten zeigte die Methotrexat-Behandlung keine dosis-abhängigen Veränderungen der Gallensäure-Plasmakonzentration. Signifikante Anstiege betrafen die konjugierte Gallensäure TCDCA (Tag 2, mittlere Dosis), TCA und TCDCA (Tag 9, hohe Dosis) und die primäre Gallensäure CDCA (Tag 14, hohe Dosis) (Abbildung 92). Auch nach der *Recovery*-Phase wurden keine signifikanten Veränderungen von Gallensäuren im Plasma festgestellt. Durch die multivariate Datenanalyse konnten keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden.

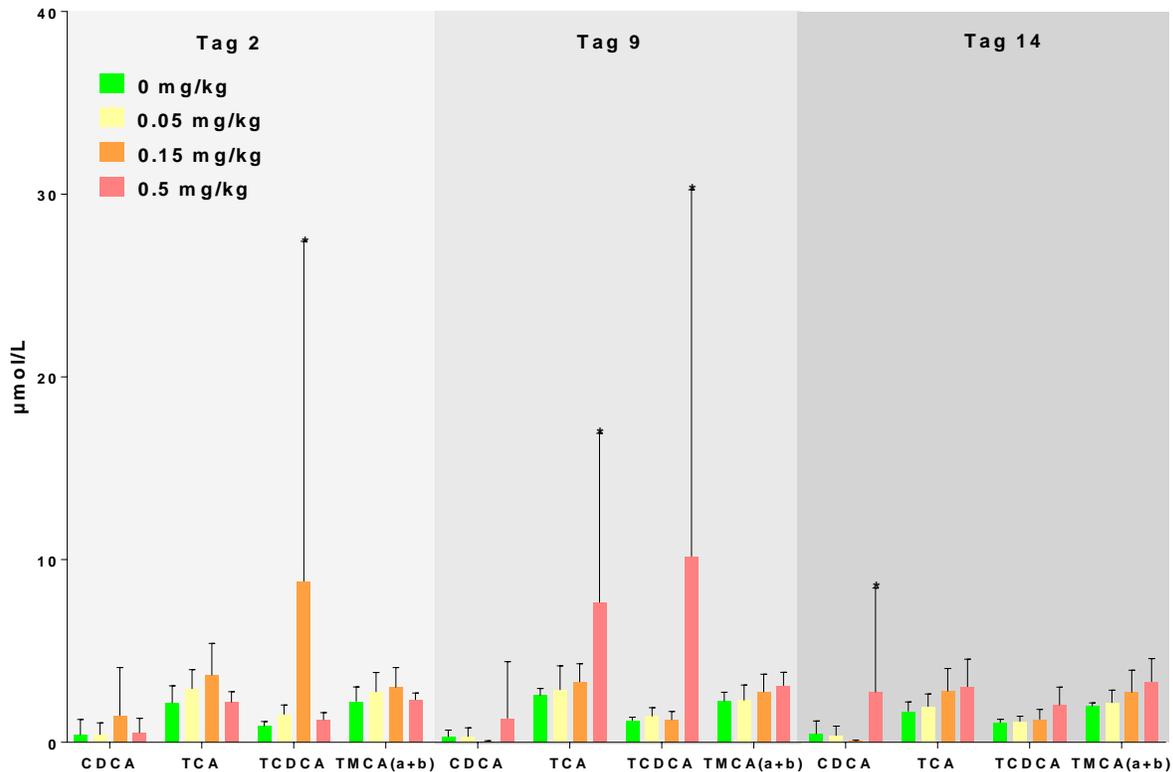


Abbildung 92 Gallensäure-Konzentrationen im Plasma weiblicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Methotrexat-Exposition. Dargestellt sind MW ± SD (n=6 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen ermittelt: *p < 0.05

3.9.5 Untersuchung der Genexpression des Gallensäure-Metabolismus im Lebergewebe

Von den Genen, die in der Gallensäure-Biosynthese eine Rolle spielen, waren in männlichen Ratten CYP7A1 (Hemmung, mittlere und hohe Dosis) und CYP8b1 (Induktion, hohe Dosis, Normalisierung nach der *Recovery*-Phase) von einer Methotrexat-abhängigen Expressionsänderung betroffen. Bei den Transportern kam es zu einer Expressionsänderung u. a. bei MDR2/3 (Induktion, alle Dosierungen). Bei SHP, welches die Gallensäure-Homöostase steuert und reguliert, kam es zu einer Hemmung in allen Dosierungen (Abbildung 94).

In weiblichen Ratten kam es unter Methotrexat-Behandlung zu einer gesteigerten Expression der Gene für CYP7A1, CYP7B1 und CYP8B1 (alle Dosierung). Die erhöhte Expression persistierte für CYP7a1 und CYP7B1 nach der *Recovery*-Phase. Bei den Transporter-Genen erniedrigte sich die Expression unter Methotrexat-Behandlung (vor allem in der Hochdosis-Gruppe) bis auf MDR2/3 und OATP2. Bei den für die Regulation der Gallensäure-Homöostase verantwortlichen

Genen waren in allen Dosisgruppen CAR, PPAR α und PPAR γ von einer Induktion sowie der *Liver-X-receptor* (LXR) und SHP von einer Hemmung der Expression betroffen (Abbildung 93).

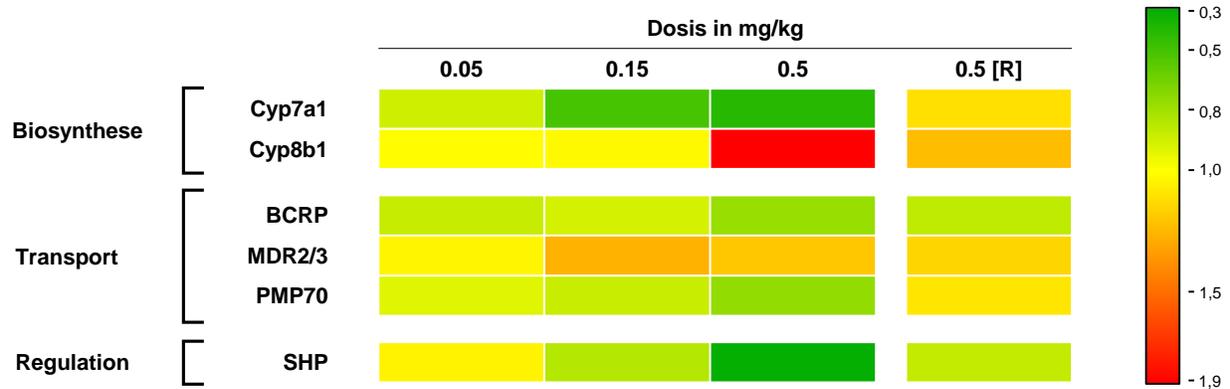


Abbildung 93 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Methotrexat-Exposition (n=6 pro Gruppe) und nach einer 14-tägigen *Recovery-Phase* (R, n=3) in männlichen Ratten. 0 mg/kg KG [Kontrolle], 0,05 mg/kg KG [niedrige Dosis], 0,15 mg/kg KG [mittlere Dosis], 0,5 mg/kg KG [hohe Dosis]. In der *Heat Map* ist das arithmetische Mittel der relativen Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) dargestellt.

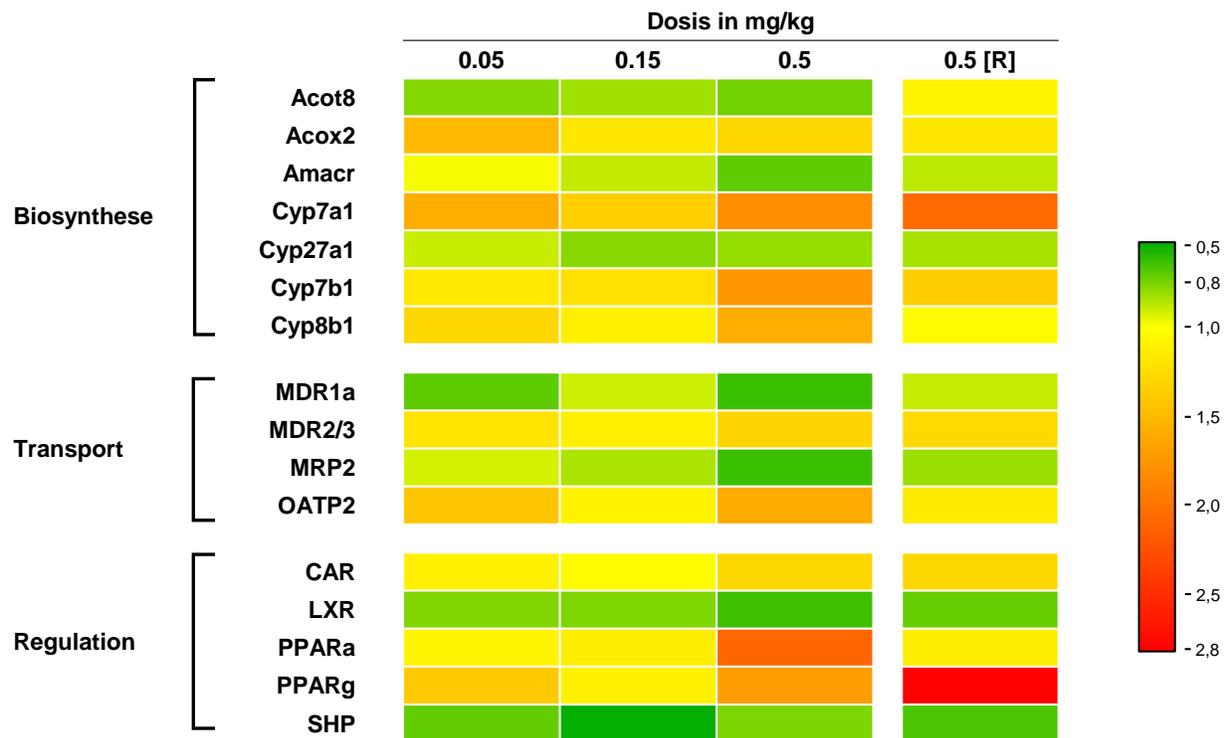


Abbildung 94 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Methotrexat-Exposition (n=6 pro Gruppe) und nach einer 14-tägigen *Recovery-Phase* (R, n=3) in weiblichen Ratten. 0 mg/kg KG [Kontrolle], 0,05 mg/kg KG [niedrige Dosis], 0,15 mg/kg KG [mittlere Dosis], 0,5 mg/kg KG [hohe Dosis]. In der *Heat Map* ist das arithmetische Mittel der relativen Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) dargestellt.

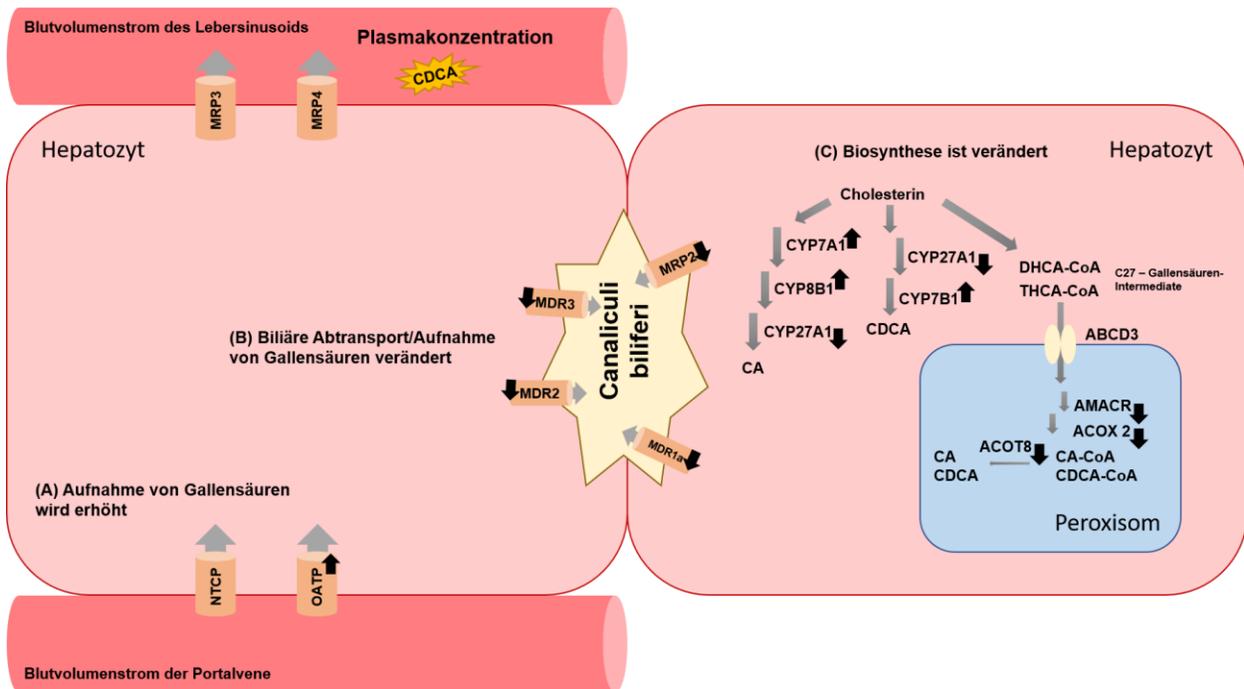


Abbildung 95 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Methotrexat in weiblichen Ratten. Die Abbildung spiegelt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und des Gallensäure-Profilings der Hochdosis-Gruppe (0,5 mg/kg KG) wider. Hierbei wurde auf der rechten Seite der peroxisomale Biosyntheseschritt von Gallensäuren vereinfacht dargestellt und diejenigen Gene wurden mit einem schwarzen Pfeil markiert, deren Transkription signifikant erhöht oder erniedrigt war. Die Richtung des Pfeils symbolisiert dabei den Anstieg oder die Erniedrigung der Transkriptionsrate. Analog sind auf der linken Seite die Transportsysteme vereinfacht dargestellt. Gelb-markierte Gallensäuren stellen einen analytisch nachgewiesenen Konzentrationsanstieg der jeweiligen Gallensäuren dar. Auszüge dieser Darstellung sind angelehnt an (Baes, et al., 2016; Ferdinandusse, et al., 2006).

3.9.6 Diskussion

Der hepatotoxische Mechanismus von Methotrexat ist nicht bekannt. Methotrexat ist ein Inhibitor der Dihydrofolatreduktase, der zu einer Unterbrechung der Nukleotid-Biosynthese und damit zu einer Hemmung der RNA- und DNA-Synthese führt (LiverTox, 2015b). Ein möglicher Mechanismus der Lebertoxizität ist ein aktiver Metabolit des Methotrexats, Methotrexat-Polyglutamat (MTXglu). Dieser Metabolit beeinflusst die Synthese von Folsäure, was ein Absinken der Konzentration von Folsäure in der Leberzelle verursacht und somit dort die DNA-Synthese beeinträchtigt (Bath, et al., 2014).

In der vorliegenden Studie mit einer täglich wiederholten intraperitonealen Applikation von Methotrexat in drei Dosierungen (niedrige Dosis: 0,05 mg/kg KG, mittlere Dosis: 0,15 mg/kg KG, hohe Dosis: 0,5 mg/kg KG) konnten keine histologischen Anzeichen einer hepatozellulären Toxizität festgestellt werden. Von den klinisch-chemischen Serummarkern zeigte ausschließlich APh bei männlichen Ratten eine signifikante dosis-abhängige Reaktion auf Methotrexat (Abbildung 90). Dieser Befund gibt Hinweise auf einen durch Methotrexat ausgelösten defekten Knochenmetabolismus. Eine dauerhafte Behandlung von Ratten erzeugt eine massive Absenkung der Knochendichte und eine schwere Osteopenie (May *et al.*, 1994).

Eine Veränderung der Gallensäure-Profile im Lebergewebe männlicher und weiblicher Ratten wurde nicht detektiert. Bei männlichen Tieren kamen vereinzelt erniedrigte CA-Konzentrationen vor, allerdings nur bis Tag 9. Bei weiblichen Ratten traten vereinzelt erhöhte TCA-, TCDCA- und CDCA-Plasmakonzentrationen während der Behandlung auf.

Die Expressionsanalyse in männlichen Ratten ergab eine dosis-abhängige Absenkung der CYP7A1-Expression. Da das Enzym für die Synthese primärer Gallensäuren zuständig ist, könnte dieser Befund die Abwesenheit von CA und CDCA in den Behandlungsgruppen im Lebergewebe und die erniedrigten Plasmakonzentrationen an Tag 2 und 9 der Behandlung erklären. Die verstärkte Expression von CYP8B1 könnte ein Hinweis auf einen adaptiven Mechanismus sein. An Tag 14 waren die Plasmakonzentrationen von CA und CDCA stark erhöht. Die Expression von Genen für Gallensäure-Transporter war teilweise erhöht und teilweise erniedrigt, was die ausbleibenden Veränderungen der Gallensäure-Homöostase erklären könnte. Die erniedrigte Expression von PMP70 könnte ein erstes Indiz für eine reduzierte peroxisomale Aufnahme von Gallensäure-Intermediaten sein, woraus eine Abnahme von primären Gallensäuren resultieren könnte (Rembacz *et al.*, 2010; Wanders, 2014). Bei den regulativen Genen fiel die erniedrigte Expression des transkriptionalen Repressors SHP mit einer parallelen Erniedrigung der Expression von CYP7A1 auf. Insgesamt korrelierten die Ergebnisse der Genexpression mit den Gallensäure-Profilen männlicher Ratten und den Befunden im Rahmen der klassischen klinischen

Evaluierung. Das Genexpressionsprofil weiblicher Ratten zeigt vielfältige Veränderungen, ohne einen signifikanten Einfluss auf die Gallensäure-Profile aufzuweisen. Gene der Biosynthese, wie ACOT, AMACR und CYP27A1, wurden vermindert exprimiert. Gleichzeitig waren andere Gene der Biosynthese, wie z. B. CYP7A1, CYP7B1 und CYP8B1, erhöht exprimiert. Dieses Ergebnis spiegelt sich nicht in reduzierten Konzentrationen primärer Gallensäuren im Lebergewebe wider. Die verminderte Expression von Transportern könnte im Zusammenhang mit der gesteigerten Plasmakonzentration von CDCA stehen (Abbildung 95). Als Agonist von PPAR γ kann Methotrexat in den hepatischen Lipid-Metabolismus eingreifen (Begriffe, et al., 2011; Shahin et al., 2011). Parallel hemmt Methotrexat die Expression von LXR, wodurch der Cholesteroll-Metabolismus beeinflusst wird (Coomes et al., 2011). Die zahlreichen Veränderungen im Genprofil unter Methotrexat lassen sich kaum mit dem ermittelten Gallensäure-Profil in Übereinstimmung bringen. Insgesamt verhielten sich die Gallensäuren in der Methotrexat-Studie eher unauffällig und waren nicht mit einem Leberschaden in Verbindung zu bringen.

3.10 Korrelation zwischen verschiedenen Arten der Leberschädigung und unterschiedlichen Gallensäure-Profilen im Plasma von Ratten

In den *In-vivo*-Studien wurden mit drei Toxinen Amitriptylin, Methapyrilen und Valproinsäure histopathologische Befunde einer Nekrose (Methapyrilen), einer hepatozellulären Hypertrophie mit dem Auftreten von Vakuolen (Valproinsäure) und der Einlagerung von Lipiden (Amitriptylin) induziert. In diesen Studien wurden die Kontrolltiere mit dem gleichen Vehikel Wasser und über die gleiche Applikationsroute behandelt. Dadurch war eine Vergleichbarkeit der Gallensäure-Profile in der multivariaten Datenanalyse gewährleistet. Dabei ging es vor allem um die Frage, ob Gallensäure-Profile nicht nur spezifisch für eine Lebertoxizität sind, sondern auch eine Aussage über die Art der Lebertoxizität zulassen. Die vorläufige Analyse ergab, dass sich die Gallensäure-Profile bei einer Nekrose von denen bei einer makrovesikulären Steatose unterscheiden.

Die Modellsubstanzen Amitriptylin, Methapyrilen und Valproinsäure führten zu histologisch nachweisbaren, hepatozellulären Veränderungen, die in einer kombinierten Diskriminanzanalyse (OPLS-DA) für männliche Ratten näher untersucht wurden. Dabei zeigte sich, dass die Behandlungen mit Methapyrilen und Amitriptylin bei den histopathologisch auffälligen Tieren mit unterschiedlichen Gallensäure-Profilen im Plasma einhergingen, die durch Veränderung von Konzentrationen individueller Gallensäuren gekennzeichnet waren (Abbildung 96 A). Beispielsweise waren bezogen auf die jeweiligen Kontrollen die erhöhten Konzentrationen von CA, CDCA und MCA(a) bei Versuchstieren mit einer Amitriptylin-induzierten Steatose höher als bei solchen mit einer Methapyrilen-induzierten Nekrose und der einhergehenden hepatobiliärer Schädigung. Die erhöhten Konzentrationen von CA, CDCA und MCA(a) im Plasma korrelierten mit einer induzierten Steatose und könnte ein spezifisches Profil für diese Art der Lebertoxizität im Plasma von Ratten darstellen (Abbildung 96 B). Weiterhin waren die TCA-Plasmakonzentrationen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle bei einer Methapyrilen-induzierten Nekrose mit hepatobiliärer Schädigung deutlich höher als bei einer Amitriptylin-induzierten Steatose (Abbildung 96). Weitere Gallensäuren, für die ein, wenn auch geringerer, Anstieg der Konzentrationen im Plasma bei der Methapyrilen-induzierten Lebertoxizität zu verzeichnen war, umfassten TMCA(a+b), TCDCA, TDCA, GCA, DCA, HDCA, MCA(b) und MCA(o). Erhöhte Konzentrationen von konjugierten und sekundären Gallensäuren im Plasma von Ratten könnten demnach eventuell Hinweise auf eine arzneimittel-induzierte Leberzellnekrose mit parallel verlaufender hepatobiliärer Toxizität liefern, wobei der Kausalzusammenhang in weiterführenden Studien noch genauer untersucht werden müsste. Die Valproinsäure-Behandlung führte zwar auch zu Veränderungen im Gallensäuren-Profil im Plasma, jedoch waren die Veränderungen im

Vergleich zu den anderen beiden Modelltoxinen nicht so stark ausgeprägt, was sich in einer geringeren Entfernung der Gallensäure-Profile der behandelten Tiere von denen der Kontrolltiere entlang der $t[1]$ - und $t[2]$ -Achsen im OPLS-DA Plot zeigt. Die Ausprägung der Valproinsäure induzierten hepatozellulären Hypertrophie mit Einlagerungen von Vakuolen in das Leberparenchym waren zu wenig fortgeschritten. Das veränderte Gallensäure-Profil im Plasma von behandelten Ratten kann daher nicht eindeutig einer ausgeprägten Lebertoxizität wie z. B. einer Nekrose, Steatose oder Cholestase zugeordnet werden.

Die Befunde liefern einen ersten Anhaltspunkt dafür, dass es möglich ist, anhand von Gallensäure-Profilen im Plasma die Art des Leberschadens zu bestimmen. Dies könnte für ein Monitoring von laufenden Studien genutzt werden und die Analyse mit etablierten klinisch-chemischen Parametern unterstützen.

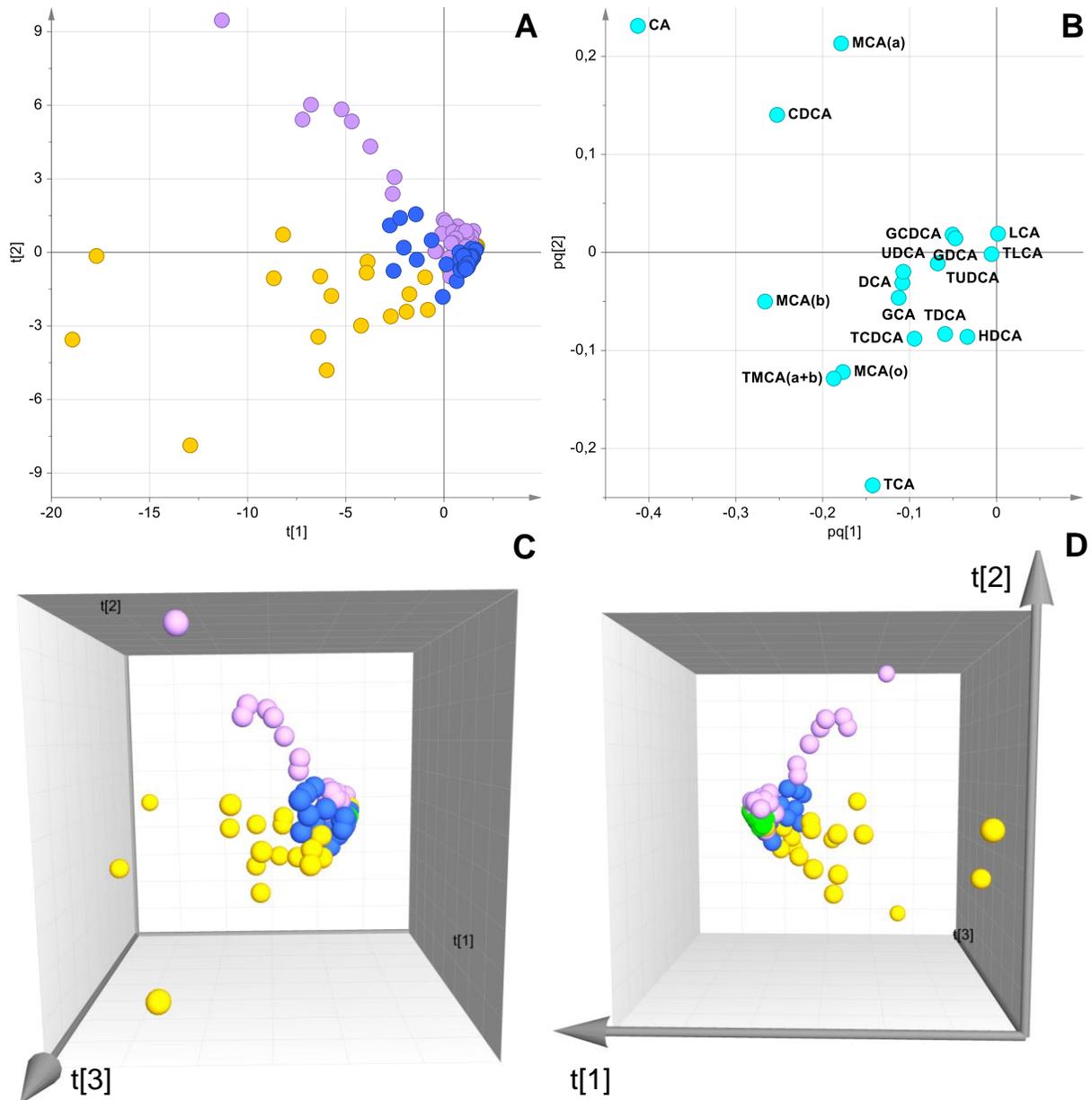


Abbildung 96 OPLS-DA basierend auf den Gallensäure-Profilen im Plasma männlicher Ratten nach Behandlung mit Amitriptylin [violett], Methapyrilen [gelb] und Valproinsäure [blau], Kontrolle [grün] über die gesamte Studiendauer von 14 Tagen. (A, C) Score Scatter Plots, (B, D) Loading Scatter Plots der Gallensäuren, die für die Verteilung der Versuchstiere in den Score Scatter Plots verantwortlich sind. (A, B) zweidimensionale (C, D) dreidimensionale Darstellung.

3.11 Gallensäure-Profilung im Supernatant von *In-vitro*-kultivierten Rattenhepatozyten

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Gallensäure-*Profiling* in den Überständen von *Sandwich*-Rattenhepatozyten-Kulturen dargestellt. Ein Ziel dieser Experimente war es, die Lebertoxizität in einem zellbiologischen System anhand von Gallensäure-Profilen im Überstand des Zellkulturmediums zu untersuchen. In einem ersten Experiment wurde das Gallensäure-Profil im Kulturmedium des Zellsystems analysiert. In einem zweiten Experiment wurde die metabolische Kompetenz des zellbiologischen Systems untersucht. Hierfür wurden die primären Gallensäuren CA und CDCA dem Zellkulturmedium zugesetzt und nach regelmäßiger Abnahme des Mediums das Gallensäure-Profil untersucht. Auf Basis der *In-vivo*-Ergebnisse der Gallensäure-Profile wurden die Modellsubstanz Flutamid und Troglitazon (BSEP-Inhibitor) ausgewählt, um im zellbiologischen System hepatozelluläre Toxizität zu induzieren. Das Gallensäure-Profil des Zellkulturmediums wurde analysiert und im Vergleich zur Kontrolle auf Veränderungen evaluiert. In einem vierten Experiment wurde versucht, die Methapyrilen-induzierte Lebertoxizität in Ratten auf das zellbiologische System zu übertragen. Die Profile der Gallensäuren im Zellkulturmedium wurden anschließend mit den Profilen der Konzentrationen der Gallensäuren im Plasma behandelter Tiere verglichen.

Ein weiteres Ziel bestand darin, anhand der Ergebnissen mit diesem zellbiologischen System zusammen mit dem LC-MS/MS basierten Gallensäure-*Profiling* ein Screening-Verfahren zu nutzen, das bereits in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung angewendet werden könnte, um eine Hepatotoxizität bereits *In vitro* besser charakterisieren zu können. Dadurch könnten potentielle hepatotoxische Arzneimittelkandidaten früher detektiert werden, wodurch Tierversuche eingespart werden könnten.

3.11.1 Gallensäureprofil im Zellkulturmedium des *In-vitro*-Assays

In einer 12-*Well*-Platte wurden $0,5 \cdot 10^6$ Leberzellen pro *Well* auf einer Kollagen-Schicht kultiviert. Über die gesamte Studiendauer (5 Tage) wurde das Nährmedium (500 μ L) täglich gewechselt. Am ersten Tag wurde der Mediumwechsel fünf Stunden nach der Aussaat der Zellen durchgeführt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden (Tag 2) wurde das Medium erneut gewechselt. Die zweite Kollagenschicht wurde an Tag 3 platziert (*Sandwich*). Die Gallensäuren in den Überständen wurden mittels LC-MS/MS quantifiziert. Während der Kultivierung der Hepatozyten waren die konjugierten Gallensäuren GCA, GCDCA, TCA, TCDCA, TMCA(a+b) sowie TUDCA im Kulturmedium fünf Tage nach der Aussaat nachweisbar (Abbildung 97).

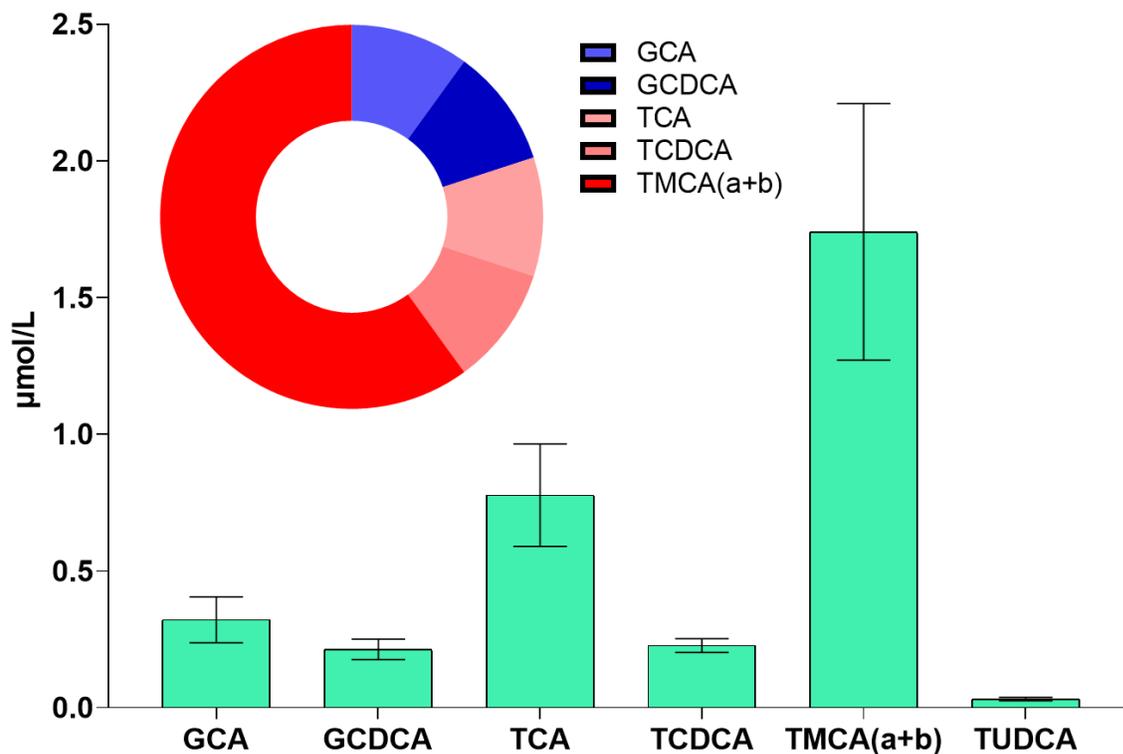


Abbildung 97 Konzentrationen ($\mu\text{mol/L}$) von Gallensäuren im Zellkulturmedium von *Sandwich-Rattenhepatozyten-Kulturen* Tag 5 nach Aussaat. Dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SD}$ ($n=6$). Daten resultieren aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.11.2 Evaluierung der metabolischen Kompetenz kultivierter Rattenhepatozyten nach Zugabe von primären Gallensäuren

In diesem Experiment wurde die metabolische Kompetenz des zellbiologischen Systems untersucht. Hierfür wurden die primären Gallensäuren CA und CDCA dem Zellkulturmedium zugesetzt und nach regelmäßiger Abnahme des Mediums wurde das Gallensäure-Profil untersucht. Das Ziel dieses Experiments war es zu untersuchen, ob die kultivierten Rattenhepatozyten die primären Gallensäuren zu konjugierten Gallensäuren verstoffwechseln.

Um das *In-vitro*-System genauer zu charakterisieren, wurde eine 12-Well-Platte mit $0,5 \cdot 10^6$ Hepatozyten pro Well 5 Tage kultiviert. Ab Tag 5 wurden die Hepatozyten einmal täglich mit den primären Gallensäuren CA und CDCA ($20 \mu\text{M}$) 3 Tage lang behandelt. Das Gallensäure-Profil im Medium aller Wells wurde ab Tag 6 bestimmt. Als Kontrollen wurden unbehandelte Ansätze mitgeführt. Unbehandelte Hepatozyten sezernierten über den Zeitraum von 3 Tagen vor allem GCA, TCA und TMCA(a+b) (Abbildung 98). Eine Behandlung mit $20 \mu\text{M}$ CA führte im

Behandlungszeitraum von 3 Tagen zu einer Akkumulation von CA im Zellkulturmedium (Abbildung 98).

Die primäre Gallensäure CDCA, die mit der gleichen Konzentration von 20 μM zugegeben wurde, scheint das bevorzugte Substrat für die Hepatozyten zu sein. Die gemessenen Konzentrationen an Tag 6 weisen darauf hin, dass diese Gallensäure bevorzugt direkt mit Glycin zu GCDCA konjugiert wird (Abbildung 98). Der Konzentrationsverlauf verändert sich nach drei Tagen der Behandlung. Hierbei bleibt GCDCA die Gallensäure mit dem höchsten Konzentrationsanteil, gefolgt von der primären Gallensäuren MCA(b) (Abbildung 98), die durch metabolische Umwandlung von CDCA entsteht. CA akkumuliert über den Behandlungszeitraum und wird kaum verstoffwechselt. Zusammenfassend belegt dieses Experiment, dass sich primäre Gallensäuren (CA/CDCA) zu konjugierten Gallensäuren in Hepatozyten verstoffwechseln lassen.

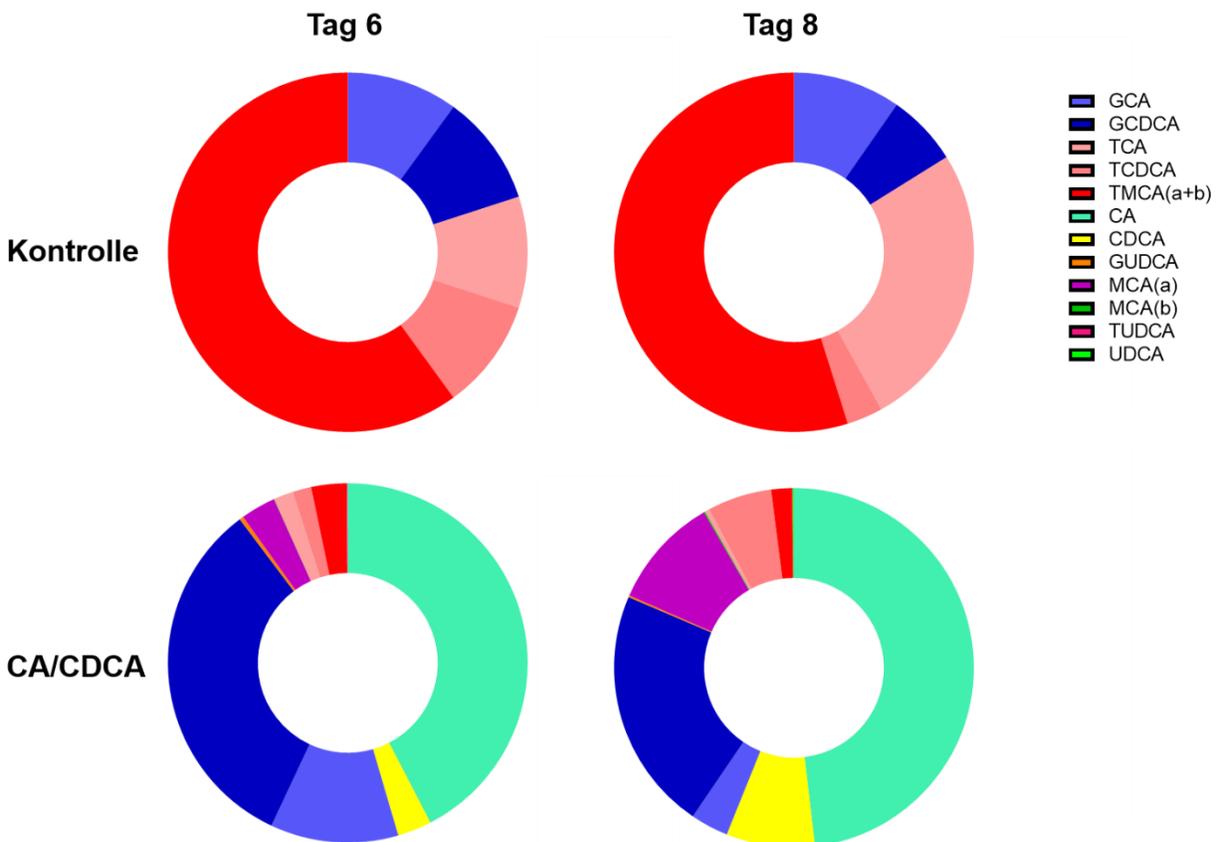


Abbildung 98 Anteile von Gallensäuren im Zellkulturmedium von mit CA und CDCA behandelten Rattenhepatozyten-Kulturen (Tag 6–8). 20 μM CDCA, (B) 20 μM CDCA. Dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SD}$ ($n=6$). Die Ergebnisse resultieren aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.11.3 Behandlung der Hepatozyten mit Troglitazon

Die vorangegangenen Versuche ergaben, dass kultivierte Rattenhepatozyten zwischen zwei Kollagenschichten limitiert in der Lage sind, Gallensäuren zu synthetisieren und primäre Gallensäuren zu konjugierten Gallensäuren zu verstoffwechseln. Im nachfolgenden Experiment wurden Hepatozyten mit dem Vehikel DMSO (1 %) und Troglitazon, einem bekannten BSEP-Inhibitor, behandelt. Parallel wurden die gleichen Untersuchungen durchgeführt, allerdings wurden die Hepatozyten schon nach der Aussaat bis hin zum Ende des Experiments an Tag 8 gleichzeitig mit 20 μM CA und CDCA behandelt.

Die Ergebnisse aus dem Experiment der Hepatozyten ohne vorherige Aktivierung von primären Gallensäuren zeigen signifikant erhöhte Konzentrationen für die konjugierten Gallensäuren GCDCA und TUDCA im Zellkulturmedium nach dreitägiger Behandlung (Abbildung 99). Hepatozyten, die neben einer Troglitazon-Exposition gleichzeitig mit primären Gallensäuren behandelte werden, zeigen doppelt so viele Veränderungen von Gallensäurekonzentrationen im Zellkulturmedium. Neben GCDCA und TUDCA sind auch GCA und GUDCA signifikant erhöht (Abbildung 100).

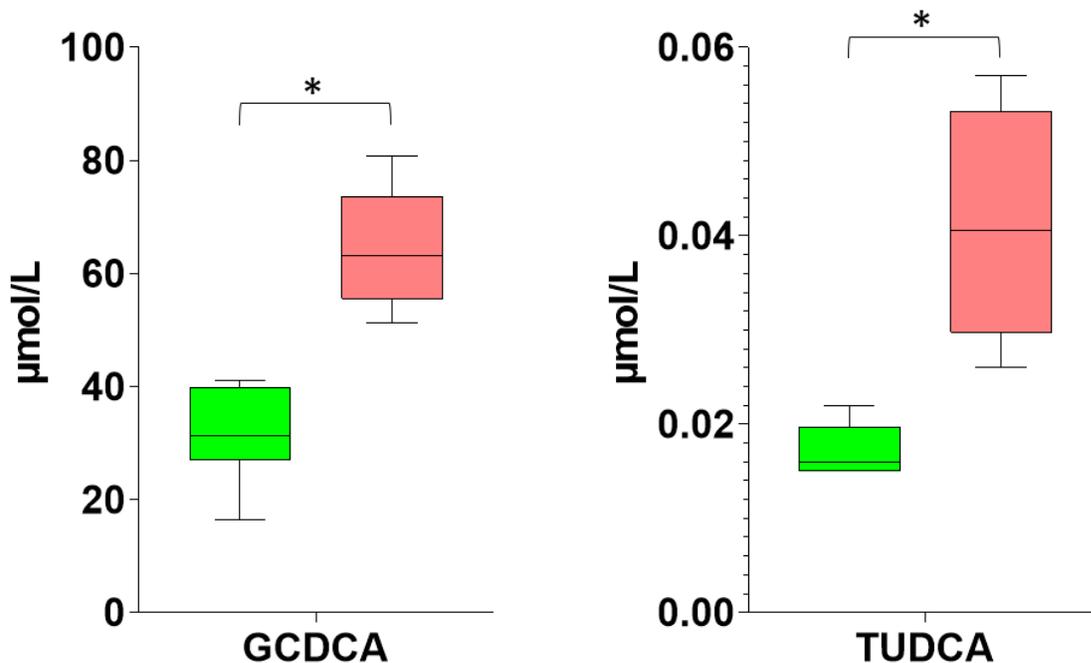


Abbildung 99 Konzentrationsverlauf GCDCA und TUDCA ($\mu\text{mol/L}$) im Zellkulturmedium von *Sandwich*-Kulturen mit Rattenhepatozyten über die Studiendauer von 3 Tagen unter Troglitazon-Behandlung. (A) Dargestellt sind die MW \pm SD (n=6 Wells). Die Ergebnisse resultieren aus 3 unabhängigen Experimenten. Kontrolle [Grün], Positivkontrolle –Troglitazon [Rot], * [$p < 0,05$] ist Signifikant verändert im Vergleich zur Kontrolle.

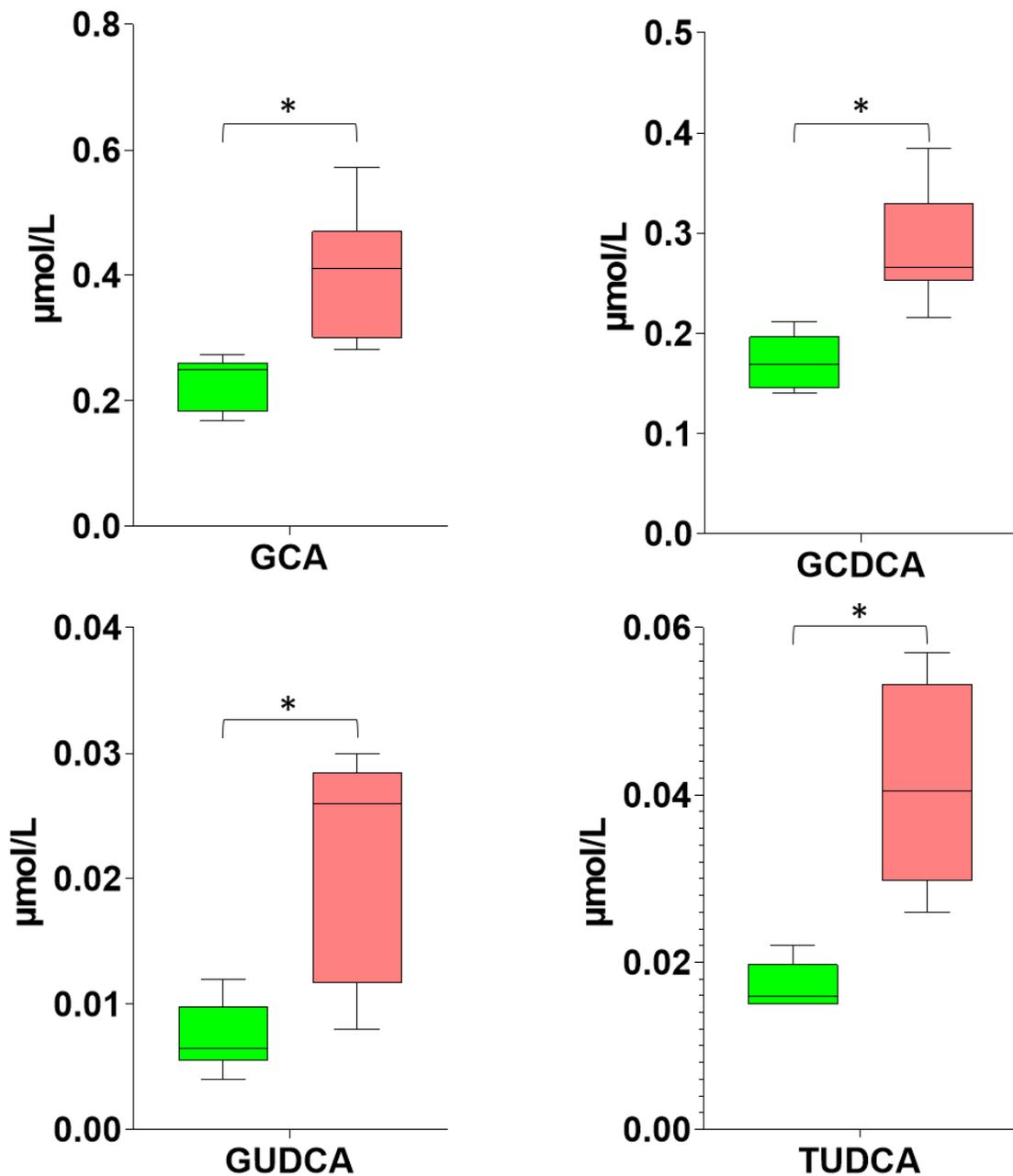


Abbildung 100 Konzentrationsverlauf GCA, GCDCA, GUDCA und TUDCA ($\mu\text{mol/L}$) im Zellkulturmedium von *Sandwich*-Kulturen mit Rattenhepatozyten über die Studiendauer von 3 Tagen unter Troglitazon-Behandlung. (A) Dargestellt sind die $\text{MW} \pm \text{SD}$ ($n=6$ Wells). Die Ergebnisse resultieren aus 3 unabhängigen Experimenten. Kontrolle [Grün], Positivkontrolle –Troglitazon [Rot], * [$p < 0,05$] ist Signifikant verändert im Vergleich zur Kontrolle.

3.11.4 Übertragbarkeit von veränderten Gallensäureprofilen im Rattenplasma auf ein *In-vitro*-Testsystem von kultivierten Rattenhepatozyten

In dieser Studie wurde mit dem Hepatotoxin Methapyrilen eine erste Untersuchung zur Übertragbarkeit von erzielten *In-vivo*-Ergebnissen zum Gallensäure-Profilings mit dem etablierten *In vitro* Testsystem der Kultivierung von Rattenhepatozyten im Sandwichdesign durchgeführt. Dazu wurden die *In-vivo*-Dosierungen in adäquate *In-vitro*-Konzentrationen für das Zellkultursystem umgewandelt. Es sollte dabei geprüft werden, ob im Kulturmedium des Testsystems vergleichbare Gallensäure-Konzentrationsveränderungen wie im Plasma behandelter Tiere auftreten. Auf der Basis von pharmakokinetischen Studien wurden die *In-vivo*-Dosierungen in adäquate *In-vitro*-Konzentrationen umgerechnet (Heise, et al., 2012). In der tierexperimentellen Studie an Ratten wurde Methapyrilen in zwei Dosierungen (Niedrig: 30 mg/kg KG, Hoch: 80 mg/kg KG) verabreicht. In Bezug auf die pharmakokinetische Studie, in der Methapyrilen mit 53 mg/kg KG an Ratten verabreicht wurde, resultierte daraus eine Konzentration von $C_{max} = 2.1 \mu\text{M}$ in der Portalvene (Heise, et al., 2012). Durch diese Erkenntnis wurde für die *In-vitro*-Studie ein Konzentrationsbereich von 1,5 μM , 5 μM und 15 μM festgelegt. Vor der Behandlung der Hepatozytenkulturen wurden während des 5-tägigen Reifungsprozesses die primären Gallensäuren CA und CDCA in einer Konzentration von 25 μM dem Zellkulturmedium zugesetzt. Ab Tag 5 startete die Behandlung mit Methapyrilen über 5 Tage mit einem täglichen Wechsel des Mediums. Veränderte TCA- und GCA-Konzentrationen traten hauptsächlich in den *In-vivo*-Ansätzen mit 80 mg/kg KG Methapyrilen auf, mit einem maximalen Konzentrationsanstieg an Tag 14 der Studie (Abbildung 101 A-B). In den *In-vitro*-Ansätzen mit 15 μM Methapyrilen kam es ab Tag 9 der Behandlung zu erhöhten GCA-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen (Abbildung 101 A1). Bei TCA erhöhten sich die Konzentrationen im Zellkulturmedium der Ansätze mit 5 μM Methapyrilen bereits ab Tag 8, der TCA-Anstieg war in den Folgetagen für alle Dosierungen erkennbar (Abbildung 101 B1). Weitere Veränderungen betrafen CA (Anstieg ab Tag 8 in der Hochdosisgruppe), GCDCA (Anstieg ab Tag 8 bei mittlerer Dosierung) und MCA(a) (Anstieg ab Tag 8 bei mittlerer und hoher Dosierung).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Evaluation von Hepatotoxizität in *Sandwich*-kultivierten Rattenhepatozyten mittels Gallensäure-Profilings wichtige Hinweise bereits auf zellulärer Ebene geben könnte.

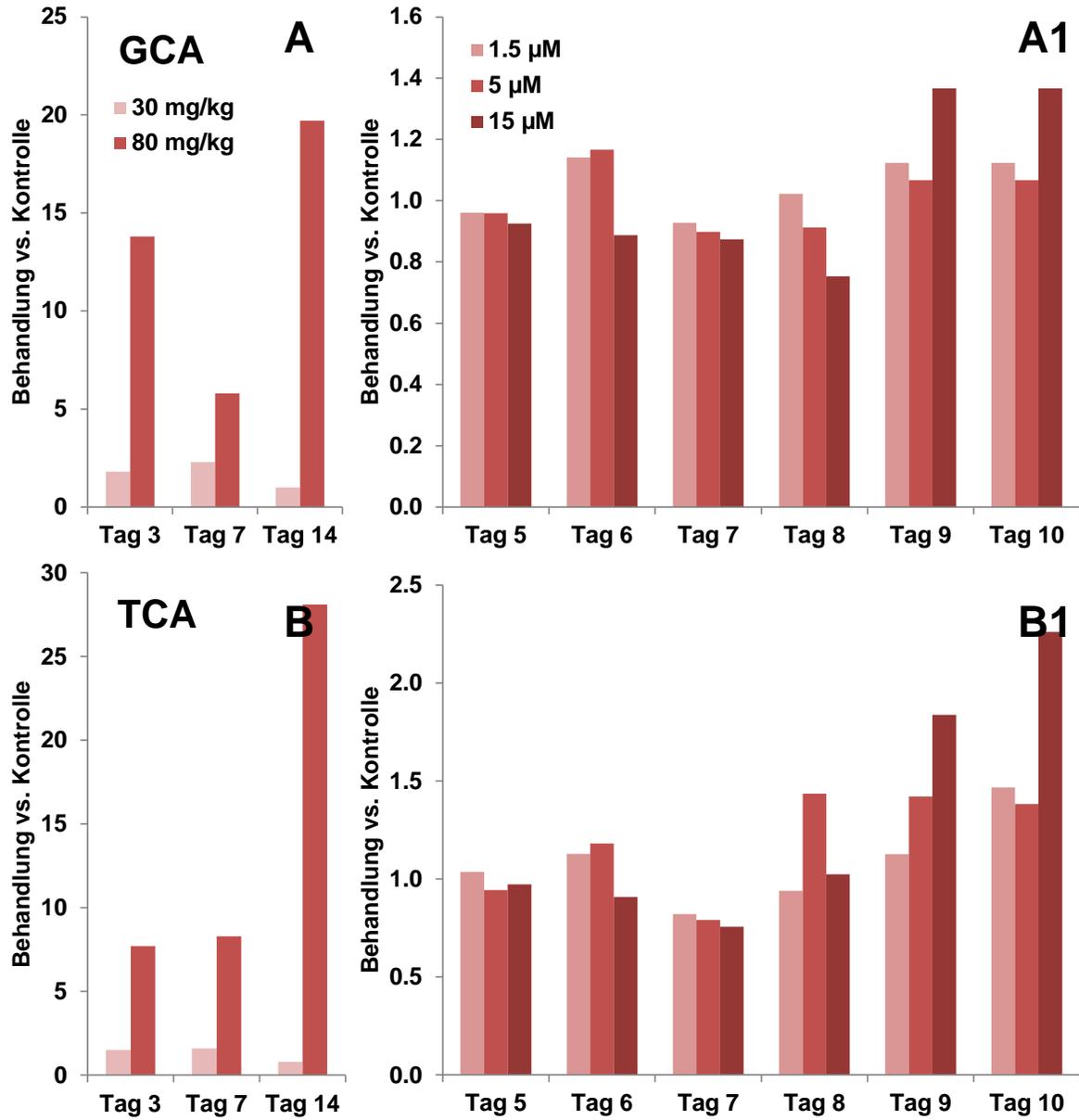


Abbildung 101 Konzentrationsverhältnis von GCA im Plasma (A) GCA im Zellkulturmedium (A1), TCA im Plasma (B) und TCA im Zellkulturmedium (B1) unter Methapyrilen-Exposition. Dargestellt sind relative Mengen (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle). > 1 Anstieg der Konzentration im Vergleich zur Kontrolle, < 1 Abnahme der Konzentration im Vergleich zur Kontrolle.

3.11.5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die hepatozellulären Effekte verschiedener Substanzen anhand von Gallensäure-Profilen in Leber und Plasma von Ratten bei systemischer Bioverfügbarkeit untersucht (oral zw. intraperitoneal verabreichte Arzneistoffe). Das Ausmaß des hepatischen und extrahepatischen Schadens wird durch die biliäre und basolaterale Ausscheidung mitbestimmt. Das biliäre System ist eine wichtige Ausscheidungsrouten für über den Blutstrom transportierte hochmolekulare Arzneistoffe und es ist am enterohepatischen Kreislauf von Arzneistoffen und endogenen Gallensäuren beteiligt. Da Interaktionen auf der Ebene der biliären Elimination zu Veränderungen in der Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes und zu Störungen der endogenen Gallensäure-Homöostase führen können, sind bei der Arzneistoffentwicklung nicht nur Wechselwirkungen von Arzneistoffen oder ihren Metaboliten mit metabolisierenden Enzymen zu beachten, sondern auch potentielle Interaktionen mit hepatobiliären Transportproteinen. Die Überprüfung dieser Zusammenhänge spielt eine immer größere Rolle in der frühen Phase der Arzneistoffentwicklung (Annaert *et al.*, 2001; Chandra *et al.*, 2004; Ghibellini *et al.*, 2006; Hewitt *et al.*, 2007; Kim, 2006). Zusätzlich sollen *In-vivo*-Studien in der frühen Arzneistoffentwicklung auf ein Minimum reduziert (Törnqvist *et al.*, 2014) werden. Vor diesem Hintergrund gewannen in den vergangenen Jahren die Bestrebungen immer stärker an Bedeutung, ein *In-vitro*-Zellmodell zu generieren, das die biliäre Ausscheidung *In vitro* nachbildet (Lechner *et al.*, 2010). Im Vordergrund standen Untersuchungen an Hepatozyten, da diese die Physiologie der Leber repräsentieren. *In-vitro*-Zellmodelle bieten den Vorteil, Effekte auf zellulärer Ebene unter kontrollierten Bedingungen betrachten zu können, dadurch werden komplexe physiologische und biochemische Netzwerke innerhalb eines Organismus vermieden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein primäres Hepatozytenmodell genutzt, das die leberspezifische Morphologie und Funktionalität, vor allem in Bezug auf die biliäre Ausscheidung, hinreichend gut abbildet (Draheim, *et al.*, 2010). Auf der Basis des etablierten Hepatozytenmodells sollte eine Methode entwickelt werden, die durch ein LC-MS/MS basiertes Gallensäure-*Profiling* ein Screening von hepatotoxischen Substanzen gezielter durchführen kann.

Vor Beginn der Studien mit verschiedenen Hepatotoxinen wurde die metabolische Aktivität des *In-vitro*-Testsystems hinsichtlich der Gallensäure-Biosynthese und des Transports im Kultivierungszeitraum von 5 Tagen evaluiert. Im Medium der Rattenhepatozyten in Sandwich-Kulturen konnte eine *De-novo*-Biosynthese von konjugierten Gallensäuren wie GCA, GCDCA, TCA, TCDCA, TMCA(a+b), TUDCA nachgewiesen werden (Abbildung 97).

Primäre Gallensäuren (CA, CDCA) sind die wichtigsten Substrate für die Synthese von konjugierten Gallensäuren in Hepatozyten (Staels, et al., 2009). Nach der fünftägigen Kultivierung wurden die Hepatozyten über einen Zeitraum von 3 Tagen einmal täglich mit 20 μ M CA und CDCA behandelt. Durch die Zugabe der primären Gallensäuren konnten neben den bereits identifizierten Konjugaten weitere Gallensäuren, wie GCDCA, GUDCA und MCA(b), detektiert werden (Abbildung 98). Damit konnte gezeigt werden, dass die kultivierten Hepatozyten primäre Gallensäuren verstoffwechseln können.

Nach der Bestätigung der metabolischen Kompetenz der Hepatozyten in *Sandwich*-Kulturen wurde in einer initialen Machbarkeitsstudie eine dreitägige Behandlung mit Troglitazon in einer Dosierung von 10 μ M durchgeführt. Troglitazon inhibiert den Transporter BSEP, der Gallensäuren in die *Canaliculi biliferi* transportiert (Funk, et al., 2001). Im Rattenhepatozyten-Modell wurde der Einfluss von Troglitazon auf die individuelle Gallensäure-Produktion bestimmt.

Die Applikation von Troglitazon führte zu einer Veränderung der Gallensäure-Homöostase. Im Vergleich zur Kontrolle erhöhten sich die Konzentrationen von GCDCA und TUDCA nach einer Behandlungsphase von 3 Tagen (Abbildung 99). Durch eine Aktivierung der Hepatozyten durch eine gleichzeitige Behandlung mit CA und CDCA verdoppelte sich die Anzahl der Gallensäuren mit gleichzeitig signifikant erhöhten Konzentrationen im Zellkulturmedium (Abbildung 100). Die Versuche zeigen, dass eine BSEP-Inhibition nicht zu einer Absenkung aller Gallensäuren im Medium führt.

Die toxikologische Bewertung von pharmazeutischen Wirkstoffen ist eine gesetzlich vorgeschriebene Notwendigkeit, um die Sicherheit von Arzneimitteln für Mensch und Umwelt zu gewährleisten. Zur Einschätzung des toxikologischen Potentials werden aktuell häufig *In-vivo*-Studien mit verschiedenen Versuchstieren genutzt (Holmes et al., 2010). Alternative Testmethoden wie *In vitro* Assays können zu einer Reduzierung oder zum Ersatz von Tierexperimenten beitragen (Kroeger, 2006). Eine Übertragung der Ergebnisse zwischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Systemen ist aufgrund der physiko-chemischen und biopharmazeutischen Eigenschaften eines Arzneimittels sowie aufgrund der physiologischen Umwelt eines Organismus eine Herausforderung (Lu et al., 2011).

In den *In-vivo*-Experimenten wurde eine Methapyrilen-induzierte Cholestase bzw. Nekrose festgestellt. Die Gallensäuren im Plasma verzeichneten starke erhöhte Konzentrationen unter Methapyrilen, die mit den histopathologischen Befunden korrelierten (Slopianka et al., 2017). Auf Basis dieser Daten und den pharmakokinetischen Eigenschaften von Methapyrilen (Heise et al., 2012) wurde ein Studiendesign für Rattenhepatozyten in *Sandwich*-Kulturen entwickelt, um eine initiale Abschätzung der veränderten Konzentrationen von Gallensäuren im *In-vitro*-Testsystem

durchzuführen. Ab Tag 8 der Behandlung kam es zu einem erhöhten Anstieg der GCA- und TCA-Konzentrationen im Zellkulturmedium (Abbildung 101). Weitere Gallensäuren zeigten einen ähnlichen Konzentrationsverlauf im Zellkulturmedium der behandelten Zellen. In den *In-vivo*-Experimenten war das Ausmaß des Anstiegs der Gallensäure-Konzentrationen deutlicher, möglicherweise aufgrund der Tatsache, dass die Tiere 14 Tage und die Zellen nur 5 Tage wiederholt behandelt wurden. Auch die Vergleichbarkeit der Dosierungen wurde lediglich abgeschätzt. Bei der Abschätzung standen keine eigenen Daten zur Pharmakokinetik von Methapyrilen zur Verfügung – die Berechnung der Konzentrationen basierte auf Literaturdaten. Weiter konnte die Stabilität des Systems nicht hinreichend getestet werden. Daher blieb offen, ob das *In-vitro*-System diese Ergebnisse für Methapyrilen in mindestens drei unabhängigen Experimenten reproduzierbar anzeigt und ob es zeitlich expandiert werden kann.

4 Abschließende Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Eignung von Gallensäureprofilen als unterstützende Marker für die Identifizierung und Differenzierung von Leberschäden in präklinischen Studien zu untersuchen. Dafür wurden in 14-tägigen Toxizitätsstudien an männlichen und weiblichen Ratten über die tägliche Verabreichung von Modellsubstanzen Leberschäden induziert. Als Modellsubstanzen wurden sechs verschiedene Arzneimittelwirkstoffe mit einem bekannten lebertoxischen Potenzial ausgewählt, die substanzspezifisch unterschiedliche Arten von Leberschäden hervorrufen.

Die Dosierungen im Tierversuch wurden anhand von Literaturrecherchen zu lebertoxischen Konzentrationen dieser Wirkstoffe für Menschen und Tiere bestimmt. Dabei wurden die folgenden Kriterien zugrunde gelegt: Die Hochdosis im Tierversuch sollte der Effektdosis entsprechen und klinische sowie histopathologische Befunde einer spezifischen Lebertoxizität auslösen. Gleichzeitig wurden zwei weitere Dosierungen gewählt, die im Fall der niedrigen Dosis keine und im Fall der mittleren Dosis leichte lebertoxische Effekte hervorrufen sollten, um die Dosis-Wirkungsbeziehung besser charakterisieren zu können. Um einen ersten Anhaltspunkt für eine mögliche Übertragbarkeit der Ergebnisse des Tierversuchs auf den Menschen zu gewinnen, wurden, über die Berechnung der humanen Äquivalenzdosis (HED), die unteren Dosierungen in den Tierversuchen im Bereich der therapeutischen Konzentrationen beim Menschen gewählt (Tabelle 47). Es ist belegt, dass eine arzneimittelinduzierte Lebertoxizität schon bei humanen therapeutischen Einnahmemengen auftreten kann (Bareille *et al.*, 2001; Bolzan *et al.*, 2000; David, *et al.*, 2010; van den Broek *et al.*, 1988), jedoch wird dies meist erst bei großen Patientenkollektiven und anhand von schwerwiegenden Schädigungen festgestellt (Suk *et al.*, 2012). Durch die Einbeziehung der humanen Äquivalenzdosis im Tierversuch sollte untersucht werden, ob sich durch die ausführliche Diagnostik über klinisch-chemische und histopathologische Parameter in Verbindung mit Gallensäuremarkern eine Leberschädigung bei humanen therapeutischen Dosierungen bereits bei der geringen Anzahl an Versuchstieren detektieren lässt.

Basierend auf einer Literaturrecherche wurden Amitriptylin und Valproinsäure als Modellsubstanzen für die Induktion einer Steatose bei Ratten ausgewählt. Hierbei sollte Amitriptylin eine makrovesikuläre Steatose und Valproinsäure eine mikrovesikuläre Steatose auslösen. Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Tierversuch mit Amitriptylin bestätigte die in der Literatur beschriebenen histopathologischen Befunde einer makrovesikulären Steatose bei Ratten (Abbildung 53). Für Amitriptylin werden in der Literatur Speziesunterschiede bei der Art des verursachten Leberschadens beschrieben. Wie oben

beschrieben, ist ein durch Amitriptylin verursachter Leberschaden bei der Ratte durch eine Steatose gekennzeichnet (Abbildung 53), wohingegen beim Menschen nach Einnahme von Amitriptylin die Ausbildung einer Cholestase verbunden mit einer Hypoplasie der Gallengänge beobachtet wurden (Voican, et al., 2014). Wie erwartet wurden im Tierversuch mit Amitriptylin keine Befunde einer Cholestase und keine Effekte auf die Gallengänge beobachtet. Die histopathologisch diagnostizierte Amitriptylin-induzierte Steatose korrelierte in der klinischen Pathologie nicht mit den in der Literatur beschriebenen Veränderungen der Serummarker. Im Tierversuch zeigten sich signifikant erniedrigte Werte der ASAT und APH bei den Männchen sowie erniedrigte Werte der ALAT bei den Weibchen, obwohl die Steatose bei Nagern in anderen Studien erwartungsgemäß mit erhöhten Werten der etablierten Serummarker einhergeht (Lionarons, et al., 2016). Im Tierversuch mit Valproinsäure konnte keine mikrovesikuläre Steatose induziert werden. Zwar war in den Hochdosisgruppen beider Geschlechter eine geringfügige Ausbildung von Vakuolen detektierbar, jedoch konnte über eine Färbung mit dem Lipidfarbstoff Ölrot keine Einlagerung von Lipiden in den Vakuolen nachgewiesen werden (Abbildung 53 C-D). Da die Versuchstiere über den Beobachtungszeitraum keine klinischen Symptome zeigten, hätte rückblickend höher dosiert werden können, um eine Steatose zu induzieren. Alternativ hätte eine Verlängerung der Expositionszeit eventuell auch zur Manifestation einer Steatose geführt. Die substanzinduzierte Ausbildung von Vakuolen in Leberzellen wird in der Literatur als zellulärer Adaptationsmechanismus diskutiert (Hall *et al.*, 2012; Nayak *et al.*, 1996). Die männlichen Ratten der mittleren und hohen Dosisgruppe wiesen zusätzlich eine Hypertrophie der Leberzellen auf. Dieser Befund könnte auf einen gesteigerten Leberstoffwechsel zur Detoxifizierung der Noxe hindeuten und damit ebenfalls eine Anpassungsreaktion der Leber darstellen (Hall, et al., 2012; Maronpot, 2014; Thoolen, et al., 2010b). Dafür würde auch sprechen, dass sich bei den mit Valproinsäure behandelten Tieren keine signifikanten Veränderungen der Serummarker zeigten. Das weist darauf hin, dass die Homöostase noch aufrechterhalten werden konnte. Vergleichbare Befunde einer Hypertrophie der Leberzellen zeigten auch Diclofenac und Flutamid. Beide Substanzen wurden zur Induzierung einer Cholestase bei behandelten Ratten eingesetzt, zeigten aber bezüglich einer Lebertoxizität lediglich eine Hypertrophie der Hepatozyten (Diclofenac: Abbildung 66, Flutamid: Abbildung 79). Die für eine Cholestase kennzeichnenden Befunde wie eine morphologische Veränderung der Gallengänge oder die Ablagerung von Gallepigmenten im Leberparenchym (Bubendorf, et al., 2011; Greaves, 2012) waren in den Dosisgruppen der Versuche mit Diclofenac und Flutamid nicht zu beobachten. Für die Substanz Diclofenac wurden neben dem Effekt auf die Leber schwerwiegende histopathologische Veränderungen im Gastrointestinaltrakt in Form

von Entzündungen des Darmgewebes mit vereinzelt auftretenden Geschwüren bei Ratten beider Geschlechter diagnostiziert (Abbildung 66 C-D). Die Effekte waren bei den weiblichen Ratten so stark ausgeprägt, dass einzelne Tiere starben oder moribund getötet werden mussten. Der Zusammenhang zwischen der Einnahme von Diclofenac und dem dosisabhängigen Auftreten von unerwünschten Wirkungen auf den Gastrointestinaltrakt ist für Diclofenac (Odom *et al.*, 2014) und für andere Vertreter der Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) bekannt (Blackler *et al.*, 2012; Goldstein *et al.*, 2015). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuchen ist es nicht gelungen, eine Dosis von Diclofenac auszuwählen, bei der eine Lebertoxizität in Ratten isoliert von Effekten auf den Gastrointestinaltrakt auftritt. Dementsprechend entsprach auch das klinisch-pathologische Profil der mit Diclofenac behandelten Ratten nicht dem einer Cholestase. Das ist wahrscheinlich darin begründet, dass unter Diclofenac-Exposition generell nur geringe Effekte auf die Leber beobachtet wurden und dass die substanzinduzierten Veränderungen im Gastrointestinaltrakts die Profile der Enzymmarker beeinflusst haben könnten. Aufgrund des minimalen Effektes auf die Leber und der deutlichen Toxizität auf den Darm verwies sich Diclofenac als Modellsubstanz zur Analyse der Lebertoxizität in Ratten als ungeeignet. Im Versuch mit Flutamid trat die Hypertrophie der Hepatozyten zusammen mit basophilen Ansammlungen im Zytoplasma auf (Abbildung 79). Da basophile Hepatozyten bei Ratten auch spontan auftreten können (Narama *et al.*, 2003), wurden aufgrund der Abwesenheit anderer morphologischer Veränderungen, die auf eine funktionelle Störung hinweisen könnten, die histopathologischen Befunde, die durch die Flutamid-Verabreichung hervorgerufen wurden, als adaptive Effekte gewertet. Eine eindeutige lebertoxische Wirkung von Flutamid konnte basierend auf den histopathologischen Veränderungen nicht nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich in den Parametern der klinischen Chemie erste Hinweise zu einer durch Flutamid hervorgerufenen Veränderung in der Leber. So war die Aktivität der γ GT in der Hochdosisgruppe beider Geschlechter ab Versuchstag 9 signifikant erhöht, eine Veränderung, die sich auch im klinisch-chemischen Bild eines cholestatischen Leberschadens zeigt (Giannini *et al.*, 2005). Da jedoch keine Korrelation mit erhöhten Werten von APh, dem Leitenzym für Cholestase, und Bilirubin im Serum festgestellt werden konnte, muss die klinische Relevanz der isolierten γ GT-Erhöhung bezweifelt werden (Giannini, *et al.*, 2005). Das Antihistaminikum Methapyrilen induzierte die in der Literatur beschriebenen Effekte einer Leberzellnekrose mit hepatobiliärer Schädigung (NTP, 2000). In der Histopathologie zeigten sich in Anhängigkeit von der Dosis und der Expositionszeit progrediente Nekrosen und Vakuolen im Lebergewebe, Hyperplasien der Gallengänge sowie Ablagerungen von Gallenpigmenten im Leberparenchym (Abbildung 40). In der klinischen Pathologie zeigten sich übereinstimmend mit der Literatur

(Hamadeh, et al., 2002; NTP, 2000) erhöhte Werte von ALAT, ASAT, APh, GLDH, γ GT und TBIL im Serum der behandelten Ratten. Zur besseren Charakterisierung der Methapyrilen-induzierten Lebertoxizität anhand der klinisch-chemischen Parameter wurde der Enzym-Quotient ALAT und APh berechnet. Der ermittelte Wert von $R = 2,44$ weist in Übereinstimmung mit den histopathologischen Befunden auf eine hepatozelluläre und cholestatische Form der Lebertoxizität hin (Giannini, et al., 2005; Gowda *et al.*, 2009; Weiler *et al.*, 2015). Aufgrund der Lebertoxizität wurde Methapyrilen bereits vor mehr als 40 Jahren vom Markt genommen. Im Gegensatz zu den anderen im Rahmen der Arbeit verwendeten Substanzen hat Methapyrilen damit keine Relevanz für den Menschen. Nichtsdestotrotz war die Nutzung dieser Modellsubstanz in der vorliegenden Arbeit zielführend, weil die erwarteten Effekte einer Leberzellnekrose mit hepatobiliärer Schädigung im Tierversuch durch die Verabreichung von Methapyrilen induziert werden konnten. Durch die Verabreichung des Zytostatikums Methotrexat konnte im Tierversuch an Ratten keine der in der Literatur für den Menschen beschriebenen Lebertoxizitäten hervorgerufen werden. Methotrexat ist dafür bekannt, beim Menschen eine Erhöhung der Serum-Aminotransferasen (ALAT, ASAT) zu verursachen (Conway *et al.*, 2017; Dirven *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 1999) und bei Anwendung in Langzeittherapie Fettlebererkrankungen, Leberfibrose bis hin zur Leberzirrhose auszulösen (Cheng *et al.*, 2018; Osuga *et al.*, 2015; Zachariae *et al.*, 1980). Die hepatotoxische Wirkung von Methotrexat ist dabei von der Dosierung, dem Dosierungsintervall und der Behandlungsdauer abhängig (Ricardo *et al.*, 2011; Zachariae, et al., 1980). Sowohl durch die Verabreichung von human-relevanten als auch von höheren Dosierungen konnte im Tierversuch mit Methotrexat kein Effekt auf die Leber der Ratten induziert werden (Abbildung 89). Da einerseits die beschriebenen Effekte der Lebertoxizität beim Menschen vor allem im Rahmen einer mehrjährigen niedrigdosierten Langzeittherapie auftreten (LiverTox, 2015b; Ricardo, et al., 2011; Zachariae, et al., 1980), könnte die im Tierversuch angewendete Expositionszeit zu kurz gewesen sein, um eine Leberschädigung hervorzurufen. Andererseits könnte die Ratte aufgrund von Speziesunterschieden nicht das geeignete Versuchstier sein, um eine Lebertoxizität nach einer Verabreichung der Modellsubstanz Methotrexat auszulösen. In der durchgeführten Studie ergaben sich hingegen Hinweise für einen gestörten Knochenmetabolismus der behandelten Tiere. In publizierten Experimenten an Ratten wiesen Methotrexat-behandelte Tiere histopathologisch nachweisbare Veränderungen im Knochenmetabolismus auf, die mit einer signifikanten Erniedrigung der Werte der APh korrelierten (May *et al.*, 1994). Auch in dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuch wurde bei männlichen Ratten nach Methotrexat-Verabreichung eine signifikante und dosis-

abhängige Abnahme des APh-Wertes beobachtet, allerdings wurde die Knochenstruktur der Ratten nicht histopathologisch untersucht.

Zusammenfassend konnten unter den im Tierversuch gewählten Bedingungen zwei der sechs Arzneimittelwirkstoffe, Amitriptylin und Methapyrilen, eine spezifische Lebertoxizität auslösen, die mit den in der Literatur beschriebenen Veränderungen einherging. Für Valproinsäure und Flutamid konnten histopathologische Veränderungen in der Leber im Tierversuch beobachtet werden, die jedoch in Abgrenzung zu einem toxischen Effekt als Anpassungsreaktion gewertet wurden. Methotrexat und Diclofenac erwiesen sich als Modellsustanzen für die Induktion einer Lebertoxizität im Tierversuch an Ratten unter den gewählten Bedingungen als ungeeignet, da für Methotrexat keine Veränderungen in der Leber nachgewiesen werden konnten und Diclofenac vorrangig unerwünschte gastrointestinale Effekte verursachte.

Insgesamt zeigten die klinisch-chemischen Serummarker im Rahmen der durchgeführten Studien eine geringe Sensitivität und Selektivität zur Bestimmung von Lebertoxizität. Lediglich bei Methapyrilen wurden erhöhte Enzyme-Werte ermittelt, die mit den histopathologischen Befunden korrelierten. Zwar konnten auch in der Studie mit Flutamid signifikant erhöhte Werte einiger Serummarker ermittelt werden, allerdings wurde hier kein eindeutiges histopathologisches Korrelat einer Lebertoxizität nachgewiesen. In der Studie mit Amitriptylin wiesen die Serummarker ein widersprüchliches Profil zu den histologischen Befunden auf. Die veränderten Werte der Serummarker in den Versuchen mit Diclofenac und Methotrexat waren wahrscheinlich auf histologische Befunde in anderen Organsystemen zurückzuführen. Konsistent mit den ausbleibenden histopathologischen Befunden in der Studie mit Valproinsäure wurden auch keine Veränderungen der Serummarker-Werte beobachtet.

Die präklinische Bewertung der Lebertoxizität wurde durch die Analytik von individuellen Gallensäuren erweitert, um zu ermitteln, ob sich dadurch die Qualität der Sicherheitsbewertung verbessern lässt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Gallensäuren sowohl im Lebergewebe als auch im Plasma verschiedene Profile ausbilden, die mit spezifischen Leberschädigungen korrelieren. Es zeigte sich, dass eine Lebertoxizität mit mehreren histologischen Befunden, wie z. B. bei Methapyrilen, das gesamte Profil der 20 individuellen Gallensäuren beeinflussen kann (Tabelle 63). Bei einer Amitriptylin-induzierten Steatose waren hingegen nur ganz bestimmte Subtypen der Gallensäuren wie beispielsweise primäre und vor allem Glycin-konjugierte Gallensäuren im Lebergewebe sowie im Plasma erhöht, wohingegen Taurin-konjugierte Gallensäuren eine Verringerung zeigten (Abbildung 55). Der Grund für die gegensätzliche veränderten Konzentration der Glycin- und Taurin-konjugierten Gallensäuren nach Amitriptylin-Exposition bleibt unklar. Die gleichzeitige Konzentrationserhöhung der primären Gallensäuren CA und CDCA im Plasma behandelte Tiere könnte auf einen

gegensteuernden Effekt zur induzierten Steatose hindeuten, da publizierte Studien an Nagern zeigen, dass primäre Gallensäuren auch einen Einfluss auf den Lipidmetabolismus in der Leber haben (Qi *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2004). Primäre Gallensäuren wie CA und CDCA sind natürliche Liganden des Farnesoid-X-Rezeptors, die über dessen Aktivierung eine Signalkaskade auslösen, die die Konzentrationen von Triglyzeriden in der Leber von Nagern erniedrigt. Die Leberschnitte dieser Tiere zeigten eine geringere hepatische Akkumulation von Triglyzeriden (Watanabe, *et al.*, 2004). Nager, denen CA und CDCA regelmäßig supplementär mit der Nahrung verabreicht wurde, konnten eine protektive Wirkung gegenüber einer fruktose-induzierten Steatose entfalten (Volynets *et al.*, 2010). In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie konnte trotz ausgeprägter Amitriptylin-induzierter Steatose keine signifikante Veränderung der Triglyzerid-Konzentration im Serum der behandelten Tiere detektiert werden. Nichtsdestotrotz könnten die erhöhten Konzentrationen von CA und CDCA im Plasma, die sowohl in männlichen als auch in weiblichen Ratten nachgewiesen wurde, einen protektiven, wenngleich auch unzureichenden Mechanismus gegen die fortschreitende Akkumulation von Triglyzeriden in der Leber darstellen. Mildere hepatozelluläre Veränderungen, wie die Flutamid- oder Valproinsäure-induzierte Hypertrophie der Leberzellen, gingen mit erhöhten Konzentrationen von einzelnen primären und konjugierten Gallensäuren im Lebergewebe und Plasma einher. Dabei ließ sich in den Gallensäureprofilen kein eindeutiges matrix-, substanz- oder geschlechtsspezifisches Muster ermitteln. Die Hypertrophie der Leberzellen wurde als adaptiver Effekt gewertet und auf eine Erhöhung des Lebermetabolismus zurückgeführt. Eine erhöhte hepatische Stoffwechselrate könnte wiederum eine vermehrte Synthese von Gallensäuren und nachfolgend eine Akkumulation im Lebergewebe und Plasma zur Folge haben. Die erhöhten Gallensäure-Konzentrationen korrelieren mit den Ergebnissen der mechanistischen Untersuchungen, die gezeigt haben, dass bei einer Hypertrophie die Transkriptionsrate von Proteinen, die bei der Synthese von Gallensäuren oder dem biliären und basolateralen Transport von Gallensäuren aus der Leber ins Blut eine Rolle spielen, gesteigert wird (Abbildung 86; Abbildung 88). Kommt es neben einer hepatozellulären Hypertrophie zu einer parallelen Schädigung des Gastrointestinal-Trakts, wie es im Versuch mit Diclofenac beobachtet wurde, können veränderte Gallensäure-Profile nicht ausschließlich mit den aufgetretenen Leberbefunden korrelieren, da der Gastrointestinal-Trakt eine wichtige Funktion im enterohepatischen Kreislauf von Gallensäuren einnimmt (Dawson *et al.*, 2003; Dawson *et al.*, 2015; Dawson *et al.*, 2009). Die Erhöhung von CA und CDCA im Plasma, die nach Diclofenac-Behandlung sowohl in männlichen als auch in weiblichen Ratten nachgewiesen wurde, könnte analog zur Flutamid- oder Valproinsäure-induzierten Hypertrophie auf eine Erhöhung des Lebermetabolismus zurückzuführen sein. Eine

andere mögliche Erklärung kann in der Diclofenac-verursachten Zerstörung des Darmepithels gefunden werden, die mit einer erhöhten Diffusion der Gallensäuren in den Dünndarm und einer nachfolgenden gesteigerten Aufnahme in Blut einhergeht. Durch das Mikrobiom wird CA unter physiologischen Bedingungen in DCA konvertiert (Abbildung 4). Da der Anstieg von CA im Plasma im Tierversuch mit Diclofenac jedoch nicht mit einer gleichzeitigen Erhöhung der Konzentration von DCA verbunden war, aber mit einer erhöhten Konjugation zu GDCA bei beiden Geschlechtern, ist zu vermuten, dass die Homöostase durch die Konjugation von DCA aufrechterhalten werden konnte. Neben dem Konzentrationsanstieg der primären Gallensäure CA war auch die Konzentration von CDCA nach der Diclofenac-Behandlung erhöht. Die erhöhte CDCA-Konzentration korrelierte mit erhöhten Konzentrationen von UDCA und TUDCA im Plasma männlicher Ratten (Abbildung 72; Abbildung 73). UDCA ist das sekundäre Produkt der primären Gallensäure CDCA, die durch bakterielle Reaktionen im Mikrobiom entsteht. Durch Konjugation mit Taurin oder Glycin entsteht im Mikrobiom aus GCDCA GUDCA und aus TCDCA TUDCA (Song *et al.*, 2017). Diese Ergebnisse könnten auf einen protektiven Mechanismus gegenüber der gastrointestinalen Toxizität zurückzuführen sein. Die sekundäre Gallensäure UDCA besitzt zytoprotektive, anti-apoptotische, membranstabilisierende, antioxidative und immunmodulierende Wirkungen (Alpini *et al.*, 2002; Amaral, *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2005; Im *et al.*, 2004). Das Taurin-Konjugat TUDCA besitzt zytoprotektive und anti-apoptotische Wirkungen (Alpini *et al.*, 2004; Baiocchi *et al.*, 2008; Marzoni *et al.*, 2006; Rivard *et al.*, 2007). Die erhöhten Konzentrationen von UDCA und TUDCA könnten vom Organismus als Antwort auf die gastrointestinalen Schäden gebildet worden sein, um dem Zerfall des Darmgewebes entgegenzuwirken. Die mit Methotrexat behandelten Ratten beider Geschlechter zeigten weder histopathologische noch klinisch-chemische Leberbefunde. Konsistent dazu waren die Gallensäure-Profile der männlichen Tiere unauffällig. In weiblichen Ratten wurde jedoch nach der Methotrexat-Verabreichung eine erhöhte Konzentration von CDCA im Plasma nachgewiesen. Da dieser Befund isoliert von anderen Leberbefunden bei nur einem Geschlecht und ohne Dosis-Wirkungs-Zusammenhang auftrat, kann die biologische Relevanz dieser Veränderung bezweifelt werden. Dennoch zeigten sich in den mechanistischen Untersuchungen starke Veränderungen in der Expression von Gallensäure-assoziierten Genen, was das veränderte Gallensäure-Profil erklären und eventuell einen initialen Schritt bei der Methotrexat-Wirkung auf der Ebene des Gallensäure-Metabolismus abbilden könnte, bevor histopathologische Veränderungen manifestiert werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in Tierversuchen mit sechs Modellsubstanzen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Induktion von Leberschäden in der Ratte durchgeführt wurden, verschiedene Gallensäure-Profile nachgewiesen werden konnten, die

sich abhängig von den verursachten Organschäden voneinander unterschieden. Im Lebergewebe zeigten sich dabei häufig veränderte Konzentrationen von GCA, GDCA, CA und vereinzelt Taurin-konjugierten Gallensäuren, wohingegen die häufigsten veränderten Konzentrationen im Plasma vor allem bei CDCA, CA, GCA, TCA, UDCA und TUDCA lagen. Zusammenfassend konnten Gallensäuren im Vergleich mit den klinischen Markern eine sensitivere und frühzeitige Aussage über eine Lebertoxizität ermöglichen. Hierbei konnte auch gezeigt werden, dass sich durch die Analytik von individuellen Gallensäuren mildere Manifestationen einer Lebertoxizität, wie z. B. Hypertrophie oder die Bildung von Vakuolen, nachweisen lassen. Klinische Marker haben für mildere Manifestationen einer Lebertoxizität keinen aussagekräftigen diagnostischen Wert (Ennulat, et al., 2010; Tonomura *et al.*, 2015). Dadurch könnte durch die Analytik von individuellen primären, konjugierten und sekundären Gallensäuren die Charakterisierung einer Lebertoxizität in der klinischen Chemie besser unterstützt werden.

In den mechanistischen Untersuchungen korrelierten die erhöhten Gallensäure-Konzentrationen im Lebergewebe mit einer eingeschränkten Biosynthese durch verminderte bzw. erhöhte Expressionen von Genen wie z. B. AMACR, ACOT8, CYP7A1, CYP8B1 und CYP7B1. Eine Korrelation mit erhöhten Konzentrationen im Lebergewebe zeigen verminderte bzw. erhöhte Expressionen von ASBT, BCRP, MDR1, MDR 3 und MRP2. Eine erhöhte Expression von MRP3 und MRP4 korreliert mit erhöhten Konzentrationen von Gallensäuren im Plasma. Zusammenfassend konnte durch die mechanistische Untersuchung der Expressionsraten von Gallensäuren-assoziierten Genen Einblicke in die zugrundeliegenden zellulären Vorgänge gewonnen werden, die die Veränderungen in den Gallensäureprofilen hervorrufen oder eine Antwort auf sie sind. Des Weiteren konnten durch diese weiterführenden Analysen die Auswirkungen der Substanzexposition auf das Gallensäureprofil auch auf einer weiteren zellulären Ebene bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gallensäuren einen wertvollen Beitrag zur Detektion einer arzneimittel-induzierten Lebertoxizität leisten können. Histopathologische Befunde in der Leber korrelierten dabei vor allem mit veränderten Konzentrationen von primären und konjugierten Gallensäuren. Sekundäre Gallensäuren spielten mit Ausnahme von UDCA und TUDCA innerhalb der durchgeführten Studien eine untergeordnete Rolle. Dennoch ist es wichtig, auch diese Gallensäuren weiterhin näher zu untersuchen, um sie eventuell zukünftig einem spezifischen Leberschaden zuordnen zu können.

5 Schlussfolgerung

Die Entwicklung einer sensitiven und spezifischen Analytik zur Diagnose einer Lebertoxizität auf der Basis individueller Gallensäure-Konzentrationen ist in den vergangenen Jahren verstärkt in den Fokus der Forschung gerückt. Die quantitative Analyse von individuellen Gallensäuren zeigt, dass Gallensäure-Profile mit histologischen Befunden eines Leberschadens korrelieren und gleichzeitig Veränderungen mit einer höheren Sensitivität anzeigen als die klassischen Serummarker der klinischen Chemie. Die Experimente im Rahmen dieser Dissertation konnten die bisherigen Ergebnisse aus der Literatur bestätigen. Die Gallensäure-Analytik konnte in den Arbeitsablauf der präklinischen Arzneimittelentwicklung implementiert werden. Mit der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methode konnten im Rattenmodell spezifische Leberschäden durch veränderte Gallensäure-Profilen identifiziert werden. Darauf aufbauend könnte das Gallensäure-Profiling nun im Rahmen eines Arzneimittelprojekts für neue Entwicklungskandidaten auch auf Nicht-Nagerspezies wie beispielsweise Hunde, Kaninchen oder *Cynomolgus* erweitert werden, um die Speziesunterschiede in Gallensäure-Profilen zu ermitteln. Im Sinne eines translationalen Studiendesigns könnte die Implementierung der Gallensäure-Analyse auch zukünftig in klinischen Studien Anwendung finden, um die Übertragbarkeit der Gallensäure-Profile aus präklinischen Studien auf den Menschen zu überprüfen. Mit der gleichzeitigen Analyse der Gallensäure-Profile im Menschen und der Gegenüberstellung mit klinischen Serummarkern könnte die Relevanz der präklinisch ermittelten Gallensäure-Profile für eine Vorhersage der Lebertoxizität beim Menschen weiter untersucht werden. Individuelle Gallensäure-Profile in humanen Studien konnten aufzeigen, dass vor allem konjugierte Gallensäuren prädiktive Aussagekraft für die Vorhersage eines Leberschadens besitzen (Luo, et al., 2018). Die Experimente der vorliegenden Arbeit belegen, dass konjugierte Gallensäuren auch in der Ratte mit bestimmten Arten von Leberschäden korrelieren. Demnach könnte ein verändertes Gallensäure-Profil, das im Rahmen von präklinischen Studien an der Ratte erhoben wurde, bereits wichtige Hinweise für eine Hepatotoxizität am Menschen geben, wenn sich die Übertragbarkeit auf ein humanes Gallensäure-Profil und die Prädiktivität eines Leberschadens in zukünftigen Studien bestätigen ließen. Zukünftig könnten bekannte Gallensäure-Profile mit einem charakteristischen Leberschaden verknüpft und in einer Datenbank umfangreich erfasst werden, die dann über multivariate Analysen genutzt werden könnten, um die Prädiktivität von Gallensäure-Profilen hinsichtlich der Klassierung von Leberschäden zu untersuchen. Die erhobenen Gallensäure-Profile in *Sandwich*-Kulturen von Hepatozyten belegen, dass eine Bewertung der Hepatotoxizität auch in *In-vitro*-Testsystemen möglich ist. Bei hinreichender

Validierung des Modellsystems könnten somit Tierexperimente eingespart werden. Im Hinblick auf die etablierte *In-vitro*-Methode wurden noch Optimierungsmöglichkeiten identifiziert, die helfen könnten, die Methodik zukünftig noch besser an die Bedingungen *In vivo* anzupassen. Dazu könnten die Hepatozyten durch die Zugabe von primären Gallensäuren metabolisch aktiviert werden, d. h. sie können die zugegebenen primären Gallensäuren nutzen und in konjugierte Gallensäuren umwandeln. Dadurch könnte in Zukunft eine umfangreichere Anzahl an Gallensäuren für ein Screening genutzt werden, um noch spezifischere Gallensäureprofile zu ermitteln und darüber eventuell die Prädiktivität des Testsystems zu steigern. Das Testsystem könnte außerdem zukünftig auf einen 7-tägigen Expositionszeitraum erweitert werden, um einen Zeitraum näher an den *In vivo* Studien abbilden zu können. Darüber hinaus könnte die Analytik bestimmter Gallensäurespezies dahingehend erweitert werden, dass beispielsweise sulfatierte Gallensäuren in die Methode eingeschlossen werden, um die Detoxifizierung individueller Gallensäuren abzubilden. Dadurch könnten bessere Einblicke in den Metabolismus von Gallensäuren gewonnen werden und z. B. untersucht werden, ob eine Akkumulation von Gallensäuren in einer verminderten Detoxifizierung begründet ist.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Analyse individueller Gallensäuren im Zellkulturmedium von *In-vitro*-kultivierten Rattenhepatozyten sowie im Lebergewebe und Plasma von behandelten Ratten einen wertvollen Beitrag zum Screening bzw. zur Detektion von hepatozellulären und hepatobiliären Leberschäden in der präklinischen Arzneimittelentwicklung leisten kann.

Insgesamt haben die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen können, dass individuelle Gallensäuren potentielle Biomarker für eine spezifische Lebertoxizität sein könnten, was durch weitere Studien näher charakterisiert werden sollte.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Überblick über den Arzneimittelentwicklungsprozess (angelehnt an (EUPATI, 2015b).	1
Abbildung 2 Relevanz präklinischer Studien in der Arzneimittelentwicklung (angelehnt an (EUPATI, 2015a).....	4
Abbildung 3 Arzneimittelkandidaten mit idiosynkratischer Arzneimittel-induzierter Lebertoxizität.	6
Abbildung 4 Überblick über den Metabolismus von Gallensäuren.	16
Abbildung 5 Überblick über die hepatische Biosynthese, die Konjugation, den Transport und den enterohepatischen Kreislauf von Gallensäuren.	19
Abbildung 6 Mechanismus der Valproinsäure-induzierten Hemmung der mitochondrialen Fettsäure- β -Oxidation (FAO).	25
Abbildung 7 Metabolisierung von Diclofenac und potentielle Bildung reaktiver Metaboliten.	28
Abbildung 8 Tierexperimentelles Studiendesign.	42
Abbildung 9 Unterteilung des linken lateralen Leberlappens.	42
Abbildung 10 Studiendesign zur Nahrungskarenz und Geschlechterspezifität.	44
Abbildung 11 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.	46
Abbildung 12 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.	48
Abbildung 13 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.	50
Abbildung 14 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.	52
Abbildung 15 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.	54
Abbildung 16 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.	56
Abbildung 17 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.	58
Abbildung 18 Reaktionsgleichung zum Bestimmungsverfahren.	61
Abbildung 19 Prinzip des Kombifiltersystems einer 96- <i>Deep Well</i> Platte.....	68
Abbildung 20 Laufmittel-Gradient am Beispiel von Laufmittel B (unpolar) über die Trennzeit von 5 min.	70
Abbildung 21 Prinzip des QuantiGene Plex Assay, angelehnt an (ThermoFischer, 2018).	80
Abbildung 22 Studiendesign des <i>In-vitro</i> -Versuches mit Sandwich-Kulturen von Rattenhepatozyten.	89
Abbildung 23 Strukturformel von Amitriptylin.	96
Abbildung 24 Strukturformel von Diclofenac.	97
Abbildung 25 Strukturformel von Flutamid.	98
Abbildung 26 Strukturformel von Methapyrilen.	99
Abbildung 27 Strukturformel von Methotrexat.	100
Abbildung 28 Strukturformel von Valproinsäure.	101
Abbildung 29 Kalibrierung von TCA im Konzentrationsbereich zwischen 0,02 und 50 $\mu\text{mol/L}$	103
Abbildung 30 Chromatogramm 20 individueller Gallensäuren.	105
Abbildung 31 Chromatographie muricholierter Gallensäuren im Plasma von Ratten.....	106
Abbildung 32 Repräsentative Chromatographie des isotope-markierten TCA-d5.	107
Abbildung 33 Vergleich der Chromatographie von (A) TCA-d5 und (B) LCA-d4 in Methanol.	110
Abbildung 34 Hauptkomponenten-Analyse (PCA) basierend auf Gallensäure-Profilen im Plasma männlicher und weiblicher Ratten.	119
Abbildung 35 Diskriminanzanalyse (OPLS-DA) basierend auf Gallensäure-Profilen im Plasma männlicher (oben) und weiblicher (unten) Ratten.	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 36 Hauptkomponenten-Analyse (PCA) basierend auf Gallensäure-Plasmaprofilen männlicher Ratten nach Behandlung mit verschiedenen Vehikeln.	122
Abbildung 37 Hauptkomponenten-Analyse (PCA) basierend auf Gallensäure-Plasmaprofilen weiblicher Ratten nach Behandlung mit verschiedenen Vehikeln.	123
Abbildung 38 Prozentuale Verteilung individueller Gallensäuren im Plasma von männlichen und weiblichen Ratten bei der Nutzung des Vehikels Wasser.	124
Abbildung 39 Futteraufnahme der Vehikel-Tiere die mit unterschiedlichen Vehikeln behandelt wurden.	127
Abbildung 40 Leberschnitte von männlichen Ratten nach Hämatoxylin-Eosin Färbung.	130
Abbildung 41 Schematische Darstellung der Biosynthese und des Transports von Gallensäuren im Hepatozyten nach 14-tägiger Behandlung mit Methapyridin.	136
Abbildung 42 Leberschnitte von männlichen Ratten nach Hämatoxylin-Eosin Färbung.	139
Abbildung 43 Aktivität der Alanin-Aminotransferase (ALAT) nach Behandlung mit Valproinsäure.	140
Abbildung 44 Gallensäure-Konzentration im Lebergewebe männlicher (A–B) und weiblicher (C–D) Ratten Valproinsäure-Exposition (Tag 14).	142
Abbildung 45 Hauptkomponenten-Analyse (PCA) basierend auf Gallensäure-Profilen im Lebergewebe unter Valproinsäure-Exposition nach 14 Tagen.	143
Abbildung 46 (A) Konzentrationsverlauf von GCA im Plasma männlicher Ratten und (B) von verschiedenen Gallensäuren im Plasma weiblicher Ratten an Tag 14 unter Valproinsäure-Exposition.	144
Abbildung 47 OPLS-DA der Gallensäure-Profile im Plasma männlicher Ratten unter Valproinsäure-Exposition.	145
Abbildung 48 PCA der Gallensäure-Profile im Plasma weiblicher Ratten unter Valproinsäure-Exposition.	146
Abbildung 49 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Valproinsäure-Exposition in männlichen Ratten (n=6 pro Gruppe)	148
Abbildung 50 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Valproinsäure in männlichen Ratten.	148
Abbildung 51 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Valproinsäure-Exposition in weiblichen Ratten (n=6 pro Gruppe).	149
Abbildung 52 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Valproinsäure in weiblichen Ratten.	150
Abbildung 53 Leberschnitte von männlichen Ratten nach Hämatoxylin-Eosin Färbung (A-B) und Ölrot-Färbung (C-D).	156
Abbildung 54 Serummarker in (A) männlichen und (B) weiblichen Ratten nach Behandlung mit Amitriptylin.	157
Abbildung 55 Gallensäure-Konzentrationen im Lebergewebe männlicher Ratten unter Amitriptylin-Exposition (Tag 9).	158
Abbildung 56 PCA der Gallensäure-Profile im Lebergewebe männlicher Ratten nach Amitriptylin-Exposition.	158
Abbildung 57 Gallensäure-Konzentrationen im Lebergewebe weiblicher Ratten unter Amitriptylin-Exposition (Tag 14).	159
Abbildung 58 Plasmakonzentrationen der primären Gallensäuren CA und CDCA bei männlichen Ratten unter Amitriptylin-Exposition.	160
Abbildung 59 Plasmakonzentrationen der konjugierter Gallensäuren und MCA(b) bei männlichen Ratten unter Amitriptylin-Exposition.	161
Abbildung 60 Plasmakonzentrationen der primären Gallensäuren CA und CDCA bei weiblichen Ratten unter Amitriptylin-Exposition.	162

Abbildung 61 PCA der Gallensäure-Profile im Plasma männlicher Ratten unter Amitriptylin-Exposition an Tag 9 (A, B).	163
Abbildung 62 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Amitriptylin-Exposition in männlichen Ratten (n=6 pro Gruppe).	164
Abbildung 63 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Amitriptylin in männlichen Ratten.	165
Abbildung 64 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Amitriptylin-Exposition in weiblichen Ratten (n=6 pro Gruppe).	165
Abbildung 65 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Amitriptylin in weiblichen Ratten.....	166
Abbildung 66 Histopathologische Befunde von männlichen und weiblichen Ratten nach Hämatoxylin-Eosin Färbung.	171
Abbildung 67 Aktivität der Alkalischen Phosphatase (APh) bei weiblichen Ratten nach der Behandlung mit Diclofenac.	172
Abbildung 68 Aktivitäten der Serummarker bei männlichen Ratten nach Behandlung mit Diclofenac.....	173
Abbildung 69 Gallensäure-Konzentration im Lebergewebe männlicher (A–B) Ratten unter Diclofenac-Exposition (Tag 14).	174
Abbildung 70 PCA der Gallensäure-Profile im Lebergewebe männlicher Ratten unter Diclofenac-Exposition an Tag 9.....	175
Abbildung 71 PCA der Gallensäure-Profile im Lebergewebe weiblicher Ratten unter Diclofenac-Exposition an Tag 14.....	176
Abbildung 72 CA- und CDCA-Konzentrationen im Plasma männlicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Diclofenac-Exposition.	177
Abbildung 73 UDCA- und TUDCA-Konzentrationen im Plasma männlicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Diclofenac-Exposition.	177
Abbildung 74 CA- und CDCA-Konzentrationen im Plasma weiblicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Diclofenac-Exposition.	179
Abbildung 75 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Diclofenac-Exposition in männlichen Ratten (n=6 pro Gruppe).	180
Abbildung 76 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Diclofenac in männlichen Ratten.	181
Abbildung 77 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Diclofenac-Exposition in weiblichen Ratten (n=6 pro Gruppe).	181
Abbildung 78 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Diclofenac in weiblichen Ratten.....	182
Abbildung 79 Leberschnitte von weiblichen Ratten nach Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	187
Abbildung 80 Aktivitäten der γ GT bei männlichen (A) und weiblichen Ratten (B) nach Behandlung mit Flutamid.	188
Abbildung 81 Serumkonzentration von Cholesterin (A) und Triglyceriden (B) in männlichen Ratten unter Flutamid-Exposition.	189
Abbildung 82 Gallensäure-Konzentrationen im Lebergewebe männlicher (A) und weiblicher (B) Ratten (an Tag 2, 9 und 14) unter Flutamid-Exposition und nach einer 14-tägigen <i>Recovery</i> -Phase (R).	190

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 83 CA-Konzentrationen im Plasma männlicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Flutamid-Exposition.	191
Abbildung 84 Gallensäure-Konzentrationen im Plasma weiblicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Flutamid-Exposition.	192
Abbildung 85 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Flutamid-Exposition (n=6 pro Gruppe) und nach einer 14-tägigen <i>Recovery</i> -Phase (R, n=3) in männlichen Ratten.	193
Abbildung 86 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Flutamid in männlichen Ratten.	194
Abbildung 87 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Flutamid-Exposition (n=6 pro Gruppe) und nach einer 14-tägigen <i>Recovery</i> -Phase (R, n=3) in weiblichen Ratten.	194
Abbildung 88 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Flutamid in weiblichen Ratten.	195
Abbildung 89 Histopathologische Befunde weiblicher Ratten unter Methotrexat-Exposition.	199
Abbildung 90 Aktivitäten der APH bei männlichen Ratten nach Behandlung mit Methotrexat.	200
Abbildung 91 CA-Konzentrationen im Plasma männlicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Methotrexat-Exposition.	201
Abbildung 92 Gallensäure-Konzentrationen im Plasma weiblicher Ratten an Tag 2, 9 und 14 unter Methotrexat-Exposition.	202
Abbildung 93 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Methotrexat-Exposition (n=6 pro Gruppe) und nach einer 14-tägigen <i>Recovery</i> -Phase (R, n=3) in männlichen Ratten.	203
Abbildung 94 Expressionsprofil von Genen des Gallensäure-Metabolismus unter Methotrexat-Exposition (n=6 pro Gruppe) und nach einer 14-tägigen <i>Recovery</i> -Phase (R, n=3) in weiblichen Ratten.	203
Abbildung 95 Schematische Darstellung des hepatischen Transportsystems und der Biosynthese von Gallensäuren nach 14-tägiger Behandlung mit Methotrexat in weiblichen Ratten.	204
Abbildung 96 OPLS-DA basierend auf den Gallensäure-Profilen im Plasma männlicher Ratten nach Behandlung mit Amitriptylin [violett], Methapyrilen [gelb] und Valproinsäure [blau], Kontrolle [grün] über die gesamte Studiendauer von 14 Tagen.	209
Abbildung 97 Konzentrationen ($\mu\text{mol/L}$) von Gallensäuren im Zellkulturmedium von <i>Sandwich</i> -Rattenhepatozyten-Kulturen Tag 5 nach Aussaat.	211
Abbildung 98 Anteile von Gallensäuren im Zellkulturmedium von mit CA und CDCA behandelten Rattenhepatozyten-Kulturen (Tag 6–8).	212
Abbildung 99 Konzentrationsverlauf GCDCA und TUDCA ($\mu\text{mol/L}$) im Zellkulturmedium von <i>Sandwich</i> -Kulturen mit Rattenhepatozyten über die Studiendauer von 3 Tagen unter Troglitazon-Behandlung.	213
Abbildung 100 Konzentrationsverlauf GCA, GCDCA, GUDCA und TUDCA ($\mu\text{mol/L}$) im Zellkulturmedium von <i>Sandwich</i> -Kulturen mit Rattenhepatozyten über die Studiendauer von 3 Tagen unter Troglitazon-Behandlung.	214
Abbildung 101 Konzentrationsverhältnis von GCA im Plasma (A) GCA im Zellkulturmedium (A1), TCA im Plasma (B) und TCA im Zellkulturmedium (B1) unter Methapyrilen-Exposition.	216

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Eine Auswahl von weiteren Arzneimitteln, die eine Cholestase induzieren können (Padda <i>et al.</i> , 2011; Sundaram, et al., 2017).....	26
Tabelle 2 Liste des Equipments der LC-MS/MS Analytik.....	31
Tabelle 3 Liste der verwendeten Chemikalien der LC-MS/MS Analytik.....	32
Tabelle 4 Liste der verwendeten Chemikalien und des Laborequipments zur Analytik von spezifischen mRNAs.....	33
Tabelle 5 Liste der Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 6 Liste der verwendeten Wirkstoffe in den tierexperimentellen Studien.....	39
Tabelle 7 Liste der verwendeten Software.....	39
Tabelle 8 Behandlungs- und Untersuchungsschema.....	43
Tabelle 9 Gerätespezifikationen COBAS 6000 c501.....	46
Tabelle 10 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung der Alanin-Aminotransferase im Serum.....	47
Tabelle 11 Einstellungen der Messmethode.....	48
Tabelle 12 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase im Serum.....	49
Tabelle 13 Einstellungen der Messmethode.....	50
Tabelle 14 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase im Serum.....	51
Tabelle 15 Einstellungen der Messmethode.....	52
Tabelle 16 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung der Gamma-Glutamyltransferase im Serum.....	53
Tabelle 17 Einstellungen der Messmethode.....	53
Tabelle 18 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung der Glutamat-Dehydrogenase im Serum.....	55
Tabelle 19 Einstellungen der Messmethode.....	55
Tabelle 20 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung von Gesamtbilirubin im Serum.....	57
Tabelle 21 Einstellungen der Messmethode.....	57
Tabelle 22 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung von Cholesterin im Serum.....	59
Tabelle 23 Einstellungen der Messmethode.....	59
Tabelle 24 Gebrauchsfertige Reagenzien zur Bestimmung von Triglyzeriden im Serum.....	61
Tabelle 25 Einstellungen der Messmethode.....	62
Tabelle 26 Zusammensetzung des neutralgepufferten Formalin.....	64
Tabelle 27 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Manuelle Färbung).....	65
Tabelle 28 Färben von fixierten Gefrierschnitten.....	67
Tabelle 29 Gradient der Laufmittelzusammensetzung zur chromatographischen Trennung der Gallensäuren.....	69
Tabelle 30 Ionenquellen-Parameter des 5500 SCIEX QTrap Massenspektrometers.....	70
Tabelle 31 Übergänge aller Gallensäuren im <i>Multiple Reaction Monitoring</i>	71
Tabelle 32 Kalibrierreihe der Standards und internen Standards für die Gallensäure-Quantifizierung.....	73
Tabelle 33 Konzentration der biologischen Qualitätskontrollen (QC) für die individuellen Gallensäuren.....	74
Tabelle 34 Pipettierschema einer 96- <i>Deep-Well</i> -Platte zur Validierung der Gallensäure-haltigen Matrices.....	77
Tabelle 35 Ausgewählte Gene mit wichtiger Funktion im Gallensäure-Metabolismus.....	79
Tabelle 36 Pipettierschema für die Einzelstrangsynthese der reversen Transkription vor der <i>In-vitro</i> Transkription.....	84
Tabelle 37 Pipettierschema für die Doppelstrangsynthese der reversen Transkription vor der <i>In-vitro</i> Transkription.....	84
Tabelle 38 Pipettierschema für die <i>In-vitro</i> Transkription (IVT).....	84
Tabelle 39 Pipettierschema für die aRNA Aufreinigung.....	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 40 Ansatzschema der Hybridisierungsreaktion der RAE230_2.0 Arrays.....	85
Tabelle 41 WME-Additiva.....	87
Tabelle 42 Zusammensetzung der Kollagenlösung zur Überschichtung der Hepatozytenmonolage.....	88
Tabelle 43 Erste Auswahl potentieller Hepatotoxine für tierexperimentelle Studien.....	92
Tabelle 44 Art der Leberschädigungen der potentiellen Modellsubstanzen auf Basis von Humandaten.	93
Tabelle 45 Zehn potentielle Substanzkandidaten für die geplanten tierexperimentellen Studien.....	94
Tabelle 46 Ausgewählte Hepatotoxine für die tierexperimentellen Studien.....	95
Tabelle 47 Gegenüberstellung der Dosierungen der Wirkstoffe im Tierexperiment an Ratten mit den äquivalenten Dosierungen im Menschen.	95
Tabelle 48 Konzentrationsbereich der Kalibriergeraden individueller Gallensäuren.	103
Tabelle 49 Zusammenfassung der Bestimmungsgrenze für jede Gallensäure.	104
Tabelle 50 Zusammenfassung der Reproduzierbarkeit verwendeter interner Standards.....	107
Tabelle 51 Richtigkeit (CV/%) 20 individueller Gallensäuren des Kalibrierbereichs und der Qualitätskontrollproben.	108
Tabelle 52 Wiederholpräzision (CV/%) 20 individueller Gallensäuren des Kalibrierbereichs und der Qualitätskontrollproben.	109
Tabelle 53 Richtigkeit (CV/%) 20 individueller Gallensäuren im Plasma.....	111
Tabelle 54 Wiederholpräzision (CV/%) 20 individueller Gallensäuren im Plasma.....	112
Tabelle 55 Richtigkeit (%) 20 individueller Gallensäuren im Leberhomogenat.	113
Tabelle 56 Wiederholpräzision (CV/%) 20 individueller Gallensäuren im Leberhomogenat.....	114
Tabelle 57 Richtigkeit (%) 15 individueller Gallensäuren im Zellkulturmedium.	115
Tabelle 58 Ermittelte Präzision (CV/%) 15 individueller Gallensäuren im Zellkulturmedium.	115
Tabelle 59 Gallensäure-Referenzkonzentrationen im Plasma (µmol/L) männlicher und weiblicher Ratten bei der Nutzung des Vehikels Wasser.	125
Tabelle 60 Häufigkeit und Schweregrad hepatozellulärer Veränderungen in männlichen Ratten nach Behandlung mit Methapyrilen.....	129
Tabelle 61 Klinische Chemie männlicher Ratten nach Behandlung mit Methapyrilen.....	131
Tabelle 62 Gallensäure-Profile im Lebergewebe von behandelten Ratten nach Methapyrilen-Behandlung.....	132
Tabelle 63 Gallensäure-Profile im Plasma von behandelten Ratten nach Methapyrilen-Behandlung.....	134
Tabelle 64 Transkriptions-Profile im Lebergewebe von behandelten Ratten nach Methapyrilen-Behandlung.....	135
Tabelle 65 Häufigkeit hepatozellulärer Veränderungen bei männlichen und weiblichen Ratten nach 14-tägiger Behandlung mit Valproinsäure (Männlich: ♂, Weiblich: ♀).....	139
Tabelle 66 Häufigkeit hepatozellulärer Veränderungen (Steatose) in männlichen und weiblichen Ratten nach der Behandlung mit Amitriptylin (Männlich: ♂, Weiblich: ♀).	155
Tabelle 67 Häufigkeit hepatozellulärer Veränderungen bei männlichen und weiblichen Ratten nach der Behandlung mit Diclofenac (Männlich: ♂, Weiblich: ♀).....	171
Tabelle 68 Serumkonzentrationen von Cholesterin (mmol/L) männlicher und weiblicher Ratten.....	174
Tabelle 69 Absolute Lebergewichte un behandelter und behandelter Ratten mit Flutamid.....	186
Tabelle 70 Histopathologische Leberbefunde bei männlichen und weiblichen Ratten nach der Behandlung mit Flutamid.	187

8 Literaturverzeichnis

Abdi, M. M. (2017). Chapter 15 - Best Practice in Toxicological Pathology A2 - Faqi, Ali Said. In *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development (Second Edition)*, pp. 375-406. Academic Press, Boston, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803620-4.00015-3>.

Abdolvahab-Emminger, H., and Benz, C. (2005). *Physikum exakt: das gesamte Prüfungswissen für die 1. AP ; 199 Tabellen ; [ideal für die neue AO]*. Thieme.

Al-Motabagani, M. A. (2006). Histological and Histochemical Studies on the Effects of Methotrexate on the Liver of Adult Male Albino Rat. *International Journal of Morphology* **24**, 417-422.

Al-Shurbaji, A. (2010). Proof-of-Principle/Proof-of-Concept Trials in Drug Development. In *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia* doi: 10.1002/9780470571224.pse251. John Wiley & Sons, Inc.

Aleo, M. D., Luo, Y., Swiss, R., Bonin, P. D., Potter, D. M., and Will, Y. (2014). Human drug-induced liver injury severity is highly associated with dual inhibition of liver mitochondrial function and bile salt export pump. *Hepatology* **60**(3), 1015-1022.

Alhaji Saganuwan, S. (2017). *Toxicity studies of drugs and chemicals in animals: An overview*, Vol. 20.

Alnouti, Y. (2009). Bile Acid Sulfation: A Pathway of Bile Acid Elimination and Detoxification. *Toxicological Sciences* **108**(2), 225-246.

Alpini, G., Baiocchi, L., Glaser, S., Ueno, Y., Marzioni, M., Francis, H., Phinizy, J. L., Angelico, M., and Lesage, G. (2002). Ursodeoxycholate and tauroursodeoxycholate inhibit cholangiocyte growth and secretion of BDL rats through activation of PKC alpha. *Hepatology* **35**(5), 1041-52.

Alpini, G., Kanno, N., Phinizy, J. L., Glaser, S., Francis, H., Taffetani, S., and LeSage, G. (2004). Tauroursodeoxycholate inhibits human cholangiocarcinoma growth via Ca²⁺-, PKC-, and MAPK-dependent pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **286**(6), G973-G982.

Alrefai, W. A., and Gill, R. K. (2007). Bile Acid Transporters: Structure, Function, Regulation and Pathophysiological Implications. *Pharmaceutical Research* **24**(10), 1803-1823 (journal article).

Altman, R., Bosch, B., Brune, K., Patrignani, P., and Young, C. (2015). Advances in NSAID development: evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs* **75**(8), 859-77.

Alves-Bezerra, M., and Cohen, D. E. (2017). Triglyceride Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology* **8**(1), 1-8.

Amacher, D. E. (2010). The discovery and development of proteomic safety biomarkers for the detection of drug-induced liver toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **245**(1), 134-142.

Amacher, D. E. (2011). Strategies for the early detection of drug-induced hepatic steatosis in preclinical drug safety evaluation studies. *Toxicology* **279**(1), 10-18.

Amacher, D. E., and Chalasani, N. (2014). Drug-Induced Hepatic Steatosis. *Semin Liver Dis* **34**(02), 205-214.

Amaral, J. D., Viana, R. J. S., Ramalho, R. M., Steer, C. J., and Rodrigues, C. M. P. (2009). Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *Journal of Lipid Research* **50**(9), 1721-1734.

Andrade, E. L., Bento, A. F., Cavalli, J., Oliveira, S. K., Freitas, C. S., Marcon, R., Schwanke, R. C., Siqueira, J. M., and Calixto, J. B. (2016). Non-clinical studies required for new drug development - Part I:

early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **49**(11), e5644.

Annaert, P. P., Turncliff, R. Z., Booth, C. L., Thakker, D. R., and Brouwer, K. L. R. (2001). P-Glycoprotein-Mediated In Vitro Biliary Excretion in Sandwich-Cultured Rat Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* **29**(10), 1277-1283.

Arguello, G., Balboa, E., Arrese, M., and Zanlungo, S. (2015). Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1852**(9), 1765-1778.

Aubrecht, J., Schomaker, S. J., and Amacher, D. E. (2013). Emerging hepatotoxicity biomarkers and their potential to improve understanding and management of drug-induced liver injury. *Genome Medicine* **5**(9), 85 (journal article).

Aulbach, A. D., and Amuzie, C. J. (2017). Chapter 17 - Biomarkers in Nonclinical Drug Development A2 - Faqi, Ali Said. In *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development (Second Edition)*, pp. 447-471. Academic Press, Boston, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803620-4.00017-7>.

Autio, Kaija J., Schmitz, W., Nair, Remya R., Selkälä, Eija M., Sormunen, Raija T., Miinalainen, Ilkka J., Crick, Peter J., Wang, Y., Griffiths, William J., Reddy, Janardan K., et al. (2014). Role of AMACR (α -methylacyl-CoA racemase) and MFE-1 (peroxisomal multifunctional enzyme-1) in bile acid synthesis in mice. *Biochemical Journal* **461**(1), 125-135.

Baes, M., and Van Veldhoven, P. P. (2016). Hepatic dysfunction in peroxisomal disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1863**(5), 956-970.

Bahr, M. J. (2017). Gefäßkrankungen der Leber *internistische praxis* **58**(3), 1-8.

Baiocchi, L., Tisone, G., Russo, M. A., Longhi, C., Palmieri, G., Volpe, A., Almerighi, C., Telesca, C., Carbone, M., Toti, L., et al. (2008). TUDCA prevents cholestasis and canalicular damage induced by ischemia-reperfusion injury in the rat, modulating PKC α -ezrin pathway. *Transplant International* **21**(8), 792-800.

Ballet, F. (1997). Hepatotoxicity in drug development: detection, significance and solutions. *Journal of Hepatology* **26**, 26-36.

Bareille, M. P., Montastruc, J. L., and Lapeyre-Mestre, M. (2001). [Liver damage and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: case non-case study in the French Pharmacovigilance Database]. *Therapie* **56**(1), 51-5.

Bath, R. K., Brar, N. K., Forouhar, F. A., and Wu, G. Y. (2014). A review of methotrexate-associated hepatotoxicity. *Journal of Digestive Diseases* **15**(10), 517-524.

Bäumel, M., Hergeth, K., and Bein, T. (2009). *Intensivbuch Pharmakotherapie: Wirkstoffprofile, Behandlungsstrategien, Fehler und Gefahren in der Intensivmedizin*. Med. Wiss. Verlag-Ges, Berlin.

Begriffe, K., Massart, J., Robin, M.-A., Borgne-Sanchez, A., and Fromenty, B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of Hepatology* **54**(4), 773-794.

Behr, C., Slopianka, M., Haake, V., Strauss, V., Sperber, S., Kamp, H., Walk, T., Beekmann, K., Rietjens, I., and van Ravenzwaay, B. (2019). Analysis of metabolome changes in the bile acid pool in feces and plasma of antibiotic-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **363**, 79-87.

- Bennion, L. J., Drobny, E., Knowler, W. C., Ginsberg, R. L., Garnick, M. B., Adler, R. D., and Duane, W. C. (1978). Sex differences in the size of bile acid pools. *Metabolism* **27**(8), 961-969.
- Bernd, M., and Hartmut, D. (2002). Pharmacokinetic/pharmacodynamic studies in drug product development. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **91**(1), 18-31.
- Bioethics, N. C. o. (2005). *The Ethics of Research Involving Animals*. Nuffield Council on Bioethics.
- Bjorge, S. M., and Baillie, T. A. (1991). Studies on the beta-oxidation of valproic acid in rat liver mitochondrial preparations. *Drug Metabolism and Disposition* **19**(4), 823-829.
- Bjornsson, E. S., and Jonasson, J. G. (2013). Drug-Induced Cholestasis. *Clinics in Liver Disease* **17**(2), 191-209.
- Blackler, R., Syer, S., Bolla, M., Ongini, E., and Wallace, J. L. (2012). Gastrointestinal-sparing effects of novel NSAIDs in rats with compromised mucosal defence. *PloS one* **7**(4), e35196-e35196.
- Blass, B. E. (2015). Chapter 8 - Safety and Toxicology. In *Basic Principles of Drug Discovery and Development*, pp. 345-381. Academic Press, Boston, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411508-8.00008-6>.
- Boelsterli, U. A. (2003). Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **192**(3), 307-322.
- Bolzan, H., Spatola, J., Castelletto, R., and Curciarello, J. (2000). [Intrahepatic cholestasis induced by amoxicillin alone]. *Gastroenterologia y hepatologia* **23**(5), 237-9.
- Boone, L., Meyer, D., Cusick, P., Ennulat, D., Bolliger, A. P., Everds, N., Meador, V., Elliott, G., Honor, D., Bounous, D., *et al.* (2005). Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. *Veterinary Clinical Pathology* **34**(3), 182-188.
- Bort, R., Ponsoda, X., Jover, R., Gómez-Lechón, M. J., and Castell, J. V. (1999). Diclofenac Toxicity to Hepatocytes: A Role for Drug Metabolism in Cell Toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **288**(1), 65-72.
- Boyer, J. L. (2013). Bile Formation and Secretion. In *Comprehensive Physiology* doi: 10.1002/cphy.c120027. John Wiley & Sons, Inc.
- Brodniewicz, T., and Gryniewicz, G. (2010). Preclinical drug development. *Acta poloniae pharmaceutica* **67**(6), 578-85.
- Bruyère, A., Declèves, X., Bouzom, F., Proust, L., Martinet, M., Walther, B., and Parmentier, Y. (2009). Development of an optimized procedure for the preparation of rat intestinal microsomes: comparison of hepatic and intestinal microsomal cytochrome P450 enzyme activities in two rat strains. *Xenobiotica* **39**(1), 22-32.
- Bubendorf, L., E. Feichter, G., C. Obermann, E., and Dalquen, P. (2011). *Pathologie*, doi: 10.1007/978-3-642-04562-2.
- Cariello, M., Piccinin, E., Garcia-Irigoyen, O., Sabbà, C., and Moschetta, A. (2017). Nuclear receptor FXR, bile acids and liver damage: Introducing the progressive familial intrahepatic cholestasis with FXR mutations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.019>.
- Cases, M., Briggs, K., Steger-Hartmann, T., Pognan, F., Marc, P., Kleinoder, T., Schwab, C. H., Pastor, M., Wichard, J., and Sanz, F. (2014). The eTOX data-sharing project to advance in silico drug-induced toxicity prediction. *Int J Mol Sci* **15**(11), 21136-54.

- Cepa, S., Potter, D., Wong, L., Schutt, L., Tarrant, J., Pang, J., Zhang, X., Andaya, R., Salphati, L., Ran, Y., *et al.* (2018). Individual serum bile acid profiling in rats aids in human risk assessment of drug-induced liver injury due to BSEP inhibition. *Toxicology and Applied Pharmacology* **338**, 204-213.
- Chandra, P., and Brouwer, K. L. R. (2004). The Complexities of Hepatic Drug Transport: Current Knowledge and Emerging Concepts. *Pharmaceutical Research* **21**(5), 719-735 (journal article).
- Chen, X., Xu, J., Zhang, C., Yu, T., Wang, H., Zhao, M., Duan, Z.-H., Zhang, Y., Xu, J.-M., and Xu, D.-X. (2011). The protective effects of ursodeoxycholic acid on isoniazid plus rifampicin induced liver injury in mice. *European Journal of Pharmacology* **659**(1), 53-60.
- Cheng, H. S., and Rademaker, M. (2018). Monitoring methotrexate-induced liver fibrosis in patients with psoriasis: utility of transient elastography. *Psoriasis (Auckland, N.Z.)* **8**, 21-29.
- Chiang, J. Y. L. (2013). Bile Acid Metabolism and Signaling. *Comprehensive Physiology* **3**(3), 1191-1212.
- Chiang, J. Y. L. (2017). Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver Research* **1**(1), 3-9.
- Chiang, J. Y. L., and Ferrell, J. M. (2018). Bile Acid Metabolism in Liver Pathobiology. *Gene Expr* **18**(2), 71-87.
- Cicognani, C., Malavolti, M., Morselli-Labate, A. M., Sama, C., and Barbara, L. (1996). Flutamide-induced toxic hepatitis. *Digest Dis Sci* **41**(11), 2219-2221 (journal article).
- Coen, M., Lenz, E. M., Nicholson, J. K., Wilson, I. D., Pognan, F., and Lindon, J. C. (2003). An Integrated Metabonomic Investigation of Acetaminophen Toxicity in the Mouse Using NMR Spectroscopy. *Chemical Research in Toxicology* **16**(3), 295-303.
- Coen, M., Ruepp, S. U., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Pognan, F., Lenz, E. M., and Wilson, I. D. (2004). Integrated application of transcriptomics and metabonomics yields new insight into the toxicity due to paracetamol in the mouse. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **35**(1), 93-105.
- Conway, R., and Carey, J. J. (2017). Risk of liver disease in methotrexate treated patients. *World journal of hepatology* **9**(26), 1092-1100.
- Coomes, E., S L Chan, E., and Reiss, A. (2011). *Methotrexate in Atherogenesis and Cholesterol Metabolism*, Vol. 2011.
- Curry, S. H., Decory, H. H., and Gabrielson, J. (2010). Phase I: The First Opportunity for Extrapolation from Animal Data to Human Exposure. In *Principles and Practice of Pharmaceutical Medicine* doi: 10.1002/9781444325263.ch9, pp. 84-106. Wiley-Blackwell.
- Dambach, D. M. (2014). Drug-Induced Hepatotoxicity: Advances in Preclinical Predictive Strategies and Tools. In *Predictive ADMET* doi: 10.1002/9781118783344.ch19, pp. 433-465. John Wiley & Sons, Inc.
- Dancygier, H. (2013). *Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen*. Springer Berlin Heidelberg.
- David, S., and Hamilton, J. P. (2010). Drug-induced Liver Injury. *US gastroenterology & hepatology review* **6**, 73-80.
- Dawson, P. A., Haywood, J., Craddock, A. L., Wilson, M., Tietjen, M., Kluckman, K., Maeda, N., and Parks, J. S. (2003). Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *The Journal of biological chemistry* **278**(36), 33920-7.

- Dawson, P. A., and Karpen, S. J. (2015). Intestinal transport and metabolism of bile acids. *Journal of Lipid Research* **56**(6), 1085-1099.
- Dawson, P. A., Lan, T., and Rao, A. (2009). Bile acid transporters. *Journal of Lipid Research* **50**(12), 2340-2357.
- den Boer, N. C., van der Heiden, C., Leijense, B., and Souverin, J. H. M. (1987). *Clinical Chemistry: An Overview*. Plenum Press, Den Haag.
- Denayer, T., Stöhr, T., and Van Roy, M. (2014). Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine* **2**(1), 5-11.
- Devarbhavi, H., Bonkovsky, H. L., Russo, M., and Chalasani, N. (2018). 56 - Drug-Induced Liver Injury A2 - Sanyal, Arun J. In *Zakim and Boyer's Hepatology (Seventh Edition)* (T. D. Boyer, K. D. Lindor, and N. A. Terrault, Eds.), pp. 844-890.e17. Content Repository Only!, Philadelphia, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-37591-7.00056-2>.
- Ding, L., Yang, L., Wang, Z., and Huang, W. (2015). Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica. B* **5**(2), 135-144.
- Dirven, L., Klarenbeek, N. B., van den Broek, M., van Groenendael, J. H., de Sonnaville, P. B., Kerstens, P. J., Huizinga, T. W., Dijkmans, B. A., Lems, W. F., and Allaart, C. F. (2013). Risk of alanine transferase (ALT) elevation in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate in a DAS-steered strategy. *Clinical rheumatology* **32**(5), 585-90.
- Dragovic, S., Vermeulen, N. P. E., Gerets, H. H., Hewitt, P. G., Ingelman-Sundberg, M., Park, B. K., Juhila, S., Snoeys, J., and Weaver, R. J. (2016). Evidence-based selection of training compounds for use in the mechanism-based integrated prediction of drug-induced liver injury in man. *Archives of Toxicology* **90**(12), 2979-3003 (journal article).
- Draheim, V., Reichel, A., Weitschies, W., and Moenning, U. (2010). N-glycosylation of ABC transporters is associated with functional activity in sandwich-cultured rat hepatocytes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **41**(2), 201-209.
- Duncan, A., Jacques, M., Michael, G. R., Joanne, B., Mark, C., and Jean-Pierre, V. (2010). Secondary Pharmacodynamic Studies and In vitro Pharmacological Profiling. In *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia* doi: doi:10.1002/9780470571224.pse085.
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Adler, M., Amberg, A., Brandenburg, A., Callanan, J. J., Connor, S., Fountoulakis, M., Gmuender, H., Gruhler, A., Hewitt, P., *et al.* (2011). The enhanced value of combining conventional and "omics" analyses in early assessment of drug-induced hepatobiliary injury. *Toxicology and Applied Pharmacology* **252**(2), 97-111.
- EMA (2010). *Repeat Dose Toxicity*. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000966.jsp&mid=WC0b01ac058002956f. Accessed April 5 2019
- EMA (2003). Committee for Veterinary Medicinal Products; Diclofenac, Summary Report.
- EMA (2011). *Guideline on bioanalytical method validation*, European Medicines Agency.
- Ennulat, D., Magid-Slav, M., Rehm, S., and Tatsuoka, K. S. (2010). Diagnostic Performance of Traditional Hepatobiliary Biomarkers of Drug-Induced Liver Injury in the Rat. *Toxicological Sciences* **116**(2), 397-412.
- EU (2001). RICHTLINIE 2001/83/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*.

- EUPATI (2015a). *Der prädiktive Wert präklinischer Prüfungen*. Available at: <https://www.eupati.eu/de/klinische-entwicklung-und-studien/entwicklung-eines-arzneimittels-schritt-6-phase-i-nachweis-des-wirkmechanismus/>. Accessed March 15 2018.
- EUPATI (2015b). *Entwicklung eines Arzneimittels. Schritt 6: Phase I – Nachweis des Wirkmechanismus*. Available at: <https://www.eupati.eu/de/klinische-entwicklung-und-studien/entwicklung-eines-arzneimittels-schritt-6-phase-i-nachweis-des-wirkmechanismus/>. Accessed March 15 2018.
- EUPATI (2015c). *Phasen der klinischen Entwicklung*. Available at: <https://www.eupati.eu/de/klinische-entwicklung-und-studien/phasen-der-klinischen-entwicklung/>. Accessed March 16 2018.
- Fachinfo-Service (2015). *Amitriptylin-neuraxpharm* Available at: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/021341>. Accessed April 5 2019.
- Fachinfo-Service (2018a). *Diclofenac 100 retard Heumann*. Available at: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/020213>. Accessed April 5 2019.
- Fachinfo-Service (2018b). *Methotrexat Lösung*. Available at: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/001332>. Accessed April 5 2019.
- Fachinfo-Service (2018c). *Valproinsäure-ratiopharm 300 Filmtabletten* Available at: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/011903>. Accessed April 5 2019.
- Fan, J.-G., Zhong, L., Tia, L.-Y., Xu, Z.-J., Li, M.-S., and Wang, G.-L. (2005). Effects of ursodeoxycholic acid and/or low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. *World journal of gastroenterology* **11**(15), 2346-2350.
- Faqi, A. S. (2017). Chapter 1 - Introduction. In *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development (Second Edition)*, pp. 1-4. Academic Press, Boston, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803620-4.00001-3>.
- FDA, U. (2005). Guidance for industry estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. *FDA, ed.*
- Ferdinandusse, S., and Houten, S. M. (2006). Peroxisomes and bile acid biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**(12), 1427-1440.
- Fontana, R. J., Hayashi, P. H., Gu, J., Reddy, K. R., Barnhart, H., Watkins, P. B., Serrano, J., Lee, W. M., Chalasani, N., Stolz, A., *et al.* (2014). Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury Is Associated With Substantial Morbidity and Mortality Within 6 Months From Onset. *Gastroenterology* **147**(1), 96-108.e4.
- Friese, M. A., Montalban, X., Willcox, N., Bell, J. I., Martin, R., and Fugger, L. (2006). The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain* **129**(8), 1940-1952.
- Funk, C., Pantze, M., Jehle, L., Ponelle, C., Scheuermann, G., Lazendic, M., and Gasser, R. (2001). Troglitazone-induced intrahepatic cholestasis by an interference with the hepatobiliary export of bile acids in male and female rats. Correlation with the gender difference in troglitazone sulfate formation and the inhibition of the canalicular bile salt export pump (Bsep) by troglitazone and troglitazone sulfate. *Toxicology* **167**(1), 83-98.
- Gad, S. C. (2014). Chapter 2 - Rodents model for toxicity testing and biomarkers. In *Biomarkers in Toxicology* (R. C. Gupta, Ed.), pp. 7-69. Academic Press, Boston, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00002-6>.

- Gad, S. C., Spainhour, C. B., Shoemake, C., Pallman, D. R. S., Stricker-Krongrad, A., Downing, P. A., Seals, R. E., Eagle, L. A., Polhamus, K., and Daly, J. (2016). Tolerable Levels of Nonclinical Vehicles and Formulations Used in Studies by Multiple Routes in Multiple Species With Notes on Methods to Improve Utility. *International Journal of Toxicology* **35**(2), 95-178.
- Gallo, J. M. (2010). Pharmacokinetic/Pharmacodynamic-Driven Drug Development. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* **77**(4), 381-388.
- Gareth J Jenkins, L. H. (2008). *Bile Acids: Toxicology and Bioactivity*, doi: 10.1039/9781847558336. RSC Publishing M. D. W. Diana Anderson, Timothy C Marrs, ed. Issues in Toxicology.
- Geier, A., Wagner, M., Dietrich, C. G., and Trauner, M. (2007). Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1773**(3), 283-308.
- Ghibellini, G., Leslie, E. M., and Brouwer, K. L. R. (2006). Methods to Evaluate Biliary Excretion of Drugs in Humans: an Updated Review. *Molecular pharmaceutics* **3**(3), 198-211.
- Giannini, E. G., Testa, R., and Savarino, V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **172**(3), 367-379.
- Giorgetti, R., di Muzio, M., Giorgetti, A., Girolami, D., Borgia, L., and Tagliabracci, A. (2017). Flutamide-induced hepatotoxicity: ethical and scientific issues. *European review for medical and pharmacological sciences* **21**(1 Suppl), 69-77.
- Goldstein, J. L., and Cryer, B. (2015). Gastrointestinal injury associated with NSAID use: a case study and review of risk factors and preventative strategies. *Drug, healthcare and patient safety* **7**, 31-41.
- Goodwin, B., Jones, S. A., Price, R. R., Watson, M. A., McKee, D. D., Moore, L. B., Galardi, C., Wilson, J. G., Lewis, M. C., Roth, M. E., *et al.* (2000). A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 Represses Bile Acid Biosynthesis. *Molecular Cell* **6**(3), 517-526.
- Gottlieb, N. L. (1985). Introduction: The art and science of nonsteroidal anti-inflammatory drug selection. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **15**(2, Supplement 1), 1-3.
- Gowda, S., Desai, P. B., Hull, V. V., Math, A. A. K., Vernekar, S. N., and Kulkarni, S. S. (2009). A review on laboratory liver function tests. *The Pan African medical journal* **3**, 17-17.
- Graham, E. E., Walsh, R. J., Hirst, C. M., Maggs, J. L., Martin, S., Wild, M. J., Wilson, I. D., Harding, J. R., Kenna, J. G., Peter, R. M., *et al.* (2008). Identification of the Thiophene Ring of Methapyrilene as a Novel Bioactivation-Dependent Hepatic Toxicophore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **326**(2), 657-671.
- Graichen, M. E., Neptun, D. A., Dent, J. G., Popp, J. A., and Leonard, T. B. (1985). Effects of methapyrilene on rat hepatic xenobiotic metabolizing enzymes and liver morphology. *Fundamental and Applied Toxicology* **5**(1), 165-174.
- Greaves, P. (2012). Chapter 9 - Liver and Pancreas. In *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies (Fourth Edition)* doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53856-7.00009-9>, pp. 433-535. Academic Press, Boston.
- Gressner, A. M., and Arndt, T. (2013). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Berlin Heidelberg.
- Griffiths, W. J., and Sjövall, J. (2010). Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. *Journal of Lipid Research* **51**(1), 23-41.

- Guengerich, F. P. (2011). Mechanisms of Drug Toxicity and Relevance to Pharmaceutical Development. *Drug metabolism and pharmacokinetics* **26**(1), 3-14.
- Haber, L. T., Bates, H. K., Allen, B. C., Vincent, M. J., and Oller, A. R. (2017). Derivation of an oral toxicity reference value for nickel. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **87**, S1-S18.
- Halilbasic, E., Baghdasaryan, A., and Trauner, M. (2013a). Nuclear Receptors as Drug Targets in Cholestatic Liver Diseases. *Clinics in Liver Disease* **17**(2), 161-189.
- Halilbasic, E., Claudel, T., and Trauner, M. (2013b). Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *Journal of Hepatology* **58**(1), 155-168.
- Hall, A. P., Elcombe, C. R., Foster, J. R., Harada, T., Kaufmann, W., Knippel, A., Kuttler, K., Malarkey, D. E., Maronpot, R. R., Nishikawa, A., *et al.* (2012). Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse and non-adverse) changes--conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicol Pathol* **40**(7), 971-94.
- Hallbach, J. (2006). *Klinische Chemie für den Einstieg*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hallbach, J. (2011). *Klinische Chemie und Hämatologie: Biomedizinische Analytik für MTLA und Studium*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hamadeh, H. K., Knight, B. L., Haugen, A. C., Sieber, S., Amin, R. P., Bushel, P. R., Stoll, R., Blanchard, K., Jayadev, S., Tennant, R. W., *et al.* (2002). Methapyrilene Toxicity: Anchorage of Pathologic Observations to Gene Expression Alterations. *Toxicologic Pathology* **30**(4), 470-482.
- Heilmeyer, L., and Kühn, H. A. (2013). *Innere Medizin. Ein Lehrbuch für Studierende der Medizin und Ärzte: Teil 2: Verdauungsorgane · Nieren · Harnwege · Endokrinologie · Stoffwechsel · Immunopathologie · Physikalische Einwirkungen · Vergiftungen · Vegetative Störungen*. Springer Berlin Heidelberg.
- Heise, T., Schug, M., Storm, D., Ellinger-Ziegelbauer, H., Ahr, H. J., Hellwig, B., Rahnenführer, J., Ghallab, A., Guenther, G., Sissnaiske, J., *et al.* (2012). In Vitro - In Vivo Correlation of Gene Expression Alterations Induced by Liver Carcinogens. *Current Medicinal Chemistry* **19**(11), 1721-1730.
- Hewitt, N. J., Gómez Lechón, M. J., Houston, J. B., Hallifax, D., Brown, H. S., Maurel, P., Kenna, J. G., Gustavsson, L., Lohmann, C., Skonberg, C., *et al.* (2007). Primary Hepatocytes: Current Understanding of the Regulation of Metabolic Enzymes and Transporter Proteins, and Pharmaceutical Practice for the Use of Hepatocytes in Metabolism, Enzyme Induction, Transporter, Clearance, and Hepatotoxicity Studies. *Drug Metabolism Reviews* **39**(1), 159-234.
- Hofmann, A. F. (1999). The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Archives of Internal Medicine* **159**(22), 2647-2658.
- Holmes, A. M., Creton, S., and Chapman, K. (2010). Working in partnership to advance the 3Rs in toxicity testing. *Toxicology* **267**(1), 14-19.
- Holt, J. D. S., and Nuttall, J. P. (2014). Preclinical Safety Evaluation. In *Microbicides for Prevention of HIV Infection* (J. Nuttall, Ed.) doi: 10.1007/82_2013_327, pp. 55-78. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Houten, S., and Auwerx, J. (2008). Bile Acids. In *Encyclopedia of Molecular Pharmacology* (S. Offermanns, and W. Rosenthal, Eds.) doi: 10.1007/978-3-540-38918-7_181, pp. 256-259. Springer Berlin Heidelberg.

- Hunt, M. C., Siponen, M. I., and Alexson, S. E. H. (2012). The emerging role of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases in regulating peroxisomal lipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1822**(9), 1397-1410.
- Hylemon, P. B., Takabe, K., Dozmorov, M., Nagahashi, M., and Zhou, H. (2017). Bile acids as global regulators of hepatic nutrient metabolism. *Liver Research* **1**(1), 10-16.
- Im, E., and Martinez, J. D. (2004). Ursodeoxycholic acid (UDCA) can inhibit deoxycholic acid (DCA)-induced apoptosis via modulation of EGFR/Raf-1/ERK signaling in human colon cancer cells. *J Nutr* **134**(2), 483-6.
- Iwanaga, T., Nakakariya, M., Yabuuchi, H., Maeda, T., and Tamai, I. (2007). *Involvement of Bile Salt Export Pump in Flutamide-Induced Cholestatic Hepatitis*, Vol. 30.
- J Patti, G., Yanes, Ó., and Siuzdak, G. (2012). *Innovation: Metabolomics: The apogee of the omics trilogy*, Vol. 13.
- Jain, S., and Kaplowitz, N. (2010). 9.16 - Clinical Considerations of Drug-Induced Hepatotoxicity. In *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (C. A. McQueen, Ed, pp. 369-381. Elsevier, Oxford, .) doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01014-9>
- Jinchun, S., Yosuke, A., Dörthe, A.-D., Laura, K. S., Xi, Y., James, G., Lisa, P., Feng, Q., William, S., Donna, L. M., et al. (2013). Systems Biology Investigation to Discover Metabolic Biomarkers of Acetaminophen-Induced Hepatic Injury Using Integrated Transcriptomics and Metabolomics *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis* doi: 10.4172/2155-9929.S1-002.
- Kantor, T. G. (1986). Use of diclofenac in analgesia. *The American journal of medicine* **80**(4b), 64-9.
- Kim, R. B. (2006). Transporters and Drug Discovery: Why, When, and How. *Molecular Pharmaceutics* **3**(1), 26-32.
- Kleiner, D. E., Chalasani, N. P., Lee, W. M., Fontana, R. J., Bonkovsky, H. L., Watkins, P. B., Hayashi, P. H., Davern, T. J., Navarro, V., Reddy, R., et al. (2014). Hepatic histological findings in suspected drug-induced liver injury: systematic evaluation and clinical associations. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **59**(2), 661-670.
- Kohonen, P., Parkkinen, J. A., Willighagen, E. L., Ceder, R., Wennerberg, K., Kaski, S., and Grafström, R. C. (2017). A transcriptomics data-driven gene space accurately predicts liver cytopathology and drug-induced liver injury. *Nature communications* **8**, 15932-15932.
- Konstantinidis, A., Winkler, D., Akimova, E., Papageorgiou, K., Grohmann, R., Toto, S., Kasper, S., Greil, W., Huf, W., and Friedrich, M.-E. (2015). Drug-Induced Liver Injury during Antidepressant Treatment: Results of AMSP, a Drug Surveillance Program. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **19**(4).
- Krämer, G., and C. Laub, M. (1992). *Valproinsäure: Pharmakologie · Klinischer Einsatz, Nebenwirkungen · Therapierichtlinien*, doi: 10.1007/978-3-642-97843-2.
- Kroeger, M. (2006). How omics technologies can contribute to the '3R' principles by introducing new strategies in animal testing. *Trends in Biotechnology* **24**(8), 343-346.
- Kuipers, F., Bloks, V. W., and Groen, A. K. (2014). Beyond intestinal soap—bile acids in metabolic control. *Nature Reviews Endocrinology* **10**, 488 (Review Article).
- Kullak-Ublick, G. A. (2003). ABC transporter regulation by bile acids: where PXR meets FXR. *Journal of Hepatology* **39**(4), 628-630.

- Kullak-Ublick, G. A., Andrade, R. J., Merz, M., End, P., Benesic, A., Gerbes, A. L., and Aithal, G. P. (2017). Drug-induced liver injury: recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut* doi: 10.1136/gutjnl-2016-313369.
- L Steinmetz, K., and Edward, S. (2009). *The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications*, Vol. 9 Suppl 1.
- Laine, L., Goldkind, L., Curtis, S. P., Connors, L. G., Yanqiong, Z., and Cannon, C. P. (2009). How common is diclofenac-associated liver injury? Analysis of 17,289 arthritis patients in a long-term prospective clinical trial. *The American journal of gastroenterology* **104**(2), 356-62.
- Landrier, J.-F., Eloranta, J. J., Vavricka, S. R., and Kullak-Ublick, G. A. (2006). The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter- α and - β genes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**(3), G476-G485.
- Lechner, C., Reichel, V., Moenning, U., Reichel, A., and Fricker, G. (2010). Development of a fluorescence-based assay for drug interactions with human Multidrug Resistance Related Protein (MRP2; ABCC2) in MDCKII-MRP2 membrane vesicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **75**(2), 284-290.
- LeCluyse, E. L., Bullock, P. L., and Parkinson, A. (1996a). Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **22**(1), 133-186.
- LeCluyse, E. L., Bullock, P. L., Parkinson, A., and Hochman, J. H. (1996b). Cultured Rat Hepatocytes. In *Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism* (R. T. Borchardt, P. L. Smith, and G. Wilson, Eds.) doi: 10.1007/978-1-4899-1863-5_9, pp. 121-159. Springer US, Boston, MA.
- Lee, H. W., Chung, J. P., Lee, K. S., Kim, K. C., Lee, K. S., Chon, C. Y., Park, I. S., and Kim, H. G. (1996). A case of flutamide-induced acute cholestatic hepatitis: a case report. *Yonsei Med J* **37**(3), 225-229.
- Lee, W. M. (2013). Drug-induced Acute Liver Failure. *Clinics in liver disease* **17**(4), 10.1016/j.cld.2013.07.001.
- Li, T., and Apte, U. (2015). Bile acid metabolism and signaling in cholestasis, inflammation and cancer. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* **74**, 263-302.
- Li, T., and Chiang, J. Y. L. (2009). Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs. *PPAR Research* **2009**, 501739.
- Li, T., and Chiang, J. Y. L. (2013). Nuclear receptors in bile acid metabolism. *Drug metabolism reviews* **45**(1), 145-155.
- Lickteig, A. J., Csanaky, I. L., Pratt-Hyatt, M., and Klaassen, C. D. (2016). Activation of Constitutive Androstane Receptor (CAR) in Mice Results in Maintained Biliary Excretion of Bile Acids Despite a Marked Decrease of Bile Acids in Liver. *Toxicological Sciences* **151**(2), 403-418.
- Lijinsky, W., Reuber, M., and Blackwell, B. (1980). Liver tumors induced in rats by oral administration of the antihistaminic methapyrilene hydrochloride. *Science* **209**(4458), 817-819.
- Lin, Z., and Will, Y. (2012). Evaluation of Drugs With Specific Organ Toxicities in Organ-Specific Cell Lines. *Toxicological Sciences* **126**(1), 114-127.
- Lionarons, D. A., Heger, M., van Golen, R. F., Alles, L. K., van der Mark, V. A., Kloek, J. J., de Waart, D. R., Marsman, H. A., Rusch, H., Verheij, J., et al. (2016). Simple steatosis sensitizes cholestatic rats to liver injury and dysregulates bile salt synthesis and transport. *Scientific Reports* **6**, 31829 (Article).

LiverTox (2015a). *Flutamide*. Available at: <http://livertox.nlm.nih.gov/Flutamide.htm>. Accessed January 19 2016.

LiverTox (2015b). *Methotrexate*. Available at: <http://livertox.nlm.nih.gov/Methotrexate.htm>. Accessed January 26 2016.

LiverTox (2015c). *Valproate*. Available at: <http://livertox.nlm.nih.gov/Valproate.htm>. Accessed January 14 2016.

livertox.nlm.nih.gov (2017). *Amitriptyline*. Available at: <https://livertox.nlm.nih.gov/Amitriptyline.htm>. Accessed May 22 2017.

López-Riera, M., Conde, I., Tolosa, L., Zaragoza, Á., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., and Jover, R. (2017). New microRNA Biomarkers for Drug-Induced Steatosis and Their Potential to Predict the Contribution of Drugs to Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in Pharmacology* **8**, 3.

Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., and Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS computational biology* **13**(5), e1005457-e1005457.

Lu, Y., Kim, S., and Park, K. (2011). In vitro-In vivo Correlation: Perspectives on Model Development. *International journal of pharmaceutics* **418**(1), 142-148.

Lüllmann, H., Mohr, K., and Hein, L. (2006). *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen ; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker ; 129 Tabellen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Luo, J., Ko, B., Elliott, M., Zhou, M., Lindhout, D. A., Phung, V., To, C., Learned, R. M., Tian, H., DePaoli, A. M., *et al.* (2014a). A nontumorigenic variant of FGF19 treats cholestatic liver diseases. *Science Translational Medicine* **6**(247), 247ra100-247ra100.

Luo, L., Aubrecht, J., Li, D., Warner, R. L., Johnson, K. J., Kenny, J., and Colangelo, J. L. (2018). Assessment of serum bile acid profiles as biomarkers of liver injury and liver disease in humans. *PLOS ONE* **13**(3), e0193824.

Luo, L., Schomaker, S., Houle, C., Aubrecht, J., and Colangelo, J. L. (2014b). Evaluation of Serum Bile Acid Profiles as Biomarkers of Liver Injury in Rodents. *Toxicological Sciences* **137**(1), 12-25.

Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., Hull, M. V., Lustig, K. D., Mangelsdorf, D. J., and Shan, B. (1999). Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids. *Science* **284**(5418), 1362 (10.1126/science.284.5418.1362).

Manzotti, C., Casazza, G., Stimac, T., Nikolova, D., and Gluud, C. (2017). Total serum bile acids or serum bile acid profile, or both, for the diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* doi: 10.1002/14651858.CD012546(2).

Maria J Monte, J. J. M., Alvaro Antelo, Jose Vazquez-Tato (2009). Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World Journal of Gastroenterology* **15**(7), 804-616.

Maronpot, R. R. (2014). *Liver, Hepatocyte - Hypertrophy*. Available at: <https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/hepatobiliary/liver/hhypert/index.htm>. Accessed 24.07 2017.

Martínez-Augustín, O., and de Medina, F. S. (2008). Intestinal bile acid physiology and pathophysiology. *World Journal of Gastroenterology : WJG* **14**(37), 5630-5640.

- Marzioni, M., Francis, H., Benedetti, A., Ueno, Y., Fava, G., Venter, J., Reichenbach, R., Mancino, M. G., Summers, R., Alpini, G., *et al.* (2006). Ca²⁺-Dependent Cytoprotective Effects of Ursodeoxycholic and Tauroursodeoxycholic Acid on the Biliary Epithelium in a Rat Model of Cholestasis and Loss of Bile Ducts. *The American Journal of Pathology* **168**(2), 398-409.
- Masubuchi, Y., Ose, A., and Horie, T. (2001). Mechanism-Based Inactivation of CYP2C11 by Diclofenac. *Drug Metabolism and Disposition* **29**(9), 1190-1195.
- Mattes, W., Davis, K., Fabian, E., Greenhaw, J., Herold, M., Looser, R., Mellert, W., Groeters, S., Marxfeld, H., Moeller, N., *et al.* (2014). Detection of hepatotoxicity potential with metabolite profiling (metabolomics) of rat plasma. *Toxicology Letters* **230**(3), 467-478.
- May, K. P., West, S. G., McDermott, M. T., and Huffer, W. E. (1994). The Effect of Low-Dose Methotrexate on Bone Metabolism and Histomorphometry in Rats. *Arthritis & Rheumatism* **37**(2), 201-206.
- McCarren, P., Springer, C., and Whitehead, L. (2011). An investigation into pharmaceutically relevant mutagenicity data and the influence on Ames predictive potential. *Journal of Cheminformatics* **3**, 51-51.
- McGettigan, P., and Henry, D. (2013). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries. *PLoS medicine* **10**(2), e1001388-e1001388.
- Mennecozzi, M., Landesmann, B., Palosaari, T., Harris, G., and Whelan, M. (2015). Sex differences in liver toxicity-do female and male human primary hepatocytes react differently to toxicants in vitro? *PloS one* **10**(4), e0122786-e0122786.
- Mennone, A., Soroka, C. J., Harry, K. M., and Boyer, J. L. (2010). Role of Breast Cancer Resistance Protein in the Adaptive Response to Cholestasis. *Drug Metabolism and Disposition* **38**(10), 1673-1678.
- Mercer, A. E., Regan, S. L., Hirst, C. M., Graham, E. E., Antoine, D. J., Benson, C. A., Williams, D. P., Foster, J., Kenna, J. G., and Park, B. K. (2009). Functional and toxicological consequences of metabolic bioactivation of methapyrilene via thiophene S-oxidation: Induction of cell defence, apoptosis and hepatic necrosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* **239**(3), 297-305.
- Meyer, U. A. (1996). Overview of enzymes of drug metabolism. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics* **24**(5), 449-59.
- Miao, J., Xiao, Z., Kanamaluru, D., Min, G., Yau, P. M., Veenstra, T. D., Ellis, E., Strom, S., Suino-Powell, K., Xu, H. E., *et al.* (2009). Bile acid signaling pathways increase stability of Small Heterodimer Partner (SHP) by inhibiting ubiquitin-proteasomal degradation. *Genes & Development* **23**(8), 986-996.
- Mindikoglu, A. L., King, D., Magder, L. S., Ozolek, J. A., Mazariegos, G. V., and Shneider, B. L. (2011). Valproic acid-associated acute liver failure in children: case report and analysis of liver transplantation outcomes in the United States. *The Journal of pediatrics* **158**(5), 802-807.
- Mohs, R. C., and Greig, N. H. (2017). Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's & Dementia : Translational Research & Clinical Interventions* **3**(4), 651-657.
- Moore, R. A., McQuay, H. J., Derry, P., and Derry, S. (2004). Single dose oral diclofenac for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* doi: 10.1002/14651858.CD004768(2).
- Nair, A. B., and Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* **7**(2), 27-31.

- Narama, I., Imaida, K., Iwata, H., Nakae, D., Nishikawa, A., and Harada, T. (2003). *A Review of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Proliferative Lesions in the Liver of Rats by a Working Group of the Japanese Society of Toxicologic Pathology*, Vol. 16.
- Nayak, N. C., Sathar, S. A., Mughal, S., Duttagupta, S., Mathur, M., and Chopra, P. (1996). The nature and significance of liver cell vacuolation following hepatocellular injury--an analysis based on observations on rats rendered tolerant to hepatotoxic damage. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **428**(6), 353-65.
- Nemes, K., Åberg, F., Gylling, H., and Isoniemi, H. (2016). Cholesterol metabolism in cholestatic liver disease and liver transplantation: From molecular mechanisms to clinical implications. *World Journal of Hepatology* **8**(22), 924-932.
- Nilsson, L. B., and Skansen, P. (2012). Investigation of absolute and relative response for three different liquid chromatography/tandem mass spectrometry systems; the impact of ionization and detection saturation. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **26**(12), 1399-406.
- NTP (2000). NTP Technical Report on the Hepatotoxicity Studies of the Liver Carcinogen Methapyrilene Hydrochloride (CAS No. 135-23-9) Administered in Feed to Male F344/N Rats.
- Odom, D. M., Mladi, D. M., Saag, K. G., Sherif, B. N., Miles, L., Ronquest, N., and Wang, J. (2014). Relationship between diclofenac dose and risk of gastrointestinal and cardiovascular events: meta-regression based on two systematic literature reviews. *Clinical therapeutics* **36**(6), 906-17.
- OECD (2008). *Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents*, doi: <https://doi.org/10.1787/9789264070684-en>.
- Osuga, T., Ikura, Y., Kadota, C., Hirano, S., Iwai, Y., and Hayakumo, T. (2015). Significance of liver biopsy for the evaluation of methotrexate-induced liver damage in patients with rheumatoid arthritis. *International journal of clinical and experimental pathology* **8**(2), 1961-1966.
- Otto, G. P., Rathkolb, B., Oestereicher, M. A., Lengger, C. J., Moerth, C., Micklich, K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wolf, E., and de Angelis, M. H. (2016). Clinical Chemistry Reference Intervals for C57BL/6J, C57BL/6N, and C3HeB/FeJ Mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* **55**(4), 375-386.
- Oyejide, L., Mendes, O. R., and Mikaelian, I. (2017). Chapter 16 - Molecular Pathology: Applications in Nonclinical Drug Development A2 - Faqi, Ali Said. In *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development (Second Edition)*, pp. 407-445. Academic Press, Boston.
- Pacey, S., Workman, P., and Sarker, D. (2011). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Drug Development. In *Encyclopedia of Cancer* (M. Schwab, Ed.) doi: 10.1007/978-3-642-16483-5_4501, pp. 2845-2848. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803620-4.00016-5>.
- Padda, M. S., Sanchez, M., Akhtar, A. J., and Boyer, J. L. (2011). DRUG INDUCED CHOLESTASIS. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **53**(4), 1377-1387.
- Parks, D. J., Blanchard, S. G., Bledsoe, R. K., Chandra, G., Consler, T. G., Kliewer, S. A., Stimmel, J. B., Willson, T. M., Zavacki, A. M., Moore, D. D., *et al.* (1999). Bile Acids: Natural Ligands for an Orphan Nuclear Receptor. *Science* **284**(5418), 1365 (10.1126/science.284.5418.1365).
- Pavkovic, M. (2014). Evaluierung neuer Sicherheits-Biomarker in präklinischen Studien. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

- Ponsoda, X., Bort, R., Jover, R., Gómez-lechón, M. J., and Castell, J. V. (1995). Molecular mechanism of diclofenac hepatotoxicity: Association of cell injury with oxidative metabolism and decrease in ATP levels. *Toxicology In vitro* **9**(4), 439-444.
- Pugsley, M. K., Authier, S., and Curtis, M. J. (2008). Principles of Safety Pharmacology. *British Journal of Pharmacology* **154**(7), 1382-1399.
- Qi, Y., Jiang, C., Cheng, J., Krausz, K. W., Li, T., Ferrell, J. M., Gonzalez, F. J., and Chiang, J. Y. L. (2015). Bile acid signaling in lipid metabolism: metabolomic and lipidomic analysis of lipid and bile acid markers linked to anti-obesity and anti-diabetes in mice. *Biochimica et biophysica acta* **1851**(1), 19-29.
- Regev, A. (2014). Drug-Induced Liver Injury and Drug Development: Industry Perspective. *Semin Liver Dis* **34**(02), 227-239.
- Rembacz, K. P., Woudenberg, J., Hoekstra, M., Jonkers, E. Z., van den Heuvel, F. A. J., Buist-Homan, M., Woudenberg-Vrenken, T. E., Rohacova, J., Marin, M. L., Miranda, M. A., et al. (2010). Unconjugated bile salts shuttle through hepatocyte peroxisomes for taurine conjugation. *Hepatology* **52**(6), 2167-2176.
- Reno, F. (2010). Nonclinical Toxicology. In *Principles and Practice of Pharmaceutical Medicine* doi: 10.1002/9781444325263.ch7, pp. 68-78. Wiley-Blackwell.
- Retz, M., and Gschwend, J. E. (2010). *Medikamentöse Tumorthherapie in der Uroonkologie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Ricardo, M.-O., Luisa, G.-B., Asuncion, G.-S., and Maria, T.-M. (2011). Autoimmune Hepatitis After Long-Term Methotrexate Therapy for Rheumatoid Arthritis. *Current Drug Safety* **6**(3), 197-200.
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B., and Bajaj, J. S. (2014). Bile acids and the gut microbiome. *Current opinion in gastroenterology* **30**(3), 332-338.
- Rivard, A. L., Steer, C. J., Kren, B. T., Rodrigues, C. M. P., Castro, R. E., Bianco, R. W., and Low, W. C. (2007). Administration of Tauroursodeoxycholic Acid (TUDCA) Reduces Apoptosis Following Myocardial Infarction in Rat. *The American Journal of Chinese Medicine* **35**(02), 279-295.
- Rodriguez, R. J., and Buckholz, C. J. (2003). Hepatotoxicity of ketoconazole in Sprague-Dawley rats: glutathione depletion, flavin-containing monooxygenases-mediated bioactivation and hepatic covalent binding. *Xenobiotica* **33**(4), 429-441.
- Roth, R. A., and Ganey, P. E. (2010). Intrinsic versus Idiosyncratic Drug-Induced Hepatotoxicity—Two Villains or One? *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **332**(3), 692-697.
- Sahini, N., Selvaraj, S., and Borlak, J. (2014). Whole Genome Transcript Profiling of Drug Induced Steatosis in Rats Reveals a Gene Signature Predictive of Outcome. *PLoS ONE* **9**(12), e114085.
- Schaap, F. G., Trauner, M., and Jansen, P. L. M. (2014). Bile acid receptors as targets for drug development. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**(1), 55-67 (Review).
- Schadt, H. S., Wolf, A., Pognan, F., Chibout, S.-D., Merz, M., and Kullak-Ublick, G. A. (2016). Bile acids in drug induced liver injury: Key players and surrogate markers. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* **40**(3), 257-266.
- Schirle, M., Bantscheff, M., and Kuster, B. (2012). Mass Spectrometry-Based Proteomics in Preclinical Drug Discovery. *Chemistry & Biology* **19**(1), 72-84.

- Schomaker, S., Warner, R., Bock, J., Johnson, K., Potter, D., Van Winkle, J., and Aubrecht, J. (2013). Assessment of emerging biomarkers of liver injury in human subjects. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **132**(2), 276-83.
- Seitz, S., and Boelsterli, U. A. (1998). Diclofenac acyl glucuronide, a major biliary metabolite, is directly involved in small intestinal injury in rats. *Gastroenterology* **115**(6), 1476-1482.
- Shahin, D., Toraby, E. E., Abdel-Malek, H., Boshra, V., Elsamanoudy, A. Z., and Shaheen, D. (2011). Effect of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonist (Pioglitazone) and Methotrexate on Disease Activity in Rheumatoid Arthritis (Experimental and Clinical Study). *Clinical Medicine Insights. Arthritis and Musculoskeletal Disorders* **4**, 1-10.
- Shapiro, R. N. (1956). The use of methapyrilene hydrochloride as a sedative and somnifacient agent. *The Journal of pediatrics* **48**(3), 314-7.
- Sharma, R., Majer, F., Peta, V. K., Wang, J., Keaveney, R., Kelleher, D., Long, A., and Gilmer, J. F. (2010). Bile acid toxicity structure–activity relationships: Correlations between cell viability and lipophilicity in a panel of new and known bile acids using an oesophageal cell line (HET-1A). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18**(18), 6886-6895.
- Shen, S., Marchick, M. R., Davis, M. R., Doss, G. A., and Pohl, L. R. (1999). Metabolic Activation of Diclofenac by Human Cytochrome P450 3A4: Role of 5-Hydroxydiclofenac. *Chemical Research in Toxicology* **12**(2), 214-222.
- Shenoy, P. (2016). Multi-regional clinical trials and global drug development. *Perspectives in Clinical Research* **7**(2), 62-67.
- Shin, J.-H., Moon, H. J., Kang, I. H., Kim, T. S., Kim, I. Y., Park, I. S., Kim, H. S., Jeung, E. B., and Han, S.-Y. (2006). Repeated 28-day oral toxicity study of ketoconazole in rats based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline No. 407" to detect endocrine effects. *Archives of Toxicology* **80**(12), 797-803 (journal article).
- Siegenthaler, W., and Aeschlimann, A. (2005). *Siegenthalers Differenzialdiagnose: innere Krankheiten - vom Symptom zur Diagnose ; 323 Tabellen*. Thieme.
- Simundic, A. M., Cornes, M., Grankvist, K., Lippi, G., and Nybo, M. (2014). Standardization of collection requirements for fasting samples: for the Working Group on Preanalytical Phase (WG-PA) of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **432**, 33-7.
- Slijepcevic, D., Roscam Abbing, R. L. P., Katafuchi, T., Blank, A., Donkers, J. M., van Hoppe, S., de Waart, D. R., Tolenaars, D., van der Meer, J. H. M., Wildenberg, M., *et al.* (2017). Hepatic uptake of conjugated bile acids is mediated by both sodium taurocholate cotransporting polypeptide and organic anion transporting polypeptides and modulated by intestinal sensing of plasma bile acid levels in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **66**(5), 1631-1643.
- Slopianka, M., Herrmann, A., Pavkovic, M., Ellinger-Ziegelbauer, H., Ernst, R., Mally, A., Keck, M., and Riefke, B. (2017). Quantitative targeted bile acid profiling as new markers for DILI in a model of methapyrilene-induced liver injury in rats. *Toxicology* **386**, 1-10.
- Soma, T., and Shimada, Y. (2012). Bile Acids. In *Encyclopedia of Cancer* (M. Schwab, Ed.) doi: 10.1007/978-3-642-16483-5_615, pp. 397-399. Springer Berlin Heidelberg.
- Song, C., Wang, B., Tan, J., Zhu, L., and Lou, D. (2017). Discovery of tauroursodeoxycholic acid biotransformation enzymes from the gut microbiome of black bears using metagenomics. *Scientific Reports* **7**, 45495 (Article).

- Souza-Mello, V. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology* **7**(8), 1012-1019.
- Sriuttha, P., Sirichanchuen, B., and Permsuwan, U. (2018). Hepatotoxicity of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *International journal of hepatology* **2018**, 5253623-5253623.
- Staels, B., and Fonseca, V. A. (2009). Bile Acids and Metabolic Regulation: Mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care* **32**(Suppl 2), S237-S245.
- Stanard, B., Dolan, D. G., Hanneman, W., Legare, M., and Bercu, J. P. (2015). Threshold of toxicological concern (TTC) for developmental and reproductive toxicity of anticancer compounds. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **72**(3), 602-609.
- Suk, K. T., and Kim, D. J. (2012). Drug-induced liver injury: present and future. *Clinical and molecular hepatology* **18**(3), 249-257.
- Sundaram, V., and Björnsson, E. S. (2017). Drug-induced cholestasis. *Hepatology Communications* **1**(8), 726-735.
- Suter, L., Schroeder, S., Meyer, K., Gautier, J.-C., Amberg, A., Wendt, M., Gmuender, H., Mally, A., Boitier, E., Ellinger-Ziegelbauer, H., *et al.* (2011). EU Framework 6 Project: Predictive Toxicology (PredTox)—overview and outcome. *Toxicology and Applied Pharmacology* **252**(2), 73-84.
- Suzuki, Y., Uehara, R., Tajima, C., Noguchi, A., Ide, M., Ichikawa, Y., and Mizushima, Y. (1999). Elevation of serum hepatic aminotransferases during treatment of rheumatoid arthritis with low-dose methotrexate. Risk factors and response to folic acid. *Scandinavian journal of rheumatology* **28**(5), 273-81.
- Tang, W., Stearns, R. A., Wang, R. W., Chiu, S.-H. L., and Baillie, T. A. (1999). Roles of Human Hepatic Cytochrome P450s 2C9 and 3A4 in the Metabolic Activation of Diclofenac. *Chemical Research in Toxicology* **12**(2), 192-199.
- Teschke, R. (2001). Toxische Leberschäden durch Arzneimittel. *Dtsch Arztebl International* **98**(40), 2584-.
- Thackaberry, E. A. (2013). Vehicle selection for nonclinical oral safety studies. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **9**(12), 1635-1646.
- Thapa, B. R., and Walia, A. (2007). Liver function tests and their interpretation. *The Indian Journal of Pediatrics* **74**(7), 663-671.
- Thomas, H., Andreas, D., Kevin, R., Karoline, R., Arnulf, F., Günter, F., Michael, T., and Valentin, F. (2017). Serum bile acids as marker for acute decompensation and acute-on-chronic liver failure in patients with non-cholestatic cirrhosis. *Liver International* **37**(2), 224-231.
- Tomic, Z., Boris, M., Sabo, A., Lalosevic, D., Jakovljevic, V., Mikov, M., Majda, S., and Vasovic, V. (2008). *Diclofenac and ketoprofen liver toxicity in rat*, Vol. 33.
- Thoolen, B., Maronpot, R. R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D. E., Kaufmann, W., Kuttler, K., Deschl, U., *et al.* (2010a). Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol* **38**(7 Suppl), 5s-81s.
- Thoolen, B., Maronpot, R. R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D. E., Kaufmann, W., Küttler, K., Deschl, U., *et al.* (2010b). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Hepatobiliary System. *Toxicologic Pathology* **38**(7_suppl), 5S-81S.

- Tonder, J. J. v., Steenkamp, V., and Gulumian, M. (2013). Pre-Clinical Assessment of the Potential Intrinsic Hepatotoxicity of Candidate Drugs. In *New Insights into Toxicity and Drug Testing* (S. Gowder, Ed.) doi: 10.5772/54792, pp. Ch. 01. InTech, Rijeka.
- Tonomura, Y., Kato, Y., Hanafusa, H., Morikawa, Y., Matsuyama, K., Uehara, T., Ueno, M., and Torii, M. (2015). Diagnostic and predictive performance and standardized threshold of traditional biomarkers for drug-induced liver injury in rats. *Journal of Applied Toxicology* **35**(2), 165-172.
- Törnqvist, E., Annas, A., Granath, B., Jalkestén, E., Cotgreave, I., and Öberg, M. (2014). Strategic Focus on 3R Principles Reveals Major Reductions in the Use of Animals in Pharmaceutical Toxicity Testing. *PLoS ONE* **9**(7), e101638.
- Tuntland, T., Ethell, B., Kosaka, T., Blasco, F., Zang, R. X., Jain, M., Gould, T., and Hoffmaster, K. (2014). Implementation of pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies in early research phases of drug discovery and development at Novartis Institute of Biomedical Research. *Frontiers in Pharmacology* **5**, 174.
- Turley, S. D., Schwarz, M., Spady, D. K., and Dietschy, J. M. (1998). Gender-related differences in bile acid and sterol metabolism in outbred CD-1 mice fed low- and high-cholesterol diets. *Hepatology* **28**(4), 1088-1094.
- van den Broek, J. W., Buennemeyer, B. L., and Stricker, B. H. (1988). [Cholestatic hepatitis caused by a combination of amoxicillin and clavulanic acid (Augmentin)]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* **132**(32), 1495-7.
- van Meer, P. J. K., Graham, M. L., and Schuurman, H.-J. (2015). The safety, efficacy and regulatory triangle in drug development: Impact for animal models and the use of animals. *European Journal of Pharmacology* **759**, 3-13.
- Varga, Z. V., Ferdinandy, P., Liaudet, L., and Pacher, P. (2015). Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **309**(9), H1453-H1467.
- Vohr, H. W. (2010). *Toxikologie: Band 1 Grundlagen der Toxikologie*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Voican, C., Corruble, E., Naveau, S., and Perlemuter, G. (2014). Antidepressant-Induced Liver Injury: A Review for Clinicians. *American Journal of Psychiatry* **171**(4), 404-415.
- Volynets, V., Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Bischoff, S. C., and Bergheim, I. (2010). Protective effect of bile acids on the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Journal of lipid research* **51**(12), 3414-3424.
- Wagner, M., Zollner, G., and Trauner, M. (2009). New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *Journal of Hepatology* **51**(3), 565-580.
- Wanders, R. J. A. (2014). Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* **98**, 36-44.
- Watanabe, M., Houten, S. M., Wang, L., Moschetta, A., Mangelsdorf, D. J., Heyman, R. A., Moore, D. D., and Auwerx, J. (2004). Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *Journal of Clinical Investigation* **113**(10), 1408-1418.
- Watanabe, N., Takashimizu, S., Kojima, S., Kagawa, T., Nishizaki, Y., Mine, T., and Matsuzaki, S. (2007). Clinical and pathological features of a prolonged type of acute intrahepatic cholestasis. *Hepatology Research* **37**(8), 598-607.
- Weckwerth, W., and Morgenthal, K. (2005). Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discovery Today* **10**(22), 1551-1558.

- Weiler, S., Merz, M., and Kullak-Ublick, G. A. (2015). Drug-induced liver injury: the dawn of biomarkers? *F1000prime reports* **7**, 34-34.
- Wen, B., Ma, L., and Zhu, M. (2008). Bioactivation of the tricyclic antidepressant amitriptyline and its metabolite nortriptyline to arene oxide intermediates in human liver microsomes and recombinant P450s. *Chemico-Biological Interactions* **173**(1), 59-67.
- Wieling, J. (2002). LC-MS-MS experiences with internal standards. *Chromatographia* **55**(1), S107-S113 (journal article).
- Yamazaki, M., Miyake, M., Sato, H., Masutomi, N., Tsutsui, N., Adam, K.-P., Alexander, D. C., Lawton, K. A., Milburn, M. V., Ryals, J. A., *et al.* (2013). Perturbation of bile acid homeostasis is an early pathogenesis event of drug induced liver injury in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **268**(1), 79-89.
- Yang, K., and Brouwer, K. L. R. (2014). Hepatocellular Exposure of Troglitazone Metabolites in Rat Sandwich-Cultured Hepatocytes Lacking Bcrp and Mrp2: Interplay between Formation and Excretion. *Drug Metabolism and Disposition* **42**(7), 1219-1226.
- Yang, K., Köck, K., Sedykh, A., Tropsha, A., and Brouwer, K. L. (2013). An Updated Review on Drug-Induced Cholestasis: Mechanisms and Investigation of Physicochemical Properties and Pharmacokinetic Parameters. *Journal of pharmaceutical sciences* **102**(9), 3037-3057.
- Yang, T., Shu, T., Liu, G., Mei, H., Zhu, X., Huang, X., Zhang, L., and Jiang, Z. (2017). Quantitative profiling of 19 bile acids in rat plasma, liver, bile and different intestinal section contents to investigate bile acid homeostasis and the application of temporal variation of endogenous bile acids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **172**(Supplement C), 69-78.
- Ye, H., Nelson, L. J., Gómez del Moral, M., Martínez-Naves, E., and Cubero, F. J. (2018). Dissecting the molecular pathophysiology of drug-induced liver injury. *World Journal of Gastroenterology* **24**(13), 1373-1385.
- York, M. J. (2017). Chapter 14 - Clinical Pathology A2 - Faqi, Ali Said. In *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development (Second Edition)*, pp. 325-374. Academic Press, Boston, I doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803620-4.00014-1>
- Zachariae, H., KRAGBALLE, K., and SØGAARD, H. (1980). Methotrexate induced liver cirrhosis. *British Journal of Dermatology* **102**(4), 407-412.
- Zhang, J., He, K., Cai, L., Chen, Y.-C., Yang, Y., Shi, Q., Woolf, T. F., Ge, W., Guo, L., Borlak, J., *et al.* (2016). Inhibition of bile salt transport by drugs associated with liver injury in primary hepatocytes from human, monkey, dog, rat, and mouse. *Chemico-Biological Interactions* **255**, 45-54.
- Zhang, Y., Limaye, P. B., Renaud, H. J., and Klaassen, C. D. (2014). Effect of various antibiotics on modulation of intestinal microbiota and bile acid profile in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **277**(2), 138-145.
- Zhao, Q., Yang, R., Wang, J., Hu, D.-D., and Li, F. (2017). PPAR α activation protects against cholestatic liver injury. *Scientific Reports* **7**(1), 9967.
- Zollner, G., and Trauner, M. (2006). Molecular mechanisms of cholestasis. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **156**(13), 380-385 (journal article).

9 Anhang

9.1 Methodenvalidierung der quantitativen Analytik von Gallensäuren

Die Methodenvalidierung ist ein wichtiger Prozess der analytischen Qualitätssicherung. Hierbei wird festgestellt, ob eine analytische Methode geeignet ist, eine vorgegebene spezifische Aufgabe zu erfüllen. Der Umfang und die Durchführung einer Validierung hängen vom beabsichtigten Zweck für den Einsatz der Methode ab.

Die analytischen Anforderungen an ein quantitatives Verfahren umfassen die folgenden Validierungsparameter: Die Selektivität, die Bestimmungsgrenze (LOQ), das Signalverhalten des Detektors zum eingesetzten Kalibrierbereich (Kalibrierung), die Richtigkeit, die Präzision, den Matrixeffekt und die Stabilität der verwendeten Standardlösungen. Ein geeignetes Konzept für den Prozess der Validierung bietet die EMEA-Richtlinie für bioanalytische Methoden. Die Richtlinie definiert klare Akzeptanzkriterien für die einzelnen Validierungsparameter, um eine analytische Qualitätssicherung zu gewährleisten. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete analytische Methode von der Biocrates Lifescience wurde bereits durch das Unternehmen validiert. In dieser Situation schreibt die EMEA-Richtlinie vor, dass eine partielle Validierung der verwendeten Methode ausreichend für den beabsichtigten Zweck ist (EMEA, 2011). Da dabei nur die Methode an sich validiert wurde und nicht die in dieser Arbeit verwendeten biologischen Matrices, wurden Validierungsexperimente für Plasma, Leberhomogenat und Zellkulturüberstand durchgeführt. Die folgenden Parameter wurden für die Matrixvalidierung der Methode festgelegt: Die Untersuchung der Bestimmungsgrenze zur Überprüfung der vom Hersteller angegebenen Konzentration, die Stabilität der verwendeten internen Standards, die Selektivität der Methode zur Überprüfung der Messsignale in den verschiedenen Matrices, der Arbeitsbereich der verwendeten Kalibrierung sowie die Richtigkeit und Wiederholpräzision der Analytik. Es muss außerdem berücksichtigt werden, dass Leberhomogenat und Plasma keine analytische Matrix darstellen.

9.1.1 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze ist die kleinste Konzentration eines Analyten in einer Probe, die mit gegebener Präzision und Richtigkeit quantitativ ermittelt werden kann (EMEA, 2011). Der erste Kalibrierstandard wurde durch den Hersteller als Bestimmungsgrenze festgelegt. Im Prozess der durchgeführten Validierung wurden die Richtigkeit und Wiederholpräzision der Bestimmungsgrenze untersucht. Das Akzeptanzkriterium für eine valide Bestimmungsgrenze wurde für den Variationskoeffizienten von $\leq 20\%$ festgelegt. Die Ermittlung des Variationskoeffizienten basiert auf dem arithmetischen Mittelwert einer sechsfach gemessenen gepoolten Matrixprobe und seiner Standardabweichung.

9.1.2 Kalibrierung

Eine Methode muss innerhalb der Kalibrierung (Arbeitsbereich) ein gültiges Modell zur Beschreibung des Zusammenhangs der eingesetzten Analytkonzentration und der Signalintensität des Detektors besitzen. Der Zusammenhang des gültigen Modells wird durch eine mathematische Funktion beschrieben. Über den Regressionskoeffizienten R^2 lässt sich die Güte des Regressionsmodells beschreiben. Ein ideales Modell sollte möglichst nahe bei 1 liegen ($R^2 > 0.990$). Der Kalibrierbereich der Gallensäuren wird über ein quadratisches Regressionsmodell beschrieben. Es wurden sieben Kalibrierpunkte für die quantitative Analyse genutzt. Dieses Modell wurde in der Validierung näher untersucht und für jede individuelle Gallensäure wurde der Regressionskoeffizient R^2 der Siebenpunkt-Kalibrierung ermittelt. Für den Kalibrierbereich wurden auch die Richtigkeit und die Wiederholpräzision der eingesetzten Kalibrierstandards bestimmt. Für das Akzeptanzkriterium des ersten Kalibrierstandards wurde ein Variationskoeffizienten von $\leq 20\%$ festgelegt (EMEA, 2011). Für das Akzeptanzkriterium der höheren Kalibrierstandards wurde ein Variationskoeffizienten (CV/%) von $\leq 15\%$ festgelegt (EMEA, 2011). Die Ermittlung des Variationskoeffizienten basiert auf dem arithmetischen Mittelwert eines dreifach gemessenen Kalibrierstandards und seiner Standardabweichung.

9.1.3 Spezifität

Die Spezifität der Methode wird bewiesen, wenn sie verschiedene, parallel zu bestimmenden Komponenten ohne gegenseitige Störung erfassen kann (EMEA, 2011). Hierbei ist zu beachten, dass Leberhomogenat und Plasma keine analytfreie Matrix sind. Zur Bestimmung der Selektivität beim Leberhomogenat und beim Plasma wurde indirekt die Richtigkeit für alle individuellen Gallensäuren bestimmt. Die Methode ist selektiv, wenn die individuellen Gallensäuren das definierte Akzeptanzkriterium der Richtigkeit erfüllen.

9.1.4 Stabilität des internen Standards

Eine Kompensation aufarbeitungs- oder matrixbedingter Verluste kann durch die Anwendung eines internen Standards erreicht werden (EMEA, 2011). Der interne Standard wird zu einem frühen Zeitpunkt der Aufarbeitung zugegeben und sollte darüber hinaus nicht in der zu untersuchenden biologischen Matrix vorhanden sein. Zur Überprüfung der Stabilität der 10 isotopen-markierten internen Standards wurden der Variationskoeffizient (CV/%) der Signalintensität und die Retentionszeit herangezogen. Die Ermittlung des Variationskoeffizienten basiert auf dem arithmetischen Mittel der Peakintensitäten und der Retentionszeiten von 284 Messungen. Das Akzeptanzkriterium des Variationskoeffizienten (CV/%) wurde auf $\leq 20\%$ festgelegt (EMEA, 2011).

9.1.5 Richtigkeit

Die Richtigkeit beschreibt das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes der Gallensäuren zum wahren Wert des Analyten in der Probe (EMEA, 2011). Für die Bestimmung der Richtigkeit des analytischen Messverfahrens wird die Wiederfindung der Gallensäuren herangezogen. Es wurden 6 technische Replikate von gepoolten Plasmaproben für die Auswertung analysiert. Hierfür wurde die Proben 1:2 sowie 1:5 verdünnt und durch sukzessive Zugabe von verschiedenen Standardkonzentrationen der Gallensäuren aufkonzentriert. Die Grundlage für die Berechnung der Genauigkeit bildet der Variationskoeffizient (CV/%), der über das arithmetische Mittel der Messwerte und deren Standardabweichungen ermittelt wird. Das Akzeptanzkriterium des Variationskoeffizienten wurde auf $\pm 15\%$ festgelegt (EMEA, 2011).

9.1.6 Wiederholpräzision

Die Präzision beschreibt das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen mehrmals gemessenen Konzentrationswerts (EMEA, 2011). Für die Bestimmung der Wiederholpräzision des analytischen Messverfahrens wird die Wiederfindung der aufgestockten Matrixprobe zugrunde gelegt. Die Grundlage für die Berechnung der Präzision bildet der Variationskoeffizient (CV%), der über das arithmetische Mittel der Messwerte und deren Standardabweichungen ermittelt wird. Das Akzeptanzkriterium des Variationskoeffizienten wurde auf $\pm 15\%$ festgelegt (EMEA, 2011).

9.2 Referenzwerte von Gallensäure-Konzentrationen in Plasma von Ratten

Anhang-Tabelle A 1 Gallensäure-Referenzkonzentrationen im Plasma ($\mu\text{mol/L}$) männlicher Ratten bei Nutzung des Vehikels Wasser

Festlegung der Referenzwerte als $\text{MW} \pm$ zweifache SD und $\text{MW} \pm$ dreifache SD ($n=12$). Zusätzliche Darstellung der physiologischen Variabilität anhand von Minimal- und Maximalwerten

Gallensäure	MW	Median	SD \pm	2xSD \pm	3xSD \pm	Min	Max
CA	0,93	0,12	3,39	6,78	10,17	0,04	20,30
CDCA	0,45	0,03	1,57	3,14	4,71	0,01	7,27
DCA	0,17	0,13	0,12	0,23	0,35	0,05	0,73
GCA	0,14	0,09	0,18	0,35	0,53	0,04	1,03
GDCA	0,02	0,02	0,01	0,02	0,03	0,01	0,07
HDCA	0,32	0,06	0,47	0,94	1,41	0,01	1,48
LCA	0,18	0,05	0,21	0,42	0,63	0,01	0,71
MCA(a)	0,12	0,02	0,29	0,57	0,86	0,01	1,24
MCA(b)	0,31	0,20	0,39	0,78	1,17	0,03	2,14
MCA(o)	0,34	0,24	0,32	0,64	0,96	0,01	1,44
TCA	0,92	0,92	0,38	0,75	1,13	0,21	2,08
TCDCa	0,22	0,19	0,11	0,21	0,32	0,08	0,58
TDCA	0,14	0,13	0,05	0,11	0,16	0,04	0,31
TMCA(a+b)	0,97	0,83	0,54	1,08	1,62	0,35	2,76
TUDCA	0,22	0,05	0,37	0,73	1,10	0,01	1,51
UDCA	0,12	0,03	0,25	0,50	0,74	0,02	1,33

Anhang-Tabelle A 2 Gallensäure-Referenzkonzentrationen im Plasma ($\mu\text{mol/L}$) weiblicher Ratten bei Nutzung des Vehikels Wasser

Festlegung der Referenzwerte als $\text{MW} \pm$ zweifache SD und $\text{MW} \pm$ dreifache SD ($n=12$). Zusätzliche Darstellung der physiologischen Variabilität anhand von Minimal- und Maximalwerten

Gallensäure	MW	Median	SD	2xSD	3xSD	Min	Max
CA	1,79	0,29	4,02	8,05	12,07	0,05	21,30
CDCA	1,10	0,10	2,52	5,04	7,56	0,02	10,50
DCA	0,19	0,14	0,12	0,24	0,36	0,05	0,64
GCA	0,45	0,09	0,77	1,54	2,31	0,04	3,04
GCDCA	0,13	0,03	0,21	0,41	0,62	0,02	0,83
GDCA	0,04	0,02	0,05	0,09	0,14	0,01	0,18
HDCA	0,58	0,30	0,73	1,46	2,19	0,02	2,82
LCA	0,09	0,09	0,06	0,13	0,19	0,01	0,24
MCA(a)	0,27	0,06	0,53	1,05	1,58	0,01	2,48
MCA(b)	0,16	0,10	0,19	0,38	0,57	0,01	1,08
MCA(o)	0,17	0,14	0,13	0,27	0,40	0,01	0,76
TCA	2,32	2,02	1,41	2,82	4,24	0,42	7,66
TCDCa	0,92	0,78	0,50	1,00	1,50	0,32	2,10
TDCA	0,09	0,08	0,05	0,10	0,15	0,02	0,25
TMCA(a+b)	1,91	1,81	1,05	2,11	3,88	0,19	4,25
UDCA	0,20	0,12	0,19	0,39	0,57	0,04	0,73

9.3 Daten Valproinsäure

9.3.1 Klinische Chemie

Klinisch-chemische Serummarker zur Bewertung einer Lebertoxizität zeigen keine auffälligen Befunde bei beiden Geschlechtern für die Behandlungs – und Recoveryperiode.

Anhang-Tabelle A 3 Serumaktivitäten von Enzymen in männlichen und weiblichen Ratten. Die klinisch-chemischen Parameter werden für die Bewertung einer Hepatotoxizität genutzt. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit zugehöriger Standardabweichung (Mittelwert \pm SD).

Ratte ♂												
Dosis	0 mg/kg KG						80 mg/kg KG					
Tag	2	9	14	2	9	14	2	9	14	2	9	
ALAT U/L	53.7	\pm 4.4	55.0	\pm 4.0	53.3	\pm 4.6	51.7	\pm 7.3	47.0	\pm 7.0	50.0	\pm 4.1
ASAT U/L	83.3	\pm 4.2	87.5	\pm 6.4	78.7	\pm 3.4	78.7	\pm 8.2	80.5	\pm 5.6	81.5	\pm 13.3
Aph U/L	166.8	\pm 38.0	169.2	\pm 44.2	156.7	\pm 42.9	150.7	\pm 42.3	144.8	\pm 45.4	139.7	\pm 42.9
GLDH U/L	4.4	\pm 0.2	6.4	\pm 2.6	4.7	\pm 0.7	4.8	\pm 0.8	4.4	\pm 0.3	4.8	\pm 0.5
γ GT U/L	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD	
Dosis	200 mg/kg KG						500 mg/kg KG					
Tag	2	9	14	2	9	14	2	9	14	2	9	
ALAT U/L	46.0	\pm 8.5	45.7	\pm 8.8	47.7	\pm 7.3	40.0	\pm 4.0	38.7	\pm 2.4	40.2	\pm 8.7
ASAT U/L	76.8	\pm 8.9	77.5	\pm 8.7	77.0	\pm 9.8	76.5	\pm 7.9	76.7	\pm 5.3	77.0	\pm 15.9
Aph U/L	163.2	\pm 34.6	154.0	\pm 34.4	153.2	\pm 31.2	156.2	\pm 39.5	130.0	\pm 38.3	129.2	\pm 38.0
GLDH U/L	4.5	\pm 0.3	4.3	\pm 0.5	4.5	\pm 0.6	5.6	\pm 0.6	4.2	\pm 0.7	4.7	\pm 1.2
γ GT U/L	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD	
Ratte ♀												
Dosis	0 mg/kg KG						80 mg/kg KG					
Tag	2	9	14	2	9	14	2	9	14	2	9	
ALAT U/L	49.2	\pm 7.6	51.0	\pm 4.1	48.8	\pm 5.0	45.8	\pm 7.2	47.5	\pm 6.6	50.0	\pm 4.0
ASAT U/L	98.3	\pm 14.2	89.0	\pm 10.0	94.5	\pm 8.9	88.8	\pm 12.5	75.0	\pm 2.8	92.7	\pm 10.7
Aph U/L	93.8	\pm 28.4	85.8	\pm 26.2	85.0	\pm 27.2	74.3	\pm 12.9	75.0	\pm 14.1	77.0	\pm 14.8
GLDH U/L	8.1	\pm 2.2	7.9	\pm 4.9	8.5	\pm 5.7	6.5	\pm 2.4	4.4	\pm 0.5	8.9	\pm 2.2
γ GT U/L	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD	
Dosis	200 mg/kg KG						500 mg/kg KG					
Tag	2	9	14	2	9	14	2	9	14	2	9	
ALAT U/L	45.7	\pm 4.6	38.5	\pm 4.2	45.0	\pm 5.4	36.8	\pm 7.0	33.8	\pm 9.8	40.3	\pm 5.1
ASAT U/L	82.3	\pm 12.2	75.5	\pm 7.5	81.2	\pm 8.7	77.0	\pm 7.9	90.7	\pm 38.8	82.5	\pm 15.7
Aph U/L	86.0	\pm 25.7	70.8	\pm 24.3	75.8	\pm 30.2	86.7	\pm 15.1	83.8	\pm 18.4	93.8	\pm 19.6
GLDH U/L	8.1	\pm 3.3	5.2	\pm 3.5	10.8	\pm 3.5	5.0	\pm 0.6	5.5	\pm 2.1	8.2	\pm 7.3
γ GT U/L	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD	

Anhang-Tabelle A 4 Serumaktivitäten von Enzymen in männlichen und weiblichen Ratten. Die klinisch-chemischen Parameter werden für die Bewertung einer Hepatotoxizität genutzt. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit zugehöriger Standardabweichung (Mittelwert MW \pm SD).

Gruppe	Tag	Zahl	Männliche Ratte					Weibliche Ratten				
			ALAT U/L	ASAT U/L	Aph U/L	GLDH U/L	γ GT U/L	ALAT U/L	ASAT U/L	Aph U/L	GLDH U/L	γ GT U/L
Kontrolle	14	MW	53.3	78.7	156.7	4.7	n/a	48.8	94.5	85.0	8.5	n/a
		\pm SD	4.6	3.4	42.9	0.7	n/a	5.0	8.9	27.2	5.7	n/a
Recovery	21	MW	63.7	67.3	156.0	5.9	n/a	45.0	69.7	66.7	2.8	n/a
		\pm SD	11.3	6.2	32.5	2.2	n/a	6.4	7.7	20.1	0.4	n/a
Recovery	28	MW	51.3	68.7	163.3	4.3	n/a	42.0	66.0	82.7	4.3	n/a
		\pm SD	3.8	11.1	37.0	0.3	n/a	8.6	2.9	21.8	1.2	n/a

9.3.2 Quantitative Analyse von Gallensäuren in der Leber von Ratten

Anhang-Tabelle A 5 Konzentration von Gallensäuren im Lebergewebe ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) der männlichen Ratten. Dargestellt als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung ($n=6$). Zusätzlich für jede Gruppe metabolischer Quotient zwischen Behandlung und Kontrolle (Quotient > 1 = Konzentrationsanstieg im Gewebe, Quotient < 1 = Konzentrationsabfall im Gewebe) Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe pro Zeitpunkt ermittelt: * $p < 0,05$.

	GCA	GCDCA	GDCA	GUDCA	TCA	TCDCA	TDCA	TMCA(a+b)	TUDCA
Vehikel	0.6 ± 0.4	0.08 ± 0.07	0.11 ± 0.09	0.02 ± 0.01	18.4 ± 10.9	2.1 ± 0.5	1.8 ± 0.7	21.5 ± 8.7	0.9 ± 0.3
80 mg/kg KG	0.5 ± 0.2	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.02 ± 0.01	18.7 ± 4.4	2.1 ± 0.5	1.4 ± 0.4	18.6 ± 5.9	0.8 ± 0.3
200 mg/kg KG	1.2 ± 1.2	0.09 ± 0.05	0.06 ± 0.03	0.02 ± 0.01	17.7 ± 9.9	1.9 ± 0.5	1.0 ± 0.4	15.9 ± 6.4	0.5 ± 0.2
500 mg/kg KG	1.5 ± 0.8	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.00	17.7 ± 10.0	1.4 ± 0.9	0.7 ± 0.3	14.6 ± 9.2	0.3 ± 0.2
80 mg/kg KG	1.0	0.9	0.7	1.1	1.0	1.0	0.8	0.9	0.8
200 mg/kg KG	2.2	1.1	0.6	1.1	1.0	0.9	0.6	0.7	0.6
500 mg/kg KG	2.7*	0.8	0.5	0.7	1.0	0.7	0.4*	0.7	0.3*

Anhang-Tabelle A 6 Konzentration von Gallensäuren im Lebergewebe ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) der weiblichen Ratten. Dargestellt als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung ($n=6$). Zusätzlich für jede Gruppe metabolischer Quotient zwischen Behandlung und Kontrolle (Quotient > 1 = Konzentrationsanstieg im Gewebe, Quotient < 1 = Konzentrationsabfall im Gewebe) Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe pro Zeitpunkt ermittelt: * $p < 0,05$. Statistische Signifikanz ermittelt nach Mann Whitney mit Bonferroni Adjustierung, # $p < 0,05$.

	CA	CDCA	GCA	GCDCA	GDCA	GUDCA	TCA	TCDCA	TDCA	TUDCA
Vehikel	0.02 ± 0.02	LOD	2.8 ± 3.0	0.7 ± 0.9	0.1 ± 0.1	0.02 ± 0.02	22.8 ± 8.1	6.0 ± 1.6	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.1
80 mg/kg KG	0.01 ± 0.01	LOD	1.5 ± 2.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.01 ± 0.00	23.4 ± 10.1	4.2 ± 2.0	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.2
200 mg/kg KG	0.03 ± 0.03	LOD	1.8 ± 1.4	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.02 ± 0.01	26.5 ± 3.8	5.5 ± 0.9	0.9 ± 0.2	0.3 ± 0.1
500 mg/kg KG	0.14 ± 0.13	0.02 ± 0.01	7.1 ± 4.1	2.2 ± 1.4	0.4 ± 0.3	0.08 ± 0.05	16.9 ± 8.1	5.6 ± 2.1	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.2
80 mg/kg KG	0.3	n.b.	0.5	0.2	1.1	0.6	1.0	0.7	1.1	1.3
200 mg/kg KG	1.2	n.b.	0.6	0.3	1.7	0.9	1.2	0.9	1.6	1.6
500 mg/kg KG	6.5*	#	2.5*	3.0*	6.6*	4.5*	0.7	0.9	0.9	1.4

9.3.3 Quantitative Analyse von Gallensäuren im Plasma von Ratten

Anhang-Tabelle A 7 Konzentration von Gallensäuren im Plasma ($\mu\text{mol/L}$) männlicher Ratten. Dargestellt als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (MW \pm SD), Dosierung (mg/kg KG) (n=6).

Zeitpunkt	Tag 2								Tag 9							
	0		80		200		500		0		80		200		500	
Dosierung	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD
Gallensäure	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD
CA	0.27	0.19	0.71	0.68	1.21	2.12	1.77	3.45	0.35	0.41	0.12	0.13	1.31	2.65	2.2	2.46
CDCA	0.03	0.03	0.16	0.22	0.17	0.26	0.12	0.26	0.14	0.21	0.03	0.03	0.29	0.6	0.32	0.51
DCA	0.2	0.09	0.14	0.07	0.11	0.04	0.18	0.15	0.14	0.02	0.11	0.02	0.2	0.1	0.19	0.13
GCA	0.15	0.11	0.11	0.06	0.22	0.29	0.19	0.19	0.09	0.03	0.14	0.07	0.31	0.32	0.96	1.04
GCDCA	0.01	0	0.01	0	0.01	0.01	0.01	0	0.01	0.01	0.02	0	0.05	0.06	0.17	0.34
GDCA	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0	0.02	0	0.04	0.04	0.1	0.17
GLCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.04	0.09
GUDCA	0.03	0.05	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0	0	0	0	0	0	0.09	0.19
HDCA	0.47	0.49	0.4	0.14	0.58	0.71	0.64	1.05	0.37	0.52	0.22	0.25	0.37	0.27	0.46	0.41
LCA	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.04	0.01	0.04	0.01	0.04	0.02	0.08	0.08
MCA(a)	0.02	0.02	0.07	0.08	0.15	0.29	0.13	0.29	0.05	0.06	0.01	0.01	0.19	0.42	0.08	0.1
MCA(b)	0.19	0.06	0.45	0.4	0.7	0.96	0.47	0.71	0.24	0.18	0.16	0.11	0.24	0.35	0.3	0.22
MCA(o)	0.17	0.12	0.23	0.15	0.22	0.21	0.53	0.66	0.24	0.14	0.2	0.08	0.21	0.24	0.14	0.08
TCA	0.73	0.13	1.38	1.28	0.79	0.26	1.31	0.56	0.92	0.59	1.09	0.73	0.91	0.32	1.71	0.61
TCDCa	0.15	0.06	0.23	0.06	0.16	0.03	0.11	0.03	0.17	0.08	0.22	0.07	0.17	0.03	0.24	0.28
TDCA	0.15	0.04	0.15	0.09	0.08	0.03	0.1	0.05	0.12	0.04	0.11	0.05	0.12	0.07	0.13	0.15
TLCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.04	0.09
TMCA(a+b)	0.58	0.16	1.17	1.26	0.63	0.26	0.92	0.41	0.71	0.54	0.82	0.62	0.45	0.17	0.63	0.24
TUDCA	0.01	0	0.01	0.01	0.01	0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0	0	0.12	0.26
UDCA	0.02	0.02	0.05	0.07	0.05	0.04	0.02	0.02	0.06	0.06	0.1	0.09	0.14	0.1	0.32	0.45

Anhang-Tabelle A 8 Konzentration von Gallensäuren im Plasma ($\mu\text{mol/L}$) männlicher Ratten. Dargestellt als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (MW \pm SD), Dosierung (mg/kg KG), R – Recovery, (n=6).

Zeitpunkt	Tag 14								Tag 21		Tag 28	
	0		80		200		500		500 [R]		500 [R]	
Gallensäure	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD
CA	0.2	0.26	1.84	3.83	0.1	0.07	2.32	4.35	7.45	5.01	0.53	0.18
CDCA	0.05	0.08	0.24	0.5	0.02	0.01	0.1	0.18	1	0.73	0.09	0.05
DCA	0.11	0.02	0.19	0.1	0.14	0.07	0.2	0.1	0.46	0.37	0.17	0.05
GCA	0.15	0.15	0.38	0.63	0.31	0.19	0.7	0.59	0.34	0.28	0.17	0.1
GCDCA	0.02	0.02	0.05	0.06	0.02	0.01	0.02	0.01	0.03	0.02	0.02	0
GDCA	0.03	0.02	0.06	0.08	0.02	0.01	0.03	0.02	0.06	0.03	0.02	0
GLCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GUDCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HDCA	0.27	0.44	0.46	0.61	0.28	0.26	0.18	0.11	1.4	1.71	0.13	0.16
LCA	0.04	0.01	0.04	0.01	0.05	0.02	0.03	0.01	0.06	0.01	0.05	0
MCA(a)	0.03	0.06	0.24	0.47	0.01	0	0.06	0.11	0.83	0.61	0.07	0.02
MCA(b)	0.12	0.06	0.47	0.68	0.09	0.04	0.26	0.36	1.77	1.48	0.27	0.06
MCA(o)	0.18	0.11	0.29	0.17	0.16	0.12	0.3	0.34	0.33	0.11	0.15	0.06
TCA	0.79	0.36	0.85	0.5	1.01	0.11	1.46	0.54	0.49	0.25	0.9	0.33
TCDCA	0.14	0.04	0.15	0.02	0.19	0.06	0.09	0.02	0.1	0.02	0.19	0.02
TDCA	0.1	0.03	0.1	0.04	0.08	0.03	0.08	0.03	0.09	0.04	0.11	0.04
TLCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TMCA(a+b)	0.58	0.18	0.48	0.29	0.63	0.16	0.59	0.29	0.32	0.15	0.76	0.26
TUDCA	0.01	0	0.01	0.01	0.01	0	0	0	0.01	0	0.01	0.01
UDCA	0.08	0.09	0.08	0.07	0.12	0.09	0.06	0.04	0.15	0.1	0.04	0.03

Anhang-Tabelle A 9 Konzentration von Gallensäuren im Plasma ($\mu\text{mol/L}$) weiblicher Ratten. Dargestellt als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (MW \pm SD), Dosierung (mg/kg KG KG) (n=6).

Zeitpunkt	Tag 2								Tag 9							
	0		80		200		500		0		80		200		500	
Dosierung	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD
Gallensäure	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD
CA	1.78	1.16	0.26	0.21	3.08	6.67	3.45	4.69	5.36	7.78	0.38	0.45	0.37	0.33	5.07	4.60
CDCA	0.61	0.52	0.10	0.06	1.17	2.53	1.40	1.89	2.70	3.90	0.19	0.19	0.15	0.11	1.85	2.44
DCA	0.17	0.07	0.16	0.09	0.18	0.11	0.21	0.18	0.26	0.18	0.20	0.08	0.18	0.08	0.18	0.11
GCA	0.68	0.81	0.12	0.04	0.35	0.42	0.27	0.14	0.57	0.65	0.45	0.54	0.71	0.41	1.80	1.24
GCDCA	0.11	0.12	0.03	0.01	0.08	0.11	0.03	0.01	0.21	0.30	0.06	0.04	0.06	0.02	0.29	0.30
GDCA	0.03	0.03	0.01	0.00	0.02	0.03	0.01	0.01	0.05	0.06	0.01	0.00	0.01	0.01	0.08	0.08
GLCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
GUDCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HDCA	0.42	0.35	0.16	0.12	0.92	1.80	0.58	0.78	0.87	1.10	0.29	0.24	0.30	0.21	0.64	0.84
LCA	0.14	0.03	0.12	0.04	0.16	0.08	0.15	0.10	0.08	0.08	0.10	0.05	0.10	0.03	0.42	0.75
MCA(a)	0.34	0.26	0.06	0.04	0.59	1.27	0.34	0.49	1.51	2.47	0.07	0.10	0.06	0.04	0.66	0.77
MCA(b)	0.17	0.11	0.10	0.06	0.14	0.24	0.28	0.31	0.29	0.38	0.10	0.11	0.09	0.08	0.30	0.26
MCA(o)	0.12	0.09	0.12	0.10	0.16	0.13	0.27	0.23	0.25	0.24	0.12	0.11	0.12	0.08	0.14	0.09
TCA	1.60	0.61	2.81	1.57	2.84	1.10	1.95	0.39	1.51	0.75	2.59	0.94	3.10	1.68	1.48	1.11
TCDCA	0.60	0.15	1.00	0.61	0.75	0.23	0.52	0.11	0.55	0.16	0.82	0.18	0.94	0.43	0.47	0.25
TDCA	0.09	0.06	0.10	0.08	0.07	0.03	0.08	0.03	0.07	0.02	0.10	0.04	0.09	0.04	0.07	0.05
TLCA	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
TMCA(a+b)	1.49	0.68	2.30	0.44	1.91	1.07	1.35	0.45	1.32	0.52	2.35	0.70	2.54	1.47	0.58	0.57
TUDCA	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UDCA	0.10	0.03	0.16	0.10	0.18	0.12	0.25	0.16	0.36	0.26	0.26	0.17	0.24	0.18	0.18	0.13

Anhang-Tabelle A 10 Konzentration von Gallensäuren im Plasma ($\mu\text{mol/L}$) weiblicher Ratten. Dargestellt als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (MW \pm SD), Dosierung (mg/kg KG KG), R – Recovery, (n=6).

Zeitpunkt	Tag 14								Tag 21		Tag 28	
	0		80		200		500		500 [R]		500 [R]	
Gallensäure	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD
CA	2.34	3.51	2.37	3.72	2.29	4.08	13.27	10.82	3.21	4.40	10.14	5.95
CDCA	1.90	3.15	0.43	0.51	1.07	2.14	5.80	4.32	4.05	5.62	9.14	9.60
DCA	0.17	0.09	0.27	0.17	0.26	0.14	0.56	0.42	0.26	0.12	0.25	0.12
GCA	0.69	0.91	0.48	0.40	0.42	0.26	2.26	0.97	0.65	0.38	0.55	0.31
GCDCA	0.17	0.25	0.05	0.02	0.05	0.02	0.58	0.36	0.36	0.40	0.10	0.05
GDCA	0.03	0.03	0.03	0.04	0.02	0.01	0.18	0.14	0.05	0.06	0.01	0.00
GLCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
GUDCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00
HDCA	0.44	0.37	0.69	0.94	0.28	0.23	1.78	1.18	0.47	0.42	0.57	0.26
LCA	0.10	0.05	0.10	0.06	0.14	0.06	0.17	0.10	0.20	0.11	0.14	0.07
MCA(a)	0.59	0.88	0.31	0.47	0.38	0.67	2.29	1.80	1.62	2.18	2.24	1.70
MCA(b)	0.19	0.20	0.31	0.47	0.26	0.35	0.77	0.54	0.26	0.22	1.13	0.72
MCA(o)	0.20	0.12	0.23	0.23	0.18	0.15	0.31	0.29	0.27	0.16	0.37	0.19
TCA	1.77	0.59	2.85	1.37	2.32	0.84	1.00	0.91	1.56	0.87	0.98	0.20
TCDCa	0.73	0.25	0.84	0.41	0.70	0.12	0.52	0.26	1.03	0.27	0.64	0.24
TDCA	0.08	0.03	0.12	0.07	0.10	0.05	0.05	0.04	0.08	0.03	0.04	0.01
TLCA	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00
TMCA(a+b)	1.56	0.76	2.35	1.72	1.49	0.91	1.25	0.77	3.06	1.33	1.76	0.40
TUDCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UDCA	0.18	0.10	0.15	0.07	0.21	0.12	0.59	0.38	0.21	0.09	0.21	0.22

9.3.4 Mechanistische Untersuchung des veränderten Gallensäureprofils durch Transkriptionsanalysen im Lebergewebe

Anhang-Tabelle A 11 Genexpressions-Profil männlicher (A) und weiblicher (B) Ratten.

A	Dosis in mg/kg			B	Dosis in mg/kg		
	80	200	500		80	200	500
Acot8	1.15	1.09	1.31	Acox2	1.10	1.10	1.30
Cyp7a1	1.00	1.56	4.52	Cyp7a1	1.00	0.90	3.30
Cyp8b1	1.05	1.42	1.54	Cyp8b1	0.70	1.30	1.30
Cyp27a1	0.94	1.08	1.42	MDR1	0.80	0.70	0.60
ASBT	1.30	0.88	1.30	MRP3	1.00	1.10	1.60
MDR1	1.31	0.91	1.36	MRP4	1.00	1.10	1.30
MDR3	1.04	0.90	0.55	BCRP	1.00	1.00	1.30
MRP4	0.92	1.01	1.32				
Hnf4a	0.89	1.06	1.28				
PXR	1.00	1.07	1.33				
SHP	1.17	0.60	1.58				

9.4 Daten Amitriptylin

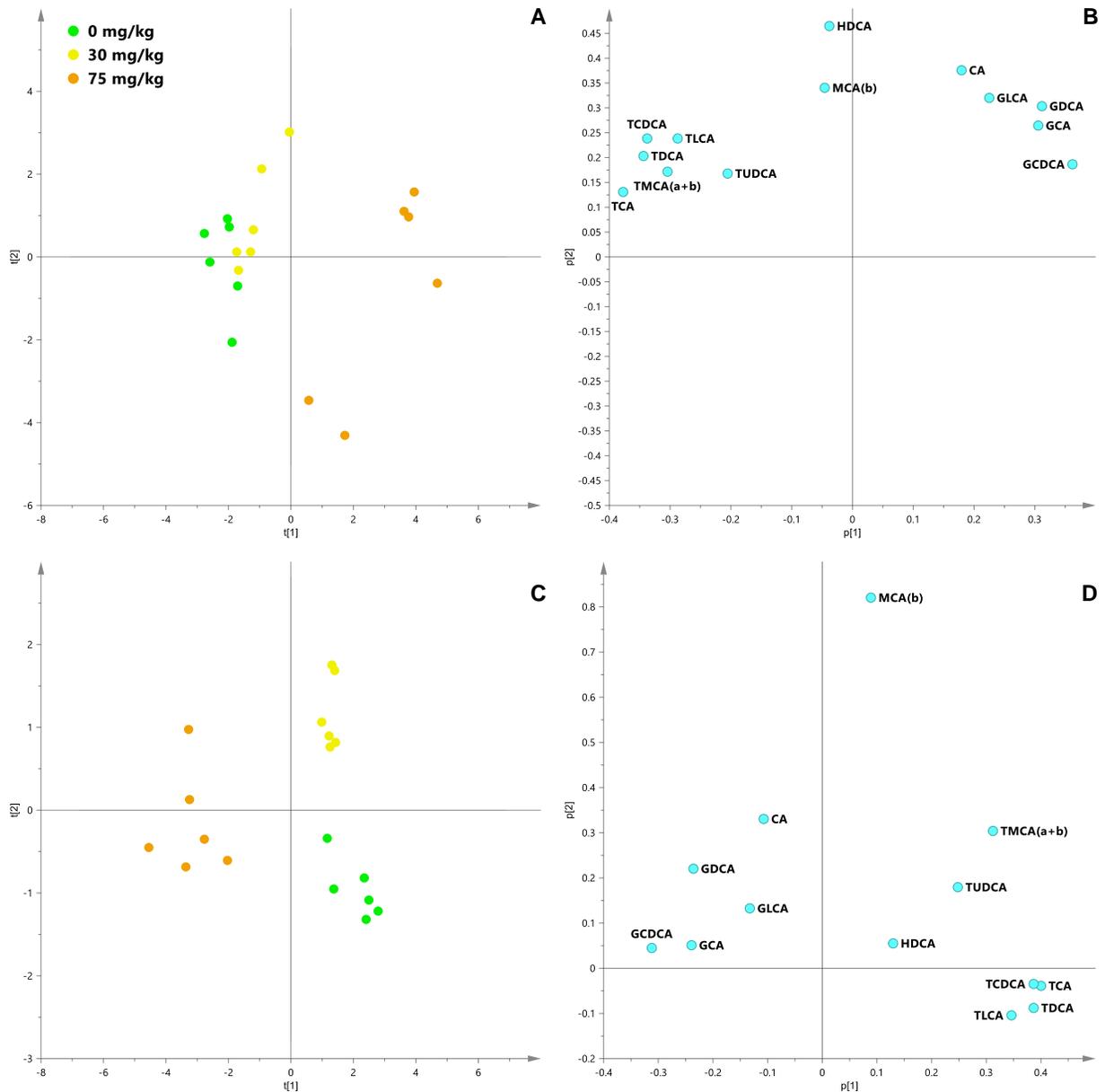
9.4.1 Klinische Chemie

Anhang-Tabelle A 12 Serumkonzentrationen von Triglyzeriden (mmol/L) in männlichen und weiblichen Ratten. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit zugehöriger Standardabweichung (Mittelwert MW \pm SD).

Männchen	Tag 2				Tag 9				
	Dosis/mg/kg KG	0	30	75	150	0	30	75	150
MW	1.4	1.69	1.37	0.99	1.55	1.79	1.41	1.24	
\pm SD	0.24	0.5	0.29	0.28	0.41	0.57	0.25	0.44	
	Tag 14								
MW									
\pm SD									
Weibchen	Tag 2				Tag 9				
	Dosis/mg/kg KG	0	30	50	75	0	30	50	75
MW	1.63	1.32	1.08	1.06	1.56	1.18	1.37	1	
\pm SD	0.43	0.66	0.36	0.62	0.26	0.48	0.4	0.28	
	Tag 14								
MW	1.67	1.29	1.87	1.22					
\pm SD	0.7	0.31	0.87	0.46					

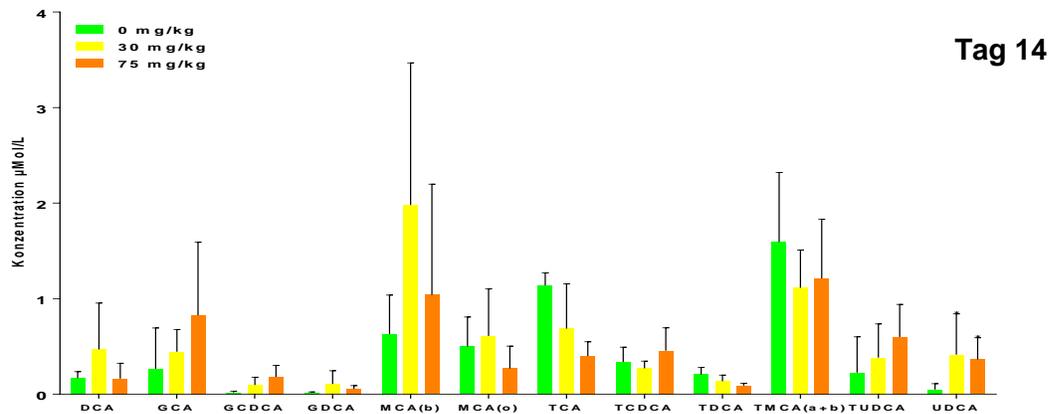
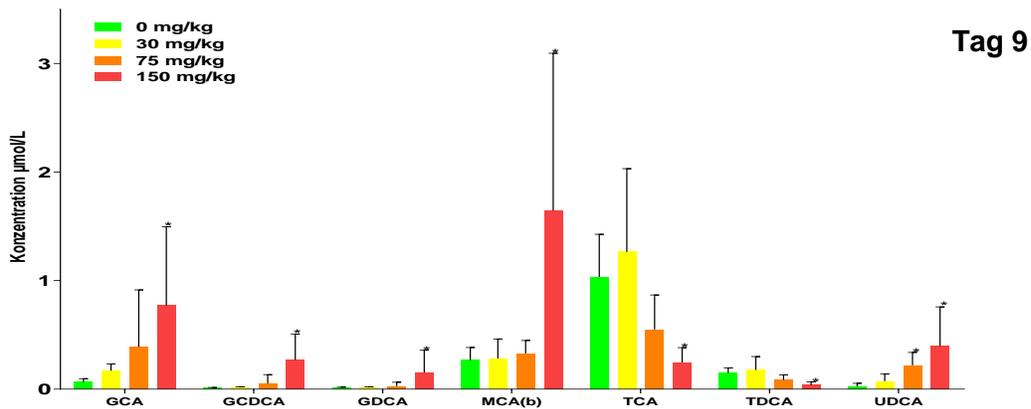
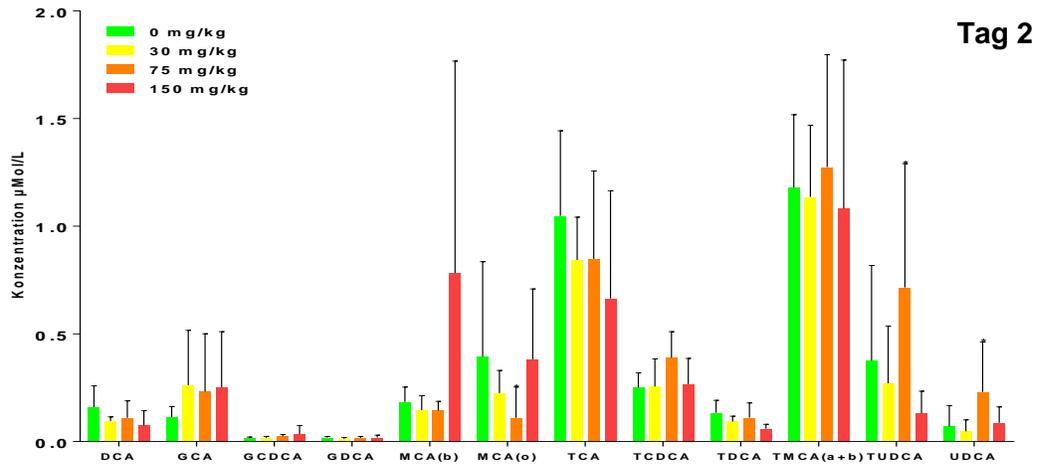
9.4.2 Multivariate Datenanalyse von Gallensäuren im Lebergewebe weiblicher Ratten

Durch eine diskriminierende Analyse mittels PCA und OPLS-DA konnte eine Trennung der weiblichen behandelten Ratten gegenüber der dazugehörigen Kontrolle erzielt werden. Ausschlaggebend für die Trennung der behandelten Ratten waren vor allem die erhöhten Gewebekonzentrationen von CA, GCA, GCDCA, GDCA und GLCA.



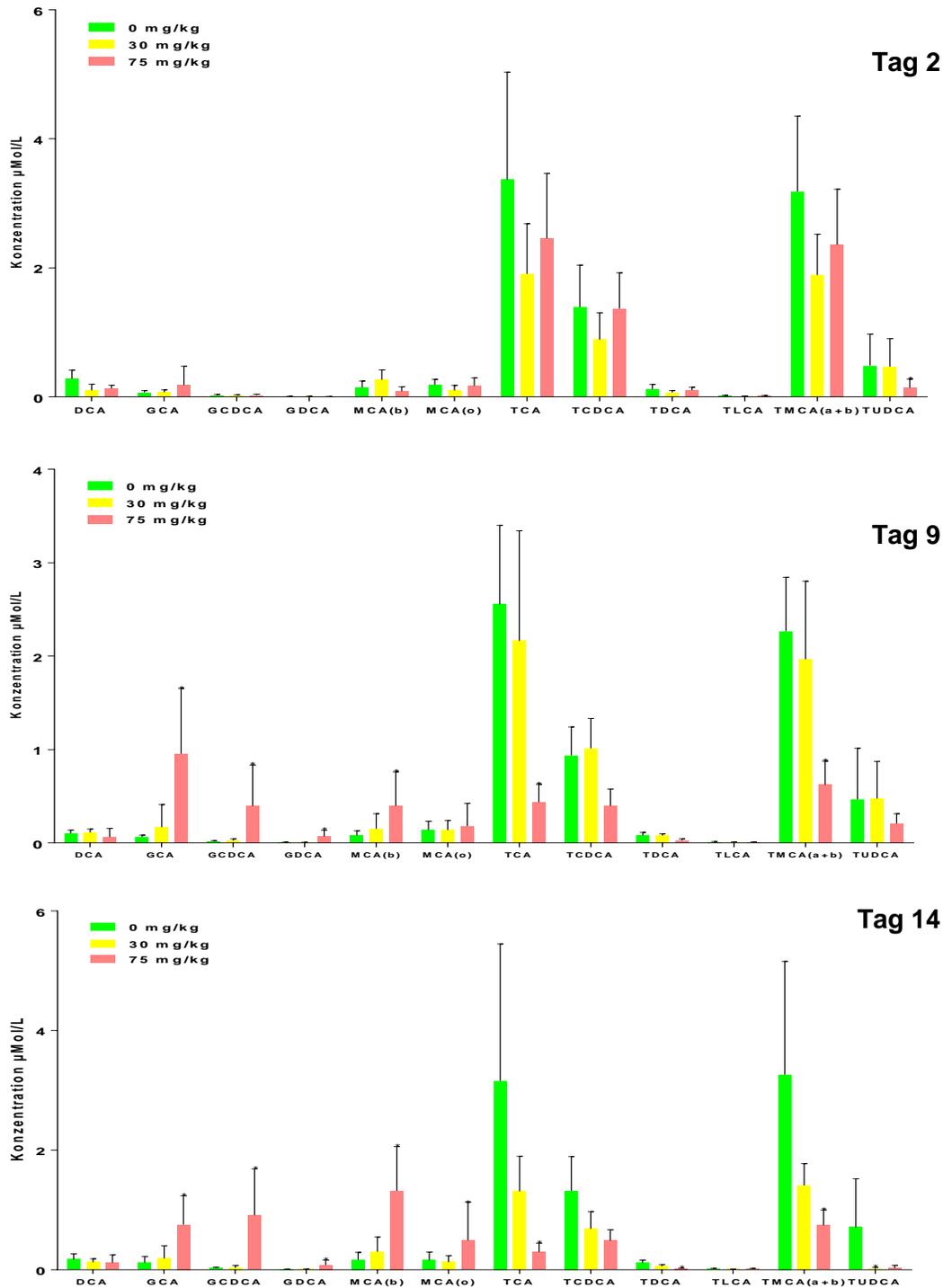
Anhang-Abbildung A1 Hauptkomponentenanalyse/Diskriminanzanalyse (PCA/OPLS-DA) basierend auf Gallensäureprofilen im Plasma weiblicher Ratten nach Behandlung mit Amitriptylin. (A) Score Scatter Plot [Grün] Kontrolle Tag 14, [Gelb] 30 mg/kg KG, [Orange] 75 mg/kg KG (B) Loadings Scatter Plot der quantifizierten Gallensäuren, die für die Verteilung der Versuchstiere in Score Scatter Plot (A) verantwortlich sind.

9.4.3 Gallensäure-Konzentrationen im Plasma männlicher Ratten



Anhang-Abbildung A2 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei männlichen Ratten behandelt mit Amitriptylin über 14 Tage. Dargestellt ist das arithmetische Mittel ($n=6$ pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: $*p < 0.05$

9.4.4 Gallensäure-Konzentrationen weiblicher Ratten im Plasma



Anhang-Abbildung A3 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei weiblichen Ratten behandelt mit Amitriptylin über 14 Tage. Dargestellt ist das arithmetische Mittel ($n=6$ pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$

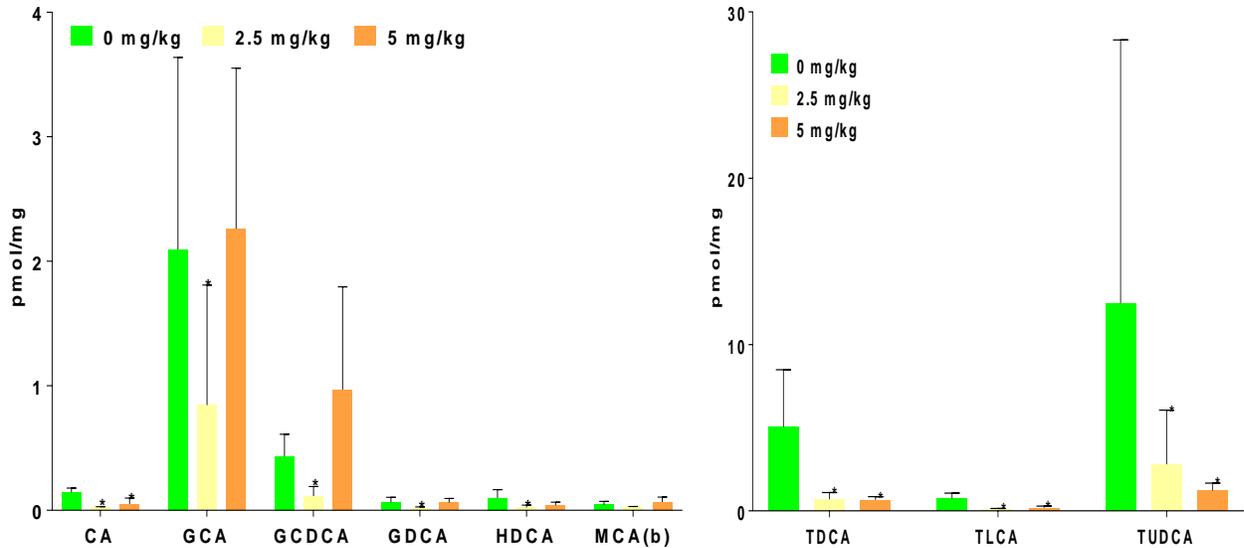
9.4.5 Mechanistische Untersuchung des veränderten Gallensäureprofils durch Transkriptionsanalysen im Lebergewebe

Anhang-Tabelle A13 Genexpressions-Profil männlicher (A) und weiblicher (B) Ratten.

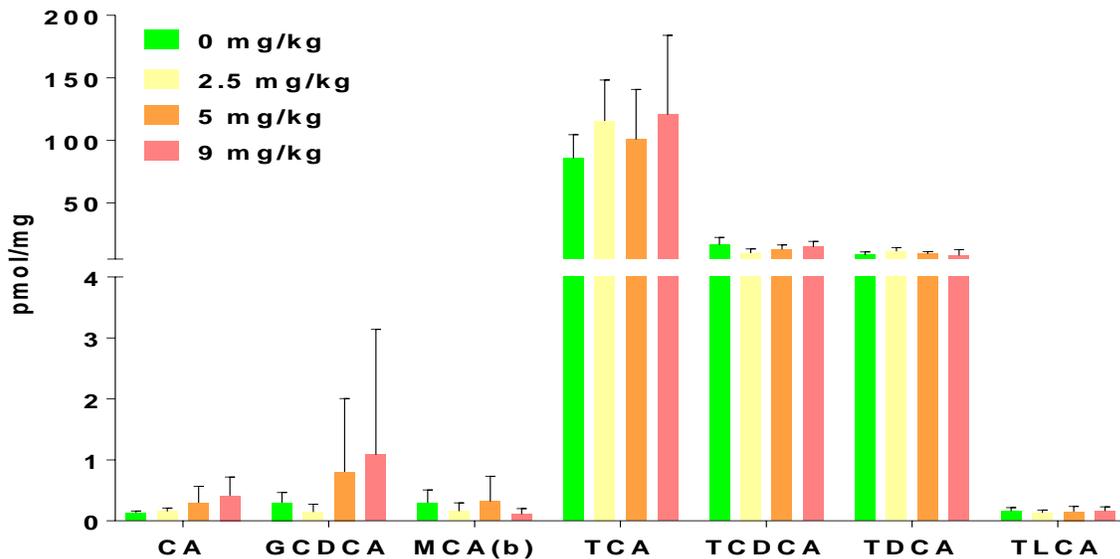
A	Dosis in mg/kg			B	Dosis in mg/kg	
	30	75	150		30	75
Amacr	1.00	0.91	0.67	BCRP	0.7	0.6
Cyp7a1	1.35	1.14	0.79	Abcg5	0.8	0.4
Cyp27a1	1.09	1.12	1.26	Abcg8	0.8	0.5
Cyp8b1	0.74	1.11	0.80	MDR1	1.4	0.8
SCPx	0.97	0.98	1.18	MRP3	2.4	2.8
Abcg2 (BCRP)	1.03	0.86	0.79	PPARa	0.9	1.2
ASBT	1.08	0.94	0.45	PPARg	1.1	1.2
MDR1	1.07	1.55	2.66	SHP	1.1	1.2
MRP3	0.93	1.85	9.52			
MRP4	0.99	1.00	1.18			
CAR	0.88	1.50	0.75			

9.5 Daten Diclofenac

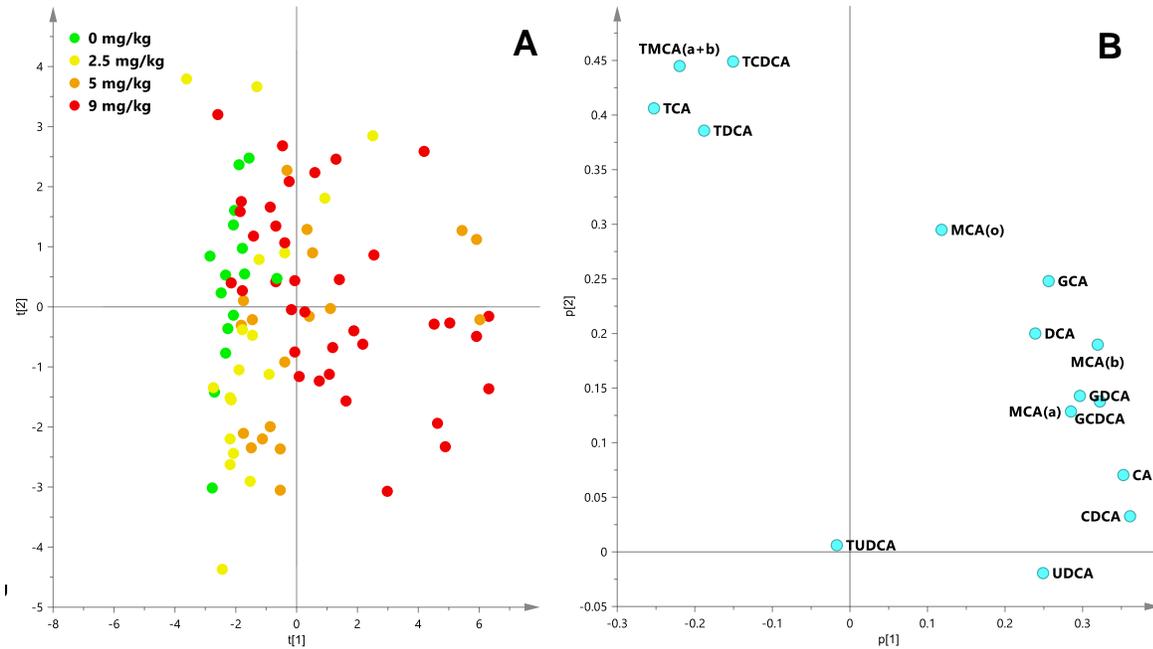
9.5.1 Gallensäure-Konzentrationen weiblicher Ratten Leber



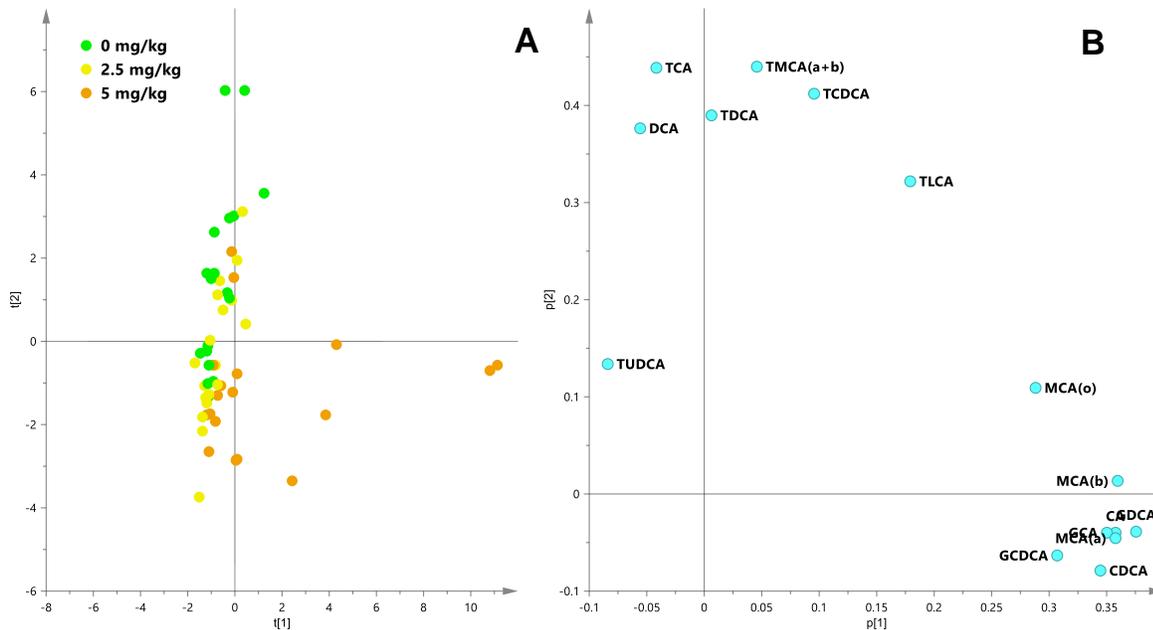
Anhang-Abbildung A4 Konzentration von Gallensäuren im Lebergewebe (pmol/mg) weiblicher Ratten. Dargestellt ist das arithmetische Mittel (n=6 pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: *p < 0.05.



Anhang-Abbildung A5 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei männlichen Ratten behandelt mit Diclofenac über 14 Tage. Dargestellt ist das arithmetische Mittel (n=6 pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: *p < 0.05.



Anhang-Abbildung A6 Hauptkomponenten Analyse (PCA) basierend auf Gallensäureprofilen im Plasma männlicher Ratten nach Behandlung mit Diclofenac. (A) Score Scatter Plot [Grün] Kontrolle, [Gelb] 2.5 mg/kg KG, [Orange] 5 mg/kg KG, [Rot] 9 mg/kg KG. (B) Loadings Scatter Plot der quantifizierten Gallensäuren, die für die Verteilung der Versuchstiere in Score Scatter Plot (A) verantwortlich sind.



Anhang-Abbildung A7 Hauptkomponenten Analyse (PCA) basierend auf Gallensäureprofilen im Plasma weiblicher Ratten nach Behandlung mit Diclofenac. (A) Score Scatter Plot [Grün] Kontrolle, [Gelb] 2.5 mg/kg KG, [Orange] 5 mg/kg KG. (B) Loadings Scatter Plot der quantifizierten Gallensäuren, die für die Verteilung der Versuchstiere in Score Scatter Plot (A) verantwortlich sind.

9.5.2 Gallensäure-Konzentrationen männlicher Ratten im Plasma

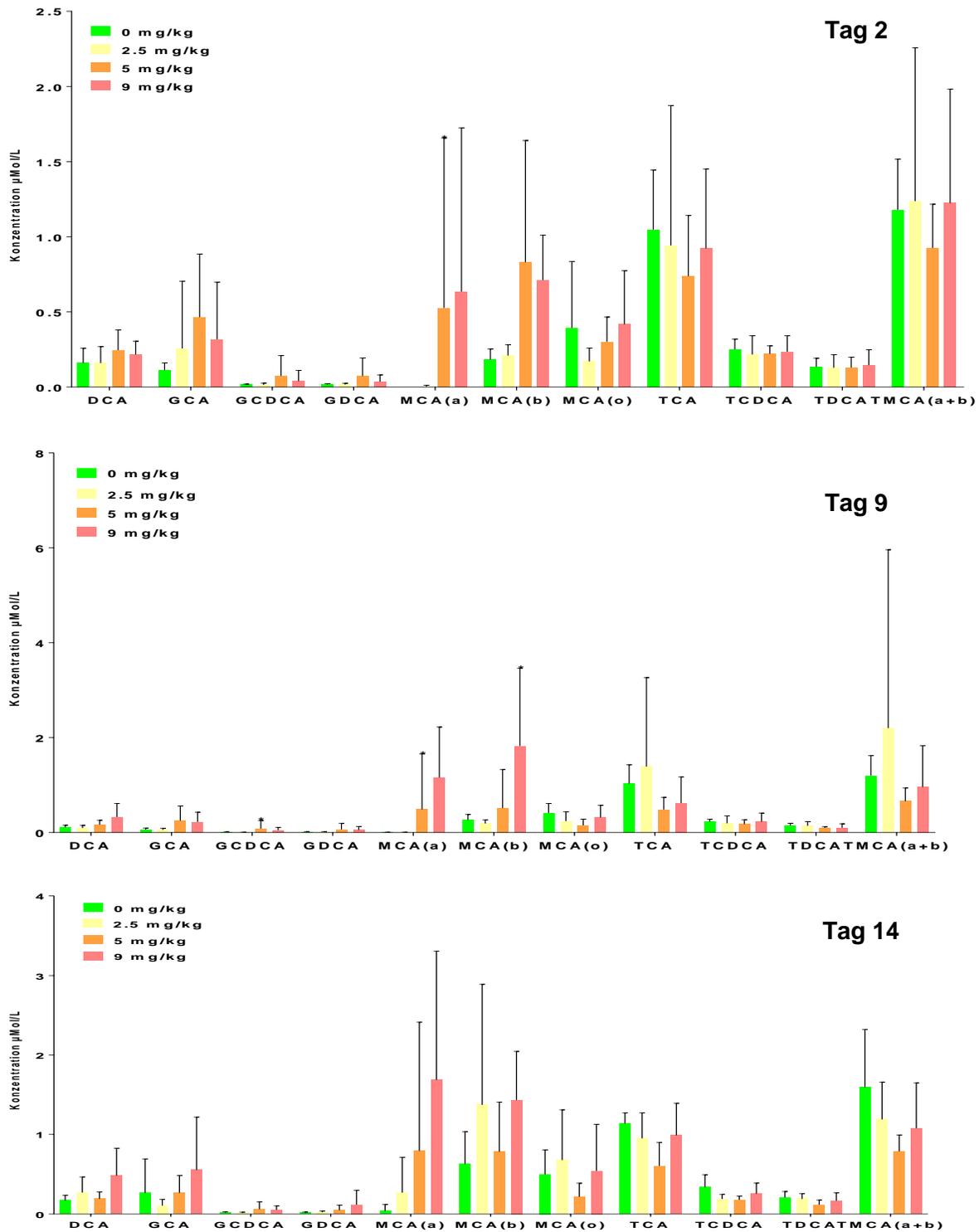


Abbildung-Anhang 1 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei männlichen Ratten behandelt mit Diclofenac über 14 Tage. Dargestellt ist das arithmetische Mittel (n=6 pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: *p < 0.05

9.5.3 Gallensäure-Konzentrationen weiblicher Ratten im Plasma

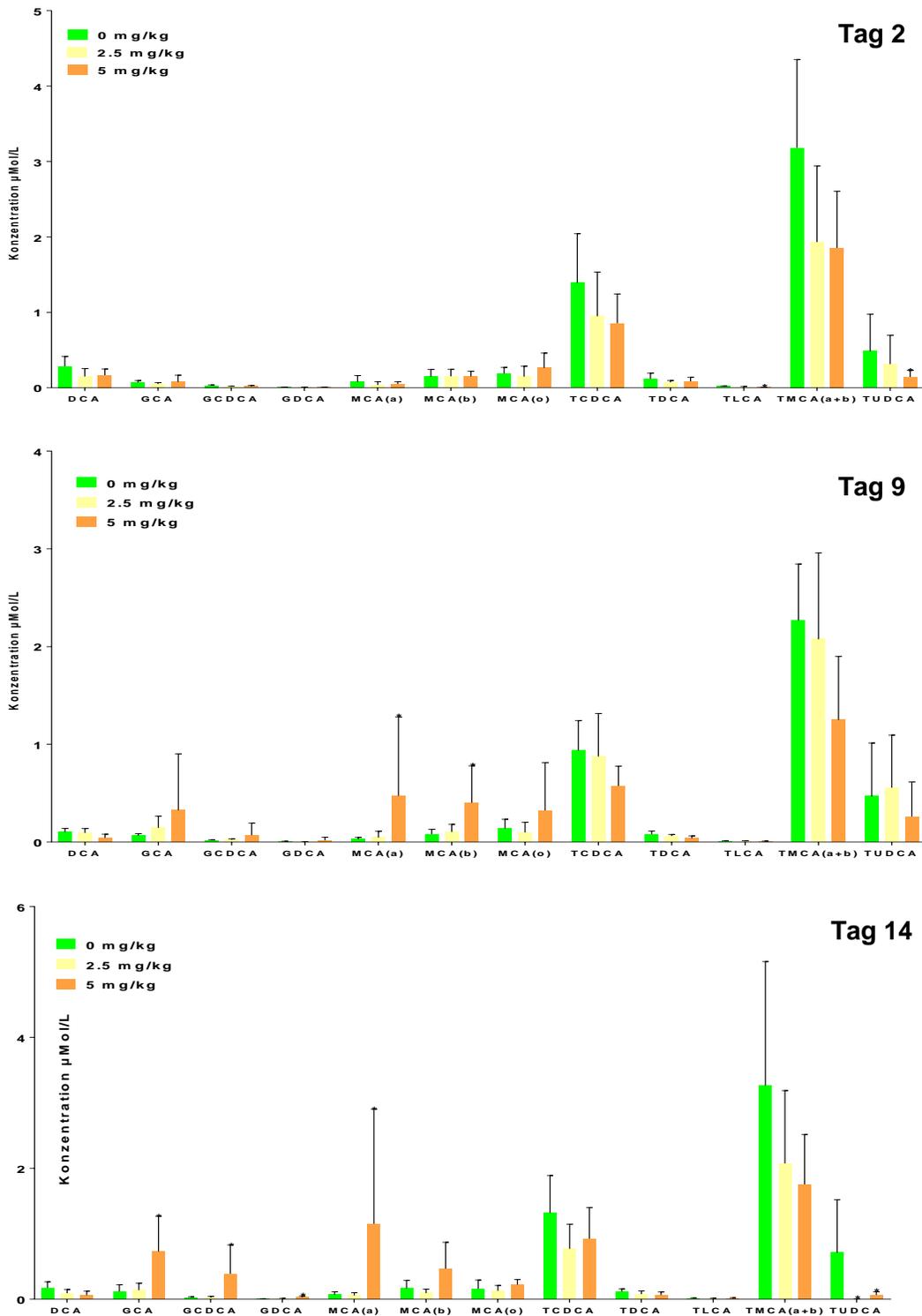


Abbildung-Anhang 2 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei weiblichen Ratten behandelt mit Diclofenac über 14 Tage. Dargestellt ist das arithmetische Mittel ($n=6$ pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.

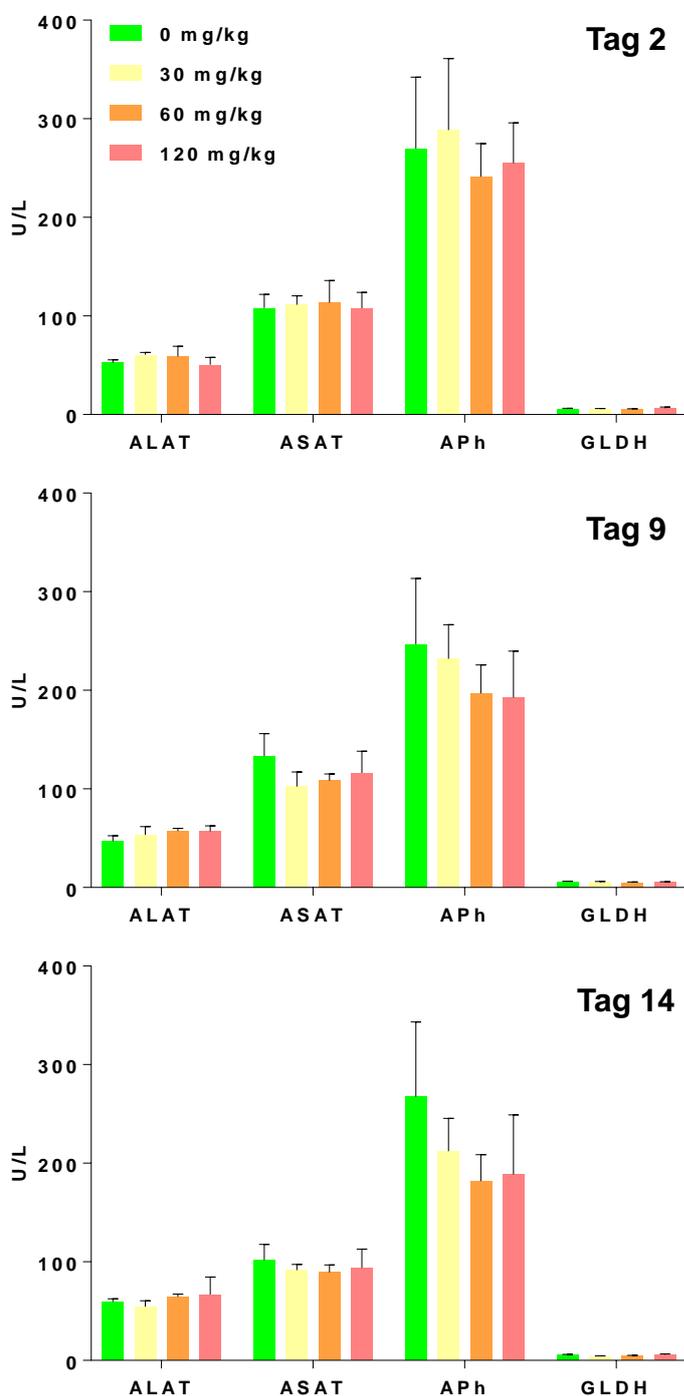
9.5.4 Mechanistische Untersuchung des veränderten Gallensäureprofils durch Transkriptionsanalysen im Lebergewebe

Anhang-Tabelle A14 Genexpressions-Profil männlicher (A) und weiblicher (B) Ratten.

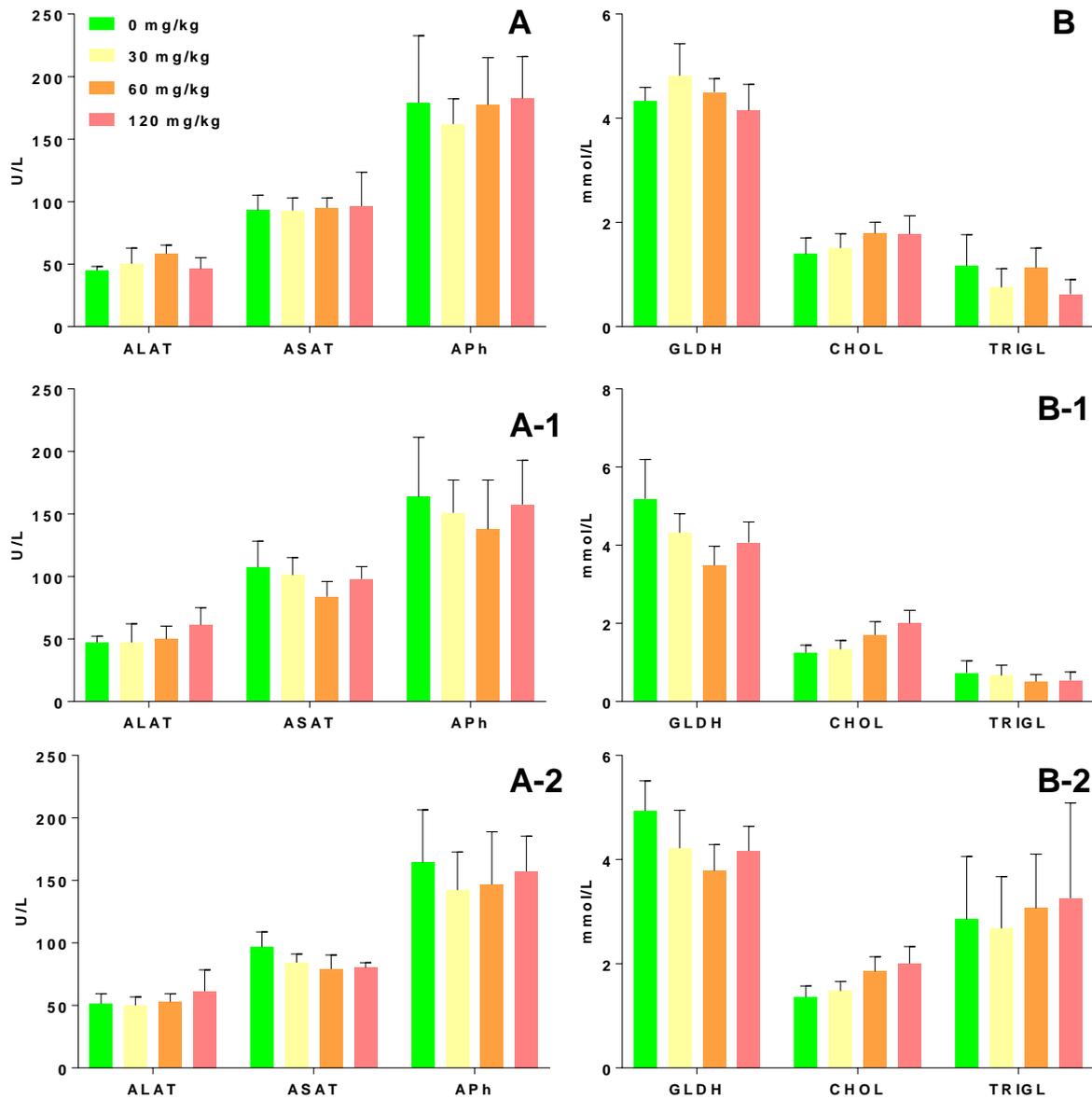
A	Dosis in mg/kg			B	Dosis in mg/kg	
	2.5	5	9		2.5	5
Acot8	0.63	0.59	0.64	Cyp7a1	0.4	0.6
Amacr	1.05	0.92	0.61	SCPx	0.7	0.7
Cyp7a1	0.50	0.78	1.75	ASBT	0.6	0.6
Cyp8b1	1.05	1.00	0.43	BCRP	0.9	0.6
BCRP	1.00	1.23	1.60	MDR1b	1.4	1.4
Abcg5	0.96	1.19	1.40	OATP2	0.6	0.7
MDR1a	1.23	1.18	1.40			
MDR1b	0.90	0.76	1.40			
MDR3	1.63	1.33	1.33			
MRP2	0.76	0.75	0.55			
MRP3	1.06	1.05	1.34			
PPARa	1.90	2.08	1.32			
PPARg	0.98	1.10	1.32			

9.6 Daten Flutamid

9.6.1 Klinische Chemie

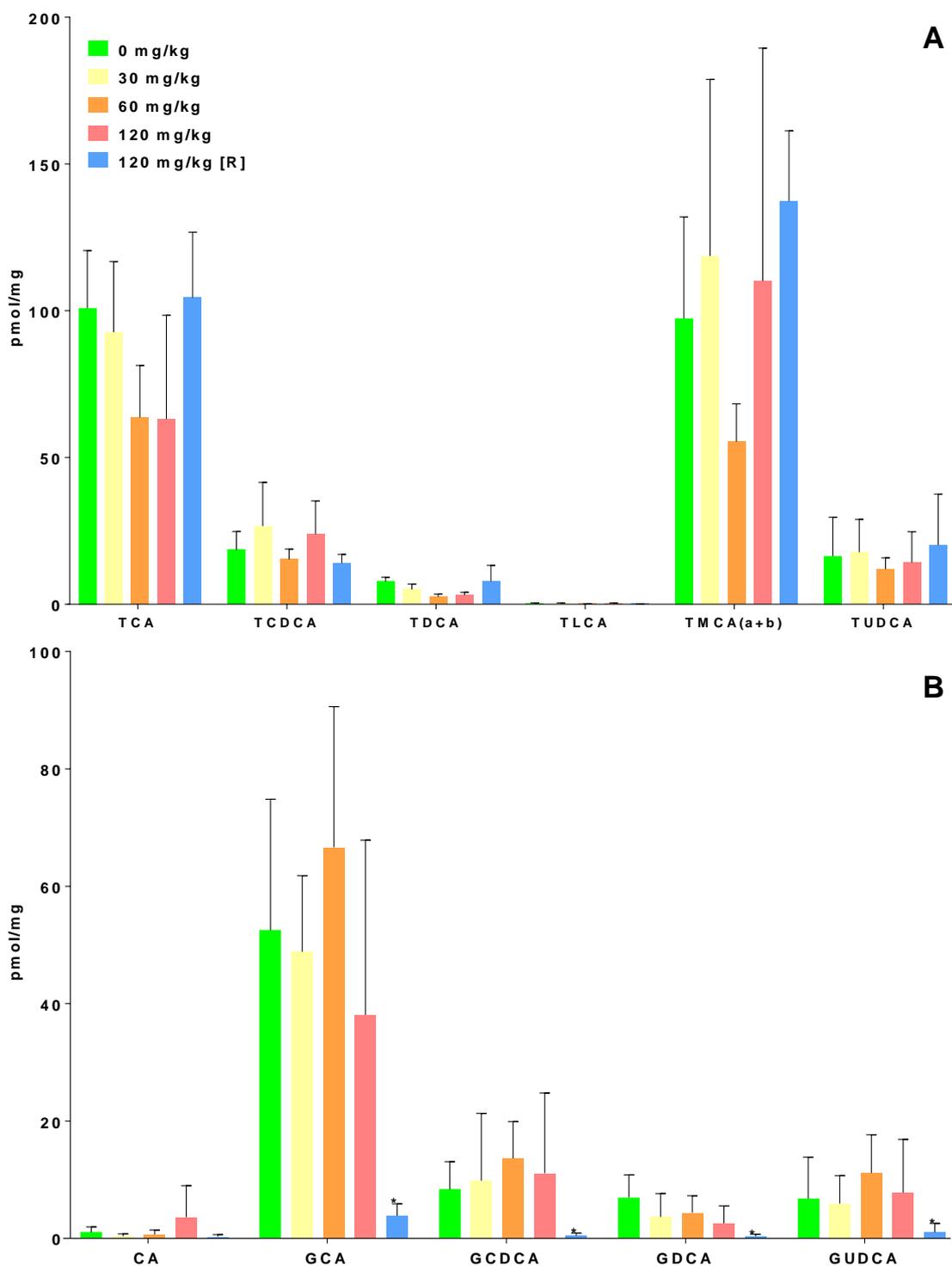


Anhang-Abbildung A8 Ergebnisse etablierter Serummarker männlicher Ratten nach Behandlung mit Flutamid. Die Ergebnisse sind dargestellt als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.

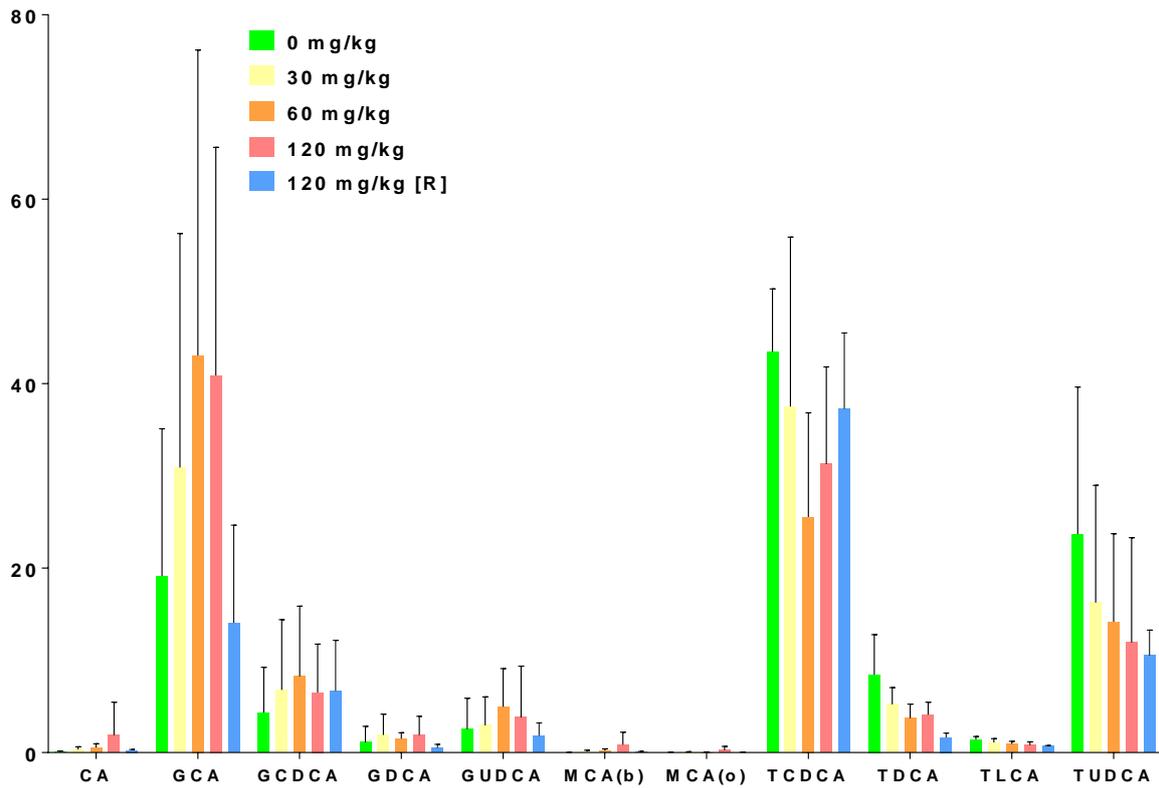


Anhang-Abbildung A9 Ergebnisse etablierter Serummarker weiblicher Ratten nach Behandlung mit Flutamid. Die Ergebnisse sind dargestellt als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.

9.6.2 Gallensäuren im Lebergewebe

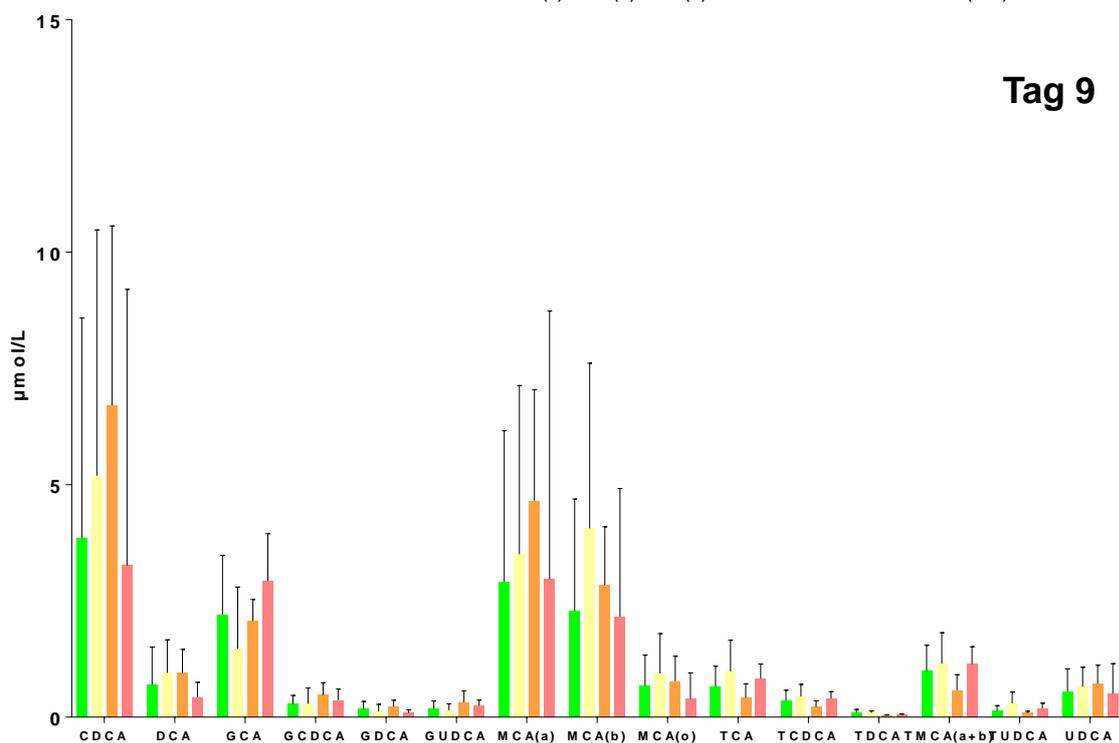
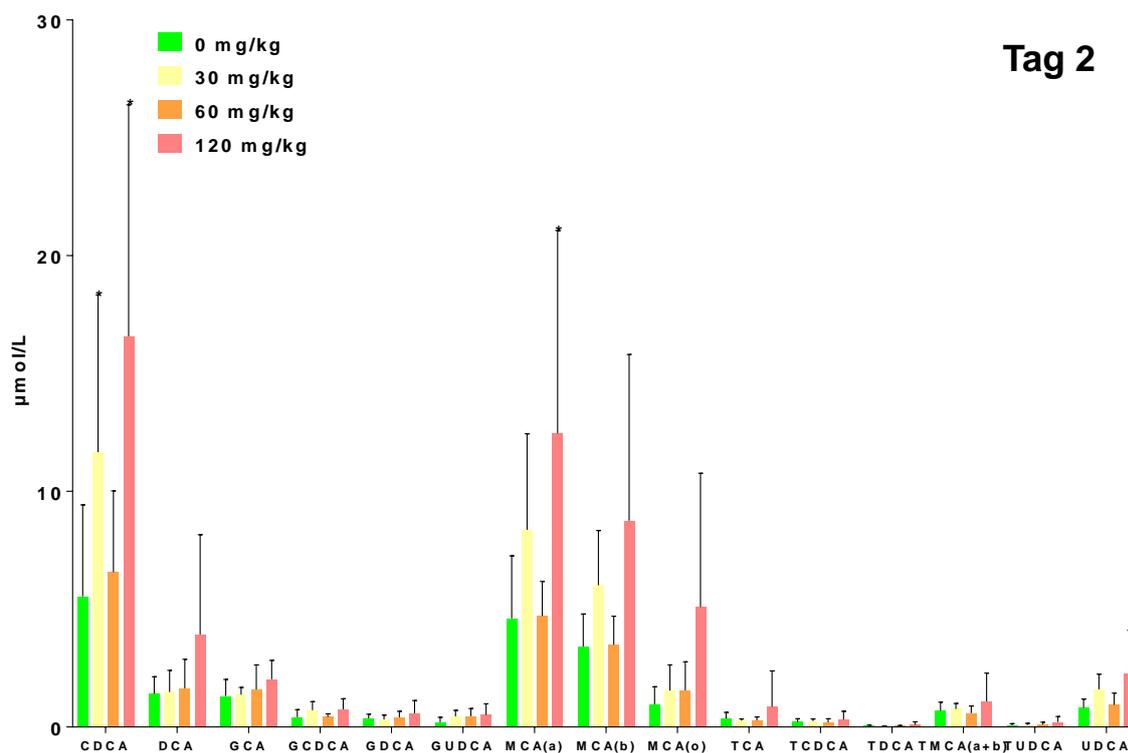


Anhang-Abbildung A10 Konzentration von Gallensäuren im Lebergewebe (pmol/mg) männlicher Ratten. Dargestellt ist das arithmetische Mittel (n=6 pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: *p < 0.05.

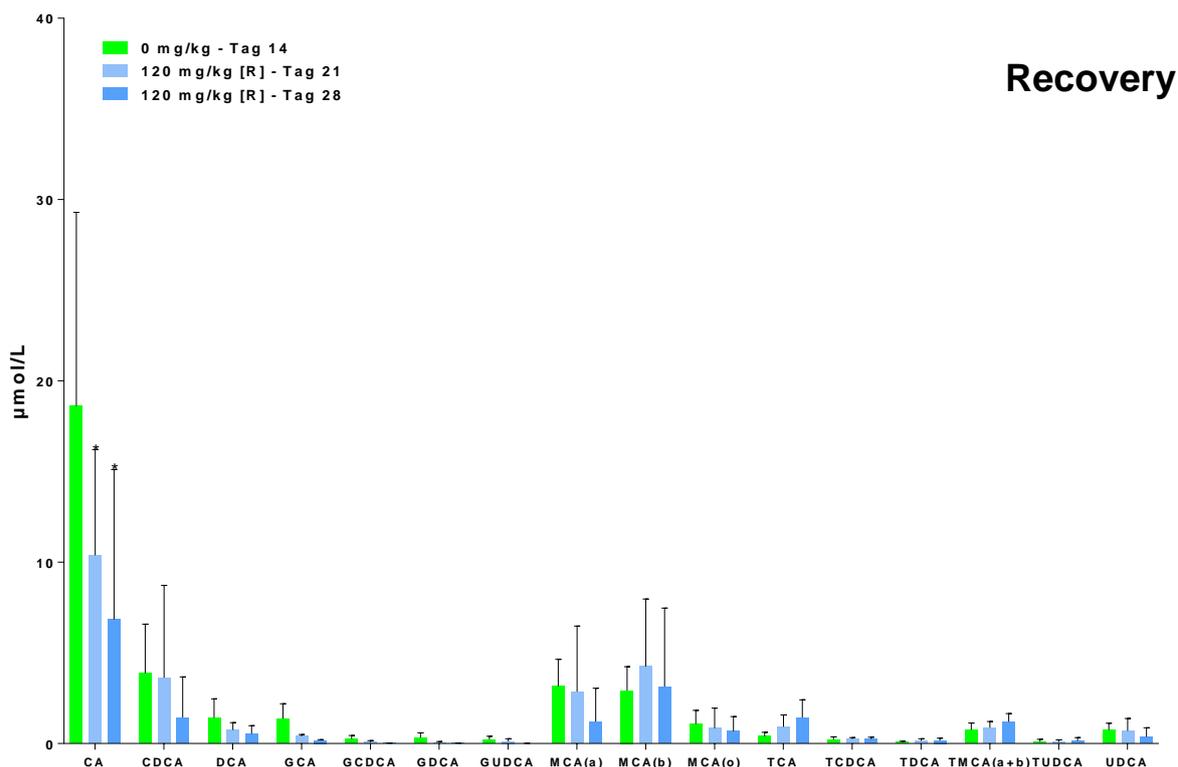
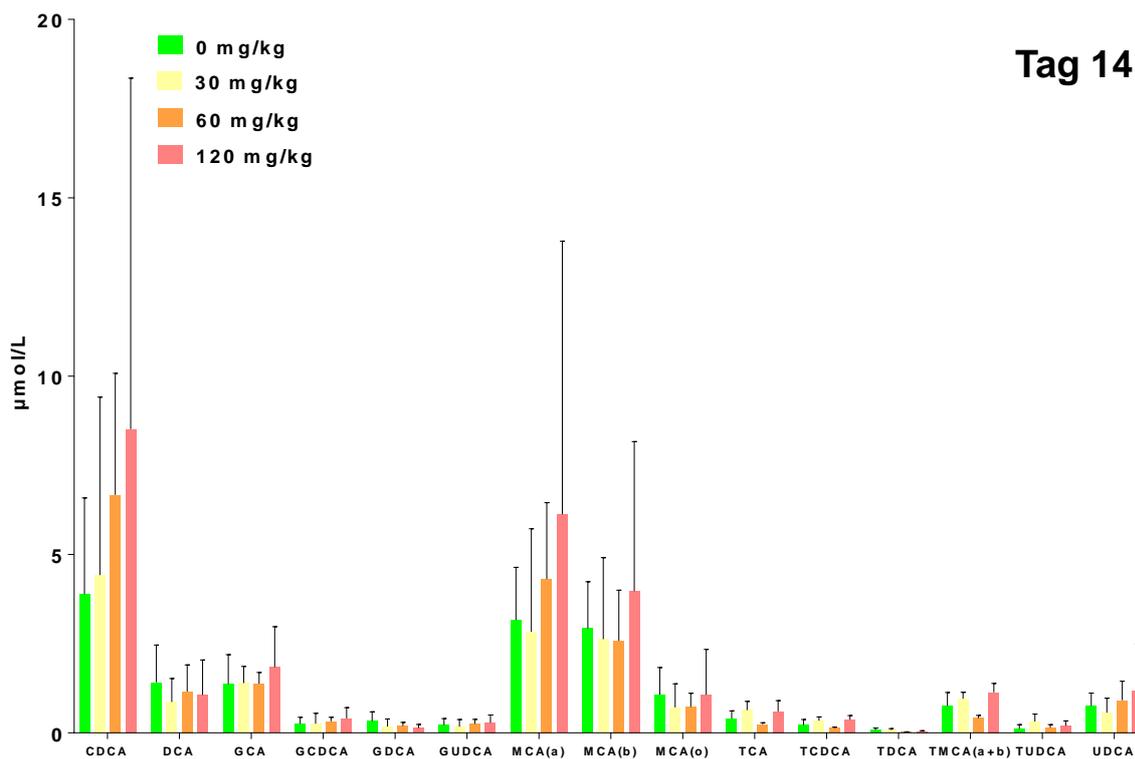


Anhang-Abbildung A11 Konzentration von Gallensäuren im Lebergewebe (pmol/mg) weiblicher Ratten. Dargestellt ist das arithmetische Mittel (n=6 pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: *p < 0.05.

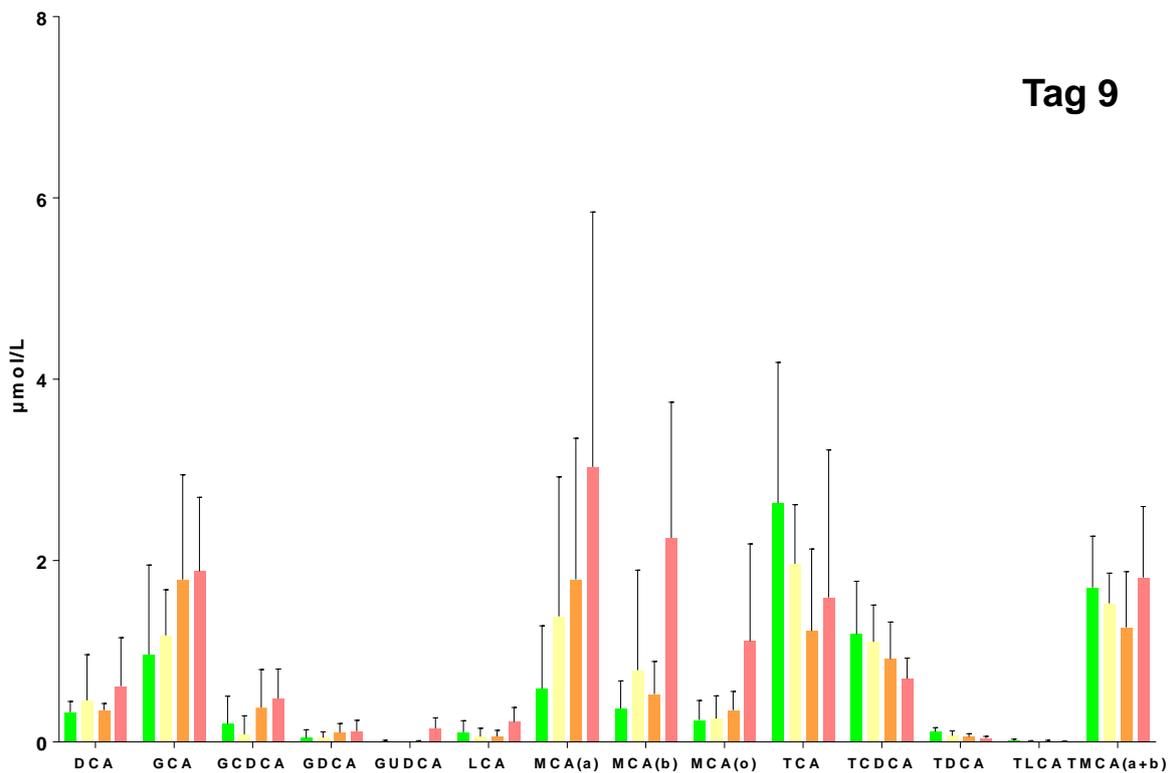
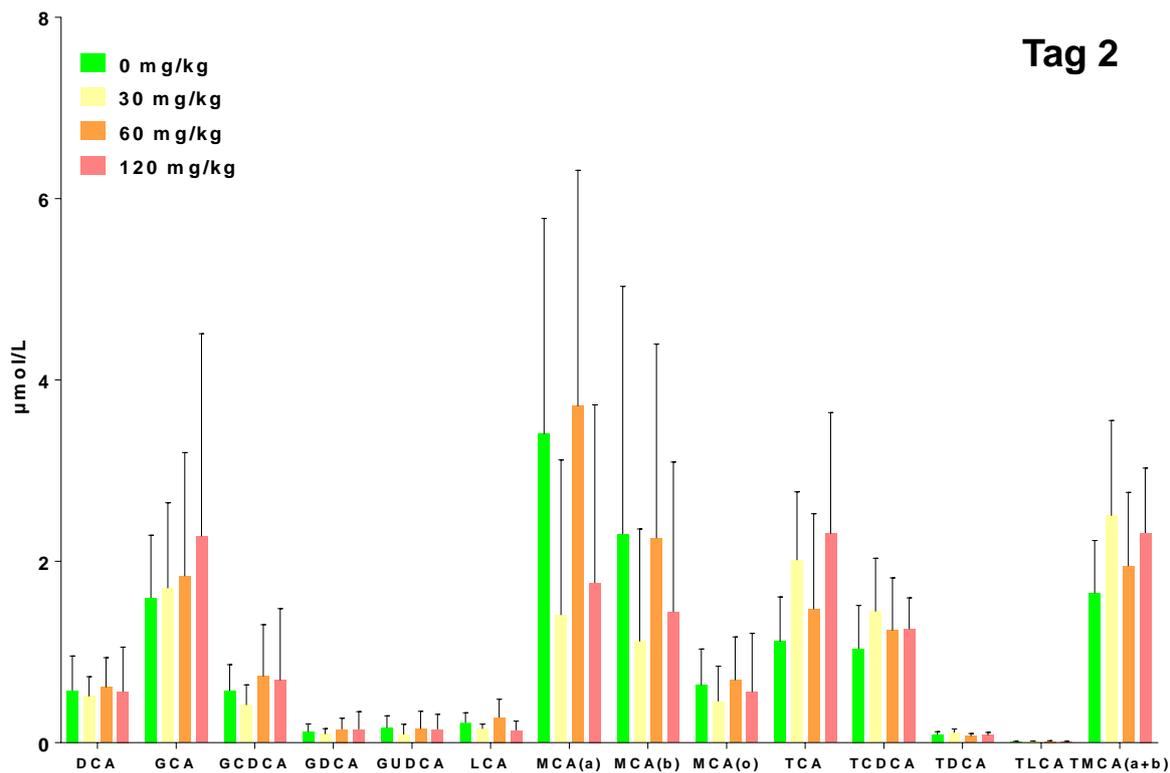
9.6.3 Gallensäuren im Plasma



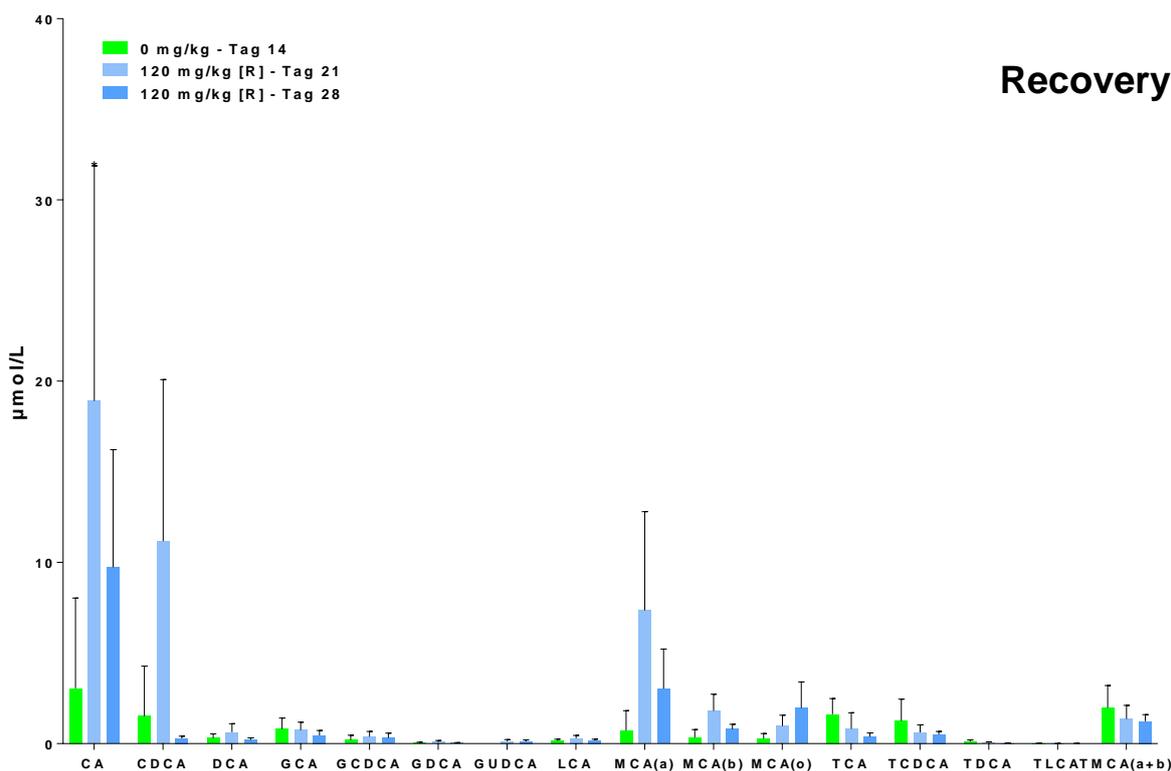
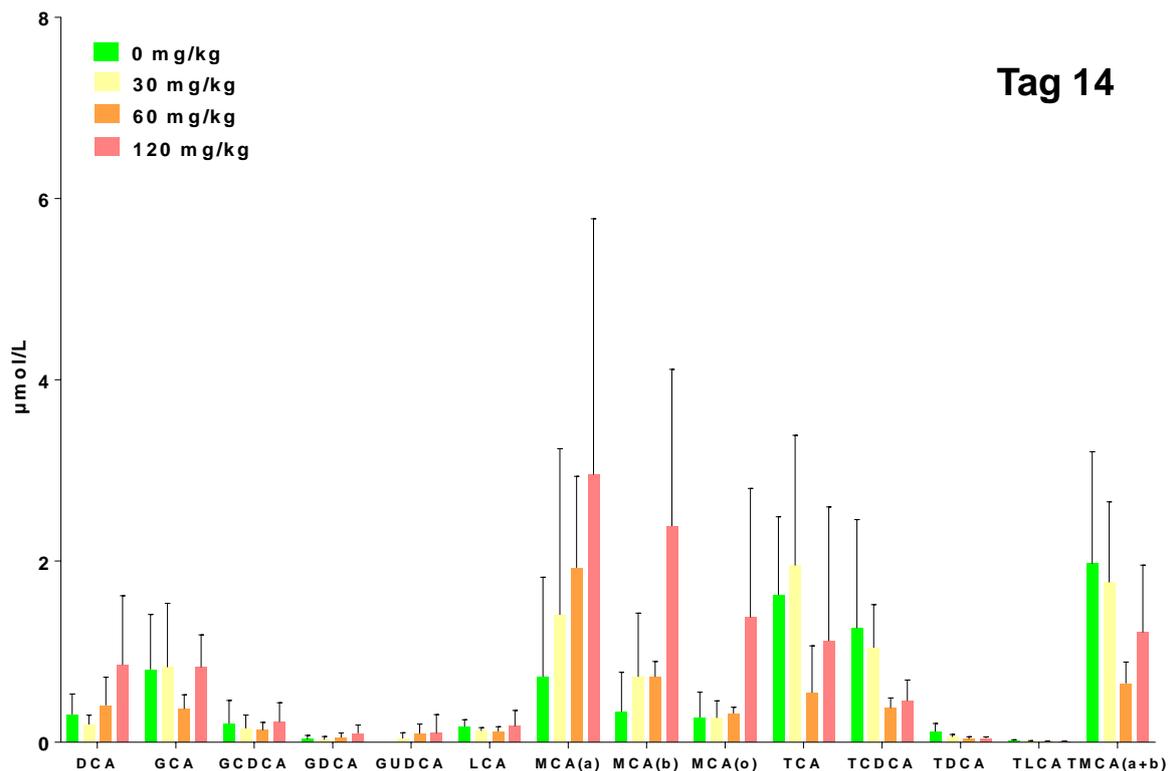
Anhang-Abbildung A12 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei männlichen Ratten für Studientag 2, 9 nach Behandlung mit Flutamid. Dargestellt ist das arithmetische Mittel ($n=6$ pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.



Anhang-Abbildung A13 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei männlichen Ratten für Studientag 14 nach Behandlung mit Flutamid und Recovery. Dargestellt ist das arithmetische Mittel ($n=6$ pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.



Anhang-Abbildung A14 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei weiblichen Ratten für Studientag 2, 9 nach Behandlung mit Flutamid. Dargestellt ist das arithmetische Mittel (n=6 pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert ± SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: *p < 0.05.



Anhang-Abbildung A15 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei weiblichen Ratten für Studientag 14 nach Behandlung mit Flutamid und Recovery. Dargestellt ist das arithmetische Mittel ($n=6$ pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.

Mechanistische Untersuchung des veränderten Gallensäureprofils durch Transkriptionsanalysen im Lebergewebe

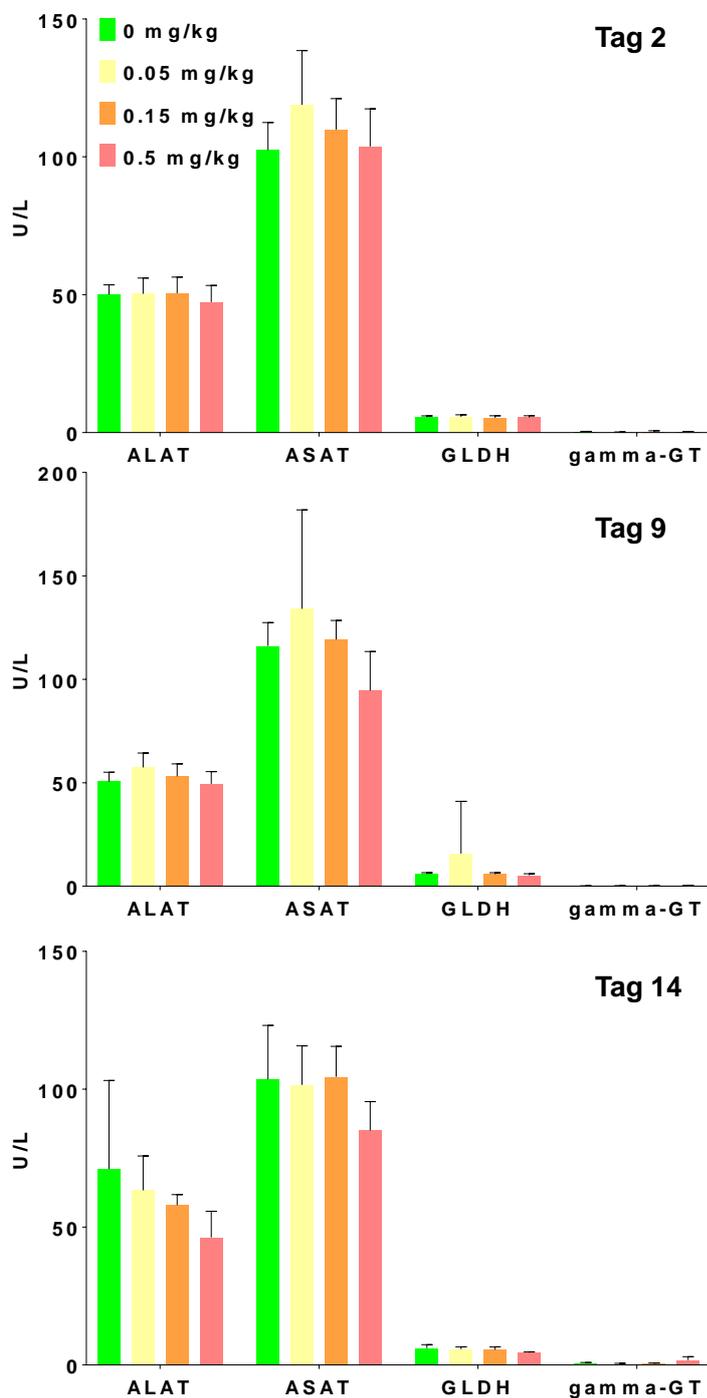
Anhang-Tabelle A15 Genexpressions-Profil männlicher (A) und weiblicher (B) Ratten.

A	Dosis in mg/kg			
	30	60	120	120 [R]
Acot8	1.17	1.41	1.48	1.00
Cyp7a1	1.90	1.29	1.45	2.17
Cyp7b1	0.77	0.46	0.56	0.86
Cyp8b1	1.41	1.57	2.21	2.66
Abcg5	1.53	1.99	1.96	0.76
Abcg8	1.53	2.08	1.75	0.70
MDR1b	1.35	1.33	2.82	1.28
MDR1a	1.17	1.65	1.56	0.99
MRP2	1.10	1.35	1.46	0.91
MRP3	2.77	8.40	10.03	0.50
MRP4	1.13	1.23	1.49	0.89
NTCP	0.67	0.48	0.51	1.75
SHP	1.03	0.46	0.44	0.40

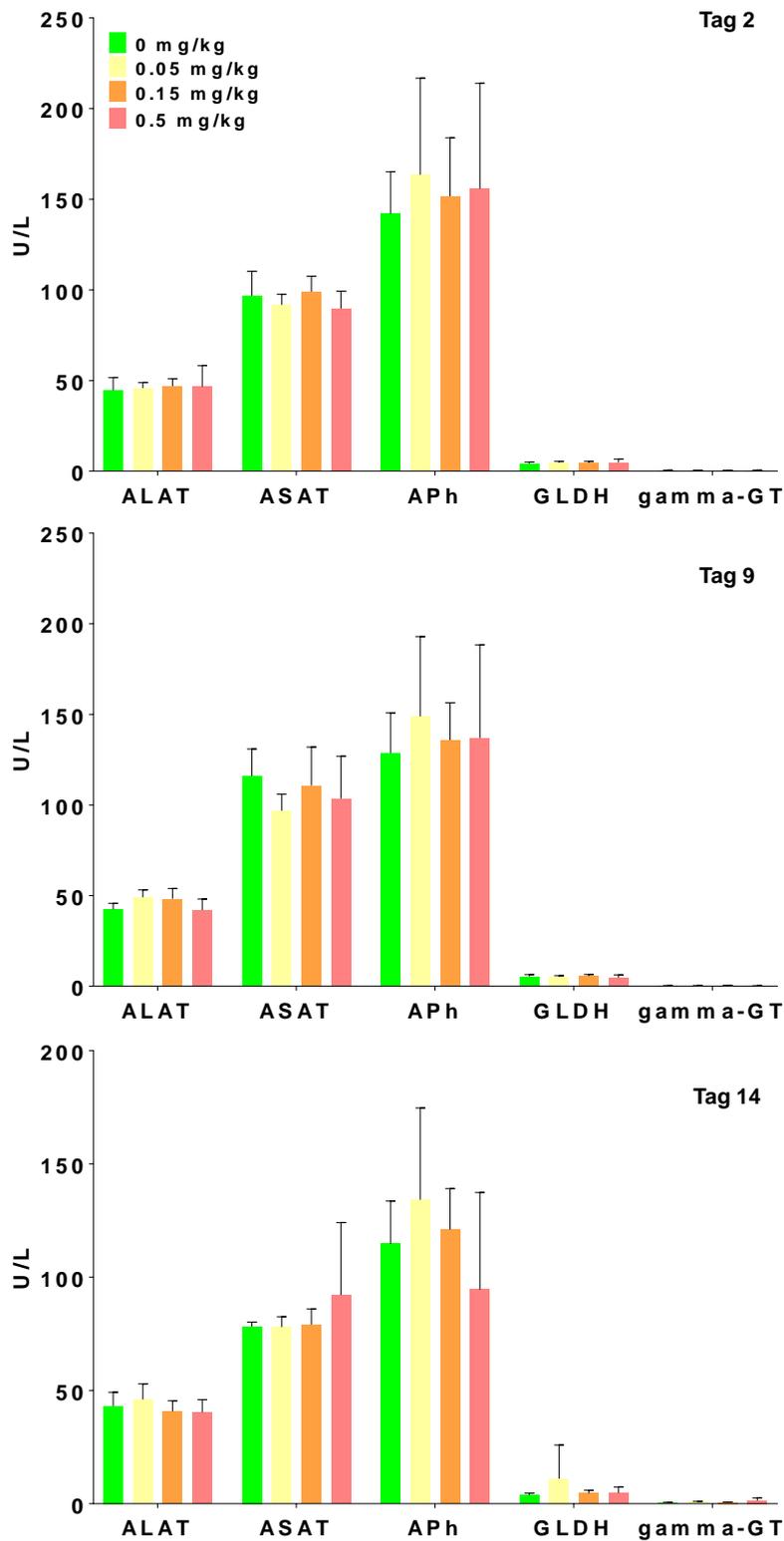
B	Dosis in mg/kg			
	30	60	120	120 [R]
Acot8	0.84	1.08	1.28	0.94
Cyp7a1	0.79	0.47	1.66	1.77
MDR1b	1.36	2.02	3.61	1.20
MRP3	3.71	6.07	8.29	1.62
MRP4	1.55	2.38	2.60	1.20
OATP2	1.32	1.19	1.65	1.12
CAR	1.74	1.32	1.68	0.67
FXR	1.19	1.23	1.36	1.66
PPARg	1.70	2.65	2.26	1.72

9.7 Daten Methotrexat

9.7.1 Klinische Chemie

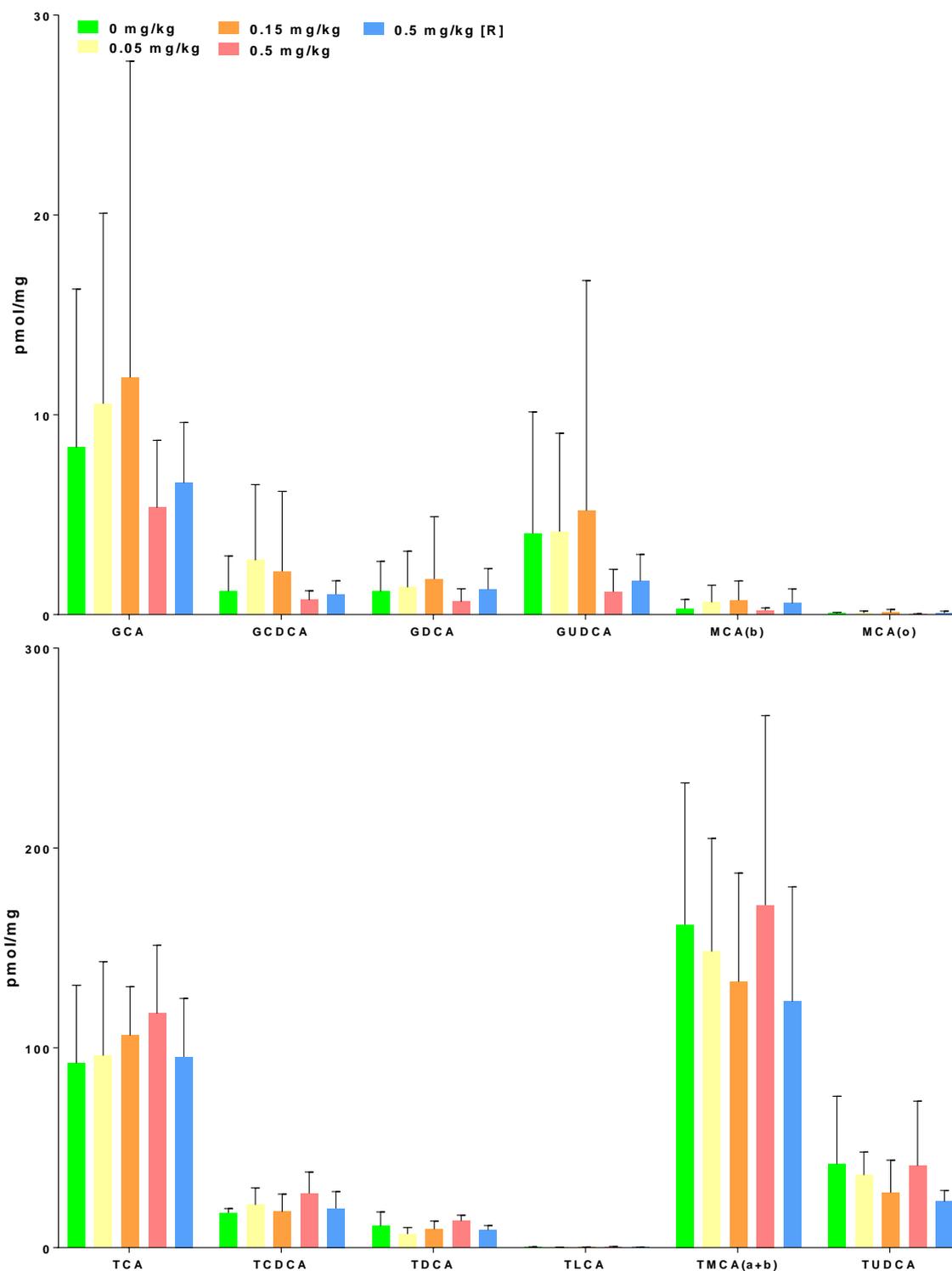


Anhang-Abbildung A16 Ergebnisse etablierter Serummarker männlicher Ratten nach Behandlung mit Methotrexat. Die Ergebnisse sind dargestellt als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.

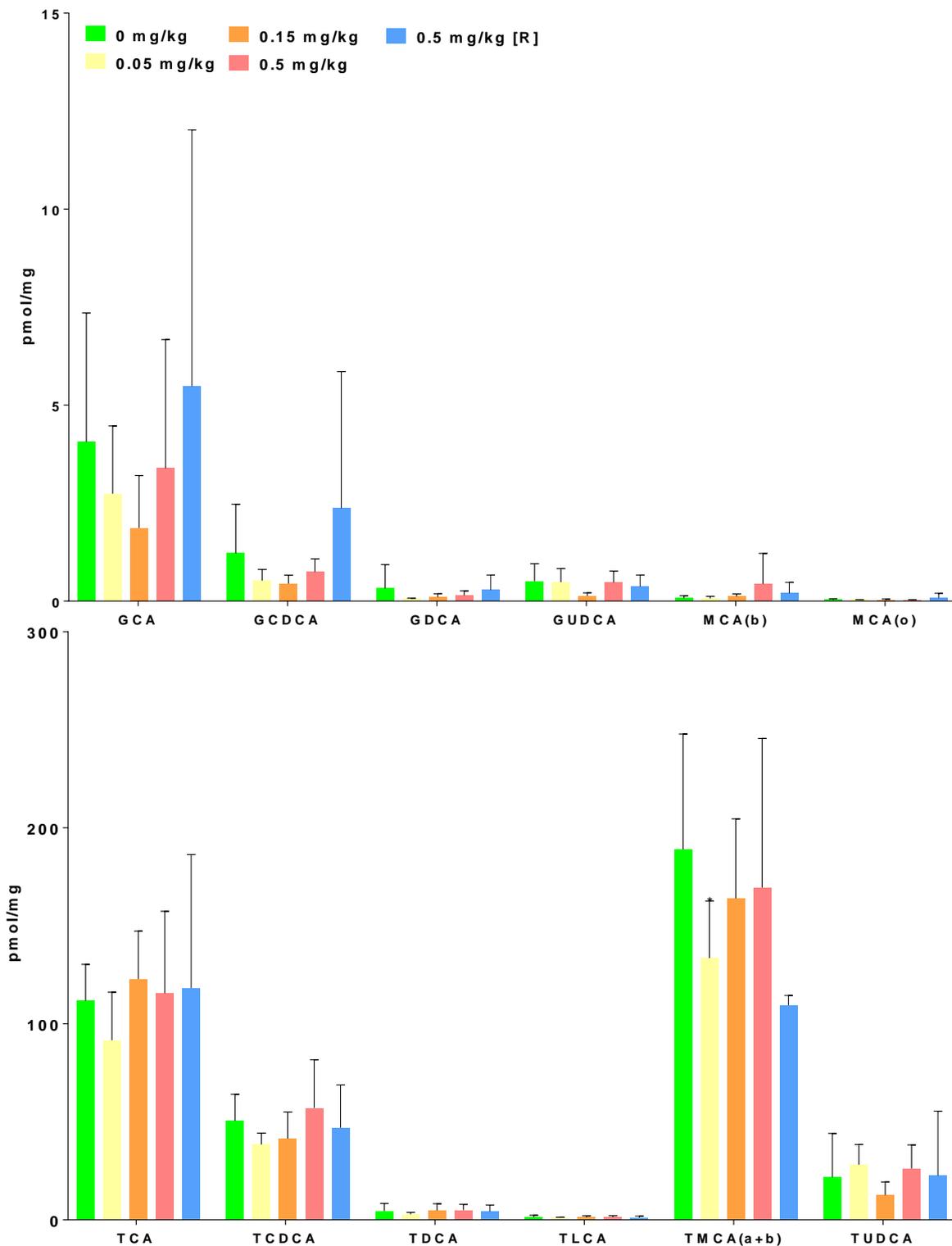


Anhang-Abbildung A17 Ergebnisse etablierter Serummarker weiblicher Ratten nach Behandlung mit Methotrexat. Die Ergebnisse sind dargestellt als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.

9.7.2 Gallensäuren im Lebergewebe

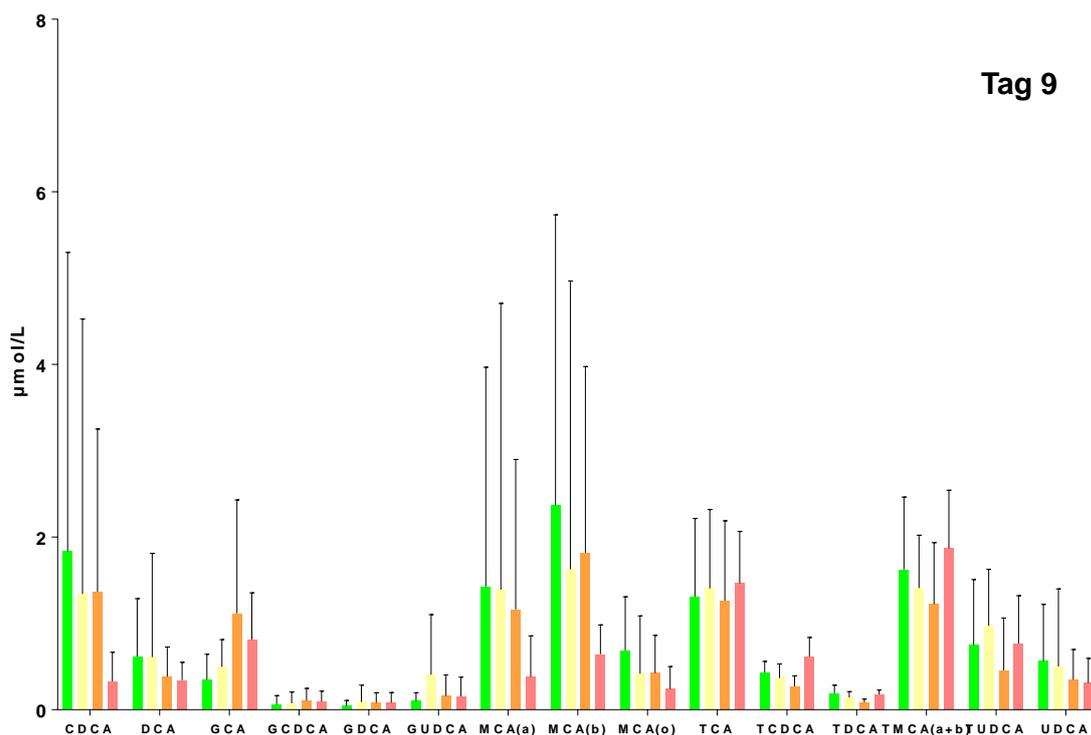
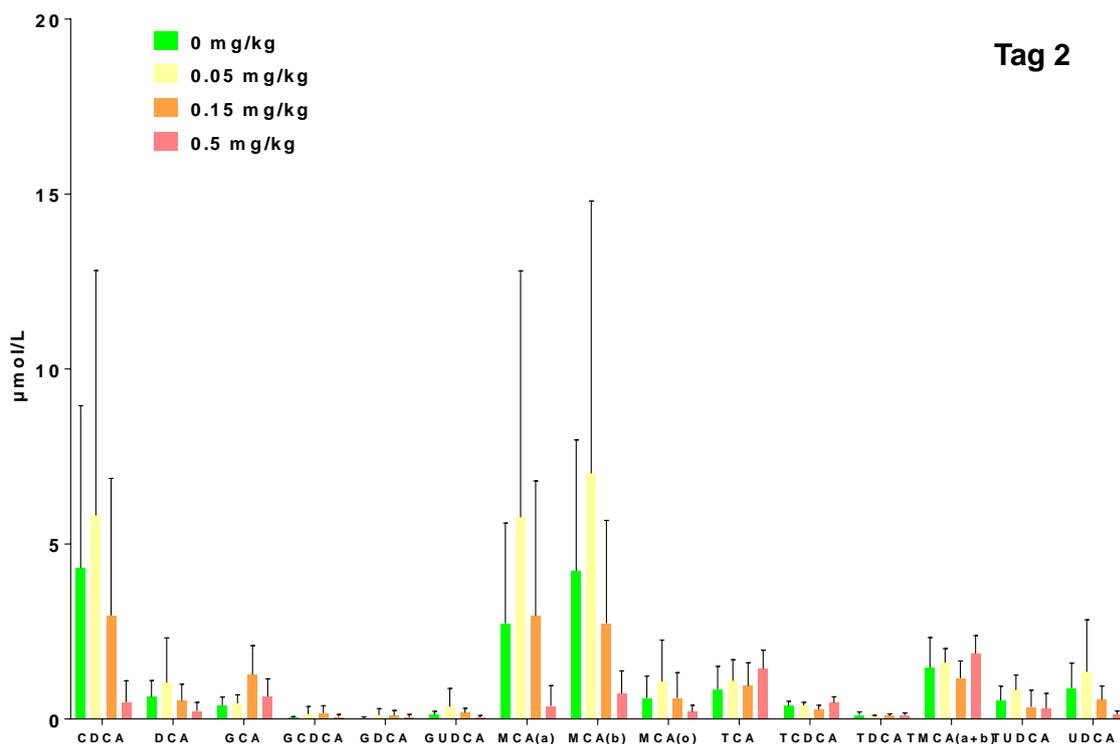


Anhang-Abbildung A18 Konzentration von Gallensäuren im Lebergewebe (pmol/mg) männlicher Ratten. Dargestellt ist das arithmetische Mittel ($n=6$ pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.

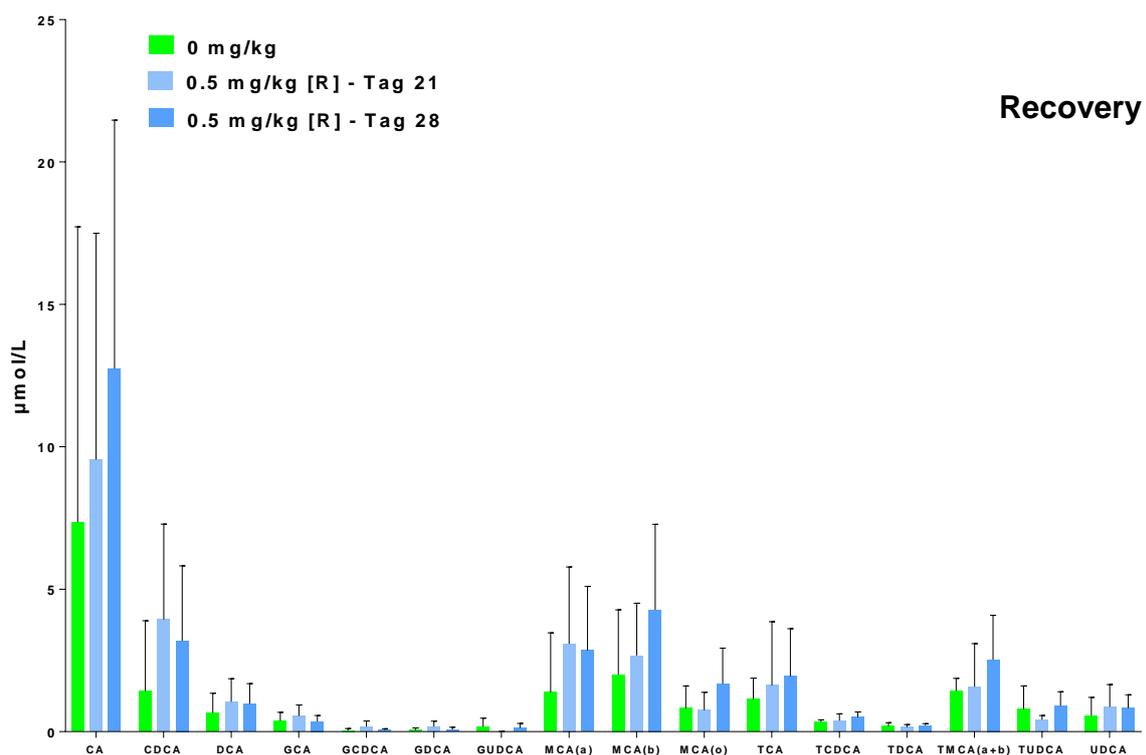
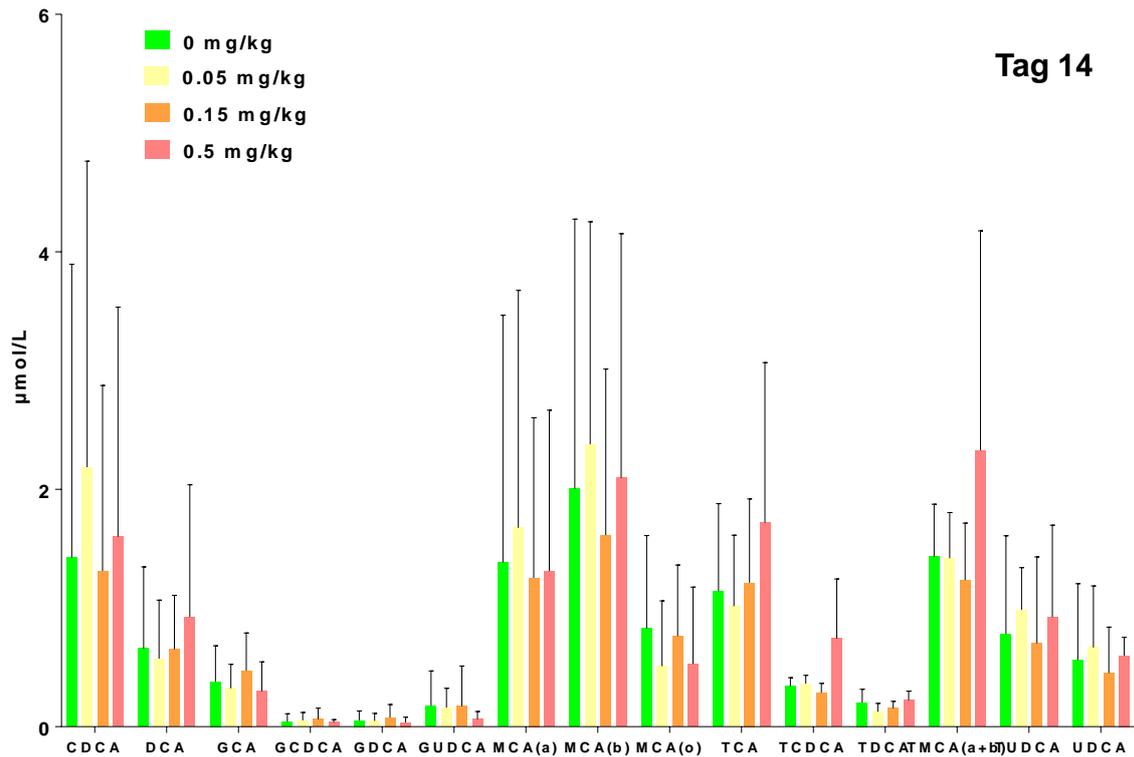


Anhang-Abbildung A19 Konzentration von Gallensäuren im Lebergewebe (pmol/mg) weiblicher Ratten. Dargestellt ist das arithmetische Mittel ($n=6$ pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.

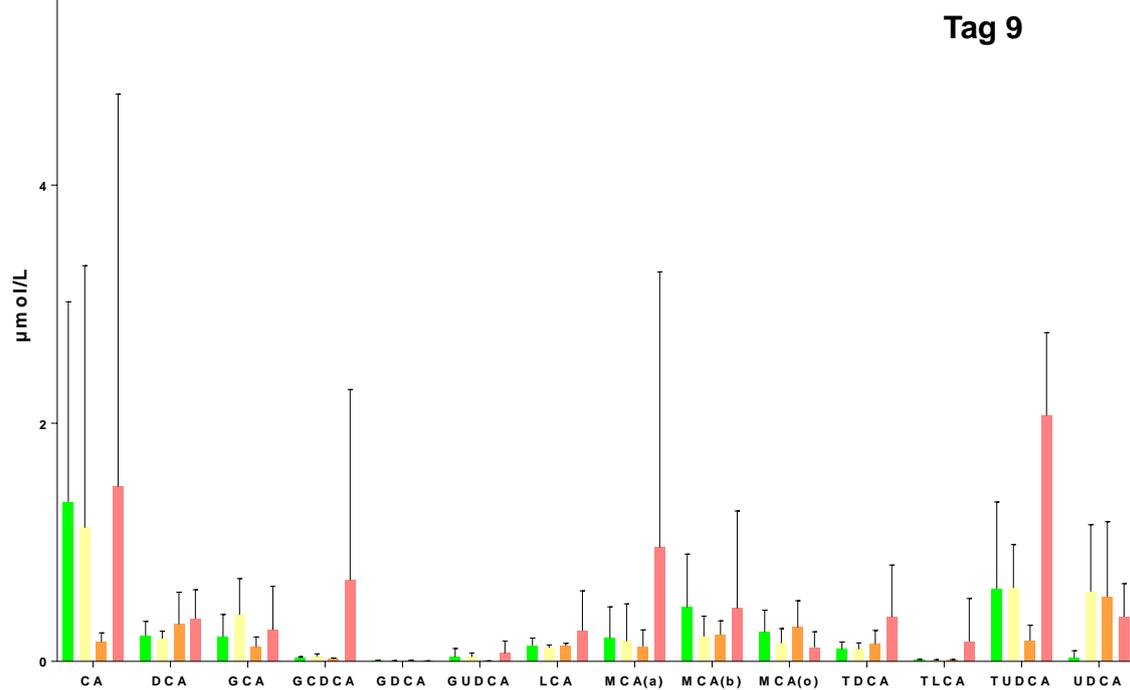
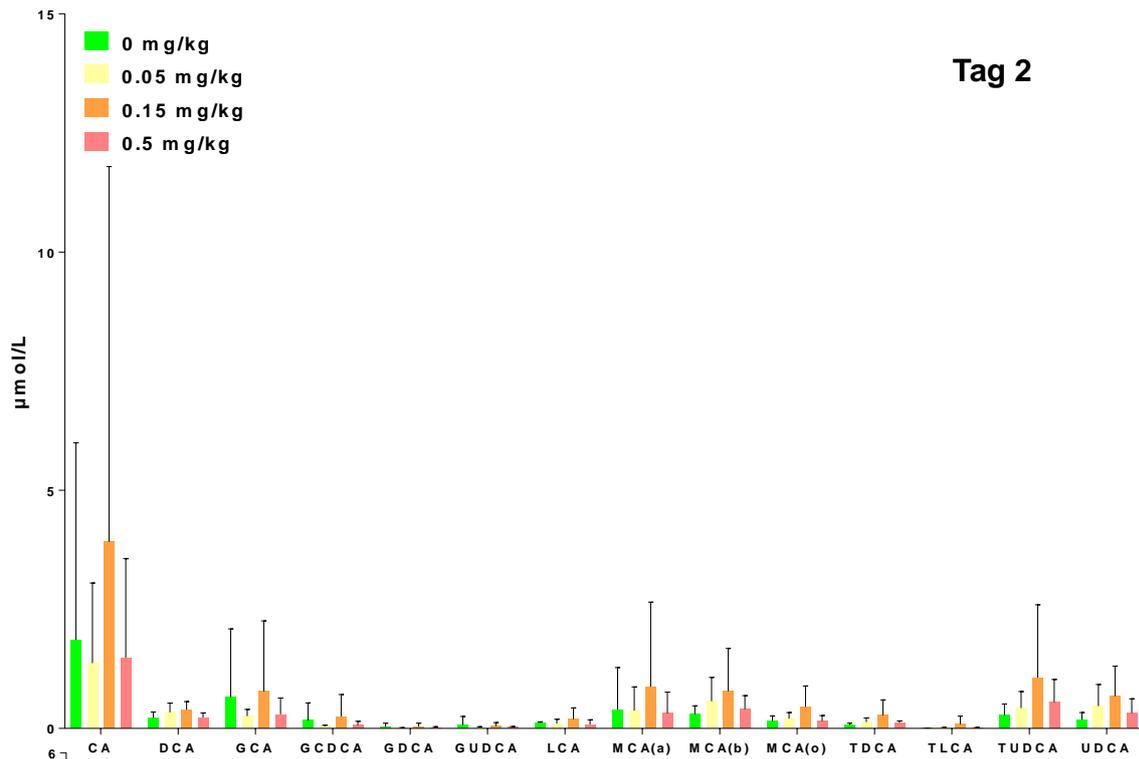
9.7.3 Gallensäuren im Plasma



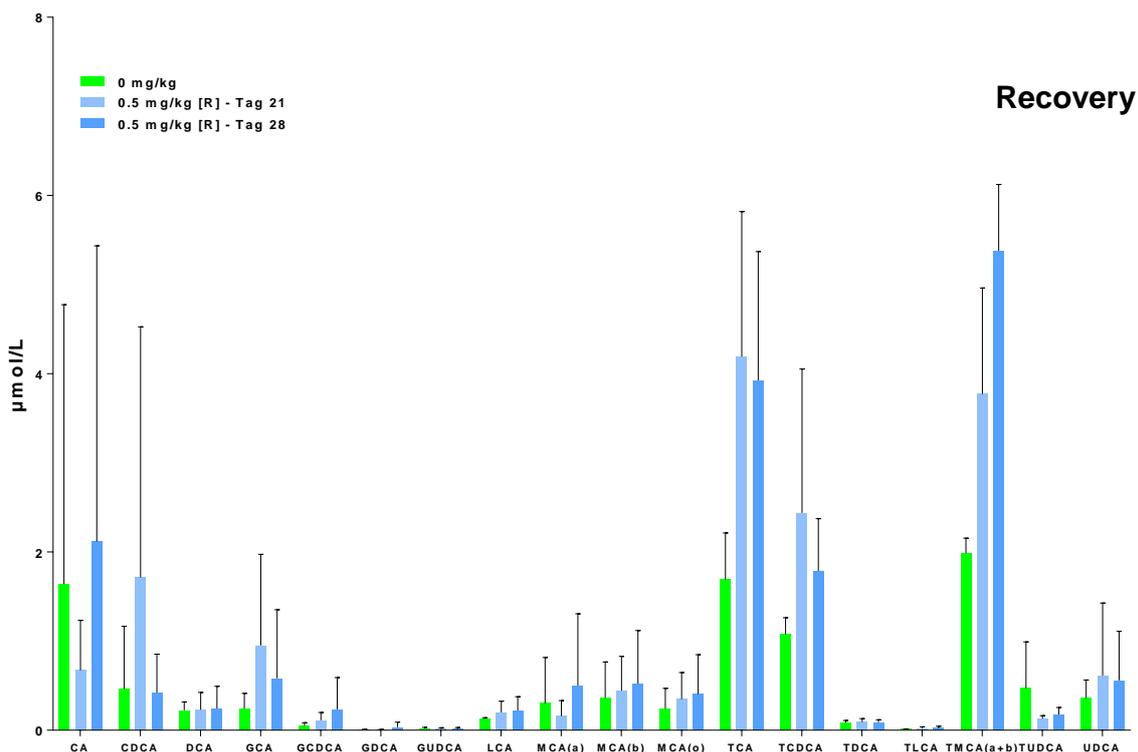
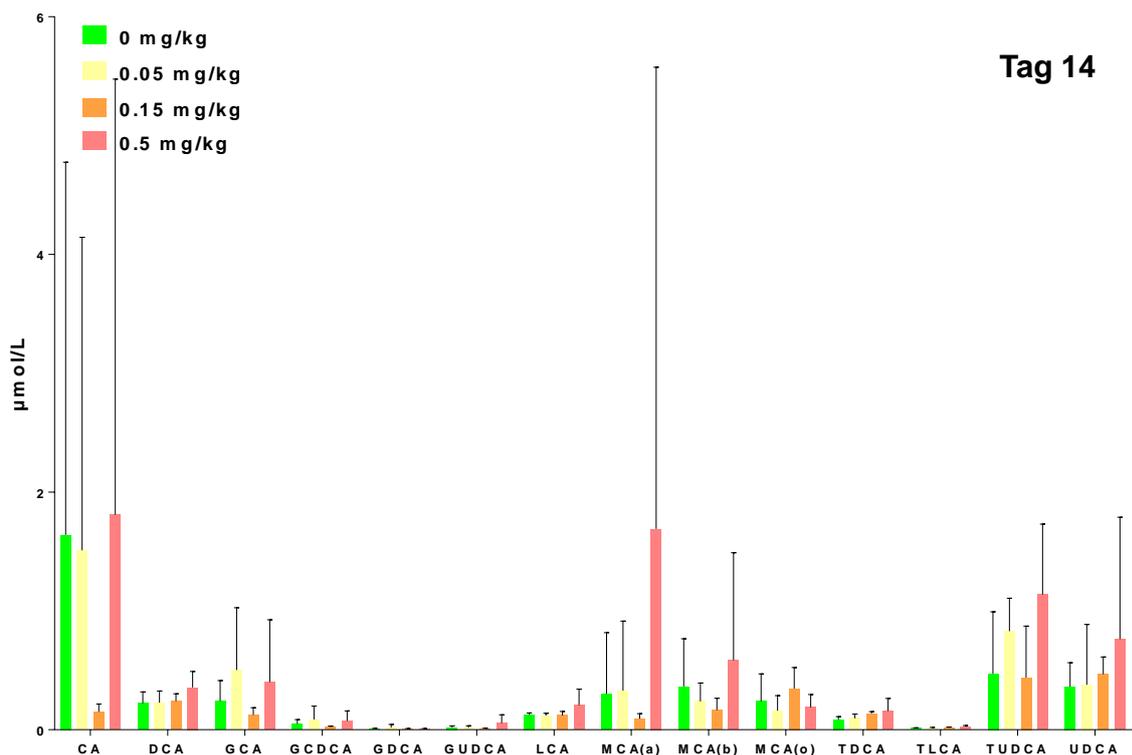
Anhang-Abbildung A20 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei männlichen Ratten für Studientag 2, 9 nach Behandlung mit Methotrexat. Dargestellt ist das arithmetische Mittel ($n=6$ pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$. Im Dt. Genitiv-Bildung ohne Apostroph (auch bei engl. Namen)!



Anhang-Abbildung A21 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei männlichen Ratten für Studientag 14 nach Behandlung mit Methotrexat und Recovery. Dargestellt ist das arithmetische Mittel ($n=6$ pro Behandlungsgruppe, $n=3$ Recovery) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.



Anhang-Abbildung A22 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei weiblichen Ratten für Studientag 2, 9 nach Behandlung mit Methotrexat. Dargestellt ist das arithmetische Mittel ($n=6$ pro Gruppe) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.



Anhang-Abbildung A23 Abbildung-Anhang 3 Plasmakonzentrationen von Gallensäuren bei weiblichen Ratten für Studientag 14 nach Behandlung mit Methotrexat und Recovery. Dargestellt ist das arithmetische Mittel ($n=6$ pro Behandlungsgruppe, $n=3$ Recovery) mit Standardabweichung (Mittelwert \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels Dunnett's Test auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: * $p < 0.05$.

Mechanistische Untersuchung des veränderten Gallensäureprofils durch Transkriptionsanalysen im Lebergewebe

Anhang-Tabelle A16 Genexpressions-Profil männlicher (A) und weiblicher (B) Ratten.

A	Dosis in mg/kg				B	Dosis in mg/kg			
	0.05	0.15	0.5	0.5 [R]		0.05	0.15	0.5	0.5 [R]
Cyp7a1	0.87	0.51	0.42	1.11	Acot8	0.77	0.82	0.74	1.07
Cyp8b1	1.01	1.02	1.88	1.23	Acox2	1.50	1.17	1.29	1.18
BCRP	0.85	0.89	0.73	0.83	Amacr	0.99	0.89	0.70	0.87
MDR2/3	1.04	1.26	1.19	1.15	Cyp7a1	1.58	1.35	1.81	2.07
PMP70	0.92	0.86	0.71	1.09	Cyp27a1	0.90	0.78	0.80	0.84
SHP	1.04	0.80	0.33	0.84	Cyp7b1	1.17	1.23	1.75	1.36
					Cyp8b1	1.29	1.11	1.59	1.02
					MDR1a	0.70	0.91	0.63	0.89
					MDR2/3	1.20	1.11	1.31	1.27
					MRP2	0.92	0.85	0.63	0.81
					OATP2	1.41	1.09	1.60	1.15
					CAR	1.11	1.03	1.29	1.29
					LXR	0.76	0.76	0.64	0.71
					PPARa	1.07	1.12	2.10	1.12
					PPARg	1.39	1.10	1.70	2.82
					SHP	0.71	0.53	0.76	0.66

9.8 Daten *In vitro* Profiling von Gallensäuren

9.8.1 Translationale Studie Methapyridin

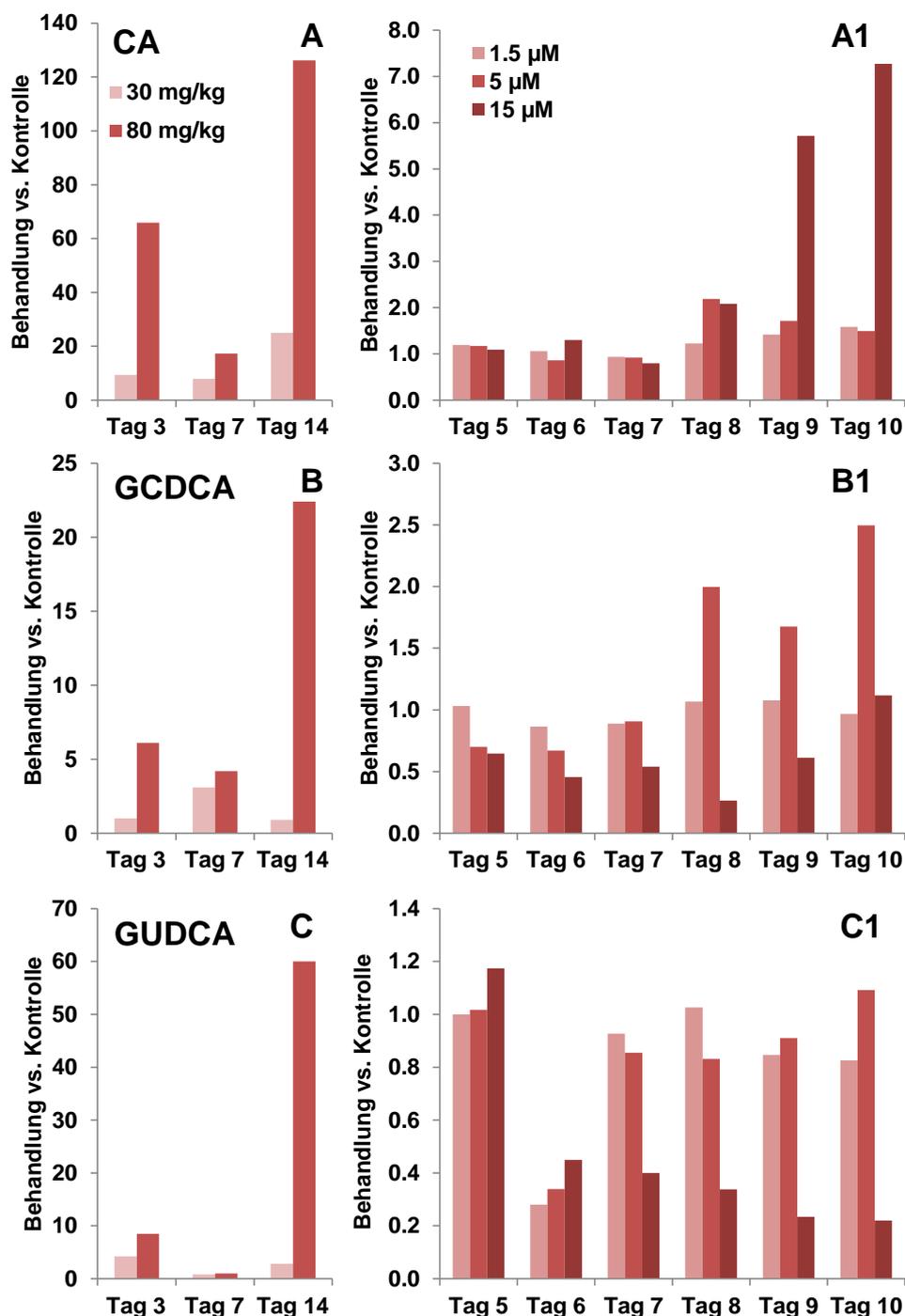


Abbildung-Anhang 4 Als Balkendiagramm vergleichend dargestellt sind unterschiedliche relative Mengen (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) von Konzentrationsanstiegen von Gallensäuren im Plasma und Zellkulturmedium. > 1 Anstieg der Konzentration im Vergleich zur Kontrolle, < 1 Absenkung der Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. (A) CA im Plasma (A1) CA im Zellkulturmedium (B) GCDCA im Plasma (B1) GCDCA im Zellkulturmedium (C) GUDCA im Plasma (C1) GUDCA im Zellkulturmedium.

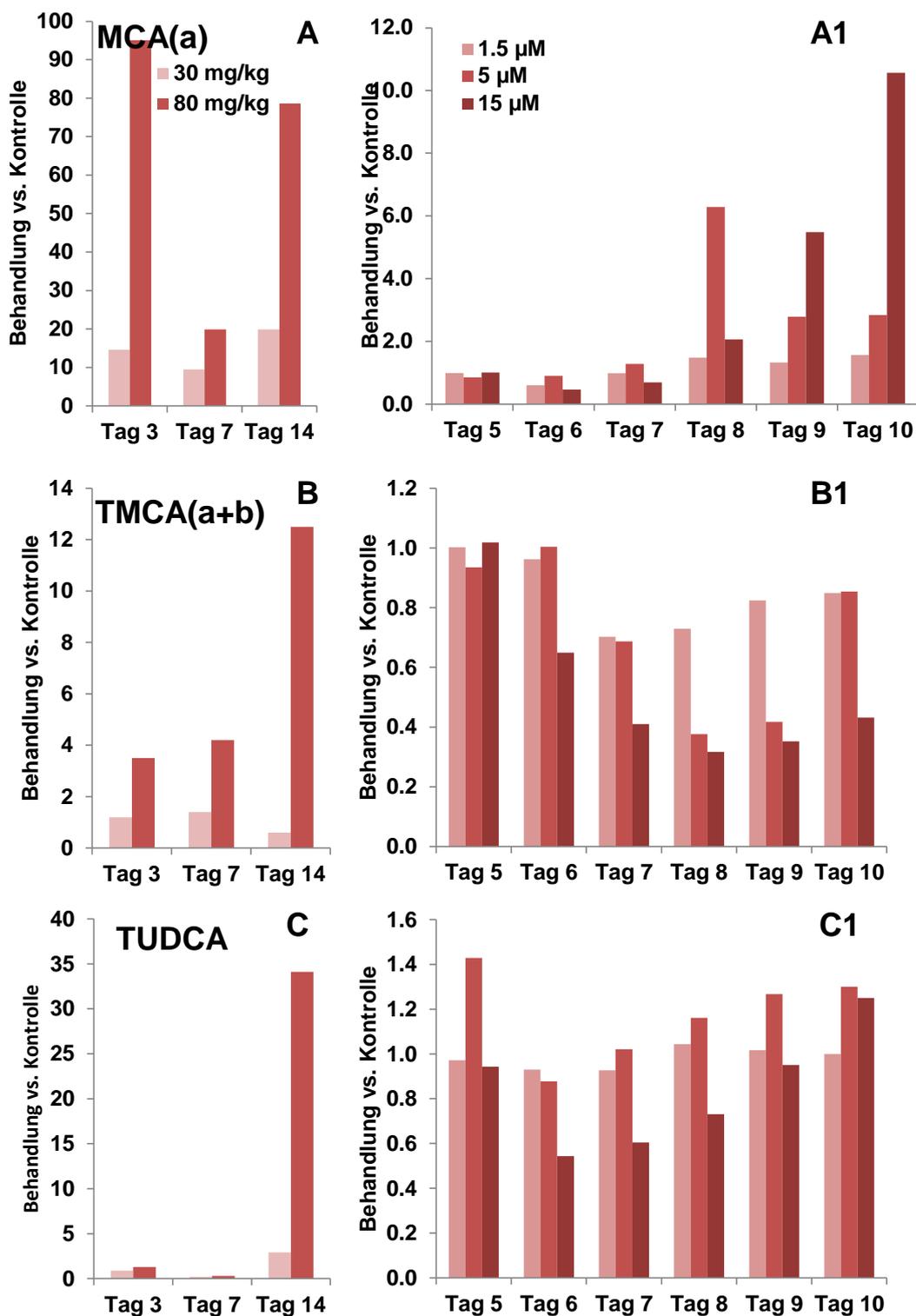


Abbildung-Anhang 5 Als Balkendiagramm vergleichend dargestellt sind unterschiedliche relative Mengen (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) von Konzentrationsanstiegen von Gallensäuren im Plasma und Zellkulturmedium. > 1 Anstieg der Konzentration im Vergleich zur Kontrolle, < 1 Absenkung der Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. (A) MCA(a) im Plasma (A1) MCA(a) im Zellkulturmedium (B) TMCA(a+b) im Plasma (B1) TMCA(a+b) im Zellkulturmedium (C) TUDCA im Plasma (C1) TUDCA im Zellkulturmedium.