

Aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Prof. Dr. med. Regine Kahl

**Klastogene und zytotoxische Wirkung von
Paracetamol in primären Hepatozytenkulturen:
Einfluß von Antioxidantien.**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Virginia Lewerenz

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referentin: Univ.-Prof. Dr. Kahl

Koreferent: Prof. Dr. Abel

Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. Regine Kahl sehr herzlich für die Bereitstellung des Themas und Arbeitsplatzes, sowie für die freundliche Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft danken.

Weiterhin danke ich den Angehörigen des Institutes für Toxikologie, insbesondere Frau Dr. Sabine Hanelt, Frau Claudia El-Bahay und Frau Ingrid Köhler für die Betreuung in theoretischer und praktischer Hinsicht.

Auch meiner Familie möchte ich herzlich danken. Besonders meine Eltern haben mir während des Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit in vielerlei Hinsicht umfangreiche Unterstützung zukommen lassen.

Nicht zuletzt danke ich Herrn Rolf Bardeli, der mich stets liebevoll ertragen hat und mir in meinem Kampf gegen Computer und Formulierungen hilfreich zur Seite stand.

Zu guter Letzt danke ich all meinen Freunden und Vaganten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Paracetamol	1
1.1.1. Paracetamolintoxikation	3
1.2. N-Acetylcystein (NAC)	11
1.3. Silibin	12
1.4. α -Tocopherol	13
1.5. Aufgabenstellung	14
2. Material	15
2.1. Versuchstiere	15
2.2. Chemikalien und biologische Komponenten	15
2.3. Geräte	16
3. Methoden	17
3.1. Hepatozytenpräparation	17
3.2. Hepatozytenkultur	19
3.2.1. Schädigung der Hepatozyten mit Paracetamol	20
3.2.2. Behandlung der Hepatozyten mit Paracetamol und N-Acetylcystein (NAC)	21
3.2.3. Behandlung der Hepatozyten mit Paracetamol und Silibin	21
3.2.4. Behandlung der Zellen mit Paracetamol und Vitamin E	22
3.2.5. Behandlung der Zellen mit N-Acetylcystein	22
3.3. Methoden zur Bestimmung der Viabilität der Zellen	23
3.3.1. Colorimetrischer MTT-Test	23
3.3.2. Neutralrottest	24
3.4. Comet Assay	25
3.4.1. Herstellung der Objektträger	25
3.4.2. Auftragen der Zellen	25
3.4.3. Alkalidenaturierung, Elektrophorese und Neutralisation	26
3.4.4. Färbung und Auswertung	27
3.5. Statistische Auswertung	28

4. Ergebnisse	29
4.1. Paracetamol und 10 μ M N-Acetylcystein	29
4.2. Paracetamol und 100 μ M N-Acetylcystein	37
4.3. Paracetamol und 25 μ M Silibin	46
4.4. Paracetamol und 50 μ M α -Tocopherol	55
4.5. Austestung der Zytotoxizität von N-Acetylcystein	63
5. Diskussion	64
5.1. Zellviabilität	66
5.2. DNS-Strangbrüche	69
5.3. Gesamtdiskussion	69
6. Zusammenfassung	74
7. Literaturverzeichnis	75
8. Anhänge	92
8.1. Abkürzungsverzeichnis	92
8.2. Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien	93
8.3. Rohwerte	96

1. Einleitung

1.1. Paracetamol

Paracetamol (Acetaminophen, APAP, 1-Acetylamino-4-hydroxybenzol) wurde 1893 von J. von Mehring erstbeschrieben. Es ist ein nichtsaures Analgetikum mit geringen antipyretischen Eigenschaften, das z. B. als ben-u-ron[®], Enelfa[®], Mono-Praecimed[®], Togonal[®], Treupel[®], sowie in verschiedenen Kombinationspräparaten weite Anwendung findet. Innerhalb der therapeutischen Dosis von 0,5-4 g pro Tag (orale Einnahme) mit einer maximalen Einzeldosis von 1 g für Erwachsene, für Kinder unter einem Jahr bis 0,12 g, unter 6 Jahren 0,25 g und unter 13 Jahren 0,25-0,5 g pro Tag zeichnet sich Paracetamol durch eine relativ geringe Rate an Nebenwirkungen (die vor allem aus Überempfindlichkeitsreaktionen bestehen) aus.

Der Wirkmechanismus von Paracetamol ist bis heute nicht genau geklärt. Es hemmt die Prostaglandinsynthese (Flower und Vane, 1972; Mattammal *et al.*, 1979; Malmberg und Yaksh, 1992) nur in geringem Maße, zeigt im Tierversuch aber auch eine supraspinale analgetische Wirkung, die vermutlich auf einer Beeinflussung von Serotonin-5HT_{2A}-Rezeptoren beruht (Srikiatkhachorn *et al.*, 1999). Weiterhin wird ein NMDA-Rezeptor-Antagonismus und eine Interaktion von Paracetamol mit der Wirkung von lokal gebildetem Stickstoffmonoxid am Neuron angenommen. Schon seit längerem wurde angenommen, daß es eine weitere, Paracetamol-sensible Zyklooxygenase, die vor allem im ZNS vorkommt und in erster Linie für Schmerzwahrnehmung und Temperaturerhöhung verantwortlich ist, gäbe (Botting, 2000). Im Jahre 2002 beschrieben Chandrasekharan *et al.* eine Zyklooxygenase-Isoform (Cox-3), die besonders im Gehirn nachgewiesen werden kann und unter anderem durch Paracetamol gehemmt wird. Diese Hemmung erfolgt aber erst durch hohe Dosen Paracetamol, so daß dessen Wirkung nicht allein auf eine Cox-3-Inhibierung, sondern möglicherweise auf die Hemmung einer weiteren, bisher noch nicht beschriebenen Zyklooxygenase-Isoform zurückgeführt werden kann (Schwab *et al.*, 2003).

Nach oraler Einnahme wird Paracetamol rasch aufgenommen und die maximale Plasmakonzentration nach ½ bis 1 Stunde erreicht. Die Bioverfügbarkeit beträgt hier 70-90 %, bei Suppositorien 30-40 %. 15-25 % des aufgenommenen Paracetamols liegen in an Plasmaproteine gebundener Form vor. Paracetamol passiert sowohl die Blut-Hirn- als auch die Liquorschranke und geht in die Muttermilch über; daher ist während Schwangerschaft und

Stillzeit auf eine strenge Indikationsstellung zu achten, wobei bisher kein Zusammenhang mit Fehlbildungen bzw. kein negativer Einfluß auf die Gesundheit oder Entwicklung des Säuglings beobachtet worden ist.

Der Abbau von Paracetamol erfolgt in der Leber. In therapeutischer Dosis eingenommen, wird Paracetamol zum größten Teil (>90 %) durch Glucuronidierung bzw. Sulfatierung an der Hydroxygruppe wasserlöslich und damit renal eliminierbar gemacht. Ein geringer Teil wird unverändert ausgeschieden (ca. 4 %). Ungefähr 2 % des Paracetamols werden durch Cytochrom P450-abhängige Oxygenasen zu N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI), einem reaktiven Elektrophil, umgewandelt. Hierbei sind beim Menschen die mikrosomalen Isoenzyme CYP1A2, CYP2E1 und CYP3A2 von Bedeutung (Raucy *et al.*, 1989; Thummel *et al.*, 1993). NAPQI wird durch Konjugation mit Glutathion (GSH) aus den körpereigenen Speichern detoxifiziert und letztendlich als Mercaptursäure ausgeschieden. Die terminale Halbwertszeit beträgt hierfür 2-3 Stunden (bei Neugeborenen 5 Stunden).

Da sowohl der Abbau durch Sulfatierung als auch der durch Glucuronidierung einer Sättigungskinetik unterliegt, wird bei einer Überdosierung nach Auslastung dieser Systeme vermehrt NAPQI gebildet.

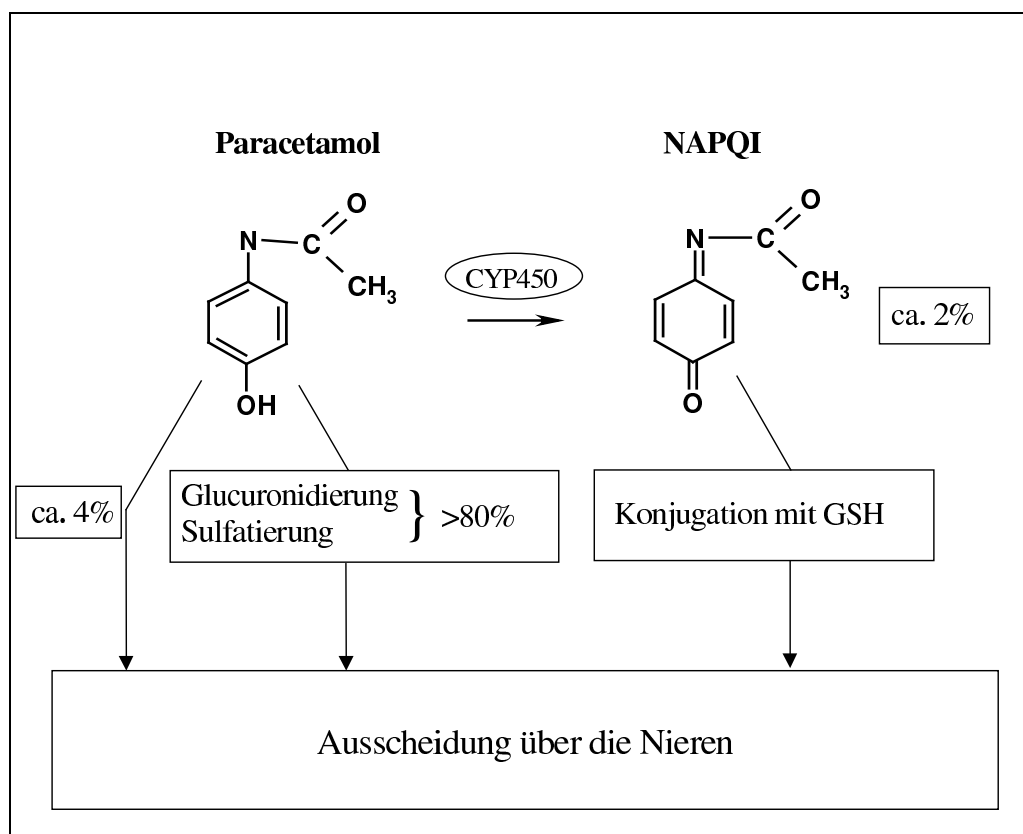


Abb. 1-1: Abbau von Paracetamol in der Leber

1.1.1. Paracetamolintoxikation

Beim Erwachsenen gilt eine Paracetamol-Einzeldosis von über 7,5 g als nicht mehr unbedenklich. Bei einer Dosis von über 20 g muß mit letalem Ausgang gerechnet werden. Ein schwerer Leberschaden ist ab einem Blutspiegel von >150 mg/l nach 4 Stunden, bzw. >50 mg/l 12 Stunden nach Einnahme des Paracetamols wahrscheinlich. Die Wahrscheinlichkeit von Komplikationen bei Paracetamol-Überdosierung läßt sich anhand des Blutspiegels und der seit der Einnahme vergangenen Zeit aus dem Rumack-Matthew-Nomogramm entnehmen (Rumack und Matthew, 1975).

Die Symptomatik der Paracetamolvergiftung nimmt einen charakteristischen mehrphasigen Verlauf:

2-14 Stunden nach Ingestion stellen sich unspezifische Beschwerden wie Übelkeit und Erbrechen (besonders bei Kindern auch nach nur leichter Überdosierung), Appetitlosigkeit, Oberbauchschmerzen, Schwitzen, Blässe, allgemeines Unwohlsein und Lethargie ein. Diese können bis zu 24 Stunden nach Einnahme der Überdosis bestehen bleiben, können allerdings auch gänzlich fehlen. Selten kommt es bereits zu dieser Zeit zu einer metabolischen Azidose mit komatösem Zustand.

Danach stellt sich ein bis zu 24stündiges Intervall des subjektiven Wohlbefindens ein, wobei laborchemisch bereits ein Transaminasenanstieg (die SGOT wird häufig als erstes Zeichen einer Leberschädigung erhöht aufgefunden) und eine Verlängerung der Gerinnungszeit (Anstieg der Prothrombinzeit) nachgewiesen werden kann.

3-5 Tage nach Ingestion zeigt sich dann das Ausmaß der Leberschädigung mit Oberbauchbeschwerden, Ikterus, Gerinnungsstörungen bis hin zur Verbrauchskoagulopathie mit Thrombozytenabfall, Bilirubin- und Transaminasenerhöhung, möglicherweise mit Zeichen einer mehr oder weniger schweren hepatischen Encephalopathie. Histologisch zeigt sich eine zentrilobuläre Lebernekrose (Mitchell *et al.*, 1973; Walker *et al.*, 1974). Bei Einnahme hoher Dosen Paracetamol findet ein fulminanter Leberzerfall statt; dieser kann mit Krämpfen, Atemdepression und hepatischem Koma zum Tode des Patienten führen. Weiterhin kann es zur metabolischen Azidose, Hypoglykämie und Elektrolytentgleisungen (Hypokaliämie, Hypophosphatämie) kommen. Eine mögliche begleitende Nierenschädigung kann sich bereits nach 24-72 Stunden nach Einnahme durch eine Oligurie ankündigen, die dann ins akute Nierenversagen mit Anurie und Dialysepflichtigkeit übergehen kann.

Kreatinin und Harnstoff sind im Serum erhöht (der Harnstoff kann aber auch bei mangelnder hepatischer Bildung im Rahmen eines hepatorenenalen Syndroms erniedrigt sein), es kann zu Proteinurie und Phosphaturie kommen. Das pathologisch-anatomische Korrelat des Nierenschadens besteht in einer Tubulusnekrose und hydropischer Vakulisierung der Zellen. Diese kann auch ohne gleichzeitig ablaufendes fulminantes Leberversagen stattfinden (Cobden *et al.*, 1982). Im EKG kann es durch myo- und subendokardiale Nekrosen zu infarktähnlichen Veränderungen besonders im Endstreckenbereich (T-Negativierung, U-Welle) kommen. Herzrhythmusstörungen bis zum Kammerflimmern, Schock und Kreislaufstillstand treten gegebenenfalls auf. Besonders Kinder leiden zusätzlich an einer zentralen Hypothermie und Blutdruckabfall.

Ab dem 5. Tag setzt in der Regel (falls es nicht zum Leberzerfall gekommen ist) eine Erholung bis zur *restitutio ad integrum* ein.

Therapeutisch kommen bei Vergiftungsfällen neben Gabe von N-Acetylcystein (siehe 1.2.) die Induktion von Erbrechen, Magenspülung, Flüssigkeitsgabe und Aktivkohle, bei Nierenversagen oder nach Einnahme einer letalen Dosis zur Giftelimination die Hämodialyse, Hämoperfusion (innerhalb der ersten 3 Stunden; vor Einsetzen der Hepatotoxizität) und als *ultima ratio* die Lebertransplantation in Frage (O'Grady *et al.*, 1991).

Der Pathomechanismus des Zellschadens durch Paracetamol ist bis heute nicht eindeutig identifiziert; es wird angenommen, daß das schädigende Agens das nur bei Überdosierung in größerem Ausmaß gebildete NAPQI (Dahlin *et al.*, 1984; Holme *et al.*, 1984) ist.

NAPQI reagiert auf verschiedene Arten mit den einzelnen Zellkomponenten. Welche der Reaktionen letztendlich die hauptverantwortlichen für die Toxizität des Paracetamols sind, ist noch nicht genau geklärt.

1. kann es durch Durchlaufen eines Redoxzyklus mit Bildung eines Semichinons (NAPQI[•]) zu oxidativem Streß kommen (Younes *et al.*, 1986).

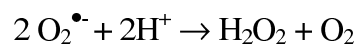
Oxidativer Streß ist definiert durch eine Imbalance zwischen der Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) und dem Schutz vor ihnen (Sies, 1986).

Unter den ROS gibt es zum einen die Radikale, wie z.B. das Superoxid- ($O_2^{\bullet-}$) oder das Hydroxylradikal (OH^{\bullet}), zum anderen nicht-radikalische, aber dennoch hochreaktive

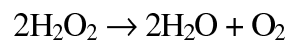
Verbindungen, wie das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder die organischen Hydroperoxide (ROOH) (Cadenas *et al.*, 1981).

ROS entstehen nicht nur beim Fremdstoffabbau durch Cytochrom P450-abhängige Oxygenasen, sondern können unter anderem auch während der Zellatmung und von Immunzellen gebildet werden.

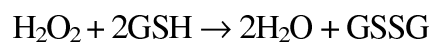
Zum Schutz vor den ROS hat jede Zelle nicht-enzymatische und enzymatische Mechanismen, die die Reaktionsfähigkeit der ROS herabsetzen. Zu den nicht-enzymatischen zählen z.B. das Glutathion oder die antioxidativ wirksamen Vitamine Ascorbinsäure und α -Tocopherol. Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Enzymen, die ebenfalls dem Schutz der Zelle vor ROS dienen: Das Superoxidradikal kann von Superoxiddismutasen (SOD), von denen eine Mangan-haltige mitochondriale und eine Kupfer- und Zink-haltige zytoplasmatische Form existiert, durch die Reaktion



in H_2O_2 überführt werden, das in Peroxisomen durch die Katalase



und im Zytosol durch die Glutathionperoxidasen



in Wasser umgewandelt wird.

Das bei der letzten Reaktion entstehende GSSG wird durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase wieder zu GSH reduziert.

Radikale und reaktive Elektrophile können aber auch direkt mit GSH reagieren (teilweise von Glutathion-S-Transferasen im Zytosol katalysiert):



Die Überdosierung von Paracetamol mit nachfolgender Bildung von NAPQI und NAPQI^{\bullet} führt ebenfalls zu oxidativem Streß. Dies kann zum einen durch das Semichinon selbst und zum anderen durch ROS, die durch dessen Reaktion mit Sauerstoff gebildet werden,

geschehen. Keller und Hinson postulierten 1991 die Bildung des Superoxidradikals durch Reaktion von NAPQI^\bullet über NADPH mit Sauerstoff. Dieses kann durch Stickstoffmonoxid unter Bildung von Peroxinitrit abgefangen werden. Peroxinitrit seinerseits führt durch Protein-Nitrierung zum Zellschaden (Jaeschke *et al.*, 2002). Andererseits kann nach SOD-katalysiertem Abbau des Superoxids zu H_2O_2 anschließend in Anwesenheit von Metallionen eine Fenton-Reaktion mit Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals (OH^\bullet) ablaufen (Goeptar *et al.*, 1995). Das Hydroxylradikal ist nun seinerseits in der Lage, Lipide zu oxidieren (Bast *et al.*, 1986) und so die Membranfunktion zu beeinträchtigen. Die Lipidperoxidation (LPO) wurde früher als wichtigster Mechanismus der Hepatotoxizität von Paracetamol angesehen (Wendel *et al.*, 1982; Thelen und Wendel 1983). Allerdings läßt sich die LPO in Zellkulturen nicht nachweisen (Albano *et al.*, 1983; van de Straat *et al.*, 1987; Donatus *et al.*, 1990, Harman *et al.*, 1992). Das nicht-metabolisierte Paracetamol scheint in der Rattenzellkultur einen antioxidativen Effekt zu haben und maskiert die LPO (Albano *et al.*, 1983; Garrido *et al.*, 1991). Gegen eine alleinige Rolle der LPO bei der zellulären Schädigung durch Paracetamol spricht auch die Beobachtung, daß es zwar möglich war, mit dem Antioxidans Curcumin die LPO zu vermindern, nicht aber die GSH-Depletion und das LDH-Leck, die die Zellen nach Paracetamolüberdosierung zeigten (Donatus *et al.*, 1990). Nichtsdestotrotz scheint das Auftreten von oxidativem Streß in einer frühen Phase der Paracetamolintoxikation eine Rolle im Hinblick auf die Entstehung des Leberzellschadens zu spielen: Der Abbau von ROS geht einher mit der Bildung von GSSG aus GSH (Jones *et al.*, 1981). So kann die GSSG-Erhöhung in der Leberzelle als ein Zeichen für oxidativen Streß angesehen werden (Sies und Cadenas, 1985). Diese GSSG-Erhöhung ist bereits in einer frühen Phase der Intoxikation *in vitro* nachweisbar (vor Verlust der Membranstabilität) (Adamson und Harman, 1993). Des weiteren wird das Ausmaß der Zellschädigung sowohl durch eine vorangehende GSH-Depletion (Farber *et al.*, 1988) als auch durch Hemmung der GSH-Peroxidase ($\text{NAPQI}^\bullet \rightarrow \text{NAPQI}$) oder der GSH Reduktase ($\text{GSSG} \rightarrow \text{GSH}$) verstärkt (Farber *et al.*, 1988; Nakae *et al.*, 1988; Adamson und Harman, 1989). Dennoch wurde *in vivo* der GSSG-Efflux in die Galle auch nach Hemmung der GSH-Reduktase nicht nachgewiesen (Smith und Mitchell, 1985). Diese Diskrepanzen zwischen *in vitro* und *in vivo* durchgeführten Versuchen könnten durch Nahrungsentzug der Versuchstiere vor der Zellpräparation mit ATP-Verminderung, CYP2E1-Induktion und erhöhter Produktion von ROS erklärt werden (Johansson *et al.*, 1988).

Ein weiteres Argument für die Beteiligung oxidativer Vorgänge an der Toxizität des Paracetamols ist, daß verschiedene Antioxidantien (unter anderem α -Tocopherol) die

schädlichen Auswirkungen einer Paracetamolintoxikation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vermindern können (Walker *et al.*, 1974; Kelleher *et al.*, 1976; Fairhurst *et al.*, 1982; Harman 1985; Amimoto *et al.*, 1994).

Insgesamt bleibt noch immer zu klären, ob die LPO tatsächlich ein kausales Ereignis oder nur die Folge der Lebernekrose nach Überdosierung von Paracetamol darstellt (Vermeulen *et al.*, 1992).

2.: Neben der „klassischen“ Schädigung von Membranlipiden durch radikalischen Angriff kann es zur kovalenten Bindung von NAPQI an Lipide kommen (Wendel und Hallbach, 1986). Diese findet nicht radikalisch, sondern als elektrophile Substitution an nucleophile Stellen des Lipids statt (Smith *et al.*, 1984) und wird im allgemeinen nicht als kausales Ereignis für die Zellschädigung angesehen (Bessems und Vermeulen, 2001).

3. kann NAPQI Thiole oxidieren. Dies geschieht sowohl mit GSH (\rightarrow GSSG) als auch mit S-H -Gruppen von Proteinen. Auf diese Weise können Disulfidbrücken, Crosslinks zwischen den Proteinen und zwischen GSH und Proteinen entstehen (Albano *et al.*, 1985; Vermeulen *et al.*, 1992; Hinson *et al.*, 1995; Holtzman, 1995). Obwohl spezifische Proteine durch NAPQI oxidiert oder glutathioniliert werden können (Birge *et al.*, 1991), scheint dies keine größere Rolle für die Zytotoxizität von Paracetamol zu spielen (Gibson *et al.*, 1996).

4.: NAPQI kann aber auch als Elektrophil kovalente Bindungen an Proteine eingehen (Hoffmann *et al.* 1985a; Hoffmann *et al.*, 1985b). Zum Beispiel kann es auf diese Weise durch Bindung an die Ribonucleotidreductase die DNS-Replikation vermindern (Honglo *et al.*, 1990).

Paracetamol bindet sowohl an mikrosomale (Weis *et al.*, 1992b; Holtzman, 1995) als auch an mitochondriale (Halmes *et al.*, 1996), zytosolische (Bartolone *et al.*, 1989; Pumford *et al.*, 1992; Hoivic *et al.*, 1996) oder nukleäre (Honglo *et al.*, 1994; Brunborg *et al.*, 1995) Proteine. Einige dieser Proteine haben mit dem Calcium (Ca^{2+})-Haushalt zu tun (Shen *et al.*, 1991). Bei der Reaktion handelt es sich um eine Arylierung (Hoffmann *et al.*, 1985a), die nicht nur an Cysteingruppen stattfindet (Matthews *et al.*, 1996). Das Ausmaß der Proteinarylierung verläuft dabei parallel zum Leberschaden (gemessen am Enzymanstieg)

(Pumford *et al.*, 1990) bzw. zum Ausmaß der Nekrose (Mitchell *et al.*, 1984). Auch wurde ein Zusammenhang zwischen durch Paracetamol ausgelöster Zentrilobulärnekrose und Menge an arylierten Proteinen in diesem Bereich gefunden (Hinson *et al.*, 1996). Im Zuge der Nekrose traten diese arylierten Proteine dann aus der Zelle aus. Auch bei Menschen mit Paracetamolintoxikation wurden arylierte Proteine im Serum gefunden (Hinson *et al.*, 1990)

5.: Ein weiterer zur Hepatotoxizität von Paracetamol beitragender Faktor ist die Störung der Ca^{2+} -Homöostase. Es wird nicht nur Ca^{2+} aus isolierten Mitochondrien freigesetzt (Albano *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1985; Weis *et al.*, 1992a; Weis *et al.*, 1992b), sondern auch der intrazelluläre Calciumspiegel erhöht. Im Zellinneren befindet sich wenig Ca^{2+} (<0,001 mmol/l), im Gegensatz zum Extrazellularraum (2,5 mmol/l). Dieser Unterschied wird durch Ca^{2+} -ATPasen in der Plasmamembran aufrechterhalten. NAPQI inhibiert diese ATPasen (Moore *et al.*, 1985); deren Thiolgruppen werden während der Reaktion oxidiert (Boobis *et al.*, 1989) und müssen unter GSH-Verbrauch wieder reduziert werden. NAPQI bewirkt eine GSH-Depletion, die Oxidation der Thiolgruppen von Proteinen und es bindet kovalent an Proteine (Moore *et al.*, 1985). Darüber hinaus werden durch NAPQI auch die Ca^{2+} -ATPasen der Mikrosomen gehemmt, die für eine Aufnahme des überschüssigen intrazellulären Calciums in die Mikrosomen und so für die Absenkung des intrazellulären Calciums sorgen. Auf diese Weise wird der Calciumspiegel innerhalb der Zelle zusätzlich erhöht (Moore *et al.*, 1985). Ein Zusammenhang zwischen Nekrose und Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle konnte *in vivo* und *in vitro* beobachtet werden (Landon *et al.*, 1986; Tee *et al.*, 1986). Calciumantagonisten (Verapamil, Nifedipin) verringern die Zytotoxizität von Paracetamol (Landon *et al.*, 1986). Allerdings gibt es auch Ergebnisse, die dafür sprechen, daß der intrazelluläre Calciumanstieg einen sekundären Effekt kurz vor Ausbildung der Nekrose darstellt (Grewal und Racz, 1993).

Inwiefern die Apoptose neben der Nekrose eine Rolle für die Paracetamoltoxizität spielt, wird noch diskutiert:

Durch die Ca^{2+} -Akkumulation im Zellkern kommt es sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zur Aktivierung von Endonukleasen mit konsekutiver DNS-Fragmentation. Dies geschieht vor Ausbildung der Nekrose und könnte somit eine Rolle für die zytotoxische Wirkung des Paracetamols spielen (Shen *et al.*, 1992). Neben der DNS-Fragmentation werden auch

Kernkondensation und Glykogenverlust beobachtet (Ray *et al.*, 1996). Auch beim Menschen wurde der Ablauf von Apoptose nachgewiesen: Die Apoptoserate in Leberpräparaten von Patienten mit fulminantem Leberversagen nach Paracetamolintoxikation betrug in den Untersuchungen von McGregor *et al.* (2003) 0,6 %. Wiger *et al.* beobachteten 1997 eine dosisabhängige Hemmung der Zellproliferation durch Paracetamol in HL-60-Zellen schon bei relativ niedrigen Dosen. Hohe Dosen führten zu Kernkondensation und DNS-Fragmentation, jedoch war in der Elektrophorese kein klares Apoptose-typisches Leiter-Bild zu erkennen. Als Erklärung für diese Beobachtungen vermuteten sie eine inkomplett abgelaufene Apoptose mit nachfolgender Nekrose (Wiger *et al.*, 1997). Für diese Erklärung spricht auch die Tatsache, daß Paracetamol nicht die Caspase-7 aktiviert (El-Hassan *et al.*, 2003). Bezüglich der Caspase-3-Aktivierung liegen in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse vor (Bae *et al.*, 2001; Boulares *et al.*, 2002; Gujral *et al.*, 2002; El-Hassan *et al.*, 2003); sowohl Bae *et al.* als auch Boulares *et al.* fanden eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität und Efflux von Cytochrom-c aus den Mitochondrien ins Zytosol in C6-Gliomzellen bzw. in SK-Hep1-Zellen, primären menschlichen Lymphozyten und Jurkat T-Zellen. Die Caspaseaktivierung und die Ausprägung der Apoptose waren durch Caspaseinhibitoren bzw. Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-XL zu vermindern. Im Gegensatz dazu war die Caspase-3-Aktivität in primären Mäusehepatozyten in den Versuchen von El-Hassan *et al.* und Gujral *et al.* nicht erhöht. Bae *et al.* verzeichneten darüber hinaus eine Zunahme des pro-apoptotisch wirkenden Bax-Proteins, Boulares *et al.* weiterhin eine Aktivierung der Caspasen 8 und 9 sowie Degradierung von DNS und Lamin B1. Gujral *et al.* fanden zwar eine Zunahme der apoptotischen Zellen nach morphologischen Kriterien, die nekrotischen Zellen stiegen jedoch entschieden stärker an.

Als Ursprung der apoptotischen Zellreaktion werden die Kupffer-Zellen angesehen (McGregor *et al.*, 2003). Diese scheinen jedoch auch über verschiedene Mechanismen (antiinflammatorische Zytokine, verstärkte Leberzellregeneration) Schutzwirkung gegen die Hepatotoxizität des Paracetamols zu haben (Ju *et al.*, 2002).

Neben verschiedenen anderen genotoxischen Effekten wie der Bildung von DNS-Addukten (Corbett *et al.*, 1989; Corbett *et al.*, 1992) durch NAPQI[•], kovalenter Bindung an die DNS (Honglo *et al.*, 1994), Schwesternchromatidaustausch und Chromosomenaberrationen (Honglo *et al.*, 1988; Honglo *et al.*, 1990; Honglo *et al.*, 1991; Giri *et al.*, 1992) und

Reduktion der DNS-Synthese-Rate (Topinka *et al.*, 1989) kann Paracetamol die Induktion von DNS-Einzelstrangbrüchen (SSBs) bewirken. Dies geschieht allerdings sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nur nach Gabe hepatotoxischer Dosen (Sasaki, 1986; Hongslo *et al.*, 1988; Hongslo *et al.*, 1994). Auch durch Paracetamolüberdosierung induzierte ROS können SSBs bewirken (Collins *et al.*, 1995). Als auslösendes Agens wird NAPQI angenommen (Dybing *et al.*, 1984). Die SSBs wurden *in vivo* zwar in der Leber, nicht aber in der Niere nachgewiesen (Hongslo *et al.*, 1994). Des weiteren erhöht die Präinkubation mit Paracetamol die SSB-Rate, die durch 4-Nitrochinolin-N-Oxid induziert wird (Hongslo *et al.*, 1994).

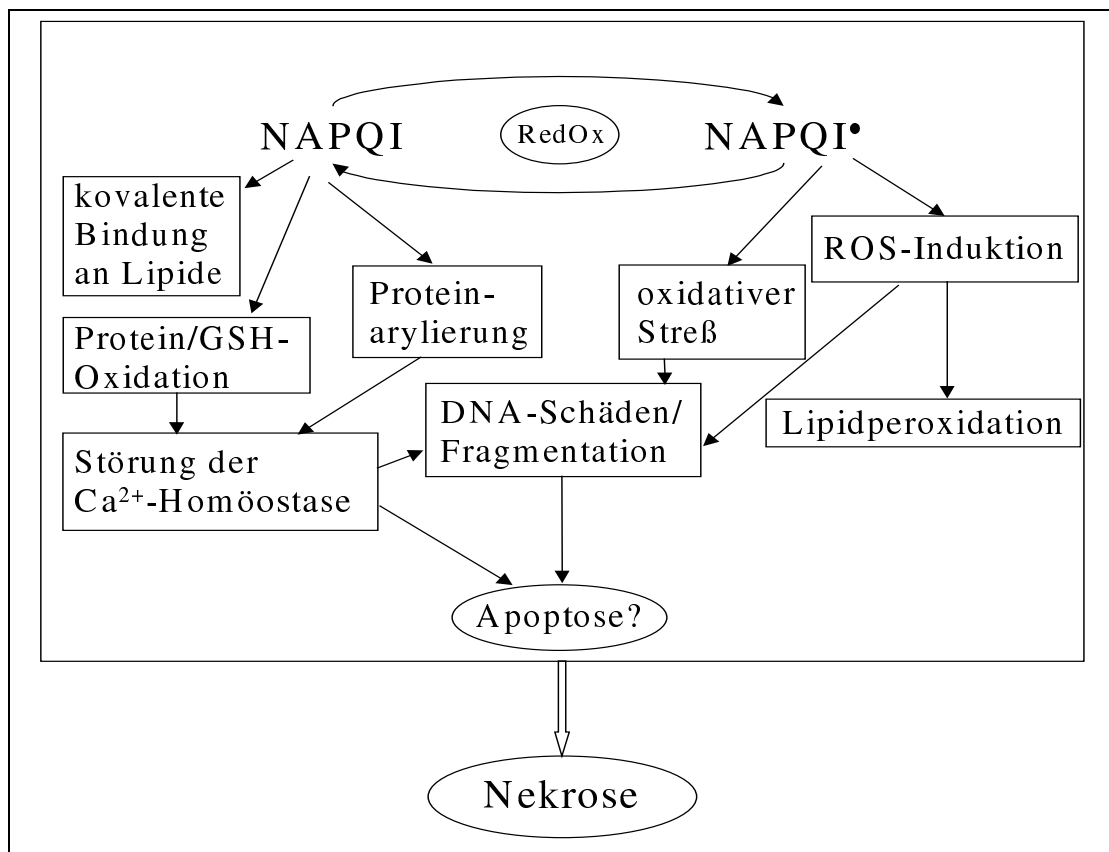


Abb. 1-2: Durch Paracetamol verursachte Zellschädigung

1.2. N-Acetylcystein (NAC)

N-Acetylcystein (NAC, Fluiimucil[®]), chemisch (R)-2-Acetamido-3-mercaptopropionsäure, ist das bei Paracetamolvergiftung klinisch eingesetzte Antidot (Mitchell *et al.*, 1973; Prescott, 1983; Corcoran *et al.*, 1985). Es fördert die Synthese von GSH (Miners *et al.*, 1984), das bei der Konjugation mit NAPQI und der Reduktion oxidierter Thiole verbraucht wird (Boobis *et al.*, 1989), hemmt die Lipidperoxidation (Fairhurst *et al.*, 1982), vermindert das Ausmaß der DNS-Fragmentation (Shen *et al.*, 1992) und stellt außerdem Sulfat für die Sulfatierung des Paracetamols bereit. Es kann *per os* mit einer Initialdosis von 140 mg/kg Körpergewicht (KG) und einer Erhaltungsdosis von 70 mg/kg KG alle 4 Stunden bis zu einer Gesamtdosis von 1200 mg/kg KG (Corcoran und Wong, 1986) gegeben werden. Kürzere Regimes von 24-36 Stunden werden heute allerdings bevorzugt (Kociancic und Reed, 2003). Alternativ steht eine (gleich effektive) intravenöse Therapie mit einer Initialdosis von 150 mg/kg KG in 200 ml 5 % Glucoselösung als Kurzinfusion über 15-30 Minuten, einer Erhaltungsdosis von 50 mg/kg KG in 500 ml 5 % Glucoselösung über 4 Stunden mit folgend 100 mg/kg KG in 1 l 5 % Glucoselösung über 16 Stunden bis zu einer Gesamtdosis von 300 mg/kg KG in 20 Stunden zur Verfügung.

N-Acetylcystein mildert den durch Paracetamolintoxikation hervorgerufenen Leberschaden (Boobis *et al.*, 1986); die kovalente Bindung an Proteine kann jedoch nur eine extrem hohe Dosis verhindern (Speeg *et al.*, 1985).

Die Nebenwirkungen einer Acetylcysteinbehandlung sind neben gastrointestinalen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Sodbrennen, Durchfällen hauptsächlich allergischer Art (unter anderem Urtikaria, Ekzeme, Bronchospasmus; Tachykardie und Blutdruckabfall sind möglich).

1.3. Silibin

Silibin (Silybin, Silibinin) ist Bestandteil des Silymarins, welches ein Gemisch aus Flavonolignanen darstellt. Man findet es in den Früchten der Mariendistel (*Silybum marianum*). Es handelt sich um 3,5,7-Trihydroxy-2-[3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxan-6-yl]-4-chromanon.

Es findet als Legalon[®] Anwendung als Antidot bei Intoxikation mit dem Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*). Weiterhin wird es als Lebertherapeutikum bei toxischem Leberschaden und in der adjuvanten Therapie bei entzündlichen Lebererkrankungen und Leberzirrhose eingesetzt (z.B. Silibene[®], Heliplant[®]) und in Kombinationspräparaten bei Hepatopathien, Stauungsleber oder Gallenproblemen (z.B. Bilisan[®], Cheirathol[®], Hepar-Pasc[®]).

Die übliche Dosis liegt bei 3 x 0,035-0,14 g/d oral, bei Knollenblätterpilzvergiftung als intravenöse Therapie 20 mg/kg KG/d in 4 zweistündigen Infusionen.

Während die kovalente Bindung von NAPQI an Proteine durch Silibin nicht beeinflusst wird (Miguez *et al.*, 1994), schützt das Silibin vor Paracetamol-induzierter Lipidperoxidation und dem Anstieg der Leberenzyme (Muriel *et al.*, 1992). Silibin wird als Antioxidans und als Radikalfänger angesehen. Im Gegensatz zu den Versuchen von Muriel *et al.* (1992), bei denen kein Schutz vor der GSH-Depletion gefunden wurde, konnte durch andere Arbeitsgruppen *in vivo* und *in vitro* ein solcher verzeichnet werden (Campos *et al.*, 1989; Chrungoo *et al.*, 1997). Shear *et al.* postulierten 1995, daß der zytoprotektive Effekt des Silibins auf einer Erhöhung des verfügbaren GSHs und einer zusätzlichen Mitochondrienmembran-stabilisierenden Wirkung beruhe. Es erhöhte die Aktivität der SOD und die der Glutathionperoxidase, beides Enzyme, die dem Schutz vor ROS dienen (Altorjay *et al.*, 1992). Darüber hinaus soll Silibin den Abbau von Paracetamol zu NAPQI hemmen und durch die Kumulation von unmetabolisiertem Paracetamol dessen antioxidative Wirkung verstärken (Garrido *et al.*, 1991). Dvorak *et al.* fanden 2003 bei primären humanen Hepatozyten einen nur gering ausgeprägten Schutz vor der Paracetamoltoxizität, dafür aber zytotoxische Effekte durch Silibin selbst.

1.4. α -Tocopherol

Tocopherol (Vitamin E) gehört zu den fettlöslichen Vitaminen. Es handelt sich dabei um eine Gruppe von 8 bisher bekannten Isoformen, die sich durch Zahl und Anordnung der Methylgruppen am Chromanring unterscheiden. Innerhalb dieser Isoformen ist das α -Tocopherol biologisch am bedeutsamsten. Es ist in vielen Nahrungsmitteln enthalten, besonders in Keimlingen (Weizenkeimöl), Gemüse und auch in Milchprodukten. Tocopherol wird schnell oxidiert und daher als Antioxidans (z.B. für Pflegeöle) verwendet. Vitamin E schützt die Zelle vor Schäden durch Oxidation der Thiolgruppen und der mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen.

Der tägliche Bedarf des Menschen an Vitamin E beträgt 10-25 mg.

α -Tocopherol schützt vor der Hepatotoxizität von Paracetamol *in vivo* (Walker *et al.*, 1974; Kelleher *et al.*, 1976; Amimoto *et al.*, 1994) und *in vitro* (Harman, 1985) und es vermindert die Paracetamol-induzierte Lipidperoxidation *in vitro* (Fairhurst *et al.*, 1982). Außerdem schützt es Zellen vor durch oxidativen Streß (H_2O_2) induzierten DNS-Schäden (Slameňová *et al.*, 1999) und senkt endogene oxidative DNS-Schäden (Duthie *et al.*, 1996).

1.5. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität und der DNS-Strangbrüche induzierenden Wirkung von Paracetamol zu untersuchen. Dazu sollte in primären Rattenhepatozyten

1. die Dosis-Wirkungskurve des zytotoxischen Effekts von Paracetamol mit der seines DNS-Strangbrüchen induzierenden Effekts verglichen werden. Damit sollten Hinweise auf einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen beiden Wirkungen gewonnen werden. Träten Strangbrüche erst bei zytotoxischen Dosierungen von Paracetamol auf, so wären sie eher als ein Epiphänomen des Zelltods zu deuten als als eine der Ursachen. Träten Strangbrüche aber schon im noch nicht zytotoxischen Dosisbereich auf oder zeigten sie die gleiche Dosis- Wirkungskurve wie die Zytotoxizität, so wäre ein kausaler Zusammenhang mit dem Zelltod nicht auszuschließen.
2. der Einfluß von drei verschiedenen Antioxidantien, N-Acetylcystein, Silibin und α -Tocopherol, auf den zytotoxischen Effekt von Paracetamol einerseits und seinen DNS-Strangbrüche induzierenden Effekt andererseits geprüft werden. Aus einem solchen Vergleich wären neben einer Aussage über die jeweiligen Wirkmechanismen auch Hinweise auf die Art des Zusammenhangs der beiden Wirkungen zu erwarten. Wäre nur einer der beiden Effekte durch Antioxidantien zu hemmen, so spräche das gegen einen kausalen Zusammenhang.

2. Material

Das für die Herstellung der Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde in einem Ionenaustauscher deionisiert und anschließend demineralisiert (Millipore-Anlage der Fa. Behr).

Alle toxischen Substanzen, wie MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoniumbromid) und DMSO wurden gesondert gesammelt und entsorgt.

2.1. Versuchstiere

Die zur Kultur verwendeten Hepatozyten wurden aus perfundierten Lebern männlicher Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 250-300 g isoliert.

Den Tieren stand Wasser und handelsübliches Tierfutter *ad libitum* zur Verfügung.

2.2. Chemikalien und biologische Komponenten

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Materialien wurden von den Firmen Sigma und Merck, die Kulturgefäße von den Firmen Nunc und Falcon bezogen.

Pentobarbital	Nembutal [®] der Fa. Richter Pharma
Collagenase	Typ CLS 208 U/mg der Fa. Biochrom
Tris	Fa. Biomedicals Inc.
Triton X-100	Fa. Fluco BioChemika
Agarose	LMP: NuSieve [®] GTG [®] Agarose der Fa. FMC BioProducts Molecular Biology Grade Agarose, Gelstrength (1 % Gel), 1,270 g/cm ² der Fa. Eurogenetic

2.3. Geräte

Perfusions-Pumpe + Heizer	IKA-Schlauchpumpe PA-M1 der Fa. Janke & Kunkel Typ FE der Fa. Hanke & Brüder
Mikroskop	Axiovert 100 der Fa. Zeiss
Brutschrank	IG 150 der Fa. Jouan
Sterilbank	LC 2 der Fa. Jouan BSB 4 der Fa. Gelaire
Zentrifuge	Tischzentrifuge Universal 30 F der Fa. Hettich
Waage	MC 1 Backweigher AC 120S-00DC der Fa. Sartorius 1265 MP der Fa. Sartorius
pH-Meter	PHM 83 Autocal pH-Meter der Fa. Radiometer Copenhagen PHM 93 Reference pH-Meter der Fa. Radiometer Copenhagen
Vortexer	VF 2 der Fa. Jahnke und Kunkel
Ultraschallbad	2210 der Fa. Branson
Rührer	MR 80 der Fa. Heidolph
Schüttler	LK 2 der Fa. Edmund Bühler
ELISA-Reader	Multscan MS der Fa. Labsystem
Wasserbad	Thermomix 1420 der Fa. B. Braun Melsungen AG
Netzteil	E835 der Fa. Consort
Elektrophoresekammer	DNA SubCell der Fa. Biorad
Fluoreszenzmikroskop	Axiolab der Fa. Zeiss mit Quecksilberdampflampe HBO 50
Fotoapparat	AE-1 der Fa. Canon

3. Methoden

3.1. Hepatozytenpräparation

Die Primärhepatozyten wurden aus männlichen Wistar-Ratten (250-300 g) nach einer modifizierten Methode von Lindl und Mitarbeitern (1989) isoliert. Das Prinzip dieser Präparation basiert auf der aufeinanderfolgenden Perfusion der Leber mit zwei Puffern; zunächst werden durch einen Ca^{2+} -freien Vorperfusionspuffer die Desmosomen der Hepatozyten durch Calciumentzug gelöst und das Blut entfernt. Im zweiten Schritt baut die durch Calcium aktivierte Collagenase die extrazelluläre Matrix ab, so daß sich der Zellverband des Leberparenchyms in Einzelzellen auflöst. Die einzelnen Parenchymzellen können aufgrund ihrer höheren Dichte anschließend durch Zentrifugation von den Nichtparenchymzellen getrennt werden.

Alle Schläuche für die Perfusion wurden zunächst mit 80 % Ethanol, dann mit sterilem *Aqua bidest* und schließlich mit Vorperfusionspuffer gespült.

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Gabe von Pentobarbital (120 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert.

Brust- und Bauchhöhle wurden unter Narkose ventral eröffnet und die Pfortader (*Vena portae*) freigelegt.

Um die Pfortader wurden zwei lose Ligaturen gelegt, eine Braunüle mit angeschlossenem Perfusionsschlauch in das Gefäß eingeführt, sowie die Ligaturen zur Abdichtung zugezogen. Die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) wurde zum Abfluß der Perfusionslösung mit der Schere durchtrennt (vgl. Abb. 3-1). Die Durchflußgeschwindigkeit der Puffer betrug 20 ml/min. Nachdem der Vorperfusionspuffer (300 ml) verbraucht war, erfolgte mit gleicher Durchflußgeschwindigkeit die Perfusion mit dem Collagenasepuffer für weitere 10 Minuten. Während der gesamten Perfusionszeit wurden die Perfusionslösungen mit Carbogen begast. Danach wurde die Leber aus dem Tier entnommen, die Leberkapsel mechanisch zerstört und die Leberzellen in *Williams Medium E* (WME, Sigma) aufgenommen.

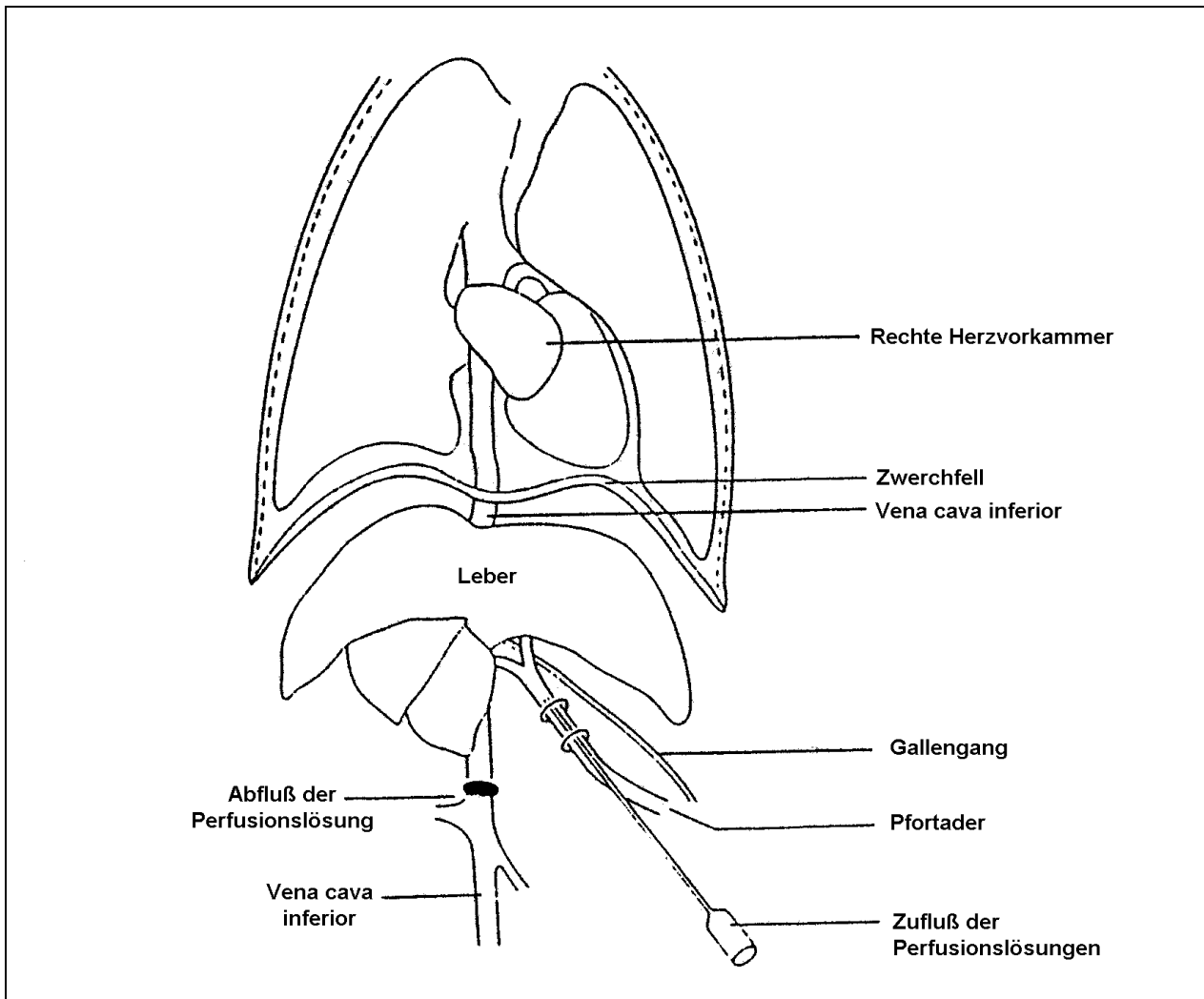


Abb. 3-1 : Leberperfusion in situ nach Lindl et al., 1989

Diese Zellsuspension wurde anschließend durch eine feine Gaze filtriert und zur Abtrennung der Hepatozyten zentrifugiert (Universal 30 F, Hettich). Nach dem ersten Zentrifugationsschritt (5 Minuten bei 50 x g) wurde das Pellet in *Williams Medium E* resuspendiert und erneut bei 50 x g für 3 Minuten zentrifugiert; das Pellet wurde in 16,5 ml *Williams Medium E* aufgenommen. Dann wurden die lebenden von den toten Zellen mittels eines Percoll-Gradienten getrennt. Hierzu wurden 28,71 ml Percoll mit 4,29 ml zehnfach konzentriertem PBS-Puffer gemischt und die in WME suspendierten Hepatozyten hinzugefügt. Nach diesem letzten Zentrifugationsschritt, der für 5 Minuten bei 1000 x g erfolgte, wurde der Überstand zusammen mit der Interphase verworfen und das Pellet in WME „komplett“ aufgenommen (die Zusammensetzung des PBS-Puffers und des WME „komplett“ ist im Anhang unter 7.1. aufgeführt).

Die Bestimmung der Viabilität der isolierten Hepatozyten erfolgte durch eine Färbung mit Trypanblau. Hierzu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 0,4 %iger Trypanblaulösung 1:10 gemischt und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Es wurden nur Hepatozytenpräparationen für Versuche eingesetzt, deren Viabilität >90 % betrug. Die Zellsuspension wurde mit WME „komplett“ auf eine Konzentration von $0,67 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

3.2. Hepatozytenkultur

Alle Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Zum Collagenisieren der Zellkulturplatten (Falcon, Nunc) wurde eine Collagenlösung (Kollagen Typ VII, Sigma, 5 µg Collagen/cm² Kulturfläche) auf die Böden der wells aufgetragen und mindestens eine Stunde unter UV-Bestrahlung getrocknet.

Pro 24-well-Platte wurden ca. 200.000 Zellen/well (300 µl der Zellsuspension) und pro 6-well-Platte ca. 10^6 Zellen/well (1,5 ml der Suspension) gegeben. Anschließend wurden die Kulturplatten in einen Brutschrank verbracht (37° C, 5 % CO₂).

Die Anheftung der Hepatozyten an die Kulturplattenböden erfolgte in den ersten zwei Stunden der Kultur. Nach der 2. Stunde wurde ein Mediumwechsel zur Entfernung nicht-adhärenter Zellen durchgeführt, wobei die Zellen einmal mit PBS gewaschen wurden.

3.2.1. Schädigung der Hepatozyten mit Paracetamol

5 Stunden nach dem Medienwechsel erfolgte eine Behandlung der Zellen mit in WME „komplett“ gelöstem Paracetamol. Dieses wurde in den Endkonzentrationen 10 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM und 40 mM eingesetzt. Dazu wurde eine Stammlösung von 50 mM Paracetamol in WME „komplett“ angesetzt und bis zur vollständigen Lösung des Paracetamols ca. eine Stunde lang in einem Ultraschallbad belassen. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden wurde das Schädigungsmedium abgenommen und nach Waschen mit PBS durch WME „komplett“ ersetzt.

Die Zellen wurden nach Beendigung der Schädigungszeit (Zeitpunkt [12 h]) und nach einer weiteren, 24stündigen Inkubation (Zeitpunkt [36 h]) verwandt.

Zum Zeitpunkt [12 h] wurde der Comet Assay (s.3.4.) sowie eine Überprüfung der Zellviabilität durch MTT- (s.3.3.1.) und Neutralrottest (s. 3.3.2.) durchgeführt.

Zum Zeitpunkt [36 h] wurde erneut die Zellviabilität bestimmt.

Der Kulturverlauf ist in Abbildung 3-2 graphisch dargestellt.

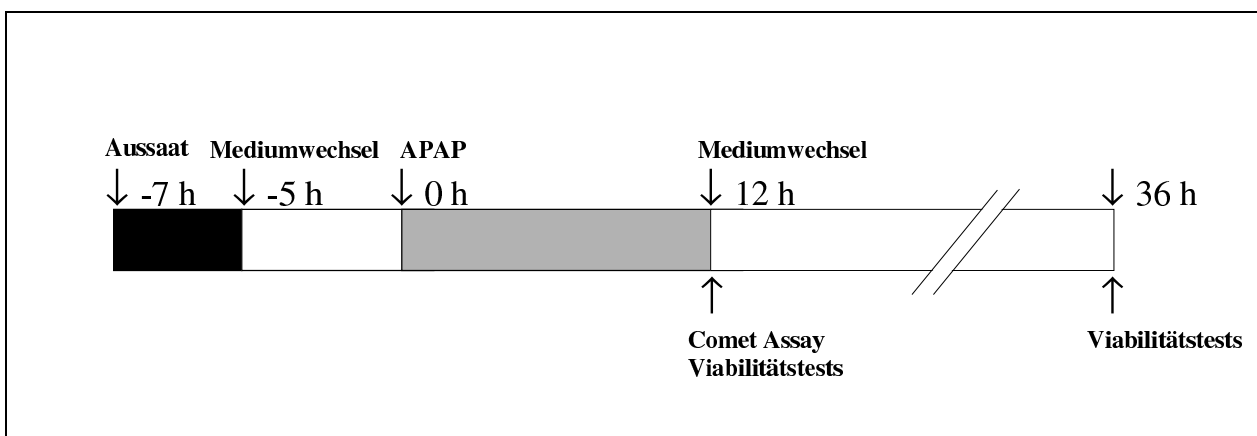


Abb. 3-2 : Verlauf der Hepatozytenkultur

3.2.2. Behandlung der Hepatozyten mit Paracetamol und N-Acetylcystein (NAC)

Die Behandlung der Zellen mit Paracetamol erfolgte wie unter 3.2.1. beschrieben.

Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit N-Acetylcystein vorbehandelt und ein weiterer Teil wurde gleichzeitig mit Paracetamol und N-Acetylcystein inkubiert.

Für die Präinkubation wurden die Zellen zum Zeitpunkt des Medienwechsels ([-5 h]) mit N-Acetylcystein (Sigma) behandelt. Nach 5 h wurde das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und durch Paracetamol-haltiges Medium ersetzt.

Für die Mitinkubation wurde N-Acetylcystein dem Paracetamol-haltigen Medium zugesetzt.

N-Acetylcystein wurde jeweils in der Konzentration 10 μM sowie 100 μM eingesetzt. Hierzu wurde eine Stammlösung von 100 mM in WME „komplett“ angesetzt.

3.2.3. Behandlung der Hepatozyten mit Paracetamol und Silibin

Die Behandlung der Zellen mit Paracetamol erfolgte wie unter 3.2.1. beschrieben.

Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit Silibin (Sigma) vorbehandelt und ein anderer Teil wurde gleichzeitig mit Silibin und Paracetamol inkubiert.

Für die Präinkubation wurden die Zellen zum Zeitpunkt des Medienwechsels ([-5h]) mit Silibin behandelt. Nach 5 Stunden wurde dieses Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und durch Paracetamol-haltiges Medium ersetzt

Für die Mitinkubation wurde Silibin dem Paracetamol-haltigen Medium zugesetzt.

Silibin wurde in einer Konzentration von 25 μM eingesetzt. Hierzu wurde eine Stammlösung von 50 mM in DMSO angesetzt.

3.2.4. Behandlung der Zellen mit Paracetamol und Vitamin E

Die Behandlung der Zellen mit Paracetamol erfolgte wie unter 3.2.1. beschrieben.

Weitere Zellkulturplatten wurden mit Paracetamol-haltigem Medium behandelt, welches zusätzlich das Antioxidans α -Tocopherol-Succinat (Sigma) enthielt. α -Tocopherol-Succinat wurde in einer Endkonzentration von 50 μ M eingesetzt, eine Konzentration, die sich in Vorversuchen der Arbeitsgruppe als nicht zytotoxisch erwiesen hatte. Hierzu wurde eine Stammlösung von 25 mM in DMSO angesetzt.

3.2.5. Behandlung der Zellen mit N-Acetylcystein

Zum Austesten der Zytotoxizität wurde N-Acetylcystein (Sigma) in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 10 μ M, 100 μ M, 1 mM, 10 mM und 100 mM. Diese wurden nach dem Medienwechsel ([-5 h]) auf die Zellen gegeben und nach 20 Stunden abgenommen. Danach und weitere 24 Stunden später wurde ein MTT-Test durchgeführt.

3.3. Methoden zur Bestimmung der Viabilität der Zellen

3.3.1. Colorimetrischer MTT-Test

Der MTT-Test (modifiziert nach Mosmann *et al.*, 1983) basiert auf der Umsetzung des Tetrazoliumsals MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoniumbromid) durch mitochondriale Enzyme. In aktiven Mitochondrien wird MTT durch Dehydrogenasen zu einem farbigen Formazansalz umgesetzt (vgl. Abb. 3-3). Dieses Salz weist eine charakteristische Absorption bei 560 nm auf. Der MTT-Test ermöglicht daher eine spektro-photometrische Quantifizierung der Viabilität von Zellen.

Das MTT (Sigma) wurde in PBS-Puffer in einer Konzentration von 3,5 mg/ml gelöst.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit einer MTT-Lösung der Konzentration 0,7 mg/ml in PBS-Puffer für 30 Minuten im Brutschrank (37° C, 5 % CO₂) inkubiert.

Nach Abnahme der MTT-Lösung wurde das gebildete Formazansalz mit Isopropanol / Ameisensäure (Verhältnis 95:5) in Lösung gebracht. 100 µl der farbigen Lösung wurden in eine 96-well-Platte pipettiert und im ELISA-Reader (SLT 400 ATC der Firma SLT Labinstruments) bei 560 nm gemessen.

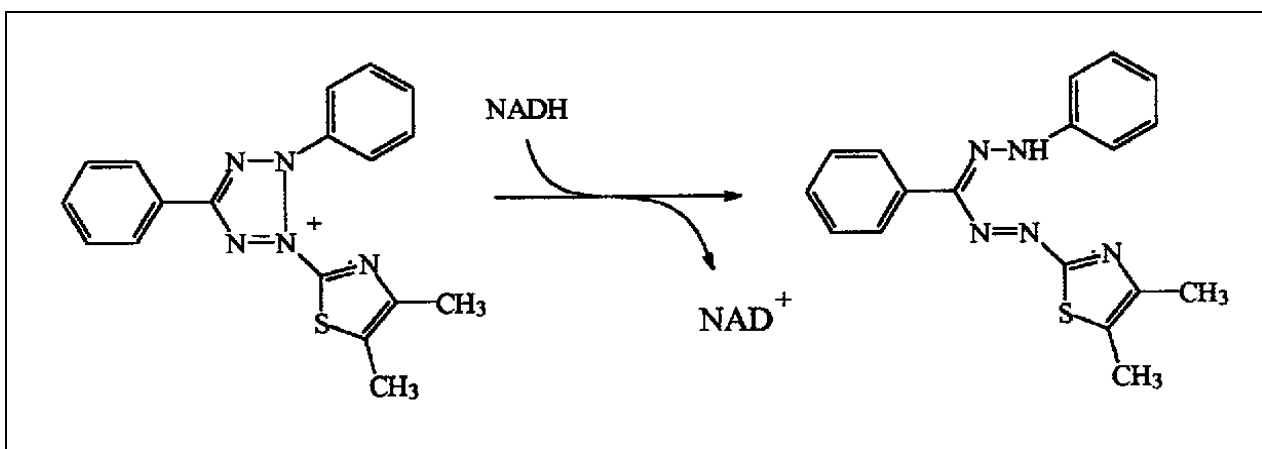


Abb. 3-3: Umsetzung von MTT in ein Formazansalz durch mitochondriale Dehydrogenasen in vitalen Zellen

3.3.2. Neutralrottest

Der Neutralrottest (nach Borenfreund *et al.*, 1985) basiert auf der aktiven Aufnahme und Speicherung des Farbstoffes 2-Amino-3-methyl-7-dimethyl-aminophenazoniumchlorid in Lysosomen bei intakter Membranfunktion. Der Farbstoff weist eine charakteristische Absorption bei 550 nm auf. Auf diese Weise kann die Zellviabilität spektro-photometrisch quantifiziert werden.

Die eingesetzte Neutralrotlösung mit der Konzentration 50 µg/ml wurde durch Verdünnung einer Neutralrot-Stammlösung (4 mg/ml Neutralrot (Sigma) in *Aqua bidest*) mit WME „komplett“ hergestellt.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit der Neutralrotlösung für 2-4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Lösung abgenommen, die Zellen wurden kurz mit Fixierlösung (1 % Formaldehyd + 1 % CaCl₂) fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und das Neutralrot wurde mit 300 µl Extraktionslösung (50 % Ethanol + 1 % Essigsäure) aus den Zellen gelöst. Zur vollständigen Extraktion des Neutralrotfarbstoffes wurden die Kulturplatten 40 min. auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. 100 µl des extrahierten Farbstoffes wurden anschließend in eine 96-well-Platte pipettiert und im ELISA - Reader (SLT 400 ATC der Firma SLT Labinstruments) bei 550 nm gemessen.

3.4. Comet Assay

Die alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese (SCGE oder Comet Assay) wurde 1988 von Singh *et al.* entwickelt und stellt eine einfache und schnelle Methode zum Nachweis von DNS-Schäden (Strangbrüche und Alkali-labile Stellen) auf Einzelzellniveau dar.

3.4.1. Herstellung der Objektträger

Für die Herstellung der Präparate wurden Objektträger mit aufgerauhtem Beschriftungsfeld verwendet, um eine bessere Haftung der aufgetragenen Gelschichten zu gewährleisten. Es wurde eine 1,5 %ige Agaroselösung (in PBS) hergestellt und vor der Verwendung 3 mal aufgeköcht. Die Basalschicht aus Agarose wurde aufgetragen, indem mit Methanol gereinigte Objektträger bis zur Hälfte des Beschriftungsfeldes in die heiße (>60° C) Agarose getaucht wurden. Zum Trocknen wurden sie über Nacht horizontal gelagert und konnten in getrocknetem Zustand bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

3.4.2. Auftragen der Zellen

Eine 0,5 %ige Low Melting Point (LMP)-Agarose wurde bei 95° C aufgeköcht, auf 37° C abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung im Wasserbad bei 37° C flüssig gehalten.

Die Zellen wurden durch dreiminütige Inkubation mit Collagenasepuffer (100 µl) von der Kulturplatte gelöst. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von serumhaltigem Medium (100 µl) gestoppt. Auf die vorbeschichteten und getrockneten Objektträger erfolgte das Auftragen der Zellsuspension. Dazu wurden 20 µl der Hepatozyten-Suspension mit 150 µl LMP-Agarose vorsichtig in ein Eppendorf-Gefäß überführt und das Gemisch dann auf einen der Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Für jede Konzentration wurden zwei Objektträger auf

diese Weise angefertigt. Nach ungefähr 5 Minuten im Kühlschrank war die Agaroseschicht erstarrt. Das Deckglas wurde dann vorsichtig abgezogen und die Präparate über Nacht (bis längstens 72 h) in eine Küvette mit 4° C kalter Lyselösung gestellt.

Die Lyselösung besteht aus 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA (372 g/mol), 10 mM Tris und 1 % Na-Laurylsarkosinat in destilliertem H₂O. Vor Zugabe des Na-Laurylsarkosinats wurde der pH-Wert mittels NaOH-Plätzchen auf 10 eingestellt. Ca. 12 h bevor die Objektträger in die Lösung gestellt werden, wird die Lösung durch Zugabe von 1 % Triton-X-100 und 10 % DMSO komplettiert.

Während der Lyse werden zelluläre Proteine und Membranen zerstört, so daß der Zellkern frei in der Agarose vorliegt.

3.4.3. Alkalidenaturierung, Elektrophorese und Neutralisation

Die Präparate wurden aus der Lyselösung genommen, kurz mit *Aqua bidest* gewaschen und horizontal mit der Gelschicht nach oben in die in einem Eisbad stehende Elektrophoresekammer gelegt. Die Kammer wurde vorsichtig mit dem alkalischen (pH 13) Elektrophoresepuffer gefüllt, bis die Präparate ca. 2-3 mm mit Puffer überschichtet waren. Während der Denaturierung und der Elektrophorese wurde eine direkte Lichtbestrahlung vermieden, um so eine zusätzliche Induktion von DNS-Schäden zu verhindern. In allen Versuchen betrug die Zeit für die Alkali-Denaturierung der DNS und die Expression der Alkali-labilen Stellen 25 Minuten. Unmittelbar auf die Alkali-Behandlung folgte dann die 25-minütige Elektrophorese. Die gewünschte Stromstärke (300 mA; 25 V \Rightarrow 0,86 V/cm) wurde durch Zu- oder Abpipettieren des Elektrophoresepuffers erreicht.

Der Elektrophoresepuffer besteht aus 300 mM NaOH und 1 mM Na₂EDTA (372 g/mol) in destilliertem H₂O.

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Kammer genommen, kurz in *Aqua bidest* gewaschen, und horizontal auf einen Abtropfständer gelegt. Zur Neutralisation wurden sie mit Neutralisationspuffer (0,4 M Tris, pH mit rauchender Salzsäure auf 7,5 eingestellt)

überschichtet. Nach 5 Minuten wurde der Puffer abgegossen und der Neutralisationsvorgang noch zweimal wiederholt.

Danach wurden die Objektträger kurz in eine Küvette mit *Aqua bidest* getaucht, 5 Minuten in 99 % Ethanol gestellt und schrägstehend getrocknet. In trockenem Zustand wurden die Objektträger bis zur Auswertung aufbewahrt.

3.4.4. Färbung und Auswertung

Die getrockneten Objektträger wurden kurz in eine Küvette mit *Aqua bidest* getaucht. Zur Färbung der Präparate wurden 30 µl des DNS-interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid (20 µg/ml) aufgetragen, der Objektträger mit einem Deckglas bedeckt und bis zur Auswertung in eine feuchte Kammer gelegt.

Die Auswertung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiolab; Anregungsfilter: 515-560 nm; Sperrfilter: 590 nm.). Es wurden pro Ansatz 50 Zellen mit Hilfe eines Okularmikrometers ausgewertet. Es wurde die „image length“ bestimmt, das heißt, die Gesamtlänge von Kern plus der gewanderten DNS. In die Messung wurden nur Zellen mit einbezogen, deren Kern eine runde Form aufwies, um mechanisch geschädigte Zellen von der Auswertung auszuschließen. Zudem wurden nur Zellen aus der Mitte des Objektträgers ausgemessen, um Randeffekte nicht mit zu berücksichtigen.

3.5. Statistische Auswertung

Im Anhang dieser Arbeit sind die Rohdaten der einzelnen Versuchsergebnisse in den Tabellen 1 bis 19 angegeben. Aus diesen wurden die im Ergebnisteil graphisch (Abbildung 4-1 bis 4-41) dargestellten arithmetischen Mittelwerte sowie die einfachen Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$) errechnet.

Diese Rohdaten wurden mit dem Schnelltest von David und Mitarbeitern (Sachs, 1992) auf das Vorliegen von Nicht-Normalität untersucht.

Zum Vergleich der Mittelwerte verschiedener Stichproben wurde zunächst eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem multiplen Mittelwertsvergleich (Fisher's protected least significance (PLSD) –Test) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Die Hepatozyten wurden zwölf Stunden lang mit Paracetamol in verschiedenen Konzentrationen inkubiert.

Zur Detektion von Strangbrüchen der Leberzell-DNS wurde der Comet Assay am Ende der Paracetamolexposition (Zeitpunkt [+12 Stunden]) durchgeführt und die Länge der Kometen bzw. der intakten Kerne (image length) am Mikroskop gemessen.

Zur Untersuchung der Viabilität der Hepatozytenkultur wurden MTT- und Neutralrottest nach Beendigung der Schädigungszeit [+12h] und nach weiteren 24 Stunden Inkubation in Medium (WME „komplett“) (Zeitpunkt [+36 Stunden]) durchgeführt. Die Werte wurden in Prozent der jeweiligen Kontrolle (ohne Paracetamol) angegeben.

4.1. Paracetamol und 10 μ M N-Acetylcystein

In diesem Versuchsteil wurde ein Teil der sieben Stunden alten Zellen einer zwölfstündigen Schädigung durch Paracetamol in den Konzentrationen 0, 10, 20, 25, 30 und 40 mM ausgesetzt; die Zellen, mit denen später die Viabilitätstests durchgeführt wurden, wurden mit den Paracetamolkonzentrationen 0, 10, 20, 25, 30, 35 und 40 mM Paracetamol geschädigt (Zeitpunkt [0 Stunden] bis [+12 Stunden]).

Ein anderer Teil der Zellen wurde gleichzeitig mit dem Paracetamol für zwölf Stunden mit 10 μ M N-Acetylcystein behandelt (Mitinkubation).

Der letzte Teil der Zellen wurde vor der Paracetamolexposition für fünf Stunden (Zeitpunkt [-5 Stunden] bis [0 Stunden]) mit 10 μ M N-Acetylcystein präinkubiert.

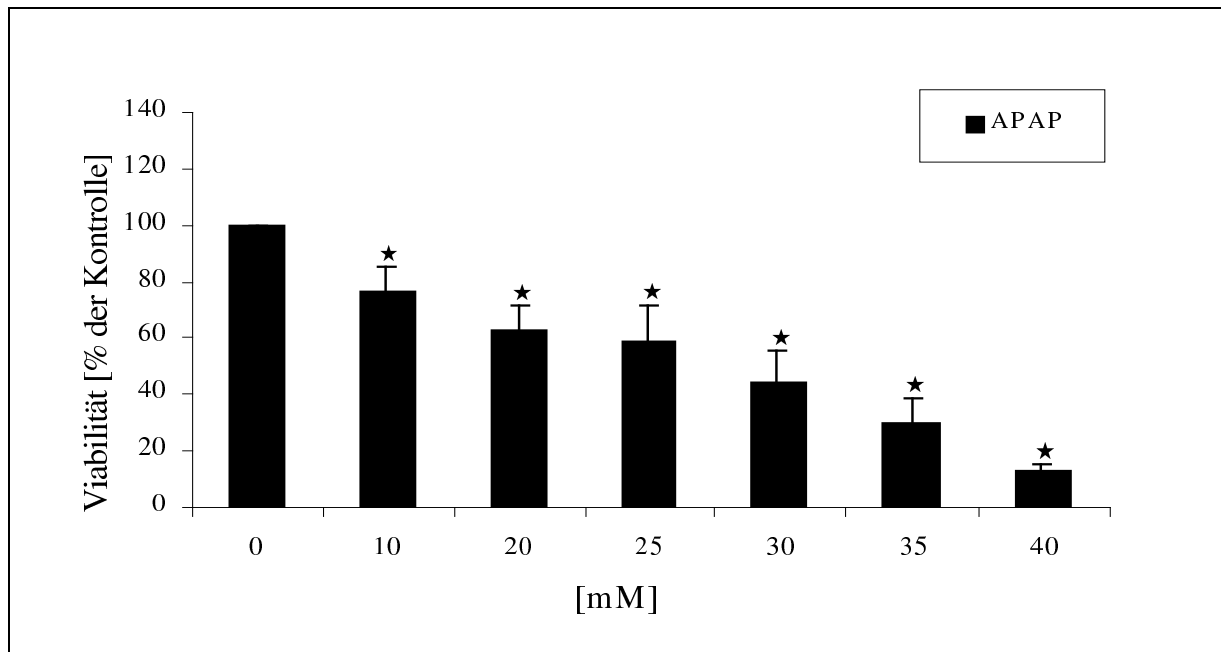
(12h/0h)**Viabilität**

Abbildung 4-1: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition (MTT-Test) (Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Direkt nach dem Ende der zwölfstündigen Schädigungszeit mit Paracetamol zeigten die Leberzellen ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM aufwärts einen signifikanten (p < 0,05) Viabilitätsverlust (siehe Abbildung 4-1).

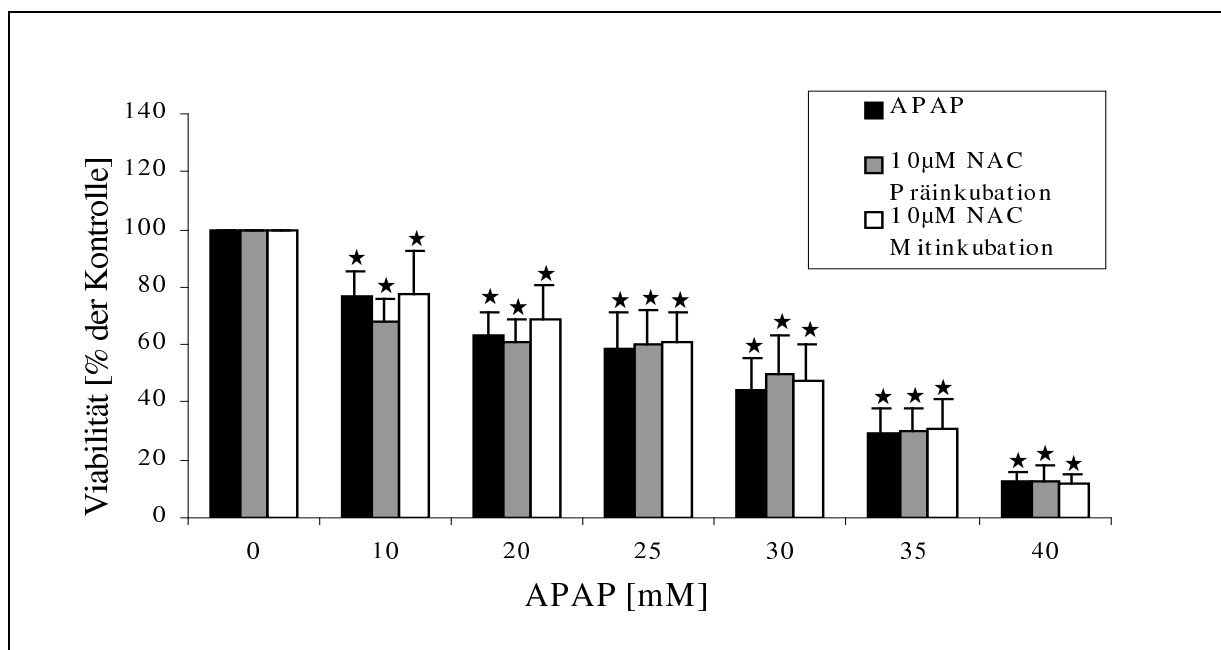


Abbildung 4-2: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 10 μM N-Acetylcystein (MTT-Test) (Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Auch die mit 10 μM N-Acetylcystein prä- oder mitinkubierten Zellen wiesen ab 10 mM Paracetamol einen Viabilitätsverlust auf. Es gab hierbei keinen signifikanten Unterschied zwischen den zusätzlich mit N-Acetylcystein behandelten und den nur mit Paracetamol inkubierten Hepatozyten (siehe Abbildung 4-2).

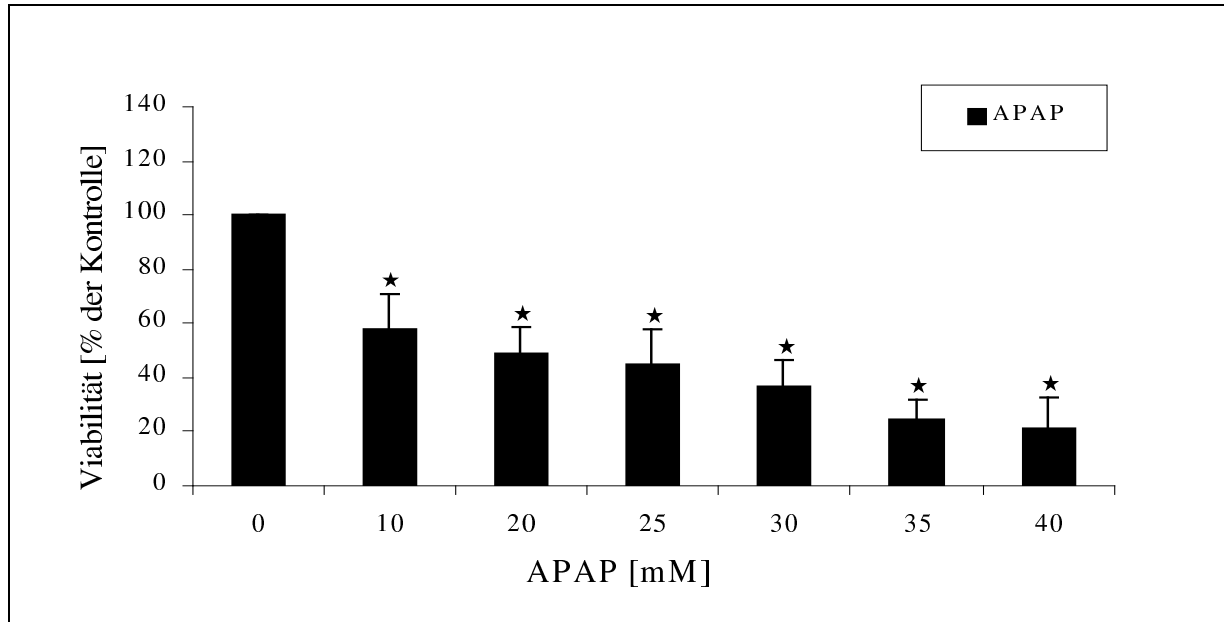


Abbildung 4-3: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition (Neutralrottest) (Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Analog zum MTT-Test zeigte sich auch im Neutralrottest direkt nach zwölfstündiger Paracetamolexposition ein signifikanter Viabilitätsverlust bei 10 mM und mehr Paracetamol (siehe Abbildung 4-3).

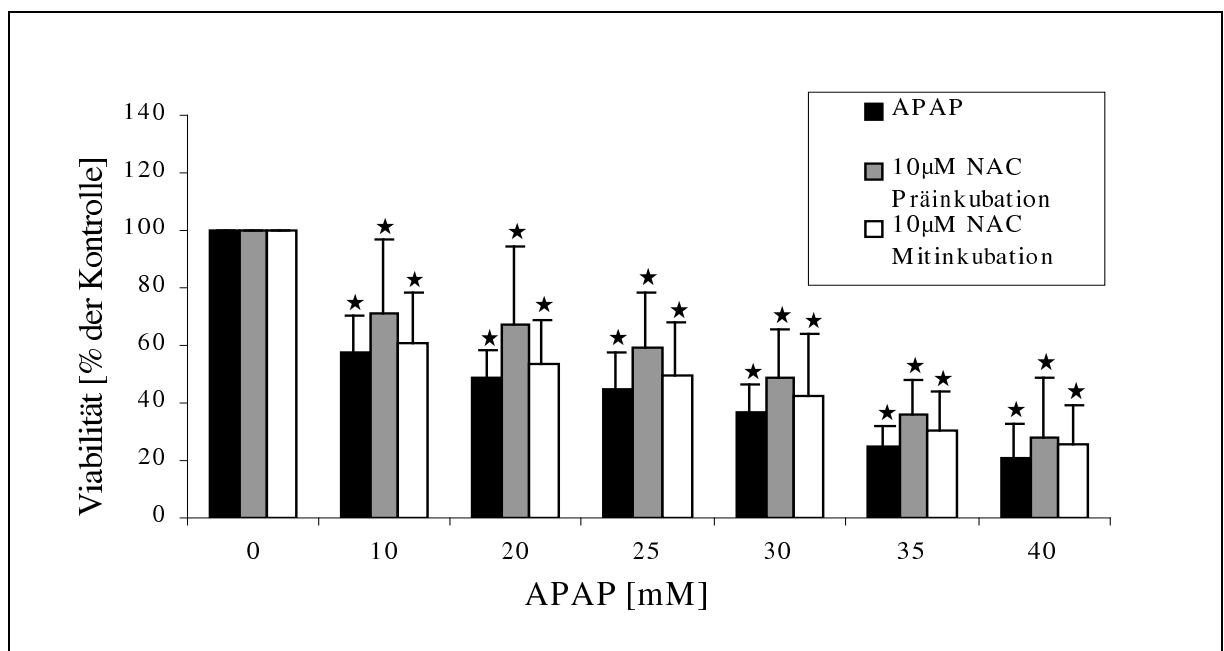


Abbildung 4-4: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 10 μM N-Acetylcystein (Neutralrottest) (Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Auch die mit 10 μM N-Acetylcystein behandelten Zellen zeigten einen Abfall der Viabilität bei Paracetamolkonzentrationen ab 10 mM. Wie im MTT-Test beobachtet bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den mit 10 μM N-Acetylcystein behandelten und nicht behandelten Zellen (siehe Abbildung 4-4).

Comet Assay

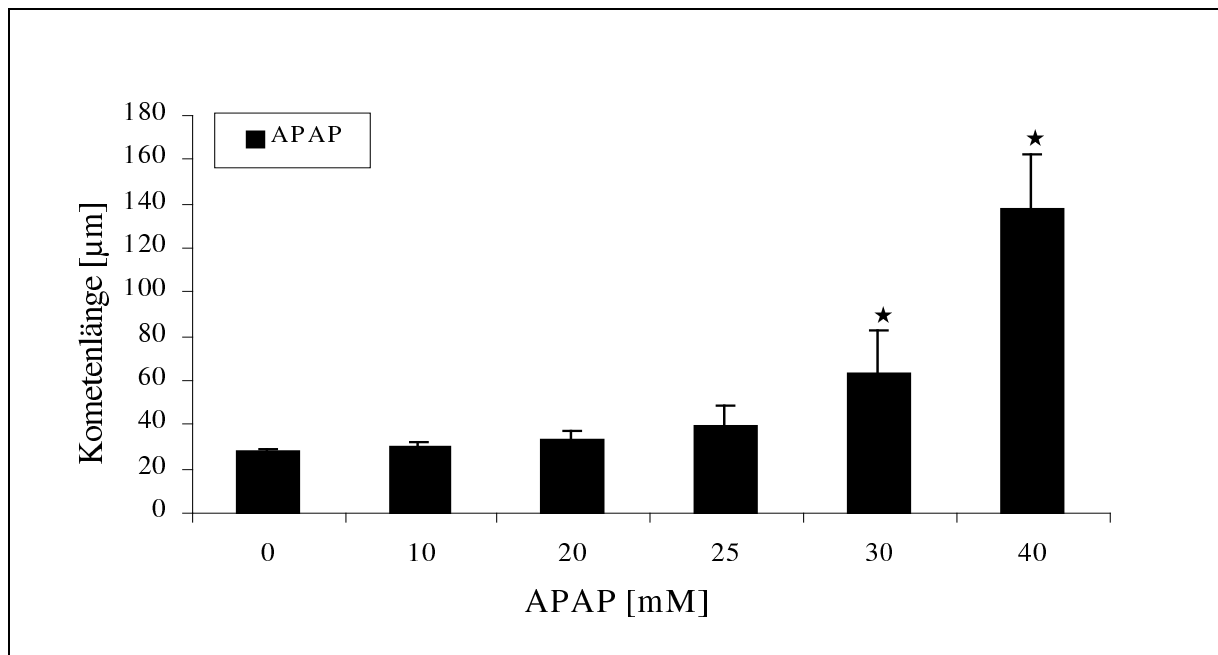


Abbildung 4-5: Kometenlänge nach zwölfstündiger Paracetamolexposition (Comet Assay)
(Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Nach Schädigung der Hepatozyten mit Paracetamol für zwölf Stunden konnten sowohl bei 30 mM als auch bei 40 mM Paracetamol signifikant längere Kometen gemessen werden als ohne Paracetamolexposition. Die Kometenlänge bei 10 mM, 20 mM und 25 mM unterschied sich nicht signifikant von der Länge der Kontrollzellen, die nicht mit Paracetamol behandelt worden waren (siehe Abbildung 4-5).

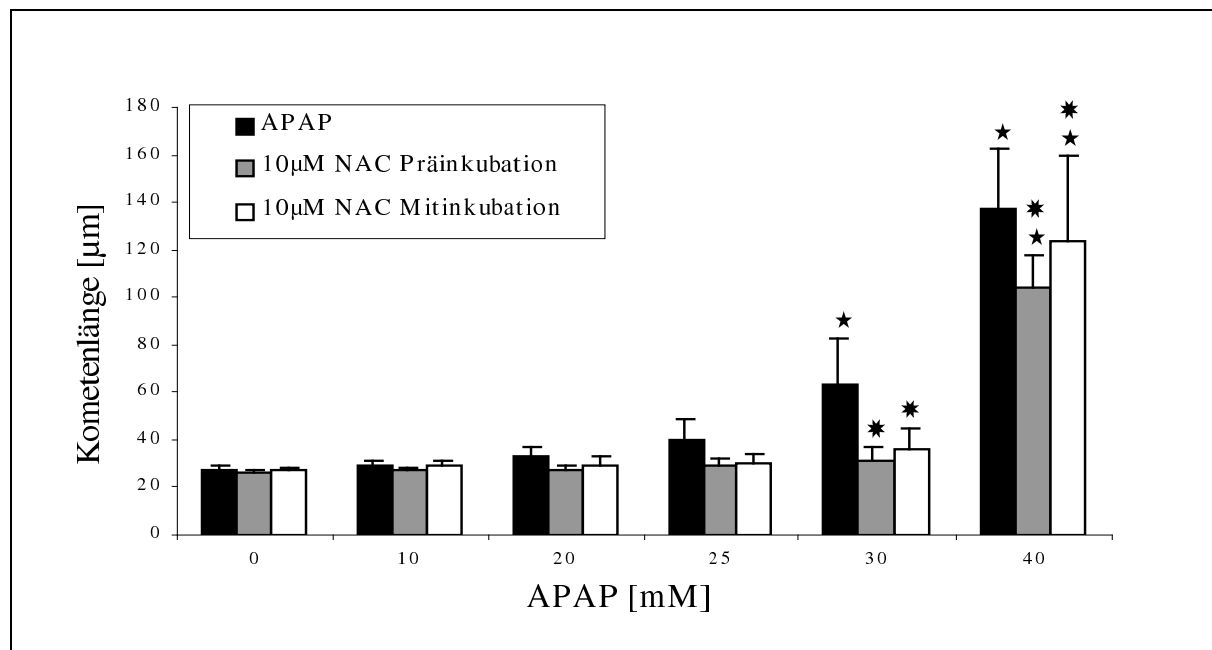


Abbildung 4-6: Kometenlänge nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 10 µM N-Acetylcystein (Comet Assay)

(Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; *p < 0,05 vs. jeweiliger Wert ohne NAC; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

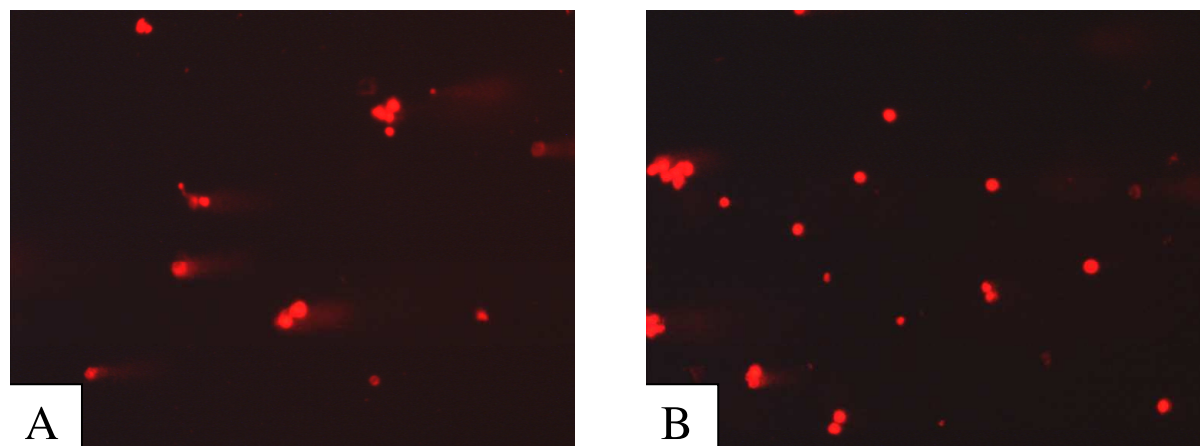


Abbildung 4-7: Kometenlänge nach zwölfstündiger Inkubation mit 30 mM Paracetamol (A) und nach zusätzlich durchgeführter Präinkubation mit 10 µM N-Acetylcystein (B) (Comet Assay); fluoreszenzmikroskopisches Bild

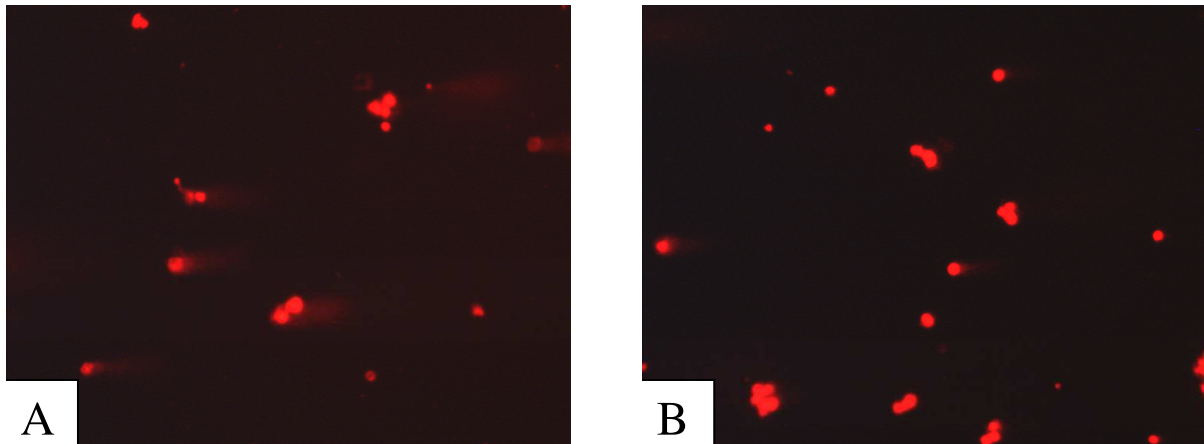


Abbildung 4-8: Kometenlänge nach zwölfstündiger Inkubation mit 30 mM Paracetamol (A) und nach zusätzlich durchgeführter Mitinkubation mit 10 µM N-Acetylcystein (B) (Comet Assay); fluoreszenzmikroskopisches Bild

Im Gegensatz zu den nicht mit N-Acetylcystein behandelten Zellen wiesen die mit 10 µM N-Acetylcystein prä- oder mitinkubierten Zellen nur bei einer Konzentration von 40 mM Paracetamol eine größere Kometenlänge auf als die Kontrollzellen, die mit N-Acetylcystein, nicht aber mit Paracetamol behandelt worden waren.

Bei 30 mM und 40 mM Paracetamol waren die Kometenlängen der Zellen, die mit 10 µM N-Acetylcystein prä- oder mitinkubiert wurden, signifikant geringer als die derjenigen, die nur mit Paracetamol geschädigt worden waren (siehe Abbildung 4-6; 4-7; 4-8).

(12h/24h)

Viabilität

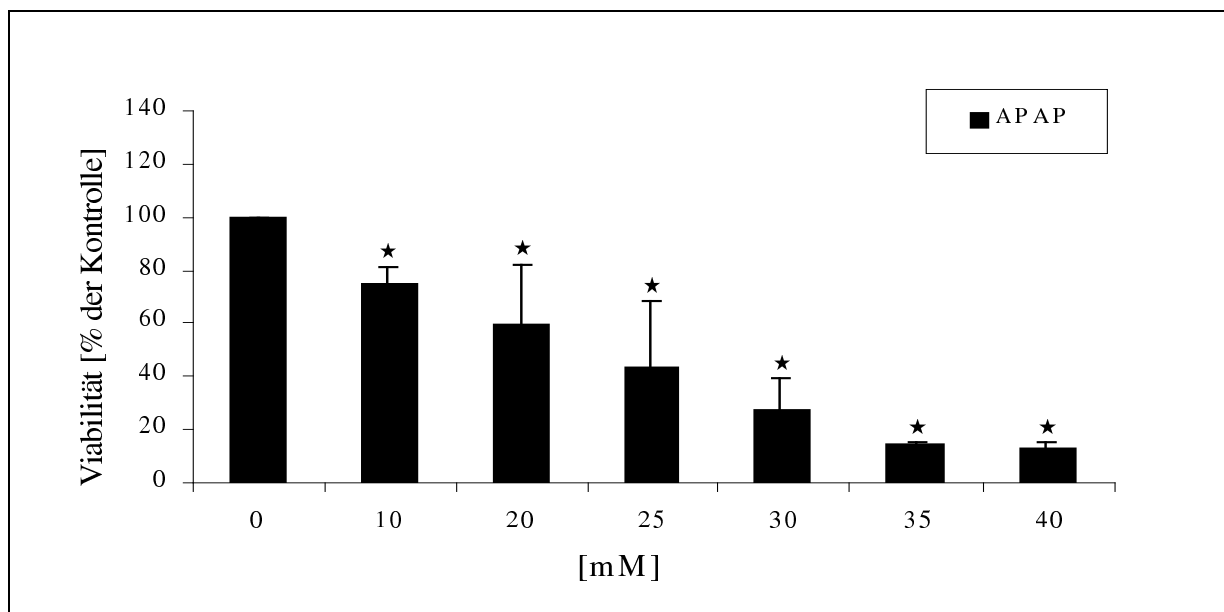


Abbildung 4-9: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und anschließender 24-stündiger Nachinkubation in Medium (MTT-Test)

(Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium zeigte sich wiederum ein Viabilitätsverlust ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM bei den Hepatozyten (siehe Abbildung 4-9).

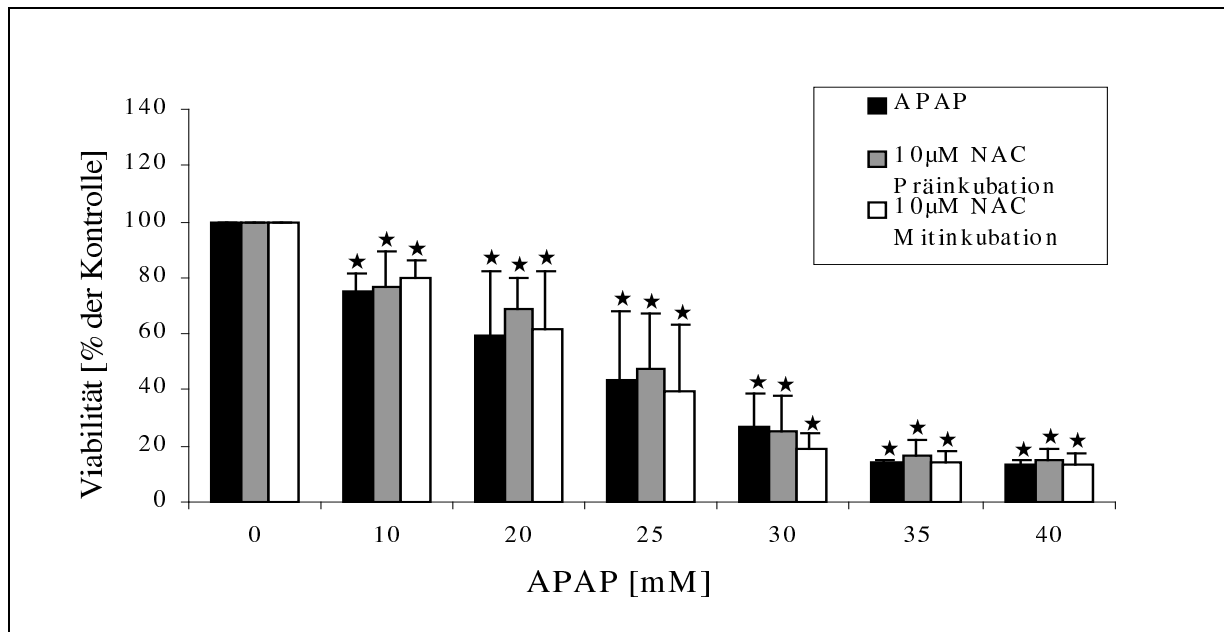


Abbildung 4-10: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 10 µM N-Acetylcystein nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium (MTT-Test)

(Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Wie bereits in dem MTT-Test direkt nach Beendigung der Paracetamolexposition beobachtet, gab es auch nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium keinen Unterschied im Viabilitätsverlust zwischen den mit N-Acetylcystein und Paracetamol und den nur mit Paracetamol behandelten Leberzellen (siehe Abbildung 4-10).

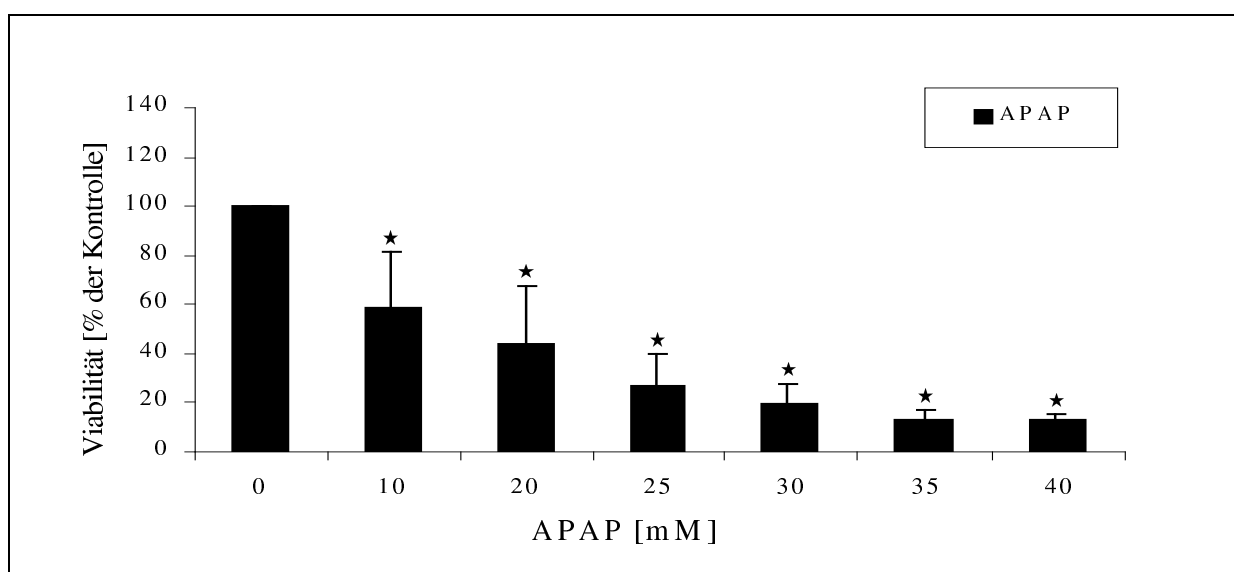


Abbildung 4-11: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und anschließender 24-stündiger Nachinkubation in Medium (Neutralrottest)

(Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Analog zum MTT-Test und zu den direkt nach Schädigungsende durchgeführten Viabilitätstests gab es auch im Neutralrottest nach 24-stündiger Nachinkubation der Zellen in Medium einen Viabilitätsabfall ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM aufwärts (siehe Abbildung 4-11).

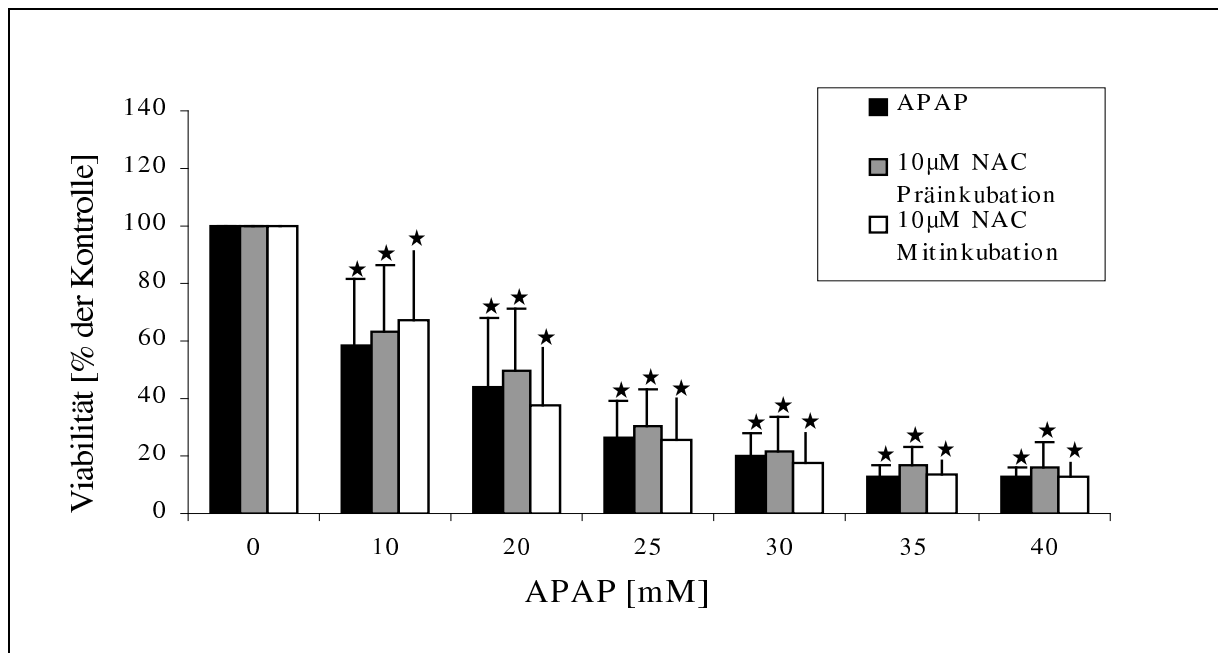


Abbildung 4-12: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 10 µM N-Acetylcystein nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium (Neutralrottest)

(Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Auch zeigte sich nach der Nachinkubation in Medium kein signifikanter Unterschied bezüglich der Viabilität der Zellen, die nur mit Paracetamol behandelt wurden und denen, die mit N-Acetylcystein prä- oder mitinkubiert worden waren (siehe Abbildung 4-12).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß nach der zwölfstündigen Paracetamolexposition, sowohl direkt danach als auch nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium ein Viabilitätsverlust bereits ab der geringsten Paracetamoldosis (10 mM) zu beobachten war. Dieser erfolgte auch bei Prä- oder Mitinkubation des Paracetamol-Antidots N-Acetylcystein im gleichen Ausmaß. Im Comet Assay war bei den nur mit Paracetamol behandelten Zellen eine Zunahme der Kometenlänge bei 30 mM und 40 mM Paracetamol zu messen. Die Hepatozyten, die mit N-Acetylcystein prä- oder mitinkubiert worden waren, zeigten hier nur bei 40 mM eine Verlängerung der Kometen.

4.2. Paracetamol und 100 μ M N-Acetylcystein

In diesem Teil des Versuchs wurde Paracetamol in den gleichen Konzentrationen wie oben beschrieben für 12 Stunden auf den ersten Teil der sieben Stunden alten Zellen gegeben.

Dem zweiten Teil wurde gleichzeitig mit dem Paracetamol 100 μ M N-Acetylcystein zur Mitinkubation zugegeben.

Der dritte Teil der Zellen wurde vor der Paracetamolexposition mit 100 μ M N-Acetylcystein für fünf Stunden präinkubiert.

(12h/0h)

Viabilität

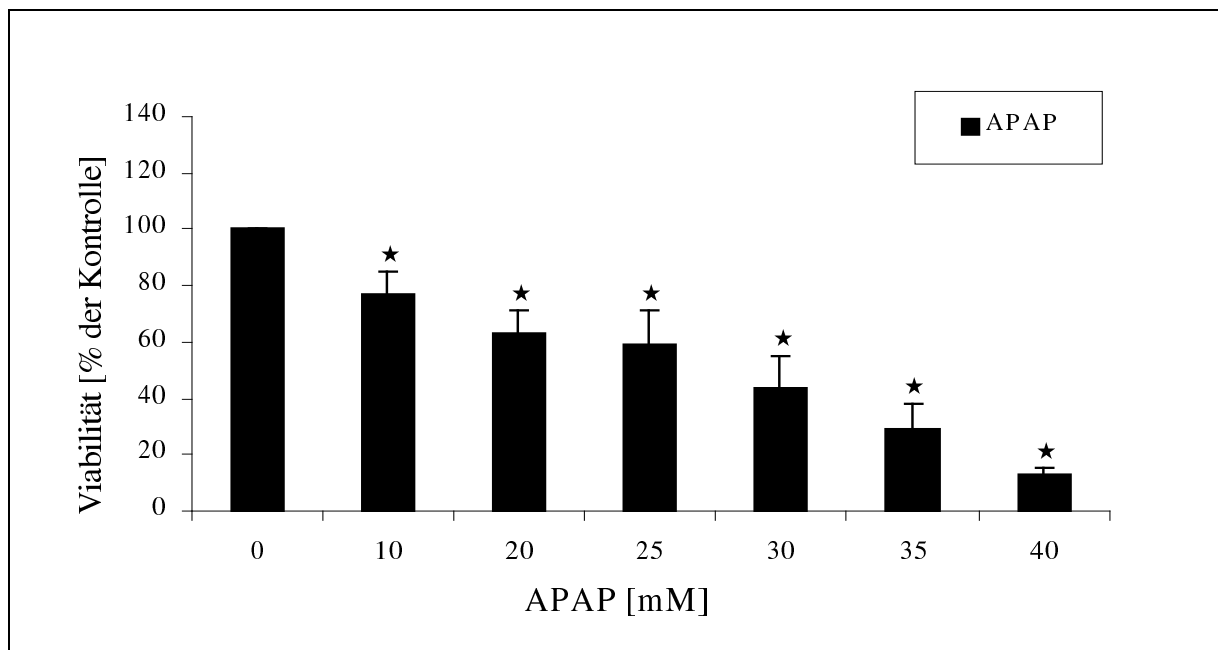


Abbildung 4-13: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition (MTT-Test)
(Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Der direkt nach der Schädigung durchgeführte MTT-Test zeigte einen signifikanten Abfall der Zellviabilität ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM an aufwärts (siehe Abbildung 4-13).

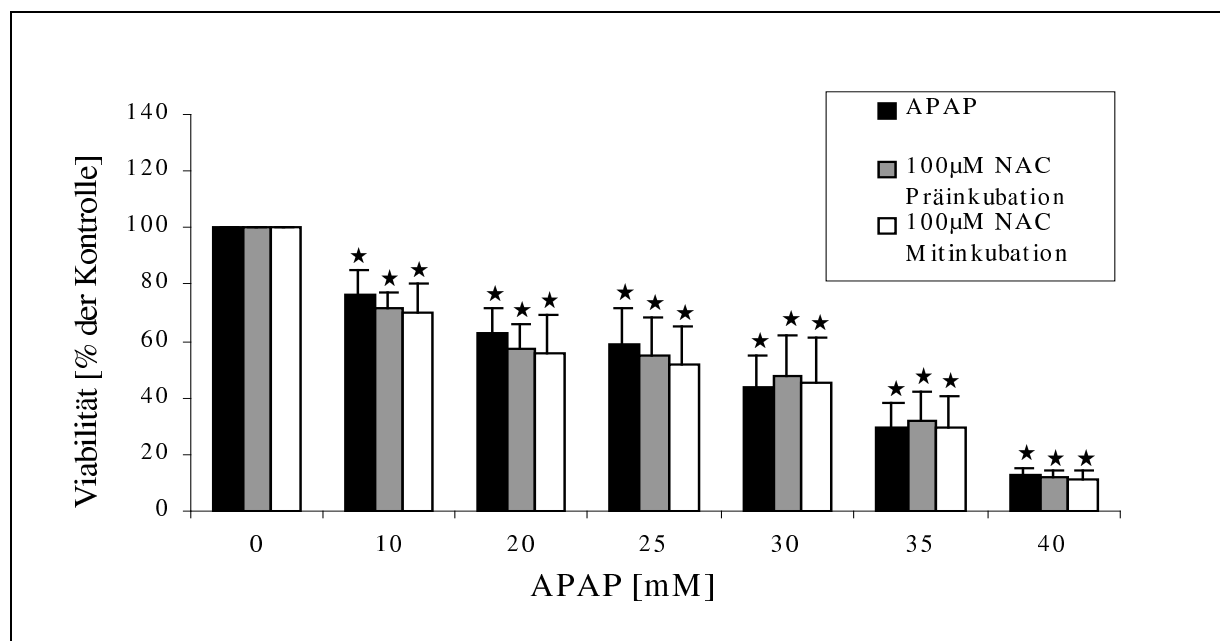


Abbildung 4-14: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 100 µM N-Acetylcystein (MTT-Test) (Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Direkt nach zwölfstündiger Paracetamolexposition war im MTT-Test bei den mit N-Acetylcystein behandelten Hepatozyten ebenfalls ein Viabilitätsverlust ab 10 mM Paracetamol zu verzeichnen. Es gab hinsichtlich der Viabilität der Zellen keinen Unterschied zwischen den Zellen, die zusätzlich zu dem Paracetamol mit 100 µM N-Acetylcystein behandelt worden waren und denen, die keine N-Acetylcystein-Behandlung erfahren hatten (siehe Abbildung 4-14).

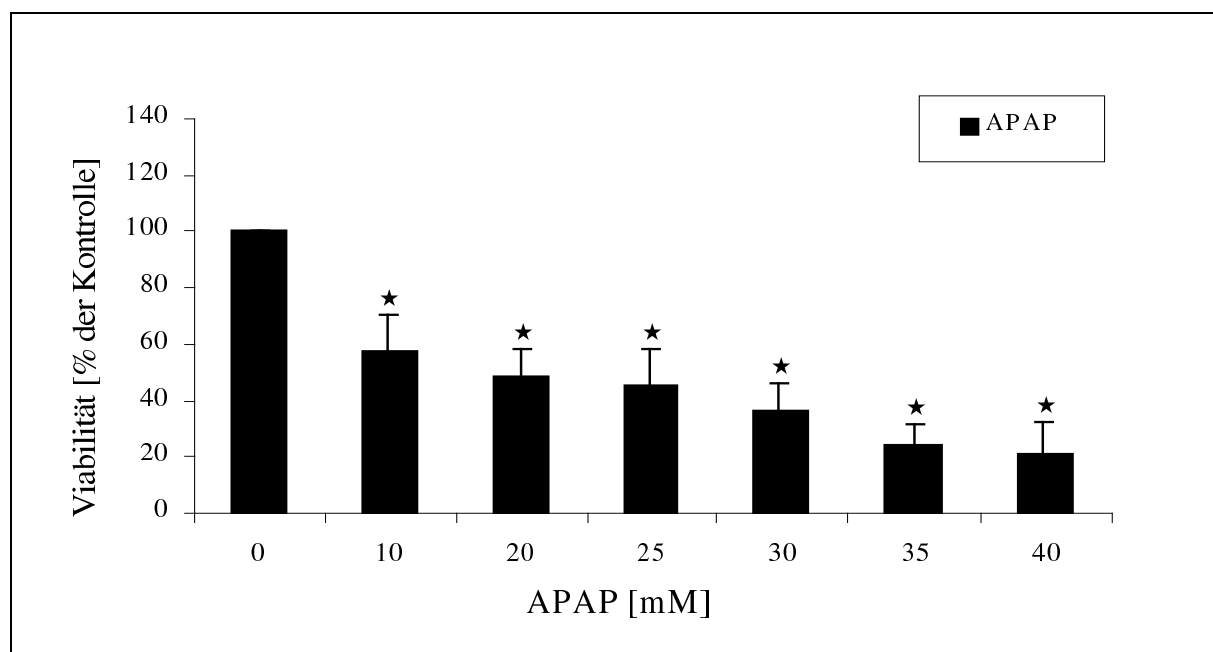


Abbildung 4-15: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition (Neutralrottest) (Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Wie schon im MTT-Test erkennbar, zeigten die Hepatozyten sofort nach Ende der Schädigungszeit einen signifikanten Viabilitätsabfall im Neutralrottest ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM (siehe Abbildung 4-15).

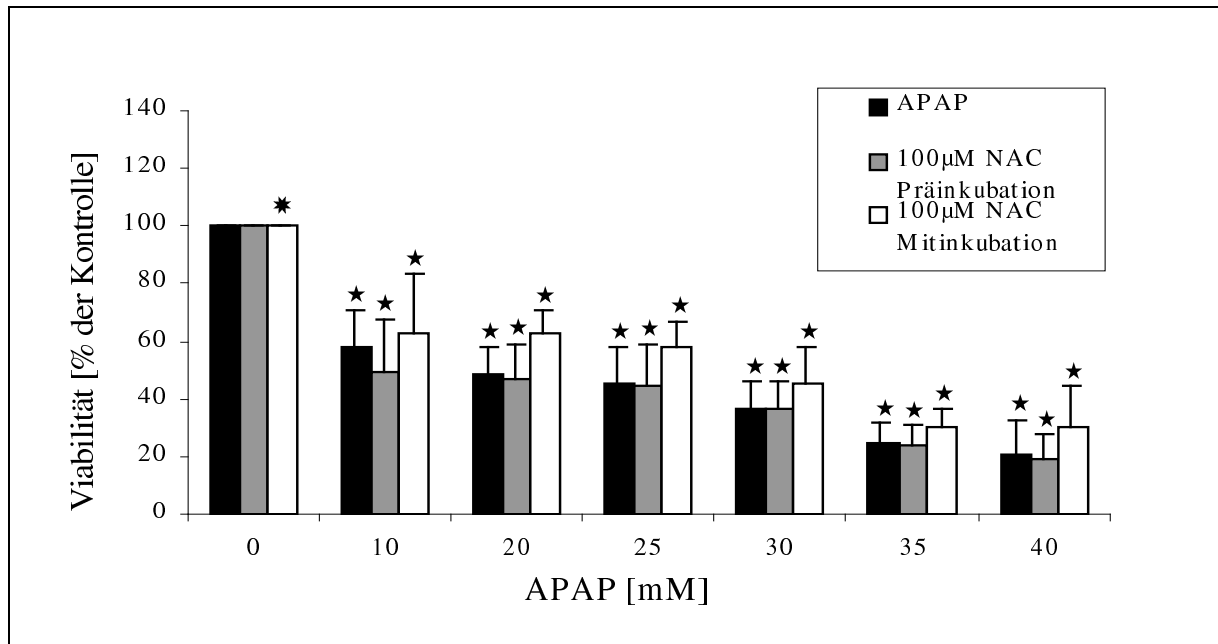


Abbildung 4-16: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 100 µM N-Acetylcystein (Neutralrottest) (Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; *p < 0,05 vs. jeweiliger Wert ohne NAC; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Wie bei den nicht mit N-Acetylcystein behandelten Zellen nahm die Viabilität der mit 100 µM N-Acetylcystein prä- oder mitinkubierten Zellen direkt nach Ende der zwölfstündigen Paracetamolexposition bei Konzentrationen ab 10 mM Paracetamol signifikant ab.

Dabei war die Viabilität der Hepatozyten, die nur mit 100 µM N-Acetylcystein mitinkubiert worden waren, signifikant (p < 0,05) geringer als die der Kontrollzellen ohne jegliche Behandlung. Die nur präinkubierten Zellen zeigten diese Viabilitätsminderung nicht. Des Weiteren bestand bei keiner Paracetamolkonzentration ein Unterschied zwischen mit 100 µM N-Acetylcystein prä- oder mitinkubierten und den nicht mit N-Acetylcystein behandelten Zellen (siehe Abbildung 4-16).

Comet Assay

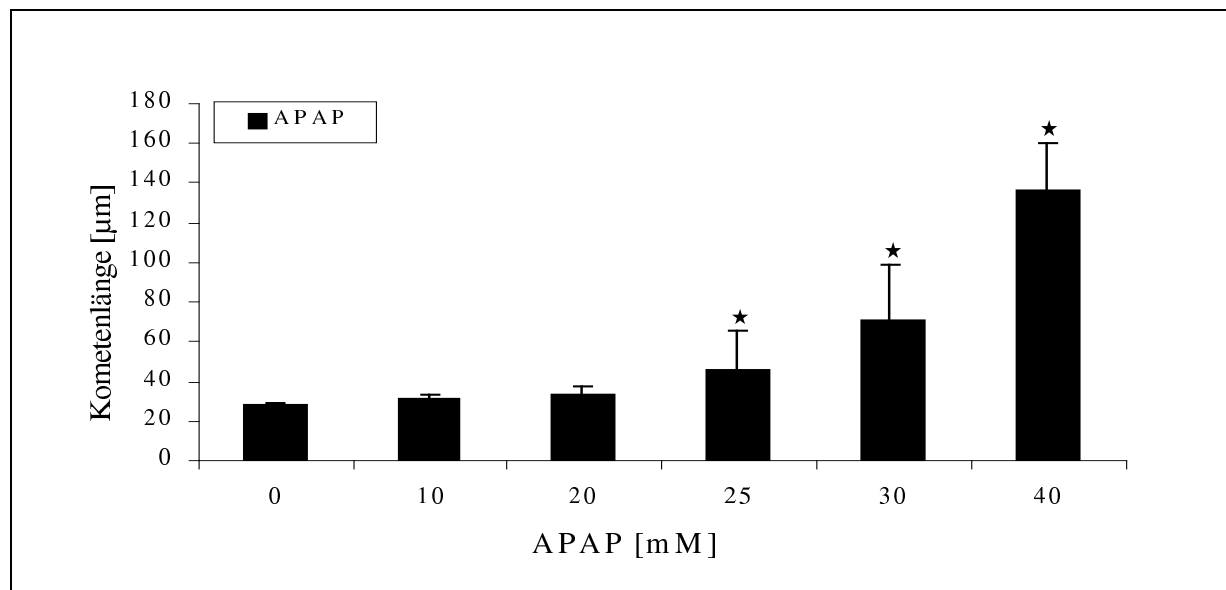


Abbildung 4-17: Kometenlänge nach zwölfstündiger Paracetamolexposition (Comet Assay)

(Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Im Comet Assay konnten nach zwölfstündiger Schädigung der Leberzellen mit Paracetamol in den Konzentrationen 25 mM, 30 mM und 40 mM größere Kometen gemessen werden als ohne Behandlung mit Paracetamol. Die Zellkerne der mit den Konzentrationen 10 mM und 20 mM behandelten Hepatozyten unterschieden sich nicht von denen der Kontrollzellen ohne Paracetamol (siehe Abbildung 4-17).

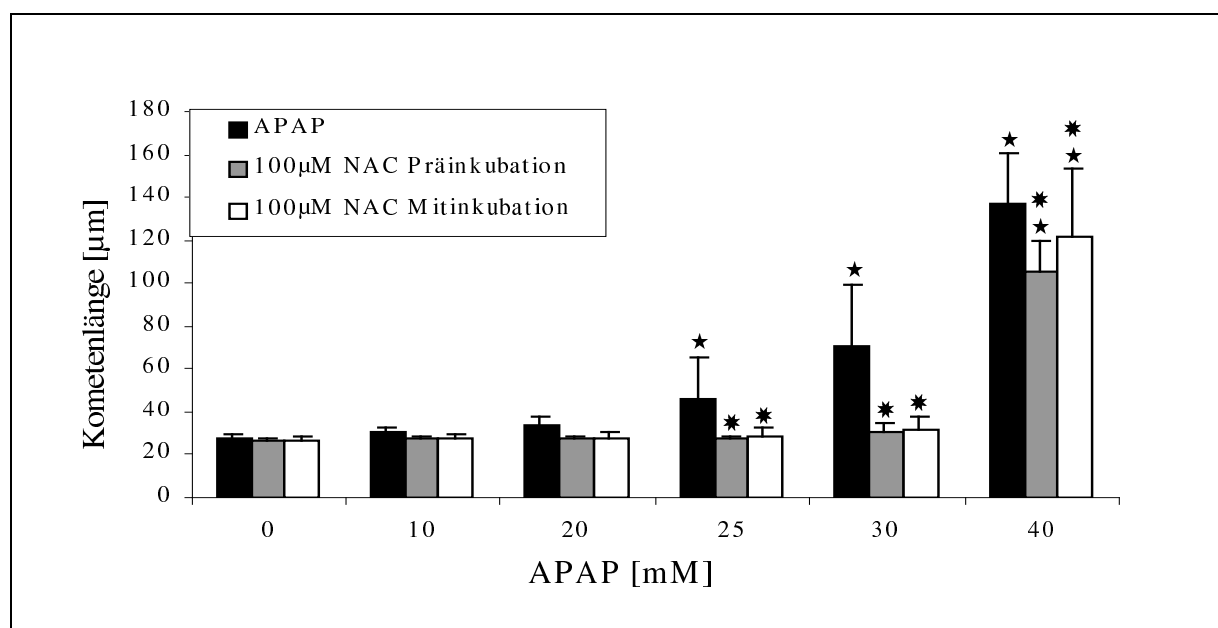


Abbildung 4-18: Kometenlänge nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 100 μM N-Acetylcystein (Comet Assay)

(Mittelwerte \pm s; n=6-8; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; *p < 0,05 vs. jeweiliger Wert ohne NAC; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

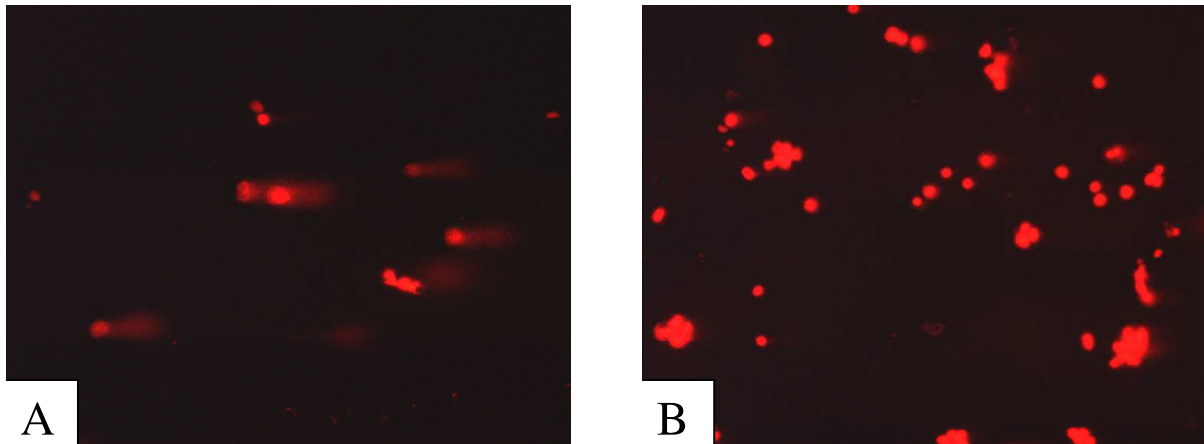


Abbildung 4-19: Kometenlänge nach zwölfstündiger Inkubation mit 30 mM Paracetamol (A) und nach zusätzlich durchgeführter Präinkubation mit 100 µM N-Acetylcystein (B) (Comet Assay); fluoreszenzmikroskopisches Bild

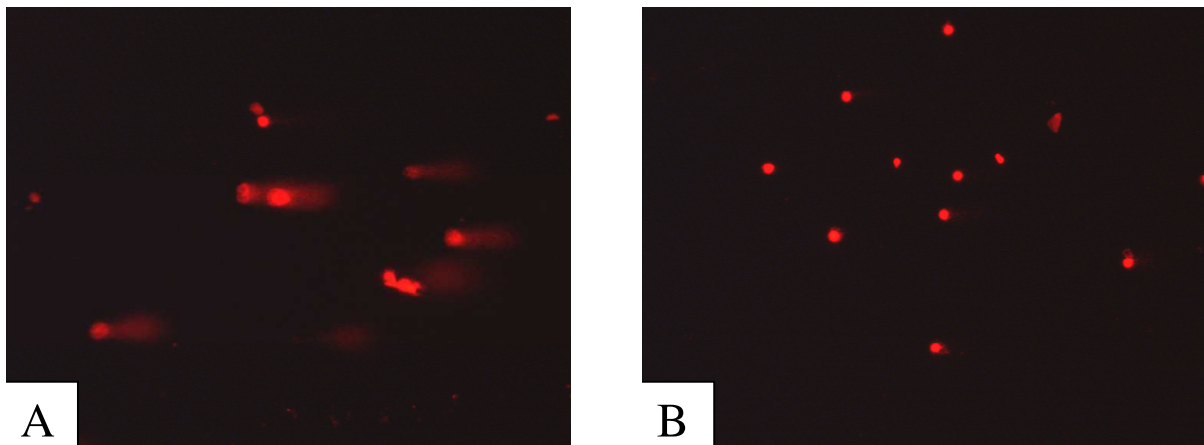


Abbildung 4-20: Kometenlänge nach zwölfstündiger Inkubation mit 30 mM Paracetamol (A) und nach zusätzlich durchgeführter Mitinkubation mit 100 µM N-Acetylcystein (B) (Comet Assay); fluoreszenzmikroskopisches Bild

Die Zellen, die mit 100 µM N-Acetylcystein behandelt worden waren, hatten erst bei einer Paracetamolkonzentration von 40 mM Kometen mit einer signifikant größeren Länge als die Zellen, die nicht mit Paracetamol geschädigt worden waren. Unabhängig davon, ob die N-Acetylcystein-Behandlung vor oder gleichzeitig mit der Schädigung durch Paracetamol stattfand, unterschieden sich die Kernlängen bei den Paracetamolkonzentrationen von 25 mM, 30 mM und 40 mM von denen, die nicht mit N-Acetylcystein behandelt worden waren. Dort wiesen die mit 100 µM N-Acetylcystein behandelten Zellen eine geringere Kernlänge auf als die unbehandelten (siehe Abbildung 4-18; 4-19; 4-20).

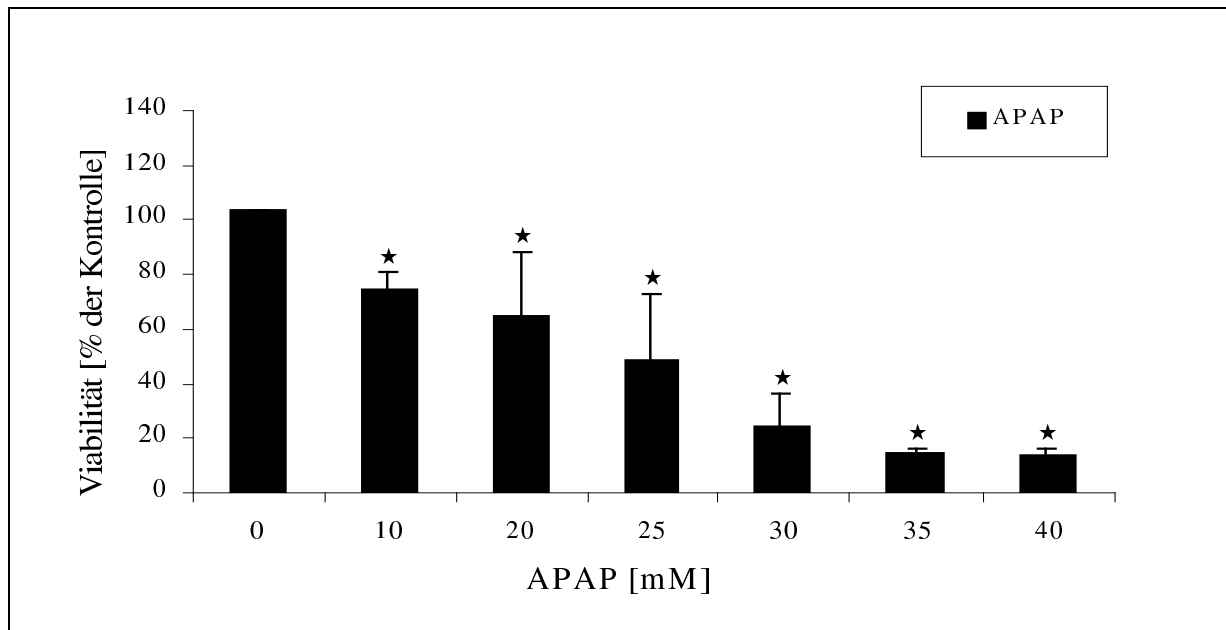
(12h/24h)**Viabilität**

Abbildung 4-21: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und anschließender 24-stündiger Nachinkubation in Medium (MTT-Test)

(Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Auch nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium sank die Viabilität der Hepatozyten ab 10 mM Paracetamol signifikant unter das Level der Kontrollzellen (siehe Abbildung 4-21).

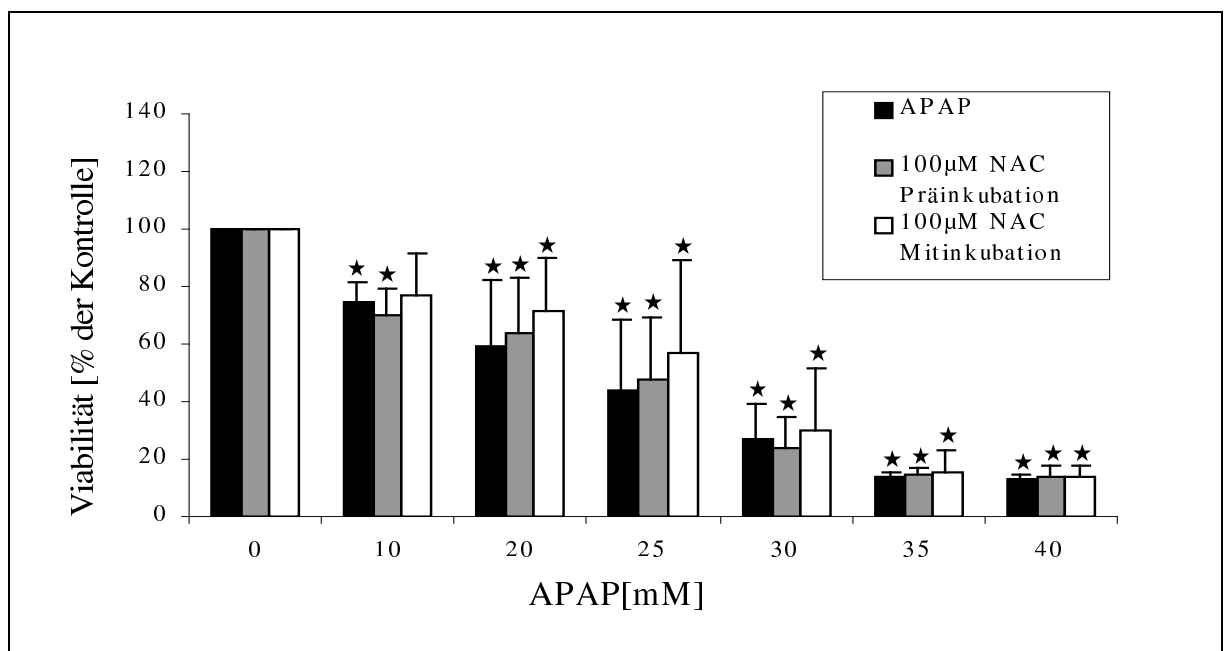


Abbildung 4-22: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 100 µM N-Acetylcystein nach anschließender 24-stündiger Nachinkubation in Medium (MTT-Test)

(Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Wie in den Viabilitätstests direkt nach Schädigungsende fand sich auch hier bei den mit N-Acetylcystein behandelten Zellen kein Unterschied zu den unbehandelten Hepatozyten. Hier fand sich ebenfalls ein Viabilitätsverlust ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM mit Ausnahme der mit 100 μ M NAC mitinkubierten Zellen, die erst ab 20 mM Paracetamol einen signifikanten Viabilitätsabfall im Vergleich zu den nicht mit Paracetamol behandelten Zellen zeigten. Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zu den nicht mit NAC behandelten Zellen bei dieser Paracetamolkonzentration (siehe Abbildung 4-22).

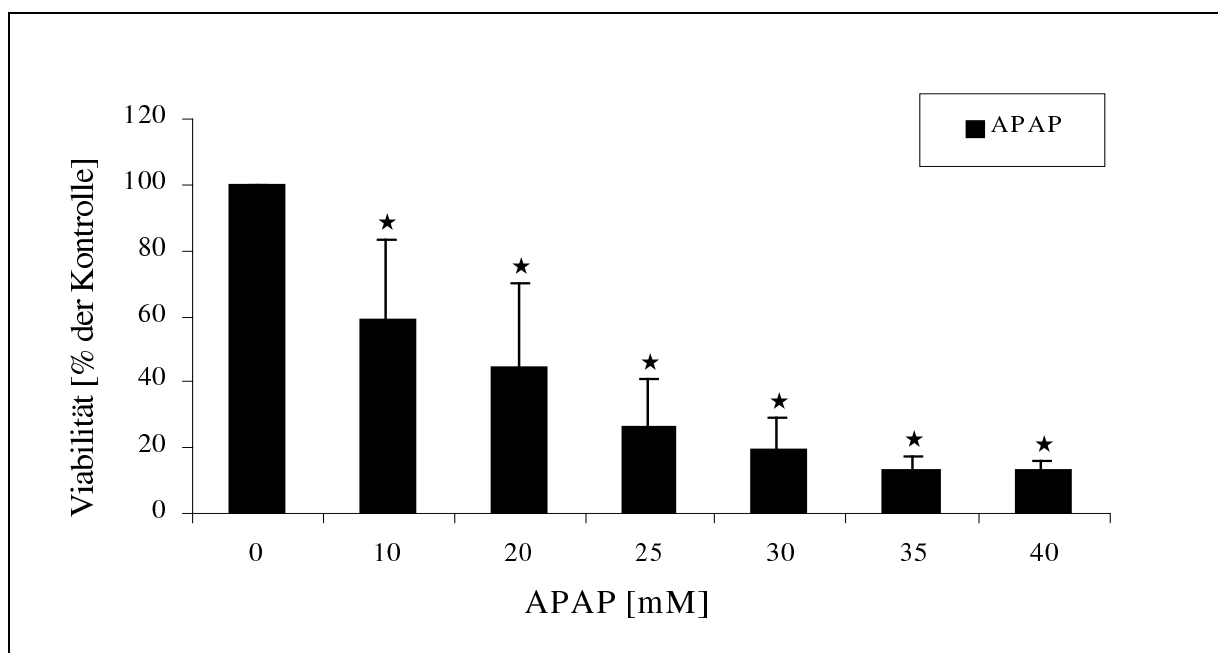


Abbildung 4-23: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und anschließender 24-stündiger Nachinkubation in Medium (Neutralrottest)
(Mittelwerte \pm s; n=5-6; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Der Neutralrottest nach zwölfstündiger Schädigung der Zellen mit Paracetamol und darauf folgender 24-stündige Nachinkubation in Medium zeigte einen signifikanten Viabilitätsabfall ab einer Paracetamolkonzentration von 20 mM bei den nicht mit N-Acetylcystein behandelten Zellen (siehe Abbildung 4-23).

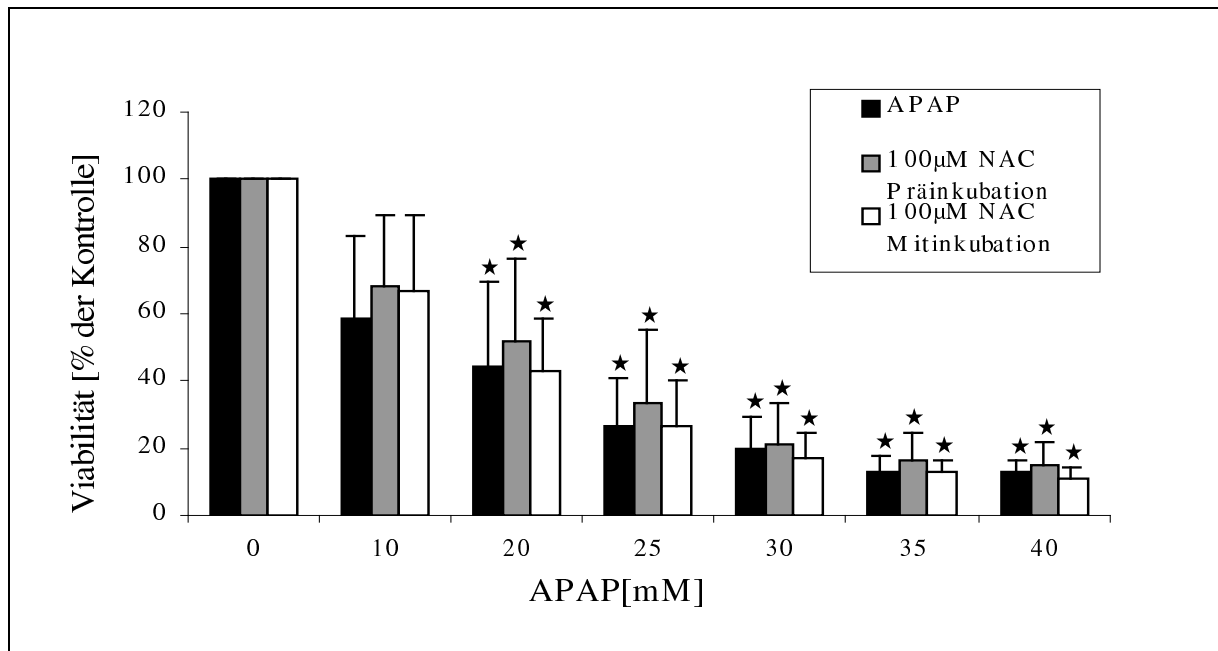


Abbildung 4-24: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 100 µM N-Acetylcystein nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium (Neutralrottest)

(Mittelwerte \pm s; n=5-6; *p <0,05 vs. jeweilige Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Die mit Paracetamol und 100 µM N-Acetylcystein behandelten Hepatozyten unterschieden sich bezüglich der Viabilität im Neutralrottest nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium nicht von den nur mit Paracetamol inkubierten. Auch sie wiesen einen Viabilitätsabfall ab 20 mM Paracetamol auf (siehe Abbildung 4-24).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Leberzellen sowohl im MTT- als auch im Neutralrottest direkt nach Schädigungsende ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM einen signifikanten Viabilitätsabfall zeigten. Im Neutralrottest nach 24-stündiger Nachinkubation kam es ab einer Paracetamolkonzentration von 20 mM zu einem signifikanten Viabilitätsabfall. Im MTT-Test zu diesem Zeitpunkt war der Viabilitätsabfall der mit 100 µM N-Acetylcystein mitinkubierten Zellen bei 10 mM Paracetamol nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Dabei unterschieden sich die mit 100 µM N-Acetylcystein präinkubierten Zellen nicht signifikant von den unbehandelten. Die mit 100 µM N-Acetylcystein gleichzeitig mit dem Paracetamol mitinkubierten Zellen zeigten im

Neutralrottest direkt nach dem Ende der Schädigungszeit eine niedrigere Viabilität der Kontrollzellen, die nur mit N-Acetylcystein, nicht aber mit Paracetamol behandelt worden waren. Die mit Paracetamol und N-Acetylcystein inkubierten Zellen unterschieden sich nicht signifikant von denen, die nur mit Paracetamol inkubiert worden waren. Nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium zeigte sich dieser Unterschied in der Viabilität der Kontrollzellen nicht mehr, weder im Neutralrot-, noch im MTT-Test, wo er auch direkt nach Schädigungsende nicht zu erkennen war.

Im Comet Assay zeigten die mit N-Acetylcystein behandelten Zellen erst bei 40 mM Paracetamol eine Kometenbildung, während die unbehandelten Zellen diese bereits bei 25 mM aufwiesen. Die image length der N-Acetylcystein-behandelten Zellen war bei 25 mM, 30 mM und 35 mM Paracetamol geringer als die der unbehandelten Zellen. Dies galt sowohl für die prä- als auch die mitinkubierten Hepatozyten.

4.3. Paracetamol und 25 μ M Silibin

Analog zu den ersten beiden Versuchsteilen wurden die Zellen nach sieben Stunden für zwölf Stunden mit den oben angegebenen Paracetamolkonzentrationen geschädigt.

Der erste Teil der Zellen erhielt keine weitere Behandlung.

Der zweite Teil wurde gleichzeitig mit dem Paracetamol mit 25 μ M Silibin inkubiert.

Der dritte Teil wurde vor der Paracetamolexposition für fünf Stunden mit 25 μ M Silibin präinkubiert.

(12h/0h)

Viabilität

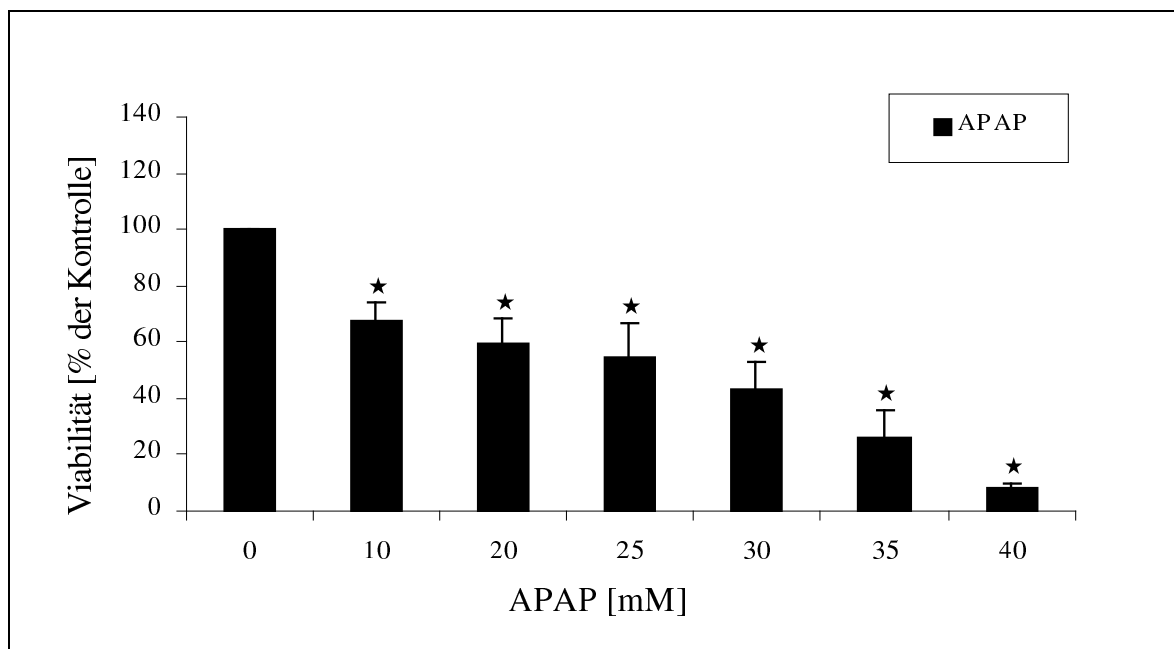


Abbildung 4-25: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition (MTT-Test)
(Mittelwerte \pm s; n=8; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

In dem direkt nach der zwölfstündigen Schädigung mit Paracetamol durchgeführten MTT-Test zeigten die Leberzellen einen signifikanten Viabilitätsverlust ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM (siehe Abbildung 4-25).

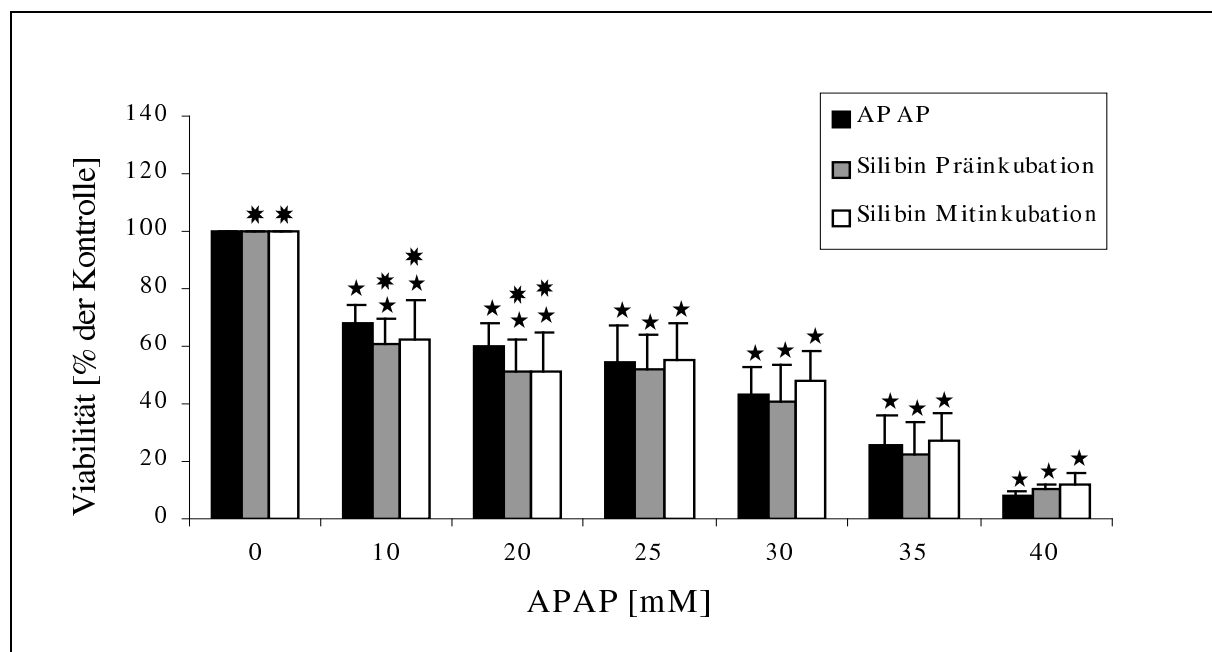


Abbildung 4-26: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 25 μ M Silibin (MTT-Test)

(Mittelwerte \pm s; n=8; *p <0,05 vs. jeweilige Kontrolle; *p <0,05 vs. jeweiliger Wert ohne Silibin; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Die Zellen, die mit Silibin behandelt worden waren, wiesen ebenfalls einen Viabilitätsabfall ab 10 mM Paracetamol auf. Gleichzeitig hatten die mit Silibin prä- oder mitinkubierten Kontrollzellen, die nicht mit Paracetamol inkubiert worden waren und die, die mit Paracetamol in den Konzentrationen 10 mM und 20 mM geschädigt worden waren, eine (auf Rohwertebene) signifikant geringere Viabilität als die, die nicht mit Silibin behandelt worden waren. Bei 30 mM, 35 mM und 40 mM Paracetamol war wiederum kein Unterschied bezüglich der Viabilität zwischen den mit und den nicht mit Silibin behandelten Zellen (siehe Abbildung 4-26) erkennbar.

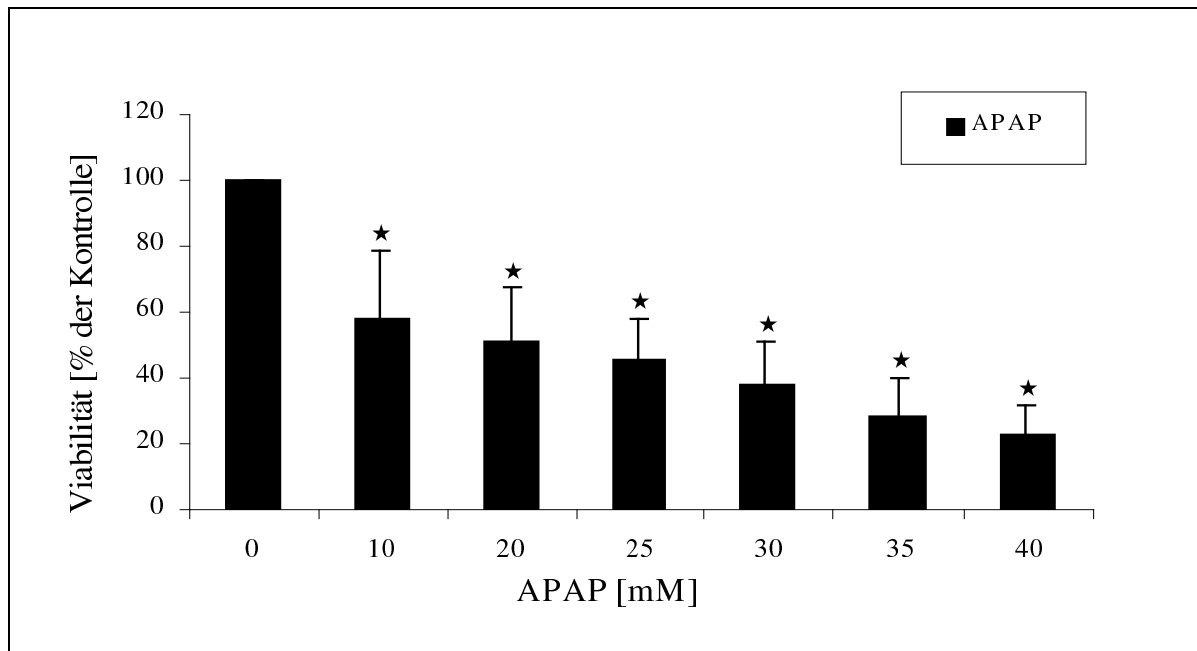


Abbildung 4-27: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition (Neutralrottest) (Mittelwerte \pm s; n=8; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

In dem direkt nach Schädigungsende durchgeführten Neutralrottest zeigte sich eine signifikante Viabilitätsminderung ab 10 mM Paracetamol (siehe Abbildung 4-27).

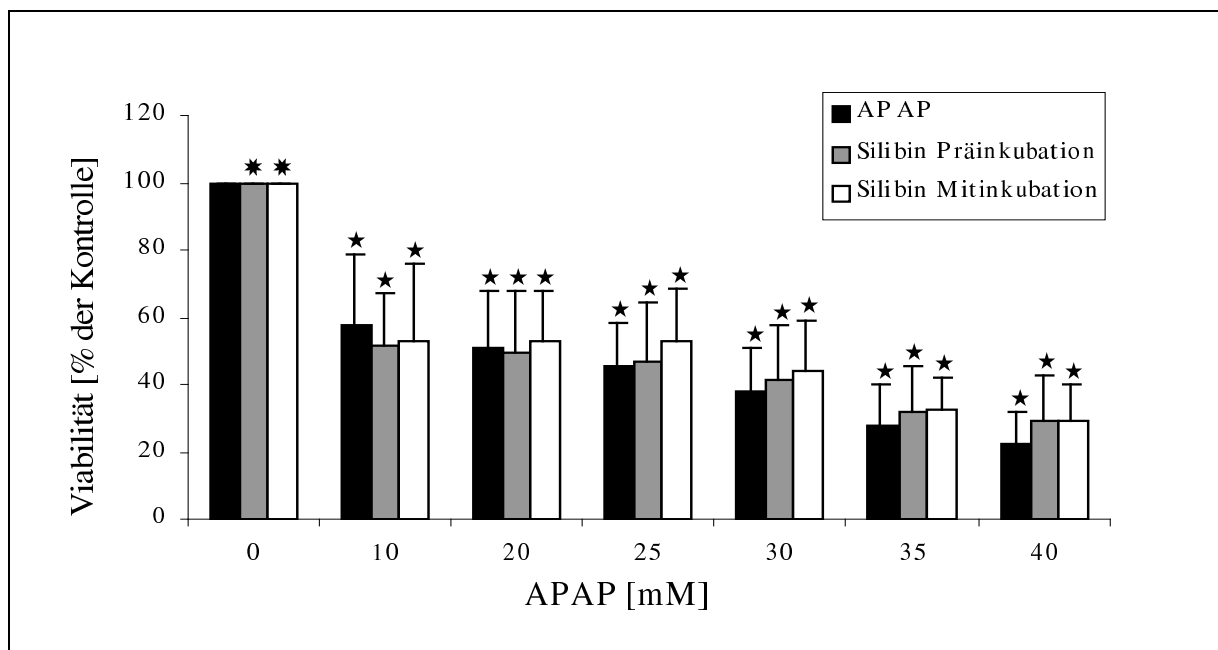


Abbildung 4-28: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 25 μ M Silybin (Neutralrottest) (Mittelwerte \pm s; n=8; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; *p < 0,05 vs. jeweiliger Wert ohne Silybin; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Direkt nach Beendigung der Paracetamolexposition waren die Viabilitäten der mit Silibin behandelten Zellen, die nicht mit Paracetamol geschädigt worden waren, auch im Neutralrottest im Vergleich zu den nicht behandelten signifikant geringer.

Bei den mit Paracetamol geschädigten Zellen ergab sich zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied in der Zellviabilität zwischen mit Silibin behandelten und unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 4-28).

Comet Assay

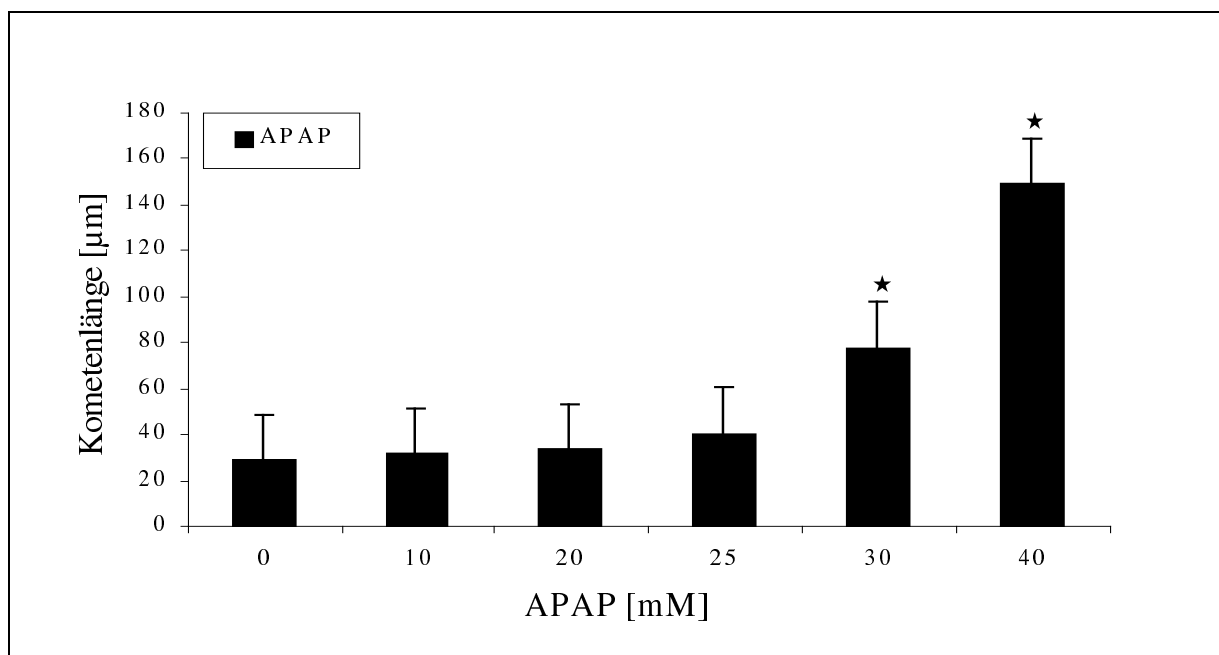


Abbildung 4-29: Kometenlänge nach zwölfstündiger Paracetamolexposition (Comet Assay)
(Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Nach zwölfstündiger Paracetamolexposition fand sich eine Kometenbildung mit signifikanter Verlängerung der Kerne bei einer Paracetamolkonzentration von 30 mM und 40 mM (siehe Abbildung 4-29).

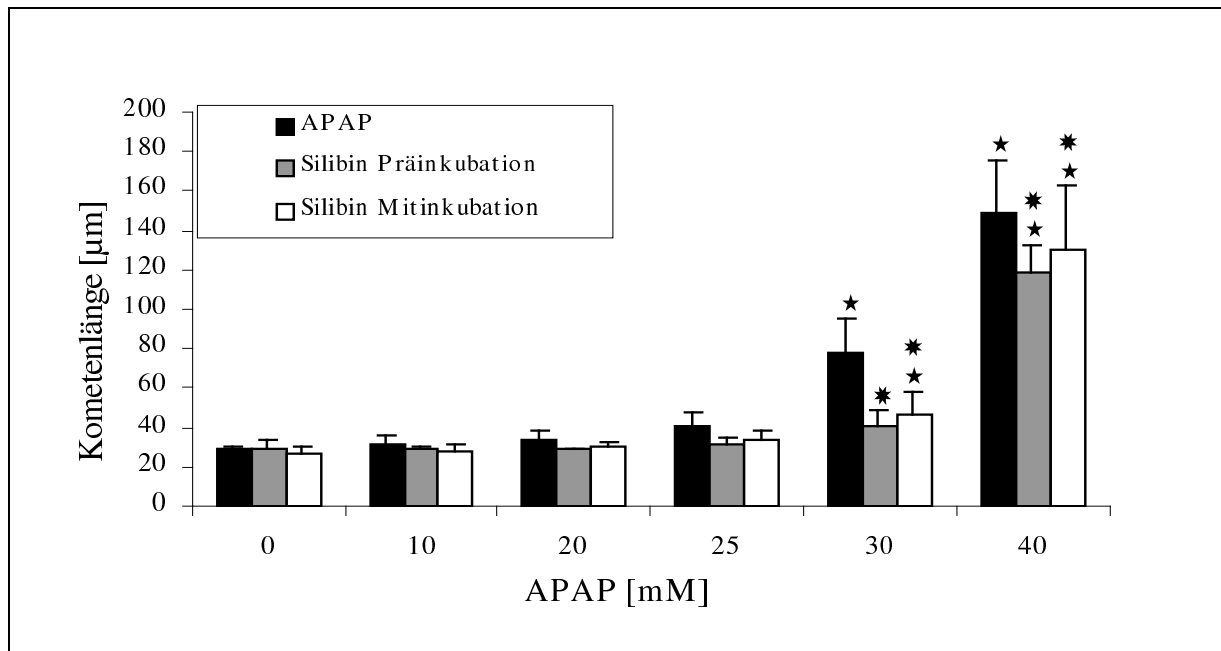


Abbildung 4-30: Kometenlänge nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 25 µM Silibin (Comet Assay)

(Mittelwerte \pm s; n=6; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; *p < 0,05 vs. jeweiliger Wert ohne Silibin; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

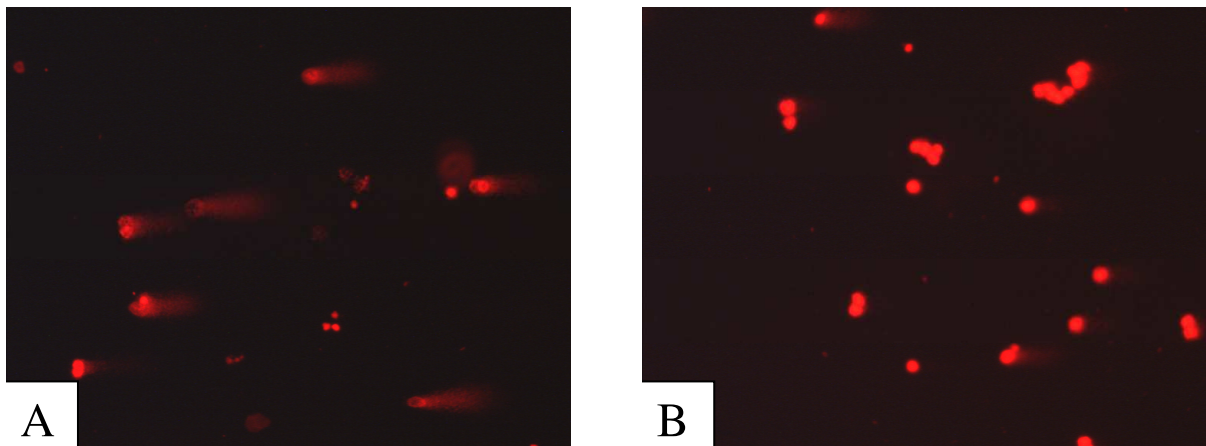


Abbildung 4-31: Kometenlänge nach zwölfstündiger Inkubation mit 30 mM Paracetamol (A) und nach zusätzlich durchgeführter Präinkubation mit 25 µM Silibin (B) (Comet Assay); fluoreszenzmikroskopisches Bild

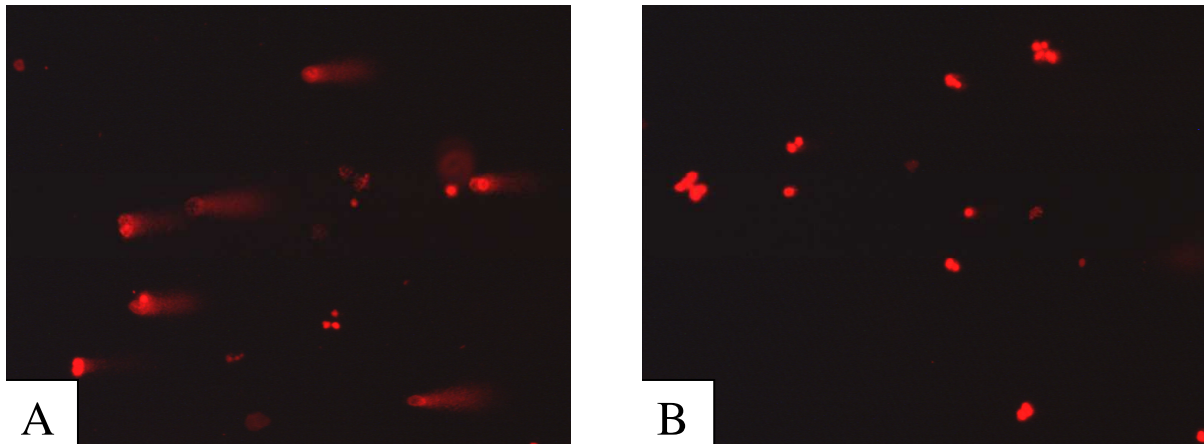


Abbildung 4-32: Kometenlänge nach zwölfstündiger Inkubation mit 30 mM Paracetamol (A) und nach zusätzlich durchgeführter Mitinkubation mit 25 µM Silibin (B) (Comet Assay); fluoreszenzmikroskopisches Bild

Die Zellen, die mit Silibin und Paracetamol gleichzeitig inkubiert worden waren, zeigten eine Erhöhung der Kernlänge bei 30 mM und 40 mM Paracetamol. Diejenigen Zellen, die mit 25 µM Silibin präinkubiert worden waren, hatten erst bei 40 mM Paracetamol eine signifikant erhöhte Kometenlänge.

Die mit 25 µM Silibin prä- oder mitinkubierten Hepatozyten hatten bei einer Paracetamolkonzentration von 30 mM sowie 40 mM eine signifikant kleinere Kometenlänge als die Zellen, die nicht mit Silibin behandelt worden waren (siehe Abbildung 4-30; 4-31; 4-32).

(12h/24h)

Viabilität

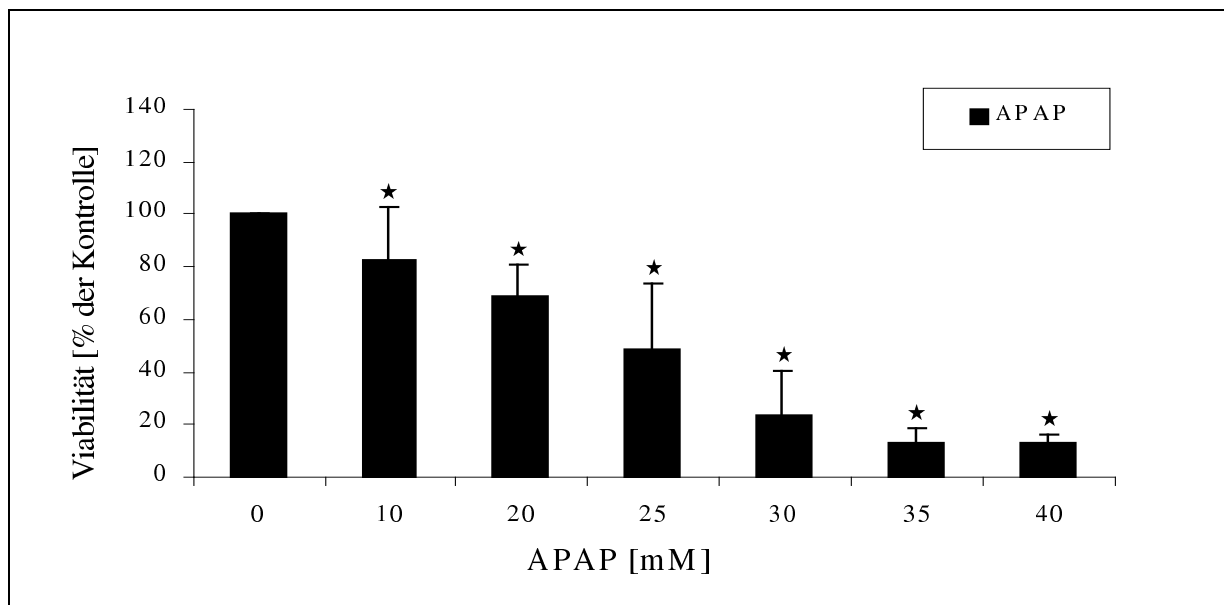


Abbildung 4-33: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und anschließender 24-stündiger Nachinkubation in Medium (MTT-Test)
(Mittelwerte ± s; n=6-7; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Bei dem nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium durchgeführten MTT-Test fand sich wiederum ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM ein signifikanter Viabilitätsabfall im Vergleich zu den nicht geschädigten Zellen (siehe Abbildung 4-33).

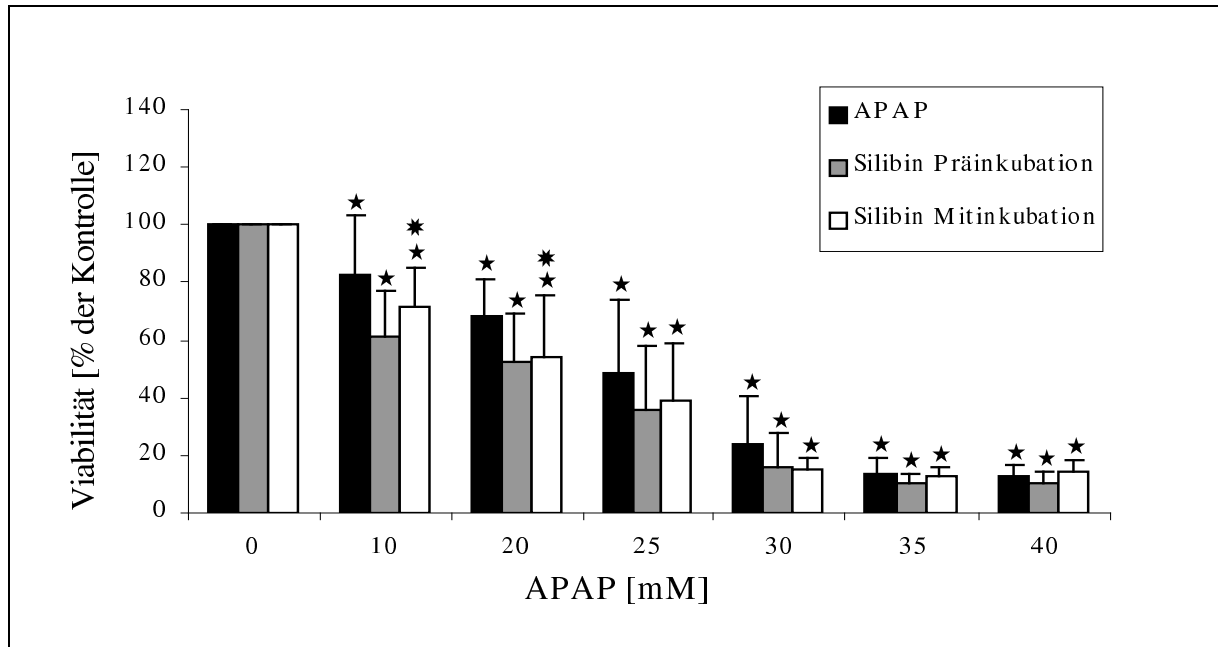


Abbildung 4-34: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 25 μ M Silibin nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium (MTT-Test)

(Mittelwerte \pm s; n=6-7; *p <0,05 vs. jeweilige Kontrolle; *p <0,05 vs. jeweiliger Wert ohne Silibin; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Auch die mit Silibin behandelten Zellen wiesen ab 10 mM Paracetamol eine Verringerung der Viabilität auf.

Mit 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM und ohne Paracetamol bestand kein signifikanter Unterschied in der Viabilität zwischen mit Silibin prä- oder mitinkubierten Zellen und denjenigen, die nicht mit Silibin behandelt worden waren.

Mit 10 mM und 20 mM Paracetamol war die Viabilität der mit Silibin mitinkubierten Zellen geringer als die der nicht mit Silibin behandelten. Zwischen den mit Silibin präinkubierten und den nicht behandelten Zellen fand sich kein solcher Unterschied (siehe Abbildung 4-34).

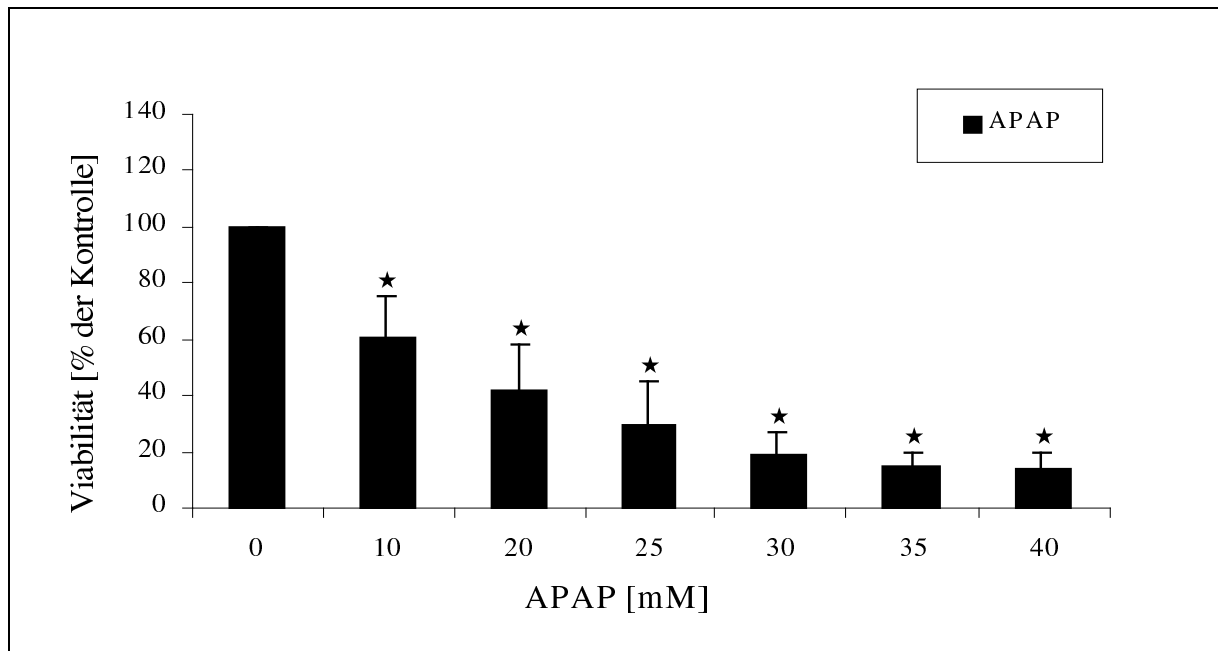


Abbildung 4-35: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und anschließender 24-stündiger Nachinkubation in Medium (Neutralrottest) (Mittelwerte \pm s; n=6-7; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Auch im Neutralrottest zeigten die Hepatozyten nach zwölfstündiger Schädigung mit Paracetamol und darauf folgender 24-stündiger Nachinkubation in Medium eine Viabilitätsminderung ab 10 mM Paracetamol (siehe Abbildung 4-35).

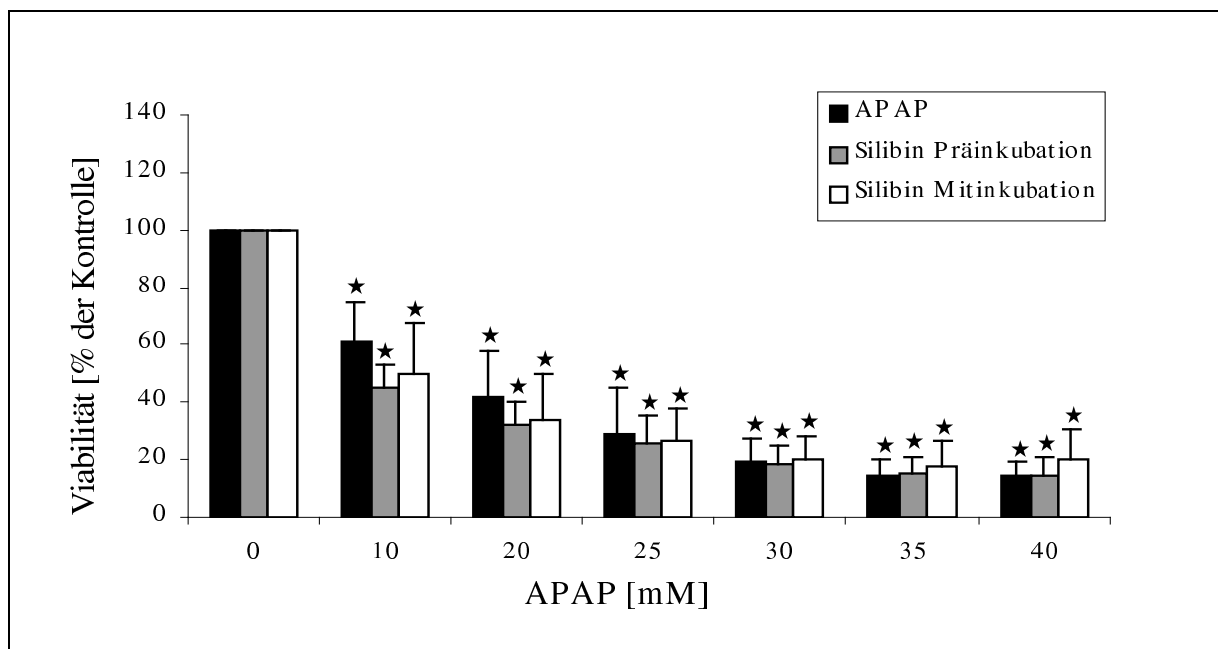


Abbildung 4-36: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Prä- oder Mitinkubation mit 25 μ M Silibin nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium (Neutralrottest) (Mittelwerte \pm s; n=6-7; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Im Gegensatz zum gleichzeitig durchgeführten MTT-Test und zum direkt nach Schädigungsende durchgeführten Neutralrottest gab es in dem Neutralrottest, der nach der

Nachinkubation durchgeführt wurde, keinen Unterschied bezüglich der Viabilität der mit Silibin behandelten und der nicht-behandelten Leberzellen. Auch die mit Silibin prä- oder mitinkubierten Zellen hatten ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM einen Viabilitätsverlust im gleichen Ausmaß wie die nicht mit Silibin behandelten Zellen (siehe Abbildung 4-36).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es auch in diesem Versuchsteil sowohl im MTT- als auch im Neutralrottest direkt nach Schädigungsende und nach 24-stündiger Nachinkubation der Zellen in Medium unabhängig von einer Silibinbehandlung zu einem signifikanten Viabilitätsverlust ab 10 mM Paracetamol kommt. Direkt nach Schädigungsende hatten im MTT-Test die Kontrollzellen, die nicht mit Paracetamol behandelt worden waren, und die mit Silibin prä- oder mitinkubierten Zellen, die mit Paracetamol in den Konzentrationen 10 mM und 20 mM geschädigt worden waren, eine geringere Viabilität als die nur mit Paracetamol inkubierten Hepatozyten, während im Neutralrottest nur die mit Silibin behandelten Kontrollzellen eine Viabilitätsminderung aufwiesen. Nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium zeigten die mit Silibin und Paracetamol gleichzeitig inkubierten Zellen bei den Paracetamolkonzentrationen von 10 mM und 20 mM eine verminderte Viabilität gegenüber den nicht mit Silibin behandelten Zellen. Im zur gleichen Zeit durchgeführten Neutralrottest fand sich kein Unterschied zwischen mit Silibin behandelten und nicht-behandelten Zellen.

Im Comet Assay hatten die Zellen unter 30 mM und 40 mM Paracetamol, die nicht mit Silibin behandelt worden waren und diejenigen, die mit Silibin mitinkubiert worden waren, eine signifikant größere Kernlänge als die jeweiligen Kontrollzellen ohne Paracetamol, die mit Silibin präinkubierten Hepatozyten hingegen erst ab 40 mM Paracetamol. Die mit Silibin behandelten Zellen hatten bei 30 mM und 40 mM Paracetamol eine geringere Kernlänge als die nur mit Paracetamol inkubierten.

4.4. Paracetamol und 50 μ M α -Tocopherol-Succinat

In diesem Teil des Versuchs wurden die sieben Stunden alten Zellen mit den gleichen Paracetamolkonzentrationen wie in den vorherigen drei Versuchsteilen für 12 Stunden geschädigt.

Der eine Teil der Zellen erhielt keine weitere Behandlung.

Der andere Teil wurde gleichzeitig mit Paracetamol und 50 μ M α -Tocopherol-Succinat inkubiert („Mitinkubation“).

(12h/0h)

Viabilität

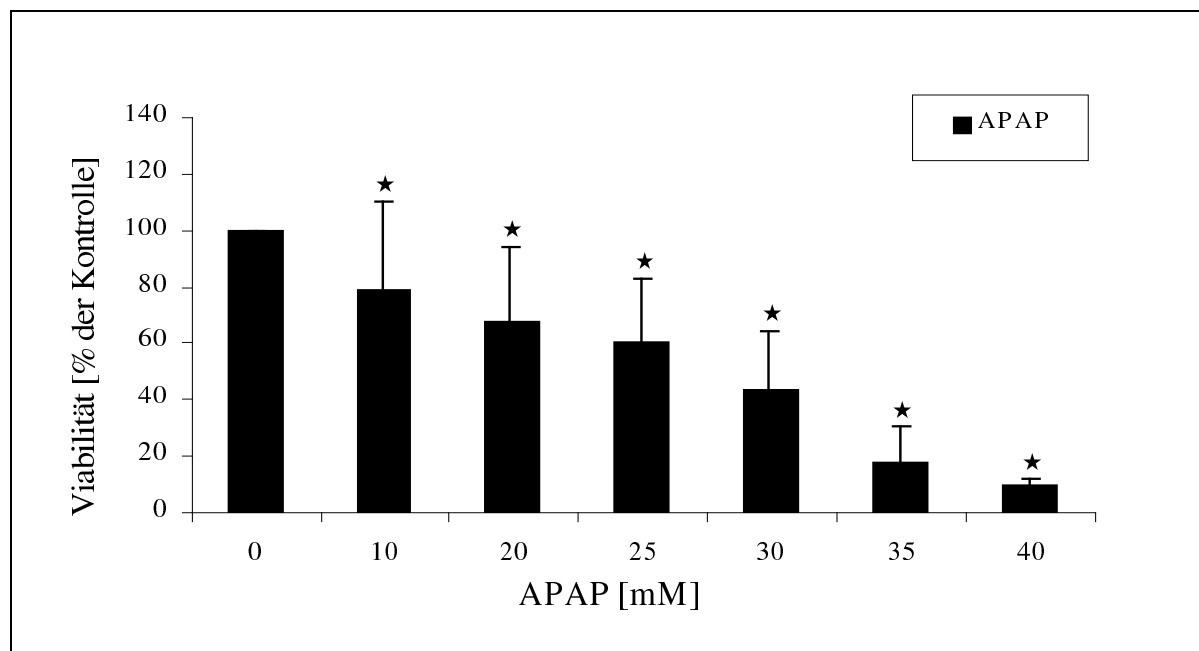


Abbildung 4-37: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition (MTT-Test)
(Mittelwerte \pm s; n=6-9; *p <0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

In dem direkt nach Ende der zwölfstündigen Schädigung mit Paracetamol durchgeführten MTT-Test zeigte sich ein signifikanter Viabilitätsverlust der Leberzellen ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM an aufwärts (siehe Abbildung 4-37).

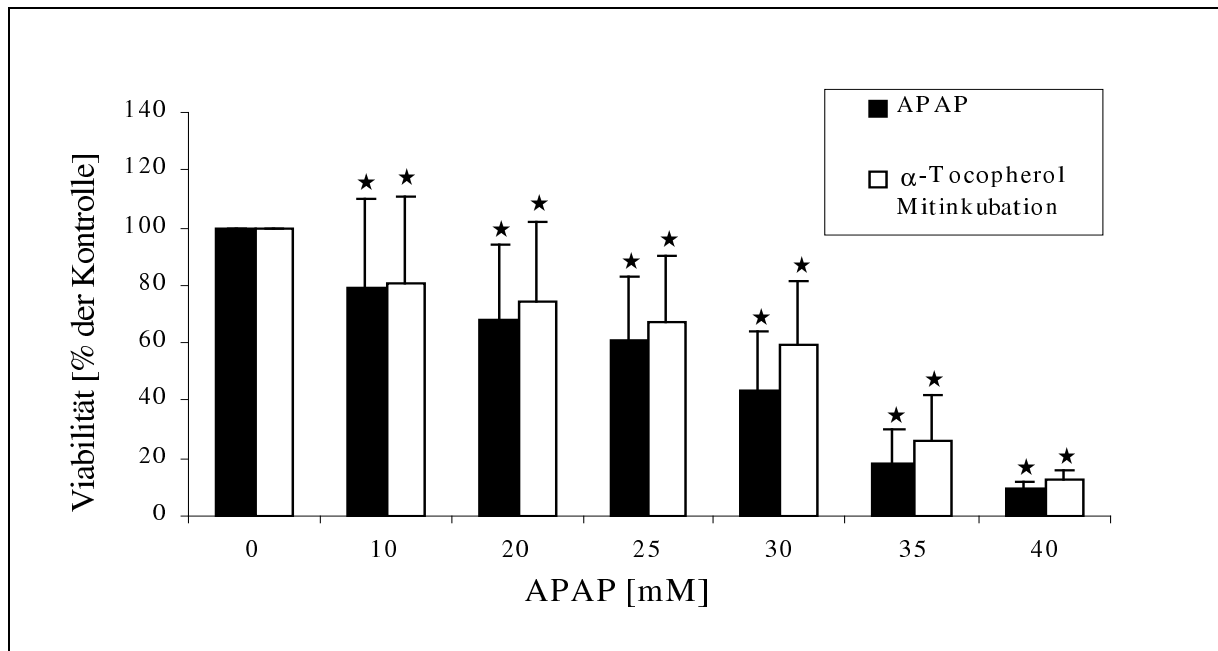


Abbildung 4-38: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Mitinkubation mit 50 µM α-Tocopherol-Succinat (MTT-Test) (Mittelwerte ± s; n=6-9; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Auch die gleichzeitig mit dem Paracetamol mit 50µM α-Tocopherol-Succinat inkubierten Zellen hatten ab 10 mM Paracetamol eine verminderte Viabilität.

Ein Unterschied zwischen der Viabilität der mit α-Tocopherol-Succinat behandelten und der unbehandelten Zellen ergab sich in keiner der Paracetamolkonzentrationen (siehe Abbildung 4-38).

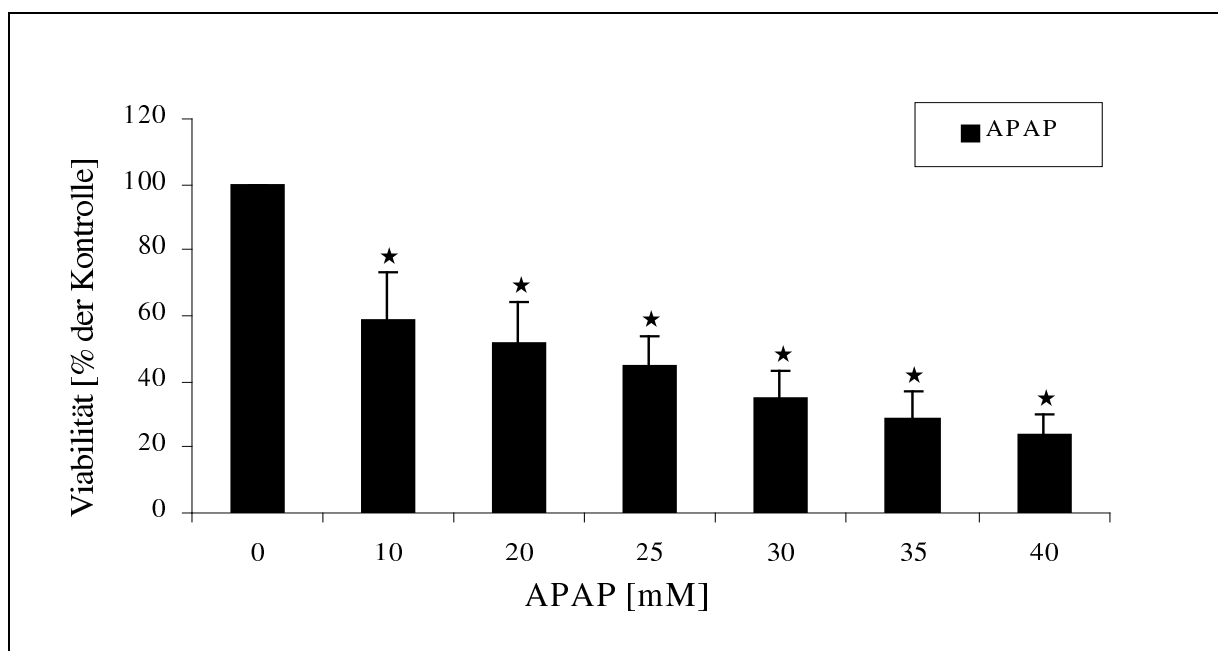


Abbildung 4-39: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition (Neutralrottest) (Mittelwerte ± s; n=4-7; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Analog zum MTT-Test fand sich zu diesem Zeitpunkt bei den Hepatozyten im Neutralrottest eine Senkung der Viabilität ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM (siehe Abbildung 4-39).

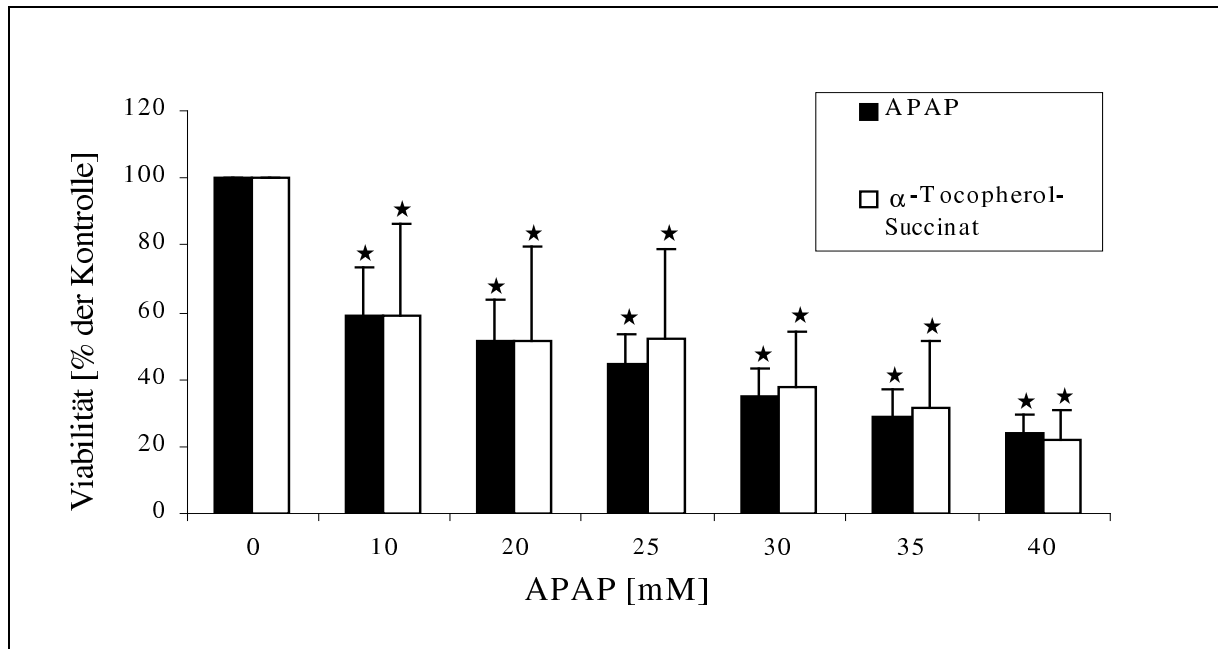


Abbildung 4-40: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Mitinkubation mit 50 µM α-Tocopherol-Succinat (Neutralrottest)
(Mittelwerte ± s; n=4-7; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Wie die nur mit Paracetamol inkubierten Zellen zeigte sich bei den mit 50 µM α-Tocopherol-Succinat mitinkubierten Hepatozyten eine signifikante Verminderung der Viabilität ab 10 mM Paracetamol.

Ein Unterschied bezüglich der Viabilität zwischen den mit α-Tocopherol-Succinat behandelten und den nicht behandelten Zellen ergab sich sofort nach Schädigungsende im Neutralrottest nicht (siehe Abbildung 4-40).

Comet Assay

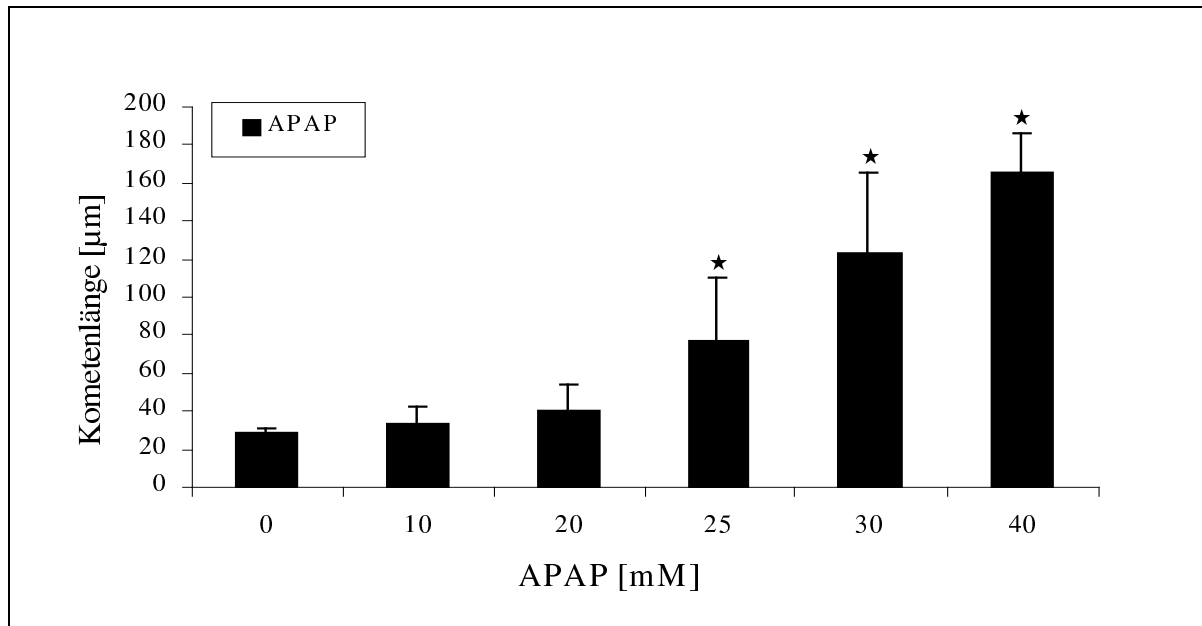


Abbildung 4-41: Kometenlänge nach zwölfstündiger Paracetamolexposition (Comet Assay)
(Mittelwerte \pm s; n=5-8; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Sowohl bei 25 mM als auch bei 30 mM und 40 mM Paracetamol bestand nach zwölfstündiger Schädigungszeit im Comet Assay eine im Vergleich zur den nicht mit Paracetamol behandelten Zellen eine signifikant größere Kernlänge (siehe Abbildung 4-41).

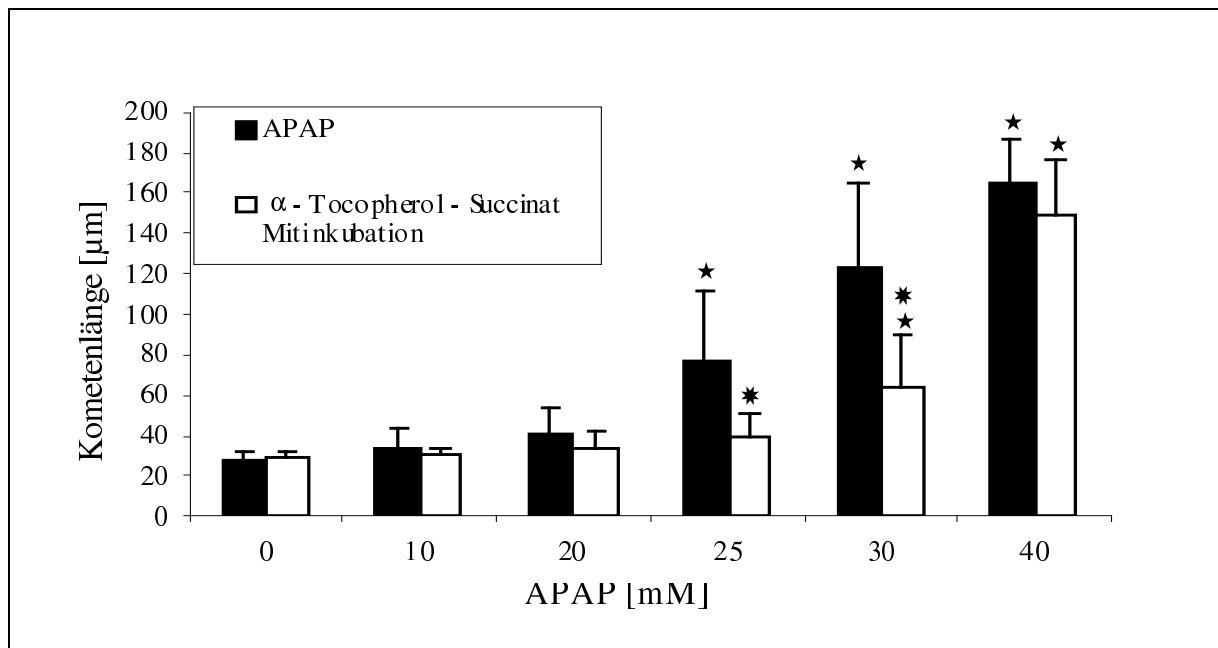


Abbildung 4-42: Kometenlänge nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Mitinkubation mit 50 μ M α -Tocopherol-Succinat (Comet Assay)
(Mittelwerte \pm s; n=5-8; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; *p < 0,05 vs. jeweiliger Wert ohne α -Tocopherol-Succinat; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

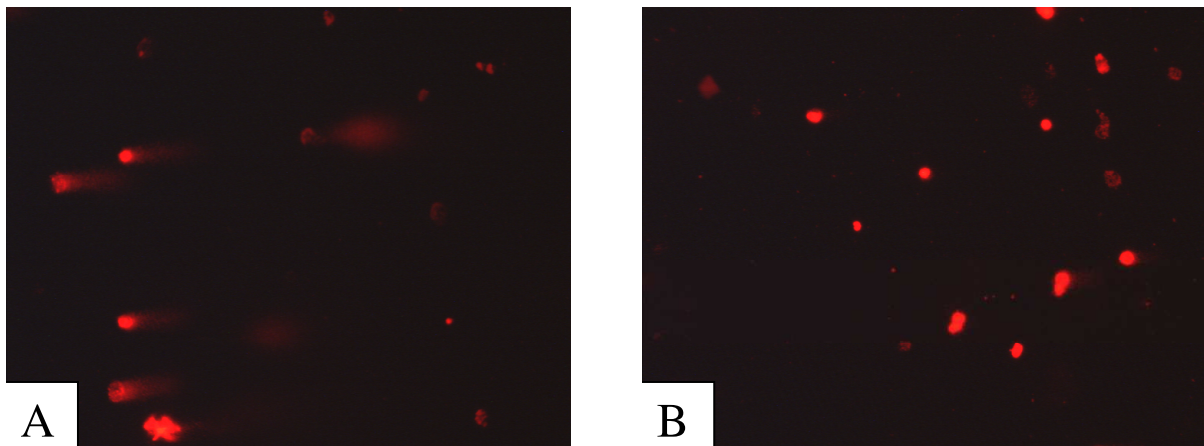


Abbildung 4-43: Kometenlänge nach zwölfstündiger Inkubation mit 30 mM Paracetamol (A) und nach zusätzlich durchgeführter Mitinkubation mit 50 µM α -Tocopherol-Succinat (B) (Comet Assay); fluoreszenzmikroskopisches Bild

Die Zellen, die mit 50 µM α -Tocopherol-Succinat mitinkubiert worden waren, zeigten bei 30 mM und bei 40 mM eine Kometenbildung mit größerer Kernlänge als die nicht mit Paracetamol behandelten Kontrollzellen.

Die mit 50 µM α -Tocopherol-Succinat mitinkubierten Hepatozyten hatten bei 25 mM sowie bei 30 mM Paracetamol eine signifikant kleinere Kernlänge als die nur mit Paracetamol geschädigten Zellen. Bei 40 mM Paracetamol bestand dieser Unterschied nicht (siehe Abbildung 4-42; 4-43).

(12h/24h)

Viabilität

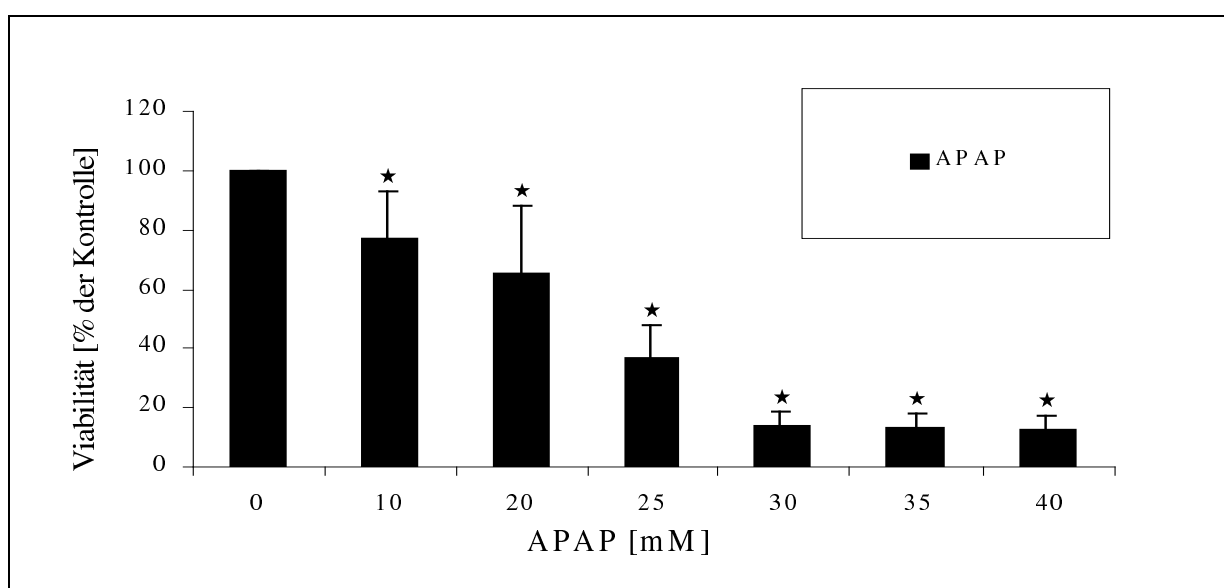


Abbildung 4-44: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und anschließender 24-stündiger Nachinkubation in Medium (MTT-Test) (Mittelwerte \pm s; n=5-7; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

In dem nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und anschließender 24-stündiger Nachinkubation in Medium durchgeführten MTT-Test zeigte sich ein signifikanter Viabilitätsverlust der Leberzellen ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM (siehe Abbildung 4-44).

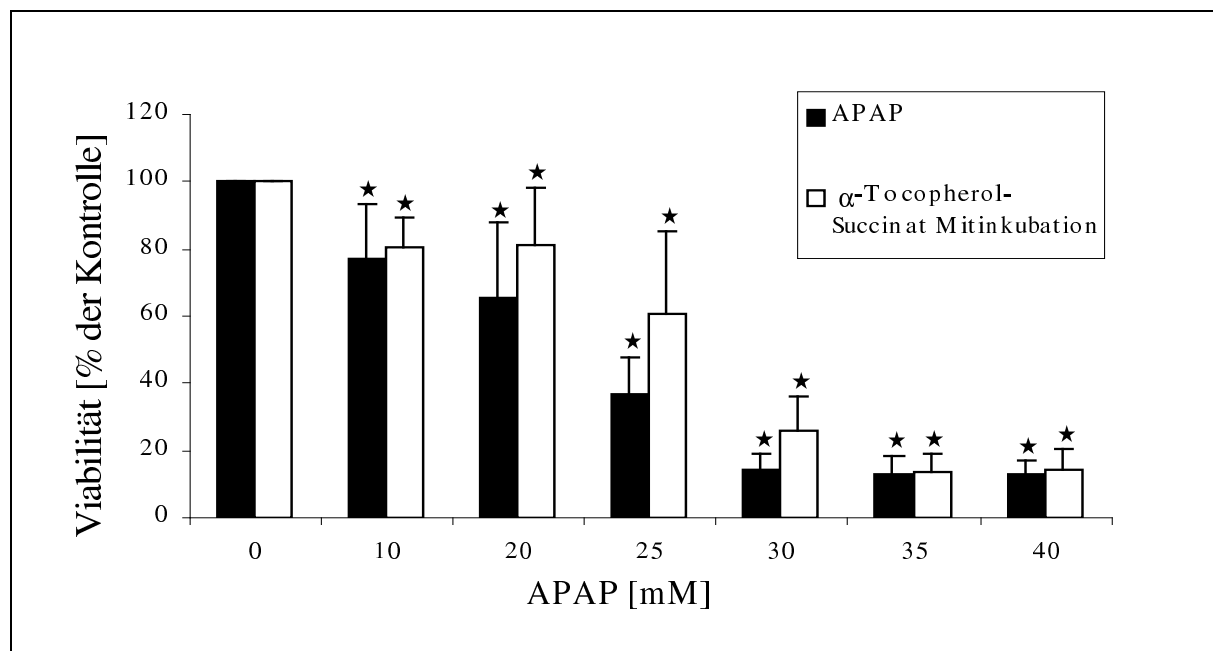


Abbildung 4-45: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Mitinkubation mit 50 μ M α -Tocopherol-Succinat nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium (MTT-Test)

(Mittelwerte \pm s; n=5-7; *p <0,05 vs. jeweilige Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Auch die mit Paracetamol und 50 μ M α -Tocopherol-Succinat gleichzeitig inkubierten Zellen hatten ab 10 mM Paracetamol an aufwärts eine verminderte Viabilität.

Bezüglich der Viabilität im MTT-Test fand sich zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied zwischen den mit α -Tocopherol-Succinat behandelten und der nicht-behandelten Zellen (siehe Abbildung 4-45).

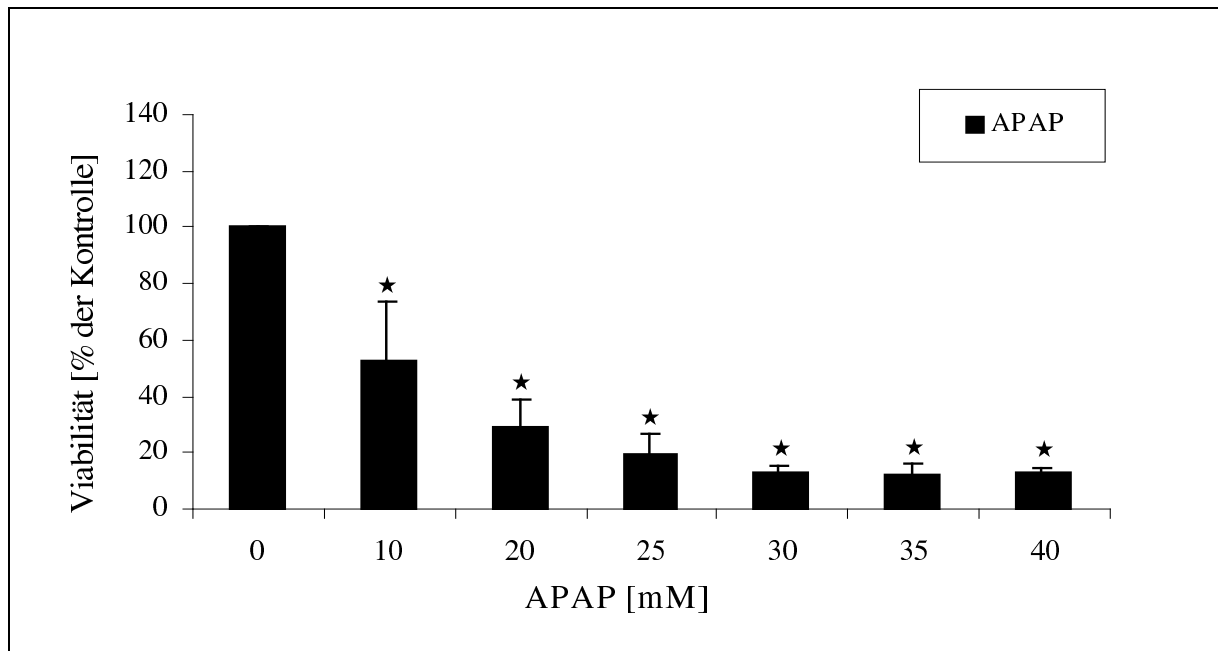


Abbildung 4-46: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und anschließender 24-stündiger Nachinkubation in Medium (Neutralrottest) (Mittelwerte \pm s; n=4-7; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Analog zum MTT-Test fand sich nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium im Neutralrottest eine Senkung der Viabilität der Hepatozyten ab 10 mM Paracetamol (siehe Abbildung 4-46).

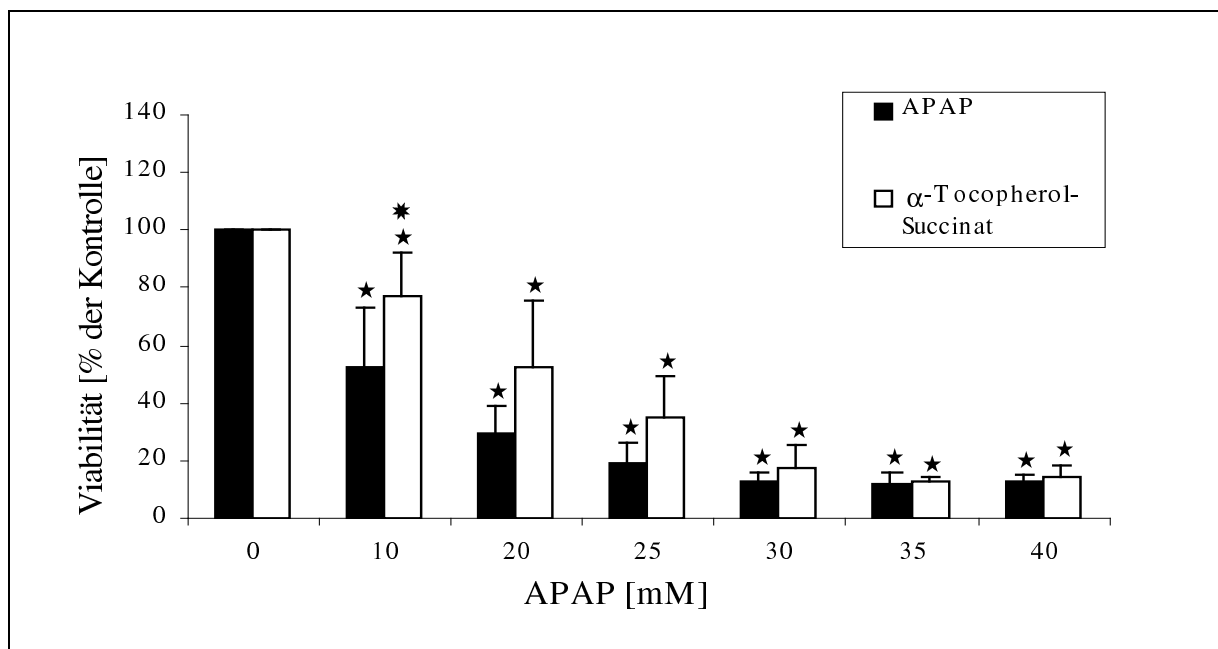


Abbildung 4-47: Viabilität der Hepatozyten nach zwölfstündiger Paracetamolexposition und nach zusätzlich durchgeführter Mitinkubation mit 50 μ M α -Tocopherol-Succinat nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium (Neutralrottest) (Mittelwerte \pm s; n=4-7; *p < 0,05 vs. jeweilige Kontrolle; *p < 0,05 vs. jeweiliger Wert ohne α -Tocopherol-Succinat; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Im Neutralrottest zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine Verminderung der Zellviabilität ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM an aufwärts, wobei die Viabilitätsminderung bei 10 mM Paracetamol bei den mit α -Tocopherol-Succinat behandelten Zellen signifikant geringer war als bei den nur mit Paracetamol inkubierten Hepatozyten.

In allen anderen Paracetamolkonzentrationen fand sich dieser Unterschied nicht (siehe Abbildung 4-47).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß auch in diesem Versuchsteil eine signifikante Viabilitätsminderung unabhängig von einer Behandlung der Zellen mit α -Tocopherol-Succinat ab einer Paracetamolkonzentration von 10 mM sowohl im MTT- als auch im Neutralrottest direkt nach Ende der zwölfstündigen Schädigung und auch nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium verzeichnet werden konnte. Hierbei gab es direkt nach der Schädigung keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Viabilität der mit α -Tocopherol-Succinat behandelten und nicht-behandelten Hepatozyten. Nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium fand sich im MTT-Test wiederum kein Unterschied zwischen den Zellen, die mit α -Tocopherol-Succinat und Paracetamol gleichzeitig inkubiert und denen, die nur mit Paracetamol inkubiert worden waren. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich im Neutralrottest bei den mit 10 mM Paracetamol inkubierten Hepatozyten eine signifikant geringere Viabilität als bei den mit α -Tocopherol-Succinat mitinkubierten Zellen.

Im Comet Assay fanden sich signifikant gegenüber den Kontrollzellen vergrößerte Kernlängen bei den nicht mit α -Tocopherol-Succinat behandelten Zellen ab einer Paracetamolkonzentration von 25 mM an aufwärts, bei den mit α -Tocopherol-Succinat behandelten Zellen ab 30 mM Paracetamol. Die Kernlängen der mit α -Tocopherol-Succinat mitinkubierten Leberzellen waren dabei bei 25mM und 30mM signifikant kleiner als die der nur mit Paracetamol inkubierten Zellen.

4.5. Austestung der Zytotoxizität von N-Acetylcystein

Um die Zytotoxizität von N-Acetylcystein auszutesten, wurden 2 Stunden alte Leberzellen für 20 Stunden mit N-Acetylcystein in den Konzentrationen 0 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM, 10 mM, 100 mM inkubiert und sofort nach Ende der Inkubationszeit und nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium ein MTT-Test durchgeführt.

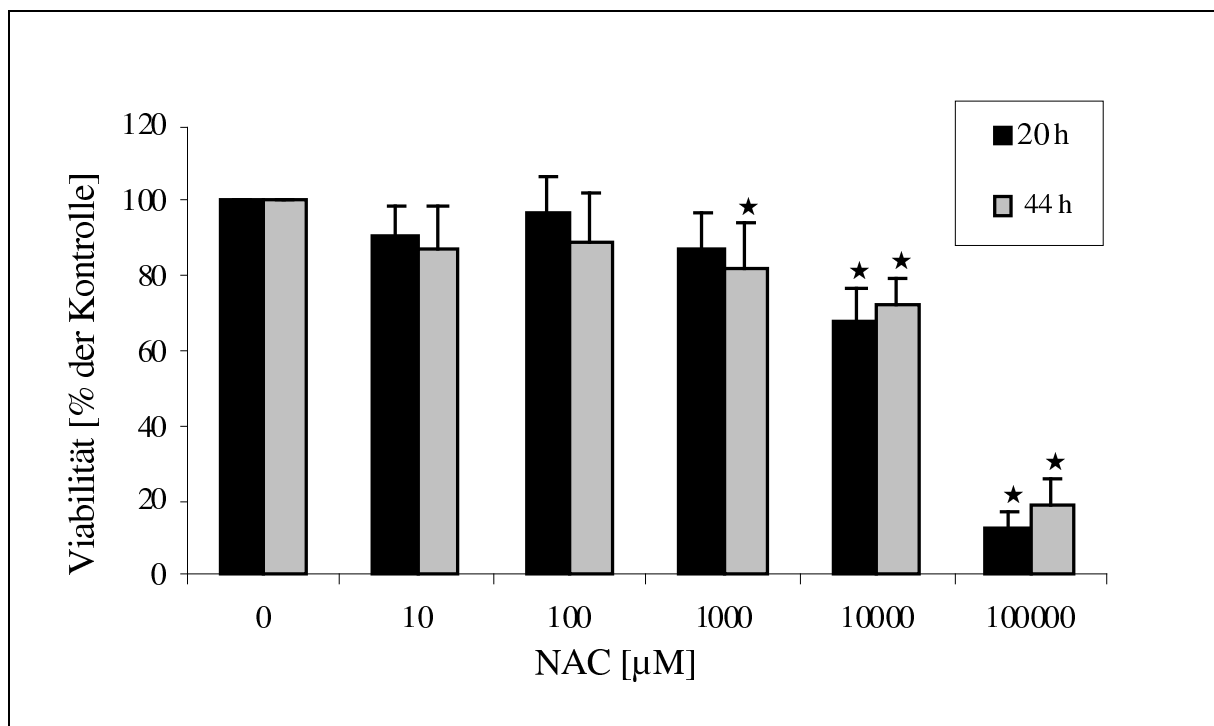


Abbildung 4-48: Viabilität der Hepatozyten direkt nach 20-stündiger Behandlung mit N-Acetylcystein und nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium (MTT-Test)

(Mittelwerte \pm s; n=5-6; *p <0,05 vs. jeweiliger Wert ohne NAC; ANOVA mit nachgeschaltetem Fisher's PLSD-Test)

Es fand sich im MTT-Test direkt nach Ende der 20-stündigen Behandlung der Hepatozyten mit N-Acetylcystein bei den Konzentrationen 10 mM und 100 mM eine signifikante Viabilitätsminderung gegenüber den Zellen, die nicht mit N-Acetylcystein behandelt worden waren.

Nach 24-stündiger Nachinkubation in Medium zeigte der MTT-Test eine signifikante Verringerung der Zellviabilität bei 1 mM und, wie bereits direkt nach Behandlungsende, bei 10 mM und 100 mM N-Acetylcystein (siehe Abbildung 4-48).

5. Diskussion

Paracetamol ist in hohen Dosierungen hepatotoxisch. Es ist allgemein akzeptiert, daß die Bildung des reaktiven Metaboliten N-Acetyl-p-benzo-chinonimin (NAPQI) durch Cytochrom-p450-abhängige Oxygenasen in die Ausbildung des Leberschadens involviert ist (Dahlin *et al.*, 1984; Holme *et al.*, 1984). Dieser Metabolit wird erst bei hohen Paracetamol-Dosen, bei denen die primären Abbauewege (Glucuronidierung und Sulfatierung) gesättigt sind, gebildet. Das in der Leber vorhandene Glutathion kann NAPQI durch Konjugation detoxifizieren. Nach Depletion des zelleigenen GSHs reichert sich das NAPQI in der Zelle an und schädigt diese. Der genaue Schädigungsmechanismus ist im Einzelnen zur Zeit noch nicht genau geklärt.

Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, darunter die durch oxidativen Streß unter Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) durch NAPQI induzierte Lipidperoxidation. Diese wurde früher als alleiniger Schädigungsmechanismus angenommen, jedoch heute zugunsten der anderen Theorien zurückgedrängt; dennoch scheint der oxidative Streß einer der zur Zellschädigung führenden Faktoren zu sein: Zum Abbau der ROS wird GSH zu GSSG reduziert (Jones *et al.*, 1981). Ein Anstieg des GSSG kann während der Intoxikation im Zellinneren gemessen werden (Adamson und Harman, 1993), so daß die Vermutung nahe liegt, daß sich in der Zelle oxidative Vorgänge abspielen. Diese wären durch die Zugabe von Antioxidantien hemmbar; tatsächlich wurde, unter anderem mit dem in dieser Arbeit verwandten α -Tocopherol, die Paracetamoltoxizität durch Antioxidantien *in vivo* (Walker *et al.*, 1974; Kelleher *et al.*, 1976; Fairhurst *et al.*, 1982; Amimoto *et al.*, 1994) bzw. *in vitro* (Harman 1985) herabgesetzt.

Als weiterer Faktor, der zur Ausbildung der toxischen Schäden an den Hepatozyten führt, wird die Arylierung von Proteinen durch kovalente Bindung des NAPQIs an nucleophile Stellen angenommen (Hoffmann *et al.*, 1995a; Hoffmann *et al.*, 1995b). Für die Beteiligung der Proteinarylierung an der Hepatotoxizität des Paracetamols spricht die Tatsache, daß *in vivo* der Anstieg der Leberenzyme als Zeichen des Leberzellschadens (Pumford *et al.*, 1990), bzw. *in vitro* die Zellnekrose (Mitchell *et al.*, 1984) mit dem Ausmaß der Proteinarylierung parallel geht. Auch Hinson *et al.* fanden 1996 einen Zusammenhang zwischen der durch Paracetamol verursachten Zentrilobulärnekrose und der Proteinarylierung; dort wo viele arylierte Proteine nachgewiesen wurden, war auch die Nekrose am stärksten (im Zentrum des Leberläppchens).

Die Oxidation und damit Inaktivierung von Proteinen durch NAPQI, insbesondere der Ca^{2+} -ATPasen, die von der Zelle zur Aufrechterhaltung des Ca^{2+} -Quotienten über die Plasmamembran benötigt werden, bzw. deren Inaktivierung durch kovalente Bindung, führt zur Störung der Ca^{2+} -Homöostase in der Zelle. Diese ATPasen werden während ihrer normalen Funktion oxidiert und anschließend unter GSH-Umwandlung in GSSG reduziert. Durch die Depletion des GSHs durch NAPQI kann diese Reduktion nicht mehr stattfinden. Durch diese und weitere Mechanismen, wie die Hemmung von mikrosomalen ATPasen, über die intrazellulär überschüssiges Ca^{2+} in die Mikrosomen aufgenommen wird, führt Paracetamol via NAPQI zur intrazellulären Ca^{2+} -Akkumulation. Grewal und Racz postulierten 1993, daß es sich hierbei um einen rein sekundären Effekt im Rahmen der Nekrose handele. Im Gegensatz dazu betrachteten Shen *et al.* 1991 den Verlust der Ca^{2+} -Regulation und die konsekutive Anreicherung von Ca^{2+} im Zytosol und im Zellkern als ein zeitlich vor der Nekrose liegendes Ereignis.

Auch im Kern wurde ein Ca^{2+} -Anstieg beobachtet, der über eine Aktivierung von Endonukleasen zur DNS-Fragmentierung im Sinne einer Apoptose führte. Dieses Phänomen spielte sich zeitlich vor Ausbildung der Nekrose ab (Shen *et al.*, 1992). Apoptose-spezifische morphologische Korrelate wie zum Beispiel die Kernkondensation konnten zwar beobachtet werden, aber die typischen Leitern in der Gel-Elektrophorese waren nicht klar zu erkennen. Daher nahmen Wiger *et al.* 1997 an, daß es im Zuge der Paracetamolintoxikation zu einer inkomplett ablaufenden Apoptose mit nachfolgender Nekrose kommt.

Einzelstrangbrüche (SSBs) der DNS wurden nach hepatotoxischen Dosen von Sasaki 1986 und Hongslo *et al.* 1988 und 1994 beobachtet. Diese wurden von den Autoren auf NAPQI bzw. die Exzisionsreparatur von Paracetamol-DNS-Addukten zurückgeführt. Auch die durch NAPQI induzierten reaktiven Sauerstoff-Spezies können DNS-Einzelstrangbrüche bewirken (Collins 1995).

Anhand der unter 4. dargestellten Ergebnisse kann man erkennen, daß Paracetamol in hohen Dosen in Konformität mit der Literatur Schäden sowohl auf Zell- als auch auf DNS-Ebene der Hepatozyten hervorruft.

Diese sollten durch Behandlung der Zellen mit den Antioxidantien, insbesondere mit dem klinisch eingesetzten Antidot N-Acetylcystein, vermindert werden.

5.1. Zellviabilität

Die Viabilität der Leberzellen wurde mit dem Neutralrottest (Farbaufnahme in Lysosomen) und dem MTT-Test (Mitochondrienfunktion) bestimmt (s. 3. 3.).

Es zeigte sich eine relativ gute Übereinstimmung zwischen den beiden Zytotoxizitätstests; ein Hinweis auf eine spezifische mitochondriale Toxizität, die mit dem MTT-Test besser als mit dem Neutralrottest hätte dargestellt werden können, fehlte.

Die Leberzellen zeigten bereits in der niedrigsten eingesetzten Paracetamolkonzentration (10 mM) einen Viabilitätsverlust, der mit steigender Konzentration des Paracetamols deutlicher wurde. Dies konnte entgegen unserer Vermutung durch Behandlung (Prä- oder Mitinkubation) der Zellen mit verschiedenen Antioxidantien (10 μ M und 100 μ M N-Acetylcystein, 25 μ M Silibin und 50 μ M α -Tocopherol-Succinat (nur Mitinkubation)) nicht beeinflusst werden.

In der Annahme, daß die hepatotoxische Wirkung des Paracetamols durch den reaktiven Metaboliten NAPQI hervorgerufen wird, dessen Detoxifikation durch Konjugation mit Glutathion stattfindet, wäre die Konsequenz einer Behandlung mit dem GSH-Vorläufer N-Acetylcystein (NAC) eine Verminderung des Viabilitätsabfalls gewesen.

Die Prä- oder Mitinkubation mit dem Paracetamol-Antidot NAC bot jedoch keinen Schutz der Hepatozyten vor dem Viabilitätsabfall durch Paracetamol. Ein solcher Schutz ist *in vitro* zwar beschrieben (Shen *et al.*, 1991; Nasseri-Sina *et al.*, 1992), die Messung der Viabilität wurde in diesen Arbeiten aber auf andere Weise durchgeführt (Messung des LDH-Lecks (Shen *et al.*, 1991), Trypanblau-Aufnahme (Nasseri-Sina *et al.*, 1992)). Ergebnisse eines MTT- oder Neutralrottests mit Zellen, die mit Paracetamol und NAC inkubiert worden sind, sind in der Literatur nicht zu finden. In Versuchen einer anderen Arbeitsgruppe erwies sich NAC in Konzentrationen unterhalb der in dieser Arbeit verwandten als zytotoxisch (interne Mitteilung). Die Zytotoxizität konnte in den Versuchen im Zuge dieser Arbeit für die hier verwandten Konzentrationen nicht reproduziert werden (s. 4.5.). Diese Diskrepanzen weisen darauf hin, daß die Behandlung primärer Hepatozyten mit NAC an sich schon relativ problematisch zu sein scheint.

N-Acetylcystein wird *in vivo*, also beim Patienten mit Paracetamolintoxikation, als Antidot eingesetzt. Klinisch wird hier eine Reduktion (bzw. Verhinderung) des Paracetamol-bedingten Leberschadens beobachtet. Dies wird zurückgeführt auf die Erhöhung des intrazellulären

Glutathionspiegels aufgrund der Präkursor-eigenschaft des NAC für Glutathion, das, da es Zellmembranen nicht passieren kann, nicht zur Therapie der Paracetamolintoxikation geeignet ist.

Daß die Verminderung der Paracetamoltoxizität durch N-Acetylcystein in den *in vitro*-Versuchen mit primären Leberzellen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, nicht beobachtet werden konnte, könnte damit zusammenhängen, daß NAC im Hepatozyten-Modell nicht wie in der Leber *in vivo* zu GSH umgesetzt wird, oder daß die Aktivität der an der Glutathion-Synthese beteiligten Enzyme im Kulturverlauf relativ rasch abnimmt. Daraus würde folgen, daß das N-Acetylcystein *in vitro* nicht an der direkten Entgiftung des NAPQI beteiligt gewesen wäre. Ein antioxidativer und damit zytoprotektiver Effekt hätte sich allerdings selbst in diesem Falle aus der Bereitstellung von oxidierbaren Cysteingruppen erwarten lassen.

Das zytoprotektive Antioxidans Silibin wird in der Humanmedizin als Lebertherapeutikum eingesetzt. Anwendung findet es bei Leberintoxikationen (besonders durch α -Amanitin, den toxischen Wirkstoff des Knollenblätterpilzes) und als Adjuvans bei chronisch-entzündlichen Lebererkrankungen sowie Leberzirrhose.

Auch dieses Antioxidans erfüllte in unseren Versuchen die Erwartung eines Zytoprotektivums *in vitro* nicht.

Die Zellen, die mit Silibin behandelt wurden, zeigten teilweise eine geringere Viabilität als die nur mit Paracetamol behandelten Hepatozyten bzw. die Kontrollzellen, wobei die intrinsische Toxizität des Silibins (25 μ M - 50 μ M) auch schon 1994 von Miguez *et al.* bzw. 2003 von Dvorak *et al.* beobachtet wurde. In den Versuchen von Miguez *et al.* wurde keine Beeinflussung der Entstehung kovalenter Bindungen gefunden. Dvorak *et al.* beobachteten keinen effektiven Schutz vor der Hepatotoxizität des Paracetamols in primären humanen Leberzellen. Singh *et al.* beobachteten 1999 einen nur mäßigen Schutz von H4IIEC3/G⁻-Zellen durch 10 μ M und 20 μ M Silibin vor 1 mM Paracetamol für 48 Stunden im Neutralrottest, die Versuche von Shear *et al.* 1995 ergaben im MTT- und Neutralrottest bei HepG2 A431-Zellen mit 0,5 mM Silymarin einen Schutz vor 5 -20 mM Paracetamol (die Inkubationszeit betrug hier 2 – 24 h). Die übrigen in der Literatur beschriebenen Versuche, die einen Schutz durch Silibin vor der Zytotoxizität des Paracetamols zeigten (Campos *et al.*, 1989; Muriel *et al.*, 1992), wurden *in vivo* durchgeführt, so daß auch hier ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich ist.

Das antioxidativ wirksame Vitamin E ist membranstabilisierend und wird in der Klinik bei Patienten mit verschiedensten Erkrankungen (unter anderem des Herz- Kreislaufsystems und des Bewegungsapparates), wie auch der chronischen Hepatitis B und C, adjuvant eingesetzt. Auch die Inkubation von α -Tocopherol-Succinat schützt jedoch in unserem System die Leberzellen nicht vor dem Viabilitätsverlust durch Paracetamol. Im Gegensatz hierzu erzielte Albano *et al.* 1983 einen Schutz der Hepatozyten durch α -Tocopherol *in vitro*, ebenso wie Harman *et al.* 1995 und 1996 (7-stündige Nachinkubation mit 10 μ M und 100 μ M α -Tocopherol nach einstündiger Behandlung mit 5 mM Paracetamol). Beide Arbeitsgruppen benutzten als Parameter für die Zellviabilität jedoch das Ausmaß des LDH-Effluxes in das Medium. Des Weiteren gab es Unterschiede bezüglich der Kulturzeiten und die Paracetamoldosis war deutlich geringer (1 mM bei mit Phenobarbital bzw. 3-Methylchloranthren vorbehandelten Zellen (Albano *et al.*, 1983) und 5 mM (Harman *et al.*, 1995 und 1996). Daher lassen sich diese Ergebnisse nur bedingt mit den in dieser Arbeit dargestellten vergleichen.

Mehrheitlich findet sich also im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit in der Literatur bezüglich der Zellviabilität nach Paracetamolinkubation ein Schutz durch Zugabe von N-Acetylcystein und α -Tocopherol. Die Schutzwirkung des Silibins wird auch in der vorliegenden Literatur kontrovers diskutiert (s. oben). Der direkte Vergleich mit den Versuchen dieser Arbeit ist allerdings problematisch; so sind z.B. einige der Versuche *in vivo* oder an Zelllinien durchgeführt worden, wobei sich die Frage stellt, ob die Reaktionen der Zellen in diesen Versuchen gleich denjenigen der Primärhepatozyten sind.

Die Versuche in der Literatur differieren weiterhin im Zeitpunkt, an dem die Schädigung begonnen wird, sowie der Dauer der Paracetamolinkubation von denen, die in dieser Arbeit durchgeführt worden waren.

Es läßt sich vermuten, daß der späte Schädigungszeitpunkt oder die lange Schädigungszeit in unserem System Gründe für die Wirkungslosigkeit der Antioxidantien sein könnten. Zum Beispiel wäre es denkbar, daß initial ein Schutz vor der Paracetamoltoxizität besteht, dieser aber im Laufe der Schädigungszeit verloren geht. Allerdings sprechen die mit Silibin durchgeführten Tests an Zelllinien mit relativ langen Schädigungszeiten (bis zu 24 h), bei denen eine Schutzwirkung gefunden wurde (Shear *et al.*, 1995), gegen diese Vermutung.

5.2. DNS-Strangbrüche

Zur Bewertung des Ausmaßes von DNS-Schäden wurde der Comet Assay (s. 3.4.) eingesetzt. Ein Anstieg der Image Length war ab einer Paracetamolkonzentration von 25 mM bzw. 30 mM zu verzeichnen. Dieser konnte im Gegensatz zu der paracetamolinduzierten Zytotoxizität durch Prä- oder Mitinkubation mit N-Acetylcystein oder Silibin bzw. durch Mitinkubation mit α -Tocopherol-Succinat (hier nur bei 25 mM und 30 mM Paracetamol, nicht mehr bei 40 mM) vermindert werden.

In der Literatur finden sich keine Comet Assay-Versuche mit Paracetamol, aber mit Hilfe der alkalischen Elution wurde die Induktion von DNS-Einzelstrangbrüchen durch Paracetamolintoxikation bereits beschrieben (Sasaki, 1986; Hongslo *et al.*, 1988; Hongslo *et al.*, 1994).

DNS-Schäden, die im Zuge einer Apoptose entstehen, können mit dem Comet Assay nachgewiesen werden. Der Comet Assay hat sich hierbei im Vergleich mit anderen Methoden zum Nachweis der Apoptose (morphologische Korrelate, Annexin V-Aufnahme) als sehr sensitiv erwiesen, das heißt, es wurden bereits DNS-Strangbrüche gemessen, bevor die anderen Tests positiv wurden (Florent *et al.*, 1999).

5.3. Gesamtdiskussion

Aus den Ergebnissen (s. 4.) kann man ersehen, daß der Viabilitätsverlust der Leberzellen bereits bei niedrigeren Paracetamolkonzentrationen zu verzeichnen ist als die DNS-Fragmentierung, die erst bei höheren Paracetamolkonzentrationen stattfindet.

Des weiteren läßt sich der Zelltod nicht durch die Zugabe von Antioxidantien beeinflussen, wohl aber wird die DNS-Fragmentierung durch Antioxidantien vermindert.

Hier stellt sich die Frage nach einem kausalen Zusammenhang zwischen Zelltod und DNS-Fragmentierung:

Die Tatsache, daß ein Viabilitätsabfall bereits bei Paracetamolkonzentrationen auftritt, bei denen keine DNS-Schädigung nachzuweisen ist, läßt vermuten, daß es sich nicht primär um einen durch DNS-Schäden verursachten Zelluntergang im Sinne einer Apoptose handelt.

Mit der Annahme, daß es sich bei den DNS-Strangbrüchen um die Begleiterscheinungen eines Zelltodes durch Nekrose handelt, könnte man zwar den Anstieg der Image Length erst bei höheren Paracetamolkonzentrationen, bei denen die Zellviabilität im unteren Bereich liegt, erklären, nicht aber die Tatsache, daß die Behandlung mit Antioxidantien den Viabilitätsabfall nicht beeinflusst, wohl aber die DNS-Strangbrüche vermindert (bei 25 mM und 30 mM Paracetamol bis auf das Niveau der Kontrollzellen).

Daher liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei dem Viabilitätsverlust und den DNS-Strangbrüchen um zwei voneinander unabhängige, durch Paracetamol (oder einen seiner Metaboliten wie zum Beispiel NAPQI) hervorgerufene Schädigungen handelt.

Da sich der Viabilitätsabfall nicht durch die Gabe von Antioxidantien beeinflussen ließ, kann man annehmen, daß es sich hierbei eher um einen nicht- oder nur in geringem Maße oxidativen Schädigungsmechanismus handelt. Hier wäre als Möglichkeit die Proteinylierung zu nennen, die schon seit längerer Zeit als möglicherweise an der Leberzellnekrose beteiligter Faktor diskutiert wird (Mitchell *et al.*, 1984; Pumford *et al.*, 1990; Hinson *et al.* 1996).

Die DNS-Strangbrüche waren erst nach der Gabe relativ hoher Konzentrationen Paracetamol nachweisbar. Ihr Ausmaß ließ sich durch die Gabe der Antioxidantien verringern. Daher kann man für ihre Entstehung einen oxidativen Vorgang als zugrunde liegend annehmen. Einerseits könnte es sich um eine durch oxidativen Streß (zum Beispiel kann das durch NAPQI induzierte Hydroxylradikal durch direkten Angriff an der DNS zu einem apoptose-typischen DNS-Leiter Phänomen führen (Tsang *et al.*, 1996)) oder durch mitochondriale Schädigung mit Austritt von Cytochrom C und nachfolgender Aktivierung der Caspasenkaskade induzierte Apoptose handeln, andererseits könnten die DNS-Strangbrüche auch nicht apoptotischen Ursprunges sein. Beide Formen der DNS-Schädigung können durch Paracetamol hervorgerufen werden. Allerdings wird die durch Paracetamol induzierte Apoptose als zeitlich vor der Nekrose liegend eingestuft (Shen *et al.*, 1992; Wiger *et al.*, 1997), während die DNS-Strangbrüche, die im Zuge dieser Arbeit mit dem Comet Assay beobachtet werden konnten, erst bei sehr hohen Paracetamolkonzentrationen, bei denen bereits eine deutliche Verminderung der Zellviabilität gemessen wurde, auftraten. Aufgrund der langen Schädigungszeit von 12 h und der Tatsache, daß auf zellulärer Ebene bereits ein deutlicher Viabilitätsverlust zu erkennen war, läßt sich vermuten, daß etwaige apoptotische Veränderungen der Zellen zeitlich schon früher abgelaufen wären und somit unter diesen Versuchsbedingungen nicht mehr hätten nachgewiesen werden können.

Eine weitere Möglichkeit der Induktion von DNS-Einzelstrangbrüchen durch Paracetamol ist die Aktivierung von Endonukleasen durch die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. NAPQI setzt einerseits Ca^{2+} aus isolierten Mitochondrien frei (Albano *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1985; Weis *et al.*, 1992a; Weis *et al.*, 1992b), inhibiert weiterhin die ATPasen, die zur Aufrechterhaltung des Ca^{2+} -Gradienten über die Zellmembran benötigt werden und verhindert darüber hinaus durch GSH-Depletion deren Reduktion. Darüber hinaus wird durch zusätzliche Inhibierung der mikrosomalen ATPasen, über die durch Aufnahme in die Mikrosomen das erhöhte zytosolische Ca^{2+} gesenkt werden würde, der Ca^{2+} -Überschuß in der Zelle verstärkt (Moore *et al.*, 1985). Dieses erhöhte Ca^{2+} diffundiert in den Zellkern und führt dort zur Aktivierung von Endonukleasen (Shen *et al.*, 1992). Der Stellenwert der Ca^{2+} -Homöostasesstörung in Bezug auf den Leberschaden ist allerdings umstritten; während Shen *et al.* die Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels als Apoptoseinduktor in der frühen Phase der Paracetamoltoxizität sehen, halten Grewal und Racz dies für einen sekundären Effekt, der kurz vor Ausbildung der Nekrose stattfindet (Grewal und Racz, 1993). In diesem Falle wäre die Induktion von DNS-Einzelstrangbrüchen bei hohen Konzentrationen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden, erklärbar; fraglich bliebe jedoch, warum der DNS-Schaden durch Antioxidantien verhindert werden konnte.

Die wahrscheinlichere Alternative ist die Induktion von DNS-Einzelstrangbrüchen durch Paracetamol, wie sie von Sasaki *et al.* 1986 und von Hongslo *et al.* 1988 und 1994 nach der Gabe hepatotoxischer Dosen Paracetamol beschrieben und auf den reaktiven Metaboliten NAPQI zurückgeführt wurden, bzw. die Induktion von DNS-Strangbrüchen mittels reaktiver Sauerstoff-Spezies (Collins 1995), wie sie durch NAPQI induziert werden können. Im ersteren Falle wäre die Schutzwirkung der Antioxidantien nicht unbedingt zu erklären; so führen Hongslo *et al.* die mittels alkalischer Elution detektierten DNS-Strangbrüche auf die Interaktion zwischen reaktiven Paracetamol-Metaboliten und der DNS bzw. auf die Folgen der Exzisionsreparatur von Paracetamol-DNS-Addukt-geschädigter DNS zurück. Weiterhin hatte N-Acetylcystein in den Versuchen dieser Arbeitsgruppe keinen Einfluß auf die Bildung der DNS-Strangbrüche. In diesem Falle bliebe die in dieser Arbeit beobachtete Wirkung der Antioxidantien unerklärt.

Wären die DNS-Strangbrüche jedoch die Folge einer ROS-Induktion durch NAPQI, so stellt die Verminderung des Ausmaßes der DNS-Schädigung durch die Gabe von antioxidativ wirksamen Substanzen eine logische Konsequenz dar; einerseits kann bereits das zur ROS-Induktion notwendige NAPQI-Radikal durch die Antioxidantien abgefangen werden, andererseits auch die entstandenen ROS selber. Auf diese Weise würde die Konzentration der

DNS-schädigenden radikalischen Agentien, die auf die Leberzellen einwirken, abnehmen und somit das Auftreten von DNS-Einzelstrangbrüchen vermindert.

Da neben dem Paracetamol-Antidot NAC auch die ebenfalls antioxidativ wirksamen Substanzen Silibin und α -Tocopherol die DNS-Schädigung reduzieren können, scheint es sich bei dem den DNS-Strangbrüchen zugrunde liegenden Schädigungsmechanismus im Gegensatz zur im Wesentlichen durch nicht-oxidative Mechanismen bedingten Zytotoxizität um einen oxidativen Vorgang zu handeln.

Insgesamt ergeben sich bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit und deren Übertragung auf den Menschen einige Schwierigkeiten:

Zum einen scheint sich das Versuchsmodell der primären Rattenhepatozyten nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen zu lassen, wie unter anderem die Tatsache gezeigt hat, daß N-Acetylcystein im *in vitro*-Versuch keinen positiven Einfluß auf die Zellschädigung durch Paracetamol hat, die klinische Erfahrung aber lehrt, daß dies beim Patienten mit Paracetamolintoxikation durchaus der Fall ist. Bei möglicherweise fehlender Umsetzung des NACs zu Glutathion wäre dieses als „nur“ antioxidativ wirksame Substanz ohne Einfluß auf den intrazellulären GSH-Gehalt zu sehen. Ein anderer Aspekt, den es besonders bei der Bewertung der eingesetzten Paracetamolkonzentrationen zu bedenken gilt, ist die Tatsache, daß, obwohl das primäre Rattenhepatozyten-Modell z.B. im Vergleich zu Zelllinien als probateres Mittel zur Erforschung der Hepatotoxizität gilt (Wang *et al.*, 2002), die Ratte gegenüber Paracetamol im Gegensatz zum Menschen eher als eine resistente Spezies anzusehen ist (Green *et al.*, 1984). Darüber hinaus wird nicht das gesamte Paracetamol aus dem Medium in die Zelle aufgenommen (interne Mitteilung), so daß die in der Zelle wirksame effektive Konzentration niedriger ist als die eingesetzte.

Zum anderen wird angenommen, daß Paracetamol eine eigene antioxidative Wirkung besitzt. Diese kann durch Akkumulation des unmetabolisierten Paracetamols in der Zelle durch Sättigung der Abbauege bei steigender Dosis wirksam werden (Garrido *et al.*, 1991). Ein solcher möglicher Effekt durch das Paracetamol selbst kann in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen oder bestätigt werden.

Abschließend lassen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse trotz der nicht uneingeschränkten Übertragbarkeit auf die Vorgänge beim Patienten mit Paracetamolintoxikation folgende Überlegungen bezüglich des Pathomechanismus der Leberschädigung zu:

Paracetamol wirkt in hohen Dosierungen nicht nur zytotoxisch, sondern es induziert, wahrscheinlich ebenfalls über den aktiven Metaboliten NAPQI, Strangbrüche der Leberzell-DNS, wirkt also auch genotoxisch. Dies geschieht allerdings erst bei Dosierungen, die bereits einen ausgeprägten zytotoxischen Effekt hervorrufen, was, sofern man diese Beobachtungen auf den Patienten nach Paracetamoleinnahme übertragen kann, bedeuten würde, daß Paracetamol-induzierte DNS-Schäden erst bei Dosierungen zu erwarten wären, bei denen bereits ein Ausmaß an Zellschädigung erreicht wäre, das ein Organversagen hoch wahrscheinlich machen würde. Die therapeutische Konsequenz, die aus der Einnahme einer solchen Paracetamoldosis erfolgen würde, nämlich die Gabe von N-Acetylcystein, würde neben der Unterdrückung des Leberzellschadens auch die DNS-Strangbrüche vermindern.

6. Zusammenfassung

Paracetamol ist ein weithin gebräuchliches, in therapeutischer Dosis relativ nebenwirkungsarmes Analgetikum und Antipyretikum. Bei Intoxikation kommt es unter anderem zu Leberzellschäden bis hin zum fulminanten Leberversagen. Die Ätiologie der Hepatotoxizität von Paracetamol ist noch unklar, diskutiert werden oxidative Vorgänge, wie zum Beispiel die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch den bei Überdosierung vermehrt gebildeten Paracetamol-Metaboliten NAPQI sowie nicht-oxidative Mechanismen der Störung des zellulären Stoffwechsels, wie beispielsweise die Arylierung von Proteinen durch NAPQI. Im Zuge der Leberzellschädigung durch Paracetamol kommt es neben dem Verlust der Zellviabilität auch zum Auftreten von DNS-Strangbrüchen.

In dieser Arbeit wurde in primären Rattenhepatozyten ein möglicher Zusammenhang zwischen diesen beiden Phänomenen und deren zugrundeliegender Mechanismus untersucht. Eine Verminderung der Zellviabilität (gemessen mit MTT- und Neutralrottest) trat bereits bei geringeren Paracetamoldosen (ab 10 mM Paracetamol) auf als die Induktion von DNS-Strangbrüchen (ab 25 – 30 mM Paracetamol), was darauf hindeutet, daß die DNS-Strangbrüche kein kausales Ereignis für die Entwicklung der von Paracetamol verursachten Leberzellnekrosen, sondern vielmehr ein im Laufe des Zelluntergangs auftauchendes Phänomen darstellen.

Weiterhin wurde geprüft, ob antioxidativ wirksame Substanzen (N-Acetylcystein, Silibin und α -Tocopherol) einen hemmenden Effekt auf die Ausprägung des zytotoxischen Effekts beziehungsweise die Induktion von DNS-Strangbrüchen durch Paracetamol in den Leberzellen haben. Während der durch Paracetamol hervorgerufene Viabilitätsverlust durch keines der Antioxidantien supprimiert wurde, konnte die Induktion von DNS-Strangbrüchen sowohl von N-Acetylcystein und Silibin als auch in etwas geringerem Maße durch α -Tocopherol verringert beziehungsweise bei submaximaler Paracetamoldosis sogar in ihrer Entstehung unterdrückt werden.

In der Zusammenschau dieser Ergebnisse läßt sich vermuten, daß es sich bei der zytotoxischen Wirkung und der Induktion von DNS-Strangbrüchen durch Paracetamol um zwei voneinander unabhängige Effekte handelt, wobei der Induktion von DNS-Strangbrüchen ein oxidativer und dem Viabilitätsverlust ein nicht-oxidativer Mechanismus wie zum Beispiel die Proteinarylierung zugrunde liegt und die DNS-Strangbrüche erst zu einem relativ späten Zeitpunkt im Verlauf der Leberzellschädigung durch Paracetamol auftreten.

7. Literatur

Adamson GM, Harman AW.

Oxidative Stress in cultured hepatocytes exposed to acetaminophen.

Biochem Pharmacol. 1993 Jun 9; 45 (11): 2289-94

Adamson GM, Harman AW.

A role for the glutathione peroxidase/reductase enzyme system in the protection from paracetamol toxicity in isolated mouse hepatocytes.

Biochem Pharmacol. 1989 Oct 1; 38(19): 3323-30

Albano E, Poli G, Chiarotto E, Biasi F, Dianzani MU.

Paracetamol-stimulated lipid peroxidation in isolated rat and mouse hepatocytes.

Chem Biol Interactions 1983; 47: 249-63

Albano E, Rundgren M, Harvison PJ, Nelson SD, Moldeus P.

Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity.

Mol Pharmacol. 1985 Sep; 28(3): 306-11

Altörjay I, Dalmi L, Sari B, Imre S, Balla G.

The effect of silibinin (Legalon) on the free radical scavenger mechanisms of human erythrocytes in vitro.

Acta Physiol Hung. 1992; 80(1-4): 375-80

Amimoto T, Matsura T, Koyama SY, Nakanishi T, Yamada K, Kajiyama G.

Acetaminophen-induced hepatic injury in mice. The role of lipid peroxidation and effects of pretreatment with coenzyme Q10 and α -Tocopherol.

Free Radic Biol Med. 1995 Aug; 19 (2): 169-76

Bae MA, Pie JE, Song BJ.

Acetaminophen induces apoptosis of C6 glioma cells by activating the c-Jun NH(2)-terminal protein kinase-related cell death pathway.

Mol Pharmacol. 2001 Oct; 60(4): 847-56

Bartolone JB, Beierschmitt WP, Birge RB, Hart SG, Wyand S, Cohen SD, Khairallah EA.

Selective acetaminophen metabolite binding to hepatic and extrahepatic proteins: An in vivo and in vitro analysis.

Toxicol Appl Pharmacol. 1989 Jun 15; 99(2): 240-9

Bast A.

Is formation of reactive oxygen by cytochrome P-450 perilous and predictable?

Tr Pharmacol Sci. 1986 Jul;

Bessems JGM, Vermeulen NPE.

Paracetamol (Acetaminophen)-induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mechanisms, Analogues and Protective Approaches.

Crit Rev Toxicol. 2001 Jan; 31(1): 55-138.

Birge RB, Bartolone JB, Cohen SD, Khairallah EA, Smolin LA.

A comparison of proteins S-thiolated by glutathione to those arylated by acetaminophen. Biochem Pharmacol 1991 Dec 11; 42 Suppl: S197-207

Boobis AR, Tee LB, Hampden CE, Davies DS.

Freshly isolated hepatocytes as a model for studying the toxicity of paracetamol.

Food Chem Toxicol. 1986 Jun-Jul; 24(6-7): 731-6

Boobis AR, Fawthrop DJ, Davies DS.

Mechanisms of cell death.

Trends Pharmacol Sci. 1989 Jul; 10(7): 275-80

Borenfreund E, Peurner JA.

Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption.

Toxicol Lett. 1985 Feb-Mar; 24(2-3): 119-24

Botting RM.

Mechanisms of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3?
Clin Infect Dis 2000 Oct; 31(Suppl 5):202-10

Boulares AH, Zoltoski AJ, Stoica BA, Cuvillier O, Smulson ME.

Acetaminophen induces a caspase-dependent and Bcl-XL sensitive apoptosis in human hepatoma cells and lymphocytes.
Pharmacol Toxicol. 2002 Jan; 90(1): 38-50

Brunborg G, Holme JA, Hongslo JK.

Inhibitory effects of paracetamol on DNA repair in mammalian cells.
Mutat Res 1995 Apr; 342(3-4): 157-70

Burger A, Wachter H.

Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch 8. Auflage
Walter de Gruyter - Berlin - New York 1998

Cadenas E, Varsavsky AI, Boveris A, Chance B.

Oxygen- or organic hydroperoxide-induced chemiluminescence of brain and liver homogenates.
Biochem J. 1981 Sep 15; 198(3): 645-54

Campos R, Garrido A, Guerra R, Valenzuela A.

Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen in rat liver.
Planta Med. 1989 Oct; 55(5): 417-9

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL.

COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression.
Proc Natl Acad Sci USA, 2002 Oct 15; 99(21): 13371-3

Chrungoo VJ, Singh K, Singh J.

Differential biochemical response of freshly isolated rat hepatocytes to paracetamol, carbon tetrachloride and D-galactosamine toxicity.

Indian J Exp Biol. 1997 Jun; 35(6): 603-10

Cobden I, Record CO, Ward MK, Kerr DN.

Paracetamol-induced acute renal failure in the absence of fulminant liver damage.

Br Med J. (Clin Res Ed) 1982 Jan 2; 284(6308): 21-2

Collins AR, Ma AG, Duthie SJ.

The Kinetics of Repair of oxidative DNA-damage (strand breaks & oxidised pyrimidines) in human cells.

Mutat Res. 1995 Jan; 336(1): 69-77

Corbett MD, Corbett BR, Hanothiaux MH, Quintana SJ.

Metabolic activation and nucleic acid binding of acetaminophen and related arylamine substrates by the respiratory burst of human granulocytes.

Chem Res Toxicol. 1989 Jul-Aug; 2(4): 260-6

Corbett MD, Corbett BR, Hanothiaux MH, Quintana SJ.

The covalent binding of acetaminophen to cellular nucleic acids as the results of the respiratory bursts of neutrophils derived from the HL-60 cell line.

Toxicol Appl Pharmacol. 1992 Mar; 113(1): 80-6

Corcoran GB, Todd EL, Racz WJ, Hughes H, Smith CV, Mitchell JR.

Effects of N-acetylcysteine on the disposition and metabolism of acetaminophen in mice.

J Pharmacol Exp Ther. 1985 Mar; 232(3): 857-63

Corcoran GB, Wong BK.

Role of glutathione in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by N-acetyl-L-cysteine in vivo: Studies with N-acetyl-D-cysteine in mice.

J Pharmacol Exp Ther. 1986 Jul; 238(1): 54-61

Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD.

N-acetyl-p-benzoquinone imine: A cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Mar; 81(5): 1327-31

Donatus IA, Sardjoko, Vermeulen NP.

Cytotoxic and cytoprotective activities of curcumin. Effects on paracetamol-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and glutathione depletion in rat hepatocytes.

Biochem Pharmacol. 1990; 39(12): 1869-75

Duthie SJ, Ma AG, Ross MA, Collins AR.

Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. Cancer Research 1996; 56(6): 1291-5

Dvorak Z, Kosina P, Walterova D, Simanek V, Bachleda P, Ulrichova J.

Primary cultures of human hepatocytes as a tool in cytotoxicity studies: cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from Silybum.

Toxicol Lett. 2003 Feb 3; 137(3): 201-12

Dybing E, Holme AJ, Gordon WP, Soderlund EJ, Dahlin DC, Nelson SD.

Genotoxicity studies with paracetamol.

Mut Res. 1984 Oct; 138(1): 21-32

El-Hassan H, Anwar K, Macanas-Pirard P, Crabtree M, Chow SC, Johnson VL, Lee PC, Hinton RH, Price SC, Kass GE.

Involvement of mitochondria in acetaminophen-induced apoptosis and hepatic injury. Roles of cytochrome c, Bax, Bid, and caspase.

Toxicol Appl Pharmacol. 2003 Sep 1; 191(2): 118-29

Fairhurst S, Barber DJ, Clark B, Horton AA.

Studies on paracetamol-induced lipid peroxidation.

Toxicol 1982; 23(2-3): 249-59

Farber JL, Leonard TB, Kyle ME, Nakae D, Serroni A, Rogers SA.

Peroxidation-dependent and peroxidation-independent mechanisms by which acetaminophen kills cultured rat hepatocytes.

Arch Biochem Biophys. 1988 Dec; 267(2): 640-50

Florent M, Godard T, Ballet JJ, Gauduchon P, Sola B.

Detection by the comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation.

Cell Biol Toxicol. 1999 Jun;15(3):185-92

Flower RJ, Vane JR.

Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol).

Nature 1972 Dec 15; 240(5381): 410-1

Garrido A, Arancibia C, Campos R, Valenzuela A.

Acetaminophen does not induce oxidative stress in isolated rat hepatocytes; its probable antioxidant effect is potentiated by the flavonoid silybin.

Pharmacol Toxicol. 1991 Jul; 69(1): 9-12

Gibson JD, Pumford NR, Samokyszyn VM, Hinson JA.

Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress.

Chem Res Toxicol 1996 Apr-May; 9(3): 580-5

Giri AK, Sivam SS, Khan KA.

Sister-chromatid exchange and chromosome aberrations induced by paracetamol in vivo in bone-marrow cells of mice.

Mutat Res. 1992 Apr; 278(4): 253-8

Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NPE.

Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P-450.

Crit Rev Toxicol. 1995; 25(1): 25-65

Green CE, Dabbs JE, Tyson ChA.

Metabolism and cytotoxicity of acetaminophen in hepatocytes isolated from resistant and susceptible species.

Toxicol Appl Pharmacol. 1984 Oct;76(1):139-49

Grewal KK, Racz WJ.

Intracellular calcium disruption as a secondary event in acetaminophen-induced hepatotoxicity.

Can J Physiol Pharmacol. 1993 Jan; 71(1): 26-33

Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H.

Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis?

Toxicol Sci. 2002 Jun; 67(2): 322-8

Halmes NC, Hinson JA, Martin BM, Pumford NR.

Glutamate dehydrogenase covalently binds to a reactive metabolite of acetaminophen.

Chem Res Toxicol. 1996 Mar; 9(2): 541-6

Harman AW.

The effectiveness of antioxidants in reducing paracetamol-induced damage subsequent to paracetamol activation.

Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1985 Aug; 49(2): 215-28

Harman AW, Mahar SO, Burcham PC, Madsen BW.

Level of cytosolic free calcium during acetaminophen toxicity in mouse hepatocytes.

Mol Pharmacol. 1992 Apr; 41(4): 665-70

Hinson JA, Roberts DW, Benson RW, Dalhoff K, Loft S, Poulsen HE.

Mechanism of paracetamol toxicity.

Lancet 1990 Mar 24; 335(8691): 732

Hinson JA, Pumford NR, Roberts DW.

Mechanisms of acetaminophen toxicity: immunochemical detection of drug-protein adducts.
Drug Metab Rev 1995; 27(1-2): 73-92

Hinson JA, Roberts DW, Halmes NC, Gibson JD, Pumford NR.

Immunochemical detection of drug-protein adducts in acetaminophen hepatotoxicity.
Adv Exp Med Biol. 1996; 387: 47-55

Hoffmann KJ, Streeter AJ, Axworthy DB, Baillie TA.

Identification of the major covalent adduct formed in vitro and in vivo between acetaminophen and mouse liver proteins.
Mol Pharmacol. 1985 May; 27(5): 566-73

Hoffmann KJ, Streeter AJ, Axworthy DB, Baillie TA.

Structural characterization of the major covalent adduct formed in vitro between acetaminophen and bovine serum albumin.
Chem Biol Interact. 1985 Feb-Apr; 53(1-2): 155-72

Hoivic DJ, Manautou JE, Tveit A, Mankowski DC, Khairallah EA, Cohen SD.

Evidence suggesting the 58-kDa acetaminophen binding protein is a preferential target for acetaminophen electrophile.
Fundam Appl Toxicol. 1996 Jul; 32(1): 79-86

Holme JA, Dahlin DC, Nelson SD, Dybing E.

Cytotoxic effects of N-acetyl-p-benzoquinone imine, a common arylating intermediate of paracetamol and N-hydroxyparacetamol.
Biochem Pharmacol. 1984 Feb 1; 33(3): 401-6

Holtzman JL.

The role of covalent binding to microsomal proteins in the hepatotoxicity of acetaminophen.
Drug Metab Rev. 1995; 27(1-2): 277-97

Hongslo JK, Christensen T, Brunborg G, Bjornstad C, Holme JA.

Genotoxic Effects of paracetamol in V79 Chinese hamster cells.

Mut Res. 1988 Feb; 204(2): 333-41

Hongslo JK, Bjorge C, Schwarze PE, Brogger A, Mann G, Thelander L, Holme JA.

Paracetamol inhibits replicative DNA synthesis and induces sister chromatid exchange and chromosomal aberrations by inhibition of ribonucleotide reductase.

Mutagenesis 1990 Sep; 5(5): 475-80

Hongslo JK, Brogger A, Bjorge C, Holme JA.

Increased frequency of sister-chromatid exchange and chromatid breaks in lymphocytes after treatment of human volunteers with therapeutic doses of paracetamol.

Mutat Res. 1991 Sep; 261(1): 1-8

Hongslo JK, Smith CV, Brunborg G, Soderlund EJ, Holme JA.

Genotoxicity of paracetamol in mice and rats.

Mutagenesis. 1994 Mar; 9(2): 93-100

Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ.

Mechanisms of hepatotoxicity.

Toxicol Sci. 2002 Feb; 65(2): 166-78

Johansson I, Ekstrom G, Scholte B, Puzycki D, Jornvall H, Ingelman-Sundberg M.

Ethanol-, sasting- and acetone-inducible cytochromes P-450 in rat liver: regulation and characteristics of enzymes belonging to the IIB and IIE gene subfamilies.

Biochemistry 1988 Mar 22;27(6):1925-34

Jones DP, Eklow L, Thor H, Orrenius S.

Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂.

Arch Biochem Biophys. 1981 Sep; 210(2): 505-16

Ju C, Reilly TP, Bourdi M, Radonovich MF, Brady JN, George JW, Pohl LR.

Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced injury in mice.

Chem Res Toxicol. 2002 Dec; 15(12): 1504-13

Kelleher J, Walker BE, Losowsky MS, Dixon MF.

Paracetamol hepatotoxicity and Vitamin E.

Int J Vitam Nutr Res. 1976; 46(2): 251-3

Keller RJ, Hinson JA.

Mechanisms of acetaminophen-stimulated NADPH oxidation catalyzed by the peroxidase H₂O₂ system.

Drug Metab Dispos. 1991 Jan-Feb; 19(1): 184-7

Kociancic T, Reed MD.

Acetaminophen intoxication and length of treatment: how long is long enough?

Pharmacotherapy. 2003 Aug; 23(8): 1052-9

Landon EJ, Naucam RJ, Rama Sastri BV.

Effects of calcium channel blocking agents and centrilobular necrosis in the liver of rats treated with hepatotoxic agents.

Biochem Pharmacol. 1986 Feb 15; 35(4): 697-705

Lindl T.; Bauer, J.

Zell- und Gewebekultur 2. Auflage (1989), Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart

Malmberg AB, Yaksh TL.

Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition.

Science 1992 Aug 28; 257(5074): 1276-9

Mattammal MB, Zenser TV, Brown WB, Herman CA, Davies BB.

Mechanism of inhibition of renal prostaglandin production by acetaminophen.

J Pharmacol Exp Ther. 1979 Sep; 210(3): 405-9

Matthews AM, Roberts DW, Hinson JA, Pumford NR.

Acetaminophen-induced hepatotoxicity. Analysis of total covalent binding vs. specific binding to cysteine.

Drug Metab Dispos. 1996 Nov; 24(11): 1192-6

McGregor AH, More LJ, Simpson KJ, Harrison DJ.

Liver death and regeneration in paracetamol toxicity.

Hum Exp Toxicol. 2003 Apr; 22(4): 221-7

von Mehring, J.

J Ther Monatsh 1893; 87: 577

Miguez MP, Anundi I, Sainz-Pardo LA, Lindros KO.

Hepatoprotective mechanism of silymarin: no evidence for involvement of cytochrome P450 2E1.

Chem Biol Interact. 1994 Apr; 91(1): 51-63

Miners JO, Drew R, Birkett DJ.

Mechanism of action of paracetamol protective agents in mice in vivo.

Biochem Pharmacol. 1984 Oct 1; 33(19): 2995-3000

Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB.

Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione.

J Pharmacol Exp Ther. 1973 Oct; 187(1): 211-7

Mitchell MC, Schenker S, Speeg KV Jr.

Selective inhibition of acetaminophen oxidation and toxicity by cimetidine and other histamine H₂-receptor antagonists in vivo and in vitro in the rat and in man.

J Clin Invest 1984 Feb; 73(2): 383-91

Moore M, Thor H, Moore G, Nelson S, Moldeus P, Orrenius S.

The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca²⁺.

J Biol Chem. 1985 Oct 25; 260(24): 13035-40

Mosmann, T.

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.

J Immunol Meth. 1983 Dec 16; 65(1-2): 55-63

Muriel P, Garciapina T, Perez-Alvarez V, Mourelle M.

Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage.

J Appl Toxicol. 1992 Dec; 12(6): 439-42

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M.

Arzneimittelwirkungen; Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie; 8. Auflage

MBG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001

Nakae D, Oakes JW, Farber JL.

Potentiation in the intact rat of the hepatotoxicity of acetaminophen by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea.

Arch Biochem Biophys. 1988 Dec; 267(2): 651-9

O'Grady JG, Wendon J, Tan KC, Potter D, Cottam S, Cohen AT, Gimson AE, Williams R.

Liver transplantation after paracetamol overdose.

BMJ 1991 Jul 27;303(6796):221-3

Oberdisse E, Hackenthal E, Kuschinsky K.

Pharmakologie und Toxikologie

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1997

Prescott LF.

Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management.
Drugs 1983 Mar; 25(3): 290-314

Pumford NR, Roberts DW, Benson RW, Hinson JA.

Immunochemical quantitation of 3-(cystein-S-yl)acetaminophen protein adducts in subcellular liver fractions following a hepatotoxic dose of acetaminophen.
Biochem Pharmacol. 1990 Aug 1; 40(3): 573-9

Pumford NR, Martin BM, Hinson JA.

A metabolite of acetaminophen covalently binds to the 56 kDa selenium binding protein.
Biochem Biophys Res Commun. 1992 Feb 14; 182(3): 1348-55

Raucy JL, Lasker JM, Lieber CS, Black M.

Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIE1 and P450IA2.
Arch Biochem Biophys. 1989 Jun; 271(2): 270-83

Ray SD, Mumaw VR, Raje RR, Fariss MW.

Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment.
J Pharmacol Exp Ther. 1996 Dec; 279(3): 1470-83

Rote Liste Service GmbH.

Rote Liste 1998
ECV – Editio Cantor – Aulendorf/Württemberg 1998

Rumack BH, Matthew H.

Acetaminophen poisoning and toxicity.
Pediatrics 1975 Jun; 55(6): 871-6

Sasaki M.

Enhancing effect of acetaminophen on mutagenesis.
Prog Clin Biol Res. 1986; 209A: 365-72

Schwab JM, Schluesener HJ, Laufer S

COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol?

Lancet 2003 Mar 22; 361(9362): 981-2

Shear NH, Malkiewicz IM, Klein D, Koren G, Randor S, Neumann MG.

Acetaminophen-induced toxicity to human epidermoid cell line A431 and hepatoblastoma cell line Hep G2, in vitro, is diminished by silymarin.

Skin Pharmacol. 1995; 8(6): 279-91

Shen W, Kamendulis LM, Ray SD, Corcoran GB.

Acetaminophen-induced Cytotoxicity in Cultured Mouse hepatocytes: correlation of nuclear Ca²⁺ accumulation and early DNA fragmentation with cell death.

Toxicol Appl Pharmacol 1991 Nov; 111(2): 242-54

Shen W, Kamendulis LM, Ray SD, Corcoran GB.

Acetaminophen-induced Cytotoxicity in Cultured Mouse hepatocytes: Effects of Ca²⁺-Endonuclease, DNA-Repair and Glutathione Depletion inhibitors on DNA fragmentation and Cell Death.

Toxicol Appl Pharmacol. 1992 Jan; 112(1): 32-40

Sies H.

Biochemistry of oxidative stress.

Angew Chem Int Ed Engl. 1986; 25: 1058-71

Sies H, Cadenas E.

Oxidative stress: damage to intact cells and organs.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1985 Dec 17; 311(1152): 617-31

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.

A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.

Exp Cell Res. 1988 Mar; 175(1): 184-91

Slameňová D, Horváthová E, Košíková B, Ružeková L, Lábaj J.

Detection of Lignin Biopolymer- and Vitamin E stimulated Reduction of DNA strand breaks in H₂O₂ and MNNG-Treated Mammalian Cells by the Comet Assay.

Nutrition & Cancer 1999; 33(1): 88-94

Smith CV, Hughes H, Mitchell JR.

Free radicals in vivo. Covalent binding to lipids.

Mol Pharmacol. 1984 Jul; 26(1): 112-6

Smith CV, Mitchell JR.

Acetaminophen hepatotoxicity in vivo is not accompanied by oxidant stress.

Biochem Biophys Res Commun. 1985 Nov 27; 133(1): 329-36

Speeg KV Jr, Mitchell MC, Maldonado AL.

Additive protection of cimetidine and N-acetylcysteine treatment against acetaminophen-induced hepatic necrosis in the rat.

J Pharmacol Exp Ther. 1985 Sep; 234(3): 550-4

Srikiatkachorn A, Tarasub N, Govitrapong P.

Acetaminophen-induced antinociception via central 5-HT(2A) receptors.

Neurochem Int. 1999 Jun; 34(6): 491-8

Tee LBG, Boobis AR, Huggett AC, Davies DS.

Reversal of acetaminophen toxicity in isolated hamster hepatocytes by dithiothreitol.

Toxicol Appl Pharmacol. 1986 Apr; 83(2): 294-314

Thelen M, Wendel A.

Drug-induced lipid peroxidation in mice—V. Ethane production and Glutathione release in isolated liver upon perfusion with acetaminophen.

Biochem Pharmacol. 1983 Jun 1; 32(11): 1701-06

Thummel KE, Lee CA, Kunze KL, Nelson SD, Slattery JT.

Oxidation of acetaminophen to N-acetyl-p-benzoquinone imine by human CYP3A4.

Biochem Pharmacol. 1993 Apr 22; 45(8): 1563-9

Topinka J, Sram RJ, Sirinjan G, Kocisova J, Binkova B, Fojtikova I.

Mutagenicity studies on paracetamol in human volunteers. II. Unscheduled DNA synthesis and micronucleus test.

Mutat Res. 1989 Nov; 227(3): 147-52

Tsang SY, Tam SC, Bremner I, Burkitt MJ.

Research communication copper-1,10-phenanthroline induces internucleosomal DNA fragmentation in HepG2 cells, resulting from direct oxidation by the hydroxyl radical.

Biochem J 1996 Jul 1;317 (Pt 1): 13-6

van de Straat R, de Vries J, Debets AJ, Vermeulen NP.

The mechanism of prevention of paracetamol-induced hepatotoxicity by 3,5-dialkyl substitution. The roles of glutathione depletion and oxidative stress.

Biochem Pharmacol. 1987 Jul 1; 36(13): 2065-70

Vermeulen NPE, Bessems JGM, van de Straat R.

Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention.

Drug Metab Rev. 1992; 24(3): 367-407

Walker BE, Kelleher J, Dixon MF, Losowsky MS.

Vitamin E Protection of the Liver from Paracetamol in the rat.

Clin Sci Mol Med. 1974 Nov; 47(5): 449-59

Wang K, Shindoh H, Inoue T, Horii I.

Advantages of in vitro cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines.

J Toxicol Sci. 2002 Aug; 27(3): 229-37

Weis M, Kass GE, Orrenius S, Moldeus P.

N-acetyl-p-benzoquinone imine induces Ca^{2+} release from mitochondria by stimulation of pyridine nucleotide hydrolysis.

J Biol Chem. 1992 Jan 15; 267(2): 804-9

Weis M, Morgenstern R, Cotgreave IA, Nelson SD, Moldeus P.

N-acetyl-p-benzoquinone imine-induced protein thiol modification in isolated rat hepatocytes.

Biochem Pharmacol. 1992 Apr 1; 43(7): 1493-1505

Wendel A, Jaeschke H, Gloger M.

Drug-induced lipid peroxidation in mice—II. Protection against paracetamol-induced liver necrosis by intravenous liposomally entrapped glutathione.

Biochem Pharmacol. 1982 Nov 15; 31(22): 3601-5

Wendel A, Hallbach J.

Quantitative assessment of the binding of acetaminophen metabolites to mouse liver microsomal phospholipid.

Biochem Pharmacol. 1986 Feb 1; 35(3): 385-9

Wiger R, Finstad HS, Hongslo JK, Haug K, Holme JA.

Paracetamol Inhibits cell Cycling and Induces Apoptosis in HL-60 Cells.

Pharmacol Toxicol. 1997 Dec; 81(6): 285-93

Younes M, Cornelius S, Siegers CP.

Ferrous iron supported in vivo lipid peroxidation induced by paracetamol, its relation to hepatotoxicity.

Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1986 Jan;51 (1): 89-99

8. Anhänge

8.1. Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse
APAP	Acetaminophen, Paracetamol
ATP	Adenosintriphosphat
Cox	Zyklooxygenase
CYP	Cytochrom P
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GSH	Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
I.E.	internationale Einheiten
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
LMP	low melting point
LPO	Lipidperoxidation
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoniumbromid)
NAPQI	N-Acetyl-p-benzochinonimin
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NMDA	N-Methyl-d-aspartat
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphate buffered saline
pH	$-\log[H^+]$
PLSD	Fisher's protected least significance
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SCGE	single cell gel electrophoresis
SGOT	Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
SOD	Superoxiddismutase
SSB	(DNS-)Einzelstrangbrüche
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WME	Williams Medium E
x	arithmetisches Mittel

8.2. Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien

Collagen – Lösung

50 mg Collagen

ad. 40 ml 0,2 % Essigsäure

Williams Medium E (Fa. Sigma)

„Komplett“ durch Zugabe von

1 % HEPES – Puffer (1M)

2 % Glutamin (200 mM)

1 % Penicillin / Streptomycin (1000 U/ml, 1000 µg/ml)

0,5 % ITS

Vorperfusionspuffer

0,8 g NaCl

0,5 g KCl

2,383 g HEPES

ad. 1000 ml H₂O

pH = 7,4

Zugabe von 1000 I.E. Heparin/100 ml Puffer unmittelbar vor der Perfusion

Collagenasepuffer

3,9 g NaCl

0,5 g KCl

0,7 g CaCl₂ 2 H₂O

2,383 g HEPES

ad. 1000 ml H₂O

pH = 7,6

Zugabe von 50 mg Collagenase H (Boehringer Mannheim)/200 ml Puffer unmittelbar vor der Perfusion

10fach konzentrierter PBS – Puffer

2,0 g KCl

2,0 g KH₂PO₄

1,0 g MgCl₂ 6 H₂O

80,0 g NaCl

14,4 g Na₂HPO₄ 2 H₂O

1fach konzentrierter PBS – Puffer

durch Verdünnung des 10fachen PBS – Puffers mit *Aqua bidest*

MTT – Lösung

3,5 mg/ml MTT

in 1x PBS

MTT – Extraktionslösung

Isopropanol / Ameisensäure (Verhältnis 95:5)

Neutralrot – Stammlösung

4 mg/ml Neutralrot – Farbstoff

in *Aqua bidest*

Neutralrotlösung

durch Verdünnung der Stammlösung auf 50 µg/ml in WME „komplett“

Neutralrot – Fixationslösung

1 % Formaldehyd

1 % CaCl₂

Neutralrot – Extraktionslösung

50 % Ethanol

1 % Essigsäure

Lyselösung

2,5 M NaCl

100 mM Na₂EDTA (372 g/mol)

10 mM Tris

Zugabe von NaOH-Plätzchen bis pH = 10

1 % Na-Laurylsarkosinat

in dest. H₂O

Zugabe von 1 % Triton-x-100 und 10 % DMSO ca. 12 h vor Gebrauch der Lösung

Elektrophoresepuffer

300 mM NaOH

1 mM Na₂EDTA (372 g/mol)

in dest. H₂O

Neutralisationspuffer

0,4 M Tris

in dest. H₂O

rauchende Salzsäure bis pH = 7,5

8.3. Rohdaten

10 μ M N-Acetylcystein

Tabelle 1: MTT-Test (12 h) 10 μ M NAC

APAP [mM]	m			s		
	APAP	NAC PI	NAC MI	APAP	NAC PI	NAC MI
0	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
10	76,70	67,87	77,39	8,58	7,90	14,92
20	63,02	60,64	68,57	8,24	7,89	11,95
25	58,75	60,16	61,24	12,46	12,18	9,65
30	44,08	49,59	47,58	11,06	13,91	12,32
35	29,45	30,21	31,05	8,90	7,98	10,15
40	12,77	12,81	12,01	2,70	5,48	2,74

Tabelle 2: Neutralrottest (12 h) 10 μ M NAC

APAP [mM]	m			s		
	APAP	NAC PI	NAC MI	APAP	NAC PI	NAC MI
0	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
10	57,75	71,48	60,69	12,92	25,26	17,83
20	48,92	67,44	53,67	9,33	26,87	14,85
25	45,10	59,16	49,58	12,84	19,29	18,26
30	36,77	48,62	42,69	9,68	16,89	21,50
35	24,52	35,96	30,08	7,17	12,13	13,79
40	20,78	28,33	25,27	11,65	20,12	14,08

Tabelle 3: Comet Assay 10 μ M NAC

APAP [mM]	m			s		
	APAP	NAC PI	NAC MI	APAP	NAC PI	NAC MI
0	27,57	26,72	27,37	1,80	0,69	0,87
10	29,64	27,03	28,77	1,96	1,15	2,36
20	32,86	27,30	29,51	4,54	1,47	3,52
25	39,71	29,02	30,19	8,59	2,89	3,81
30	63,09	31,42	35,86	19,38	5,54	9,22
40	137,30	103,78	123,74	25,57	13,72	35,43

Tabelle 4: MTT-Test (36 h) 10 μ M NAC

APAP [mM]	m			s		
	APAP	NAC PI	NAC MI	APAP	NAC PI	NAC MI
0	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
10	74,80	76,99	79,79	6,51	12,27	6,64
20	59,57	68,54	61,41	22,90	11,43	21,11
25	43,68	47,17	39,94	24,41	20,23	23,53
30	27,18	25,17	19,34	11,96	13,01	5,29
35	14,17	16,49	14,36	1,17	5,37	3,87
40	13,20	14,71	13,77	1,72	4,45	3,61

Tabelle 5: Neutralrottest (36 h) 10 μ M NAC

APAP [mM]	m			s		
	APAP	NAC PI	NAC MI	APAP	NAC PI	NAC MI
0	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
10	58,72	63,35	67,55	22,57	23,07	23,47
20	44,07	49,50	37,60	23,56	21,99	19,86
25	26,58	30,46	25,27	12,97	12,63	14,64
30	19,66	21,40	17,21	8,42	12,44	10,43
35	12,95	16,49	13,41	4,07	6,55	5,33
40	12,87	16,32	12,57	3,00	8,20	5,30

100µM N-Acetylcystein**Table 6: MTT-Test (12 h) 100 µM NAC**

APAP [mM]	m			s		
	APAP	NAC PI	NAC MI	APAP	NAC PI	NAC MI
0	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
10	76,70	71,44	69,63	8,58	5,57	10,74
20	63,02	56,90	55,91	8,24	9,52	13,17
25	58,75	54,60	51,80	12,46	13,48	13,80
30	44,08	47,65	45,16	11,06	14,46	15,96
35	29,45	31,72	29,52	8,90	10,44	11,16
40	12,77	12,01	10,90	2,70	2,69	3,52

Table 7: Neutralrottest (12 h) 100 µM NAC

APAP [mM]	m			s		
	APAP	NAC PI	NAC MI	APAP	NAC PI	NAC MI
0	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
10	57,75	49,13	63,05	12,92	18,17	20,73
20	48,92	47,12	62,56	9,33	11,67	7,99
25	45,10	44,66	57,81	12,84	14,40	8,79
30	36,77	36,70	45,67	9,68	9,19	12,07
35	24,52	23,53	30,13	7,17	7,34	6,07
40	20,78	19,45	29,99	11,65	8,73	14,50

Table 8: Comet Assay 100 µM NAC

APAP [mM]	m			s		
	APAP	NAC PI	NAC MI	APAP	NAC PI	NAC MI
0	27,76	26,88	26,85	1,77	1,00	1,31
10	30,96	27,20	27,53	1,82	1,12	1,87
20	33,64	27,53	27,66	4,24	1,55	2,59
25	45,81	27,98	28,93	20,06	1,08	4,14
30	70,23	30,75	32,21	28,55	3,85	5,97
40	136,63	105,67	121,65	24,09	13,83	31,45

MTT-Test (36 h) 100 µM NAC

APAP [mM]	m			s		
	APAP	NAC PI	NAC MI	APAP	NAC PI	NAC MI
0	103,93	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
10	74,25	70,25	76,97	6,51	8,98	14,30
20	65,05	63,75	71,68	22,90	19,27	18,29
25	48,32	47,94	56,57	24,41	20,97	32,74
30	24,65	23,90	29,94	11,96	10,96	21,26
35	14,77	14,69	15,69	1,17	2,23	7,55
40	14,12	13,85	13,57	1,72	4,17	4,37

Table 9: Neutralrottest (36 h) 100 µM NAC

APAP [mM]	m			s		
	APAP	NAC PI	NAC MI	APAP	NAC PI	NAC MI
0	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
10	58,72	67,87	66,94	24,72	21,35	22,45
20	44,07	51,49	42,84	25,81	24,56	15,81
25	26,58	33,43	26,26	14,21	22,04	13,96
30	19,66	20,92	17,27	9,41	12,78	7,20
35	12,95	16,40	12,87	4,46	8,36	3,41
40	12,87	14,67	11,13	3,29	6,93	3,43

25µM Silibin**Tabelle 10: MTT-Test (12 h) Silibin**

APAP [mM]	m			s		
	APAP	SPI	SMI	APAP	SPI	SMI
0	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
10	67,79	60,81	62,72	6,58	9,07	13,14
20	59,79	51,41	51,22	8,23	10,92	13,27
25	54,73	52,19	55,53	12,40	11,91	12,46
30	43,05	40,89	47,73	9,74	12,57	11,04
35	25,86	22,47	27,09	10,27	11,28	9,62
40	8,01	10,34	11,65	1,60	1,73	4,02

Tabelle 11: Neutralrottest (12 h) Silibin

APAP [mM]	m			s		
	APAP	SPI	SMI	APAP	SPI	SMI
0	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
10	57,94	51,70	52,60	20,57	15,40	23,38
20	50,71	49,26	53,01	16,97	18,37	14,63
25	45,48	46,98	52,80	12,59	17,13	15,45
30	38,04	41,52	43,73	13,14	15,92	15,35
35	27,96	32,20	32,47	11,93	13,31	9,61
40	22,63	28,98	29,27	9,20	13,90	10,71

Tabelle 12: Comet Assay Silibin

APAP [mM]	m			s		
	APAP	SPI	SMI	APAP	SPI	SMI
0	28,95	29,07	27,27	1,60	4,23	2,92
10	31,67	28,97	28,22	4,79	1,27	2,88
20	33,47	28,88	29,93	5,06	0,73	2,72
25	40,32	31,72	33,32	7,27	3,35	4,52
30	77,62	40,57	46,35	17,36	8,45	11,73
40	148,95	119,07	130,25	26,09	13,79	32,61

Tabelle 13: MTT-Test (36 h) Silibin

APAP [mM]	m			s		
	APAP	SPI	SMI	APAP	SPI	SMI
0	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
10	82,67	61,10	71,40	20,37	16,05	13,80
20	68,53	52,68	53,95	12,73	16,26	21,53
25	48,91	35,72	39,12	24,67	22,30	19,79
30	23,56	16,25	15,02	16,64	11,62	4,35
35	13,33	10,64	13,07	5,41	2,66	2,51
40	12,63	10,72	14,51	3,90	3,37	3,63

Tabelle 14: Neutralrottest (36 h) Silibin

APAP [mM]	m			s		
	APAP	SPI	SMI	APAP	SPI	SMI
0	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00
10	60,83	45,02	50,12	14,27	8,03	17,74
20	41,53	32,02	33,66	16,38	8,59	16,53
25	29,14	25,59	26,66	15,71	9,49	10,92
30	19,01	18,26	19,90	8,27	6,34	8,26
35	14,83	15,15	17,93	5,22	5,65	8,52
40	14,20	14,56	19,96	5,49	6,16	10,48

50µM α-Tocopherol-Succinat**Tabelle 15: MTT-Test (12 h) Vitamin E**

	m		s	
APAP [mM]	APAP	Vit. E	APAP	Vit. E
0	100,00	100,00	0,00	0,00
10	79,22	80,38	30,91	30,47
20	67,81	74,45	26,33	27,84
25	60,59	67,50	22,48	22,40
30	43,27	59,17	20,84	22,64
35	17,87	26,12	12,56	15,91
40	9,41	12,89	2,29	3,24

Tabelle 16: Neutralrottest (12 h) Vitamin E

	m		s	
APAP [mM]	APAP	Vit. E	APAP	Vit. E
0	100,00	100,00	0,00	0,00
10	58,80	58,84	14,46	27,61
20	51,61	51,28	12,23	28,44
25	44,62	51,84	9,20	26,93
30	35,04	37,79	7,91	16,40
35	28,90	31,79	8,11	19,71
40	23,87	21,99	5,91	8,80

Tabelle 17: Comet Assay Vitamin E

	m		s	
APAP [mM]	APAP	Vit. E	APAP	Vit. E
0	28,50	29,23	2,92	2,62
10	33,70	30,46	9,16	3,78
20	40,24	33,40	14,21	8,22
25	76,88	38,26	33,82	12,90
30	122,84	64,65	42,35	25,13
40	165,23	149,70	21,03	26,75

Tabelle 18: MTT-Test (36 h) Vitamin E

	m		s	
APAP [mM]	APAP	Vit. E	APAP	Vit. E
0	100,00	100,00	0,00	0,00
10	77,11	80,72	15,99	8,44
20	65,23	80,86	22,66	17,41
25	37,00	60,95	10,56	24,26
30	14,19	25,65	4,70	10,73
35	13,13	13,69	5,18	5,46
40	12,67	14,39	4,51	6,22

Tabelle 19: Neutralrottest (36 h) Vitamin E

	m		s	
APAP [mM]	APAP	Vit. E	APAP	Vit. E
0	100,00	100,00	0,00	0,00
10	52,27	77,25	20,97	14,96
20	29,50	52,46	9,74	23,23
25	19,48	35,16	6,93	13,85
30	12,56	17,40	2,97	8,20
35	12,20	12,55	3,80	1,83
40	12,68	14,31	2,09	4,33

Klastogene und zytotoxische Wirkung von Paracetamol in primären Rattenhepatozytenkulturen: Einfluß von Antioxidantien

Dissertation von Virginia Lewerenz

Paracetamol ist ein weithin gebräuchliches, in therapeutischer Dosis relativ nebenwirkungsarmes Analgetikum und Antipyretikum. Bei Intoxikation kommt es unter anderem zu Leberzellschäden bis hin zum fulminanten Leberversagen. Die Ätiologie der Hepatotoxizität von Paracetamol ist noch unklar, diskutiert werden oxidative Vorgänge, wie zum Beispiel die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch den bei Überdosierung vermehrt gebildeten Paracetamol-Metaboliten NAPQI sowie nicht-oxidative Mechanismen der Störung des zellulären Stoffwechsels, wie beispielsweise die Arylierung von Proteinen durch NAPQI. Im Zuge der Leberzellschädigung durch Paracetamol kommt es neben dem Verlust der Zellviabilität auch zum Auftreten von DNS-Strangbrüchen.

In dieser Arbeit wurde in primären Rattenhepatozyten ein möglicher Zusammenhang zwischen diesen beiden Phänomenen und deren zugrundeliegender Mechanismus untersucht.

Eine Verminderung der Zellviabilität (gemessen mit MTT- und Neutralrottest) trat bereits bei geringeren Paracetamoldosen (ab 10 mM Paracetamol) auf als die Induktion von DNS-Strangbrüchen (ab 25 – 30 mM Paracetamol), was darauf hindeutet, daß die DNS-Strangbrüche kein kausales Ereignis für die Entwicklung der von Paracetamol verursachten Leberzellnekrosen, sondern vielmehr ein im Laufe des Zelluntergangs auftauchendes Phänomen darstellen.

Weiterhin wurde geprüft, ob antioxidativ wirksame Substanzen (N-Acetylcystein, Silibin und α -Tocopherol) einen hemmenden Effekt auf die Ausprägung des zytotoxischen Effekts beziehungsweise die Induktion von DNS-Strangbrüchen durch Paracetamol in den Leberzellen haben. Während der durch Paracetamol hervorgerufene Viabilitätsverlust durch keines der Antioxidantien supprimiert wurde, konnte die Induktion von DNS-Strangbrüchen sowohl von N-Acetylcystein und Silibin als auch in etwas geringerem Maße durch α -Tocopherol verringert beziehungsweise bei submaximaler Paracetamoldosis sogar in ihrer Entstehung unterdrückt werden.

In der Zusammenschau dieser Ergebnisse läßt sich vermuten, daß es sich bei der zytotoxischen Wirkung und der Induktion von DNS-Strangbrüchen durch Paracetamol um zwei voneinander unabhängige Effekte handelt, wobei der Induktion von DNS-Strangbrüchen ein oxidativer und dem Viabilitätsverlust ein nicht-oxidativer Mechanismus wie zum Beispiel die Proteinarylierung zugrunde liegt und die DNS-Strangbrüche erst zu einem relativ späten Zeitpunkt im Verlauf der Leberzellschädigung durch Paracetamol auftreten.

Düsseldorf, den 03.11.2004



Prof. Dr. med. R. Kahl

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Lewerenz
Vorname: Virginia
Geburtsdatum: 27.07.1976
Geburtsort: Düsseldorf
Anschrift: Friedrichstr. 117
40217 Düsseldorf
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1983 – 1987 Grundsule in Düsseldorf
1987 – 1996 Städt. Geschwister-Scholl-Gymnasium, Düsseldorf
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

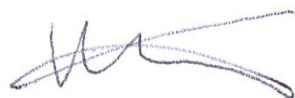
Hochschulbildung:

10/1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
08/1999 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: befriedigend)
09/1999 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Toxikologie der HHU Düsseldorf
03/2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut)
04/2002 – 03/2003 Praktisches Jahr an den Universitätskliniken Düsseldorf
15. 05.2003 Ärztliche Prüfung (Gesamtnote: gut (2,16))
01.10.2004 Approbation

Veröffentlichungen:

- 2000 Poster: V. Lewerenz, C. El-Bahay, S. Hanelt and R. Kahl:
Protection by antioxidants against paracetamol-induced DNA
damage. Herbsttagung der DGPT.
- 2003 V. Lewerenz, S. Hanelt, C. Nastevska, E. Röhrdanz and R.
Kahl: Antioxidants protect primary rat hepatocyte cultures
against acetaminophen-induced DNA strand breaks but not
against acetaminophen-induced cytotoxicity.
Toxicology. 2003 Sep 30; 191(2-3): 179-87.
- 2004 V. Lewerenz, T. Burchardt, A. Büchau, T. Ruzicka and M.
Megahed: Livedovaskulopathie in Kombination mit
heterozygoter Faktor V Leiden Mutation und Sticky Platelet
Syndrom.
Hautarzt. 2004 Apr; 55(4): 379-81.

Düsseldorf, den 03. November 2004



Virginia Lewerenz