

Aus der Klinik und Poliklinik
für Anästhesiologie und Intensivtherapie
der Universität Rostock

Direktor: Herr Professor Dr. D. Reuter

**In-vitro Hepatotoxizitätsbestimmung intensivmedizinisch
relevanter Hypnotika und Opiode mit der permanenten
humanen Hepatozytenzelllinie Hep G2/C3A**

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

Vorgelegt von Katharina Haller
aus Berlin

ROSTOCK, 01.11.2020

Dekan der Medizinischen Fakultät: Herr Prof. Dr. med. habil. Emil C. Reisinger

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. habil. Martin Sauer,
Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin Klinikum Magdeburg
2. Prof. Dr. med. Georg Lamprecht,
Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie der Universitätsmedizin Rostock
3. Prof. Dr. rer. nat. Mladen V. Tzvetkov,
Institut für Pharmakologie Universität Greifswald

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der öffentlichen Verteidigung: 2021

Alle Wissenschaft wäre überflüssig, wenn die Erscheinungsform und das Wesen der Dinge unmittelbar zusammenfielen Karl Marx - *Friedrich Engels - Werke, Band 25, "Das Kapital", Bd.III*

I. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Leberversagen	1
1.2	Medikamentenassoziierte Leberschädigung.....	6
1.3	Arzneimittelsicherheit und Testung auf Hepatotoxizität	11
1.4	Intensivmedizinische Analgosedierung.....	17
2	Zielstellung	26
3	Material und Methoden.....	27
3.1	Testsubstanzen.....	27
3.2	Zellkultur	28
3.3	Gewinnung von Spenderplasma.....	29
3.4	Durchführung des Hepatotoxizitätstests	30
3.5	Statistik	36
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Hypnotika und Sedativa	37
4.2	Opioide.....	48
4.3	Zusammenfassung.....	58
5	Diskussion	65
6	Zusammenfassung.....	77
7	Literaturverzeichnis	79
8	Anhang.....	101
9	Eidesstaatliche Erklärung.....	110
10	Danksagung.....	111

II. Abkürzungsverzeichnis

3		I	
3-MC	3-Methylcholantren	INR	International International Normalized Ratio
A		L	
ALAT	Alanin Aminotransferase	LDH	Laktatdehydrogenase
ALV	Akutes Leberversagen	M	
AMG	Arzneimittelgesetz	MELD	Model of endstage liver disease
AP	Alkalische Phosphatase	MOV	Multiorganversagen
ARDS	Acute respiratory distress syndrome	N	
B		NAD	Nikotinamiddinukleotid
BSEP	Bile salt export pump	P	
C		PBS	Phosphate buffered saline
CYP450	Cytochrom P450	R	
D		RASS	Richmond Agitation Sedation Scale
DILI	Drug induced liver injury	S	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	SBP	Spontan bakterielle Peritonitis
DMSO	Dimethylsulfoxid	SIRS	Systemic inflammatory response
E		T	
ELAD	extracorporal liver assist device	TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
EMA	Europäische Arzneimittelagentur	X	
F		XTT	Natrium-3'-(1- phenylaminocarbonyl)- 3,4-tetrazolium-bis-(4- methoxy-6-nitro)- benzesulphon-säure
FDA	Food and Drug Administration	Y	
FKS	Fetales Kälberserum	γ -GT	Gamma- Glutamyltransferase
H			
HE	Hepatische Enzephalopathie		
HRS	Hepatorenales Syndrom		

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Ätiologie des akuten Leberversagens. Erfassung von 1.147 Patienten in den USA im Zeitraum 1998 - 2007 durch ALF Study Group; HBV: Hepatitis B Virus, HAV: Hepatitis A Virus. Modifiziert nach [5].	1
Abbildung 2	Mechanismen der medikamenteninduzierten Hepatotoxizität (1) Metabolisierung des Medikaments durch CYP450 zu reaktiven Metaboliten. (2) Reaktive Metaboliten aktivieren apoptotische Signalkaskaden. (3) Glutathionmangel führt zur kovalenten Bindung an hepatische Proteine und einer Aktivierung der Immunantwort. (4) Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Mitochondrien mit Öffnung von mitochondrialen Kanälen, Zusammenbruch der ATP-Synthese und folgender Nekrose. Cyt c, Cytochrom C; ETK, Elektronentransportkette; MPT, mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore; ÄMM, äußere mitochondriale Membran. Modifiziert nach [73].	10
Abbildung 3	Übersicht über die hepatischen Gallensalztransporter und deren vorwiegende Ausscheidungsfunktion. NTCP=Na ⁺ /taurocholat Cotransporter; OATP = organic anion transport protein; MRP2 = multidrug resistance-associated protein-2; BSEP = bile salt export protein; MDR1 bzw. 3 = multidrug-resistance protein 1 bzw. 3. Modifiziert nach [84].	11
Abbildung 4	Strukturformel von Midazolam (8-Chlor-6-(2-fluorphenyl)-1-methyl-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin)	18
Abbildung 5	Protonierung und Ringöffnung von Midazolam. Aus [120].	18
Abbildung 6	Strukturformel von Propofol (2,6-Diisopropylphenol)	19
Abbildung 7	Strukturformel von R,S-Ketamin ((RS)-(±)-2-(2-Chlorphenyl)-2-(methylamino)-cyclohexan-1-on)	20
Abbildung 8	Metabolismus von Ketamin. [152].	21
Abbildung 9	Strukturformel von Thiopental	22
Abbildung 10	Metabolismus von Thiopental. Modifiziert nach [167].	22
Abbildung 11	Strukturformel von Fentanyl (N-(1-Phenethyl-4-piperidyl) propionanilid).	23
Abbildung 12	Strukturformel von Remifentanyl (3-{4-Methoxycarbonyl-4-[(1-oxopropyl)phenyl-amino]-1-piperidin}propansäure-methylester)	24
Abbildung 13	Metabolismus von Remifentanyl. Hauptweg ist die Esterspaltung zu Remifentanilsäure (GI90291). Als Nebenweg existiert die N-Dealkylierung zu GI94219. [183].	25

Abbildung 14	Strukturformel von Sufentanil (N-[4-(Methoxymethyl)-1-(2-thiophen-2-ylethyl)-4-piperidyl]-N-phenyl-propanamid).....	25
Abbildung 15	Schematische Darstellung des vermuteten Mechanismus des XTT-Tests	34
Abbildung 16	Reaktionsprinzip des Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Tests; das ebenfalls entstehende Acetaldehyd ist nicht dargestellt. [214]	35
Abbildung 17	Zellzahl nach 6-tägiger Inkubation im Medium.....	38
Abbildung 18	Vitalität nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Klinisch relevante Konzentrationen (C_{max}) der Hypnotika und Sedativa. Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.	40
Abbildung 19	Vitalität nach 6-tägiger Inkubation im Plasma bei aufsteigenden Konzentrationen von Thiopental ($C_{max} - C_{10x}$). Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle bzw. untereinander dargestellt.....	41
Abbildung 20	Mikroalbuminkonzentrationen nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit klinisch relevanten Konzentrationen (C_{max}) der Hypnotika und Sedativa. Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.	42
Abbildung 21	Indirekter XTT-Test (Extinktion) nach 6-tägiger Inkubation im Medium... ..	44
Abbildung 22	Direkter XTT-Test (Extinktion) nach 6-tägiger Inkubation im Medium.	46
Abbildung 23	Resorufinkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit klinisch relevanten Konzentrationen (C_{max}). Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.....	47
Abbildung 24	Zellzahlen nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit klinisch relevanten Konzentrationen (C_{max}) Fentanyl, Remifentanyl und Sufentanil. Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.	49
Abbildung 25	Vitalität nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit klinisch relevanten Konzentrationen (C_{max}) von Fentanyl, Remifentanyl und Sufentanil. Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.	50
Abbildung 26	LDH-Freisetzung nach Zugabe klinisch relevante Konzentrationen (C_{max}) der Opiode.....	52
Abbildung 27	Indirekter XTT-Test (Extinktion) nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit klinisch relevanten Konzentrationen (C_{max}) von Fentanyl, Remifentanyl und	

Sufentanil. Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 54

Abbildung 28 Indirekter XTT-Test (Extinktion) nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit aufsteigender Konzentration von Sufentanil (C_{\max} - C_{10x}). Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ zur Negativkontrolle bzw. zueinander dargestellt. 55

Abbildung 29 Resorufinkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit aufsteigender Konzentration von Remifentanil (C_{\max} - C_{10x}). Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 56

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Klinische Merkmale eines Akuten Leberversagens. Modifiziert nach [12].....	2
Tabelle 2	West Haven Kriterien (modifiziert nach [17]).	3
Tabelle 3	Die häufigsten 5 Medikamentenklassen und Substanzen, die eine Leberschädigung hervorrufen. *Heilpflanzen und Nahrungsergänzungsmittel werden nicht aufgelistet. Modifiziert nach [52].	6
Tabelle 4	Klinische Schädigungsmuster der medikamenteninduzierten Leberschädigung modifiziert nach [53]; ULN: Upper Limit of Normal (Obere Grenze des Normwerts), ALAT: Alanin Aspartat Transferase, AP: Alkalische Phosphatase.....	7
Tabelle 5	Parameter der Toxizitätsprüfung nach [86].	13
Tabelle 6	Graduierung der Zytotoxizität nach [93].	14
Tabelle 7	Phasen der klinischen Testung nach [77].	16
Tabelle 8	Übersicht der verwendeten Hypnotika und Opioide; C_{max} : klinisch relevante Konzentration, C_{5x} : 5-fach maximale Konzentration, C_{10x} : 10-fach maximale Konzentration, DMSO: Dimethylsulfoxid, ML: Medikamentenlösung.....	27
Tabelle 9	Plattenbelegung im Versuchsaufbau. C_{max} : maximale Konzentration; C_{5x} : 5-fache maximale Konzentration;- C_{10x} 10-fach maximale Konzentrationen der Testsubstanz; SL: Stammlösung (s. Abschnitt 3.1), FKS: fetales Kälberserum	30
Tabelle 10	Mikroalbuminkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit klinisch relevanten Konzentrationen (C_{max}) von Fentanyl, Remifentanyl und Sufentanyl. Es sind Median, 25/75 Perzentil und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.	53
Tabelle 11	Übersicht des Hepatotoxizitätstest für Midazolam in den Konzentrationen C_{max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.	58
Tabelle 12	Übersicht des Hepatotoxizitätstest für Propofol in den Konzentrationen C_{max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.	59
Tabelle 13	Übersicht des Hepatotoxizitätstest für S-Ketamin in den Konzentrationen C_{max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * $p < 0,05$ gegenüber	

	der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.	60
Tabelle 14	Übersicht des Hepatotoxizitätstest für Thiopental in den Konzentrationen C_{\max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.	61
Tabelle 15	Übersicht des Hepatotoxizitätstest für Fentanyl in den Konzentrationen C_{\max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.	62
Tabelle 16	Übersicht des Hepatotoxizitätstest für Remifentanyl in den Konzentrationen C_{\max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.	63
Tabelle 17	Übersicht des Hepatotoxizitätstest für Sufentanyl in den Konzentrationen C_{\max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.	64
Tabelle 18	pH-Wert der verschiedenen Medikamentenkonzentrationen im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	101
Tabelle 19	pH-Wert der Medikamentenkonzentrationen Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	101
Tabelle 20	Zellzahl nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	102
Tabelle 21	Vitalität nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	102
Tabelle 22	Zellzahl nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	103
Tabelle 23	Vitalität nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	103
Tabelle 24	LDH-Aktivität nach 3-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	104
Tabelle 25	LDH-Aktivität nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	104
Tabelle 26	LDH-Aktivität nach 3-tägiger Inkubation im Plasma.....	105

Tabelle 27	LDH-Aktivität nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	105
Tabelle 28	Mikroalbuminkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	106
Tabelle 29	Mikroalbuminkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	106
Tabelle 30	Indirekter XTT-Test [Extinktion/Well] nach 6-tägiger Inkubation im Medium.....	107
Tabelle 31	Direkter XTT-Test [Extinktion/Well] nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	107
Tabelle 32	Indirekter XTT-Test [Extinktion/Well] nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	108
Tabelle 33	Direkter XTT-Test [Extinktion/Well] nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.	108
Tabelle 34	Resorufinkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt. ...	109
Tabelle 35	Resorufinkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt. ...	109

1 Einleitung

1.1 Leberversagen

Das akute oder fulminante Leberversagen (ALV) ist mit jährlich etwa 200 - 500 Fällen in Deutschland ein seltenes, jedoch lebensbedrohliches Krankheitsbild mit einer Letalität von bis zu 50% ohne Lebertransplantation. [1–3] Die am häufigsten zum Tode führenden Folgen sind das Hirnödem, Infektionen und Multiorganversagen (MOV). [4]

Definitionen

Seit der Erstbeschreibung des ALV im Jahre 1970 von Trey und Davidson existieren viele Definitionen, deren gemeinsame Eckpfeiler zusammengefasst werden können. Sie definieren das ALV als kurz andauernden (< 12 - 26 Wochen) Verlust der hepatischen Funktion mit Koagulopathie (INR \geq 1,5) und Enzephalopathie bei nicht vorgeschädigter Leber. [5, 6] Fehlt die hepatische Enzephalopathie, so spricht man eher von schwerer akuter Leberinsuffizienz. [7] Als frühe hepatische Dysfunktion, die bei 11% aller Intensivpatienten auftritt, bezeichnet man Serum-Bilirubinwerte $> 34,2 \mu\text{mol/l}$ innerhalb der ersten 48 Stunden des Krankenhausaufenthalts. [8]

Ätiologie

Im Gegensatz zu den Entwicklungsnationen, wo virale Hepatitiden häufigster Auslöser des ALV sind stehen in den Industrieländern Medikamente an erster Stelle. [9, 10] So waren in einer retrospektiven deutschen Studie 40% der Fälle von ALV auf Medikamenteneinnahme zurückzuführen und in den USA ist Acetaminophen mit einem Anteil von fast der Hälfte noch immer die wichtigste Ursache (s. Abbildung 1). [11]

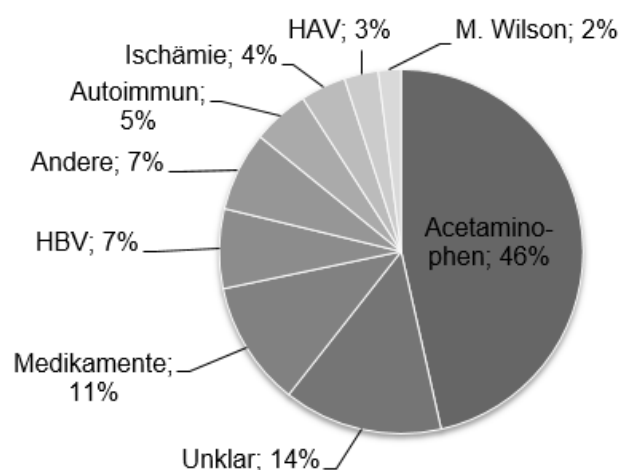


ABBILDUNG 1 Ätiologie des akuten Leberversagens. Erfassung von 1.147 Patienten in den USA im Zeitraum 1998 - 2007 durch ALF Study Group; HBV: Hepatitis B Virus, HAV: Hepatitis A Virus. Modifiziert nach [5].

Weitere weniger häufige Ursachen sind metabolische Störungen wie Morbus Wilson, toxische Schädigung durch *Amanita* spp. (Knollenblätterpilz) oder immunologische Schädigung bei Autoimmunhepatitis. [12] Im Gegensatz zu den eben genannten primären Ursachen eines Leberversagens spricht man von sekundärem Leberversagen, wenn es z.B. die Folge von Sepsis oder Herz-Kreislauf-Stillstands ist. [13] Häufig entsteht das ALV auf dem Boden einer vorbestehenden Lebererkrankung, sodass man von akut-auf-chronischem Leberversagen spricht. [14]

Symptomatik

Das ALV ist ein Krankheitsbild, bei dem am Anfang häufig unspezifische Symptome wie Schwäche, Übelkeit und Völlegefühl mit Zeichen hepatischer Insuffizienz wie Ikterus oder Enzephalopathie (s.u.) stehen. [15] Die negativen Auswirkungen auf die Organsysteme bis hin zum Multiorganversagen und deren klinischen Merkmale fasst Tabelle 1 zusammen.

Organsystem	Auswirkung
Systemisch	Systemische Inflammation (systemic inflammatory response; SIRS) Spontan bakterielle Peritonitis Kataboler Stoffwechselzustand
Leber	Verminderung der <ul style="list-style-type: none"> • Glukoneogenese mit Hypoglykämie • Laktatclearance mit Laktatazidose • Ammonikentgiftung mit Hyperammonämie
Lunge	Acute respiratory distress syndrome (ARDS)
Nebenniere	Inadäquate Glukokortikoidproduktion mit Hypotension
Gerinnungssystem	Verminderte Synthese von Gerinnungsfaktoren mit Koagulopathie sowie Thrombozytopenie
Knochenmark	Suppression, z.B. Thrombozytopenie
Leukozyten	Beeinträchtigte Funktion mit Gefahr der Infektanfälligkeit
Gehirn	Hepatische Enzephalopathie Zerebrales Ödem Intrakranielle Drucksteigerung
Herz	Subklinische myokardiale Schädigung
Pankreas	Pankreatitis (vor allem bei Acetaminophen bedingtem ALV)
Niere	Akute Nierenschädigung bei Leberinsuffizienz Hepatorenales Syndrom

TABELLE 1 Klinische Merkmale eines Akuten Leberversagens. Modifiziert nach [12].

Eine wichtige und prognoserelevante Organdysfunktion, die im Rahmen des Leberversagens auftritt, ist die hepatische Enzephalopathie (HE). Darunter versteht man "Veränderungen in

psychomotorischen, intellektuellen, kognitiven, emotionalen, verhaltenssteuernden und feinmotorischen Funktionen". [16] Sie kann anhand der Symptomatik z.B. durch die seit 1969 gebräuchliche West Haven Kriterien in die Grade I - IV (s. Tabelle 2) eingeteilt werden und sich zu einem zerebralen Ödem mit Erhöhung des intrakraniellen Drucks entwickeln.

Grad	Symptomatik
0	Nur durch psychometrische Tests detektierbar
1	Verlangsamung, verminderte Aufmerksamkeit
2	Lethargie oder Apathie, Desorientierung, bizarres Verhalten
3	Somnolenz bis Semistupor
4	Coma hepaticum

TABELLE 2 West Haven Kriterien (modifiziert nach [17]).

Pathophysiologisch geht man davon aus, dass es zur Astrozytenschwellung kommt, deren genaue Ursache noch diskutiert wird. [18] Zum einen wurde in klinischen Studien gezeigt, dass eine Korrelation zwischen hohen Ammoniakkonzentrationen und Entwicklung einer HE besteht und bei Konzentrationen $> 200 \mu\text{mol/l}$ die Gefahr einer zerebralen Herniation erhöht ist. [19] Zum anderen gibt es auch Hinweise darauf, dass inflammatorische Zustände zur Entwicklung der HE beitragen (über den zerebralen Blutfluss oder auch über Änderung der Permeabilität des Endothels gegenüber Neurotoxinen). [16]

Patienten im akuten Leberversagen sind besonders gefährdet für Infektionen. So sind sie nicht nur immunkompromittiert und benötigen häufig invasive Verfahren (z.B. zentralvenöse Zugänge, maschinelle Beatmung bei HE), sondern können auch schwer diagnostiziert werden, da sie u.a. nicht in der Lage sind mit Veränderungen der Körpertemperatur zu reagieren. [20]

Therapie

Die Therapie des ALV gestaltet sich so vielfältig wie die Ursachen und Symptome. Da aber selbst bei kausaler Therapie nicht alle Patienten ansprechen, z.B. nur 50% auf Prednisolon im Rahmen einer Autoimmunhepatitis, stellt die einzig kurative Therapie des ALV die Lebertransplantation dar, die für einen Anteil von 5 - 12% der Lebertransplantationen insgesamt verantwortlich ist. [21, 22] Die Durchführung hängt vor allem von der Einschätzung der Prognose ab (s. unten).

Sowohl als Primär- als auch Sekundärprophylaxe der HE wird die Senkung der Ammoniakspiegel im Blut durch orale oder rektale Zufuhr von Lactulose empfohlen. [16, 23, 24] Weiterhin werden das Antibiotikum Rifaximin sowie L-Ornithin-L-Aspartat eingesetzt. Kommt es in den Stadien III-IV zur zunehmenden Vigilanzminderung mit dem Verschwinden der Schutzreflexe, so ist eine Schutzintubation notwendig. Damit einhergehen sollte eine Analgosedierung zur Verhinderung eines Anstiegs des intrakraniellen Drucks. [25–27] Sollte

es trotzdem zum Anstieg des intrakraniellen Drucks kommen (der für 25% der Todesfälle im ALV verantwortlich ist [28]), so wird als Erstlinientherapie Mannitol als Bolus und bei refraktären Zuständen leichte Hypernatriämie (Natrium 145 – 155 mmol/l) und Hypothermie (34 - 35°C Körperkerntemperatur) empfohlen. [29]

Ist die renale Funktion beeinträchtigt, so konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Humanalbumin sowie Terlipressin zur Besserung sowie Verringerung der Mortalität, zumindest beim Typ 1 des hepatorenen Syndroms (HRS), führt. [30] Aufgrund der hohen Kosten von Terlipressin wird meist zunächst die Gabe von Noradrenalin und bei Nichtansprechen eine zusätzliche Gabe von Terlipressin oder Vasopressin empfohlen. [31]

Die durch hypotone Hyperhydratation entstehende Hyponatriämie sollte durch Volumenrestriktion therapiert werden. Für den Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Tolvaptan konnte eine Besserung der Hyponatriämie gezeigt werden, jedoch ohne Veränderung der Mortalität. [32]

Die Gabe von nicht-selektiven Beta-Blockern war schon lange ein fester Bestandteil der Prävention von Varizenblutungen. Trotz zahlreicher Bedenken wurden in den letzten Jahren auch positive Effekte bei dekompensierter Leberzirrhose mit Aszites gefunden oder bei akut- auf chronischem Leberversagen. [33] So wurde u.a. eine geringere Sterblichkeit auf der Warteliste zur Transplantation beobachtet. [34] Dies ist vermutlich nicht nur ursächlich in der Verringerung des portalvenösen Drucks, sondern auch in geringerer bakterieller Translokation sowie geringerer Rate von spontan bakterieller Peritonitis (SBP). Die Gabe wird jedoch wegen des Risikos eines hepatorenen Syndroms und erhöhter Mortalität nur innerhalb bestimmter Grenzen von Blutdruck, Serumnatrium und Kreatinin empfohlen. [35]

Die spontan bakterielle Peritonitis ist eine häufige Infektion bei Leberzirrhose und hat eine Mortalität zwischen 20 - 40%. [36] Sie wird definiert als das Vorhandensein von 250 polymorphnukleären Zellen pro Milliliter Aszites bei fehlender intraabdomineller Infektionsquelle. Die Kultur ist nur in ca. 50% der Fälle positiv. [37] Da es sich größtenteils um gram-negative Bakterien handelt werden als kalkulierte Antibiotikatherapie der ersten Wahl in den meisten Leitlinien Cephalosporine der dritten Generation empfohlen. [38, 39] Eine neuere deutsche Studie konnte hingegen zeigen, dass sogar mehr gram-positive Bakterien für SBP verantwortlich sind und nur in ca. 50% der Fälle mit der empfohlenen Therapie abgedeckt wurden. [37] Parallel zur antibiotischen Therapie wird empfohlen bei Diagnosestellung 1,5 g/kg Körpergewicht Humanalbumin sowie am dritten Tag 1,0 g/kg Körpergewicht zu verabreichen. Hierdurch soll sowohl Inzidenz (bei alleiniger antibiotischer Therapie bis zu 30%) als auch Mortalität eines HRS deutlich verringert werden. [29, 40]

Extrakorporale Leberersatzverfahren stellen eine (bisher nicht außerhalb von Studien empfohlene) Therapie zur Überbrückung der Zeit bis zur Transplantation oder möglichen

Akutregeneration dar und dienen der Entfernung proteingebundener toxischer Substanzen, die durch die "klassische" Dialyse nicht erfasst werden können. Man unterscheidet hierbei prinzipiell in artifizielle (zellfreie) und bioartifizielle (auf Zellbasis funktionierende) Systeme:

Artifizielle Systeme

Hierbei zu nennen sind zwei Möglichkeiten der Albumindialyse: MARS und Prometheus. Im von Stange und Mitzner entwickelten MARS (Molecular Adsorbents Recirculating System) werden im Patientenplasma befindliche Toxine über eine semipermeable Membran an eine Albuminlösung abgegeben, die in einem Sekundärkreislauf gereinigt und wiederverwendet wird. [41] Im Gegensatz dazu erfolgt die Dialyse durch das Prometheus System so, dass das Albumin des Patienten von Toxinen gereinigt und anschließend in den Patientenkreislauf rückgeführt wird. [42]

Bioartifizielle Verfahren

Neben den oben erwähnten zellfreien Systemen, die auf die Elimination von Toxinen ausgelegt sind, steht mit z.B. dem ELAD (extracorporeal liver assist device) System aus 300 - 400g humanen Hepatomazellen HepG2/C3A (also etwa 20% der Leberzellmasse) ein Biosystem zur Verfügung, das zusätzlich einen Teil der Synthesefunktion der Leber (Albumin und Gerinnungsfaktoren) ersetzen soll. [43]

Prognose

Besonders schlecht ist die Prognose für Patienten, die das akute Leberversagen auf Basis von Sepsis, Medikamenteneinnahme oder Autoimmunhepatitis erworben haben. Bei diesen Patientengruppen liegt die Mortalität bei ca. 70%. [44] Kommt es im Rahmen des ALV zum septischen Schock erreicht sie sogar 98%. [20]

Es gibt zahlreiche Bewertungssysteme, die zur Abschätzung der Prognose entwickelt wurden. Hier sind der MELD(Model of endstage liver disease)-Score, die King's College Hospital Kriterien sowie die Clichy-Kriterien zu nennen. Doch keines besticht bisher durch zufriedenstellende prädiktive Aussagekraft. [29] Die derzeit wichtigsten Kriterien stellen die King's College Hospital Kriterien mit einer Sensitivität von 68%-69% und einer Spezifität zwischen 82% und 92% dar. [45]

Indikatoren für ein schlechtes Outcome sind:

- Enzephalopathie Grad III und IV zum Zeitpunkt der Aufnahme [46]
- Latenzzeit zwischen Auftreten von Ikterus und HE (subakutes Leberversagen) [47]

Schließlich ist auch die Überführung in ein spezialisiertes Zentrum sowie die Möglichkeit der Organtransplantation ein die Prognose beeinflussender Faktor. [22] Kommt es zur Transplantation liegt die 1-Jahres-Überlebensrate heutzutage bei > 80%. [12] Im Verlauf eines

medikamentös bedingten Ikterus kommt es nach der Regel von Hyman Zimmerman in zirka 10% der Fälle entweder zu Transplantationsbedürftigkeit oder Tod („Hy’s rule“). [48, 49]

1.2 Medikamentenassoziierte Leberschädigung

Die medikamentenassoziierte Leberschädigung (Drug induced liver injury; DILI) ist mit 41% die häufigste Ursache des ALV in Deutschland und tritt etwa bei einem von hundert Patienten während des Klinikaufenthalts auf. [50] Und obwohl Acetaminophen für die meisten Fälle eines DILI verantwortlich ist, werden etwa 1.000 weitere Substanzen mit leberschädigender Wirkung beschrieben. [51] Die nachfolgende Tabelle aus einer großen Studie des US-amerikanischen DILI Networks, in der über tausend Patienten mit V.a. DILI zwischen 2004 und 2013 eingeschlossen wurden, gibt einen Überblick über die häufigsten Medikamentenklassen und Substanzen:

	Medikamentenklassen		Substanzen*
1	Antibiotika	1	Amoxicillin-Clavulansäure
2	Heilpflanzen und Nahrungsergänzungsmittel	2	Isoniazid
3	Medikamente mit Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System	3	Nitrofurantoin
4	Medikamente mit Wirkung auf das Nervensystem	4	Sulfamethoxazol/Trimethoprim
5	Anti-neoplastische Medikamente	5	Minocyclin

TABELLE 3 Die häufigsten 5 Medikamentenklassen und Substanzen, die eine Leberschädigung hervorrufen. *Heilpflanzen und Nahrungsergänzungsmittel werden nicht aufgelistet. Modifiziert nach [52].

Klinisch kann die medikamentenassoziierte Leberschädigung im Schweregrad zwischen leichter hepatozellulärer Dysfunktion bis hin zum ALV variieren, aber auch jede Form der Lebererkrankung imitieren. [53] Die Diagnosestellung gestaltet sich dementsprechend schwierig und kann z.B. auf Bewertungssystemen wie dem RUCAM-Score (Roussel-Uclaf Causality Assessment Method) oder dem bekannten laborchemischen Profil des Medikaments (s.u.) beruhen. Auf der frei zugänglichen Online-Plattform Liver-Tox® des US-amerikanischen National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases können u.a. Informationen zu Diagnose, Phänotyp der hepatotoxischen Schädigung und klinische Fälle eingesehen werden. [54]

Einteilung nach dem biochemischen Profil

Schädigt eine Substanz (z.B. Troglitazon) direkt Hepatozyten kommt es in der Folge zur Auflösung der Zellmembran und Freisetzung von Enzymen wie der Alanin-Aminotransferase (ALAT). Man bezeichnet dies als **hepatozelluläres Schädigungsmuster**. Dem gegenüber kommt es beim **cholestatischen Schädigungsmuster** (das beispielsweise durch Amoxicillin-

Clavulansäure hervorgerufen wird) in der laborchemischen Untersuchung vor allem zur Erhöhung der Alkalischen Phosphatase (AP) und γ -Glutamyltransferase (γ -GT). [55] Obwohl dies einen Anhalt für die Diagnosestellung geben kann, ist auch zu bedenken, dass sich das biochemische Profil im Verlauf der Erkrankung ändern kann. So beginnt ein DILI mit einem hepatozellulären Schädigungsmuster, das sich später als gemischt oder sogar cholestatisch präsentieren kann.

Eine genaue Einteilung gibt die Klassifikation der CIMOS (Council of International Organizations of Medical Sciences) und FDA (Food and Drug Administration) in Tabelle 4. [56, 57]

Schädigungsmuster	Kriterien
Hepatozellulär	ALAT $\geq 3 \times$ ULN und R-Wert ≥ 5
Gemischt	ALAT $\geq 3 \times$ ULN, AP $\geq 2 \times$ ULN und R-Wert 2 - 5
Cholestatisch	AP $\geq 2 \times$ ULN und R-Wert ≤ 2
R-Wert: $\frac{\text{ALAT (Vielfaches des ULN)}}{\text{AP (Vielfaches des ULN)}}$	

TABELLE 4 Klinische Schädigungsmuster der medikamenteninduzierten Leberschädigung modifiziert nach [53]; **ULN**: Upper Limit of Normal (Obere Grenze des Normwerts), **ALAT**: Alanin-Aminotransferase, **AP**: Alkalische Phosphatase

Einteilung nach dem zeitlichen Profil

Obligat hepatotoxisch

Die erste Gruppe führt dosisabhängig bei den meisten Patienten innerhalb weniger Tage zur Schädigung. [58] Beispielsubstanz dieser Gruppe ist Acetaminophen, das in den USA für 46% des ALV verantwortlich ist. [5] Prädisponierend wirken Alkoholkonsum und Mangelernährung [59] sowie genetische Polymorphismen. [60] Trotz des raschen Beginns zeigt die Acetaminophen-induzierte Leberschädigung ein Spontanüberleben von 66% innerhalb der ersten 3 Wochen. [61]

Fakultativ hepatotoxisch (idiosynkratisch)

Die überwiegende Mehrheit der Substanzen ist jedoch in die Gruppe der idiosynkratischen Hepatotoxine einzuordnen, wenn auch nur 11% der Fälle des ALV sie zurückzuführen sind. [5] Als Idiosynkrasie (von griechisch „eigen“ (*idios*), „zusammen“ (*syn*) und „Mischung“ (*crasis*)) wird ein individuelles Merkmal, beispielsweise die Reaktion auf einen bestimmten Stimulus, bezeichnet. [62] Medikamenten mit idiosynkratischer Hepatotoxizität ist eine lange Latenzzeit, geringe Inzidenz und damit spätes Auftreten in klinischen Studien sowie fehlende Nachweisbarkeit in Tiermodellen gemein. [55, 63] Die früher häufig postulierte Unabhängigkeit von der verabreichten Dosis wird heutzutage in Frage gestellt. [64] Die häufigsten Hepatotoxine dieser Art sind Antibiotika (vor allem Amoxicillin-Clavulansäure, Isoniazid) und

nicht-steroidale Antiphlogistika (Diclofenac). [49, 65] Tritt ein durch idiosynkratische Hepatotoxine ausgelöstes ALV ein, überlebt nur knapp ein Drittel der Patienten die ersten drei Wochen. [66] Der Mechanismus der Leberschädigung bleibt weiterhin unklar. Es existieren Hinweise für einzelne Medikamente, die bei Patienten zum ALV führen, dass eine genetische Prädisposition durch Polymorphismen in Enzymsequenzen sowie stille Mutationen in mitochondrialer DNA vorliegen könnte. [67, 68]

Grundlagen der Pathogenese

Die Leberschädigung stellt auf zellulärer Ebenen einen Untergang von Hepatozyten durch Apoptose oder Nekrose dar. Apoptose ist ein ATP-abhängiger Prozess, der zu Zellschrumpfung, Kondensation des Chromatins und Aufnahme durch Phagozyten ohne Freisetzung zellulärer Bestandteile oder Immunreaktion. Es gibt zwei Wege der Aktivierung der Apoptose, die beide in einer Kaskade aus Caspasen münden, die den programmierten Zelltod auslösen. Zum einen der intrinsische Weg, bei dem die Aktivierung der Caspasen über Cytochrom c erfolgt, das nach intrazellulären Signalen (Toxine, Strahlung u.v.m.) aus Mitochondrien freigesetzt wurde. Zum anderen der extrinsische Weg, in dem die Aktivierung von Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptorfamilie (TNF- α) ursächlich ist. [69] Diese werden durch das Immunsystem aktiviert, wenn (nach der "Danger-Hypothese") zwei Signale zusammentreffen: 1.) die Komplexbildung aus Arzneistoff (Hapten) und Protein sowie 2.) Kostimulation der Immunzellen durch Arzneistoff-unabhängige Faktoren wie Zytokine. [70] Für Diclofenac beispielsweise konnte gezeigt werden, dass es in Anwesenheit von TNF- α vermehrt zum apoptotischen Zelluntergang von Hepatozyten führt. [71]

Der nekrotische Zelluntergang geht mit Zellschwellung, Verlust der Membranintegrität und einer inflammatorischen Reaktion im umgebenden Gewebe einher. [69] Ursächlich ist der Verlust der Fähigkeit der ATP-Synthese, die aus der Folge eines gestörten mitochondrialen Stoffwechsels resultiert. [72] Eine Beispielsubstanz, die klassischerweise zu Nekrose führt ist Acetaminophen. [73]

Reaktive Metaboliten und Fremdstoffmetabolismus

Lange erklärte man sich die toxische Wirkung von Medikamenten allein durch ihre Überdosierung - so wie schon Paracelsus vor 500 Jahren postulierte, dass die Dosis das Gift mache. Ein Wandel trat ein, als in den 1930er Jahren bekannt wurde, dass viele Medikamente in Metaboliten verwandelt werden, die ebenfalls pharmakologisch aktiv sind. [74] So kann die Pathogenese der Hepatotoxizität durch toxische Effekte der Ausgangssubstanz und des Metaboliten erklärt werden.

Mit einem Beitrag von 75% stellen die Cytochrom P450 (CYP450) Enzyme das wichtigste System zur Metabolisierung von Fremdstoffen dar. [75] Diese Gruppe von hämhaltigen, am glatten endoplasmatischen Retikulum sowie in Mitochondrien sitzenden Proteinen sind für die Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse von Substanzen in Phase I des Fremdstoffmetabolismus zuständig, bevor diese in der zweiten Phase mit hydrophilen Molekülen wie z.B. Glucuronat konjugiert werden. Sie werden aufgrund von Sequenzhomologie in Familien und Subfamilien eingeteilt, wobei die Genfamilien 1, 2 und 3 vor allem für den Arzneistoffwechsel Bedeutung haben. Hierbei spielen u.a. CYP3A4/5 mit 30% und CYP1A2 mit 10% des Metabolismus eine große Rolle. [76] Andere CYP450 Familien sind beispielsweise an Synthese von Steroidhormonen oder am Metabolismus von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Eicosanoiden beteiligt. [77] Doch nicht nur an Entgiftungsvorgängen sondern auch für die Entstehung krebserregender Stoffe aus vormals unbedenklichen Substanzen sind sie verantwortlich. [78] Im menschlichen Organismus kommen CYP450 Enzyme ubiquitär vor, der größte Anteil findet sich jedoch in der Leber.

Sowohl in Phase I als auch II können reaktive Metaboliten durch Biotransformation entstehen. [79] (s. (1) in Abbildung 2) Diese Produkte können sowohl durch kovalente Bindung (d.h. einer Bindung zwischen elektrophilen Medikamenten oder Metaboliten und nucleophilen Zellstrukturen wie Proteinen, RNA oder DNA) als auch durch Oxidation von Thiolgruppen die Funktion von Proteinen beeinflussen und so zur Schädigung des Gewebes beitragen. [80, 81] Die Bildung reaktiver Metaboliten ist der häufigste Grund der Marktrücknahme von Medikamenten im Rahmen der Hepatotoxizität. [82]

Pathogenese der hepatozellulären Schädigung

Fast immer steht mitochondriale Dysfunktion entweder als primäres Ziel oder als Folge im Zusammenhang mit DILI. [83] Mögliche Mechanismen direkter mitochondrialer Schädigung sind:

- **Apoptose** durch Öffnung der MPT (mitochondrial permeability transition) Pore mit Zusammenbruch des mitochondrialen Potenzials, Riss der äußeren Membran und Freisetzung pro-apoptotischer Proteine
- **Nekrose** durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung mit Abnahme der ATP-Synthese
- **Microvesikuläre Steatose** durch Beeinträchtigung der Fettsäureoxidation entweder durch direkte Inhibition von Enzymen oder Sequestrierung von Kofaktoren (z.B. L-Carnitin)

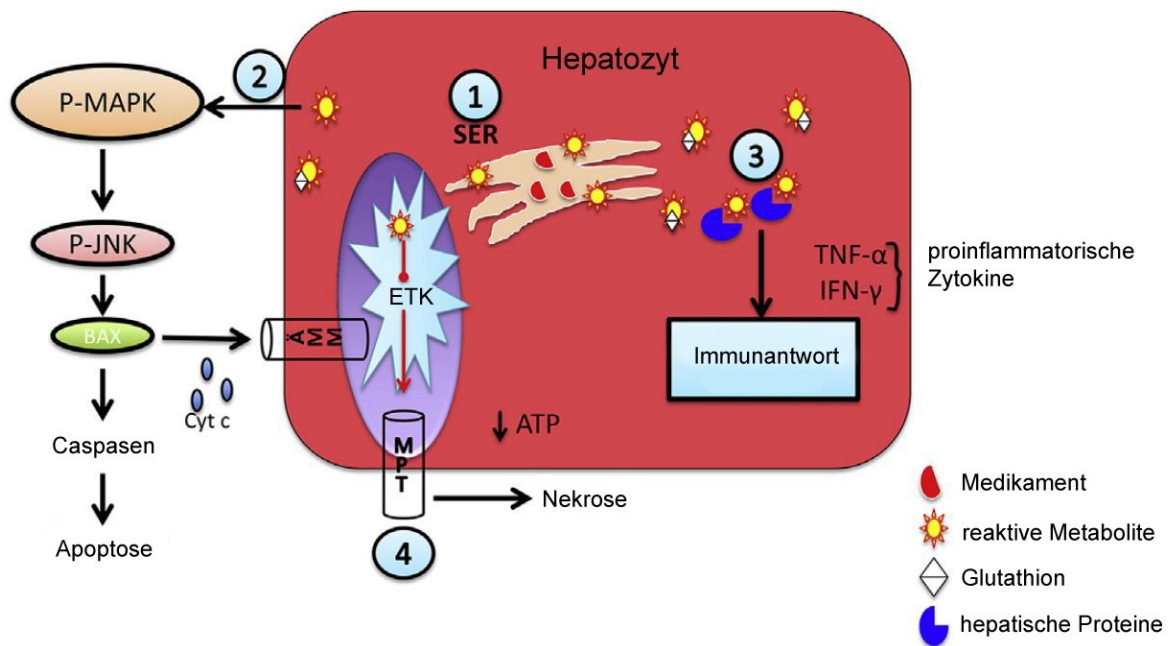


ABBILDUNG 2 Mechanismen der medikamenteninduzierten Hepatotoxizität (1) Metabolisierung des Medikaments durch CYP450 zu reaktiven Metaboliten. (2) Reaktive Metaboliten aktivieren apoptotische Signalkaskaden. (3) Glutathionmangel führt zur kovalenten Bindung an hepatische Proteine und einer Aktivierung der Immunantwort. (4) Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Mitochondrien mit Öffnung von mitochondrialen Kanälen, Zusammenbruch der ATP-Synthese und folgender Nekrose. Cyt c, Cytochrom C; ETK, Elektronentransportkette; MPT, mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore; ÄMM, äußere mitochondriale Membran. Modifiziert nach [73].

Pathogenese der cholestatischen Schädigung

Nachdem Gallensalze entweder durch Aufnahme aus dem sinusoidalen Blut (enterohepatischer Kreislauf) oder durch Neusynthese über CYP7A1 in den Hepatozyten vorliegen, werden sie an der kanalikulären Membran über v.a. über die Exportpumpe BSEP (bile salt export pump), aber auch über MRP2 (multidrug resistance-associated protein-2) in die Gallenkanäle abgegeben. Weiterhin existieren an der basolateralen Membran ebenfalls weitere Exportpumpen, die jedoch normalerweise nur in geringem Umfang exprimiert werden. (s. Abbildung 3)

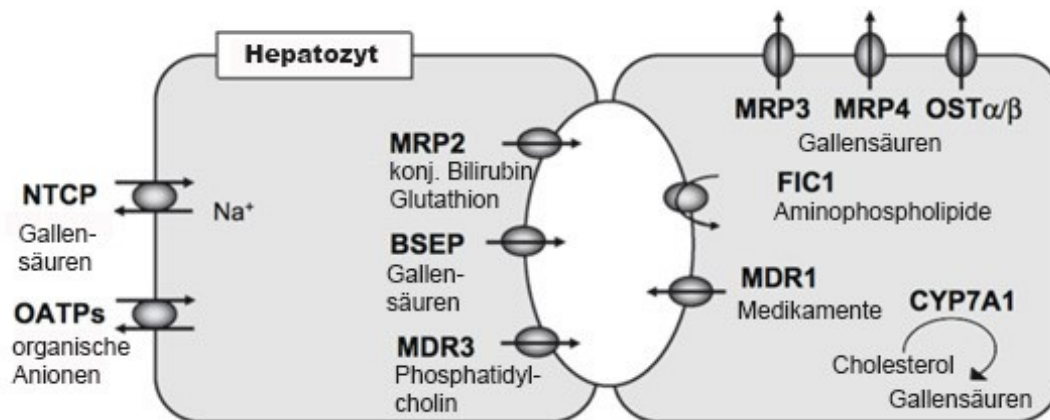


ABBILDUNG 3 Übersicht über die hepatischen Gallensalztransporter und deren vorwiegende Ausscheidungsfunktion. NTCP=Na⁺/taurocholat Cotransporter; OATP = organic anion transport protein; MRP2 = multidrug resistance-associated protein-2; BSEP = bile salt export protein; MDR1 bzw. 3 = multidrug-resistance protein 1 bzw. 3. Modifiziert nach [84].

Medikamente wie Troglitazon, Rifampicin oder Ciclosporin können eine inhibitorische Wirkung auf das BSEP. [85] Akkumulieren als Folge davon die Gallensalze in den Hepatozyten, so können sie über verschiedene Wege den apoptotischen Zelltod hervorrufen.

1.3 Arzneimittelsicherheit und Testung auf Hepatotoxizität

Soll ein neu entwickeltes Arzneimittel in der Europäischen Union (EU) zugelassen werden, so stehen zwei Wege zur Auswahl: zum einen das dezentrale Verfahren über die jeweiligen Arzneimittelbehörden des Mitgliedstaats zum anderen das zentrale Verfahren über die Europäische Arzneimittelagentur (EMA). Eine Verpflichtung zur Teilnahme am zentralen Verfahren besteht nur für bestimmte Arzneimittel, so u.a. biotechnologisch hergestellte oder für die Behandlung von Diabetes, Krebs sowie Autoimmunerkrankungen vorgesehene. Auf dem deutschen Markt gilt seit dem 01.01.1978 das deutsche Arzneimittelgesetz (AMG), das nach der Thalidomid-Katastrophe verabschiedet wurde. Darin vorgeschriebene Kriterien für die Zulassung von Medikamenten sind:

- Therapeutische Wirksamkeit
- Pharmazeutische Qualität
- Unbedenklichkeit.

Vor Formulierung des Gesetzes war lediglich eine Überprüfung auf pharmazeutische Qualität sowie eine Registrierung des Arzneimittels notwendig gewesen. [77] Die Hepatotoxizität war den letzten 50 Jahren der Hauptgrund, weswegen Medikamente aus Sicherheitsgründen vom Markt genommen werden mussten. [90] Ein Beispiel der jüngeren Vergangenheit ist Troglitazon, ein Medikament zur Blutzuckersenkung bei nicht-insulinpflichtigem Diabetes mellitus, das als Agonist am Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor γ (PPAR γ) wirkt.

Nach der Meldung von etwa 100 Fällen von ALV bei 2 Millionen Anwendern wurde im Jahr 2000 die Zulassung für den US-amerikanischen Markt entzogen. [91]

Präklinische Testung

Um die Unbedenklichkeit eines Medikaments nachzuweisen wird zunächst präklinisch am Tier- und Zellmodell auf Toxizität und - nach Genehmigung - in klinischen Studien am Menschen auf unerwünschte Nebenwirkungen untersucht. Ein Meilenstein war 1920 die Einführung der LD50 (mittlere letale Dosis) durch J. W. Trevan.

Die präklinische toxikologische Untersuchung einer neuen Substanz erfolgt im Hinblick auf unterschiedliche Parameter, die in folgender Tabelle aufgelistet sind:

Parameter	Beschreibung	Art und Umfang
Akute Toxizität	Ermittlung der maximal tolerierbaren Dosis und Vergleich mit der tolerierbaren Dosis	Tierversuch an 2 Spezies
Subakute Toxizität	Identifizierung von toxikologisch relevanten Zielorganen (physiologische, makroskopische, licht- und elektronenmikroskopische Veränderung u.a.)	Tierversuch an 2 Spezies
Chronische Toxizität	Wie subakute Toxizität mit Beobachtung über längere Zeitdauer (in Abhängigkeit von der erwarteten Anwendungsdauer)	Tierversuch an 2 Spezies
Mutagenität	Untersuchung auf Gen-/ Chromosomenmutationen	Bakterien- und Säugerzellen, in-vitro Methoden, Tierversuche
Karzinogenität	Gabe über längere Zeitdauer (meist 2 Jahre) und Untersuchung anhand von Hämatologie, Autopsie und Histologie	Tierversuch an 2 Spezies
Teratogenität	Untersuchung von Paarungs- und Reproduktionsaktivität, Gebärfähigkeit, Stillen, Frucht- und Embryonaldefekten	Tierversuch

TABELLE 5 Parameter der Toxizitätsprüfung nach [86].

Eine explizite Untersuchung auf Hepatotoxizität ist im AMG nicht vorgeschrieben; für die präklinische Testung in der EU stellt die EMA jedoch eine dreistufige Leitlinie bereit. [87] Dabei ist der erste Schritt die Testung an Tieren. Doch gerade das hepatotoxische Potenzial lässt sich nicht sicher anhand von Tierversuchen vorhersagen. Die mitochondriale Schädigung beispielsweise ist in jungen, gesunden Nagetieren nicht auszulösen. [88] Und erst wenn in Tierversuchen laborchemische oder histopathologische Hinweise auftreten bzw. wenn bei strukturell ähnlichen Arzneimitteln Hepatotoxizität bekannt ist, soll im zweiten Schritt gezielt der Mechanismus der Hepatotoxizität an z.B. in-vitro Kulturen mit Hepatozytenzelllinien betrachtet werden.

In-vivo Toxizitätsprüfung

Trotz großer Fortschritte im Bereich der Molekularbiologie und Zellkultur beruht der Großteil toxikologischer Forschung seit Jahrzehnten noch auf Tierversuchen (meist an Nagetieren). Im Jahr 1959 beschrieben W. M. S. Russell und R. L. Burch das 3R-Prinzip für den ethischeren Umgang bei Tierversuchen. [89] Sie beinhaltet folgende Punkte:

- **Replacement** (Vermeidung): Entwicklung von alternativen Methoden zu Tierversuchen
- **Reduction** (Verringerung): Gewinnung von mehr Information aus der gleichen Zahl von Tieren
- **Refinement** (Verfeinerung): Verwendung von Methoden zur Verminderung / Verhinderung von Stress und Schmerz

Der US National Research Council hat sich 2007 mit dem Positionspapier „Toxicity Testing in the 21st Century: A vision and A Strategy“ („Toxizitätsprüfung im 21. Jahrhundert: eine Vision und eine Strategie“) für einen Wandel von Tierversuchen hin zu zellbasierten Methoden ausgesprochen. [90] Und auch die Europäische Union schenkt dem Thema Gehör, u.a. mit der Tierschutzrichtlinie 2010/63/EU. Durch sie ist das 3R-Prinzip nun in vielen Mitgliedsstaaten in der Gesetzgebung verankert. Das European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (Referenzlabor für Alternativen zu Tierversuchen der Europäischen Union; EURL-ECVAM) der Europäischen Kommission bestimmt Alternativmethoden zu Tierversuchen. Zu dessen Erfolgen zählt, dass im Jahr 2004 vier in-vitro Testverfahren zur toxikologischen Prüfung von Chemikalien, die durch die OECD geregelt wird, validiert wurden. [91]

In-vitro Toxizitätsprüfung

In der Zellkultur soll Zytotoxizität Rückschlüsse auf die Wirkung am Organ geben. Als Zytotoxizität bezeichnet man die "Wirkung eines chemischen Agens, die sich beobachten lässt in veränderter Zellmorphologie, Unfähigkeit zur Adhäsion an Oberflächen, Veränderungen in der Zellwachstumsrate, Zelluntergang und Zellzerfall." [92]

Die Erarbeitung von standardisierten in-vitro Systemen ist momentan im Fokus der Wissenschaft und noch außerhalb gesetzlich geregelter Standards. Eine Grundlage, auf der die Vergleichbarkeit von Zytotoxizitätstests beruhen könnte ist die DIN EN ISO 10993-5. [93]

Sie bemisst Zytotoxizität anhand von:

- Zellmorphologischen Veränderungen
- Zellschädigung
- Zellwachstum
- Zellulärem Metabolismus

Sie gibt z.B. die in folgender Tabelle dargestellte Graduierung der Zytotoxizität an:

Grad	Ausmaß	Zellkultur
0	Nichts	Intrazytoplasmatische Granula Keine Lyse Keine Inhibition des Wachstums
1	Leicht	≤ 20% Zellen rund und ohne intrazytoplasmatische Granula Wenige lysierte Zellen Nur minimale Inhibition des Wachstums
2	Mild	≤ 50% Zellen rund und ohne intrazytoplasmatische Granula Keine ausgeprägte Lyse < 50% Inhibition des Wachstums
3	Mäßig	≤ 70% Zellen rund oder lysiert; Zellschicht nicht komplett zerstört > 50% Inhibition des Wachstums
4	Schwer	Nahezu vollständige Zerstörung der Zellschichten

TABELLE 6 Graduierung der Zytotoxizität nach [93].

Zum andern gibt sie den Cutoff-Wert für den Nachweis von Zytotoxizität bei einer Reduktion um 30% in metabolischen Tests, wie z.B. dem XTT-Test(s. Kapitel 3.4.5.1), an. [93]

Die in der DIN EN ISO 10993-5 zur Toxizitätsprüfung empfohlenen Zelllinien sind – mit einer Ausnahme – Fibroblasten tierischen Ursprungs, u.a. die murinen Fibroblasten der American Type Culture Collection CCL 1 (NCTC clone 929). [93]

In-Vitro Hepatotoxizitätstestung

Hier haben sich vor allem zwei Modellsysteme durchgesetzt – primäre humane Hepatozyten und permanente Leberzelllinien aus Tumoren. Beide zeichnen sich durch hervorragende Spezifität von 100% aus, hinsichtlich der Sensitivität ist jedoch keines der Testsysteme befriedigend (s.u.). [94]

Primär isolierte Hepatozyten

Als Goldstandard werden primär isolierte Hepatozyten bezeichnet, da sie die Biotransformation in vollem Ausmaß durchführen können. Auch scheinen sie das sensitivere Modell (bis zu 44%) gegenüber beispielsweise der permanenten Zelllinie HepG2 zu sein (6%). [94] Problematisch ist jedoch, dass es im Verlauf zum Verlust der ursprünglichen metabolischen Kapazität, beispielsweise der Aktivität der CYP450 Enzyme, kommen kann. [95] Weiterer Nachteil ist die begrenzte Verfügbarkeit sowie variable Qualität aufgrund interindividueller Spenderunterschiede. [96] [97] Das HEPAC-System der Firma Primacyt aus Schwerin ist u.a. ein validiertes System für die Zellkultur primärer Hepatozyten. [98]

Permanente Leberzelllinien

Aus diesen Gründen wurden unbegrenzt verfügbare, im Phänotyp identische, permanente Leberzelllinien entwickelt. Weitere Vorteile sind geringe Kosten und die Möglichkeit zur Kryokonservation. [99]

Für Testungen mit toxikologischer Fragestellung stellen unter anderem die permanenten Zelllinien HepG2, Hep3B und HepaRG eine Alternative zu primär isolierten Hepatozyten dar. Die wohl am häufigsten benutzte Zelllinie ist HepG2. [100] So wurde sie unter anderem zur Testung der Toxizität von Antimykotika, Muskelrelaxanzien und Albuminzubereitungen verwendet. [101–103] HepG2-Zellen können unter anderem adäquat auf DNA-Schädigung reagieren, da sie keine p53 Mutation tragen. [104] Neben toxikologischen Fragestellungen werden sie ebenso in der Entwicklung eines Biosensors zur Erkennung hepatischer Dysfunktion bei Sepsis verwendet. [105] Nachteilig ist jedoch, dass HepG2 Zellen - im Vergleich zu primär isolierten Hepatozyten - Enzyme des Phase I Metabolismus (so u.a. CYP3A4) nur in geringem Ausmaß oder gar nicht exprimieren und damit die Toxizität für bestimmte Stoffe unterschätzt wird. [106] Die etwas neuere Zelllinie HepaRG exprimiert verschiedene CYP450 Enzyme in höherem Umfang und scheint daher auch ein sensitiveres Testmodells zu sein. [94] Von manchen Autoren wird empfohlen HepaRG für toxikologische und HepG2 für toxikogenomische Studien zu verwenden. [104]

Klinische Testung

Die klinische Prüfung an Probanden kann beginnen, nachdem die Ergebnisse der präklinischen pharmakologisch-toxikologischen Prüfung vorliegen, der Studienplan durch die

Ethikkommission genehmigt wurde und die zuständige Bundesbehörde (in Deutschland das Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte oder Paul-Ehrlich-Institut) kein Veto innerhalb von 60 Tagen eingelegt hat. Die klinische Prüfung gliedert sich in vier Phasen:

Phase	Fragestellung	Beschreibung
I	Humanpharmakologie	Erkenntnisse über Pharmakodynamik und –kinetik, Dosisfindung; gesunde Probanden oder Patienten
II	Exploratorische Therapiestudien	Erkenntnisse über therapeutische Wirksamkeit, ggf. anhand von Surrogatmarkern; meist 30 – 300 Patienten
III	Konfirmatorische Therapiestudien	Bestätigung des therapeutischen Nutzens und Charakterisierung des Nebenwirkungsprofils; meist 100 – 1.000 Patienten
IV	Therapeutische Anwendung	Studien nach Zulassung des Medikaments, u.a. zur Erfassung seltener Nebenwirkungen

TABELLE 7 Phasen der klinischen Testung nach [77].

Im Verlauf der klinischen Testung (Phase I – III) werden Medikamente häufig an nicht mehr als 8.000 Studienteilnehmern getestet. Zur Beurteilung seltener Nebenwirkungen wie der Hepatotoxizität (Inzidenz 1:10.000) wären jedoch Gruppengrößen von 30.000 Teilnehmern notwendig, um mit 95%iger Konfidenz das Auftreten eines Falls von DILI hervorzurufen. [107]

Da dies selten der Fall ist, wurden Kriterien postuliert, die auf ein Auftreten von DILI an wenigen Teilnehmern (d.h. schon vor Phase IV) hinweisen sollen:

- Erhöhung von ALT auf das 3-fache der Norm
- Erhöhung von ALT auf das 10-fache der Norm (sehr selten)
- Erhöhung von ALT auf das 3-fache der Norm & Erhöhung von Bilirubin auf das 2-fache der Norm (Hy's Gesetz)

Dies zeigt sich auch rückblickend für das Beispiel Troglitazon. Hier war es während der klinischen Testung bei 0,6% der Probanden zur Erhöhung von ALT Spiegeln auf das > 10-fache gekommen. In der Kontrollgruppe war dies bei keinem Teilnehmer der Fall gewesen. [53] Nach Markteinführung wurden 100 Fälle von ALV bei 2 Millionen behandelter Patienten berichtet.

1.4 Intensivmedizinische Analgosedierung

Die intensivmedizinische Betreuung involviert für den Patienten häufig die Erfahrung von Stress, Angst und das Erleben unangenehmer Maßnahmen. [26] Um die damit verbundene Angst zu nehmen und die Toleranz einer mechanischen Beatmung am Tubus zu steigern, kann eine Sedierung notwendig sein. [108, 109] Als Sedierung bezeichnet man "die medikamentöse Abschirmung des Körpers gegen körperliche und psychische Stressfaktoren" [110] oder auch einen "Zustand psychomotorischer Indifferenz". [111] Die Sedierungstiefe wird meist durch die 10-stufige Richmond Agitation Sedation Scale (RASS) beurteilt, die von +4 (sehr streitlustig, gewalttätig) bis - 5 (nicht erweckbar) reicht [112]. Nach dem Sedierungsziel unterscheidet man demnach die "tiefe Sedierung" ($RASS \leq -3$), deren Indikation z.B. im Rahmen von Interventionen gegeben sein kann, von einer symptomorientierten Sedierung ($RASS 0/-1$), deren Ziel vor allem Reduktion von Angst und Stress ist. [26] Zur Sedierung werden in der deutschen Intensivmedizin vor allem Propofol (meist für Sedierungsdauern < 24h), Midazolam (Einsatz bei Dauer > 72 h) und S-Ketamin eingesetzt. [113] Für die Analgesie wird allen voran Sufentanil (35 – 40%) verwendet, aber auch Fentanyl (30 – 35%) und Remifentanyl (10%). [114]

1.4.1 Hypnotika und Sedativa

Geschichtlich entwickelten sich die heutigen Substanzen nachdem Ende des 18. Jahrhunderts erfolglos versucht worden war injizierbare Lösungen der bereits bekannten inhalativen Anästhetika herzustellen. Der Meilenstein zur intravenösen Anästhesie gelang dem deutschen Pharmakologen Hermuth Weese 1932 mit der Entwicklung des Barbitursäurederivats Hexobarbital. Innerhalb der heute bekannten Pharmaka unterscheidet man die Gruppe der Hypnotika, also Substanzen, die der Dosierung entsprechend bis zu tiefer Bewusstlosigkeit führen können (hierzu zählt unter anderem Propofol sowie Thiopental), von Sedativa, die nur in hohen Dosierungen nur zentral dämpfend wirken (zum Beispiel Midazolam). Die im folgenden beschriebenen Hypnotika und Sedativa sind nicht nur aufgrund ihrer häufigen Anwendung (sie zählen oder zählten laut WHO zu den wichtigsten Medikamenten einer gesundheitlichen Basisversorgung [115]), sondern auch wegen ihrer ausgeprägten hepatischen Verstoffwechselung und der möglichen Bildung reaktiver Metaboliten interessant für toxikologische Fragenstellungen. Weiterführende pharmakologische Daten sind im Kapitel Material und Methoden zu finden.

Midazolam

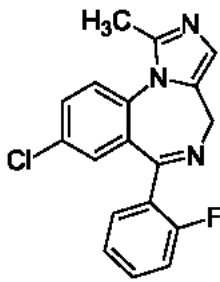


ABBILDUNG 4 Strukturformel von Midazolam (8-Chlor-6-(2-fluorphenyl)-1-methyl-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin)

Der im Jahr 1976 synthetisierte Vertreter der Imidazobenzodiazepine umfasst einen breit gefächerten Anwendungsbereich, zu dem neben der Sedierung von Intensivpatienten unter anderem auch den therapierefraktären Status epilepticus, sowie die Gabe als Prämedikation vor Operationen oder zur Narkose in Anästhesie und Rettungsdienst zählen. [116, 117] Die Hauptwirkung des Midazolams, wie auch der anderen Benzodiazepine, sind Anxiolyse, Hypnose, Sedierung, Muskelrelaxation, Amnesie und Antikonvulsion. [118] Sie sind Folge der Bindung an gamma-Aminobuttersäure-Rezeptoren (gamma-butyric acid receptor A, GABA_A) mit Steigerung deren Affinität für den Botenstoff GABA. Daraus folgt die erhöhte Durchlässigkeit für Chlorid und ein vermindertes Membranpotenzial mit gesenkter neuronaler Erregbarkeit. [119]

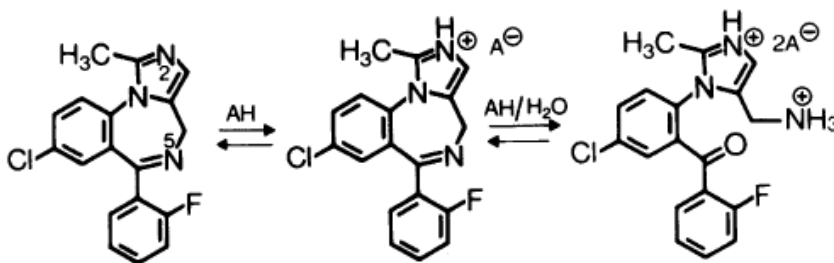


ABBILDUNG 5 Protonierung und Ringöffnung von Midazolam. Aus [120].

Strukturell unterscheidet sich Midazolam von anderen Benzodiazepinen durch den Imidazolring, der im Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossenen Variante vorliegt. In Abhängigkeit des pH-Werts verschiebt sich das Gleichgewicht, sodass bei sauren pH-Werten (meist auf pH-Werte um 3,5 titriert) 15-20% der geöffneten, protonierten Form vorliegen. Somit ist Midazolam sehr gut wasserlöslich und damit zugänglich für parenterale Zubereitungen. [120] In Umgebung physiologischen pHs jedoch schließt sich der Ring, sodass eine starke Lipophilie vorherrscht, die eine schnelle Penetration in das zentrale Nervensystem ermöglicht. [121, 122]

Midazolam zählt mit einer terminalen Halbwertszeit von 1 bis 4 Stunden zu den kurzwirksamen Benzodiazepinen, was durch die rasche Verstoffwechslung der sich am Imidazolring

befindlichen Methylgruppe bedingt wird. [118] Sie ist der Angriffspunkt für CYP3A4, wodurch vor allem der Hauptmetabolit α -Hydroxymidazolam entsteht, der nach Glukuronidierung mit dem Urin ausgeschieden wird. [120, 123] Insgesamt zeichnet sich Midazolam durch eine gute therapeutische Breite und Nebenwirkungsarmut aus. Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehört in Kombination mit Fentanyl die erhöhte Gefahr für Hypoxämie und Apnoe. [124] Weiterhin beschrieben wurden unter anderem Ataxie, Hypotonie, Halluzinationen, Agitiertheit und Hautausschlag. [125] Ein hepatotoxisches Potenzial wurde bisher nicht beschrieben. Livertox® gibt an, dass eine hepatotoxische Wirkung von Midazolam – im Gegensatz zu anderen Benzodiazepinen wie z.B. Diazepam – sehr unwahrscheinlich ist. [54] In einer Studie konnte gezeigt werden, dass nach Sedierung mit Midazolam keine Änderung der Leberenzyme im Plasma eintrat. [126]

Propofol

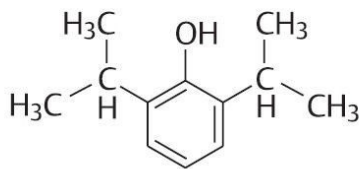


ABBILDUNG 6 Strukturformel von Propofol (2,6-Diisopropylphenol)

Propofol, das in Wasser kaum lösliche 2,6-diisopropylphenol, wurde 1973 entwickelt und kam in seiner ersten Zubereitung - unter Zusatz von einem Polyalkylenglycolether - nie auf den Markt, da klinische Studien anaphylaktische Reaktionen zeigten. [127] Schließlich wurde 1988 in Deutschland eine Lipidemulsion zugelassen. Nach Beginn der klinischen Anwendung zeigten sich gehäuft postoperative Infektionen in Zusammenhang mit der Verwendung [128, 129], sodass zum strikten aseptischen Vorgehen angehalten wurde [130] und zur Verwendung antimikrobieller Zusätze führte. [131] In den neunziger Jahren wurden vermehrt Fälle eines schwerwiegenden Symptomkomplexes als Nebenwirkung der Anwendung bei Kindern aufgedeckt, der später als Propofolinfusionssyndrom bekannt wurde. [132] Hierunter versteht man das, vermutlich auf einer Störung der mitochondrialen Atmungskette oder Fettsäureoxidation beruhende, Auftreten von Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen sowie Laktatazidose, Niereninsuffizienz, Rhabdomyolyse, Hypertriglyceridämie und Hepatomegalie mit Steatose. [133] Bei intensivmedizinisch betreuten Erwachsenen liegt die Inzidenz einer prospektiven Studie zufolge bei ca. 1%. [134] Nichtsdestoweniger hat sich Propofol trotz dieser Nebenwirkungen zu dem wichtigsten Hypnotikum in der Anästhesie und Intensivmedizin etabliert. Propofol ist in Deutschland als Generikum erhältlich und steht ebenso wie Midazolam auf der WHO-Liste der gesundheitlichen Basisversorgung. [115] Es

verfügt über Eigenschaften wie Anxiolyse, Amnesie, Induktion von Bewusstlosigkeit und Reduktion des intrakraniellen Drucks sowie günstigen weiteren, noch nicht sicher erforschten Wirkungen wie Antiemese und Analgesie. [135–137] Die Wirkungsweise ist nicht abschließend geklärt, scheint jedoch mit einer Beeinflussung der Transmission des GABA_A-Rezeptors sowie der Hemmung der Freisetzung von Glutamat in Zusammenhang zu stehen. [137] Der Abbau erfolgt entweder durch direkte Glukuronidierung und Ausscheidung oder primäre Oxidierung vor allem durch CYP2B6 und CYP2C9, aber auch zu einem geringen Anteil durch CYP1A2, wodurch aktives Hydroxypropofol entsteht, das etwa ein Drittel der Aktivität von Propofol besitzt. [138, 139] Anschließend erfolgt die Umwandlung zu inaktiven Metaboliten durch Glukuronidierung und die renale Ausscheidung. [140] Obwohl bisher kein hepatotoxisches Potenzial bekannt ist wurden fünf Fälle akuter Hepatitis und ein Fall von ALV nach Sedierung mit Propofol beschrieben. [141] Livertox® weist zum einen auf das Propofol-Infusions-Syndrom hin, sowie auf die vereinzelt idiosynkratischen Fälle des Leberversagens hin. [54]

S-Ketamin

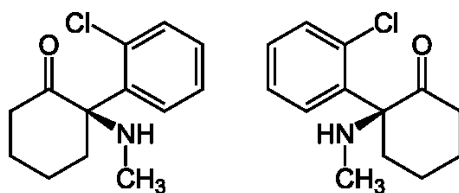


ABBILDUNG 7 Strukturformel von R,S-Ketamin ((RS)-(±)-2-(2-Chlorphenyl)-2-(methylamino)-cyclohexan-1-on)

Im Jahre 1970 von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassen und im Vietnamkrieg eingesetzt, ist Ketamin heutzutage aufgrund seiner Sonderstellung kaum aus der klinischen Gebrauch wegzudenken. Denn dieser chirale Arzneistoff bietet bei der Patienten-anwendung, im Gegensatz zu den meisten anderen Sedativa und Hypnotika, eine höhere hämodynamische Stabilität. [142] Besonders ist auch die in subhypnotischen Dosierungen antinozizeptive Wirkung zusammen mit der Möglichkeit der oralen Zufuhr, wodurch der Einsatz bei chronischen Schmerzen begünstigt wird. [143] Weiterhin zeigte sich, dass Ketamin eine Therapiealternative bei schwerer Depression sein könnte. [144, 145] Zur Erklärung der Pharmakodynamik existieren viele mögliche Ansätze. Es wirkt beispielsweise über einen nichtkompetitiven Antagonismus mit dem Transmitter Glutamat an den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren, ist ein schwacher Agonist an Opioidrezeptoren und ein HCN1 (hyperpolarisation and cyclic nucleotid gated) Kanal Blocker - um nur einige Wege zu nennen. [146, 147] Der Zustand, der durch Ketamin erreicht wird bezeichnet man als "dissoziative Anästhesie", d.h. Analgesie und Amnesie bei z.T. erhaltenem Bewusstsein und Schutzreflexen. [148] Das optisch aktive Ketamin wird aufgrund der 2-fach stärkeren Wirkung sowie geringerer psychomimetischer Nebenwirkungen (u.a. Unruhe, Aggressivität,

intraoperative Spontanbewegungen) vor allem als reines S-Enantiomer verwendet anstatt als Razemat. [149, 150] Auch die Metabolisierung zu dem ebenfalls pharmakologisch aktiven Metaboliten Norketamin im Sinne einer N-Demethylierung erfolgt stereoselektiv entweder durch CYP3A4 oder CYP2B6. [151, 152] So metabolisiert CYP3A4 S-Ketamin schneller, während CYP2B6 beide Isoformen in gleicher Weise verstoffwechselt. Der andere Hauptmetabolit, der durch CYP2B6 entsteht ist Dehydronorketamin. Neben diesen beiden Stoffwechselwegen scheinen noch viele Nebenwege zu existieren. [153] Die Ausscheidung von Ketamin erfolgt über den Urin. Der größte Teil davon sind glukuronidierte Metabolite (80%) und nur 2% Ketamin, 2% Norketamin und 16% Dehydronorketamin werden gefunden. [154]

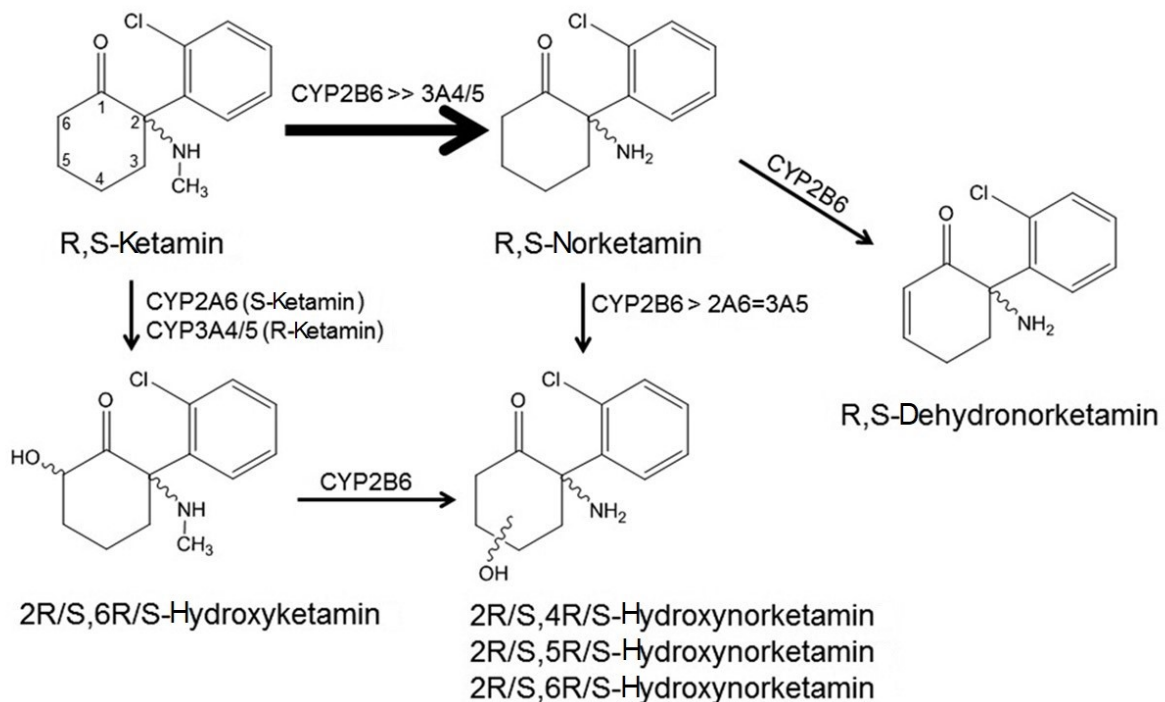


ABBILDUNG 8 Metabolismus von Ketamin. [152]

Die bei chronischer, missbräuchlicher Verwendung am meisten bekannte Nebenwirkung von Ketamin ist eine Zystitis mit entzündlichen Wandveränderungen und Symptomen wie Dysurie, Polyurie und Hämaturie. [155] Auf LiverTox® wird für Ketamin außerdem eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von hepatischen und biliären Schäden nach Langzeitanwendung angegeben. [54] Es ist ein Fall von ALV bei einer Patientin mit Ketaminanwendung zur Therapie chronischer Schmerzen bekannt. [156] Außerdem fallen immer wieder junge Ketaminkonsumenten klinisch durch Oberbauchbeschwerden sowie Erhöhung von ALT und ALP auf. [157, 158] In einer Studie an 297 Ketaminkonsumenten waren bei fast 10% die Leberwerte erhöht. [159] Bildmorphologisch findet man oft eine Dilation des Ductus choledochus oder des Ductus hepaticus communis, die sich nach Beendigung des Konsums zum Teil normalisierte. [160] Eine Leberbiopsie präsentierte das Bild wie bei einer sklerosierenden Cholangitis oder chronischer Cholestase. [161] Zur Pathogenese der

Leberschädigung ist bisher noch nicht viel bekannt. In Versuchen an Ratten konnten man u.a. elektronenmikroskopisch mitochondriale Degeneration nachweisen sowie eine Einschränkung des Komplex I der Atmungskette. [162, 163]

Thiopental

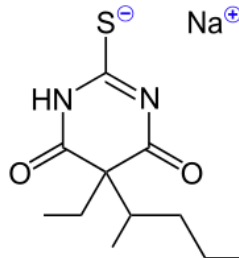


ABBILDUNG 9 Strukturformel von Thiopental (5-ethyl-5 (1-methylbutyl) -2-thiobarbitursäure)

Auch wenn Thiopental, ein schwefelhaltiges Barbiturat zur Narkoseeinleitung, durch Propofol von der Liste der weltweit wichtigsten Medikamente der WHO verdrängt wurde, spielt es bei speziellen Indikationen noch eine wichtige Rolle. [115] So kommt es beispielsweise bei der intensivmedizinischen Betreuung von Patienten mit der Gefahr oder dem Vorhandensein erhöhten Hirndrucks aber auch im refraktären Status epilepticus zum Einsatz. [164] Als Barbiturat bindet es an den GABA_A-Rezeptor, jedoch an eine andere Bindungsstelle im Vergleich zu Benzodiazepinen wie Midazolam, was mit einer gesteigerten Öffnungsdauer des Chloridkanals einhergeht. [165] Die sehr kurze Wirkdauer (6 – 16 Minuten) von Thiopental lässt sich vor allem mit einer raschen Umverteilung im Gewebe erklären. [166] Der Metabolismus erfolgt dann hepatisch zum aktiven Metaboliten Pentobarbital, der in einem darauf folgenden Schritt ebenso wie ein Teil von Thiopental zu einer Carbonsäure oder einem Alkohol oxidiert und somit inaktiviert wird (s. Abbildung 10). Die genauen enzymatischen Schritte sind bisher jedoch noch nicht geklärt. [167]

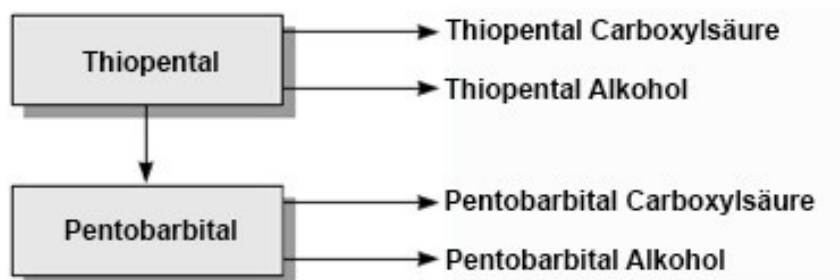


ABBILDUNG 10 Metabolismus von Thiopental. Modifiziert nach [167].

Bekannte Nebenwirkungen des Thiopentals sind eine dosisabhängige Atemdepression sowie hämodynamische Instabilität. [148] Bisher wurde ein Fall von Leberschädigung nach Anwendung von Thiopental beschrieben. [168] LiverTox® gibt an, das Auftreten von Leberschädigung bei Barbituraten sei extrem selten, wenn überhaupt vorhanden. [54]

1.4.2 Opioide

Häufige und schmerzhaftes Prozeduren in der (postoperativen) intensivmedizinischen Behandlung sind beispielsweise das Drehen des Patienten, Absaugung der Atemwege oder das Legen eines arteriellen Zugangs. [114] Etwa 70% aller Intensivpatienten erinnert sich daran Schmerzen gehabt zu haben. [169] Daraus folgen kann eine Stressreaktion des gesamten Körpers mit Aktivierung des Sympathikus und z.B. myokardialer Ischämie, daraus folgend verlängertem Krankenhausaufenthalt sowie höheren Kosten. [170, 171] Als Opioide werden natürliche oder synthetische Substanzen bezeichnet, die morphin-ähnliche Eigenschaften besitzen. [172] Sie üben ihren analgetischen Effekt zum einen durch die Hemmung der Weiterleitung aufsteigender Schmerzsignale sowie die Aktivierung absteigender Schmerzbahnen aus. [173] Ihrer analgetischen Wirkung liegt vor allem die Interaktion mit dem μ_1 -Opioidrezeptor zugrunde, einem G-Protein gekoppeltem Rezeptor, der zur Hemmung spannungsabhängiger Kalziumkanäle und Adenylatcyclase sowie Aktivierung von K⁺-Kanälen führt. [174] Aufgrund der hohen Lipophilie der Opioide kommt es nach lang andauernder Anwendung zur Akkumulation und damit zu einer verlängerten Halbwertszeit. Aus diesem Grund wurde der Terminus der kontextsensitiven Halbwertszeit (HWZ) eingeführt. Das ist also „die Zeit, die benötigt wird, dass die Plasmakonzentration um 50% nach Beendigung der Infusion abfällt“. [175] Die klassischen Nebenwirkungen, die bei allen Opioiden auftreten sind unter anderem Atemdepression, Übelkeit, Obstipation und vor allem bei schnellwirksamen Opioiden Thoraxrigidität. [176] Auf Livertox® wird für Fentanyl und seine Abkömmlinge (Alfentanil, Remifentanil und Sufentanil) kein hepatotoxisches Potenzial angegeben. [54] Auch in großen Studien, wie der des DILI Networks, wo von 2004 bis 2013 über tausend Patienten mit arzneimittelinduziertem Leberversagen beobachtet wurden, war kein einziger Fall auf Opioide zurückzuführen. [52]

Fentanyl

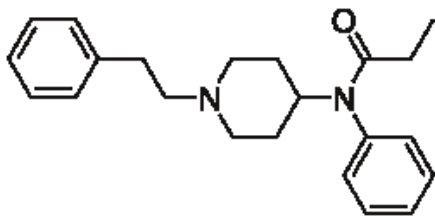


ABBILDUNG 11 Strukturformel von Fentanyl (N-(1-Phenethyl-4-piperidyl) propionanilid)

Nachdem das aus dem Schlafmohn extrahierte Morphin jahrelang in Gebrauch war, konnte 1960 mit der Entwicklung von Fentanyl ein synthetischer μ -Opioidrezeptor-Agonist mit vergleichsweise 100-fach stärkerer analgetischer Potenz auf den Markt gebracht werden. Ihm sollten später noch weitere Vertreter der Fentanylgruppe wie Remifentanil und Sufentanil folgen. Die Verwendung des Fentanyls beläuft sich nicht nur auf die Analgosedierung in der

Intensivmedizin, sondern auch als Komponente der Allgemeinanästhesie und als transdermales Pflaster zur Behandlung chronischer Schmerzen. Die intravenöse Zufuhr von Fentanyl führt innerhalb von einer Minute einer halbstündigen Analgesie. [177] Metabolisiert wird es hauptsächlich durch CYP3A4 zu Norfentanyl, einem Metaboliten mit vernachlässigbarer pharmakologischer Aktivität, der renal ausgeschieden wird. [178] Auch werden etwa 8% unverändert renal eliminiert. [165] Toxizität in Zusammenhang mit Fentanyl ist vor allem im Rahmen der Überdosierung mit nachfolgender Atemdepression bekannt. Weiterhin kann ein serotonerges Syndrom bei Kombination mit u.a. selektiven Serotonin Wiederaufnahmehemmern auftreten. [179] Spezifische Organotoxizität ist bislang nicht bekannt.

Remifentanil

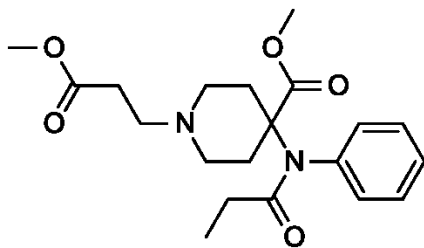


ABBILDUNG 12 Strukturformel von Remifentanil (3-{4-Methoxycarbonyl-4-[(1-oxopropyl)phenyl-amino]-1-piperidin}propansäure-methylester)

Remifentanil ist ein Opioid mit starker μ -Rezeptoraffinität und einer analgetischen Potenz, die mit der von Fentanyl vergleichbar ist. [180] Seine Besonderheit ist die kontext-sensitive Halbwertszeit von 2-3 Minuten, die sich unabhängig von der Dauer der vorangegangenen Infusion darstellt. [181] Dies liegt darin begründet, dass eine schnelle Umwandlung durch unspezifische Esterasen in Blut und Gewebe zum Metaboliten Remifentanilsäure erfolgt, der nur 1/4600 der ursprünglichen Aktivität besitzt. Er wird dann zum größten Teil über die Niere ausgeschieden. [182] Über Hepatotoxizität oder andere Organotoxizität von Remifentanil ist bisher nichts bekannt.

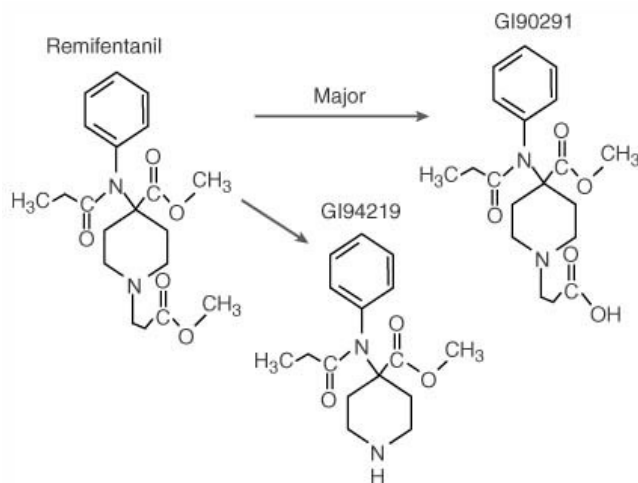


ABBILDUNG 13 Metabolismus von Remifentanil. Hauptweg ist die Esterspaltung zu Remifentanilsäure (GI90291). Als Nebenweg existiert die N-Dealkylierung zu GI94219. [183]

Die schnelle und organunabhängige Verstoffwechslung macht dieses Opioid für die intensivmedizinische Anwendung interessant. Zum einen kann so die Erholung schnell erfolgen, woraus eine geringere Dauer von invasiver Beatmung und ein verkürzter Aufenthalt auf der Intensivstation resultieren. [184, 185] Zum anderen kann es so auch bei Leberinsuffizienz eingesetzt werden, da es nicht zur Akkumulation bei verminderter Organfunktion kommt. [186, 187]

Sufentanil

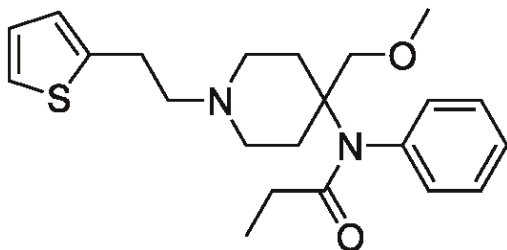


ABBILDUNG 14 Strukturformel von Sufentanil (N-[4-(Methoxymethyl)-1-(2-thiophen-2-ylethyl)-4-piperidyl]-N-phenyl-propanamid)

Nach Fentanyl synthetisierte Paul Janssen 1976 Sufentanil. [188] Dies war die Geburtsstunde eines neuen Opioids, das sich durch eine 1.000-fach stärkere analgetische Potenz im Vergleich zu Morphin, sowie eine größere therapeutischen Breite auszeichnet. So präsentiert es beispielsweise eine höhere hämodynamische Stabilität und eine kürzere Eliminations-Halbwertszeit. Wie Fentanyl erfolgt der Metabolismus von Sufentanil hauptsächlich durch das Enzym CYP3A4 im Sinne einer oxidativen N-Dealkylierung mit folgender renaler Elimination. [189] Hinsichtlich eventueller Toxizitäten von Sufentanil ist bisher nichts bekannt.

2 Zielstellung

Unter Verwendung eines etablierten Zytotoxizitätstests auf Basis der humanen Hepatozytenzelllinie HepG2/C3A sollen sieben häufig in der Intensivmedizin verwendete Hypnotika und Opioide auf medikamenteninduzierte Hepatotoxizität untersucht werden. Dazu sollen folgende Substanzen getestet werden:

- Midazolam
- Propofol
- S-Ketamin
- Thiopental
- Fentanyl
- Remifentanyl
- Sufentanyl

Die Testung an den Sensorzellen soll in Mikrotiterplatten mit Konzentrationen erfolgen, die in Patientenplasma bei Sedierung zu intensivmedizinischen Zwecken mit empfohlenen Dosierungen erwartet werden können. Untersucht werden sollen die klinisch relevante Konzentration sowie die fünffache und zehnfache Konzentration sowohl in Kulturmedium als auch in Plasma. Nach bestimmten Inkubationszeiten soll die Zahl und Vitalität der Sensorzellen, das Ausmaß der Freisetzung von Laktatdehydrogenase, der Aktivierungsgrad mitochondrialer Enzyme und des Cytochrom P450 Isoenzym CYP1A2 sowie die Proteinsyntheseleistung gemessen werden. Durch den Vergleich mit im reinen Kulturmedium oder Plasma mitgeführten Kontrollen soll eine Aussage über den Umfang der in-vitro Hepatotoxizität gemacht werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Testsubstanzen

In Tabelle 8 werden die getesteten Hypnotika und Opioide anhand ihrer Zusammensetzung, Pharmakokinetik und Zubereitung aufgelistet.

Testsubstanz		Midazolam	Propofol	S-Ketamin	Thiopental	Fentanyl	Remifentanyl	Sufentanil
Handelsname		Midazolam -ratiopharm ® 5mg / 5 ml Injektionsösung	Propofol- ® Lipuro 10 mg/ml Injektionslösung	Ketanest ® S 25 mg/ml Injektionslösung	Thiopental Inresa ® 500 mg Pulver	Fentanyl -ratiopharm ® 0,1 mg / 2 ml Injektionslösung	Ultiva ® 2 mg Pulver	Sufenta mite ® 5 µg/ml Injektionslösung
Hersteller		ratiopharm GmbH	B. Braun AG	Pfizer Pharma GmbH	Ospedalia AG	ratiopharm GmbH	GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG	Janssen-Cilag GmbH
sonstige Bestandteile		Wasser, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Salzsäure	raffiniertes Sojaöl, Triglyceride, Glycerol, Eilecithin, Natriumoleat, Wasser	Natriumchlorid, Salzsäure, Wasser	Natriumcarbonat	Natriumchlorid, Wasser, Salzsäure, Natriumhydroxid	Glycin, Salzsäure, Natriumhydroxid	Natriumchlorid, Wasser
Plasmaproteinbindung		96 - 97% [118] [190]	97 - 98% [191]	10 - 30% [192]	80 - 84% [193] [194]	84% [195]	92% [195]	93% [195]
Medikamentenlösung					Auflösen mit 20 ml Reinstwasser		Auflösen mit 2 ml NaCl 0,9%	
Konzentration		1 mg/ml	10 mg/ml	25 mg/ml	250 mg/ml	50 µg/ml	1 mg/ml	5 µg/ml
Arbeitslösung		16,2 ml NaCl 0,9% 0,5 ml ML	13,35 ml NaCl 0,9% 1,35 ml DMSO 0,3 ml ML	14,94 ml NaCl 0,9% 0,06 ml ML	14,4 ml NaCl 0,9 % 0,6 ml ML	14,7 ml NaCl 0,9% 0,3 ml ML	14,975 ml NaCl 0,9% 22,75 µl ML	14,7 ml NaCl 0,9% 0,3 ml ML
Konzentration		30 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	100 mg/ml	1 µg/ml	1,5 µg/ml	100 ng/ml
pH-Wert		4,47	8,10	4,92	9,68	7,03	5,05	4,76
Test- konzentrationen	C _{max}	300 ng/ml [196][196]	2 µg/ml [197][198]	1 µg/ml [199][149]	1 mg/ml [200] [201]	10 ng/ml [202]	1 ng/ml [203]	15 ng/ml [204] [187]
	C _{5x}	1.500 ng/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	5 mg/ml	50 ng/ml	5 ng/ml	75 ng/ml
	C _{10x}	3.000 ng/ml	20 µg/ml	10 µg/ml	10 mg/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	150 ng/ml

TABELLE 8 Übersicht der verwendeten Hypnotika und Opioide; C_{max}: klinisch relevante Konzentration, C_{5x}: 5-fach maximale Konzentration, C_{10x}: 10-fach maximale Konzentration, DMSO: Dimethylsulfoxid, ML: Medikamentenlösung.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Master- und Workingzellbank

Für den Zytotoxizitätstest dieser Arbeit wurden die permanente Hepatoma-Zelllinie HepG2/C3A verwendet, die von der American Type Culture Collection (ATCC-CRL-10471) bezogen wurde. Ein Vial der Zellen mit 1×10^7 Zellen/ml wurde ausgesät und soweit kultiviert, dass die Kryokonservierung von 140 Röhrchen (Reaktionsgefäße 1,5 ml; Eppendorf Deutschland) mit 1×10^7 Zellen/ 2 ml in flüssigem Stickstoff (Vorlaufbehälter Apollo 2002-2 und Biosafe 420 SCB; Cryotherm GmbH Deutschland) bei -196°C erfolgen konnte. Das Medium während der Kryokonservierung bestand aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; life technologies Deutschland), 10% fetalem Kälberserum (FKS; PAA Laboratories Deutschland), 1% L-Glutamin (2 mM; PAA Laboratories Deutschland) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO EMPLURA®; Merck Deutschland), das zur Kryoprotektion diente. Die Zellen wurden Licht- und Elektronenmikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht. Auch erfolgte eine molekulargenetische Diagnostik durch die Firma DIAGENOM GmbH (Rostock), die die Zellen der so hergestellten Masterzellbank mit bisher verwendeten HepG2/C3A-Zellen anhand von Short-Tandem-Repeats verglich. Weiterhin wurden die Zellkulturüberstände auf Kontamination mit Mycoplasmen (MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit; Lonza Deutschland) sowie durch das Medizinische Labor auf Bakterien, Pilze und Viren untersucht. Danach wurden die unter 3.4 beschriebenen Testabläufe durchgeführt, um die Funktionalität der Zellen zu bestimmen. Aus der so hergestellten Masterzellbank wurden zwei Röhrchen zum Aufbau einer Workingzellbank verwendet. Dazu wurden die Zellen 20 Tage kultiviert, wodurch weitere 20 Kryoröhrchen mit 1×10^7 Zellen/ml geschaffen werden. Diese wurden kryokonserviert wie oben beschrieben.

3.2.2 Kultivierung

Für die Versuche wurden einzelne Tubes aus dem Stickstoff genommen, im Wasserbad (Mettler Deutschland) bei 37°C erwärmt und in Aufbaumedium (DMEM mit 50% FKS) aufgenommen, zentrifugiert (5 min, 900 U/min, 20°C ; Megafuge 1.0 R; Heraeus Sepatech GmbH Deutschland), der Überstand verworfen und das Pellet in Kulturmedium resuspendiert. Nach Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung (s. Abschnitt 3.4.3) wurden die Zellen mit einer Konzentration von 5×10^5 Zellen /ml in 25 T Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-One Deutschland) mit 10 ml in Kulturmedium aus DMEM ausgesät, da sich in Vorversuchen zeigte, dass die CYP450 Enzymaktivitäten hier im Vergleich zu anderen Medien besser ausgeprägt sind. [205] Diesem Kulturmedium hinzugefügt wurde FKS in einer Konzentration von 10% oder 15%. In ihm enthalten sind eine Vielzahl von Proteinen, so unter anderem Fibronectin, das die Zellanhaftung unterstützt oder α_2 -Mikroglobulin, das Trypsin neutralisiert und so zur Erholung der Zellen nach Passagierung beiträgt. Auch Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth

28

factor) und PDGF (platelet-derived growth factor) sind darin erhalten und tragen zum Zellwachstum und zur Differenzierung bei. Weiterhin zugesetzt wurde 1% L-Glutamin (2 mM) sowie 1% Antibiotika-Lösung (Penicillin (10.000 IE/ml)/Streptomycin (10 mg/ml); PAA Laboratories Deutschland).

Die Kultivierung der HepG2/C3A Zellen erfolgte im Brutschrank unter 5% CO₂-Begasung bei 37 °C sowie 60%-iger Luftfeuchtigkeit (CO₂-Brutschrank; Thermo Fischer Scientific Deutschland). Ein Mediumwechsel erfolgte 24 Stunden nach der Revitalisierung, danach dreimal pro Woche. Sobald die Zellkultur eine Konfluenz von annähernd 90% erreicht hatte wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das alte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette (150 mm Glas; VWR Deutschland) abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit Phosphat gepufferter Salzlösung (Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg; PAA Laboratories Deutschland) gespült und mit 1 ml je 25 T Zellkulturflasche Trypsin-Ethylendiamin-Tetraacetat (Trypsin-EDTA 1x; PAA Laboratories Deutschland) für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die hierdurch abgelösten Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, zentrifugiert (5 min, 900 U/min, 20 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in Kulturmedium resuspendiert und nach Bestimmung von Zellzahl und Vitalität in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml erneut ausgesät. Die Zellen wurden bis zu 10 Passagen geführt und danach verworfen.

3.3 Gewinnung von Spenderplasma

Für die Versuche wurde ein Plasmapool aus den Spenden junger Probanden ohne bekannte chronische Erkrankungen oder regelmäßige Medikamenteneinnahme hergestellt. Das Vollblut wurde mit 50 IE Heparin (Lithium-Heparin; ratiopharm Deutschland) pro ml abgenommen und nach einer Ruhezeit von 2 Stunden zentrifugiert (15 Minuten bei 4.000 Umdrehungen/Minute). Danach wurde es mittels eines manuellen Plasmaextraktors (LMB Deutschland) separiert und gepoolt. Abschließend erfolgte die Sterilfiltrierung des Plasmas durch einen 0,22 µm Filter (Disposable Filter Unit FP30/0,2 CA-S). Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei - 30 °C (Gefrier-&Kühlschrank Liebherr Österreich) in 10 ml bis 50 ml Tubes (BlueCaps 15 ml / 50 ml; Greiner Bio-One Deutschland).

3.4 Durchführung des Hepatotoxizitätstests

3.4.1 Testvorbereitung

Microtiterplatten 1 und 2

Vorbereitung

Für die unter 3.4.3 bis 3.4.5.1 beschriebenen Testparameter wurden die HepG2/C3A Zellen nach der Revitalisierung mindestens zwei Wochen in Kulturmedium mit 10% FKS gehalten.

Testdurchführung

Für den Test wurde wie unter 3.2.2 beschrieben eine Zellsuspension hergestellt, die Zellzahl bestimmt und 250.000 Zellen in 250 µl Kulturmedium je Well in zwei 24-Well-Zellkulturplatte (Greiner Bio-One Deutschland) ausgesät. Nach mindestens vier Stunden Inkubation im Brutschrank, die der Adhäsion der Zellen diente und nach Sichtkontrolle unter dem Mikroskop (Lichtmikroskop; Wolovert 30 Standard; HUND GmbH Deutschland) ggf. verlängert wurde, erfolgte die Zugabe des Medikaments in Kulturmedium oder Plasma, sodass sich je Well 1 ml befand. Ebenso wurden für die Negativkontrollen Zellen in reinem Kulturmedium mit 10% und ohne FKS sowie im Plasma mitgeführt. (s. Tabelle 9)

	1	2	3	4	5	6
A	C_{max} 990 µl Medium 10 µl SL	C_{max} 990 µl <u>Plasma</u> 10 µl SL	C_{5x} 950 µl Medium 50 µl SL	C_{5x} 950 µl <u>Plasma</u> 50 µl SL	C_{10x} 900 µl Medium 100 µl SL	C_{10x} 900 µl <u>Plasma</u> 100 µl SL
B	C_{max} 990 µl Medium 10 µl SL	C_{max} 990 µl <u>Plasma</u> 10 µl SL	C_{5x} 950 µl Medium 50 µl SL	C_{5x} 950 µl <u>Plasma</u> 50 µl SL	Kontrolle 1 ml <u>Plasma</u>	Kontrolle 1 ml <u>Plasma</u>
C	C_{max} 990 µl Medium 10 µl SL	C_{max} 990 µl <u>Plasma</u> 10 µl SL	C_{10x} 900 µl Medium 100 µl SL	C_{10x} 900 µl <u>Plasma</u> 100 µl SL	Kontrolle 1 ml Medium 10% FKS	Kontrolle 1 ml Medium 10% FKS
D	C_{5x} 950 µl Medium 50 µl SL	C_{5x} 950 µl <u>Plasma</u> 50 µl SL	C_{10x} 900 µl Medium 100 µl SL	C_{10x} 900 µl <u>Plasma</u> 100 µl SL	Kontrolle 1 ml Medium 0% FKS	Kontrolle 1 ml Medium 0% FKS

TABELLE 9 Plattenbelegung im Versuchsaufbau. C_{max}: maximale Konzentration; C_{5x}: 5-fache maximale Konzentration; C_{10x} 10-fach maximale Konzentrationen der Testsubstanz; SL: Stammlösung (s. Abschnitt 3.1), FKS: fetales Kälberserum

Nach zwei Tagen Inkubation im Brutschrank unter Standardbedingungen wurde den Zellen am dritten Tag nach der Aussaat erneut die zu testende Substanz zugeführt. Hierzu wurde das alte Medium bzw. Plasma mittels steriler Pasteurpipette abgesaugt, zweimal mit PBS gespült und schließlich das Medikament in Kulturmedium nach dem Schema in Tabelle 9 zugegeben. Die Zellen, die Tag eins bis drei mit Plasma kultiviert wurden erhielten einen Wechsel auf Kulturmedium. Es schlossen sich zwei Tage Inkubation im Brutschrank an. Am sechsten Tag erfolgte die Bestimmung der Testparameter.

Microtiterplatte 3

Vorbereitung

Für die unter 3.4.5.2 beschriebene Bestimmung der Aktivität des Cytochrom P450-Isoenzym CYP1A2 wurden HepG2/C3A Zellen nach der Revitalisierung mindestens zwei Wochen in Kulturmedium mit 15 % FKS gezüchtet, da mit steigender FKS-Konzentration die Aktivität von CYP450 Enzymen gesteigert wird. [206] Darauf folgte eine Woche Anzucht in Kulturmedium, das zusätzlich mit 3-Methylcholantren (3-MC 98%; Sigma-Aldrich Deutschland) in einer Konzentration von 2,68 mg/l versetzt wurde. Die Zugabe von 3-MC erfolgte, da es zu einer 20- bis 30-fachen Steigerung der Cytochromaktivität führt. [207]

Testdurchführung

Für den Test wurde wie unter 3.2.2 beschrieben eine Zellsuspension hergestellt, die Zellzahl bestimmt und 250.000 Zellen in 1000 µl Kulturmedium mit 15 % FKS und 3-MC in einer Konzentration von 5,36 mg/l in eine 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Während der nächsten zwei Tage erhielten die Zellen täglich einen Wechsel dieses Mediums. Am dritten Tag nach der Aussaat wurde der Überstand abgesaugt, zweimal mit PBS gespült und schließlich das Medikament in 1000 µl Kulturmedium mit 15 % FKS oder Plasma je Well nach dem Schema in Tabelle 9 zugegeben. Nun folgten zwei Tage Inkubation im Brutschrank. Am sechsten Tag nach der Aussaat wurde der unter 3.4.5.2 beschriebene Test durchgeführt.

3.4.2 Bestimmung des pH-Werts

Da unphysiologische pH-Werte Einfluss auf das Zellwachstum und die Vitalität nehmen können, wurde der pH-Wert sowohl der Medikamentenzubereitung als auch der Testsubstanzen in allen Konzentrationen im Plasma und Medium wie auch der Negativkontrollen bestimmt. Hierzu wurde die Bestimmung aus 200 µl der entsprechenden Lösung bei 37°C in Eppendorfgläsern (Reaktionsgefäße 1,5 ml; Eppendorf Deutschland) mit dem pH-Messgerät (inoLab pH7310, WTW Deutschland) durchgeführt.

3.4.3 Bestimmung der Vitalität und Proliferation

Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Trypanblaufärbung ist eine schnelle und einfach durchzuführende Methode zur Bestimmung der Zellzahl. Sie funktioniert im Sinne einer Ausschlussfärbung, da der anionische Farbstoff aufgrund seiner Größe ($M = 960,8 \text{ g/mol}$) ausschließlich die Membran abgestorbener Zellen durchdringen, an deren Zellproteine binden und sie somit blau färben kann. Es ist allerdings zu bedenken, dass Trypanblau selbst über eine zytotoxische Wirkung verfügt, weswegen die Einwirkdauer möglichst gering gehalten werden soll [208, 209]. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Überstand jedes Wells und die darin enthaltenen, nicht adhären Zellen in je ein Blue Cap überführt. Die adhären Zellen wurden durch Inkubation mit 500 μl Trypsin-Lösung (10 Minuten bei 37°C , 5% CO_2 , 60% Luftfeuchtigkeit) gelöst und in die entsprechenden Blue Caps gebracht. Anschließend wurde das durch Zentrifugation (5 Minuten bei 153 g) gewonnene Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert. Die so gewonnene Zellsuspension aus ursprünglich adhären und nicht-adhären Zellen wurde ggf. mit PBS verdünnt und mit Trypanblau (Trypanblau 0,4%; Sigma Aldrich Deutschland) im Verhältnis 1:1 gefärbt. Zur Zählung wurden 10 μl dieser gefärbten Suspension in eine Einweg-Zählkammer aus Kunststoff (C-Chip Neubauer improved DHC-NO1; Peqlab Deutschland) mit der Einteilung nach Neubauer pipettiert. Das Zählraster der Kammer besteht aus neun Quadraten mit einem definierten Volumen von je $0,1 \text{ mm}^3$, wovon die lebendigen Zellen der vier Eckquadrate ausgezählt wurden. Aus den Werten der vier Einzelquadrate wurde der Mittelwert gebildet und die Lebendzellzahl pro ml über die folgende Formel berechnet:

$$\text{Lebendzellzahl / ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Die Gesamtzellzahl ergibt sich nach Zählung der nicht gefärbten, toten Zellen durch folgende Gleichung:

$$\text{Gesamtzellzahl/ml} = \text{Lebendzellzahl} + \text{Totzellzahl}$$

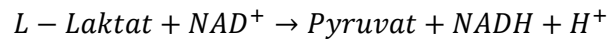
Die Vitalität wurde aus dem Quotienten zwischen Lebendzellzahl und Gesamtzellzahl (Summe der lebendigen und toten Zellen) berechnet.

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH)

Eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung des Zelltods stellt die Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) dar. Es ist ein Enzym des anaeroben Stoffwechsels, das im Zytoplasma aller Zellen vorhanden ist und tritt bei Membranschädigung in das Kulturmedium über. Die Bestimmung der LDH-Aktivität erfolgte nach drei und nach sechs Tagen Inkubation

mit der Testsubstanz aus 200 µl Zellkulturüberstand am EDV-gestützten Analyseautomaten (Cobas Mira plus; Roche Diagnostics Deutschland) nach der optimierten Standardmethode der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). [210] Es handelt sich dabei um einen kinetisch-optischen Test, der die sich auf die folgende Reaktionsgleichung stützt:



Nach vollautomatisierter Zugabe des Reagenzes (LT-SYS® Deutschland) bestehend aus N-Methyl-D-Glutamine, L-Laktat, β-Nikotinamiddinukleotid (NAD⁺), HCl und NaCl erfolgt die Messung der Extinktion bei 340 nm Wellenlänge, deren Abnahme eine Protonierung des Coenzym NAD⁺ zu NADH + H⁺ und damit indirekt die Enzymaktivität widerspiegelt. Zur internen Richtigkeitskontrolle wurde das Gerät bei jeder Messung mittels Multikalibrator (LT-SYS® Deutschland) neu kalibriert und anhand von Kontrollseren (normal und abnormal; LT-SYS® Deutschland) überprüft.

3.4.4 Mikroalbumin-Bestimmung

Unter Mikroalbumin-Bestimmung versteht man Erfassung sehr geringer Mengen Albumins (20 - 200 mg/l). Die Bildung von Albumin ist ein Parameter für vitale Hepatozyten, so auch für HepG2-Zellen. Die Mikroalbuminkonzentration wurde durch das Medizinische Labor Rostock aus 200µl Zellkulturüberstand, der in sterile Eppendorfgefäße überführt und bis zum Analysezeitpunkt bei -20 °C gelagert worden waren, bestimmt. Die verwendete Methode beruht auf der Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, der eine Reaktion zwischen Albumin und Anti-Albumin-Antikörpern zugrunde liegt. Dabei wird die Zunahme des Streulichts durch die Komplexbildung mit einem Nephelometer (Image 800; Beckman-Coulter, Deutschland) gemessen (kinetische Immunnephelometrie).

3.4.5 Aktivität von Enzymsystemen

3.4.5.1 Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen

Der XTT-Test ist ein klassischer Viabilitätstest zur Darstellung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen. Das Reaktionsprinzip ist die Reduktion des Tetrazolium-Salzes XTT (Natrium-3'-(1-phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium-bis-(4-methoxy-6-nitro)-benzesulphon-säure) zu orangefarbenem Formazan, welches, im Gegensatz zu dem Produkt des ähnlich ablaufenden MTT-Tests, wasserlöslich ist und direkt spektrophotometrisch gemessen werden kann. Die Reduktion läuft an der Zelloberfläche ab, wo ein Elektronentransfer von im mitochondrialen Citratzyklus gebildetem NADH über Plasmamembran-Oxidoreduktasen auf

XTT unter Zuhilfenahme eines intermediären Elektronenakzeptors, Phenazinmethosulfat (PMS), erfolgt. [211, 212]

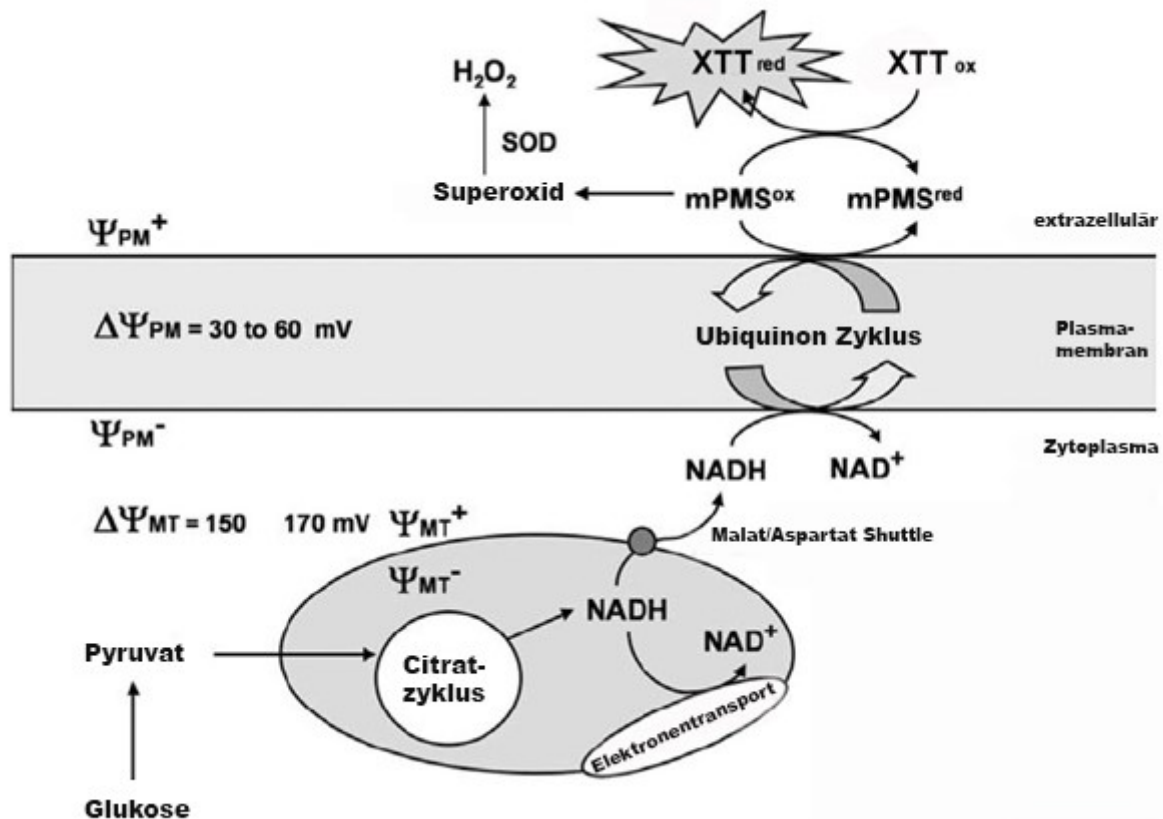


ABBILDUNG 15 Schematische Darstellung des vermuteten Mechanismus des XTT-Tests. Erklärung s. Text. Modifiziert nach [212].

Der Test auf Basis des Cell Proliferation Kits II (Roche Diagnostics GmbH Deutschland) wurde jeweils zweifach durchgeführt: zum einen wurde der Überstand der Zellkultur verwendet, wodurch die Zellen, die sich im Rahmen der Schädigung abgelöst hatten, erfasst werden konnten. Diese Variante wird im Weiteren als **indirekter XTT-Test** bezeichnet. Zum anderen erfolgte die Bestimmung des Tests der adhärenenten Zellen (**direkter XTT-Test**). Pro Well wurden im Sinne einer Doppelbestimmung 2 x 100 µl Überstand oder Zellsuspension entnommen und in eine durchsichtige 96-Well-Platte (Cellstar Greiner Bio-One) überführt. Es wurde eine Lösung aus 5 ml XTT Reagenz (labeling reagent, 1 mg/ml XTT in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-Medium) und 0,1 ml Kopplungsreagenz (electron-coupling reagent; 0,383 mg/ml Phenazinmethosulfat in PBS) hergestellt, von der je Well 100 µl hinzugegeben wurden. Anschließend erfolgte nach 1 h (direkter XTT-Test) bzw. 24 h (indirekter XTT-Test) Inkubation im Brutschrank die photometrische Messung bei einer Referenzwellenlänge von 690 nm und einer Absorptionswellenlänge von 450 nm (Anthos Reader 2010; Biochrome Ltd. Vereinigtes Königreich).

3.4.5.2 Bestimmung der Aktivität von CYP1A2

Die Aktivität der Isoenzyme CYP1A1 und 2 der Cytochrom P450 Familie kann mit Hilfe des Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) Tests bestimmt werden. [213] Hierbei erfolgt die in Abbildung 16 dargestellte Reaktion, bei der eine Oxidierung der -CH₂-Gruppe von 7-ethoxyresorufin (7-ER) zu einer -CHOH Gruppe erfolgt. Da diese -CHOH Gruppe instabil ist, zerfällt sie zu einem Hemiacetal und gibt Resorufin frei, dessen Fluoreszenz gemessen werden kann. Da bei ausreichend hoher 7-ER Konzentration die Reaktionsgeschwindigkeit annähernd ihr Maximum erreicht kann aus der Intensität der Fluoreszenz auf die Konzentration des katalysierenden CYP-Enzyms rückgeschlossen werden. [214]

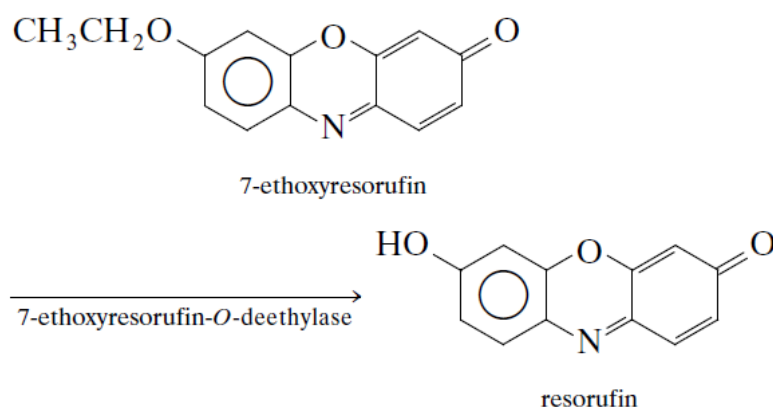


ABBILDUNG 16 Reaktionsprinzip des Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Tests; das ebenfalls entstehende Acetaldehyd ist nicht dargestellt. [214]

Zu Beginn erfolgte das Absaugen des Zellkulturüberstands und zweimalige Spülen mit PBS. Nachfolgend wurden 500 µl pro Well einer Lösung bestehend aus 8 µmol/l Ethoxyresorufin (Resorufin Ethyl Ether; Invitrogen Deutschland), 10 µmol/l Dicumarol (Sigma Aldrich Deutschland) und DMEM zugegeben, mit der die Zellen im Brutschrank unter Standardbedingungen eine Stunde inkubiert wurden. Im Anschluss wurden im Sinne eine Doppelbestimmung aus jedem Well 2 x 75 µl des Überstandes entnommen und in eine schwarze 96-Well-Platte überführt. Nun wurden die Zellen mit 15 µl je Well einer Natriumacetat-Puffer-Lösung (Natriumacetat-Puffer pH 4,66; Bernd Kraft GmbH, Deutschland), die 15 Fishman Units β-Glucuronidase und 120 Roy Units Arylsulfatase (β-Glucuronidase-Arylsulfatase; Roche Diagnostics Deutschland) enthielt, drei Stunden im Thermoshake (Shaker Thermostat DTS-4; ELMI Ltd. Lettland) bei 600 Umdrehungen pro Minute und 37 °C inkubiert. Diese Lösung sollte zur Hydrolyse möglicher Resorufin-Konjugate führen. Abschließend wurden 200 µl Ethanol (Ethanol absolute EMSURE®; Merck Deutschland) in jedes Well gegeben um die Reaktion zu stoppen und am Fluoreszenz-Reader (Fluoroskan Ascent; Thermo Labsystems Deutschland) bei einer Exzitationswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 584 nm gemessen. Zur Quantifizierung der

Ergebnisse wurde eine Resorufinstandardreihe mitgeführt, die durch Verdünnung von Resorufin (in den Konzentrationen 0 pmol, 10 pmol, 20 pmol, 40 pmol und 80 pmol) in Kulturmedium geschaffen wurde. Anhand einer linearen Regressions-Kurvengleichung durch die Resorufin-Kalibrierkurve konnten so die Resorufin-Mengen bestimmt werden.

3.5 Statistik

Die Datenanalyse erfolgte mittels des Statistikprogramms SPSS für Windows 22.0 (IBM Vereinigte Staaten). Zunächst wurden alle Daten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Nicht-normalverteilte Daten wurden deskriptiv als Median mit der 25. und 75. Perzentile dargestellt. Zum Vergleich der zentralen Tendenzen wurden zwei nichtparametrische Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Zunächst der Kruskal-Wallis-Tests für mehrere Stichproben sowie nachfolgend der Mann-Whitney-U-Tests zum paarweisen Vergleich. Als signifikant galten p-Werte $< 0,05$.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Hepatotoxizitätstestung der Hypnotika und Sedativa (Midazolam, Propofol, S-Ketamin und Thiopental) sowie der Opioide (Fentanyl, Sufentanil und Remifentanyl) dargelegt.

4.1 Hypnotika und Sedativa

4.1.1 pH-Wert

Der pH-Wert des Zellkulturmediums lag bei 7,8 und der des gepoolten Spenderplasmas bei 7,7. Die pH-Werte der reinen Testsubstanzen waren sowohl stark basisch (Thiopental pH 10,6 und Propofol pH 8,0) als auch sauer (Midazolam pH 3,4 und S-Ketamin pH 3,9). In der Zubereitung im Medium (C_{\max} bis C_{10x}) waren die pH-Werte – mit Ausnahme von Thiopental in der höchsten Konzentration (pH 8,0) – jedoch nicht signifikant vom reinen Zellkulturmedium verschieden (pH 7,7 bis 7,8) (s. Anhang Tabelle 18). Im Plasma waren die pH-Werte von C_{\max} bis C_{10x} im Vergleich zum Medium höher (pH 7,7 – 8,0) und einige Medikamentenkonzentrationen signifikant höher als der Wert des Plasmas – Thiopental sogar über alle Konzentrationen. (s. Anhang Tabelle 19)

4.1.2 Vitalität und Proliferation

Zellzahl im Medium

In der Kultur im Medium konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Zellzahl der Negativkontrolle (683×10^3 Zellen pro ml) und der klinisch relevanten Konzentrationen (C_{\max}) der Testsubstanzen festgestellt werden (712 bis 775×10^3 Zellen pro ml, s. Abbildung 17A). Auch mit steigender Konzentration C_{\max} bis C_{10x} zeigte sich keine signifikante Abnahme der Zellzahl. Im Gegenteil präsentierten Midazolam und Propofol mit 905 und 835×10^3 Zellen pro ml signifikant erhöhte Zellzahlen in der höchsten Konzentration (C_{10x}) (s. Abbildung 17B und Anhang Tabelle 20).

Ergebnisse

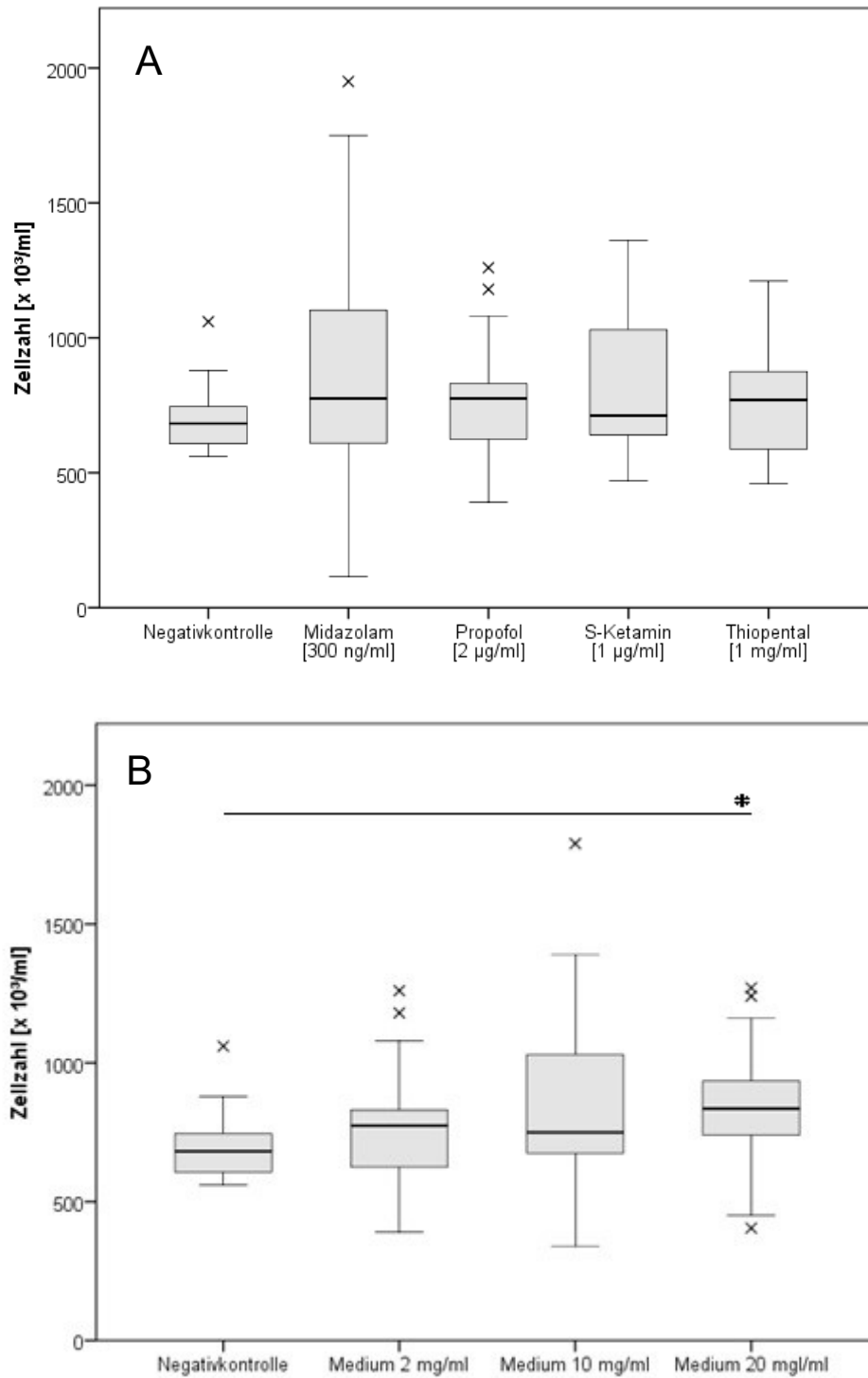


ABBILDUNG 17 Zellzahl nach 6-tägiger Inkubation im Medium.

A | Hypnotika und Sedativa in klinisch relevanten Konzentrationen C_{MAX}

B | Aufsteigende Konzentration von **Propofol** (C_{MAX} - C_{10x})

Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Zellzahl im Plasma

Im Plasma wuchsen in allen Versuchen weniger Zellen als im Medium. Die Negativkontrolle im Plasma enthielt 650×10^3 Zellen pro ml – im Medium dagegen 683×10^3 Zellen pro ml. In der klinisch relevanten Konzentration (C_{\max}) waren die Zellzahlen im Durchschnitt um 20% geringer als bei gleicher Konzentration im Medium. Im Vergleich zur Negativkontrolle mit Plasma war die Zahl nicht der mit C_{\max} bis C_{10x} inkubierten Zellen nicht signifikant vermindert. Die schon im Medium aufgefallene Zunahme der Zellzahl bei Propofol mit steigender Konzentration konnte auch im Plasma beobachtet werden. In der Konzentration C_{5x} und C_{10x} war die Zellzahl signifikant höher als im Plasma (810 und 830×10^3 Zellen pro ml). (s. Anhang Tabelle 22)

Vitalität im Medium

In Gegenüberstellung zur Negativkontrolle, deren Vitalität im Durchschnitt 94% war, zeigten alle Substanzen in klinisch relevanter Konzentration (C_{\max}) eine signifikante Vitalitätsminderung. Dies ließ sich am stärksten bei Thiopental (86%) und Propofol (86%) beobachten. (s. Abbildung 18)

Eine weitere Abnahme der Vitalität mit steigender Konzentration konnte bei Thiopental beobachtet werden, wo sie von 86% (C_{\max}) auf bis zu 80% in 10-facher Konzentration (C_{10x}) abfiel. (s. Abbildung 19) Bei Propofol war ein entgegengesetzter Trend zu beobachten: die Vitalität nahm mit steigender Konzentration (C_{5x} und C_{10x}) im Vergleich zu C_{\max} zu – blieb jedoch stets unterhalb der Negativkontrolle. Die anderen Hypnotika und Sedativa präsentierten keine eindeutigen Tendenzen bei weiterer Konzentrationssteigerung. (s. Anhang Tabelle 21)

Ergebnisse

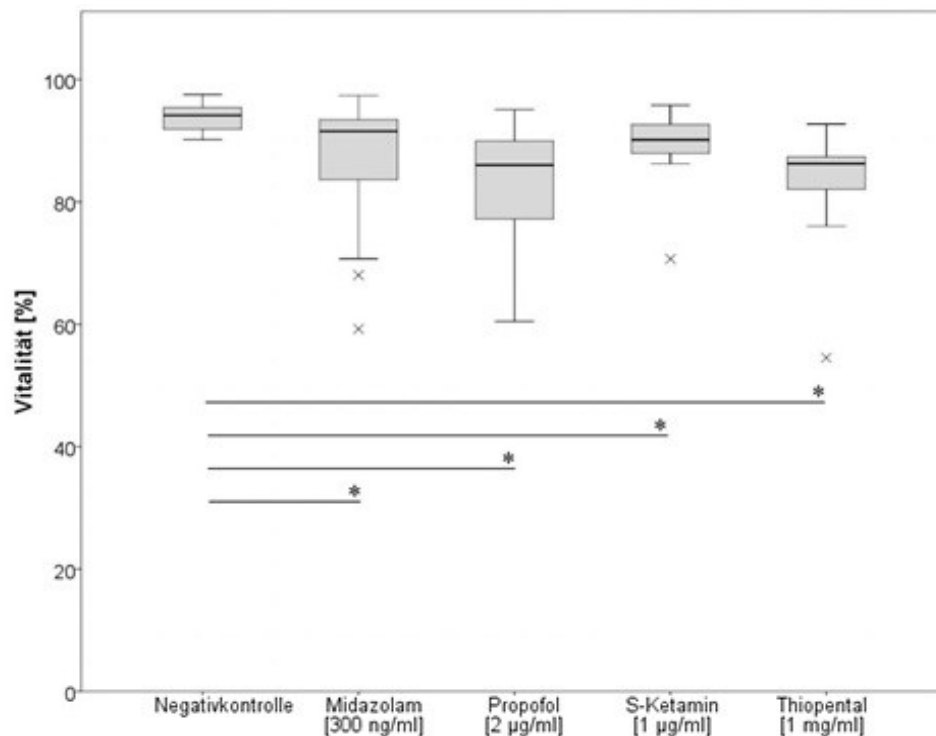


ABBILDUNG 18 Vitalität nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Klinisch relevante Konzentrationen (C_{MAX}) der Hypnotika und Sedativa. Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Vitalität im Plasma

Die Vitalität der Zellen war im Plasma ohne Medikamentenzugabe mit 90% etwas niedriger als im Medium (94%). Entsprechend der Beobachtungen im Medium (ausgenommen Midazolam) war auch im Plasma die Vitalität bei allen Substanzen in klinisch relevanter Konzentration (C_{max}) im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant gemindert. Wie schon im Medium beobachtet war hier die Vitalität bei C_{max} für Propofol (77%) und Thiopental (81%) am niedrigsten. Die weitere Vitalitätsminderung mit Zunahme der Konzentration von Thiopental war im Plasma noch ausgeprägter als im Medium zu sehen. Bei Propofol zeigte sich – wie schon im Medium beobachtet – mit steigender Konzentration eine signifikante Zunahme der Vitalität (auf 80% bei C_{10x}). Für Ketamin und Midazolam war keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit festzustellen (s. Anhang Tabelle 23).

Ergebnisse

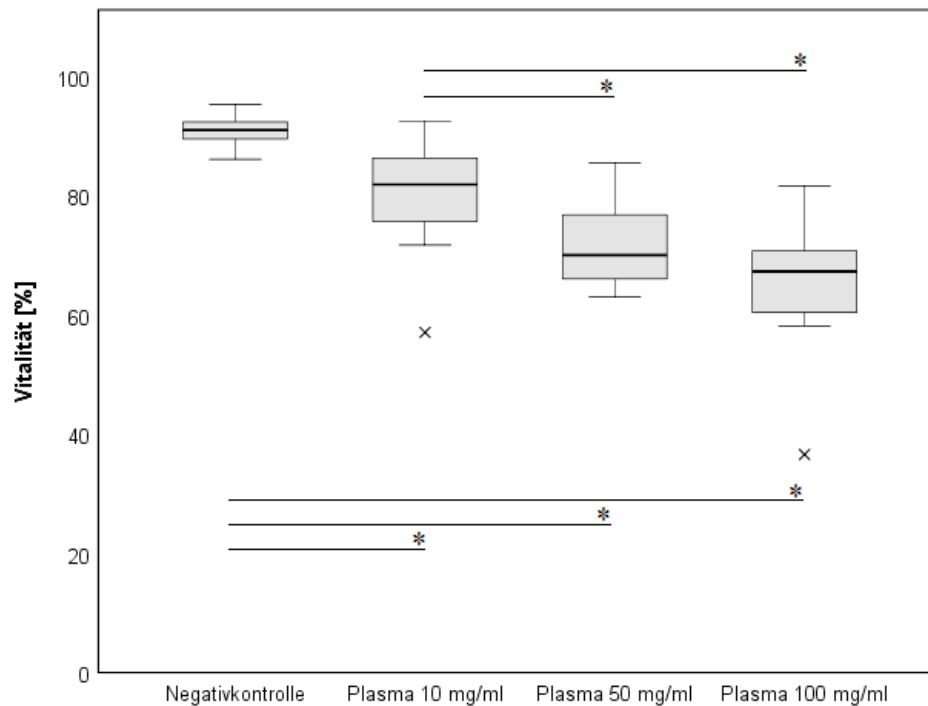


ABBILDUNG 19 Vitalität nach 6-tägiger Inkubation im Plasma bei aufsteigenden Konzentrationen von **Thiopental** (C_{MAX} - C_{10x}). Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle bzw. untereinander dargestellt.

Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) im Medium

In der Negativkontrolle mit Zellkulturmedium lag die Aktivität der Laktatdehydrogenase am dritten Tag bei 71 U/l. Nach drei weiteren Tagen verdoppelte sie sich auf 148 U/l. An Tag 3 lagen die Werte für alle Substanzen in allen Konzentrationen (C_{max} bis C_{10x}) mit 36 bis 48 U/l unterhalb derer der Negativkontrolle. Das gleiche galt für Tag 6, wo sich die Werte im Vergleich zu Tag 3 verdoppelten, mit 80 bis 123 U/l jedoch deutlich unterhalb der Negativkontrolle blieben (s. Anhang Tabelle 24 und Tabelle 25).

Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) im Plasma

Die LDH-Aktivität im Überstand der mit gepoolten Spenderplasma inkubierten Zellen lag an Tag 3 bei 165 U/l, damit doppelt so hoch wie im Zellkulturmedium (71 U/l). Die LDH-Werte der Versuche mit den Testsubstanzen an Tag 3 waren mit 112 bis 221 U/l sogar bis viermal so hoch wie zum gleichen Zeitpunkt im Medium. Im Vergleich zur Negativkontrolle waren die LDH-Aktivitäten für alle Substanzen und Konzentrationen signifikant vermindert (112 bis 138 U/l). Einzige Ausnahme bildete Thiopental, wo die LDH-Aktivität in den Konzentrationen C_{max} bis C_{10x} mit 190 bis 221 U/l signifikant gesteigert war. An Tag 6, wo die Zellen des Plasmaversuchs bereits wieder im Medium kultiviert wurden, glich sich auch die LDH-Aktivität der Plasma-Negativkontrolle an die Medium-Negativkontrolle an (168 vs. 148 U/l). Die LDH-Aktivitäten in den Versuchen mit den Testsubstanzen waren wie an Tag 3 im Vergleich zur Negativkontrolle

Ergebnisse

mit 80 bis 132 U/l verringert, jedoch nur für S-Ketamin in C_{\max} und C_{5x} signifikant. Die LDH-Aktivität in den Versuchen mit Thiopental war wie an Tag 3 im Vergleich zu den anderen Hypnotika und Sedativa deutlich erhöht, jedoch nun ebenfalls verringert im Vergleich zur Negativkontrolle. (s. Anhang Tabelle 26 und Tabelle 27)

4.1.3 Syntheseleistung

Mikroalbumin im Medium

Das im Überstand bestimmte Mikroalbumin lag bei der Medium-Negativkontrolle durchschnittlich bei 7 mg/l. Im Vergleich dazu zeigte sich bei den allen Testsubstanzen mit Ausnahme von Thiopental eine signifikante Erhöhung (s. Abbildung 20).

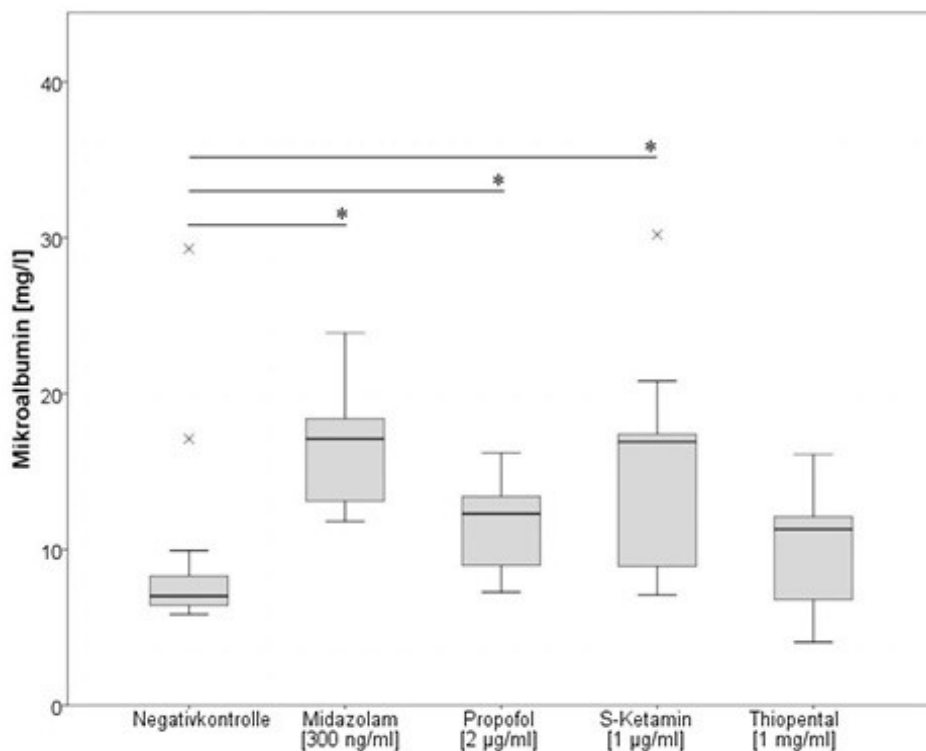


ABBILDUNG 20 Mikroalbuminkonzentrationen nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit klinisch relevanten Konzentrationen (C_{\max}) der Hypnotika und Sedativa. Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Mit steigender Konzentration (C_{5x} - C_{10x}) nahm die Mikroalbuminkonzentration aller Testsubstanzen im Vergleich zu den Werten der einfachen Konzentration (C_{\max}) um bis zu 50% ab und befand sich damit im Bereich der Negativkontrolle. (s. Anhang Tabelle 28)

Mikroalbumin im Plasma

Die Mikroalbuminkonzentration der Plasma-Negativkontrolle war mit 14 mg/l doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle des Mediums (7 mg/dl). Im Plasma zeigten sich in den klinisch relevanten Konzentrationen (C_{\max}) höhere durchschnittliche Mikroalbuminkonzentrationen (12

mg/l bis 27 mg/l) im Vergleich zu den Versuchen in Medium, jedoch keine signifikante Abweichung von der Negativkontrolle. (s. Anhang Tabelle 29)

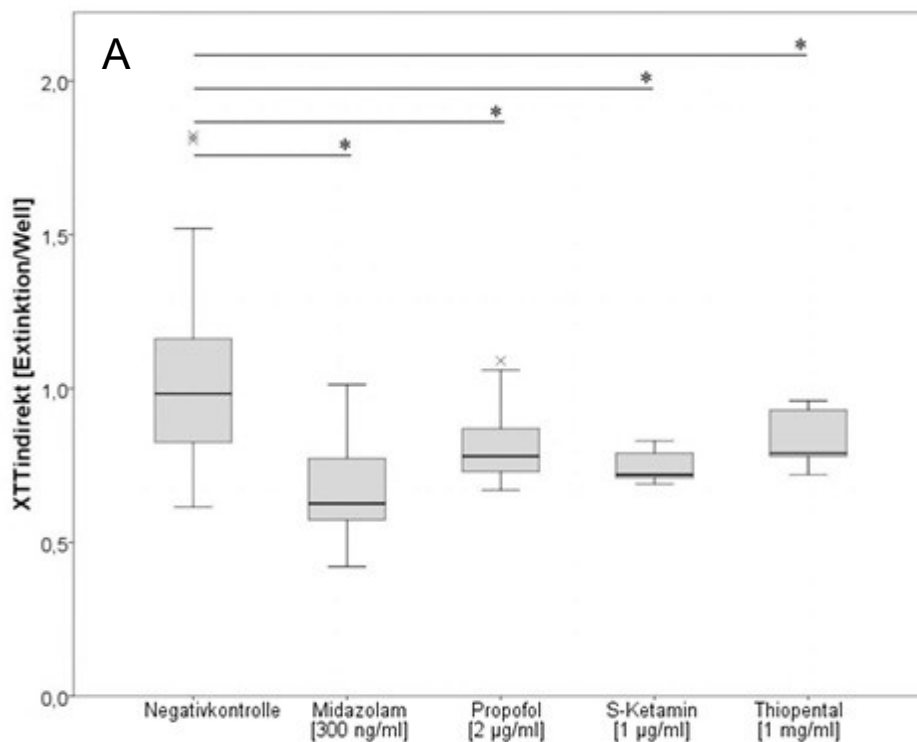
4.1.4 Aktivität von Enzymsystemen

Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (XTT-Test)

Indirekter XTT-Test im Medium

Die Extinktion im Überstand (indirekter XTT-Test) der Negativkontrolle lag bei 1,0. Hierzu war die Extinktion bei allen Testsubstanzen in der klinisch relevanten Konzentration (C_{\max}) signifikant herabgesetzt. (s. Abbildung 21A)

Mit steigender Konzentration der Testsubstanzen nahm die Extinktion im indirekten XTT-Test weiter ab – jedoch nicht signifikant zu C_{\max} . Bei Thiopental lagen die Werte in der höchsten Konzentration (C_{10x}) etwa 10% unter denen der Ausgangskonzentration (C_{\max}). (s. Abbildung 21B)



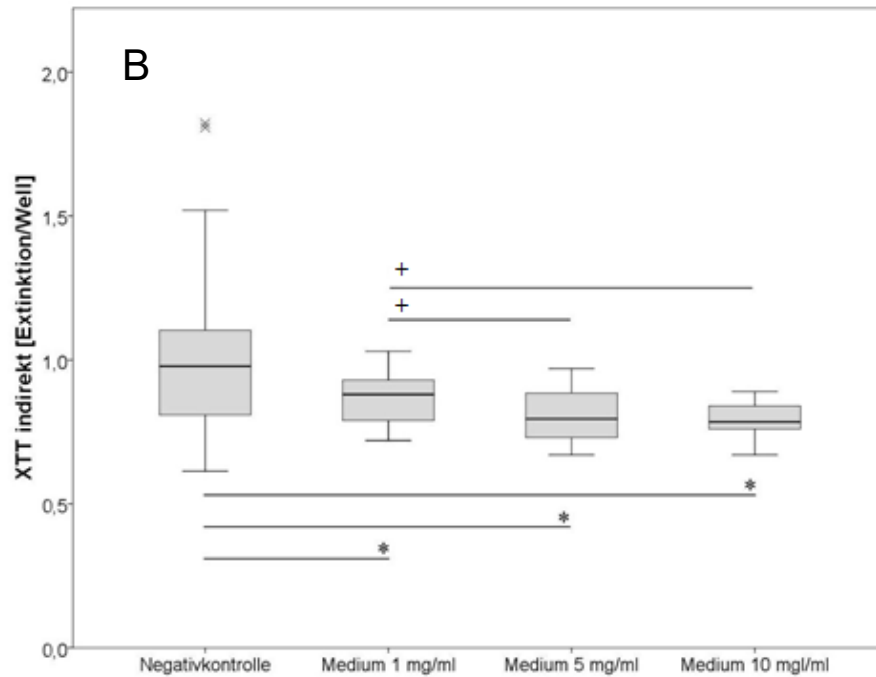


ABBILDUNG 21 Indirekter XTT-Test (Extinktion) nach 6-tägiger Inkubation im Medium. A | klinisch relevante Konzentrationen (C_{max}) der Hypnotika und Sedativa.

B | aufsteigende Konzentration von **Thiopental** (C_{max} - C_{10x}).

Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer, * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle und + $p < 0,05$ gegenüber C_{max} dargestellt.

Indirekter XTT-Test im Plasma

Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen im Überstand bei in Plasma kultivierter Zellen lag wie im Medium bei 1 (Negativkontrolle). Im Vergleich hierzu war die Extinktion bei C_{\max} wie im Medium für alle Testsubstanzen signifikant reduziert (0,7 bis 0,9). Eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit war jedoch bei keiner Substanz zu verzeichnen. (s. Anhang Tabelle 32)

Direkter XTT-Test im Medium

Die Extinktion im Versuch mit den adhärenenten Zellen (direkter XTT-Test) im Medium war in der Negativkontrolle 1,5. Dem gegenüber waren die Werte von Midazolam und S-Ketamin in den klinisch relevanten Konzentrationen (C_{\max}) signifikant gemindert. Propofol und Thiopental präsentierten keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle. (s. Abbildung 22A)

Mit zunehmenden Konzentration stiegen die Extinktionen bei allen Testsubstanzen signifikant an. Es näherten sich Midazolam und S-Ketamin der Negativkontrolle an und waren nicht mehr signifikant davon verschieden. Propofol und Thiopental überstiegen die Negativkontrolle signifikant. Am stärksten ausgeprägt war hierbei Propofol, dessen Werte in der höchsten Konzentration (C_{10x}) das 1,2-fache der Ausgangskonzentration (C_{\max}) betrugen. (s. Abbildung 22B)

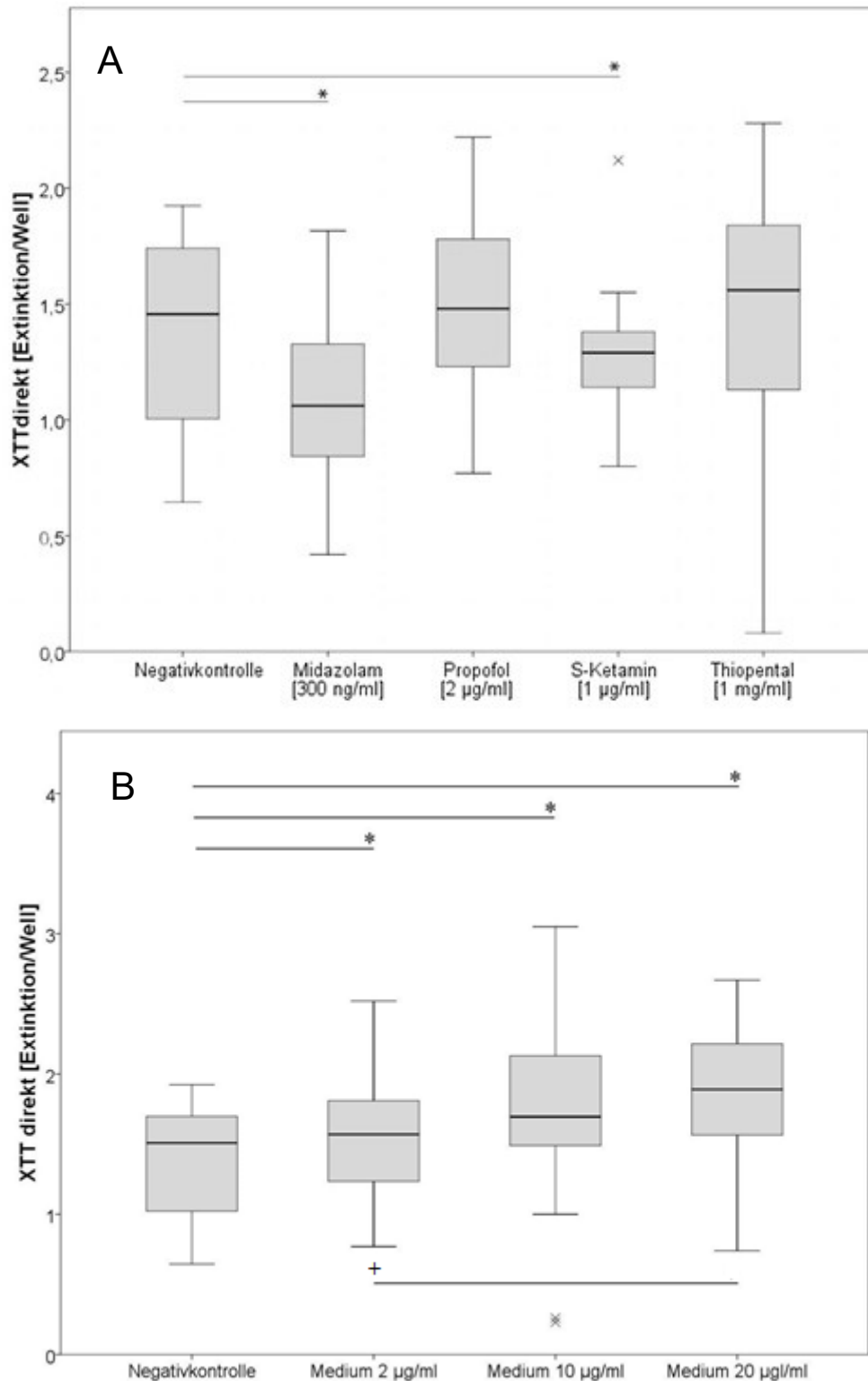


ABBILDUNG 22 Direkter XTT-Test (Extinktion) nach 6-tägiger Inkubation im Medium.

A | klinisch relevante Konzentrationen (C_{max}) der Hypnotika und Sedativa.

B | aufsteigende Konzentration von **Propofol** (C_{max} - C_{10x}).

Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer, * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle und + $p < 0,05$ gegenüber C_{max} dargestellt.

Direkter XTT-Test im Plasma

Die Extinktion im Versuch der Plasma-Negativkontrolle beträgt etwas mehr als die Hälfte der Medium-Negativkontrolle (0,8 vs. 1,5). In klinisch relevanter Konzentration C_{\max} war die Extinktion für alle Testsubstanzen gegenüber der Negativkontrolle gesteigert (0,9 bis 1,2), signifikant jedoch nur bei Propofol und Thiopental. Die Werte für Thiopental und Propofol waren ebenso wie im Medium vergleichsweise höher als die der anderen Testsubstanzen. Eine konzentrationsabhängige Extinktionszunahme ließ sich für alle Substanzen nachweisen, signifikant zu C_{\max} für Propofol und Thiopental. Hier war bei C_{10x} die Extinktion fast doppelt so hoch wie in der Negativkontrolle (1,5 bis 1,7 im Vergleich zu 0,8). (s. Anhang Tabelle 33)

Aktivität von CYP1A2 (Ethoxyresorufin-Test) im Medium

In der Negativkontrolle war eine Resorufin-Konzentration von 3,1 pmol/l zu verzeichnen. Eine signifikante Reduktion der Resorufin-Konzentration in der klinisch relevanten Konzentration (C_{\max}) lag lediglich bei S-Ketamin vor (1,4 pmol/l). Thiopental und Propofol hingegen präsentierten eine signifikant gesteigerte Aktivität gegenüber der Negativkontrolle (5,7 und 4,5 pmol/l). Die Resorufinkonzentration von Midazolam war mit 4,2 pmol/l zur Negativkontrolle gesteigert, jedoch nicht signifikant. (s. Abbildung 23)

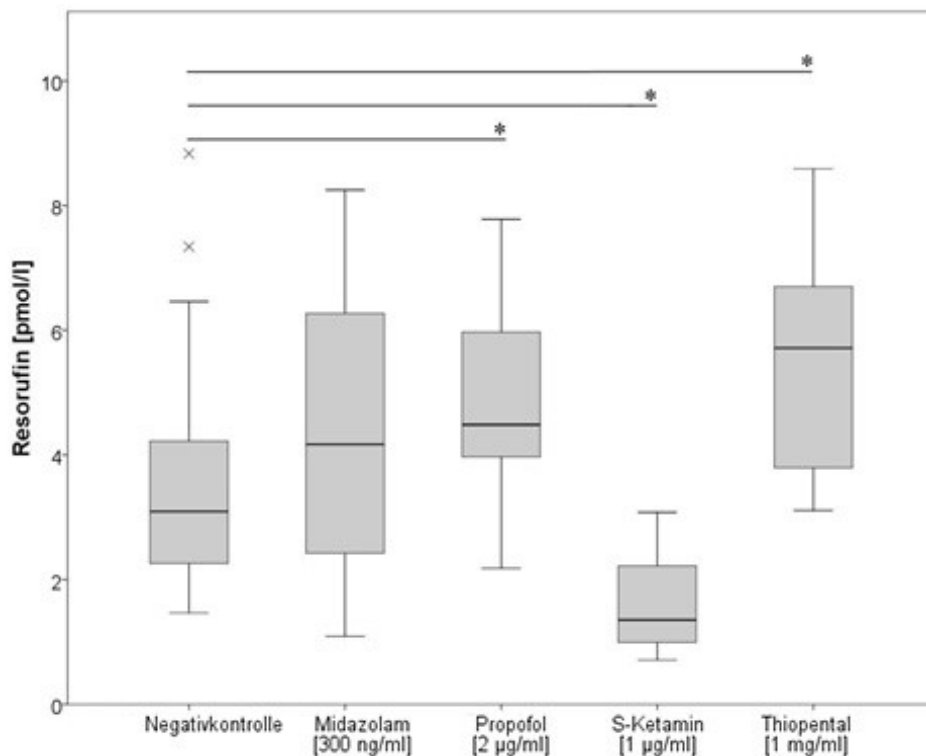


ABBILDUNG 23 Resorufinkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit klinisch relevanten Konzentrationen (C_{\max}). Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Ergebnisse

Bei Konzentrationssteigerung der Testsubstanz zeigte sich - mit Ausnahme von S-Ketamin - eine Abnahme der CYP1A2-Aktivität im Vergleich zur Ausgangskonzentration. Signifikant war dies bei Vergleich von C_{10x} zu C_{max} für alle Substanzen mit Ausnahme von S-Ketamin. Somit lagen die Werte in der höchsten Konzentration C_{10x} mit 2,2 – 3,1 unterhalb der Negativkontrolle. (s. Anhang Tabelle 34)

Aktivität von CYP1A2 (Ethoxyresorufin-Test) im Plasma

Die Resorufin-Konzentration lag bei im Plasma kultivierten Zellen wie im Medium bei 3 pmol/l. Nach Zugabe von Midazolam, Propofol und S-Ketamin in den klinisch relevanten Konzentrationen C_{max} war die Enzymaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant vermindert (1,4 bis 1,7 pmol/l). Nur Thiopental zeigte mit durchschnittlichen Werten von 3,3 pmol/l keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle, es war wie im Medium mit höherer Aktivität von CYP1A2 vergesellschaftet. Im Vergleich zum Medium, wo die Aktivität von CYP1A2 mit zunehmender Konzentration der Testsubstanzen abfiel, stieg sie im Plasma an oder blieb kaum verändert. Midazolam, das im Mediumversuch zu einer starken Abnahme der Enzymaktivität geführt hatte, wich in der höchsten Konzentration mit 1,6 pmol/l nicht wesentlich von der Ausgangskonzentration (1,7 pmol/l) ab. (s. Anhang Tabelle 35)

4.2 Opioide

4.2.1 pH-Wert

Für die Stammlösungen der Opioide wurden allesamt pH-Werte im sauren Bereich gemessen (Fentanyl 4,2 - Remifentanyl 3,2 - Sufentanyl 3,5). In den untersuchten Konzentrationen C_{max} - C_{10x} waren jedoch mit pH-Werten von 7,6 - 7,7 keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle im Medium (7,8) und Plasma (7,7) zu verzeichnen. (s. Anhang Tabelle 18 und Tabelle 19)

4.2.2 Vitalität und Proliferation

Zellzahl im Medium

Im Medium zeigten die Zellzahlen in der klinisch relevanten Konzentration C_{max} ausschließlich bei Sufentanyl eine signifikante Erniedrigung (um 30%) zur Negativkontrolle (683×10^3 Zellen pro ml). (s. Abbildung 24)

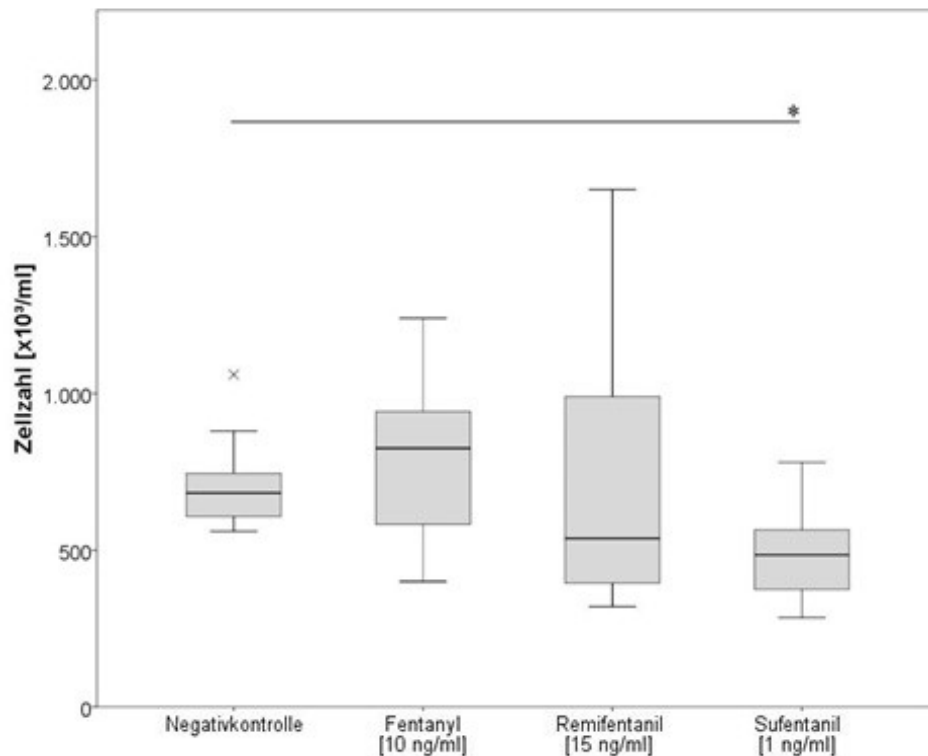


ABBILDUNG 24 Zellzahlen nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit klinisch relevanten Konzentrationen (C_{\max}) Fentanyl, Remifentanyl und Sufentanyl. Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Für keines der getesteten Opiode war mit der 5- oder 10-fachen Konzentrationssteigerung eine signifikante Veränderung der Zellzahl zur klinisch relevanten Konzentration (C_{\max}) zu sehen. Sufentanyl zeigte wie in der Ursprungskonzentration signifikant geminderte Zellzahlen und Fentanyl bei C_{10x} eine zur Negativkontrolle signifikant gesteigerte Zellzahl. (s. Anhang Tabelle 20)

Zellzahl im Plasma

In der Plasma-Negativkontrolle war die Zellzahl mit 650×10^3 im Vergleich zum Medium mit 683×10^3 Zellen pro ml geringer. Nach Zugabe der Testsubstanzen in den klinisch relevanten Konzentrationen C_{\max} nahm die Zellzahl bei Sufentanyl und Remifentanyl signifikant ab (330×10^3 und 480×10^3 pro ml). Eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit über der Konzentrationen C_{5x} - C_{10x} war jedoch nur für Sufentanyl zu beobachten (bei C_{10x} 295×10^3 pro ml). Remifentanyl und Fentanyl unterschieden sich in steigender Konzentration nicht signifikant von der Negativkontrolle. (s. Anhang Tabelle 22)

Vitalität im Medium

Eine signifikante Vitalitätsreduktion im Vergleich zur Negativkontrolle (94%) konnte bei allen getesteten Opioidanalgetika in der klinisch relevanten Konzentration (C_{\max}) nachgewiesen werden. Am stärksten ausgeprägt war dies bei Sufentanil (68%), aber auch Remifentanil (77%) und Fentanyl (85%) zeigten eine Vitalitätsminderung. (s. Abbildung 25)

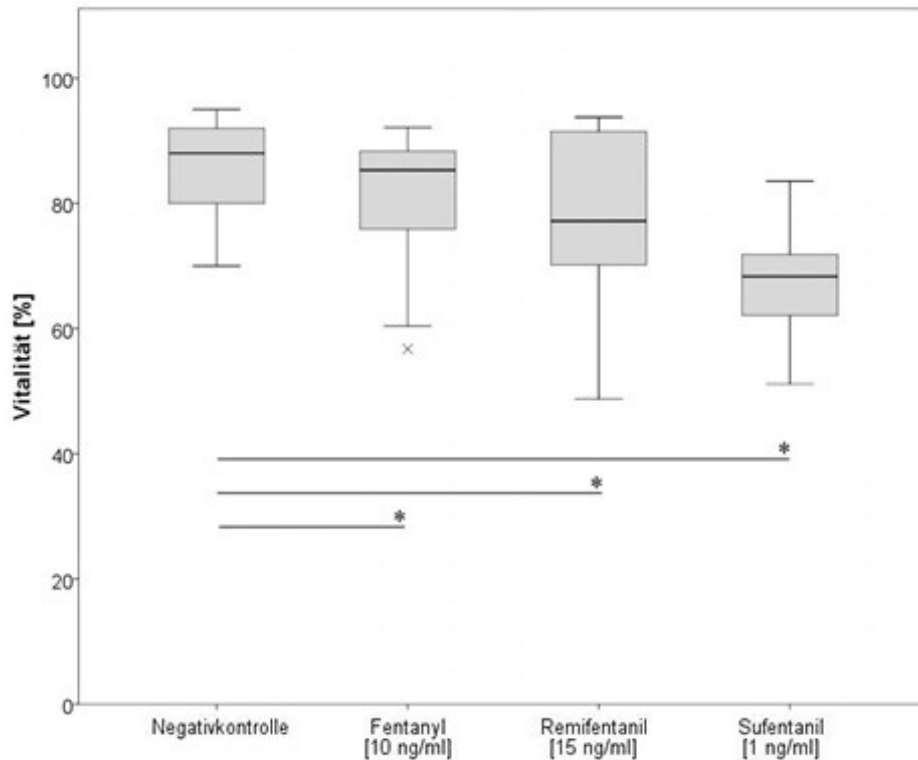


ABBILDUNG 25 Vitalität nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit klinisch relevanten Konzentrationen (C_{\max}) von Fentanyl, Remifentanil und Sufentanil. Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

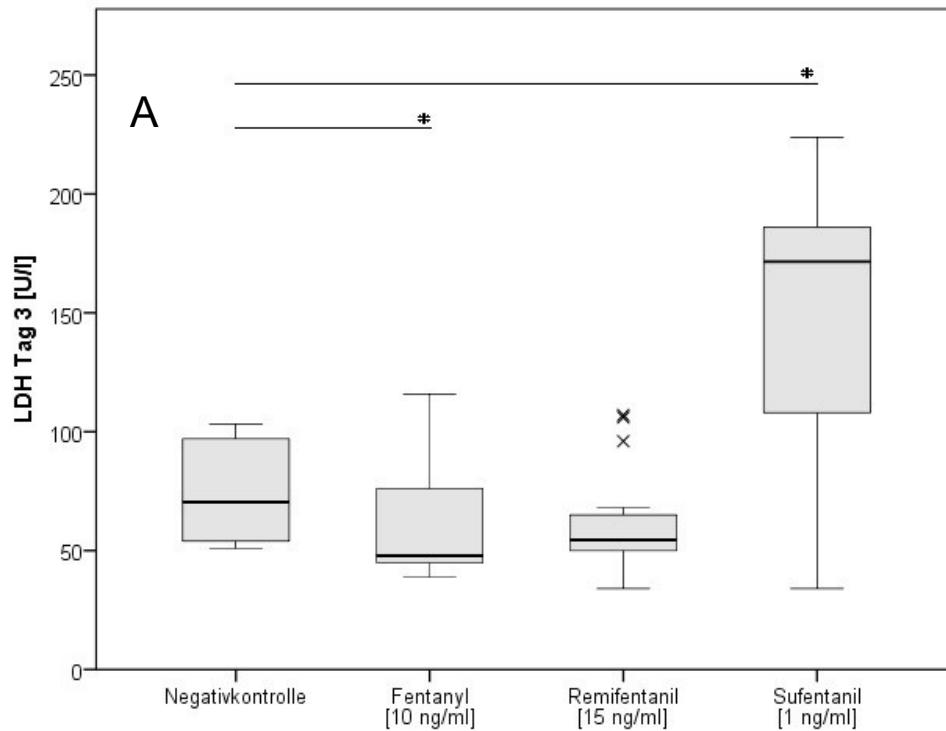
In der 5-fachen und 10-fachen Konzentration der Testsubstanzen war die Vitalität nicht signifikant von der Vitalität bei C_{\max} verschieden. Einzig Fentanyl präsentierte eine minimale Steigerung der Vitalität (87% statt 85%). (s. Anhang Tabelle 21)

Vitalität im Plasma

Die Vitalität der Zellkultur bei Anzucht im Plasma (90%) war geringer als im Medium (94%). Alle Testsubstanzen führten in der klinisch relevanten Konzentration C_{\max} zu einer Abnahme der Vitalität im Vergleich zur Ausgangskonzentration. Wie auch im Medium war dies bei Sufentanil mit einer Vitalität von nur 69% am stärksten ausgeprägt. Aber auch für Remifentanil (80%) und Fentanyl (82%) wurden signifikante Vitalitätsminderungen verzeichnet. Wie schon im Medium konnte für keines der getesteten Opioide mit Steigerung der Konzentration eine weitere signifikante Abnahme der Vitalität bewirkt werden. (s. Anhang Tabelle 23)

Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) im Medium

Im Medium präsentierte sich an Tag 3 lediglich Sufentanil mit signifikant erhöhten (172 U/l) LDH-Werten in der Konzentration C_{\max} im Vergleich zur Negativkontrolle (71 U/l). Remifentanyl und Fentanyl zeigten Werte im Bereich bzw. unterhalb der Negativkontrolle. (s. Abbildung 26A). An Tag 6 war eine signifikant vermehrte LDH-Freisetzung bei C_{\max} von Sufentanil und Remifentanyl gegenüber der Negativkontrolle zu verzeichnen. Fentanyl war wie schon an Tag 3 nicht signifikant von der Negativkontrolle verschieden. (s. Abbildung 26B)



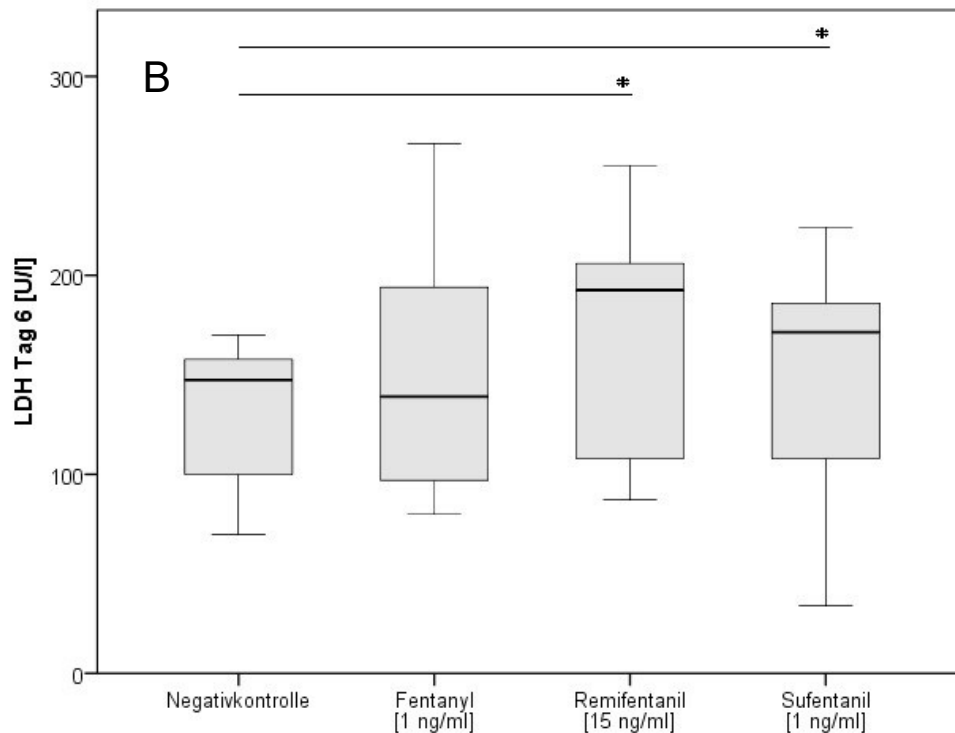


ABBILDUNG 26 LDH-Freisetzung nach Zugabe klinisch relevante Konzentrationen (C_{max}) der Opiode

A | nach 3-tägiger Inkubation.

B | nach 6-tägiger Inkubation.

Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Mit Konzentrationssteigerung (C_{5x} - C_{10x}) nahm die LDH-Freisetzung an Tag 3 und Tag 6 ab, jedoch nicht signifikant. (s. Anhang Tabelle 24 und Tabelle 25)

Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) im Plasma

Die LDH-Aktivität im Überstand der mit gepoolten Spenderplasma inkubierten Zellen lag an Tag 3 bei 165 U/l, damit doppelt so hoch wie im Zellkulturmedium (71 U/l). Die LDH-Werte der Versuche mit den Testsubstanzen an Tag 3 waren mit 165 bis 242 U/l sogar bis viermal so hoch wie zum gleichen Zeitpunkt im Medium. Am höchsten lagen die Werte – wie schon im Medium - für Sufentanyl in der klinisch relevanten Konzentration (C_{max}) mit 242 U/l. Ebenso signifikant oberhalb der Negativkontrolle lag Fentanyl mit 189 U/l im Plasma. Remifentanyl unterschied sich nicht signifikant. Für alle Opiode ließ sich keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit nachweisen. Nach 6 Tagen unterschieden sich die Werte aller Testsubstanzen nicht signifikant von der Negativkontrolle. Eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit war nur für Remifentanyl vorhanden. Hier nahmen die Werte mit zunehmender Konzentration signifikant ab. (s. Tabelle 26 und Tabelle 27)

4.2.3 Syntheseleistung

Mikroalbuminkonzentration im Medium

Die Mikroalbuminkonzentration der im Medium kultivierten Zellen ohne Testsubstanz lag bei 7 mg/l. In der klinisch relevanten Konzentration (C_{\max}) unterschied sich lediglich Fentanyl signifikant mit einer mehr als doppelt so hohen Mikroalbuminkonzentration von 15 mg/l. In den Konzentrationen (C_{5x} - C_{10x}) waren auch die Mikroalbuminwerte für Sufentanil und Remifentanil signifikant vermindert. (s. Tabelle 10) Mit zunehmender Konzentration ließ sich für alle Opiode eine Abnahme der Mikroalbuminkonzentration im Vergleich zur Ausgangskonzentration feststellen, für Fentanyl und Remifentanil war dies signifikant.

Testsubstanz	Mikroalbumin [mg/l]		
	C_{\max}	C_{5x}	C_{10x}
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	15,00 * 13,00 / 15,80	13,20 * 7,79 / 15,20	10,30 * 7,92 / 12,00
Remifentanil (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	6,63 5,26 / 7,52	5,07 * 3,00 / 6,95	4,69 * 3,05 / 5,48
Sufentanil (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	6,52 5,20 / 11,70	5,52 * 4,71 / 6,18	4,47 * 4,02 / 6,85
Negativkontrolle	7,01 6,47 / 8,20		

TABELLE 10 Mikroalbuminkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit klinisch relevanten Konzentrationen (C_{\max}) von Fentanyl, Remifentanil und Sufentanil. Es sind Median, 25/75 Perzentil und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Mikroalbuminkonzentration im Plasma

Die Mikroalbuminkonzentration der Plasmanegativkontrolle lag mit 14 mg/l doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle des Mediums (7 mg/l). Nach Zugabe von Sufentanil in C_{\max} sank sie mit 6 mg/l auf weniger als 50% signifikant zur Plasmanegativkontrolle ab. Nach Zugabe von Fentanyl in C_{\max} stieg sie signifikant auf das 1,3-fache der Negativkontrolle an (18 mg/l). Einzig Remifentanil blieb in der klinisch relevanten Konzentration auf dem Level der Negativkontrolle. (s. Anhang Tabelle 29) Für keines der Opiode zeigte sich über C_{\max} bis C_{10x} eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit.

4.2.4 Aktivität von Enzymsystemen

Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (XTT-Test)

Indirekter XTT-Test im Medium

Im Überstand des Mediums wurden sowohl für Remifentanyl (0,9) als auch für Sufentanyl (0,9) eine signifikant verminderte Extinktion im Vergleich zur Negativkontrolle (1,0) gemessen. Fentanyl zeigte sich mit 1,0 im Bereich der Negativkontrolle. (s. Abbildung 27)

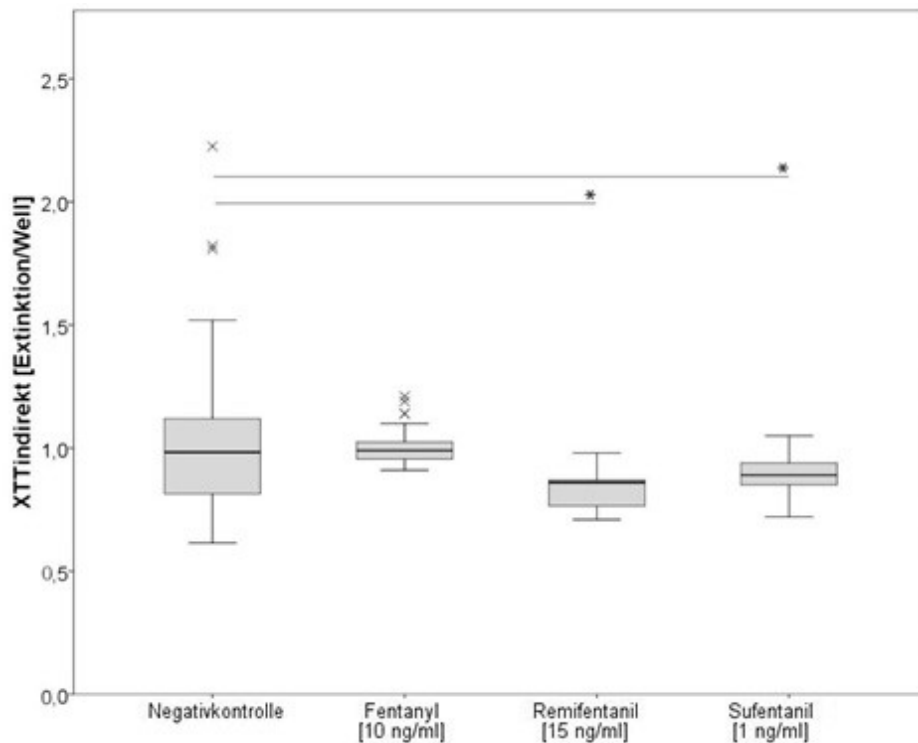


ABBILDUNG 27 Indirekter XTT-Test (Extinktion) nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit klinisch relevanten Konzentrationen (C_{max}) von Fentanyl, Remifentanyl und Sufentanyl. Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Mit steigender Medikamentenkonzentration zeigte sich für alle Substanzen eine Abnahme der Extinktion im XTT-Test (s. Anhang Tabelle 30). Am stärksten war dies bei Sufentanyl zu beobachten, dessen Extinktionswerte in 10-facher Konzentration auf beinahe 80% des Werts der Ausgangskonzentration (C_{max}) abfielen. (s. Abbildung 28)

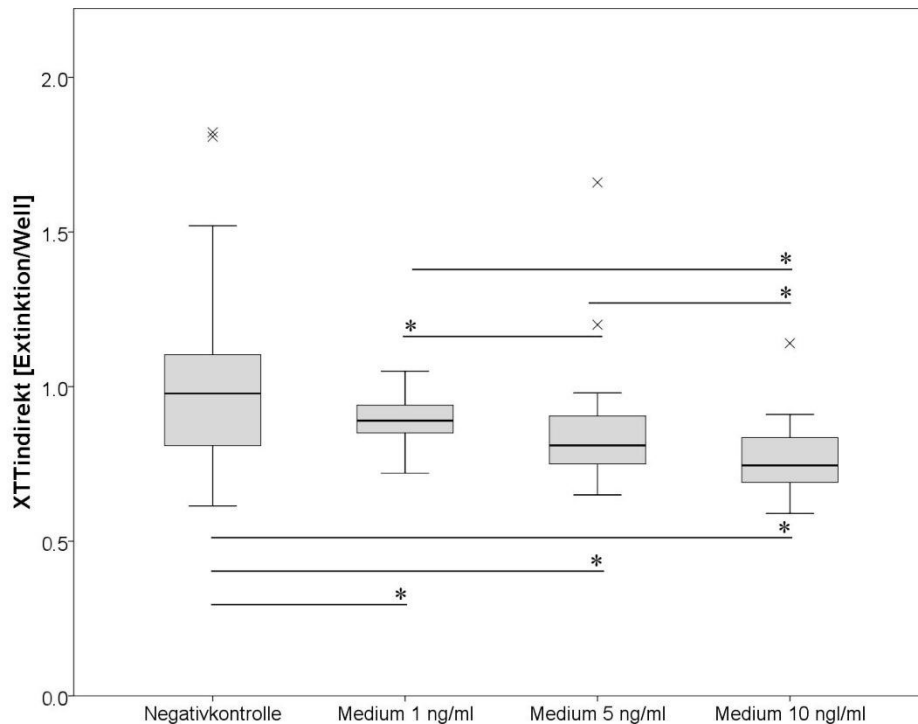


ABBILDUNG 28 Indirekter XTT-Test (Extinktion) nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit aufsteigender Konzentration von **Sufentanil** (C_{max} - C_{10x}). Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ zur Negativkontrolle bzw. zueinander dargestellt.

Indirekter XTT-Test im Plasma

Sowohl für die Negativkontrolle als auch die Testsubstanzen unterschieden sich zwischen Plasma und Medium kaum. Im Überstand des Plasmas wurde eine Extinktion von 0,98 gemessen werden (im Medium 1,0). Nach Zugabe von Remifentanyl und Sufentanil waren wie im Medium sowohl in C_{max} als auch in C_{5x} - C_{10x} signifikant niedrigere Werte als in der Negativkontrolle zu verzeichnen. Die zunehmende Konzentration führte im Gegensatz zum Medium nicht zu einer weiteren Abnahme der Extinktion. Fentanyl war (mit Ausnahme der 10-fachen Konzentration) in allen Konzentrationen nicht signifikant unterschiedlich zur Negativkontrolle. (s. Anhang Tabelle 32)

Direkter XTT-Test im Medium

Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen der adhären Zellen, die mit der klinisch relevanten Konzentration (C_{max}) der Opiode inkubiert wurden, wies im Medium keine signifikante Abweichung zum Wert der Negativkontrolle (1,5) auf. (s. Anhang Tabelle 31)

In den Konzentrationen (C_{5x} - C_{10x}) stiegen die Extinktionswerte für alle Testsubstanzen im Vergleich zur Ausgangskonzentration (C_{max}) leicht (um das bis zu 1,2-fache) an. (s. Anhang Tabelle 31)

Direkter XTT-Test im Plasma

Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen der adhären Zellen, die im Plasma kultiviert wurden war fast nur halb so hoch wie die der im Medium kultivierten (0,79 bzw. 1,51). Im Gegensatz zum Medium wo es mit Ausnahme von Fentanyl in der 10-fachen Konzentration keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle gegeben hatte, wies im Plasma Fentanyl in allen Konzentrationen eine höhere Extinktion als die Negativkontrolle auf ($> 1,0$). Die Zunahme der Extinktion mit steigender Konzentration, die schon im Medium beobachtet wurde konnte auch im Plasma verzeichnet werden. (s. Anhang Tabelle 33)

Aktivität von CYP1A2 (Ethoxyresorufin-Test) im Medium

Ein signifikanter Unterschied in der Resorufinkonzentration zur Negativkontrolle (3,1 pmol/l) konnte bei den Versuchen im Medium nur für Remifentanyl beobachtet werden, bei dem sich eine signifikant geminderte CYP1A2 Aktivität zeigte (2,7 pmol). (s. Anhang Tabelle 34)

Mit steigender Konzentration war eine Abnahme der CYP1A2-Aktivität für alle getesteten Medikamente zu beobachten. (s. Anhang Tabelle 34) Am stärksten ausgeprägt war dies bei Remifentanyl, wo die Resorufinkonzentration in der höchsten (C_{10x}) Konzentration um 20% vermindert war. (s. Abbildung 29)

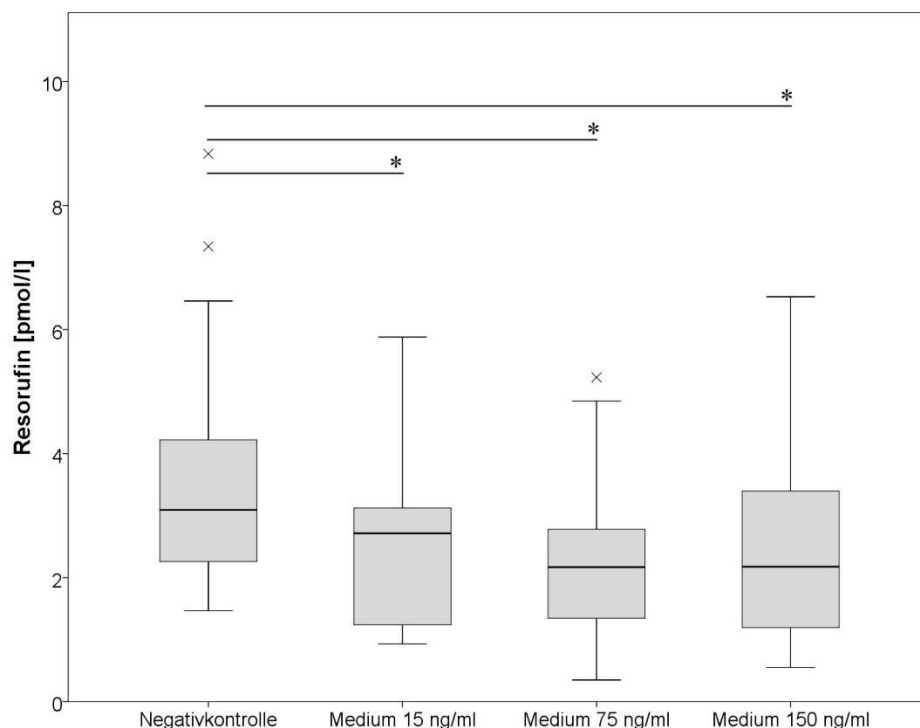


ABBILDUNG 29 Resorufinkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Medium mit aufsteigender Konzentration von **Remifentanyl** (C_{max} - C_{10x}). Es sind Median, 25/75 Perzentil, x als Ausreißer und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt.

Aktivität von CYP1A2 (Ethoxyresorufin-Test) im Plasma

Die Aktivität von CYP1A2 der im Plasma kultivierten Zellen unterschied sich mit 2,98 pmol/l Resorufin kaum von der im Medium kultivierter (3,09 pmol/l). Die Aktivitätsminderung nach Zugabe der Testsubstanzen war im Plasma jedoch ausgeprägter zu sehen als im Medium. So betrug die CYP1A2-Aktivität in der klinisch relevanten Konzentration von Fentanyl nur ein Drittel der Negativkontrolle (1,02), die von Remifentanil etwas mehr als die Hälfte (1,64) und auch bei Sufentanil war sie signifikant gemindert (2,21). Im Gegensatz zum Medium jedoch, wo mit steigender Konzentration die Enzymaktivität weiter gemindert wurde, kam es in den Plasmaversuchen zu einer leichten Aktivitätszunahme gegenüber der Ausgangskontrolle bei allen drei Testsubstanzen. (s. Anhang Tabelle 35)

4.3 Zusammenfassung

4.3.1 Midazolam

Bei Midazolam war auffällig, dass die Synthese von Mikroalbumin in allen Konzentrationen etwa um das 2-fache zur Negativkontrolle gesteigert war. Die Zellzahl war nicht vermindert, die Werte der Laktatdehydrogenase nicht erhöht und die Vitalität nur geringfügig beeinträchtigt. Auch die Aktivität von CYP1A2 war nicht von der Negativkontrolle signifikant verschieden. Einzig die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen war sowohl in Überstand als auch in den adhären Zellen signifikant gemindert und nahm mit Konzentrationssteigerung noch weiter ab.

			Konzentration			
			Negativ- kontrolle	C _{max} 300 ng/ml	C _{5x} 1500 ng/ml	C _{10x} 3000 ng/ml
pH	M		7,75	7,71	7,71	7,82
	P		7,66	7,63	7,88 *	7,74
Zellzahl [x10 ³ /ml]	M		683	775	1000 *	905 *
	P		650	590	595	750
Vitalität [%]	M		94,12	91,55*	89,89 *	92,80
	P		90,91	90,07	89,50	88,23
LDH [U/l]	Tag 3	M	70,50	43,50 *	39,00 *	36,00 *
		P	165,00	125,50 *	128,50 *	124,50 *
	Tag 6	M	147,50	122,50	94,00 *	92,00 *
		P	168,00	98,00	97,00	92,00
Mikroalbumin [mg/l]	M		7,01	17,10 *	14,20 *	13,30
	P		13,65	17,50	19,20 *	16,55
XTT [Extink- tion/Well]	indirekt	M	0,98	0,73 *	0,72 *	0,68 *
		P	1,01	0,70 *	0,69 *	0,70 *
	direkt	M	1,51	1,05 *	1,29	1,48
		P	0,79	1,01	1,23 *	1,22 *
Resorufin [pmol/l]	M		3,09	4,17	3,18	2,71
	P		2,98	1,66 *	1,68 *	1,61 *

TABELLE 11 Übersicht des Hepatotoxizitätstest für Midazolam in den Konzentrationen C_{max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * p<0,05 gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.

4.3.2 Propofol

Eine reduzierte Vitalität und verminderte Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen im Überstand konnte für Propofol in allen Konzentrationen verzeichnet werden, wohingegen die Zellzahl nie vermindert, sondern in der höchsten Konzentration sogar gesteigert war. Im Medium lag eine Aktivitätssteigerung für CYP1A2 vor, im Plasma war CYP1A2 vermindert aktiv. Mikroalbumin wurde bei in Propofol inkubierten Zellen vermehrt produziert oder zeigte keinen Unterschied. Die Werte der Laktatdehydrogenase waren stets unterhalb der Negativkontrolle. Der pH-Wert wich nicht signifikant von reinem Medium oder Plasma ab.

			Konzentration			
			Negativ- kontrolle	C _{max} 2 µg/ml	C _{5x} 10 µg/ml	C _{10x} 20 µg/ml
pH	M		7,75	7,69	7,73	7,69
	P		7,66	7,64	7,68	7,68
Zellzahl [x10 ³ /ml]	M		683	775	750	835 *
	P		650	590	595	750
Vitalität [%]	M		94,12	86,02 *	84,87 *	87,07 *
	P		90,91	77,07 *	76,61 *	80,93 *
LDH [U/l]	Tag 3	M	70,50	44,00 *	43,50 *	40,00 *
		P	165,00	129,00 *	135,00 *	138,00
	Tag 6	M	147,50	103,00 *	90,00 *	80,00 *
		P	168,00	89,00	97,00	97,00
Mikroalbumin [mg/l]	M		7,01	12,30 *	7,24	6,25
	P		13,65	11,50	14,80	12,90
XTT [Extink- tion/Well]	indirekt	M	0,98	0,73 *	0,72 *	0,68 *
		P	1,01	0,70 *	0,69 *	0,70 *
	direkt	M	1,51	1,52	1,69 *	1,89 *
		P	0,79	1,10 *	1,51 *	1,49 *
Resorufin [pmol/l]	M		3,09	4,49 *	4,41 *	3,06
	P		2,98	1,73 *	2,44 *	2,36 *

TABELLE 12 Übersicht des Hepatotoxizitätstest für Propofol in den Konzentrationen C_{max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * p<0,05 gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.

4.3.3 S-Ketamin

Nach Zugabe von S-Ketamin wurde eine verminderte Vitalität, Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen im Überstand sowie des CYP1A2 Systems bestimmt. Die Synthese von Mikroalbumin im Medium war gesteigert. Im Bereich der Negativkontrolle befanden sich Zellzahl, Werte der Laktatdehydrogenase und des pH-Werts im Medium.

			Konzentration			
			Negativ- kontrolle	C _{max} 1 µg/ml	C _{5x} 5 µg/ml	C _{10x} 10 µg/ml
pH		M	7,75	7,70	7,79	7,81
		P	7,66	7,64	7,74 *	7,73 *
Zellzahl [x10 ³ /ml]		M	683	712	720	750
		P	650	690	595	565
Vitalität [%]		M	94,12	90,14 *	88,12*	88,10 *
		P	90,91	83,55 *	83,58 *	83,73 *
LDH [U/l]	Tag 3	M	70,50	37,00 *	38,00 *	37,00 *
		P	165,00	124,00 *	121,00 *	112,00 *
	Tag 6	M	147,50	97,00 *	98,00 *	91,00
		P	168,00	80,00 *	83,00 *	96,00
Mikroalbumin [mg/l]		M	7,01	16,90 *	9,31 *	8,43
		P	13,65	22,20	27,20	18,00
XTT [Extink- tion/Well]	indirekt	M	0,98	0,78 *	0,79 *	0,73 *
		P	1,01	0,76 *	0,80 *	0,78 *
	direkt	M	1,51	1,12 *	1,29	1,38
		P	0,79	1,01	1,19	1,21
Resorufin [pmol/l]		M	3,09	1,35 *	1,74 *	1,74 *
		P	2,98	1,63 *	1,67 *	1,87 *

TABELLE 13 Übersicht des Hepatotoxizitätstest für S-Ketamin in den Konzentrationen C_{max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * p<0,05 gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.

4.3.4 Thiopental

Für Thiopental ließ sich eine konzentrationsabhängige Verminderung in Vitalität feststellen. Auch die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen im Überstand war sowohl im Medium als auch im Plasma vermindert, während sie im direkten Zellkontakt gesteigert war. Die CYP1A2-Aktivität war sowohl im Medium als auch im Plasma höher als die Negativkontrolle. Im Bereich der Negativkontrolle befanden sich Zellzahl, Werte der Laktatdehydrogenase sowie der Syntheseleistung von Mikroalbumin. Der pH-Wert war im Vergleich zur Negativkontrolle im Plasma sowie in der 10-fachen Konzentration basischer.

			Konzentration			
			Negativ- kontrolle	C _{max} 1 mg/ml	C _{5x} 5 mg/ml	C _{10x} 10 mg/ml
pH	M		7,75	7,75	7,79	8,01 *
	P		7,66	7,71 *	7,95 *	7,76 *
Zellzahl [x10 ³ /ml]	M		683	770	790	610
	P		650	558	563	550
Vitalität [%]	M		94,12	86,26 *	84,88 *	80,11 *
	P		90,91	81,82 *	69,97 *	67,21 *
LDH [U/l]	Tag 3	M	70,50	47,50	46,00 *	43,50 *
		P	165,00	221,00 *	205,00 *	191,00 *
	Tag 6	M	147,50	122,00	110,00	96,50 *
		P	168,00	129,50	129,00	131,50
Mikroalbumin [mg/l]	M		7,01	11,30	6,99	5,94
	P		13,65	18,00	17,50	10,10
XTT [Extink- tion/Well]	indirekt	M	0,98	0,88 *	0,80 *	0,78 *
		P	1,01	0,78 *	0,79 *	0,82 *
	direkt	M	1,51	1,43	1,87 *	1,76 *
		P	0,79	1,24 *	1,69 *	1,42 *
Resorufin [pmol/l]	M		3,09	5,72 *	4,74 *	4,44 *
	P		2,98	3,27	3,20	3,48 *

TABELLE 14 Übersicht des Hepatotoxizitätstest für Thiopental in den Konzentrationen C_{max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * p<0,05 gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.

4.3.5 Fentanyl

Fentanyl zeigte eine signifikant verminderte Vitalität bei allen Konzentrationen. In der höchsten Konzentration C_{10x} war auch eine signifikant verminderte Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen nachweisbar. Eine signifikant gesteigerte Freisetzung von LDH war nur im Plasma an Tag 3 nachweisbar. Die Aktivität von CYP1A2 war konzentrationsabhängig signifikant vermindert und die Synthese von Mikroalbumin in allen Konzentrationen signifikant gesteigert. Im Bereich der Negativkontrolle bzw. im Normbereich lagen die Werte der Zellzahl und des pH-Werts.

			Konzentration			
			Negativ- kontrolle	C_{max} 10 ng/ml	C_{5x} 50 ng/ml	C_{10x} 100 ng/ml
pH	M		7,75	7,74	7,68	7,68
	P		7,66	7,67	7,65	7,64
Zellzahl [$\times 10^3$ /ml]	M		683	825	745	873 *
	P		650	538	593	635
Vitalität [%]	M		94,12	85,31 *	86,32 *	87,65 *
	P		90,91	82,18 *	82,46 *	82,88 *
LDH [U/l]	Tag 3	M	70,50	48,00 *	46,00 *	42,00 *
		P	165,00	188,50 *	187,00 *	196,00 *
	Tag 6	M	147,50	139,00	148,00	124,50
		P	168,00	143,00	133,50	136,50
Mikroalbumin [mg/l]	M		7,01	15,00 *	13,20 *	10,30 *
	P		13,65	18,30 *	20,10 *	25,20 *
XTT [Extink- tion/Well]	indirekt	M	0,98	0,99	0,92	0,88 *
		P	1,01	0,88	0,91	0,87
	direkt	M	1,51	1,64	1,77	1,82 *
		P	0,79	1,16	1,78 *	1,73 *
Resorufin [pmol/l]	M		3,09	3,07	2,75 *	2,55 *
	P		2,98	1,02 *	1,22 *	1,49 *

TABELLE 15 Übersicht des Hepatotoxizitätstest für Fentanyl in den Konzentrationen C_{max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.

4.3.6 Remifentanyl

Der Minderung der Viabilität der Zellen nach Inkubation mit Remifentanyl stellte sich durch eine signifikante Abnahme der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen, sowie signifikant reduzierte Vitalität dar. Die Zellzahl unterschied sich nicht signifikant von der Negativkontrolle. Die Aktivität von CYP1A2 war signifikant vermindert und zeigte eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit. Die Mikroalbuminsynthese sowie die LDH-Freisetzung war lediglich in C5x und C10x im Medium signifikant vermindert. Der pH-Wert lag für alle Konzentrationen im Bereich der Negativkontrolle.

			Konzentration			
			Negativ- kontrolle	C _{max} 15 ng/ml	C _{5x} 75 ng/ml	C _{10x} 150 ng/ml
pH	M		7,75	7,66	7,62	7,62
	P		7,66	7,58	7,64	7,58
Zellzahl [x10 ³ /ml]	M		683	565	538	548
	P		650	483 *	458	435
Vitalität [%]	M		94,12	77,19 *	76,15 *	76,66 *
	P		90,91	80,29 *	78,61 *	78,60 *
LDH [U/l]	Tag 3	M	70,50	54,50	54,00 *	50,50 *
		P	165,00	180,00	178,50	164,50
	Tag 6	M	147,50	192,50 *	171,00	157,00
		P	168,00	143,00	133,50	136,50
Mikroalbumin [mg/l]	M		7,01	6,63	5,07 *	4,69 *
	P		13,65	9,15	10,30	10,20
XTT [Extink- tion/Well]	indirekt	M	0,98	0,86 *	0,78 *	0,69 *
		P	1,01	0,74 *	0,77 *	0,74 *
	direkt	M	1,51	1,17	1,28	1,38
		P	0,79	1,05 *	1,07 *	1,14 *
Resorufin [pmol/l]	M		3,09	2,71 *	2,17 *	2,18 *
	P		2,98	1,64 *	1,74 *	1,72 *

TABELLE 16 Übersicht des Hepatotoxizitätstest für Remifentanyl in den Konzentrationen C_{max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * p<0,05 gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.

4.3.7 Sufentanil

Für Sufentanil waren Zellzahl, Vitalität und die mitochondriale Aktivität signifikant gemindert sowie die Freisetzung von LDH erhöht. Die Mikroalbuminsynthese zeigte sich in der 5- und 10-fachen Konzentration vermindert. Einzig die Aktivität von CYP1A2 und der pH-Wert waren unverändert zur Negativkontrolle.

			Konzentration			
			Negativ- kontrolle	C _{max} 1 ng/ml	C _{5x} 5 ng/ml	C _{10x} 10 ng/ml
pH		M	7,75	7,66	7,75	7,71
		P	7,66	7,63	7,64	7,63
Zellzahl [x10 ³ /ml]		M	683	485 *	473 *	503 *
		P	650	328 *	318 *	295 *
Vitalität [%]		M	94,12	68,32 *	68,02 *	67,64 *
		P	90,91	69,10 *	67,53 *	70,11 *
LDH [U/l]	Tag 3	M	70,50	171,50 *	153,00 *	130,50 *
		P	165,00	242,00 *	228,50 *	219,00 *
	Tag 6	M	147,50	187,00 *	148,50	150,50
		P	168,00	165,00	160,50	167,00
Mikroalbumin [mg/l]		M	7,01	6,52	5,52 *	4,47 *
		P	13,65	6,23 *	7,17 *	8,06 *
XTT [Extink- tion/Well]	indirekt	M	0,98	0,89 *	0,81 *	0,74 *
		P	1,01	0,80 *	0,81 *	0,82 *
	direkt	M	1,51	1,09	1,32	1,19
		P	0,79	0,86	1,05	1,15
Resorufin [pmol/l]		M	3,09	3,30	3,08	2,84
		P	2,98	2,21 *	2,59	3,01

TABELLE 17 Übersicht des Hepatotoxizitätstest für Sufentanil in den Konzentrationen C_{max} - C_{10x} im Medium (M) und Plasma (P). Es sind Median und * p<0,05 gegenüber der Negativkontrolle dargestellt. 25/75 Perzentil sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Hepatotoxizität von intensivmedizinisch relevanten Hypnotika und Sedativa sowie Opioiden an einem Zytotoxizitätstest auf Basis von Leberzellen zu untersuchen. Der auf den Hepatomazellen HepG2/C3A beruhende Test wurde ursprünglich als Biosensor zur frühzeitigen Erkennung eingeschränkter Leberfunktion entwickelt. [215] Nachfolgend wurde er in verschiedenen Studien eingesetzt. So fand er Anwendung in einer Sepsis-Therapie-Studie EISS (Extracorporeal Immune Support System), weiteren Sepsis-Diagnostik- und Lebertransplantations-Studien. [105, 216–218] Auch die Hepatotoxizitätsprüfung bestimmter Muskelrelaxantien und Albuminzubereitungen wurde schon erprobt. [102, 103, 219] Zuletzt erfolgten die Hepatotoxizitätstestung von ausgewählten Antimykotika sowie eine Testvalidierung anhand primärer humaner Hepatozyten. [101, 220]

Obwohl das akute Leberversagen (ALV) zu mehr als 50% medikamenteninduziert ist, ist eine explizite Testung auf Leberschädlichkeit außerhalb der allgemeinen Toxizitätsprüfung im Arzneimittelgesetz nicht vorgeschrieben. [221, 222] Da die Erkennung eines hepatotoxischen Potenzials vor Zulassung des Medikaments in klinischen und präklinischen Studien oft nicht gelingt, scheint die Verwendung und Weiterentwicklung eines Hepatozytensensors nicht nur wegen der Gefährdung von Patienten, sondern auch wegen Milliardenverlusten bei der Entwicklung neuer Arzneimittel gerechtfertigt. In klinischen Studien beruht die schlechte Vorhersagbarkeit auf der zu geringen Inzidenz der Hepatotoxizität im Vergleich zur Probandengröße. [221] Die präklinische Medikamententestung in-vivo erfolgt am Tiermodell, oft an Nagern. Jedoch haben diese lediglich eine Konkordanz von < 50% mit der tatsächlichen hepatotoxischen Wirkung am Menschen – im Vergleich zu anderen Organsysteme, wie dem blutbildende System, das zu 90% Übereinstimmung zeigt. [223] In der in-vitro Testung gelten primäre Hepatozyten als Goldstandard. [94] Problematisch sind jedoch deren begrenzte Verfügbarkeit, variable Qualität aufgrund interindividueller Spenderunterschiede und Verlust metabolischer Kapazität über die Dauer der Kultur. [95–97] Aus diesem Grund rücken permanente, stets in gleichbleibender Qualität verfügbare Leberzelllinien wie HepG2 in den Fokus.

Die Zelllinie HepG2 entstammt dem hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen männlichen Kaukasiers. HepG2/C3a stellt einen Klon der HepG2-Zelllinie dar, der von Kelly 1994 aufgrund seiner hohen Ähnlichkeit zu primären Hepatozyten isoliert wurde. [224] Er zeichnet sich bei Konfluenz durch einen Phänotyp aus, der über eine lange Verdopplungszeit (> 200 Stunden statt 24 Stunden), gesteigerte Albuminsekretion und der Produktion von für die reife Leber spezifischen Enzymisofomen (z.B. Pyruvatkinase L, Aldolase B) äußert. [225] Der Einsatz

65

dieser Zelllinie erfolgt in zahlreichen toxikologischen Studien oder auch dem extrakorporalen Leberunterstützungssystem ELAD. [43, 226] Im Zusammenhang mit Hepatotoxizitätstestungen werden HepG2 Modelle wegen geringer Sensitivität (< 10 %) kritisiert. [94]

Ein Problem der HepG2-Zellen stellt ihre eingeschränkte Expression von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen und Transportproteinen dar. Betroffen sind unter anderem wichtige CYP450 Enzyme des Phase-I-Metabolismus der reifen Leber. So wird z.B. CYP3A4 in HepG2-Zellen weniger stark exprimiert und ist auch weniger induzierbar als in humanen Hepatozyten. [227] Generell stellt sich daher die Frage, ob bei Verwendung von Hep2G-Zellen Hepatotoxizität durch reaktive Metaboliten unterschätzt sowie die direkte Hepatotoxizität von Medikamenten, die normalerweise inaktiviert werden, überschätzt wird.

Ein anderes Problem - die verminderte Expression von Transportproteinen - betrifft u.a. die Bile Salt Export Pump (BSEP), die in HepG2 nicht exprimiert wird. [228] Da jedoch von ihr vermutet wird eine zentrale Rolle in der cholestatischen Leberschädigung zu spielen, stellt sich die Frage in wieweit die cholestatische Leberschädigung durch HepG2 erfasst werden kann. Weiterhin muss gesagt werden, dass die genetische Variabilität in Bezug auf Arzneistoff-metabolisierende Enzyme für die hepatotoxische Wirkung prädisponierend wirkt, was jedoch mit der (gewünschten) Uniformität der HepG2/C3A-Zellen nicht zu erreichen ist. [229] So haben beispielsweise Patienten mit einer langsam metabolisierenden Form der N-Acetyltransferase 2 eine höhere Sensibilität für die hepatotoxische Wirkung von Isoniazid. [230]

Wie schon in der Einleitung unter 1.2 dargelegt, spielt die mitochondriale Dysfunktion eine zentrale Rolle bei der hepatotoxischen Wirkung von Medikamenten. HepG2/C3A Zellen scheinen aufgrund eines hohen Gehalts an Mitochondrien sowie mitochondrialer DNA in dieser Hinsicht ein optimaler Sensor zu sein. [231] Da sie jedoch weder Fettsäureoxidation noch oxidative Phosphorylierung durchführen, sondern ihre Energie mittels Glykolyse bereitstellen, ist über eine funktionelle Beeinträchtigung der Mitochondrien zunächst nur schwer Aussage zu treffen. [83] Dies kann durch Wachstum in glukosefreiem (Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung) sowie glutaminhaltigem Medium (vermutlich Aktivierung der Fettsäureoxidation) umgangen werden. [232] Hierbei wird Glutamin über α -Ketoglutarat in den Citratzyklus eingeschleust. Es konnte gezeigt werden, dass so oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien stattfindet. [233, 234] Durch diesen Umstand kann argumentiert werden, dass somit HepG2/C3A einen Vorteil gegenüber primären humanen Hepatozyten besitzen, da

man spezifisch unterscheiden könnte, ob die Toxizität die Atmungskette betrifft, indem man Kulturen auf glukosehaltigem/glukosefreiem Medium vergleichen kann.

Auch muss beachtet werden, dass Hepatozyten, die in der Leber in einer dreidimensionalen Struktur angeordnet sind, in diesem Test nur einen 2D-Layer bildeten und daher mit veränderten Eigenschaften der Zellen zu rechnen ist. Nakamura et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Produktion von Albumin sowie die Induzierbarkeit von CYP1A2 in einer dreidimensionalen Kultur signifikant höher ist. [235] Hierdurch könnte möglicherweise eine höhere Sensitivität des Tests für die Einflüsse hepatotoxischer Substanzen generiert werden. Da die Leber auch aus bis zu 40% Zellen anderer Herkunft, der Zytotoxizitätstest jedoch ausschließlich aus Hepatomzellen besteht, sollte in Betracht gezogen werden, dass möglicherweise durch andere in der Leber präsente Zelltypen vermittelte hepatotoxische wie hepatoprotektive Aspekte vernachlässigt werden könnten. So wurde beispielsweise für Kupffer-Zellen gezeigt, dass sie an der leberschädigenden Wirkung von Melphalan beteiligt sind. [236] Und für die zytotoxische Wirkung von Diclofenac auf HepG2-Zellen die Anwesenheit von TNF- α (Tumornekrosefaktor- α), der im Rahmen von pro-inflammatorischen Signalen wie bakteriellen Lipopolysaccharide von Makrophagen wie z.B. Kupffer-Zellen gebildet werden, sensibilisierend wirkt. [71] Aus diesem Grund entwickelten Kelly et al. eine Ko-Kultur von Hepatozyten und Kupffer-Zellen zur Untersuchung von immunvermittelter Hepatotoxizität. [237]

Nachdem auf die Nachteile der HepG2-Zellen und Gründe für die mangelnde Sensitivität des Hepatozytensensors eingegangen wurde, sollte erwähnt werden, dass es auch Studien gibt die eine höhere Sensitivität aufweisen. Unter anderem eine Studie von O'Brien et al., die mit 243 an HepG2-Zellen getesteten Substanzen eine Sensitivität von 90% erzielte. [238] Die Autoren geben mehrere Gründe, warum die Sensitivität anderer Studien oft nicht ausreichend sei: die Wahl von in-vivo nicht-relevanter Konzentrationen, zu geringen Inkubationszeiten, die Messung nur eines einzelnen Endpunkts oder die Wahl von Testparametern, die Endstufen der Zytotoxizität darstellen. [238] Aus diesem Grund wählten wir nach Literaturrecherche klinisch relevante Konzentrationen, die derer von intensivmedizinisch betreuten Patienten in Langzeitanalgesedierung entsprachen und testen sie zusätzlich in 5-facher und 10-facher Konzentration um der möglichen Akkumulation bei Nieren- oder Leberversagen zu entsprechen. Weiterhin führten wir parallel zum Ansatz in Zellkulturmedium ebenso einen Ansatz in humanem Plasma von gesunden Spendern durch. So sollte zum einen die Situation eines hypalbuminämischen Patienten, zum anderen eines mit normalem Plasmaproteinstatus und damit auch der Bindung des Medikaments daran nachgestellt werden. Zu bedenken ist

allerdings, dass im Plasma die Albuminsyntheseleistung von HepG2-Zellen steigt, aber die Proliferation sinkt. [239, 240]

Mit 6 Tagen wählten wir eine Inkubationszeit, die in etwa der mittleren Aufenthaltsdauer auf einer Intensivstation entspricht. [241] Auch besteht der Hepatotoxizitätsassay aus mehreren Endpunkten: so wurden die Zellzahl und Vitalität, die Freisetzung von Laktatdehydrogenase, die Mikroalbuminbestimmung und die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (XTT-Test) sowie die Aktivität des CYP1A2-Enzyms bestimmt.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte lichtmikroskopisch via Zählkammer. In der bereits in der Einleitung erwähnten DIN EN ISO 10993-5 geht man von moderater Zytotoxizität bei einer Inhibition des Wachstums $> 50\%$ aus. In der Arbeit von S. Doß an HepG2/C3A-Zellen war nach Zugabe des hepatotoxischen Paracetamols die Zellzahl um 80% vermindert. [220]

Eine Veränderung der Membranpermeabilität ist ein Zeichen der Zellschädigung bei Zellen in Nekrose oder einer späten Phase der Apoptose und kann durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Hierzu zählen Ausschlusstests wie das Anfärben mit Trypanblau, wie auch Messung zytosolischer Enzyme wie Laktatdehydrogenase.

Die Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) im extrazellulären Medium wurde als Marker in Zytotoxizitätsassays mit HepG2-Zellen durch Dong et al. 1998 eingeführt. [242] Sie ist ein Marker irreversibler Zellschädigung, da aufgrund einer Permeabilitätssteigerung der Zellmembran das normalerweise fast ausschließlich intrazellulär befindliche Enzym austreten kann. Obwohl normalerweise ein Zeichen für nekrotischen Zelluntergang, wurde gezeigt, dass in-vitro (aufgrund des Fehlens von phagozytierenden Zellen) auch bei Apoptose eine Freisetzung von LDH erfolgt. [243] Weiterhin ist ein gewisses Level von LDH wegen der physiologischen Zellmauserung stets zu verzeichnen. Die Messung der LDH erfolgte an den Tagen 3 und 6, da stark hepatotoxische Substanzen schon nach kurzer Zeit schädigend wirken können, sodass bei einer Plasma-Halbwertszeit von 10 ± 2 Stunden nach sechs Tagen keine Erfassung mehr möglich wäre.

Für die Trypanblaufärbung und die Freisetzung von Laktatdehydrogenase ist zu beachten, dass apoptotische Zellen lange Zeit die Membranintegrität bewahren können und so fälschlicherweise als vital eingestuft werden können. Der Trypanblau-Test ist weiterhin anfällig für Verfälschungen durch Proteine und es muss beachtet werden, dass der Farbstoff selbst zytotoxisch wirken kann, weswegen die Inkubationszeit so kurz wie möglich gehalten werden sollte. [244]

Die Hepatoblastomzellen sind in der Lage die meisten Plasmaproteine mit Ausnahme von C-reaktiven Protein zu synthetisieren, darunter auch Albumin. [245] Die Albuminproduktion der

HepG2/C3A Zellen wird beispielsweise im Leberunterstützungssystem ELAD genutzt. [43] In toxikologischen Fragestellungen dient die Albuminsynthese als ein Parameter zur Beurteilung der Hepatozytenfunktion. [216] So konnte gezeigt werden, dass bei stark beeinträchtigter Hepatozytenfunktion, so beispielsweise nach Inkubation mit Acetaminophen, keine Mikroalbuminsynthese mehr zu verzeichnen war. [220]

Terazoliumsalze werden seit der Erstbeschreibung des MTT-Ansatzes durch Mosman et al. im Jahr 1983 zur Untersuchung der Zellviabilität benutzt. [246] Die bei der Reduktion von Terazoliumsalzen entstehende Formazan kann dann spektrophotometrisch gemessen werden und somit Rückschluss auf die Fähigkeit der Zelle zur Bildung von Reduktionsäquivalenten geben. Die Weiterentwicklung des MTT zum XTT-Test erfolgte mit der Synthese einer neuen Terazoliumsalzes, das sich wasserlöslich (im Gegensatz zum im DMSO aufzulösenden MTT) präsentierte und somit die Durchführung erleichterte. Im Gegensatz zum positiv geladenen MTT, welches die Zellmembran passieren kann, muss für das negativ geladene XTT ein Zwischenschritt eingefügt werden, bei dem ein vorübergehender Akzeptor die Elektronen über die Zellmembran schleust. Der Unterschied zwischen MTT und XTT liegt deshalb auch darin, dass MTT durch viele Reduktionsäquivalente zu Formazan umgewandelt werden kann, XTT vermutlich jedoch nur über das im mitochondrialen Citratzyklus entstehende NADH. [211, 212] Problematisch ist, dass sowohl XTT als auch MTT durch einen sauren pH, Polyphenole, Superoxide und Albumin reduziert werden können, was in einer Überschätzung der Zellviabilität resultiert. [247–250] In der ISO Norm 10993-5 zur Prüfung der in-vitro-Toxizität wird bei einer Abnahme der Dehydrogenaseaktivität um > 30% zur Negativkontrolle von einem zytotoxischen Effekt ausgegangen. [93]

Die Cytochromenzyme CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 können polyzyklische Kohlenwasserstoffe und Arylamine zu Karzinogenen umwandeln. [251] CYP1A2, macht bis zu 15% des Cytochromenzymgehalts der Leber aus - im Gegensatz zu CYP1A1, das nicht oder nur in geringer Menge in der Leber vorkommt. [252, 253] Es ist für die Metabolisierung von Arzneimitteln wie trizyklischen Antidepressiva, Neuroleptika, Koffein und Paracetamol verantwortlich. [254] Ein weiteres Substrat stellt 7-Ethoxyresorufin dar, das zu Resorufin umgewandelt wird. Resorufin kann fluorometrisch bestimmt werden wodurch Rückschluss auf die Enzymaktivität möglich ist. Dieser Assay wird als Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Ansatz bezeichnet. [214] Gleichzeitig werden die Enzyme der CYP1 Familie durch polyaromatische Kohlenwasserstoffe in ihrer Aktivität induziert. Dies erfolgt durch Bindung an den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR), der dann im Kern mit (AhR nuclear translocator; Arnt) dimerisiert und die Transkription aktiviert. [255] Arzneistoffe mit Einfluss auf CYP1A2 sind als Induktoren z.B. Omeprazol oder Phenobarbital oder als Inhibitoren Ciprofloxacin, Ketoconazol

oder Isoniazid zu nennen. [256] Obwohl es eines der wichtigsten Cytochromenzyme der menschlichen Leber darstellt ist die Expression von CYP1A2 in HepG2/C3A Zellen 80-mal niedriger als vergleichsweise in primären humanen Hepatozyten. [106, 257] Aus diesem Grund werden Induktoren eingesetzt bzw. eine Transfektion mit Adenoviren durchgeführt. [258] In diesem Testablauf wurde der polyzyklische Kohlenwasserstoff 3-Methylcholantren eingesetzt, von dem gezeigt werden konnte das mRNA-Level von CYP1A2 um das 12-fache nach zu erhöhen. [259] Weiterhin unterliegt die Aktivität der Cytochromenzyme Kulturbedingungen, unter die auch die Präsenz von Wachstumsfaktoren oder der Zusatz von Serum, wie FKS fallen. Daher entschieden wir uns den Testansatz für die Bestimmung von CYP1A2 unter Zusatz von 15% FKS zum Kulturmedium durchzuführen. Eine Änderung der CYP1A2-Aktivität sollte im Kontext der Viabilitätsparameter beurteilt werden. So kann eine Abnahme der CYP1A2-Aktivität nicht nur für eine Wirkung als Inhibitor, sondern ebenfalls für Zelluntergang und damit verminderte Kapazität zur Enzymsynthese sprechen. Bei isoliertem Abfall der CYP1A2-Aktivität unter Erhalt der Zellviabilität ist ein zytotoxischer Effekt jedoch auch nicht ausgeschlossen, da es möglich ist, dass durch die gesteigerte CYP1A2-Aktivität vermehrt reaktive, zytotoxische Metaboliten entstehen.

In dieser Dissertation erfolgte die Untersuchung für intensivmedizinische Analgosedierung genutzten Sedativa, Hypnotika und Opiode im Hinblick auf ihre Wirkung auf die permanente Hepatomzelllinie HepG2/C3A.

Hierbei wurden die im Handel üblichen Zubereitung der Medikamente (Zusammensetzung s. Kapitel 3.1) anstatt der Reinsubstanz verwendet, weswegen Interferenzen mit Hilfsstoffen nicht auszuschließen sind. Die in den hier verwendeten Medikamentenzubereitungen pH-Wert-Änderungen durch Puffersubstanzen sowie die anderen Zusatzstoffe werden im Rahmen der einzelnen Medikamente diskutiert.

Midazolam zählt zu den kurzwirksamen Benzodiazepinen mit sedierender und anxiolytischer Wirkung. Zu seinem Nebenwirkungsspektrum zählen Hypotonie, Agitiertheit und vor allem in Kombination mit Opioiden Apnoe und Hypoxie. [124, 125] Nach Literaturrecherche und Livertox® ist kein hepatotoxisches Potenzial bekannt. [54] Erfolgt die Gabe im Rahmen eines Leberversagens, so besteht bei hepatischer Metabolisierung die Gefahr der Akkumulation. In der Zellkultur konnte an oralen Tumorzellen eine zytotoxische Wirkung festgestellt werden. [260] In unserer Testung zeigte Midazolam ein geringes hepatotoxisches Potenzial. Die Vitalität war in der Konzentration C_{\max} (300 ng/ml) mit 92% signifikant von der Negativkontrolle verschieden (94%). Konkordant hierzu war die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen im direkten XTT-Test um 34% vermindert. Die Zellzahl war im Vergleich zur Negativkontrolle

sogar gesteigert und die LDH-Werte lagen unterhalb der Negativkontrolle. Im EROD-Test konnten wir keine Beeinflussung der CYP1A2 Aktivität feststellen. Auch in anderen Studien wurde keine Veränderung der CYP1A2 Aktivität gemessen. [261] Midazolam wird fast ausschließlich durch CYP3A4 metabolisiert und daher häufig in pharmakologischen Testungen als Markersubstanz genutzt. [262] Auch wenn HepG2/C3A-Zellen nur eine verminderte CYP3A4 Kapazität haben, ist eine Toxizität des gebildeten Metaboliten 1'-Hydroxymidazolam nicht bekannt. Die Synthesekapazität der Hepatozyten (Mikroalbuminproduktion) wurde durch Midazolam nicht negativ beeinflusst. Midazolam liegt in der Medikamentenlösung mit Wasser, Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydroxid (NaOH) und Salzsäure (HCl) bei einem pH von 4,5 vor. In den Versuchen war der pH mit 7,6 – 7,7 nicht von der Negativkontrolle verschieden (pH 7,7 – 7,8). Midazolam besitzt eine hohe Plasmaproteinbindung (96 – 97%). Passend hierzu war der negative Effekt auf Vitalität und den direkten XTT-Test im Plasmaversuch aufgehoben.

Für Propofol findet man in der Literatur bisher nur einen Fall von ALV, der in Zusammenhang damit stehen könnte, sowie fünf Fälle, in denen eine akute Hepatitis auftrat. [141] Eine wichtige unerwünschte Nebenwirkung ist als Propofolinfusionssyndrom bekannt. [132] Hierunter versteht man das Auftreten von Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen sowie Laktatazidose, Niereninsuffizienz, Rhabdomyolyse, Hypertriglyceridämie und Hepatomegalie mit Steatose. Ursächlich ist vermutlich eine Störung der mitochondrialen Atmungskette oder Fettsäureoxidation. [133] Bei intensivmedizinisch betreuten Erwachsenen liegt die Inzidenz einer prospektiven Studie zufolge bei ca. 1%. [134] In unseren Versuchen reduzierte Propofol in der Konzentration C_{\max} (2 µg/ml) die Vitalität im Medium auf 86% sowie (trotz einer Proteinbindung von 98%) im Plasma auf 77%. Zu überlegen ist jedoch, ob dies ein hepatotoxisches Potenzial darstellt oder im Rahmen des im Vergleich zu normalen Hepatozyten stehenden veränderten zellulären Phänotyps zu sehen ist. Studien im Rahmen der anti-Tumor Forschung an HepG2-Zellen konnten zeigen, dass Propofol zur Steigerung der Expression von miR-199a führt, einer Mikro-RNA, die in HepG2-Zellen im Vergleich zu normalen Hepatozyten vermindert exprimiert wird und an der Tumorentwicklung beteiligt sein könnte. [263, 264] Eine in HepG2-Zellen hochregulierte miR-199a Expression konnte die Zellproliferation reduzieren. [265] Auch wurde für Propofol anti-tumor Effekte über eine Hemmung der Cyclooxygenase beschrieben. [266] Weiterhin konnte für Propofol gezeigt werden, dass es wie das strukturell ähnliche Tocopherol (Vitamin E) protektiv gegenüber oxidativen Stress wirkt. [267] Die LDH-Werte waren an Tag 3 und Tag 6 signifikant zur Negativkontrolle reduziert. Wir fanden eine Einschränkung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen im XTT-Test. Dies könnte möglicherweise durch die beschriebene Beeinflussung des mitochondrialen Stoffwechsels wie des Citratzyklus erklärt werden, da der

XTT-Test auf Elektronenübertragung beruht, die aus dem Citratzyklus gewonnen wird [268, 269]. Im Medium zeigte sich Propofol als Induktor der CYP1A2 Aktivität. Dies bestätigt die Ergebnisse einer Untersuchung an Hasen. [270] Studien an humanen hepatischen Mikrosomen zeigten jedoch, dass Propofol ein schwacher Inhibitor der Isoenzyme CYP 1A2, 2C9 und 3A4 zu sein scheint. [271] Die Zusatzstoffe der Medikamentenlösung in der Propofol vorliegt enthält Glycerol, Natriumoleat, raffiniertes Sojaöl, Triglyceride sowie Eilecithin. Glycerol oder auch Propan-1,2,3-triol genannt ist ein Zuckeralkohol, der die Grundlage der Fettsäuresynthese im menschlichen Organismus darstellt. In Zellkulturansätzen mit HepG2 konnte gezeigt werden, dass es die Halbwertszeit und Aktivität des CYP2E1 erhöhte sowie die Zellproliferation einschränkte. [272, 273] Oleat (eine einfach ungesättigte Fettsäure mit der Summenformel $C_{18}H_{34}O_2$) scheint, im Gegensatz zu anderen freien Fettsäuren, an HepG2-Zellen keine zytotoxische Wirkung auszuüben. [274] Ebenso konnte keine Beeinflussung von Proliferation oder Vitalität bei Inkubation mit Sojaöl festgestellt werden. [275] Lecithine, in der Zellmembran vorkommende Phospholipide, scheinen in HepG2-Zellen zu akkumulieren, über eine schädigende Wirkung ist nichts bekannt. [276] Ebenso musste bedacht werden, dass zur Herstellung einer Lösung des lipophilen Propofols Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet wurde, jedoch in Konzentrationen von $< 0,1\%$ in Kontakt mit den Zellen. Der pH (8,0 in der Medikamentenlösung) war in den Versuchen im Medium und im Plasma nicht von der Negativkontrolle verschieden (pH 7,7 - 7,6).

LiverTox® gibt für Ketamin eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von hepatischen und biliären Schäden nach Langzeitanwendung an. [54] Man findet viele Fallberichte, wo es nach chronischer Anwendung zur Erhöhung von Leberenzymen oder sogar zu ALV kam (s. auch Einleitung 1.4.1) [157, 158] Es gibt bereits eine Studie an HepG2 von 2009, wo S-Ketamin in den Dosierungen 10 bis 200 $\mu\text{g/ml}$ über maximal 24 Stunden getestet wurde. [277] Dort war in den Konzentrationen 100 und 200 μg sowohl die Zellzahl signifikant gemindert, als auch die Freisetzung von LDH erhöht. Bei 10 und 50 $\mu\text{g/ml}$ war kein Unterschied zur Negativkontrolle festzustellen. In unseren Versuchen an den Konzentrationen 1, 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ fand sich zwar eine geringfügige Minderung der Vitalität (in der höchsten Konzentration C_{10x} 88% vs. 94% in der Negativkontrolle), jedoch Zellzahlen im Bereich der Negativkontrolle und LDH-Werte signifikant unterhalb der Negativkontrolle. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine leichte Schädigung der Hepatozyten ohne Verminderung der Zellzahl mit Austritt von LDH vor Tag 3, sodass an Tag 3 bereits nur noch verringert LDH nachweisbar ist. Zur Pathogenese der Leberschädigung ist bisher aus Versuchen Ratten bekannt, dass es zur Einschränkung des Komplex I der Atmungskette kommt und man u.a. elektronenmikroskopisch mitochondriale Degeneration nachweisen kann. [162, 163] Die o.g. Studie an HepG2-Zellen kam u.a. durch Bestimmung von Caspase-Aktivitäten zu dem Schluss,

dass S-Ketamin den apoptotischen Zelltod durch "Aktivierung eines Bax-Mitochondrien-Caspase Protease Signalwegs" ausüben könnte. [277] Auch andere in-vitro Studien stellten eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion, so unter anderem eine Einschränkung NADH Dehydrogenase, fest. [278, 279] Dies könnte die in der hier vorliegenden Untersuchung reduzierte Aktivität des XTT-Tests erklären. Wie bereits in anderen Untersuchungen festgestellt, deuten die Ergebnisse des hier durchgeführten EROD-Tests darauf hin, dass S-Ketamin als Inhibitor des CYP1A2-Enzyms fungiert. [280] Beeinflussung der Ergebnisse für S-Ketamin durch Hilfsstoffe in der Medikamentenlösung (NaCl, Salzsäure und Wasser) sind vermutlich nicht vorhanden. Die pH-Wert Verschiebung durch Salzsäure (pH 4,9) wurde in Medium (pH 7,7) und Plasma (pH 7,6) aufgehoben. Es liegen außer den generellen Unterschieden zwischen Plasma und Medium - wie oben erwähnt - keine Unterschiede für S-Ketamin in den Versuchen in Zellkulturmedium oder Plasma vor, was bei einer Plasmaproteinbindung von 10 – 30% vermutlich nicht zu erwarten wäre. [192]

Bisher liegt für Thiopental laut LiverTox® und PubMed-Recherche kein Hinweis für ein hepatotoxisches Potenzial vor. [54] Es gibt einen Fallbericht über eine mögliche Leberschädigung nach Thiopentalgabe. [168] In der vorliegenden Untersuchung an HepG2/C3A zeigte sich jedoch eine deutliche konzentrationsabhängige Minderung der Vitalität bis maximal 80% bzw. 67% in der höchsten Konzentration im Medium bzw. Plasma, obwohl die Zellzahl in keiner Konzentration signifikant von der Negativkontrolle verschieden war. Die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen im Überstand war konzentrationsunabhängig vermindert bzw. im direkten Zellkontakt gesteigert. Andere Studien zeigten für Thiopental, dass es im T-Zell-Modell anti-apoptotische Effekte durch Induktion von Hitzeschockproteinen ausübt, die u.a. die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien verhindern. [281] Obwohl die Isoenzyme, die für den Abbau von Thiopental verantwortlich sind bisher noch nicht gefunden wurden, konnte gezeigt werden, dass Thiopental, wie alle Barbiturate, als Induktor für CYP3A3 und 3A4 fungiert. [164] In unserem Versuch konnten wir eine Aktivitätssteigerung für CYP1A2 feststellen. In der Zubereitung liegt Thiopental als Pulver mit Natriumcarbonat – einer in der Zellkultur weit verbreiteten Puffersubstanz – vor. Dies führte in der höchsten Konzentration im Medium (pH 8,0), sowie in allen Plasmaversuchen signifikant höhere pH-Werte (pH bis 8,0) vorlagen als in der Negativkontrolle (pH 7,6 bis 7,8).

Die klassischen Nebenwirkungen der Opiode sind unter anderem Atemdepression, Übelkeit, Obstipation und vor allem bei schnellwirksamen Opioiden Thoraxrigidität. [176] Für Fentanyl und die verwandten Opiode Remifentanyl und Sufentanyl ist nach LiverTox® und PubMed-Recherche kein hepatotoxisches Potenzial bekannt. [54] Wir konnten für Fentanyl eine signifikant verminderte Vitalität der HepG2/C3A-Zellen (82 – 88 %) bei unveränderter Zellzahl

zeigen. Die LDH-Werte lagen an Tag 3 signifikant unter denen der Negativkontrolle, was in Zusammenschau mit der niedrigen Vitalität für eine Zellschädigung vor Tag 3 sprechen könnte. Auch die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen nahm über die Konzentration im indirekten XTT-Test nicht signifikant ab. An Ratten konnte eine Einschränkung des hepatozellulären Sauerstoffverbrauchs sowie des Energiestoffwechsels neuronaler Mitochondrien durch Fentanyl gezeigt werden. [282, 283] In einer Studie an HepG2 war eine leichte Einschränkung der Atmungskette zu sehen, jedoch ohne Veränderung des zellulären Sauerstoffverbrauchs. [284] Wir konnten eine inhibitorische Wirkung auf CYP1A2 in der 5-fachen und 10-fachen Konzentration sowie im Plasma feststellen. In der Literatur ist nicht beschrieben, dass Fentanyl CYP1A2 hemmt, sodass dies ebenfalls im Rahmen einer zytotoxischen Wirkung gesehen werden könnte. Fentanyl wird durch CYP3A4 metabolisiert, wirkt jedoch nicht als Induktor oder Inhibitor. [189] Die Medikamentenlösung enthält NaCl sowie HCl und NaOH zur pH-Regulierung (pH 7,0). In allen Konzentrationen war der pH jedoch nicht signifikant von der Negativkontrolle verschieden (pH 7,6 – 7,7).

Für Remifentanil verzeichneten wir eine signifikante Verminderung der Vitalität (77 - 80 %) bei nicht-signifikant geminderter Zellzahl sowie eine konzentrationsabhängige signifikante Aktivitätsminderung mitochondrialer Dehydrogenasen. Wie schon für Fentanyl beschrieben wurde auch für Remifentanil eine Einschränkung des zellulären Sauerstoffverbrauchs bei Nervenzellen der Ratte gefunden. [283] Demgegenüber steht eine Studie an HepG2-Zellen, wo Remifentanil die Bioenergetik der mitochondrialen Atmungskette verbessern soll. [285] Weiterhin ist für Remifentanil an verschiedenen Organen und Zellen eine Protektion gegenüber oxidativem Stress, so u.a. beim Ischämie-Reperusions-Schaden der Leber gezeigt worden. [286, 287] Weiterhin zeigte sich in unseren Versuchen eine konzentrationsabhängige Abnahme der CYP1A2-Aktivität. Da für Remifentanil in der Literatur keine Angaben als Inhibitor für CYP1A2 vorliegen, kann auch hier von einer Abnahme der Enzymsyntheseleistung im Rahmen der Zytotoxizität ausgegangen werden. Im Organismus wird Remifentanil über gewebsunabhängige Esterasen metabolisiert. Ob diese von HepG2 synthetisiert werden und ob es somit in dem Versuch zur Akkumulation von Remifentanil kommt ist unklar. Im Vergleich mit den Versuchen im Spenderplasma, in dem die Esterasen vermutlich vorhanden sind, kann jedoch gesehen werden, dass die Vitalität und die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen ebenfalls signifikant konzentrationsabhängig vermindert sind, was eine aufgrund von Akkumulation falsch hoch eingeschätzte Zytotoxizität weniger wahrscheinlich macht. In der Arzneimittelzubereitung liegt Remifentanil mit Glycin, NaOH und Salzsäure mit einem pH von 5,0 vor. Glycin ist eine essentielle Aminosäure, die auch im verwendeten Zellkulturmedium DMEM mit 30 mg/l zugesetzt ist, weswegen nicht von einem hepatotoxischen Potenzial

ausgegangen werden muss. [288] Der pH war in allen Konzentrationen sowohl im Medium als auch im Plasma im Bereich der Negativkontrolle (pH 7,6 – 7,8).

Sufentanil zeigte mit 68% Vitalität in der klinisch relevanten Konzentration den stärksten Vitalitätsverlust der hier getesteten Substanzen. Weiterhin lagen LDH-Werte vor, die mehr als doppelt so hoch wie die Negativkontrolle waren. Auch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen war im indirekten XTT signifikant konzentrationsabhängig reduziert und die Mikroalbuminsynthese nahm mit zunehmender Konzentration ab. Diese Ergebnisse sprechen für ein mögliches hepatotoxisches Potenzial. Da bisher keine Untersuchungen zu eventueller Sufentanil bedingter Hepatotoxizität vorliegt ist dies schwer einzuordnen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Opiode die Sensibilität von Hepatozyten über Apoptose durch Fas-Rezeptoren erhöhen zu scheinen. Für das Opioid Morphin wurde in Zellkultur und in-vivo anti-tumor Effekte beschrieben. [289–291] Da aber für Fentanyl und Remifentanyl nicht annähernd so deutlich verminderte Vitalitätsparameter vorlagen müssten noch weitere toxische Eigenschaften für Sufentanil vorliegen. Wir konnten keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des CYP1A2-Enzyms feststellen. Sufentanil wird wie Fentanyl über CYP3A4 metabolisiert. [189] In der Medikamentenlösung liegt Sufentanil mit NaCl und Wasser bei einem pH von 4,8 vor. Mit 7,6 bis 7,8 war der pH in allen Versuchen im Bereich der Negativkontrolle.

Die medikamenteninduzierte Leberschädigung ("drug-induced liver injury"; DILI) ist für einen Großteil des akuten Leberversagens (ALV), einer schwerwiegenden Erkrankung mit intensivmedizinischer Behandlung und häufiger Transplantationsbedürftigkeit, verantwortlich. Auch in der Entwicklung neuer Wirkstoffe spielt die leberschädigende Wirkung (Hepatotoxizität) eine Rolle, da sie der häufigste Grund für die Marktrücknahme von neuen Medikamenten und damit die Ursache von hohen Entwicklungskosten ist. Unter anderem aufgrund der komplexen Pathogenese der Hepatotoxizität und dem Einfluss von reaktiven Metaboliten durch Biotransformation steht bisher kein zuverlässiges Prognoseverfahren zur Verfügung. Der hier verwendete Zytotoxizitätstest stellt eine Grundlage dar, auf der weiter versucht werden kann ein System zu entwickeln, das die Leberschädlichkeit mit hoher Sensitivität vorhersagen kann. Im nächsten Schritt wäre es beispielsweise interessant Kombinationen der hier verwendeten Medikamente zu testen um additive oder synergistische Wirkungen auf die Leberzellen zu untersuchen, da im klinischen Alltag die Gabe eines einzelnen Medikaments sehr selten ist. Auch könnten neben den getesteten Konzentrationen noch weitere Untersuchungen in anderen Konzentrationen sowie die Testung anderer Enzyme der CYP450 Familie erfolgen. So könnte beispielsweise die Untersuchung CYP3A4 von Interesse sein, da sowohl Midazolam, Fentanyl als auch Sufentanil darüber verstoffwechselt

Diskussion

werden. Auch wäre es in Anbetracht der Bedeutung reaktiver Metaboliten lohnenswert einen Ansatz zu entwickeln, in dem es möglich wäre die Parameter der Viabilität an HepG2/C3A-Zellen mit induzierter CYP450-Aktivität zu untersuchen. So könnten HepG2-Zellen beispielsweise wie im Ansatz von Tolosa et al. durch Transfektion mit Adenoviren die Expression von ausgewählten Cytochromenzymen ermöglicht werden. [258]

6 Zusammenfassung

Die epidemiologische Veränderung der Alterszusammensetzung in den westlichen Gesellschaften führt dazu, dass immer ältere Menschen auch intensivmedizinisch betreut werden. Ein intensivmedizinischer Aufenthalt erfordert häufig Sedierung und Gabe von Opioiden, da die bei erlebten Schmerzen und psychischer Belastung erfolgte Stressreaktion zu weiteren Komplikationen und verlängertem Krankenhausaufenthalt führen kann. Die meisten intensivmedizinisch betreuten Patienten erhalten daher Sedativa, Hypnotika und Opioide. Da es während eines Aufenthalts auf der Intensivstation auch häufig zur Erhöhung der Leberenzyme kommt und das medikamenten-induzierte Leberversagen eine sehr häufige Arzneimittelnebenwirkung ist, stellte sich für uns die Frage nach einer hepatotoxischen Wirkung der am häufigsten verwendeten Sedativa, Hypnotika und Opioide.

Es war das Ziel dieser Arbeit den bereits bestehenden und ursprünglich zur Früherkennung von Leberversagen entwickelten Leberzellensor, dessen Grundlage die permanente Hepatomzelllinie HepG2/C3A ist, durch Testung von intensivmedizinisch genutzten Sedativa, Hypnotika und Opioiden mit der Fragestellung nach Hepatotoxizität weiter zu untersuchen. Die Beurteilung der Schädigung der Hepatomzellen erfolgte durch die lichtmikroskopische Bestimmung von Zellzahl und Vitalität, die Messung der freigesetzten Laktatdehydrogenase, die fluorometrische Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen im XTT-Test sowie die Syntheseleistung anhand der Mikroalbuminkonzentration. Weiterhin wurde die Aktivität des CYP1A2-Enzyms bestimmt um Einflüsse auf die Metabolisierungsleistung zu untersuchen.

Es zeigte sich eine gute Korrelation zu Ergebnissen aus anderen Studien bezüglich der mitochondrialen Dysfunktion und Wirkung auf das CYP1A2-Enzym. Insgesamt kann man sagen, dass die hier getesteten in der Langzeitsedierung und -analgesie eingesetzten Arzneistoffe keine ausgeprägten hepatotoxischen Eigenschaften präsentierten. Keines der Medikamente führte zu einer Abnahme der Vitalität um mindestens 50%, d.h. hatte eine nach DIN EN ISO 10993-5 klassifizierte milde oder stärker ausgeprägte Zytotoxizität. In Zusammenschau mit den anderen Parametern des Zytotoxizitätsassays kann jedoch überraschenderweise für alle Opioide ein hepatotoxisches Potenzial beobachtet werden, insbesondere für Sufentanil. Demgegenüber fanden wir bei S-Ketamin, für das ein apoptotischer Effekt auf HepG2-Zellen vorbeschrieben war, weniger stark schädigende Auswirkungen.

Zusammengefasst zeigt Fentanyl zytotoxische Eigenschaften durch Reduktion von Vitalität und CYP1A2-Enzymaktivität. Remifentanyl führte noch zu stärkerer Vitalitätsreduktion und

Zusammenfassung

Abnahme der CYP1A2-Enzymaktivität sowie zusätzlich zur Abnahme der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen und verminderter Mikroalbuminproduktion. Sufentanil schlussendlich zeigte in allen Parametern, mit Ausnahme der CYP1A2-Aktivität, zytotoxische Wirkung. So war nach Zugabe von Sufentanil die Vitalität am stärksten eingeschränkt, die Zellzahl deutlich vermindert, die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen sowie die Mikroalbuminproduktion herabgesetzt.

Auch wenn die hepatotoxische Wirkung der hier getesteten Hypnotika und Opioide nicht stark ausgeprägt ist muss bedacht werden, dass sich die klinische Anwendung der Medikamente von den Testbedingungen deutlich unterscheidet. So werden Hypnotika und Opioide häufig kombiniert bzw. mit anderen potenzial hepatotoxischen Substanzen gegeben, sodass sich Effekte gegebenenfalls potenzieren. Weiterhin ist unklar was eine auch nur geringfügig hepatotoxische Substanz bei schon vorgeschädigter Leber auslösen kann. Unter diesen Bedingungen ist es außerdem denkbar, dass die höchste hier getestete Plasmakonzentration durch Einschränkung des hepatischen Metabolismus und der Exkretion deutlich überschritten wird.

Limitiert werden die Testergebnisse dadurch, dass der Testaufbau nicht uneingeschränkt auf den menschlichen Organismus übertragbar ist. So ist u.a. die Metabolisierungskapazität der Hepatomzellen in Bezug auf Cytochromenzyme eingeschränkt und es fehlen weitere für die Leber typischen Zellen (z.B. Kupffer-Zellen) sowie Abbauege (Plasmaesterasen).

7 Literaturverzeichnis

1. Canbay A, Tacke F, Hadem J et al. (2011) Acute liver failure: a life-threatening disease. *Dtsch Arztebl Int* 108: 714–720. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2011.0714>
2. Hadem J, Stiefel P, Bahr MJ et al. (2008) Prognostic Implications of Lactate, Bilirubin, and Etiology in German Patients With Acute Liver Failure. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 6: 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2007.12.039>
3. Bower WA, Johns M, Margolis HS et al. (2007) Population-based surveillance for acute liver failure. *Am J Gastroenterol* 102: 2459–2463. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01388.x>
4. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV et al. (2002) Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Annals of internal medicine* 137: 947–954
5. Lee WM, Squires, Robert H Jr, Nyberg SL et al. (2008) Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 47: 1401–1415. <https://doi.org/10.1002/hep.22177>
6. Trey C, Davidson CS (1970) The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis* 3: 282–298
7. Hadem J, Schneider AS, Manns MP (2011) Akutes Leberversagen. Wie viel Diagnostik und Therapie braucht mein Patient? (Acute liver failure. How much diagnostic work-up and therapy does my patient need?). *Internist (Berl)* 52: 804, 806-8, 810-4. <https://doi.org/10.1007/s00108-010-2793-0>
8. Kramer L, Jordan B, Druml W et al. (2007) Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients—a prospective multicenter study. *Crit Care Med* 35: 1099-e7
9. Khuroo MS, Kamili S (2003) Aetiology and prognostic factors in acute liver failure in India. *J Viral Hepat* 10: 224–231
10. Mudawi HMY, Yousif BA (2007) Fulminant hepatic failure in an African setting: etiology, clinical course, and predictors of mortality. *Dig Dis Sci* 52: 3266–3269. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9730-z>
11. Canbay A, Jochum C, Bechmann LP et al. (2009) Acute liver failure in a metropolitan area in Germany: a retrospective study (2002 - 2008). *Z Gastroenterol* 47: 807–813. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1109058>
12. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A et al. (2010) Acute liver failure. *Lancet* 376: 190–201. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60274-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60274-7)
13. Manns MP, Schneidewind S (2016) *Praxis der Hepatologie*. Springer-Verlag
14. Jalan R, Williams R (2002) Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options. *Blood purification* 20: 252–261

15. (2010) 42.13 Akutes Leberversagen. In: Greten H, Rinninger F, Greten T (eds) Innere Medizin, 13., aktualis. u. überarb. Aufl. Thieme, Stuttgart
16. Prakash R, Mullen KD (2010) Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7: 515–525.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.116>
17. Conn HO, Leevy CM, Vlahcevic ZR et al. (1977) Comparison of lactulose and neomycin in the treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. *Gastroenterology* 72: 573–583
18. Albrecht J, Norenberg MD (2006) Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44: 788–794
19. Wendon JA, Larsen FS (2006) Intracranial pressure monitoring in acute liver failure. A procedure with clear indications. *Hepatology* 44: 504–506
20. Rolando N, Wade J, Davalos M et al. (2000) The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 32: 734–739.
<https://doi.org/10.1053/jhep.2000.17687>
21. Potts JR, Verma S (2010) Optimizing management in autoimmune hepatitis with liver failure at initial presentation. *World Journal of Gastroenterology* : WJG 17: 2070–2075.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i16.2070>
22. O’Grady JG (2005) Acute liver failure. *Postgraduate medical journal* 81: 148–154
23. Sharma P, Sharma BC, Agrawal A et al. (2012) Primary prophylaxis of overt hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: an open labeled randomized controlled trial of lactulose versus no lactulose. *Journal of gastroenterology and hepatology* 27: 1329–1335
24. Sharma BC, Sharma P, Agrawal A et al. (2009) Secondary prophylaxis of hepatic encephalopathy: an open-label randomized controlled trial of lactulose versus placebo. *Gastroenterology* 137: 885–891
25. Stravitz RT, Kramer AH, Davern T et al. (2007) Intensive care of patients with acute liver failure: recommendations of the US Acute Liver Failure Study Group. *Crit Care Med* 35: 2498–2508
26. Burchardi H, Larsen R, Marx G et al. (2011) *Die Intensivmedizin*. Springer-Verlag
27. Lee WM, Stravitz RT, Larson AM (2012) Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases Position Paper on acute liver failure 2011. *Hepatology* 55: 965–967
28. Stravitz RT, Larsen FS (2009) Therapeutic hypothermia for acute liver failure. *Crit Care Med* 37: S258–S264

29. Lee WM, Stravitz RT, Larson AM (2012) Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases position paper on acute liver failure 2011. *Hepatology* 55: 965–967. <https://doi.org/10.1002/hep.25551>
30. Allegretti AS, Israelsen M, Krag A et al. (2017) Terlipressin versus placebo or no intervention for people with cirrhosis and hepatorenal syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005162.pub4>
31. Sharma P, Kumar A, Shrama BC et al. (2008) An open label, pilot, randomized controlled trial of noradrenaline versus terlipressin in the treatment of type 1 hepatorenal syndrome and predictors of response. *Am J Gastroenterol* 103: 1689–1697. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2008.01828.x>
32. Cardenas A, Gines P, Marotta P et al. (2012) Tolvaptan, an oral vasopressin antagonist, in the treatment of hyponatremia in cirrhosis. *J Hepatol* 56: 571–578. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.08.020>
33. Mookerjee RP, Pavesi M, Thomsen KL et al. (2016) Treatment with non-selective beta blockers is associated with reduced severity of systemic inflammation and improved survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol* 64: 574–582
34. Leithead JA, Rajoriya N, Tehami N et al. (2014) Non-selective β -blockers are associated with improved survival in patients with ascites listed for liver transplantation. *Gut: gutjnl-2013-306502*
35. Franchis R de (2015) Expanding consensus in portal hypertension. *J Hepatol* 63: 743–752. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.05.022>
36. Nobre SR, Cabral JEP, Gomes JJF et al. (2008) In-hospital mortality in spontaneous bacterial peritonitis: a new predictive model. *European journal of gastroenterology & hepatology* 20: 1176–1181
37. Kilian F, Simone N, Tobias R et al. (2016) Microbiology and resistance in first episodes of spontaneous bacterial peritonitis: implications for management and prognosis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 31: 1191–1195. <https://doi.org/10.1111/jgh.13266>
38. Runyon BA (2013) Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases Practice Guideline management of adult patients with ascites due to cirrhosis 2012. *Hepatology* 57: 1651–1653
39. Liver EAFTSOT (2010) EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Hepatol* 53: 397–417
40. Sort P, Navasa M, Arroyo V et al. (1999) Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *New England Journal of Medicine* 341: 403–409

41. Stange J, Ramlow W, Mitzner S et al. (1993) Dialysis against a recycled albumin solution enables the removal of albumin-bound toxins. *Artificial organs* 17: 809–813
42. Rifai K, Ernst T, Kretschmer U et al. (2003) Prometheus®—a new extracorporeal system for the treatment of liver failure☆. *J Hepatol* 39: 984–990
43. Millis JM, Cronin DC, Johnson R et al. (2002) Initial experience with the modified extracorporeal liver-assist device for patients with fulminant hepatic failure: system modifications and clinical impact. *Transplantation* 74: 1735–1746
44. Lee WM, Squires RH, Nyberg SL et al. (2008) Acute liver failure: summary of a workshop. *Hepatology* 47: 1401–1415
45. McPhail, Mark J W, Wendon JA, Bernal W (2010) Meta-analysis of performance of Kings's College Hospital Criteria in prediction of outcome in non-paracetamol-induced acute liver failure. *J Hepatol* 53: 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.03.023>
46. Ichai P, Samuel D (2008) Etiology and prognosis of fulminant hepatitis in adults. *Liver Transpl* 14 Suppl 2: S67-79. <https://doi.org/10.1002/lt.21612>
47. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A et al. (17) Acute liver failure. *The Lancet* 376: 190–201. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60274-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60274-7)
48. Björnsson E, Olsson R (2005) Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology* 42: 481–489
49. Andrade RJ, Lucena MI, Fernandez MC et al. (2005) Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology* 129: 512–521. <https://doi.org/10.1016/j.gastro.2005.05.006>
50. Koch A, Streetz K, Tischendorf J et al. (2015) Leberwerterhöhung auf der Intensivstation. In: *Weiterbildung Intensivmedizin und Notfallmedizin*. Springer, pp 11–20
51. Zimmerman HJ (1999) Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. Lippincott Williams & Wilkins
52. Chalasani N, Bonkovsky HL, Fontana R et al. (2015) Features and outcomes of 899 patients with drug-induced liver injury: the DILIN prospective study. *Gastroenterology* 148: 1340-1352. e7
53. Abboud G, Kaplowitz N (2007) Drug-induced liver injury. *Drug Safety* 30: 277–294
54. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases LiverTox®. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>
55. Navarro VJ, Senior JR (2006) Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 354: 731–739. <https://doi.org/10.1056/NEJMr052270>
56. Benichou C (1990) Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J Hepatol* 11: 272–276

57. Navarro V (2010) Hepatic adverse event nomenclature document
58. Katarey D, Verma S (2016) Drug-induced liver injury. *Clin Med (Lond)* 16: s104-s109.
<https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-6-s104>
59. Myers RP, Shaheen AAM, Li B et al. (2008) Impact of liver disease, alcohol abuse, and unintentional ingestions on the outcomes of acetaminophen overdose. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 6: 918–925
60. Huang Y-S, Su W-J, Huang Y-H et al. (2007) Genetic polymorphisms of manganese superoxide dismutase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, glutathione S-transferase M1 and T1, and the susceptibility to drug-induced liver injury. *J Hepatol* 47: 128–134.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.02.009>
61. Fontana RJ (2008) Acute liver failure including acetaminophen overdose. *Medical Clinics of North America* 92: 761–794
62. Senior JR (2008) What is idiosyncratic hepatotoxicity? What is it not? *Hepatology* 47: 1813–1815
63. Kaplowitz N (2004) Drug-induced liver injury. *Clin Infect Dis* 38 Suppl 2: S44-8.
<https://doi.org/10.1086/381446>
64. Lammert C, Einarsson S, Saha C et al. (2008) Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: Search for signals. *Hepatology* 47: 2003–2009
65. Sgro C, Clinard F, Ouazir K et al. (2002) Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology* 36: 451–455.
<https://doi.org/10.1053/jhep.2002.34857>
66. Reuben A, Koch DG, Lee WM (2010) Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology* 52: 2065–2076.
<https://doi.org/10.1002/hep.23937>
67. Daly AK, Aithal GP, Leathart JBS et al. (2007) Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes. *Gastroenterology* 132: 272–281. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.023>
68. Boelsterli UA, Lim PLK (2007) Mitochondrial abnormalities—A link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicology and applied pharmacology* 220: 92–107.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.12.013>
69. Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35: 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
70. Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nature reviews Drug discovery* 4: 489–499

71. Fredriksson L, Herpers B, Benedetti G et al. (2011) Diclofenac inhibits tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor- κ B activation causing synergistic hepatocyte apoptosis. *Hepatology* 53: 2027–2041
72. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57: 1835–1840
73. Shehu AI, Ma X, Venkataramanan R (2017) Mechanisms of Drug-Induced Hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease* 21: 35–54
74. Fura A, Shu Y-Z, Zhu M et al. (2004) Discovering drugs through biological transformation: role of pharmacologically active metabolites in drug discovery. *J Med Chem* 47: 4339–4351
75. Guengerich FP (2007) Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical research in toxicology* 21: 70–83
76. Zanger UM, Schwab M (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* 138: 103–141.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
77. Aktories K, Forth W (2005) Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie: für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker; mit 303 Tabellen. Elsevier, Urban&FischerVerlag
78. Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M (2006) Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 25: 1679–1691
79. Li AP (2002) A review of the common properties of drugs with idiosyncratic hepatotoxicity and the “multiple determinant hypothesis” for the manifestation of idiosyncratic drug toxicity. *Chemico-biological interactions* 142: 7–23
80. Liebler DC, Guengerich FP (2005) Elucidating mechanisms of drug-induced toxicity. *Nature reviews Drug discovery* 4: 410–420
81. Williams DP, Park BK (2003) Idiosyncratic toxicity: the role of toxicophores and bioactivation. *Drug discovery today* 8: 1044–1050
82. Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL et al. (2005) The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 177–202
83. Labbe G, Pessayre D, Fromenty B (2008) Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundamental & clinical pharmacology* 22: 335–353
84. Wagner M, Zollner G, Trauner M (2009) New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *J Hepatol* 51: 565–580

85. Stieger B, Fattinger K, Madon J et al. (2000) Drug-and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 118: 422–430
86. Breitenbach J, Fischer D (2010) Die Pharmaindustrie. Einblick-Durchblick-Perspektiven
87. Committee for Medicinal Products for Human Use Non-clinical Guideline on Drug-induced Hepatotoxicity.
www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500003355
88. Olson H, Betton G, Robinson D et al. (2000) Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 32: 56–67.
<https://doi.org/10.1006/rtph.2000.1399>
89. Russell WMS, Burch RL, Hume CW (1959) The principles of humane experimental technique. Methuen London
90. National RC (2007) Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. National Academies Press
91. Europäische Kommission. <https://cordis.europa.eu/news/rcn/21975/de>
92. Horvath S (1980) Cytotoxicity of drugs and diverse chemical agents to cell cultures. *Toxicology* 16: 59–66
93. International Organisation for Standardisation (2009) Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity(ISO 10993-5:2009)
94. Gerets HHJ, Tilmant K, Gerin B et al. (2012) Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol* 28: 69–87
95. Groneberg DA, Grosse-Siestrup C, Fischer A (2002) In vitro models to study hepatotoxicity. *Toxicol Pathol* 30: 394–399
96. Gómez-Lechón MJ, Castell JV, Donato MT (2007) Hepatocytes—the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chemico-biological interactions* 168: 30–50
97. LeCluyse EL (2001) Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13: 343–368
98. Ullrich A, Berg C, Hengstler JG et al. (2007) Use of a standardised and validated long-term human hepatocyte culture system for repetitive analyses of drugs: repeated administrations of acetaminophen reduces albumin and urea secretion. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation* 24: 35–40

99. Nakamura K, Kato N, Aizawa K et al. (2011) Expression of albumin and cytochrome P450 enzymes in HepG2 cells cultured with a nanotechnology-based culture plate with microfabricated scaffold. *The Journal of toxicological sciences* 36: 625–633
100. Knasmüller S, Mersch-Sundermann V, Kevekordes S et al. (2004) Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology* 198: 315–328
101. Doß S, Potschka H, Doß F et al. (2017) Hepatotoxicity of Antimycotics Used for Invasive Fungal Infections: In Vitro Results, Article ID 9658018. *BioMed research international* 2017
102. Sauer M, Piel I, Haubner C et al. (2017) Rocuronium is more hepatotoxic than succinylcholine in vitro. *European Journal of Anaesthesiology (EJA)* 34: 623–627
103. Stiffel Melanie (2014) Biologische Wirkung von Caprylat - Auswirkung in humanen Albumin-lösungen für therapeutische Anwendungen., Dissertation, Universität Rostock
104. Jennen DGJ, Magkoufopoulou C, Ketelslegers HB et al. (2010) Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicological sciences* 115: 66–79
105. Sauer M, Haubner C, Mencke T et al. (2012) Impaired cell functions of hepatocytes incubated with plasma of septic patients. *Inflammation Research* 61: 609–616
106. Wilkening S, Stahl F, Bader A (2003) Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* 31: 1035–1042. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.8.1035>
107. Uetrecht JP (2010) Adverse drug reactions. Springer, Heidelberg, London
108. Mehta S, McCullagh I, Burry L Current Sedation Practices: Lessons Learned from International Surveys. *Critical Care Clinics* 25: 471–488. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2009.04.001>
109. Carrión MI, Ayuso D, Marcos M et al. (2000) Accidental removal of endotracheal and nasogastric tubes and intravascular catheters. *Crit Care Med* 28: 63–66
110. Berlit P (2006) Therapielexikon Neurologie. Springer-Verlag
111. Roewer N, Thiel H (2013) Taschenatlas Anästhesie. Georg Thieme Verlag
112. Sessler CN, Gosnell MS, Grap MJ et al. (2002) The Richmond Agitation–Sedation Scale. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1338–1344. <https://doi.org/10.1164/rccm.2107138>
113. Martin J, Parsch A, Franck M et al. (2005) Practice of sedation and analgesia in German intensive care units: results of a national survey. *Crit Care* 9: R117-23. <https://doi.org/10.1186/cc3035>
114. Payen MPDJ-F, Chanques MG, Mantz MPDJ et al. (2007) Current Practices in Sedation and Analgesia for Mechanically Ventilated Critically Ill PatientsA Prospective Multicenter

- Patient-based Study. *Anesthesiology* 106: 687–695.
<https://doi.org/10.1097/01.anes.0000264747.09017.da>
115. World Health Organization (2014) The selection and use of essential medicines: Report of the WHO Expert Committee, 2013 (including the 18th WHO Model List of essential medicines and the 4th WHO Model List of essential medicines for children). WHO technical report series, 0512-3054, vol 985. World Health Organization, Geneva
116. Walser A, Zenchoff G, Fryer RI (1976) Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. 75. 7-Hydroxyaminobenzodiazepines and derivatives. *J Med Chem* 19: 1378–1381
117. Claassen J, Hirsch LJ, Emerson RG et al. (2002) Treatment of refractory status epilepticus with pentobarbital, propofol, or midazolam: a systematic review. *Epilepsia* 43: 146–153
118. Reves JG, Fragen RJ, Vinik HR et al. (1985) Midazolam: pharmacology and uses. *Anesthesiology* 62: 310–324
119. Rudolph U, Mohler H (2006) GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* 6: 18–23.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.10.003>
120. Gerecke M (1983) Chemical structure and properties of midazolam compared with other benzodiazepines. *Br J Clin Pharmacol* 16 Suppl 1: 11S-16S
121. Greenblatt DJ, Arendt RM, Abernethy DR et al. (1983) In vitro quantitation of benzodiazepine lipophilicity: relation to in vivo distribution. *Br J Anaesth* 55: 985–989
122. Arendt RM, Greenblatt DJ, deJong RH et al. (1983) In vitro correlates of benzodiazepine cerebrospinal fluid uptake, pharmacodynamic action and peripheral distribution. *J Pharmacol Exp Ther* 227: 98–106
123. Bauer TM, Ritz R, Haberthür C et al. (1995) Prolonged sedation due to accumulation of conjugated metabolites of midazolam. *Lancet* 346: 145–147
124. Bailey PL, Pace NL, Ashburn MA et al. (1990) Frequent hypoxemia and apnea after sedation with midazolam and fentanyl. *Anesthesiology* 73: 826–830
125. Bein T, Hergeth K, Bäuml M (2013) *Intensivbuch Pharmakotherapie: Wirkstoffprofile, Behandlungsstrategien, Fehler und Gefahren in der Intensivmedizin*. Medizinisch Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Berlin
126. Howie AF, Spencer E, Beckett GJ (1992) Aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and glutathione transferase in plasma during and after sedation by low-dose isoflurane or midazolam. *Clin Chem* 38: 476–479
127. Thompson KA, Goodale DB (2000) The recent development of propofol (DIPRIVAN). *Intensive Care Med* 26 Suppl 4: S400-4

128. Bennett SN, McNeil MM, Bland LA et al. (1995) Postoperative infections traced to contamination of an intravenous anesthetic, propofol. *N Engl J Med* 333: 147–154.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199507203330303>
129. McNeil MM, Lasker BA, Lott TJ et al. (1999) Postsurgical *Candida albicans* infections associated with an extrinsically contaminated intravenous anesthetic agent. *J Clin Microbiol* 37: 1398–1403
130. Jansson JR, Fukada T, Ozaki M et al. (2006) Propofol EDTA and reduced incidence of infection. *Anaesth Intensive Care* 34: 362–368
131. Herr DL, Kelly K, Hall JB et al. (2000) Safety and efficacy of propofol with EDTA when used for sedation of surgical intensive care unit patients. *Intensive Care Med* 26 Suppl 4: S452-62
132. Parke TJ, Stevens JE, Rice AS et al. (1992) Metabolic acidosis and fatal myocardial failure after propofol infusion in children: five case reports. *BMJ* 305: 613–616
133. Kam, P C A, Cardone D (2007) Propofol infusion syndrome. *Anaesthesia* 62: 690–701.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.2007.05055.x>
134. Roberts RJ, Barletta JF, Fong JJ et al. (2009) Incidence of propofol-related infusion syndrome in critically ill adults: a prospective, multicenter study. *Crit Care* 13: R169.
<https://doi.org/10.1186/cc8145>
135. Fujii Y, Itakura M (2008) Comparison of propofol, droperidol, and metoclopramide for prophylaxis of postoperative nausea and vomiting after breast cancer surgery: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study in Japanese patients. *Clin Ther* 30: 2024–2029. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2008.11.011>
136. Ewalenko P, Janny S, Dejonckheere M et al. (1996) Antiemetic effect of subhypnotic doses of propofol after thyroidectomy. *Br J Anaesth* 77: 463–467
137. Trapani G, Altomare C, Sanna E et al. (2000) Propofol in Anesthesia. Mechanism of Action, Structure-Activity Relationships, and Drug Delivery. *CMC* 7: 249–271.
<https://doi.org/10.2174/0929867003375335>
138. Kansaku F, Kumai T, Sasaki K et al. (2011) Individual differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anesthetic agent propofol with regard to CYP2B6 and UGT1A9 genotype and patient age. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 26: 532–537
139. Guitton J, Burronfosse T, Sanchez M et al. (1997) Quantitation of propofol metabolite, 2, 6-diisopropyl-1, 4-quinol, by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical letters* 30: 1369–1378
140. Court MH, Duan SX, Hesse LM et al. (2001) Cytochrome P-450 2B6 is responsible for interindividual variability of propofol hydroxylation by human liver microsomes. *Anesthesiology* 94: 110–119

141. Kneiseler G, Bachmann HS, Bechmann LP et al. (2010) A Rare Case of Propofol-Induced Acute Liver Failure and Literature Review. *Case Rep Gastroenterol* 4: 57–65.
<https://doi.org/10.1159/000262448>
142. Bourgoin A, Albanèse J, Wereszczynski N et al. (2003) Safety of sedation with ketamine in severe head injury patients: comparison with sufentanil. *Crit Care Med* 31: 711–717
143. Blonk MI, Koder BG, Bemt PM et al. (2010) Use of oral ketamine in chronic pain management: a review. *European journal of pain* 14: 466–472
144. Mathews DC, Zarate CA (2013) ASCP Corner: Current Status of Ketamine and Related Compounds for Depression. *The Journal of clinical psychiatry* 74: 516–517
145. Murrough JW (2012) Ketamine as a novel antidepressant: from synapse to behavior. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 91: 303–309
146. Jensen LL, Handberg G, HELBO-HANSEN HS et al. (2008) No morphine sparing effect of ketamine added to morphine for patient-controlled intravenous analgesia after uterine artery embolization. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 52: 479–486
147. Chen X, Shu S, Bayliss DA (2009) HCN1 channel subunits are a molecular substrate for hypnotic actions of ketamine. *The Journal of Neuroscience* 29: 600–609
148. Barash PG (2009) *Clinical anesthesia*. Lippincott Williams & Wilkins
149. White PF, Schüttler J, Shafer A et al. (1985) Comparative pharmacology of the ketamine isomers. Studies in volunteers. *Br J Anaesth* 57: 197–203
150. Hempelmann G, Kuhn DFM (1997) Klinischer Stellenwert des S-(+)-Ketamin. *Der Anaesthesist* 46: S3-S7
151. Grant IS, Nimmo WS, Clements JA (1981) Pharmacokinetics and analgesic effects of im and oral ketamine. *Br J Anaesth* 53: 805–810
152. Li Y, Collier JK, Hutchinson MR et al. (2013) The CYP2B6* 6 allele significantly alters the N-demethylation of ketamine enantiomers in vitro. *Drug metabolism and disposition* 41: 1264–1272
153. Zanos P, Moaddel R, Morris PJ et al. (2018) Ketamine and Ketamine Metabolite Pharmacology: Insights into Therapeutic Mechanisms. *Pharmacological Reviews* 70: 621. <https://doi.org/10.1124/pr.117.015198>
154. Dinis-Oliveira RJ (2017) Metabolism and metabolomics of ketamine: a toxicological approach. *Forensic Sciences Research* 2: 2–10.
<https://doi.org/10.1080/20961790.2017.1285219>
155. Tan S, Chan WM, Wai MSM et al. (2011) Ketamine effects on the urogenital system—changes in the urinary bladder and sperm motility. *Microscopy research and technique* 74: 1192–1198

156. Noppers IM, Niesters M, Aarts LP et al. (2011) Drug-induced liver injury following a repeated course of ketamine treatment for chronic pain in CRPS type 1 patients: a report of 3 cases. *Pain* 152: 2173–2178
157. Lo RSC, Krishnamoorthy R, Freeman JG et al. (2011) Cholestasis and biliary dilatation associated with chronic ketamine abuse: a case series. *Singapore Med J* 52: e52-5
158. Wong SW, Lee KF, Wong J et al. (2009) Dilated common bile ducts mimicking choledochal cysts in ketamine abusers. *Hong Kong Med J* 15: 53–56
159. Wong GL-H, Tam Y-H, Ng C-F et al. (2014) Liver injury is common among chronic abusers of ketamine. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12: 1759-62.e1.
<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.01.041>
160. Yu W-L, Cho CC-M, Lung PF-C et al. (2014) Ketamine-related cholangiopathy: a retrospective study on clinical and imaging findings. *Abdom Imaging* 39: 1241–1246.
<https://doi.org/10.1007/s00261-014-0173-2>
161. Turkish A, Luo JJ, Lefkowitz JH (2013) Ketamine abuse, biliary tract disease, and secondary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 58: 825–827.
<https://doi.org/10.1002/hep.26459>
162. Kalkan Y, Tomak Y, Altuner D et al. (2013) Hepatic effects of ketamine administration for 2 weeks in rats. *Human & Experimental Toxicology* 33: 32–40.
<https://doi.org/10.1177/0960327112472990>
163. Venancio C, Antunes LM, Felix L et al. (2013) Chronic ketamine administration impairs mitochondrial complex I in the rat liver. *Life Sciences* 93: 464–470.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.001>
164. Huynh F, Mabasa VH, Ensom MHH (2009) A critical review: does thiopental continuous infusion warrant therapeutic drug monitoring in the critical care population? *Therapeutic drug monitoring* 31: 153–169
165. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (2004) Basic & clinical pharmacology. Lange Medical Books/McGraw-Hill New York, NY, USA
166. Longnecker DE (2012) Anesthesiology, 2. ed. McGraw-Hill, New York
167. Russo H, Bressolle F (1998) Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Thiopental. *Clinical Pharmacokinetics* 35: 95–134. <https://doi.org/10.2165/00003088-199835020-00002>
168. Hasselstrom L, Kristoffersen MB (1979) Hepatitis following thiopentone. A case report. *Br J Anaesth* 51: 801–804
169. Whipple JK, Lewis KS, Quebbeman EJ et al. (1995) Analysis of pain management in critically ill patients. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 15: 592–599

170. Epstein J, Breslow MJ (1999) The stress response of critical illness. *Critical Care Clinics* 15: 17–33
171. Dasta JF, Kane-Gill S (2011) Pharmacoeconomics of sedation in the ICU. *Anesthesiology clinics* 29: 707–720
172. Bause H, Kochs E, Scholz J et al. (2011) *Duale Reihe Anästhesie: Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie*. Georg Thieme Verlag
173. Miller RD, Eriksson LI, La Fleisher et al. (2010) *Miller's Anesthesia*. Philadelphia: Churchill Livingstone
174. Filizola M, Laakkonen L, loew GH (1999) 3D modeling, ligand binding and activation studies of the cloned mouse δ , μ and κ opioid receptors. *Protein Engineering, Design and Selection* 12: 927–942. <https://doi.org/10.1093/protein/12.11.927>
175. Beers R, Camporesi E (2004) Remifentanyl Update. *CNS Drugs* 18: 1085–1104. <https://doi.org/10.2165/00023210-200418150-00004>
176. Striebel HW (2013) *Die Anästhesie: Band I Grundlagen-Formen der Allgemeinanästhesie-Lokal-und Regionalanästhesie-Besonderheiten-Narkoseprobleme Band II Nebenerkrankungen-Fachspezifische Anästhesie-Aufwachraum-Lebensrettende Sofortmaßnahmen-Anhang*. Schattauer Verlag
177. Lüllmann H, Mohr K (2006) *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen-Medikamente gezielt einsetzen; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker; 129 Tabellen*. Georg Thieme Verlag
178. Feerman DE, Lasker JM (1996) Metabolism of fentanyl, a synthetic opioid analgesic, by human liver microsomes. Role of CYP3A4. *Drug metabolism and disposition* 24: 932–939
179. Rang ST, Field J, Irving C (2008) Serotonin toxicity caused by an interaction between fentanyl and paroxetine. *Canadian Journal of Anaesthesia* 55: 521. <https://doi.org/10.1007/BF03016672>
180. Scott LJ, Perry CM (2005) Remifentanyl. *Drugs* 65: 1793–1823. <https://doi.org/10.2165/00003495-200565130-00007>
181. Kapila A, Glass PS, Jacobs JR et al. (1995) Measured context-sensitive half-times of remifentanyl and alfentanil. *Anesthesiology* 83: 968–975
182. Cox PEH, Langemeijer BMWE, Gubbens-Stibbe BJM et al. (1999) The Comparative Pharmacodynamics of Remifentanyl and Its Metabolite, GR90291, in a Rat Electroencephalographic Model. *Anesthesiology* 90: 535–544
183. Egan TD, Lemmens HJ, Fiset P et al. (1993) The pharmacokinetics of the new short-acting opioid remifentanyl (GI87084B) in healthy adult male volunteers. *Anesthesiology* 79: 881–892

184. Rozendaal FW, Spronk PE, Snellen FF et al. (2009) Remifentanil-propofol analgo-sedation shortens duration of ventilation and length of ICU stay compared to a conventional regimen: a centre randomised, cross-over, open-label study in the Netherlands. *Intensive Care Med* 35: 291–298. <https://doi.org/10.1007/s00134-008-1328-9>
185. Muellejans B, Matthey T, Scholpp J et al. (2006) Sedation in the intensive care unit with remifentanil/propofol versus midazolam/fentanyl: a randomised, open-label, pharmacoeconomic trial. *Critical Care* 10: R91. <https://doi.org/10.1186/cc4939>
186. Navapurkar VU, Archer S, Gupta SK et al. (1998) Metabolism of remifentanil during liver transplantation. *BJA: British Journal of Anaesthesia* 81: 881–886. <https://doi.org/10.1093/bja/81.6.881>
187. Pitsiu M, Wilmer A, Bodenham A et al. (2004) Pharmacokinetics of remifentanil and its major metabolite, remifentanil acid, in ICU patients with renal impairment. *Br J Anaesth* 92: 493–503
188. Niemegeers CJ, Schellekens KH, van Bever WF et al. (1975) Sufentanil, a very potent and extremely safe intravenous morphine-like compound in mice, rats and dogs. *Arzneimittelforschung* 26: 1551–1556
189. Tateishi T, Krivoruk Y, Ueng YF et al. (1996) Identification of human liver cytochrome P-450 3A4 as the enzyme responsible for fentanyl and sufentanil N-dealkylation. *Anesth Analg* 82: 167–172
190. Moschitto LJ, Greenblatt DJ (1983) Concentration-independent plasma protein binding of benzodiazepines. *J Pharm Pharmacol* 35: 179–180
191. Servin F, Desmonts JM, Haberer JP et al. (1988) Pharmacokinetics and protein binding of propofol in patients with cirrhosis. *Anesthesiology* 69: 887–891
192. Dayton PG, Stiller RL, Cook et al. (1983) The binding of ketamine to plasma proteins: emphasis on human plasma. *Eur J Clin Pharmacol* 24: 825–831
193. Morgan DJ, Blackman GL, Paull JD et al. (1981) Pharmacokinetics and plasma binding of thiopental. I: Studies in surgical patients. *Anesthesiology* 54: 468–473
194. Burch PG, Stanski DR (1982) Decreased protein binding and thiopental kinetics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 32: 212–217
195. Benet LZ, Hoener B-A (2002) Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 71: 115–121
196. Malacrida R, Fritz ME, Suter PM et al. (1992) Pharmacokinetics of midazolam administered by continuous intravenous infusion to intensive care patients. *Crit Care Med* 20: 1123–1126

197. Beller JP, Pottecher T, Lugnier A et al. (1988) Prolonged sedation with propofol in ICU patients: recovery and blood concentration changes during periodic interruptions in infusion. *Br J Anaesth* 61: 583–588
198. Bailie GR, Cockshott ID, Douglas EJ et al. (1992) Pharmacokinetics of propofol during and after long-term continuous infusion for maintenance of sedation in ICU patients. *Br J Anaesth* 68: 486–491
199. Adams HA, Kochs E, Spies C (eds) (2008) *Anästhesiologie*
200. Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ et al. (2002) *Clinical anesthesiology*. McGraw-hill New York
201. Russo H, Dubboin MP, Bressolle F et al. (1997) Time-dependent pharmacokinetics of high dose thiopental infusion in intensive care patients. *Pharmaceutical research* 14: 1583–1588
202. McClain DA, Hug CC (1980) Intravenous fentanyl kinetics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 28: 106–114
203. Cohen SE, Tan S, White PF et al. (1988) Sufentanil analgesia following cesarean section: epidural versus intravenous administration. *Obstetric Anesthesia Digest* 8: 87
204. Michelsen LG, Hug CC (1996) The pharmacokinetics of remifentanyl. *Journal of clinical anesthesia* 8: 679–682
205. Doostdar H, Duthie SJ, Burke MD et al. (1988) The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line. *FEBS Letters* 241: 15–18. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81021-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81021-4)
206. Guigal N, Seree E, Nguyen QB et al. (2001) Serum induces a transcriptional activation of CYP1A1 gene in HepG2 independently of the AhR pathway. *Life Sciences* 68: 2141–2150. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01022-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01022-0)
207. Dawson JR, Adams DJ, Wolf CR (1985) Induction of drug metabolizing enzymes in human liver cell line Hep G2. *FEBS Letters* 183: 219–222. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80780-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80780-8)
208. Belinsky SA, Popp JA, Kauffman FC et al. (1984) Trypan blue uptake as a new method to investigate hepatotoxicity in periportal and pericentral regions of the liver lobule: studies with allyl alcohol in the perfused liver. *J Pharmacol Exp Ther* 230: 755
209. Schmitz S (2011) *Der Experimentator: Zellkultur*, 3. Aufl. Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
210. Bais R, Philcox M (1994) Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC Method for Lactate Dehydrogenase (L-Lactate: NAD⁺Oxidoreductase, EC 1.1.1.27). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 32: 639–655

211. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD et al. (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48: 4827–4833
212. Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review* 11: 127–152
213. Burke MD, Mayer RT (1974) Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug metabolism and disposition* 2: 583–588
214. Petrusis JR, Chen G, Benn S et al. (2001) Application of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to mixtures of halogenated aromatic compounds. *Environmental toxicology* 16: 177–184
215. Sauer M Verwendung von humanen Hepatozyten zur Ermittlung der Leberfunktion und Leberregeneration(DE102006005526)
216. Haubner C (2010) Zytotoxizitätstest zur Ermittlung der Leberfunktion auf der Basis humanen Hepatozyten (Biosensor) bei septischen Patienten., Dissertation, Universität Rostock
217. Sauer M, Doß S, Ehler J et al. (2017) Procalcitonin Impairs Liver Cell Viability and Function In Vitro: A Potential New Mechanism of Liver Dysfunction and Failure during Sepsis? Article ID 6130725. *BioMed research international* 2017
218. Sauer M, Haubner C, Richter G et al. (2018) impaired cell Viability and Functionality of hepatocytes after incubation With septic Plasma—results of a second Prospective Biosensor study. *Frontiers in immunology* 9: 1448
219. Piel I (2014) In-vitro Testung des hepatotoxischen Potentials von Muskelrelaxantien. Dissertation, Universität Rostock
220. Doß S (2015) Zellbasierte Testung von Hepatotoxizität mit der permanenten Zelllinie HepG2/C3A: Standardisierung, Validierung, Parametererweiterung und Testung von intensivmedizinisch relevanten Medikamenten am Beispiel der Antimykotika und Paracetamol, Dissertation, Universität Rostock
221. Jinghai J. Xu, Dolores Diaz, Peter J. O'Brien (2004) Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chemico-biological interactions* 150: 115–128. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.09.011>
222. Buchwald H (2014) Arzneimittelgesetz: Arzneimittelgesetz (AMG) - Heilmittelwerbebezug (HWG) - Apothekengesetz (ApoG) - Apothekenbetriebsordnung (ApBetrO) - Arzneimittelhandelsverordnung (AM-HandelsV) - Arzneimittel- und Wirkstoffherstellerverordnung (AMWHV), 8., aktualis. Aufl. Arzneimittelrecht. Bundesanzeiger, Köln

223. Olson H, Betton G, Robinson D et al. (2000) Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 32: 56–67
224. Kelly JH (1994) Permanent human hepatocyte cell line and its use in a liver assist device (LAD)
225. Flynn TJ, Ferguson MS (2008) Multiendpoint mechanistic profiling of hepatotoxicants in HepG2/C3A human hepatoma cells and novel statistical approaches for development of a prediction model for acute hepatotoxicity. *Toxicology In Vitro* 22: 1618–1631. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.04.016>
226. Knasmüller S, Mersch-Sundermann V, Kevekordes S et al. (2004) Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology* 198: 315–328
227. Gerets HHJ, Tilmant K, Gerin B et al. (2012) Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol* 28: 69–87. <https://doi.org/10.1007/s10565-011-9208-4>
228. Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A et al. (2007) Expression of Thirty-six Drug Transporter Genes in Human Intestine, Liver, Kidney, and Organotypic Cell Lines. *Drug metabolism and disposition* 35: 1333–1340. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.014902>
229. Larrey D, Pageaux GP (1997) Genetic predisposition to drug-induced hepatotoxicity. *J Hepatol* 26: 12–21
230. Huang Y-S, Chern H-D, Su W-J et al. (2002) Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 35: 883–889
231. Höschele D (2006) Cell culture models for the investigation of NRTI-induced mitochondrial toxicity.: Relevance for the prediction of clinical toxicity. *Toxicol In Vitro* 20: 535–546
232. Long B, Muhamad R, Yan G et al. (2016) Quantitative proteomics analysis reveals glutamine deprivation activates fatty acid β -oxidation pathway in HepG2 cells. *Amino Acids* 48: 1297–1307. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2182-7>
233. Iyer VV, Yang H, Ierapetritou MG et al. (2010) Effects of glucose and insulin on HepG2-C3A cell metabolism. *Biotechnology and bioengineering* 107: 347–356
234. Marroquin LD, Hynes J, Dykens JA et al. (2007) Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicological sciences* 97: 539–547

235. Nishida Y, Taniguchi A (2013) Induction of albumin expression in HepG2 cells using immobilized simplified recombinant fibronectin protein. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 49: 400–407
236. Kresse M, Latta M, Künstle G et al. (2005) Kupffer cell-expressed membrane-bound TNF mediates melphalan hepatotoxicity via activation of both TNF receptors. *The Journal of Immunology* 175: 4076–4083
237. Rose KA, Holman NS, Green AM et al. (2016) Co-culture of hepatocytes and Kupffer cells as an in vitro model of inflammation and drug-induced hepatotoxicity. *Journal of pharmaceutical sciences* 105: 950–964
238. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D et al. (2006) High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Archives of Toxicology* 80: 580–604. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0091-3>
239. Pramfalk C, Larsson L, Härdfeldt J et al. (2016) Culturing of HepG2 cells with human serum improve their functionality and suitability in studies of lipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861: 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.10.008>
240. Nojiri S, Joh T (2014) Albumin suppresses human hepatocellular carcinoma proliferation and the cell cycle. *Int J Mol Sci* 15: 5163–5174. <https://doi.org/10.3390/ijms15035163>
241. Bär A (2011) Intensivmedizin im Wandel der Zeit: Patientenanalyse der internistischen Intensivstation 92 des Universitätsklinikums Regensburg aus dem Jahre 2001 und historischer Vergleich der Ergebnisse mit Beschreibungen aus Mainz und Frankfurt
242. Dong W, Simeonova PP, Gallucci R et al. (1998) Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Toxicology and applied pharmacology* 151: 359–366
243. Hu X-Z, Xu Y, Hu D-C et al. (2007) Apoptosis induction on human hepatoma cells Hep G2 of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209). *Toxicol Lett* 171: 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.04.002>
244. Altman SA, Randers L, Rao G (1993) Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnology progress* 9: 671–674
245. Bouma M-E, Rogier E, Verthier N et al. (1989) Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: Morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 25: 267–275. <https://doi.org/10.1007/BF02628465>
246. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65: 55–63

247. Johno H, Takahashi S, Kitamura M (2010) Influences of Acidic Conditions on Formazan Assay: A Cautionary Note. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162: 1529–1535. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8934-z>
248. Wang S, Yu H, Wickliffe JK (2011) Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicology In Vitro* 25: 2147–2151. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.07.007>
249. Han M, Li J, Tan Q et al. (2010) Limitations of the use of MTT assay for screening in drug discovery. *J Chin Pharmaceu Sci* 19: 195–200
250. Funk D, Schrenk HH, Frei E (2007) Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay. *BioTechniques* 43: 178, 180, 182 passim-178, 180, 182 passim
251. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB et al. (2004) Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem* 279: 23847–23850. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400004200>
252. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M et al. (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270: 414–423
253. Drahushuk AT, McGarrigle BP, Larsen KE et al. (1998) Detection of CYP1A1 protein in human liver and induction by TCDD in precision-cut liver slices incubated in dynamic organ culture. *Carcinogenesis* 19: 1361–1368
254. Papp-Jámbor C, Jaschinski U, Forst H (2002) Cytochrom-P450-Enzyme und ihre Bedeutung für Medikamenteninteraktionen. *Der Anaesthesist* 51: 2–15. <https://doi.org/10.1007/s101-002-8365-5>
255. Honkakoski P, Negishi M (2000) Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochemical Journal* 347: 321–337
256. Burton ME (2006) *Applied pharmacokinetics & pharmacodynamics: principles of therapeutic drug monitoring*. Lippincott Williams & Wilkins
257. Schweikl H, Taylor JA, Kitareewan S et al. (1993) Expression of CYP1A1 and CYP1A2 genes in human liver. *Pharmacogenetics and Genomics* 3: 239–249
258. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Pérez-Cataldo G et al. (2013) HepG2 cells simultaneously expressing five P450 enzymes for the screening of hepatotoxicity: identification of bioactivable drugs and the potential mechanism of toxicity involved. *Archives of Toxicology* 87: 1115–1127
259. Chung I, Bresnick E (1994) 3-Methylcholanthrene-mediated induction of cytochrome P4501A2 in human hepatoma HepG2 cells as quantified by the reverse transcription-polymerase chain reaction. *Arch Biochem Biophys* 314: 75–81

260. Ohno S, Kobayashi K, Uchida S et al. (2012) Cytotoxicity and type of cell death induced by midazolam in human oral normal and tumor cells. *Anticancer research* 32: 4737–4747
261. Vrzal R, Kubesova K, Pavek P et al. (2010) Benzodiazepines medazepam and midazolam are activators of pregnane X receptor and weak inducers of CYP3A4: investigation in primary cultures of human hepatocytes and hepatocarcinoma cell lines. *Toxicol Lett* 193: 183–188
262. Foti RS, Rock DA, Wienkers LC et al. (2010) Selection of alternative CYP3A4 probe substrates for clinical drug interaction studies using in vitro data and in vivo simulation. *Drug Metab Dispos* 38: 981–987. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.032094>
263. Zhang J, Wu G-q, Zhang Y et al. (2013) Propofol induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by upregulation of microRNA-199a expression. *Cell Biol Int* 37: 227–232. <https://doi.org/10.1002/cbin.10034>
264. Zhang J, Zhang D, Wu G-q et al. (2013) Propofol inhibits the adhesion of hepatocellular carcinoma cells by upregulating microRNA-199a and downregulating MMP-9 expression. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 12: 305–309. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(13\)60048-X](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(13)60048-X)
265. Jia XQ, Cheng HQ, Qian X et al. (2012) Lentivirus-mediated overexpression of microRNA-199a inhibits cell proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Cell biochemistry and biophysics* 62: 237–244
266. Inada T, Kubo K, Shingu K (2011) Possible link between cyclooxygenase-inhibiting and antitumor properties of propofol. *J Anesth* 25: 569–575. <https://doi.org/10.1007/s00540-011-1163-y>
267. Ranjbar A, Sharifzadeh M, Karimi J et al. (2014) Propofol attenuates toxic oxidative stress by CCl₄ in liver mitochondria and blood in rat. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 13: 253
268. Kajimoto M, Atkinson DB, Ledee DR et al. (2013) Propofol compared with isoflurane inhibits mitochondrial metabolism in immature swine cerebral cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 34: 514–521. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.229>
269. Acco A, Comar JF, Bracht A (2004) Metabolic Effects of Propofol in the Isolated Perfused Rat Liver. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 95: 166–174. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2004.pto950404.x>
270. Campos SP, Lurdes Pinto M de, Gomes G et al. (2016) Expression of CYP1A1 and CYP1A2 in the liver and kidney of rabbits after prolonged infusion of propofol. *Experimental and Toxicologic Pathology* 68: 521–531

271. McKillop D, Wild MJ, Butters CJ et al. (1998) Effects of propofol on human hepatic microsomal cytochrome P450 activities. *Xenobiotica* 28: 845–853.
<https://doi.org/10.1080/004982598239092>
272. Yang M-X, Cederbaum AI (1997) Glycerol Increases Content and Activity of Human Cytochrome P-450E1 in a Transduced HepG2 Cell Line by Protein Stabilization. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 21: 340–347.
<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1997.tb03770.x>
273. Sugiyama N, Mizuguchi T, Aoki T et al. Glycerol Suppresses Proliferation of Rat Hepatocytes and Human HepG2 Cells. *Journal of Surgical Research* 103: 236–242.
<https://doi.org/10.1006/jsre.2002.6367>
274. Cho H-K, Lee J-y, Jang Y-m et al. (2008) Involvement of endoplasmic reticulum stress in palmitate-induced apoptosis in HepG2 cells. *Toxicological Research* 24: 129–135
275. Ueda K, Asai Y, Yoshimura Y et al. (2008) Effect of oil-in-water lipid emulsions prepared with fish oil or soybean oil on the growth of MCF-7 cells and HepG2 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60: 1069–1075. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.8.0013>
276. Zhang Y, Huang C, Sheng X et al. (2009) Lecithin promotes adipocyte differentiation and hepatic lipid accumulation. *International journal of molecular medicine* 23: 449
277. Lee S-T, Wu T-T, Yu P-Y et al. (2009) Apoptotic insults to human HepG2 cells induced by S-(+)-ketamine occurs through activation of a Bax-mitochondria-caspase protease pathway. *Br J Anaesth* 102: 80–89
278. Chang H-C, Chen T-L, Chen R-M (2008) Cytoskeleton Interruption in Human Hepatoma HepG2 Cells Induced by Ketamine Occurs Possibly through Suppression of Calcium Mobilization and Mitochondrial Function. *Drug metabolism and disposition* 37: 24–31.
<https://doi.org/10.1124/dmd.108.023325>
279. Markham A, Cameron I, White SJ (1981) The effect of ketamine hydrochloride, a non-barbiturate parenteral anaesthetic on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochemical Pharmacology* 30: 2165–2168. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(81\)90238-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(81)90238-0)
280. Lin F, He Y, Zhang L et al. (2015) Assessment of the effect of ketamine on cytochrome P450 isoforms activity in rats by cocktail method. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8: 4335–4341
281. Roesslein M, Schibilsky D, Muller L et al. (2008) Thiopental Protects Human T Lymphocytes from Apoptosis in Vitro via the Expression of Heat Shock Protein 70. *J Pharmacol Exp Ther* 325: 217. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.133108>
282. Zamparelli M, Eaton S, Quant PA et al. (1999) Analgesic doses of fentanyl impair oxidative metabolism of neonatal hepatocytes. *Journal of pediatric surgery* 34: 260–263

283. Vilela SMF, Santos DJ, Félix L et al. (2009) Are fentanyl and remifentanyl safe opioids for rat brain mitochondrial bioenergetics? *Mitochondrion* 9: 247–253
284. Djafarzadeh S, Vuda M, Jeger V et al. (2016) The Effects of Fentanyl on Hepatic Mitochondrial Function. *Anesthesia & Analgesia* 123: 311–325.
<https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001280>
285. Djafarzadeh S, Vuda M, Takala J et al. (2012) Effect of Remifentanyl on Mitochondrial Oxygen Consumption of Cultured Human Hepatocytes. *PLOS ONE* 7: e45195.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045195>
286. Yang L-Q, Tao K-M, Liu Y-T et al. (2011) Remifentanyl preconditioning reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via inducible nitric oxide synthase expression. *Anesthesiology* 114: 1036–1047
287. Zhang Y, Irwin MG, Wong TM et al. (2005) Remifentanyl preconditioning confers cardioprotection via cardiac kappa-and delta-opioid receptors. *Anesthesiology* 102: 371–378
288. Dulbecco R, Freeman G (1959) Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8: 396–397
289. Jaume M, Jacquet S, Cavaillès P et al. (2004) Opioid receptor blockade reduces Fas-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 40: 1136–1143. <https://doi.org/10.1002/hep.20428>
290. Kawase M, Sakagami H, Furuya K et al. (2002) Cell death-inducing activity of opiates in human oral tumor cell lines. *Anticancer research* 22: 211
291. Fuggetta MP, Di Francesco P, Falchetti R et al. (2005) Effect of morphine on cell-mediated immune responses of human lymphocytes against allogeneic malignant cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 24: 255

8 Anhang

8.1.1 pH-Wert im Medium

Testsubstanz	Medikament	pH-Wert		
		C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	3,39	7,71 7,71 / 7,75	7,71 7,69 / 7,73	7,82 7,78 / 7,82
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	8,04	7,69 7,69 / 7,71	7,73 7,73 / 7,75	7,69 7,67 / 7,69
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	3,85	7,70 7,70 / 7,71	7,79 7,78 / 7,80	7,81 7,80 / 7,82
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	10,59	7,75 7,75 / 7,77	7,79 7,79 / 7,83	8,01 * 7,92 / 8,01
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	4,19	7,74 7,72 / 7,76	7,68 7,66 / 7,70	7,68 7,68 / 7,68
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	3,21	7,66 7,65 / 7,66	7,62 7,60 / 7,65	7,62 7,62 /
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	3,54	7,66 7,65 / 7,68	7,75 7,73 / 7,78	7,71 7,70 / 7,72
Negativkontrolle		7,75 7,71 / 7,85		

TABELLE 18 pH-Wert der verschiedenen Medikamentenkonzentrationen im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

8.1.2 pH-Wert im Plasma

Testsubstanz	Medikament	pH-Wert		
		C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	3,39	7,63 7,61 / 7,65	7,88 * 7,79 / 7,89	7,74 7,71 / 7,74
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	8,04	7,64 7,63 / 7,65	7,68 7,67 / 7,69	7,68 7,64 / 7,68
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	3,85	7,64 7,64 / 7,65	7,74 * 7,72 / 7,74	7,73 * 7,71 / 7,74
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	10,59	7,71 * 7,70 / 7,71	7,95 * 7,84 / 7,97	7,76 * 7,74 / 7,77
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	4,19	7,67 7,66 / 7,67	7,65 7,64 / 7,65	7,64 7,63 / 7,68
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	3,21	7,58 7,58 / 7,59	7,64 7,61 / 7,76	7,58 7,56 / 7,58
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	3,54	7,63 7,60 / 7,64	7,64 7,63 / 7,64	7,63 7,60 / 7,67
Negativkontrolle		7,66 7,60 / 7,69		

TABELLE 19 pH-Wert der Medikamentenkonzentrationen Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

8.1.3 Zellzahl und Vitalität im Medium

Testsubstanz	Zellzahl [$\times 10^3/\text{ml}$]		
	C_{max}	C_{5x}	C_{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	775 610 / 1103	1000 * 678 / 1192	905 * 675 / 1040
Propofol (2 $\mu\text{g/ml}$ 10 $\mu\text{g/ml}$ 20 $\mu\text{g/ml}$)	775 625 / 830	750 675 / 1030	835 * 740 / 935
S-Ketamin (1 $\mu\text{g/ml}$ 5 $\mu\text{g/ml}$ 10 $\mu\text{g/ml}$)	712 640 / 1030	720 590 / 960	750 565 / 960
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	770 601 / 869	790 631 / 944	610 481 / 720
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	825 589 / 939	745 623 / 1050	873 * 723 / 1020
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	565 438 / 788	538 400 / 950	548 500 / 881
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	485 * 376 / 561	473 * 353 / 589	503 * 314 / 608
Negativkontrolle	683 614 / 740		

TABELLE 20 Zellzahl nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

Testsubstanz	Vitalität [%]		
	C_{max}	C_{5x}	C_{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	91,55* 83,63 / 93,45	89,89 * 85,46 / 93,79	92,80 90,19 / 94,87
Propofol (2 $\mu\text{g/ml}$ 10 $\mu\text{g/ml}$ 20 $\mu\text{g/ml}$)	86,02 * 77,21 / 89,95	84,87 * 81,82 / 93,42	87,07 * 84,23 / 90,91
S-Ketamin (1 $\mu\text{g/ml}$ 5 $\mu\text{g/ml}$ 10 $\mu\text{g/ml}$)	90,14 * 87,92 / 92,63	88,12* 87,23 / 91,28	88,10 * 85,07 / 90,96
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	86,26 * 82,30 / 87,29	84,88 * 80,74 / 89,43	80,11 * 76,29 / 83,70
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	85,31 * 76,34 / 88,15	86,32 * 83,17 / 89,16	87,65 * 84,80 / 91,54
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	77,19 * 70,17 / 91,25	76,15 * 72,60 / 91,13	76,66 * 69,83 / 88,65
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	68,32 * 62,72 / 71,62	68,02 * 62,45 / 75,65	67,64 * 62,16 / 75,60
Negativkontrolle	94,12 91,88 / 95,42		

TABELLE 21 Vitalität nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

8.1.4 Zellzahl und Vitalität im Plasma

Testsubstanz	Zellzahl [$\times 10^3/\text{ml}$]		
	C_{max}	C_{5x}	C_{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	590 338 / 935	595 493 / 870	750 495 / 953
Propofol (2 $\mu\text{g/ml}$ 10 $\mu\text{g/ml}$ 20 $\mu\text{g/ml}$)	605 505 / 700	810 * 645 / 920	830 * 625 / 920
S-Ketamin (1 $\mu\text{g/ml}$ 5 $\mu\text{g/ml}$ 10 $\mu\text{g/ml}$)	690 415 / 870	595 330 / 840	565 385 / 765
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	558 403 / 594	563 488 / 743	550 376 / 696
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	538 339 / 690	593 465 / 728	635 460 / 771
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	483 * 348 / 629	458 400 / 670	435 391 / 756
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	328 * 249 / 500	318 * 208 / 419	295 * 260 / 395
Negativkontrolle	650 543 / 691		

TABELLE 22 Zellzahl nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

Testsubstanz	Vitalität [%]		
	C_{max}	C_{5x}	C_{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	90,07 84,70 / 92,87	89,50 83,38 / 91,56	88,23 83,60
Propofol (2 $\mu\text{g/ml}$ 10 $\mu\text{g/ml}$ 20 $\mu\text{g/ml}$)	77,07 * 72,06 / 83,33	76,61 * 70,48 / 82,28	80,93 * 75,32 / 86,38
S-Ketamin (1 $\mu\text{g/ml}$ 5 $\mu\text{g/ml}$ 10 $\mu\text{g/ml}$)	83,55 * 80,56 / 86,57	83,58 * 78,29 / 86,30	83,73 * 79,66 / 86,92
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	81,82 * 75,83 / 86,16	69,97 * 66,05 / 75,94	67,21 * 60,93 / 70,42
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	82,18 * 76,30 / 86,69	82,46 * 77,42 / 85,01	82,88 * 46,23 / 87,34
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	80,29 * 73,19 / 85,50	78,61 * 75,88 / 87,70	78,60 * 63,95 / 88,60
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	69,10 * 65,97 / 80,59	67,53 * 60,05 / 77,68	70,11 * 61,64 / 75,62
Negativkontrolle	90,91 89,46 / 92,30		

TABELLE 23 Vitalität nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * $p < 0,05$ gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

8.1.5 Laktatdehydrogenase (LDH) im Medium

Testsubstanz	LDH [U/l] an Tag 3		
	C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	43,50 * 41,00 / 47,75	39,00 * 37,00 / 43,75	36,00 * 34,00 / 39,75
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	44,00 * 41,00 / 48,00	43,50 * 39,75 / 46,00	40,00 * 38,00 / 44,00
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	37,00 * 36,00 / 43,00	38,00 * 36,00 / 40,00	37,00 * 34,00 / 40,00
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	47,50 41,75 / 58,75	46,00 * 39,25 / 51,25	43,50 * 39,25 / 49,75
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	48,00 * 45,00 / 70,50	46,00 * 39,00 / 57,75	42,00 * 38,25 / 56,60
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	54,50 50,50 / 64,50	54,00 * 48,25 / 65,75	50,50 * 45,25 / 64,50
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	171,50 * 108,25 / 188,50	153,00 * 83,25 / 187,50	130,50 * 70,25 / 174,00
Negativkontrolle	70,50 54,00 / 97,00		

TABELLE 24 LDH-Aktivität nach 3-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

Testsubstanz	LDH [U/l] an Tag 6		
	C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	122,50 87,75 / 153,75	94,00 * 75,25 / 117,75	92,00 * 65,50 / 111,25
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	103,00 * 85,00 / 120,00	90,00 * 84,00 / 98,00	80,00 * 77,00 / 91,00
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	97,00 * 89,00 / 107,00	98,00 * 87,00 / 113,00	91,00 75,00 / 114,00
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	122,00 98,75 / 175,75	110,00 89,00 / 123,50	96,50 * 85,00 / 110,75
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	139,00 98,25 / 193,50	148,00 97,00 / 194,75	124,50 88,75 / 183,50
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	192,50 * 114,00 / 205,50	171,00 120,50 / 193,00	157,00 118,50 / 176,25
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	187,00 * 146,25 / 179,94	148,50 132,75 / 213,50	150,50 130,50 / 167,00
Negativkontrolle	147,50 101,50 / 156,88		

TABELLE 25 LDH-Aktivität nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

8.1.6 Laktatdehydrogenase (LDH) im Plasma

Testsubstanz	LDH [U/l] an Tag 3		
	C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	125,50 * 121,00 / 132,00	128,50 * 121,50 / 141,75	124,50 * 116,25 / 136,00
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	129,00 * 109,00 / 143,00	135,00 * 110,00 / 151,00	138,00 118,00 / 164,00
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	124,00 * 119,00 / 135,00	121,00 * 106,00 / 123,00	112,00 * 106,00 / 123,00
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	221,00 * 184,00 / 245,75	205,00 * 178,00 / 221,50	191,00 * 175,50 / 208,75
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	188,50 * 178,25 / 201,50	187,00 * 179,25 / 196,00	196,00 * 177,25 / 212,25
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	180,00 137,25 / 190,75	178,50 137,50 / 191,50	164,50 129,25 / 188,75
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	242,00 * 183,75 / 266,75	228,50 * 180,25 / 242,50	219,00 * 165,25 / 228,50
Negativkontrolle	165,00 134,00 / 187,25		

TABELLE 26 LDH-Aktivität nach 3-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

Testsubstanz	LDH [U/l] an Tag 6		
	C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	98,00 85,00 / 116,50	97,00 78,00 / 113,50	92,00 73,00 / 144,50
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	89,00 82,00 / 117,00	97,00 84,00 / 120,00	97,00 88,00 / 116,00
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	80,00 * 69,00 / 104,00	83,00 * 70,00 / 95,00	96,00 75,00 / 124,00
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	129,50 104,25 / 144,50	129,00 117,50 / 148,50	131,50 115,75 / 152,25
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	143,00 112,00 / 172,00	133,50 106,50 / 174,50	136,50 111,25 / 187,50
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	179,50 110,00 / 203,75	156,50 105,25 / 193,00	148,00 106,00 / 178,50
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	165,00 145,50 / 186,50	160,50 153,50 / 170,50	167,00 148,75 / 202,75
Negativkontrolle	168,00 78,75 / 174,13		

TABELLE 27 LDH-Aktivität nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

8.1.7 Mikroalbumin im Medium

Testsubstanz	Mikroalbumin [mg/l]		
	C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	17,10 * 13,10 / 18,40	14,20 * 9,71 / 48,60	13,30 8,25 / 14,60
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	12,30 * 8,98 / 13,40	7,24 6,06 / 10,90	6,25 5,94 / 8,12
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	16,90 * 7,09 / 17,40	9,31 * 5,27 / 17,00	8,43 6,94 / 14,70
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	11,30 6,78 / 12,10	6,99 5,84 / 11,00	5,94 4,85 / 7,95
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	15,00 * 13,00 / 15,80	13,20 * 7,79 / 15,20	10,30 * 7,92 / 12,00
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	6,63 5,26 / 7,52	5,07 * 3,00 / 6,95	4,69 * 3,05 / 5,48
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	6,52 5,20 / 11,70	5,52 * 4,71 / 6,18	4,47 * 4,02 / 6,85
Negativkontrolle	7,01 6,47 / 8,20		

TABELLE 28 Mikroalbuminkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

8.1.8 Mikroalbumin im Plasma

Testsubstanz	Mikroalbumin [mg/l]		
	C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	17,50 15,60 / 20,30	19,20 * 16,50 / 24,70	16,55 13,35 / 22,35
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	11,50 9,92 / 19,90	14,80 12,30 / 20,70	12,90 7,93 / 14,30
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	22,20 7,06 / 25,70	27,20 8,57 / 37,20	18,00 10,50 / 43,40
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	18,00 11,40 / 28,00	17,50 8,07 / 19,30	10,10 7,26 / 19,90
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	18,30 * 17,20 / 52,80	20,10 * 17,30 / 30,40	25,20 * 17,30 / 28,10
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	9,15 7,53 / 13,30	10,30 9,63 / 12,80	10,20 8,71 / 12,41
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	6,23 * 3,76 / 8,25	7,17 * 6,12 / 9,37	8,06 * 7,40 / 9,33
Negativkontrolle	13,65 11,90 / 18,73		

TABELLE 29 Mikroalbuminkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

8.1.9 Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (XTT-Test) im Medium

XTT INDIREKT [Extinktion/Well]			
Testsubstanz	C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	0,73 * 0,60 / 0,88	0,72 * 0,59 / 0,80	0,68 * 0,58 / 0,83
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	0,77 * 0,74 / 0,83	0,75 * 0,69 / 0,78	0,73 * 0,68 / 0,78
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	0,78 * 0,72 / 0,82	0,79 * 0,74 / 0,92	0,73 * 0,70 / 0,85
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	0,88 * 0,79 / 0,93	0,80 * 0,73 / 0,88	0,78 * 0,76 / 0,84
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	0,99 0,96 / 1,02	0,92 0,83 / 1,04	0,88 * 0,82 / 0,92
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	0,86 * 0,77 / 0,87	0,78 * 0,69 / 0,88	0,69 * 0,65 / 0,85
Sufentanil (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	0,89 * 0,85 / 0,94	0,81 * 0,75 / 0,90	0,74 * 0,69 / 0,83
Negativkontrolle	0,98 0,81 / 1,12		

TABELLE 30 Indirekter XTT-Test [Extinktion/Well] nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

XTT DIREKT [Extinktion/Well]			
Testsubstanz	C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	1,05 * 0,61 / 1,39	1,29 1,01 / 1,62	1,48 0,86 / 1,85
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	1,52 1,21 / 1,79	1,69 * 1,50 / 2,06	1,89 * 1,57 / 2,21
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	1,12 * 0,74 / 1,30	1,29 0,62 / 1,57	1,38 0,64 / 1,76
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	1,43 1,11 / 1,73	1,87 * 1,40 / 1,94	1,76 * 1,30 / 1,91
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	1,64 1,05 / 2,09	1,77 1,38 / 2,14	1,82 * 1,49 / 2,22
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	1,17 0,99 / 1,47	1,28 1,08 / 1,86	1,38 1,10 / 1,78
Sufentanil (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	1,09 0,83 / 1,48	1,32 0,90 / 1,63	1,19 0,80 / 1,51
Negativkontrolle	1,51 1,02 / 1,70		

TABELLE 31 Direkter XTT-Test [Extinktion/Well] nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (XTT-Test) im Plasma

XTT INDIREKT [Extinktion/Well]			
Testsubstanz	C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	0,70 * 0,63 / 0,83	0,69 * 0,62 / 0,86	0,70 * 0,61 / 0,84
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	0,77 * 0,74 / 0,83	0,75 * 0,69 / 0,78	0,73 * 0,68 / 0,78
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	0,76 * 0,66 / 0,83	0,80 * 0,75 / 0,89	0,78 * 0,72 / 0,83
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	0,78 * 0,72 / 0,86	0,79 * 0,75 / 0,84	0,82 * 0,79 / 0,86
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	0,88 0,86 / 0,94	0,91 0,83 / 0,96	0,87 0,80 / 1,00
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	0,74 * 0,72 / 0,78	0,77 * 0,74 / 0,84	0,74 * 0,68 / 0,85
Sufentanil (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	0,80 * 0,76 / 0,84	0,81 * 0,77 / 0,85	0,82 * 0,74 / 0,89
Negativkontrolle	1,01 0,79 / 1,21		

TABELLE 32 Indirekter XTT-Test [Extinktion/Well] nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

XTT DIREKT [Extinktion/Well]			
Testsubstanz	C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	1,01 0,69 / 1,31	1,23 * 0,94 / 1,60	1,22 * 0,96 / 1,54
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	1,10 * 0,99 / 1,42	1,51 * 1,29 / 1,79	1,49 * 1,34 / 1,76
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	1,01 0,63 / 1,29	1,19 0,78 / 1,51	1,21 0,64 / 1,61
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	1,24 * 1,01 / 1,58	1,69 * 1,28 / 1,89	1,42 * 1,09 / 1,83
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	1,16 0,76 / 1,77	1,78 * 1,27 / 1,98	1,73 * 1,07 / 2,07
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	1,05 * 0,80 / 1,31	1,07 * 0,89 / 1,30	1,14 * 0,82 / 1,58
Sufentanil (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	0,86 0,66 / 1,09	1,05 0,77 / 1,48	1,15 0,79 / 1,41
Negativkontrolle	0,79 0,79 / 0,82		

TABELLE 33 Direkter XTT-Test [Extinktion/Well] nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

8.1.11 Aktivität von CYP1A2 (Ethoxyresorufin-Test) im Medium

Testsubstanz	Resorufin [pmol/l]		
	C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	4,17 2,44 / 6,25	3,18 2,18 / 4,41	2,71 1,90 / 4,35
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	4,49 * 3,97 / 5,97	4,41 * 3,01 / 5,06	3,06 2,46 / 4,58
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	1,35 * 1,00 / 2,13	1,74 * 1,50 / 1,94	1,74 * 1,50 / 2,19
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	5,72 * 3,82 / 6,69	4,74 * 3,63 / 6,31	4,44 * 3,30 / 5,24
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	3,07 2,54 / 3,94	2,75 * 1,52 / 3,32	2,55 * 1,52 / 3,41
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	2,71 * 1,25 / 3,11	2,17 * 1,36 / 2,77	2,18 * 1,20 / 3,36
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	3,30 2,73 / 3,75	3,08 2,63 / 3,81	2,84 2,52
Negativkontrolle	3,09 2,29 / 4,22		

TABELLE 34 Resorufinkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Medium. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

8.1.12 Aktivität von CYP1A2 (Ethoxyresorufin-Test) im Plasma

Testsubstanz	Resorufin [pmol/l]		
	C _{max}	C _{5x}	C _{10x}
Midazolam (300 ng/ml 1500 ng/ml 3000 ng/ml)	1,66 * 1,69 / 3,54	1,68 * 1,69 / 3,37	1,61 * 1,66 / 3,16
Propofol (2 µg/ml 10 µg/ml 20 µg/ml)	1,73 * 1,12 / 3,17	2,44 * 1,28 / 3,57	2,36 * 1,34 / 3,28
S-Ketamin (1 µg/ml 5 µg/ml 10 µg/ml)	1,63 * 1,43 / 2,35	1,67 * 1,42 / 2,42	1,87 * 1,61 / 2,17
Thiopental (1 mg/ml 5 mg/ml 10 mg/ml)	3,27 2,69 / 3,52	3,20 2,47 / 3,93	3,48 * 2,95 / 4,59
Fentanyl (10 ng/ml 50 ng/ml 100 ng/ml)	1,02 * 0,66 / 1,78	1,22 * 0,77 / 1,87	1,49 * 0,80 / 1,91
Remifentanyl (15 ng/ml 75 ng/ml 150 ng/ml)	1,64 * 1,11 / 1,85	1,74 * 0,75 / 1,94	1,72 * 0,71 / 2,13
Sufentanyl (1 ng/ml 5 ng/ml 10 ng/ml)	2,21 * 2,06 / 2,59	2,59 2,15 / 2,77	3,01 2,29 / 3,32
Negativkontrolle	2,98 2,25 / 4,19		

TABELLE 35 Resorufinkonzentration nach 6-tägiger Inkubation im Plasma. Es sind Median, 25/75 Perzentil sowie * p<0,05 gegenüber Negativkontrolle dargestellt.

9 Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Universität Rostock zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

In-vitro Hepatotoxizitätsbestimmung intensivmedizinisch relevanter Hypnotika und Opioide mit der permanenten humanen Hepatozytenzelllinie Hep G2/C3A

ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Berlin, 01.11.2020 Katharina Haller

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Martin Sauer, der mich durch seine Anregung auf dieses auch im weiteren Berufsverlauf immer wieder wichtige Thema gebracht hat und mir durch seine ausgezeichnete Betreuung immer zur Seite stand.

Weiterhin möchte mich bei Fr. Potschka für ihre enorme Unterstützung und Anleitung in der Laborarbeit und Zellkultur bedanken.

Auch meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für die Geduld, Unterstützung und ermutigenden Worte während der Arbeit an dieser Dissertation.