

Aus dem
Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und
Veterinärmedizin

eingereicht über den Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Hepatotoxizität von Valproinsäure in isolierten Rattenhepatozyten: Einfluß von Prooxidantien und Hungern

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Grit Barthel

Tierärztin

aus Räckelwitz

Berlin 1997

Journal-Nr. 2103

Meinem Jens

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin.

Dekan des Fachbereichs: Univ.-Prof. Dr. Klaus Hartung

Erster Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kroker

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Roland Rudolph

Tag der Promotion: 28. November 1997

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Valproinsäure (VPA)	3
2.1.1 Therapie der Epilepsie	3
2.1.2 Pharmakodynamische Eigenschaften	3
2.1.2.1 Antikonvulsive Wirkungen von VPA.....	3
2.1.2.2 Mögliche Wirkungsmechanismen von VPA.....	4
2.1.3 Pharmakokinetische Eigenschaften und Proteinbindung.....	4
2.1.3.1 Absorption, Distribution, Elimination, effektive Dosis und therapeutische Blutkonzentration.....	5
2.1.3.2 Proteinbindung.....	6
2.1.4 Metabolismus von VPA	8
2.1.4.1 Metabolismuswege	8
2.1.4.2 Mitochondrialer Metabolismus.....	8
2.1.4.3 Mikrosomaler Metabolismus	10
2.1.4.4 Weitere Metaboliten, insbesondere Konjugationsprodukte	11
2.1.4.5 Quantitative Verteilung der Hauptmetaboliten	14
2.1.4.6 Beteiligung der β - bzw. ω -Oxidation endogener Fettsäuren und des Aminosäurestoffwechsels am VPA-Metabolismus.....	16
2.1.5 Hungern und dessen Einfluß auf VPA-Kinetik und VPA-Metabolismus.....	17
2.1.5.1 Einfluß von Hungern auf den Organismus, insbesondere auf die Leber	17
2.1.5.2 Hungern und VPA-Kinetik und -Metabolismus, Leberbiochemie und Leberhistologie	19
2.2 Allgemeines zur Hepatotoxizität von VPA	22
2.2.1 Formen der Hepatotoxizität.....	22
2.2.1.1 Reversible Hepatotoxizität.....	22
2.2.1.2 Irreversible Hepatotoxizität	22
2.2.2 Häufigkeit, Hauptrisikogruppe und Einflußfaktoren	24
2.3 Mögliche Mechanismen der Hepatotoxizität und Beeinflussung von Stoffwechselwegen	25
2.3.1 Veränderter Metabolismus von VPA bei Hepatotoxizität.....	26
2.3.1.1 Metabolismusprofile bei Hepatotoxizität.....	26

2.3.1.2 Verantwortlichkeit von VPA und VPA-Metaboliten bzw. von Metabolismwegen für die Hepatotoxizität	27
2.3.2 Veränderung des Fettstoffwechsels, der Gluconeogenese und des Harnstoffzyklus durch VPA	31
2.3.2.1 Hemmung der mitochondrialen β -Oxidation endogener Fettsäuren - Rolle von CoA und Carnitin.....	31
2.3.2.2 Weitere mögliche Mechanismen der Hemmung der β -Oxidation	34
2.3.2.3 Hemmung der Ketogenese.....	35
2.3.2.4 Hemmung der Gluconeogenese	36
2.3.2.5 Hemmung der Harnstoffsynthese und Hyperammonämie.....	36
2.3.3 Einfluß von VPA auf Elemente des komplexen Verteidigungssystems zur Abwehr freier Radikale.....	37
2.3.3.1 Einfluß von VPA auf die Enzymaktivität	38
2.3.3.2 Einfluß von VPA auf die Spurenelemente.....	39
2.3.3.3 GSH-Status und dessen Beeinflussung durch VPA und VPA-Metaboliten.....	40
2.3.3.4 VPA und Lipidperoxidation.....	45
2.3.4 Rolle des Hungerns bei VPA-vermittelter Hepatotoxizität.....	46
2.3.5 Einfluß von Polytherapie der Epilepsie auf die VPA-Hepatotoxizität	47
2.3.6 Histologische Veränderungen bei VPA-Hepatotoxizität	48
2.3.6.1 Mikroversikuläre Steatose und Nekrose der Leber	48
2.3.6.2 Mitochondrien.....	49
2.4 Substanzen zum Auslösen von oxidativem Streß.....	50
2.4.1 Wirkungsmechanismus der Hydroperoxide Cumolhydroperoxid (CuOOH) und tert-Butylhydroperoxid (t-BuOOH)	51
2.4.1.1 Hydroperoxidmetabolismus.....	51
2.4.1.2 Hydroperoxidzerfall.....	53
2.4.1.3 Bioaktivierung von Xenobiotika durch Hydroperoxide	55
2.4.2 Wirkungsmechanismus von Bromheptan (BrH).....	55
3 MATERIAL UND METHODEN	56
3.1 Substanzen zur Behandlung.....	56
3.2 Versuchstiere.....	58
3.2.1 Rasse, Geschlecht, Gewicht und Alter	58
3.2.2 Versuchstierhaltung	58

3.3 Die Methode isolierter Hepatozyten	58
3.3.1 Lösungen und Collagenasen	58
3.3.2 Präparation isolierter Hepatozyten	59
3.3.2.1 Operation	59
3.3.2.2 Perfusion	59
3.3.2.3 Leberzellaufbereitung	60
3.3.3 Durchführung der Inkubation	60
3.4 Versuchsanordnung	61
3.4.1 Behandlungen und Probenentnahmen	61
3.4.2 Kontroll- und Behandlungsgruppen.....	63
3.5 Parameter	68
3.5.1 Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter	68
3.5.1.1 Trypanblautest	68
3.5.1.2 Laktatdehydrogenase- (LDH)	68
3.5.1.3 Intrazelluläres Kalium (K ⁺) und Natrium (Na ⁺)	68
3.5.1.4 Reduziertes Glutathion (GSH).....	69
3.5.1.5 Malondialdehyd (MDA)	69
3.5.1.6 Protein.....	69
3.5.2 VPA- und Metabolitenbestimmung mit Hilfe der Gaschromatographie/ Massenspektrometrie (GC/MS).....	70
3.5.2.1 Extraktion und Derivatisierung.....	70
3.5.2.2 Analyse und Quantifizierung	70
3.5.2.3 Standards und Wiederfindung in der Leberzellsuspension.....	71
3.5.2.4 Präzision und Genauigkeit	73
3.5.3 Elektronenmikroskopie.....	77
3.6 Verwendete Materialien	77
3.6.1 Lösungen, Puffer und Collagenasen	77
3.6.2 Substanzen und Chemikalien.....	80
3.6.3 Geräte und Material	81
3.7 Versuchsauswertung und Statistik	82

4 ERGEBNISSE	83
4.1 Zoologische, zotechnische und versuchsbedingte Parameter	83
4.1.1 Versuchstiere und Versuchsanordnung	83
4.1.2 Leberperfusion und Inkubation	84
4.2 Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter	85
4.2.1 Kontrollgruppen	86
4.2.1.1 Trypanblautest	86
4.2.1.2 LDH-Freisetzung	86
4.2.1.3 Intrazellulärer Kaliumgehalt	86
4.2.1.4 Intrazellulärer Natriumgehalt	86
4.2.1.5 Intrazellulärer GSH-Gehalt	87
4.2.1.6 MDA-Nachweis	88
4.2.2 Einfluß von Prooxidantien	88
4.2.2.1 Trypanblautest	88
4.2.2.2 LDH-Freisetzung	88
4.2.2.3 Intrazellulärer Kaliumgehalt	88
4.2.2.4 Intrazellulärer Natriumgehalt	89
4.2.2.5 Intrazellulärer GSH-Gehalt	89
4.2.2.6 MDA-Nachweis	91
4.2.3 Einfluß von VPA	91
4.2.3.1 Trypanblautest	91
4.2.3.2 LDH-Freisetzung	92
4.2.3.3 Intrazellulärer Kaliumgehalt	92
4.2.3.4 Intrazellulärer Natriumgehalt	93
4.2.3.5 Intrazellulärer GSH-Gehalt	93
4.2.3.6 MDA-Nachweis	95
4.2.4 Einfluß der Kombination von Prooxidantien und VPA	95
4.2.4.1 Trypanblautest	95
4.2.4.2 LDH-Freisetzung	101
4.2.4.3 Intrazellulärer Kaliumgehalt	105
4.2.4.4 Intrazellulärer Natriumgehalt	110
4.2.4.5 Intrazellulärer GSH-Gehalt	115
4.2.4.6 MDA-Nachweis	124

4.3 VPA-Metabolismus	128
4.3.1 VPA-Metabolismus bei unterschiedlichen VPA-Mengen.....	129
4.3.1.1 Anteil bzw. Menge nicht metabolisierter VPA.....	129
4.3.1.2 Anteil bzw. Menge der detektierten Metaboliten.....	130
4.3.2 Einfluß von Prooxidantien auf den VPA-Metabolismus	133
4.3.2.1 Anteil bzw. Menge nicht metabolisierter VPA.....	133
4.3.2.2 Anteil bzw. Menge der detektierten Metaboliten.....	137
4.4 Elektronenmikroskopie	145
4.4.1 Kontrollgruppen mit Hungern	145
4.4.2 Einfluß von Prooxidantien mit Hungern	145
4.4.3 Einfluß von VPA allein mit Hungern.....	147
4.4.4 Einfluß der Kombination von Prooxidantien und VPA	147
5 DISKUSSION	154
5.1 Die Wahl des Modells	154
5.1.1 Modell und Inkubationsbedingungen.....	154
5.1.2 Länge der Hungerperiode und der Einfluß von Hungern	154
5.1.3 Prooxidantienwahl und Einfluß von oxidativem Streß	156
5.1.4 Wahl der VPA-Dosis und Einfluß von VPA.....	158
5.2 Diskussion der Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter bei kombinierter Behandlung	161
5.2.1 Einfluß von VPA und Hydroperoxiden	161
5.2.1.1 Ohne Hungern.....	161
5.2.1.2 Mit Hungern.....	162
5.2.2 Einfluß von BrH-Vorbehandlung und VPA.....	166
5.2.2.1 Ohne Hungern.....	166
5.2.2.2 Mit Hungern.....	166

5.3 Diskussion des VPA-Metabolismus	168
5.3.1 VPA-Metabolismus im Vergleich zu anderen <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Untersuchungen.....	168
5.3.2 VPA-Metabolismus bei unterschiedlichen VPA-Mengen.....	170
5.3.3 Einfluß von Prooxidantien bei kombinierter Behandlung.....	172
5.4 Diskussion der morphologischen Ergebnisse	174
5.5 Hypothesen für den Mechanismus der Zytotoxizität	177
5.6 Schlußbetrachtung	183
6 ZUSAMMENFASSUNG	186
7 SUMMARY	189
8 LITERATURVERZEICHNIS	192
9 ANHANG: TABELLEN DER VITALITÄTS- UND FUNKTIONALI- TÄTSPARAMETER / VPA- UND METABOLITENWERTE	219

Vorwort

Diese Arbeit entstand am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) neben meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Angestellte in den Fachgebieten „Zentrale Steuerung der Zulassung, Aufbereitung, Nachzulassung“ und „Antimikrobiell, hormonell und zentralwirksame Tierarzneimittel, Umweltverträglichkeit“. Sie wurde vom Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin im November 1997 als Dissertation angenommen.

Für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Dissertation im BgVV möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Kroker (BgVV) danken.

Mein besonderer Dank gilt Marion Allert für ihre ständige Hilfsbereitschaft, Zuverlässigkeit und freundliche Zusammenarbeit bei der praktischen Durchführung und Auswertung der Versuche. Danken möchte ich Prof. Dr. Dr. h. c. Heinz Nau für die Möglichkeit der VPA- und Metabolitenbestimmungen am damaligen Institut für Toxikologie und Embryopharmakologie der FU Berlin und für die gewährte wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft. Mein Dank gilt Erika Drews und Dr. Werner Wittfoht für die Einführung in die Gaschromatographie und Massenspektrometrie und die stets freundschaftliche Unterstützung. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Peter Schulze und seinen Mitarbeitern Monika Schwebs und Hilmar Reupke (BgVV), die freundlicherweise die elektronenmikroskopischen Aufnahmen anfertigten. Herrn Dr. Schulze möchte ich für seine jederzeit engagierte fachliche Beratung, die für mich wertvollen Gespräche und nicht zuletzt für die kritische Durchsicht des Manuskripts herzlich danken.

Weiterhin danke ich Dr. Sabine Klee für die wissenschaftliche Starthilfe in die Thematik. Bei Angelika Hiller, Ines Schirrmann und Dr. Steffen Börner bedanke ich mich für die kameradschaftliche Zusammenarbeit und fachkundigen Ratschläge bei der Auswertung der Versuche. Dr. Karl Bache danke ich für die freundliche Beratung in statistischen Fragen und Dr. Barbara Cyrus für die zeitaufwendige Durchsicht der Endfassung. Sonja Boden möchte ich besonders danken. Sie übernahm die mühevollen Arbeit, die Endfassung orthographisch durchzusehen. Für die Bereitstellung des Wirkstoffes Valproinsäure danke ich der Firma Desitin. Mein Dank gilt allen Kollegen des damaligen Fachgebietes „Zentrale Steuerung der Zulassung, Aufbereitung, Nachzulassung“, insbesondere Susanne Köhler und Gabriele Schweyen für ihre immer freundliche moralische und fachliche Unterstützung.

Großen Anteil an dieser Arbeit hat auch mein Mann Jens. Er half mir moralisch über schwere Zeiten hinweg, nahm sich viel Zeit, mit mir über die Arbeit zu reden, löste fast jedes Computerproblem und sah jede Fassung der Dissertation kritisch durch. Nicht zuletzt möchte ich meiner Mutter und meinem verstorbenen Vater danken, die mich zu jeder Zeit weit über das übliche Maß hinaus unterstützt haben.

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUC	area under curve (Fläche unter der Kurve)
BCNU	1,3-Bis(2-Chloroethyl)-1-Nitrosoharnstoff
BrH	Bromheptan
BSO	DL-Buthionin-(R,S)-Sulfoximin
t-BuOOH	tert-butyl-Hydroperoxid
CuOOH	Cumolhydroperoxid
DEM	Diethylmaleat
DMFA	Dimethylformamid
DPPD	N,N'-Diphenyl- <i>p</i> -Phenylendiamin
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure)
ED ₅₀	effektive Dosis
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GSH	reduziertes Glutathion
GSH-Px	Glutathion-Peroxidase
GSSG-Rd	Glutathiondisulfid-Reduktase
GST	Glutathion-S-Transferase
γ -GT	γ -Glutamyltransferase
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
k.A.	keine Angabe
LDH	Laktatdehydrogenase
MDA	Malondialdehyd
MEC	2-Ethyl-2-Methyl-Caprinsäure
mH	mit Hungern
mmol/l ZW	mmol/l Zellwasser
Na-VPA	Natriumvalproinsäure
NAC	N-Acetylcystein
oH	ohne Hungern
2,4-dien-PA	2,4-Pentadienoyl
3-keto-4-PA	3-keto-4-Pentensäure
(R,S)-3-OH-4-PA	(R,S)-3-Hydroxy-4-Pentensäure

4-PA	4-Pentensäure
PGA	2-Propylglutarsäure
2-PMA	2-Propylmalonat
2-PSA	2-Propylsuccininat
s	Standardabweichung
s.c.	subcutan
SC-HMAD	kurzkettige L-3-Hydroxy-2-Methylacyl-CoA-Dehydrogenase
SOD	Superoxiddismutase
UDP-Glucuronyltransferase	Uridin-5'-Diphosphat-Glucuronyltransferase
V _d	scheinbares Verteilungsvolumen
VK	Variationskoeffizient
VPA	Valproinsäure
2-en-VPA	2-Propyl-2-Pentensäure
2,3'-dien-VPA	2-Propyl-2,3'-Pentadiensäure
2,4-dien-VPA	2-Propyl-2,4-Pentadiensäure
3-en-VPA	2-Propyl-3-Pentensäure
3-keto-VPA	2-Propyl-3-keto-Pentensäure
3-keto-4-en-VPA	2-Propyl-3-keto-4-Pentensäure
3-OH-VPA	2-Propyl-3-Hydroxy-Pentensäure
4-en-VPA	2-Propyl-4-Pentensäure
4-GS-5-OH-VPA	2-Propyl-4-(Glutathion-S-yl)-5-Hydroxy-Pentensäure
4-keto-VPA	2-Propyl-4-keto-Pentensäure
4-OH-VPA	2-Propyl-4-Hydroxy-Pentensäure
4,5-epoxy-VPA	2-(2'-Carboxypentanyl)-Oxiran
5-GS-2-en-VPA	2-Propyl-5-(Glutathion-S-yl)-2-Pentensäure
5-GS-3-en VPA	2-Propyl-5-(Glutathion-S-yl)-3-Pentensäure
5-GS-3-keto-VPA	2-Propyl-5-(Glutathion-S-yl)-3-keto-Pentensäure
5-NAC-2-en-VPA	2-Propyl-5-(N-Acetylcystein-S-yl)-2-Pentensäure
5-NAC-3-en-VPA	2-Propyl-5-(N-Acetylcystein-S-yl)-3-Pentensäure
5-OH-VPA	2-Propyl-5-Hydroxy-Pentensäure
2,4-dien-VPA-Glucuronid	1-O-(2-Propyl-2,4-Pentadienoyl)- β -D-Glucuronid
5-GS-2-en-VPA-Glucuronid	1-O-(2-Propyl-5-(Glutathion-S-yl)-2-en-VPA)-Glucuronid
5-GS-3-en-VPA-Glucuronid	1-O-(2-Propyl-5-(Glutathion-S-yl)-3-en-VPA)-Glucuronid
5-NAC-3-en-VPA-Glucuronid	1-O-(2-Propyl-5-(N-Acetylcystein-S-yl)-3-en-VPA)-Glucuronid
5-GS-4-OH-VPA-Lacton	2-Propyl-5-(Glutathion-S-yl)-4-Hydroxy-Pentensäure-Lacton
5-NAC-4-OH-VPA-Lacton	2-Propyl-5-(N-Acetylcystein-S-yl)-4-Hydroxy-Pentensäure-Lacton
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Nach der zufälligen Entdeckung der antikonvulsiven Eigenschaften von Valproinsäure (VPA) durch MEUNIER et al. (1963) wurde sie bereits 1968 in Europa und 1978 in den USA als Antiepileptikum zugelassen. Mit ihrer Einführung häuften sich die Berichte über unerwünschte Wirkungen bei VPA-Therapie. Eine seltene unerwünschte Nebenwirkung stellt das irreversible Leberversagen dar. Das größte Risiko besteht bei Kindern unter zwei Jahren, die eine Polytherapie mit anderen Antiepileptika erhalten und an anderen Krankheiten leiden oder neurologische Dysfunktionen aufweisen.

Aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums mit guten Therapieerfolgen beim Menschen kann auf VPA als Antiepileptikum nicht verzichtet werden. Deshalb wurden in den letzten 20 Jahren intensiv Aspekte der Hepatotoxizität untersucht. Der Mechanismus dieser Schädigung ist dennoch unklar. Bisher wurden verschiedene biochemische Mechanismen, die für die Hepatotoxizität verantwortlich sein könnten, vorgeschlagen. Es wird vermutet, daß die Hepatotoxizität nicht das Ergebnis eines einzelnen Mechanismus ist. Außerdem ist bekannt, daß die individuelle Empfindlichkeit gegenüber VPA, z.B. durch eine beeinträchtigte mitochondriale β -Oxidation der Fettsäuren, fieberhafte Erkrankungen, einen schlechten Ernährungszustand, eine verminderte antioxidative Kapazität der Leber und andere Einflußfaktoren, steigen kann. Ferner existieren einige hepatotoxische Metaboliten, und es ist meist ein entscheidender Weg im Metabolismus von VPA, die β -Oxidation, verändert. Es ist bisher jedoch nicht bekannt, ob Veränderungen im VPA-Metabolismus Ursache oder Folge der VPA-induzierten Lebertoxizität sind oder inwieweit diese Veränderungen überhaupt eine Rolle spielen. Eine charakteristische Schädigung stellt die mikrovesikuläre Steatose dar, die häufig mit einer Nekrose verbunden ist. Diese Veränderungen könnten eine Folge des beeinträchtigten Schutzes vor freien Radikalen sein. So sind wichtige Elemente des Verteidigungssystems zur Abwehr freier Radikale durch VPA beeinträchtigt. Die Hypothese, daß ein Versagen des Abfangsystems für freie Radikale eine entscheidende Rolle spielt, gewinnt zunehmend an Interesse.

Die Ergebnisse von *in vitro*-Versuchen in der Rattenleber zeigen, daß VPA allein selbst in hohen Dosierungen nicht oder nur schwach hepatotoxisch ist. *In vivo* entsteht mit hohen Dosen nur in adulten Ratten eine mikrovesikuläre Steatose. Untersuchungen des Risikofaktors Hungern weisen darauf hin, daß VPA weder in hungernden Ratten noch bei hungernden Menschen zur Hepatotoxizität führt. Hungern verursacht allerdings eine verminderte β - und ω -Oxidation des Antiepileptikums.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher in einem *in vitro*-Modell der isolierten Hepatozyten der Ratte die Hepatotoxizität und der Metabolismus von VPA untersucht, wenn mehrere Faktoren wie Hungern und oxidativer Streß auf die Leberzellen wirken. Es wurde die Rolle von Glutathion (GSH), der Lipidperoxidation und von Veränderungen des VPA-Metabolismus im Zytotoxizitätsmechanismus von VPA erforscht.

Zur Erfüllung dieser Zielstellung wurden folgende Untersuchungen angestellt:

1. Zunächst wurden geeignete Testsubstanzen zum Auslösen von oxidativem Streß mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen gesucht. Es sollte sich dabei um Prooxidantien handeln, die mittels der Elemente des Verteidigungssystems zur Abwehr freier Radikale abgebaut werden bzw. die zur Verminderung eines Elementes, des GSH-Gehaltes, führen. Es kamen Substanzen zum Einsatz, die bei der verwendeten Dosis allein noch keine Veränderungen der ausgewählten Vitalitätsparameter sowohl ohne als auch mit Hungern verursachen.
2. Der Einfluß des Ernährungszustandes Hungern auf die Tiere, die Leber und Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter der Leberzellen wurde untersucht.
3. Es wurde geprüft, ob eine VPA-Behandlung allein in unterschiedlichen Konzentrationen zu Schädigungen der Leberzellen in Abhängigkeit vom Ernährungszustand in diesem Modell führt und ob charakteristische Veränderungen im Hinblick auf die Vitalität, die antioxidative Kapazität und den VPA-Metabolismus zu beobachten sind.
4. Darauf aufbauend wurden der Einfluß einer kombinierten Behandlung von unterschiedlichen VPA-Mengen mit verschiedenen Konzentrationen von Prooxidantien, die allein noch keine meßbaren Veränderungen des GSH-Gehaltes der Leberzellen verursachen, auf die Vitalität und Funktionalität der Hepatozyten getestet. Um die Wirkung des Ernährungszustandes der Ratten auf die eventuell festzustellenden Effekte beurteilen zu können, wurden die gleichen Behandlungen in Leberzellen sowohl von nicht hungernden als auch von hungernden Ratten durchgeführt.
5. Daran anschließend wurde die Rolle einer GSH-Verarmung in Kombination mit Hungern und VPA-Behandlung untersucht.
6. Studien zum Metabolismus von VPA schlossen sich an. Der Einfluß von VPA allein, der mögliche Einfluß von Prooxidantien bei kombinierter Behandlung und die Rolle des Ernährungszustandes auf das Metabolitenmuster und die Metabolitenmenge wurden ermittelt.
7. Für bestimmte Behandlungsgruppen folgten elektronenmikroskopische Untersuchungen, die zeigen sollten, ob bei Veränderungen der Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter auch ultrastrukturelle Veränderungen der Hepatozyten zu beobachten sind.

2 Literaturübersicht

2.1 Valproinsäure (VPA)

2.1.1 Therapie der Epilepsie

VPA hat das weiteste Spektrum antikonvulsiver Aktivität der mehr etablierten Antiepileptika (DAVIS et al., 1994). VPA ist das Mittel der Wahl bei der Behandlung von primär generalisier-ten Anfällen (APPLETON, 1995, WILDER, 1987). So dient dieses Arzneimittel zur Therapie von Absencen, tonisch-klonischen Anfällen, tonischen, klonischen und myoklonischen Anfällen und zur Behandlung von Fieberkrämpfen (BOURGEOIS et al., 1987, BOURGEOIS, 1994, LÖSCHER, 1985, WILDER, 1995). BOURGEOIS (1994) betonte, daß nur VPA effektiv gegen Absencen, tonisch-klonische und myoklonische Anfälle in Patienten mit primär generalisierter Epilepsie ist. CHADWICK (1994) zeigte, daß VPA gegen partielle Anfälle mit und ohne sekundäre Generalisierung effektiv ist. Das wird jedoch kontrovers diskutiert (PORTER, 1982, WILDER, 1995).

Die Therapie mit VPA ist von großem Vorteil, da nach SHERWIN (1983) bei 50 % der Patien-ten mit einfachen Absencen auch tonisch-klonische Krämpfe vorkommen. Bei der Mehrheit der Epilepsien von Kindern wird als erste Arzneimitteltherapie VPA und Carbamazepin empfohlen (VERITY et al., 1995), da beide Gruppen von Anfallstypen und die Epilepsiesyn-drome erfaßt werden. Außerdem verursacht VPA nur minimale neurologische Nebenwirkun-gen wie Sedation, Ataxie, Störung der kognitiven Funktion und hat keine kosmetischen Nebenwirkungen (CHADWICK, 1994, DAVIS et al., 1994, WILDER, 1987).

2.1.2 Pharmakodynamische Eigenschaften

2.1.2.1 Antikonvulsive Wirkungen von VPA

VPA hat im Tiermodell bei generalisierten Anfällen wie Absencen (Petit mal), klonischen, to-nischen, tonisch-klonischen (Grand mal) und myoklonischen und bei komplexen partiellen Anfällen, die durch verschiedene chemische, elektrische und sensorische Stimuli induziert wurden, eine akute antikonvulsive Wirkung (s. Übersicht in DAVIS et al., 1994, LÖSCHER, 1993). Die antikonvulsive Potenz von VPA ist stark abhängig von der Spezies, der Applika-tionsart, dem induzierten Anfallstyp und der Zeit zwischen VPA-Gabe und Anfallsinduktion, und sie steigt mit der Größe der Tiere (LÖSCHER, 1993). Bei chronischer VPA-Gabe in Amyg-dala-gekündelten Ratten, einem Modell für komplexe partielle Anfälle (LÖSCHER et al., 1988a, LÖSCHER et al., 1989, LÖSCHER, 1993) und bei kontinuierlicher i.v. Infusion von VPA (LÖSCHER und HÖNACK, 1995) im Epilepsie-Modell des Pentylentetrazol-induzierten generalisierten myoklonischen Anfalls steigt innerhalb der ersten zwei bis drei Behand-

lungstage die antikonvulsive Potenz. Es wurde jedoch keine signifikante Akkumulation von VPA und seiner Metaboliten im Plasma oder Gehirn beobachtet.

2.1.2.2 Mögliche Wirkungsmechanismen von VPA

Bisher ist der präzise Wirkungsmechanismus von VPA noch nicht genau bekannt. Große Bedeutung wird dem Effekt von VPA auf den inhibitorischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) beigemessen (DAVIS et al., 1994, LÖSCHER, 1993). Es ist jedoch aufgrund der vielen pharmakodynamischen Effekte von VPA unwahrscheinlich, daß diese Substanz nur einen Wirkungsmechanismus hat. Das breite Wirkungsspektrum von VPA scheint auf einer Kombination verschiedener neurochemischer und neurophysiologischer Mechanismen zu beruhen (LÖSCHER, 1993). Vor allem drei Wirkungsmechanismen von VPA werden diskutiert:¹

1. Effekte von VPA auf das GABA-System

VPA erhöht die Konzentration des inhibitorischen präsynaptischen Neurotransmitters GABA, höchstwahrscheinlich durch die Aktivierung der GABA-synthetisierenden Enzyme bzw. die Inaktivierung GABA-hemmender Enzyme. Möglicherweise könnte auch die K^+ -induzierte GABA-Abgabe erhöht werden, oder VPA könnte indirekte Wirkungen auf die GABA-Konzentration haben. Die GABA-vermittelte Hemmung der Erregungsausbreitung steigt.

2. Effekte von VPA auf andere Aminosäuren-Neurotransmitter

VPA vermindert die durch exzitatorische Aminosäuren vermittelte Neurotransmission, höchstwahrscheinlich durch die Hemmung der γ -Hydroxybuttersäureabgabe infolge einer Enzymhemmung. Möglicherweise könnte eine Hemmung der Exzitation durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat) erfolgen oder durch VPA die Aspartatkonzentration im Gehirn gesenkt werden.

3. Effekte von VPA auf Membran-Ionen-Kanäle

VPA vermindert elektrisch provozierte hochfrequente repetitive Entladungen der Neuronen. Möglicherweise erfolgt dies durch die Erhöhung der K^+ -Leitfähigkeit der Membran oder durch die Blockierung des spannungsabhängigen Na^+ -Kanals.

2.1.3 Pharmakokinetische Eigenschaften und Proteinbindung

Es bestehen Unterschiede in der Pharmakokinetik und der Plasmaproteinbindung von VPA bei Mensch und Tier, und es existieren auch beträchtliche tierartspezifische Unterschiede (LÖSCHER, 1978). Die folgenden Ausführungen beschränken sich auf den Menschen und die Versuchstiere Ratte und Maus. Für den Menschen wird eine lineare Pharmakokinetik im *steady*

¹ Die im folgenden aufgeführten möglichen Mechanismen werden in den Übersichtsartikeln von DAVIS et al. (1994) und LÖSCHER (1993) ausführlich diskutiert.

state (HALL et al., 1985) und eine nichtlineare Pharmakokinetik mit steigender VPA-Clearance bei höheren Dosen (MAY und RAMBECK, 1985, TURNBULL et al., 1983b) beschrieben. In der Ratte ist die Eliminations- und Verteilungskinetik von VPA nichtlinear (DICKINSON et al., 1979, LÖSCHER et al., 1989, SEMMES und SHEN, 1991).

2.1.3.1 Absorption, Distribution, Elimination, effektive Dosis und therapeutische Blutkonzentration

VPA wird sowohl nach oraler als auch nach i.p. Gabe schnell resorbiert (ALY und ABDEL-LATIF, 1980, GUGLER et al., 1977, LÖSCHER und ESENWEIN, 1978). Die mittlere Bioverfügbarkeit oraler VPA-Formulierungen beträgt beim Menschen 90-100% (KLOTZ und ANTONIN, 1977, NITSCHKE und MASCHER, 1982).

Die Verteilung von VPA erfolgt vor allem in das Blut und die extrazelluläre Flüssigkeit, die Penetration ins Gewebe ist sehr gering (KLOTZ und ANTONIN, 1977, KUPFERBERG, 1980). Der VPA-Gehalt im Gehirn (cerebrospinale Flüssigkeit) ist nach SHEN et al. (1992) variabel. Er betrug ca. 10 % der therapeutischen Serumkonzentration des Menschen (MEIJER und HESSING-BRAND, 1973), ca. 3,1-15 % der Serumkonzentration der Ratte (LÖSCHER und NAU, 1983) und ca. 20 % der Serumkonzentration der Maus (LÖSCHER und ESENWEIN, 1978). Aufgrund der geringen Verteilung ins Gehirn sind relativ hohe Plasmakonzentrationen von VPA erforderlich, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen (PINDER et al., 1977). Bei der Ratte war 10 min nach oraler Gabe VPA in allen Teilen des Organismus vorhanden, wobei der Gehalt im Blut sehr hoch, in Leber, Niere, Herz und Lunge moderat und im Gehirn und der Skelettmuskulatur gering war (DICKINSON et al., 1979). Nach i.p. Gabe von radioaktiv markierter VPA an junge Ratten fanden ALY und ABDEL-LATIF (1980) bereits nach 30 min eine maximale Verteilung der Radioaktivität ins Gewebe. Zu dieser Zeit waren von dem in diesen drei Organen vorhandenen VPA 17 % im Gehirn, 64 % in der Leber und 19 % in der Niere. PORUBEK et al. (1989) ermittelten 24 h nach i.p. Gabe von 60 mg/kg radioaktiv markierter VPA in adulten Ratten nur noch 1 % der verabreichten Dosis im Gewebe. Auf zellulärer Ebene wird VPA sowohl in der Leber als auch im Gehirn vor allem in die flüssige Fraktion verteilt, gefolgt von den Mitochondrien. In der Leber ist auch der VPA-Gehalt in den Mikrosomen hoch. Im Gehirn befindet sich nur wenig VPA im Myelin und den Synaptosomen (ALY und ABDEL-LATIF, 1980).

Das scheinbare Verteilungsvolumen (V_d) von VPA ist im Vergleich zu anderen Antiepileptika sehr klein (LEVY und KOCH, 1982) (s. Tabelle 2.1-1). Bei epileptischen Patienten wurden höhere Werte von 0,2-0,4 l/kg bei Polytherapie mit anderen Antiepileptika im Vergleich zu gesunden Personen, bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen und bei Patienten, bei denen eine *steady state*-VPA-Plasmakonzentration aufrechterhalten wurde, im Vergleich zu Patienten mit einmaligen Gaben ermittelt (s. Übersichtsartikel von DAVIS et al., 1994).

Nach der fast vollständigen Metabolisierung von VPA (s. Abschnitt 2.1.4) erfolgt die Ausscheidung hauptsächlich mit dem Urin. Nur ein geringer Teil wird in die Fäzes, die Ausatemluft und die Galle ausgeschieden (s. Übersichtsartikel von CHAPMAN et al., 1982, COTARIU

und ZAIDMAN, 1988, und GUGLER und VON UNRUH, 1980). Es besteht eine nichtlineare Beziehung zwischen dem Alter und der VPA-Clearance (CLOYD et al., 1993). Epileptische Kinder im Alter von 2-10 Jahren weisen sowohl bei Monotherapie als auch bei Polytherapie im Vergleich zu Erwachsenen eine höhere Plasmaclearance und eine geringere terminale Plasmaeliminationshalbwertszeit auf (HALL et al., 1985). Die Auswertung der Ergebnisse von CHEN et al. (1996) ergab auch in jungen Ratten eine relativ höhere totale Clearance von VPA als in adulten Tieren (s. Tabelle 2.1-1).

VPA zeigt in Tierstudien nur bei hohen Dosen eine antikonvulsive Aktivität. Nach CHAPMAN et al. (1982) ist die effektive Dosis (ED₅₀) der Ratte ca. 15fach höher und der Maus ca. 10fach höher als beim Menschen. Die minimale effektive Blutkonzentration ist bei der Ratte ca. 6fach höher als beim Menschen (s. Tabelle 2.1-1). Die therapeutisch wirksame VPA-Konzentration des Menschen liegt bei 50-100 µg/ml (PINDER et al., 1977, SCHOBEN et al., 1975).

Tabelle 2.1-1: Pharmakokinetische Parameter von Mensch, Ratte und Maus

Spezies	Mensch	Ratte	Maus
V _d in l/kg	0,126-0,175 ^{*a}	0,66 ^{**b}	0,33 ^{**c}
Plasmaclearance in ml/kg/h (Mensch) bzw. in ml/kg/min (Ratte, Maus)	6-11 ^f	4,17 ^b	4,33 ^c
Plasmaeliminationshalbwertszeit in h	12-15,9 ^f	4,6 ^b	0,82 ^c
ED ₅₀ in mg/kg p.o.	25 (20-30)	314 (262-372) ^{***d}	209 (172-246) ^{***d}
minimaler effektiver Blutspiegel in µg/ml	50-60 ^c	≥224-≥512 ^{***d}	≥70 ^{***d}
Proteinbindung in %	94,8 ^{****b}	63,4 ^{****b}	11,9 ^{****b}

Quellen: DAVIS et al. (1994) (a), LÖSCHER (1978) (b), LÖSCHER und ESENWEIN (1978) (c), CHAPMAN et al. (1982) (d), JEAUVONS (1981) (e), LEVY und SHEN (1989) (f)

* nach einmaliger Dosis

** nach einmaliger i.v. Gabe von 200 mg/kg

*** Pentylentetrazol-induzierter tonischer Krampf

**** Proteinbindung bei VPA-Konzentration von 75 µg/ml bestimmt

2.1.3.2 Proteinbindung

Die Bindung von VPA erfolgt hauptsächlich an Albumin (LEVY und KOCH, 1982, NURGE et al., 1991). LÖSCHER (1978) zeigte, daß starke Differenzen in der Plasmaproteinbindung zwischen Mensch, Ratte und Maus bestehen (s. Tabelle 2.1-1). Bei gesunden Menschen und bei

therapeutischer Blutkonzentration ist die freie Fraktion von VPA sehr klein (LEVY und KOCH, 1982).

Die Plasmaproteinbindung von VPA ist konzentrationsabhängig, und die freie Fraktion steigt nichtlinear mit der totalen VPA-Plasmakonzentration bei Mensch und Tier *in vivo* (BOWDLE et al., 1980, KLOTZ und ANTONIN, 1977, LÖSCHER, 1978). CRAMER et al. (1986) stellten beim Menschen ein nichtlineares Ansteigen der ungebundenen VPA-Konzentration fest, wenn die totale VPA-Plasmakonzentration über 80-85 µg/ml steigt. LÖSCHER (1978) fand *in vivo* bei Hunden und Ratten heraus, daß die Proteinbindung sank, wenn die Serumkonzentration von VPA über 70 µg/ml liegt. Die Ursache dafür sahen LÖSCHER (1978) sowie YU und SHEN (1992) in einer Sättigung der Plasmaproteine mit VPA. Beim Menschen wird eine Sättigung der Bindungskapazität dann erreicht, wenn im Plasma die obere Grenze der therapeutischen Konzentration nachweisbar ist (GUGLER et al., 1977).

Auch *in vitro*-Untersuchungen im Meerschweinchen bestätigten dieses Ergebnis. Es steigt zwar der freie VPA-Anteil mit steigender Konzentration im Plasma, allerdings sinkt die absolut gebundene VPA-Menge nicht (YU und SHEN, 1992).

Nach YU und SHEN (1992) konnte aber bei *in vivo*-Untersuchungen im Meerschweinchen auch ein absolutes Sinken der proteingebundenen VPA-Menge mit steigender VPA-Konzentration festgestellt werden. Die Ursache sahen sie eher in einer Induktion und Produktion von Bindungskonkurrenten durch VPA als in einer verminderten Bindungsfähigkeit aufgrund einer Konformationsänderung im Albuminmolekül durch hohe VPA-Konzentrationen über 10 mM (BRODERSEN et al. 1990). Bindungskonkurrenten könnten endogen induzierte Substanzen oder Metaboliten von VPA selbst, insbesondere 2-en-VPA, sein (YU und SHEN, 1992). Dieser Metabolit zeigt eine höhere Affinität zu Plasmaproteinen der Ratte als VPA (NAU und LÖSCHER, 1984, SEMMES und SHEN, 1990).

Es existieren einige Besonderheiten der Proteinbindung. Zum einen verdrängt VPA andere Antiepileptika wie Phenobarbital, Primidon, Phenytoin von ihrer Bindungsseite an Serumalbumine und/oder hemmt deren Metabolismus. Zum anderen verdrängen Salizylsäure (s. Übersicht in LEVY und KOCH, 1982, und in DAVIS et al., 1994) und freie Fettsäuren (BOWDLE et al., 1982, BRODERSEN et al., 1990, MONKS und RICHENS, 1978) VPA von der Bindung an Plasmaproteine. Diese Erhöhung der Plasmakonzentration ungebundener VPA wird beim Menschen durch eine durch Hungern induzierte Zunahme freier Fettsäuren bzw. durch die Infusion einer Fettemulsion verursacht (BOWDLE et al., 1982, ZIMMERMAN et al., 1981).

2.1.4 Metabolismus von VPA

2.1.4.1 Metabolismuswege

Die Metabolisierung von VPA findet größtenteils in der Leber statt² und ist generell auf die ungebundene Fraktion beschränkt (LÖSCHER, 1978). VPA wird fast vollständig metabolisiert, da nur 1-3 % der verabreichten Dosis unverändert im Urin erscheinen (GUGLER und VON UNRUH, 1980, KLOTZ und ANTONIN, 1977). Trotz der einfachen chemischen Struktur von VPA unterliegt diese Substanz sehr komplexen metabolischen Umbauvorgängen. Es wurden bei Mensch und Tier vier (CHAPMAN et al., 1982, GRANNEMAN et al., 1984b) bzw. fünf (ZACCARA et al., 1988, PRICKETT und BAILLIE, 1984) parallele metabolische Wege beschrieben: die Glucuronidierung, die β -Oxidation, die ω -Oxidation, die ω_1 -Oxidation und die ω_2 -Oxidation. PISANI (1992) ermittelte in geringem Umfang auch eine γ -Dehydrogenierung und eine δ -Dehydrogenierung von VPA. Die Tabelle 2.1-2 zeigt den von verschiedenen Autoren ermittelten Anteil der einzelnen in der Leber stattfindenden Metabolisierungswege und deren Hauptorte unter normalen Bedingungen. In der Abbildung 2.1-1 sind die Hauptmetabolismuswege von VPA dargestellt.

2.1.4.2 Mitochondrialer Metabolismus

Alle Intermediärprodukte der mitochondrialen β -Oxidation von VPA sind CoA-Ester (KESTERSON et al., 1984, MATSUMOTO et al., 1976, PONCHAUT et al., 1992b). Metaboliten der β -Oxidation sind 2-en-VPA³ und die Folgeprodukte 3-OH-VPA⁴ und 3-keto-VPA (GOMPertz et al., 1977, KOCHEN et al., 1977, NAU und LÖSCHER, 1984, SHIRLEY et al., 1993). Der Metabolit 2,4-dien-VPA⁵ und das Folgeprodukt 3-keto-4-en-VPA (BAILLIE, 1988, RETTENMEIER et al., 1985, RETTENMEIER et al., 1986) sind ebenfalls β -Oxidationsmetaboliten. Metaboliten der γ -Dehydrogenierung sind 3-en-VPA⁶ und das Folgeprodukt 2,3'-dien-VPA (FISHER et al., 1992a, PISANI, 1992, RETTIE et al., 1987) (s. Abbildung 2.1-1).

² BAILLIE und LEVY (1991), COTARIU und ZAIDMAN (1988), GUGLER et al. (1977), GUGLER und VON UNRUH (1980), NURGE et al. (1991).

³ CHAPMAN et al. (1982), KOCH et al. (1989b), KOCHEN und SCHEFFNER (1980), KONDO et al. (1990), KUHARA et al. (1978), LÖSCHER et al. (1988b), MATSUMOTO et al. (1976), RETTIE et al. (1986), SHIRLEY et al. (1993).

⁴ JAKOBS und LÖSCHER (1978), KOCHEN und SCHEFFNER (1980), KUHARA et al. (1978), LÖSCHER et al. (1988b), MATSUMOTO et al. (1976), RETTIE et al. (1986), SHIRLEY et al. (1993).

⁵ BAILLIE und RETTENMEIER (1989), GRANNEMAN et al. (1984b), KESTERSON et al. (1984), LÖSCHER et al. (1993a), PONCHAUT et al. (1992b).

⁶ ACHAEMPONG und ABBOTT (1985), ACHAEMPONG et al. (1983), BAILLIE und LEVY (1991), CHAPMAN et al. (1982), KOCHEN et al. (1984), NAU und SIEMES (1992), RETTIE et al. (1987).

Tabelle 2.1-2: Abbauwege von VPA, Anteil der einzelnen Wege und deren Bildungsorte

Abbauweg	Anteil in %	Ort	Spezies
Glucuronidierung	20 ^{a, b}	endoplasmatisches Retikulum	Mensch [*]
	25-30 ^c	endoplasmatisches Retikulum	Mensch ^{**}
	50 ^d	endoplasmatisches Retikulum	Mensch ^{***}
	55 ^e	endoplasmatisches Retikulum	Ratte, <i>in vivo</i> [*]
	40-60 ^f	Zytoplasma	k.A. ^{**}
	68-73 ^{b, g}	k.A.	Ratte, <i>in vivo</i> [*]
	80 ^h	endoplasmatisches Retikulum	Ratte, <i>in vivo</i> [*]
β -Oxidation	6,5 ^e	Mitochondrien	Ratte, <i>in vivo</i> [*]
	10-15 ^c	Mitochondrien	Mensch ^{**}
	24 ^d	Mitochondrien	Mensch ^{***}
	30-40 ^f	Mitochondrien	k.A. ^{**}
	k.A.	Peroxisomen	Ratte, <i>in vivo</i> ⁱ , <i>in vitro</i> ^j
ω -Oxidation	6 ^e	endoplasmatisches Retikulum	Ratte, <i>in vivo</i> [*]
	15 ^d	endoplasmatisches Retikulum	Mensch ^{***}
ω_1 -Oxidation	1,5 ^e	endoplasmatisches Retikulum	Ratte, <i>in vivo</i> [*]
	10 ^d	endoplasmatisches Retikulum	Mensch ^{***}
γ -Dehydrogenierung	0,7 ^d	Mitochondrien	Mensch ^{***}
δ -Dehydrogenierung	0,3 ^d	Mikrosomen	Mensch ^{***}

Quellen: KUPFERBERG (1980) (a), EYMARD et al. (1971) (b), BAILLIE und LEVY (1991) (c), PISANI (1992) (d), GRANNEMAN et al., (1984b), (e), BUCHI et al. (1984) (f), PORUBEK et al. (1989) (g), FISHER et al. (1991) (h), HEINEMEYER et al. (1983) (i), OLSON et al. (1986) (j)

* prozentualer Anteil des Weges an der eingesetzten VPA-Dosis im Urin

** prozentualer Anteil des Weges am gesamten VPA-Metabolismus

*** prozentualer Anteil des Weges an der gesamten im Urin ausgeschiedenen VPA-Metabolitenmenge

Das aus VPA entstehende einfach ungesättigte 2-en-VPA wurde in biologischen Flüssigkeiten vor allem als 2-(*E*)-Isomer gefunden (RETTENMEIER et al., 1989). Das 3-keto-VPA entsteht durch β -Oxidation aus 3-OH-VPA, kann aber auch aus 2-en-VPA gebildet werden (PISANI, 1992). Dieser Metabolit wird über den Krebs-Zyklus weiter abgebaut (EADIE et al., 1990). Der Metabolit 3-OH-VPA ist auch ein mikrosomales Produkt. Das 2,4-dien-VPA entsteht durch β -Oxidation aus 4-en-VPA⁷ und kann auch im endoplasmatischen Retikulum aus 2-en-VPA gebildet werden. Als erste fanden RETTENMEIER et al. (1985) und RETTENMEIER et al. (1986)

⁷ BAILLIE und RETTENMEIER (1989), GRANNEMAN et al. (1984b), KESTERSON et al. (1984), LÖSCHER et al. (1993a), PONCHAUT et al. (1992b).

heraus, daß die β -Oxidation von 2,4-dien-VPA zum α,β -ungesättigten reaktiven elektrophilen Keton 3-keto-4-en-VPA führt. Der Metabolit 3-en-VPA wurde zum ersten Mal von RETTIE et al. (1987) identifiziert. Der Ursprung von 3-en-VPA und 2,3'-dien-VPA ist nach BAILLIE und LEVY (1991) noch nicht genau bekannt. Beide Metaboliten wurden *in vitro* in Rattenlebermitochondrien, die mit VPA inkubiert wurden, gefunden. Das 3-en-VPA und das doppelt ungesättigte 2,3'-dien-VPA scheinen sowohl durch γ -Dehydrogenierung aus VPA als auch durch Isomerisierung aus 2-en-VPA gebildet zu werden (FISHER et al., 1992a, RETTENMEIER et al., 1987).

2.1.4.3 Mikrosomaler Metabolismus

Die in den Mikrosomen stattfindende ω - und ω_1 -Oxidation von VPA verläuft sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nicht unter Beteiligung von CoA (KUHARA und MATSUMOTO, 1974, PONCHAUT et al., 1992b). Metaboliten der ω -Oxidation sind 5-OH-VPA (NAU und SIEMES, 1992) und das Folgeprodukt PGA (GOMPERTZ et al., 1977, KOCHEN et al., 1977, KUHARA et al., 1978, NAU und SIEMES, 1992). Metaboliten der ω_1 -Oxidation sind 4-OH-VPA (BAILLIE und LEVY, 1991) und das Folgeprodukt 4-keto-VPA (ACHEAMPONG et al., 1983, NAU und SIEMES, 1992). Metabolit der ω_2 -Oxidation ist 3-OH-VPA (PRICKETT und BAILLIE, 1984, RETTENMEIER et al., 1987, RETTIE et al., 1986). Metabolit der δ -Dehydrogenierung ist 4-en-VPA (PONCHAUT et al., 1992b, RETTIE et al., 1987, RETTIE et al., 1988). Ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum wird 2,4-dien-VPA gebildet (KASSAHUN und BAILLIE, 1993) (s. Abbildung 2.1-1).

RETTENMEIER et al. (1985) vermuteten, daß die Dicarboxylsäure PGA vielleicht auch aus 4-en-VPA gebildet werden kann. Der Metabolit 3-OH-VPA, der bei Mensch und Ratte durch direkte Hydroxylierung von VPA Cytochrom-P450-abhängig gebildet wird, ist auch ein Produkt der β -Oxidation. KOCH et al. (1989b) stellten jedoch *in vivo* beim Menschen fest, daß 3-OH-VPA eher durch die mikrosomale Oxidation als durch die mitochondriale β -Oxidation entsteht.

Von BAILLIE (1988) und RETTIE et al. (1987) wurde ermittelt, daß die 4-en-VPA-Bildung, katalysiert durch ein Mitglied der Cytochrom-P450-2B-Subfamilie, durch δ -Dehydrogenierung aus VPA erfolgt. BAILLIE (1988) konnte das Cytochrom P450 2B1 als Katalysator dieser Bildung identifizieren. Das 2,4-dien-VPA entsteht durch β -Oxidation aus dem mikrosomal gebildeten 4-en-VPA, kann nach KASSAHUN und BAILLIE (1993) aber auch durch die mikrosomale Cytochrom-P450-katalysierte Dehydrogenierung aus dem β -Oxidationsprodukt 2-en-VPA im endoplasmatischen Retikulum gebildet werden und ist damit immer Resultat einer kombinierten Aktion von CoA-vermittelter β -Oxidation und Cytochrom P450 (NAU und SIEMES, 1992, SIEMES et al., 1993). Es wurden nach 2-en-VPA-Behandlung sogar 2,4-dien-VPA-Konzentrationen gefunden, die sowohl bei Ratten (LÖSCHER et al., 1992) als auch beim Menschen (FABRE et al., 1992) mehrfach höher waren als nach VPA-Gabe. KASSAHUN et al. (1994) stellten dagegen fest, daß die metabolische Aktivierung von CoA-vermittelt

gebildetem 2-en-VPA im endoplasmatischen Retikulum nicht so effizient war wie die 4-en-VPA-Bioaktivierung in den Mitochondrien.

2.1.4.4 Weitere Metaboliten, insbesondere Konjugationsprodukte

Neben der Konjugation von VPA mit Glucuronsäure zum VPA-Glucuronid⁸ wurden folgende Konjugationsprodukte von VPA identifiziert. BOHAN et al. (1984) und MILLINGTON et al. (1985) ermittelten Valproylcarnitin im Urin vom Menschen. GRANNEMAN et al. (1984b) zeigten bei Untersuchungen in Ratten, daß VPA-Glycin aus VPA-CoA in den Lebermitochondrien gebildet wird. Sie wiesen dieses Konjugat im Urin nach, wohingegen GOMPERTZ et al. (1977) VPA-Glycin beim Menschen nicht finden konnten. Eine Konjugation von VPA mit Glutamin ist möglich (SCHOBEN, 1979). Sie findet in den Mitochondrien der Leber statt (GRANNEMAN et al., 1984b). MAO et al. (1992) zeigten, daß während der Aktivierung von VPA zu Valproyl-CoA freies Valproyl-AMP in Lebermitochondrien von Ratten entsteht (s. Abbildung 2.1-1). MATSUMOTO et al. (1976) fanden im Urin VPA-behandelter Ratten verschiedene Säuren wie Propylmalonat, Propylsuccinat und ω -Hydroxysuccinat.

Von 2,4-dien-VPA wurden Glutathion-Konjugate (GSH-Konjugate) in der Galle und die korrespondierenden N-Azetylcystein-Konjugate (NAC-Konjugate) im Urin gefunden. Das GSH-Konjugat wurde auch von 3-keto-4-en-VPA ermittelt. KASSAHUN et al. (1991) und KASSAHUN et al. (1994) identifizierten das GSH-Konjugat 5-GS-3-en-VPA von 2,4-dien-VPA und das daraus entstehende NAC-Konjugat 5-NAC-3-en-VPA in Ratten, die mit 2,4-dien-VPA oder mit 4-en-VPA behandelt wurden. KASSAHUN et al. (1991) fanden das NAC-Konjugat von 2,4-dien-VPA im Urin von Menschen mit VPA-Therapie und BAILLIE und LEVY (1991) bei Patienten mit VPA-assoziiertem Leberschaden. Das GSH-Konjugat stammt höchstwahrscheinlich vom elektrophilen CoA-Thioester von 2,4-dien-VPA ab (KASSAHUN und BAILLIE, 1993). Von KASSAHUN et al. (1994) wurden die Cytochrom-P450-abhängigen, durch Epoxidierung aus 4-en-VPA entstehenden GSH-Konjugate 4-GS-5-OH-VPA und 5-GS-4-OH-VPA-Lacton in der Galle von 4-en-VPA-behandelten Ratten detektiert. TANG et al. (1996) identifizierten zuerst das GSH-Konjugat 5-GS-2-en-VPA. Bei Menschen, die eine VPA-Therapie erhielten, wurde zusätzlich zum 5-NAC-3-en-VPA im Urin ein nicht identifiziertes NAC-Konjugat von 2,4-dien-VPA detektiert (KASSAHUN et al., 1991). Nach TANG et al. (1996) könnte es sich um das 5-NAC-2-en-VPA handeln. In 4-en-VPA-behandelten Ratten wurde 5-GS-3-keto-VPA, das GSH-Konjugat von 3-keto-4-en-VPA, identifiziert (KASSAHUN et al., 1994). In jüngsten Untersuchungen fanden TANG und ABBOTT (1996b) zusätzlich zu den GSH-Konjugaten 5-GS-4-OH-VPA-Lacton von 4,5-epoxy-VPA und 5-GS-3-en-VPA von 2,4-dien-VPA-CoA, die NAC-Konjugate 5-NAC-4-OH-VPA-Lacton bzw. 5-NAC-3-en-VPA im Urin und der Galle von Ratten, die mit 4-en-VPA behandelt wurden.

⁸ DICKINSON et al. (1989), GUGLER et al. (1977), KLOTZ und ANTONIN (1977), LIU et al. (1992), POLLACK und BROUWER (1991), SCHOBEN et al. (1975).

Hauptmetabolismuswege von Valproinsäure

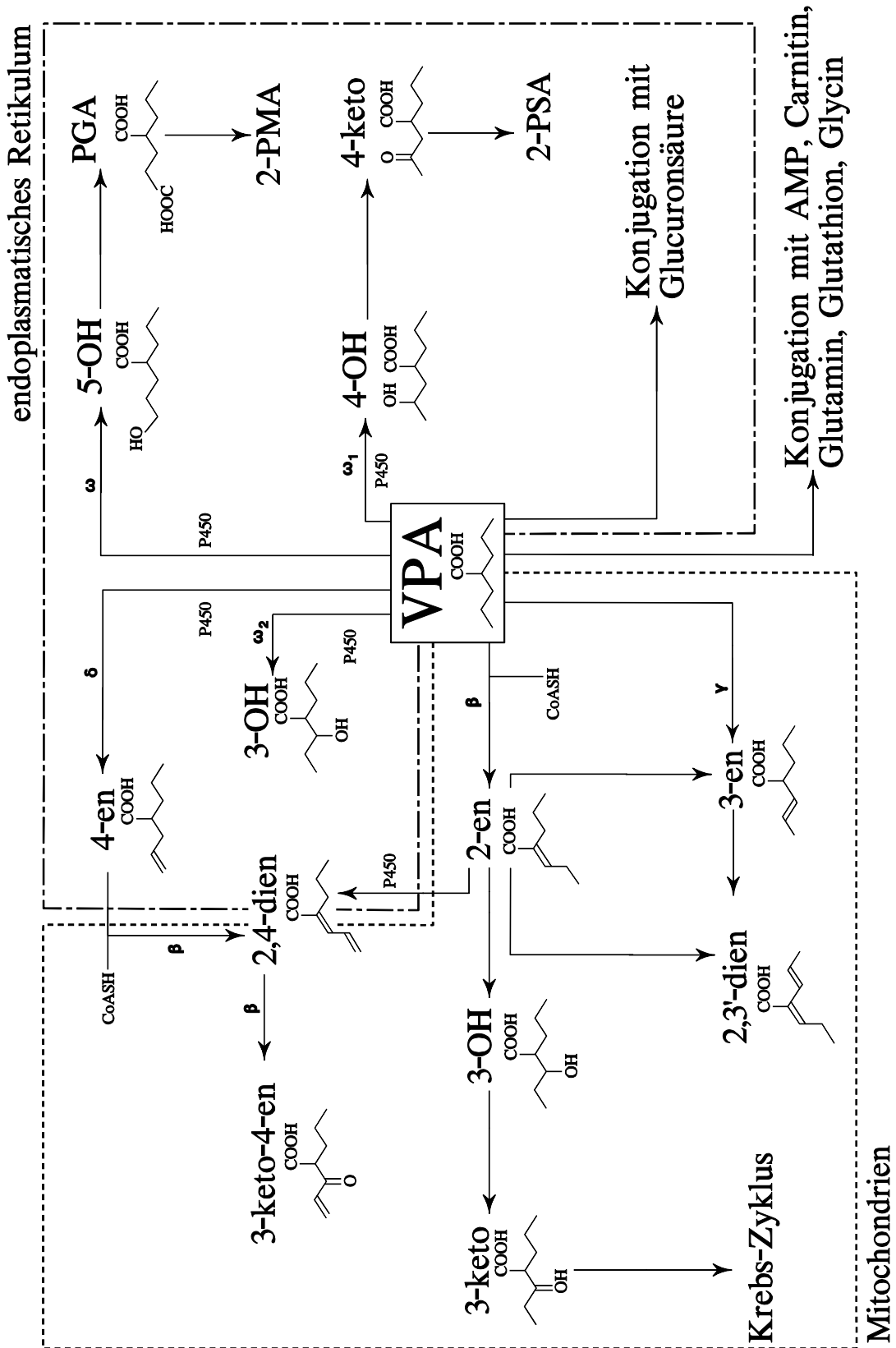


Abbildung 2.1-1: Hauptmetabolismuswege von VPA

Metabolismuswege zu GSH-Konjugaten

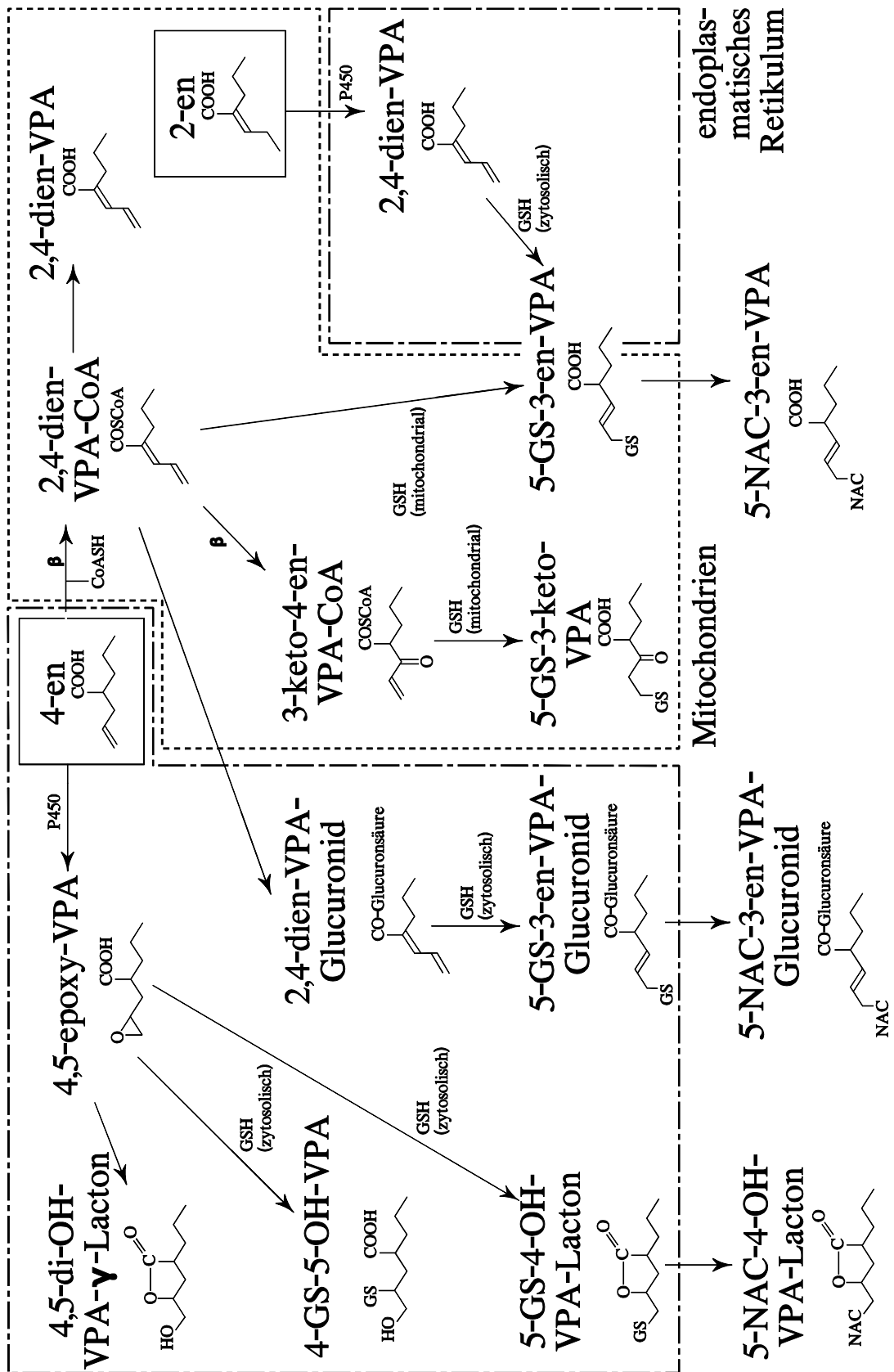


Abbildung 2.1-2: Metabolismuswege zu GSH-Konjugaten

TANG und ABBOTT (1996a) berichteten zum ersten Mal über die Konjugation von 2,4-dien-VPA-Glucuronid mit GSH zu GSH-Glucuronid-Dikonjugaten (5-GS-3-en-VPA-Glucuronid I und II, 5-GS-2-en-VPA-Glucuronid in der Galle) *in vivo* von 2,4-dien-VPA-behandelten Ratten. Ihre Untersuchungen unterstützen die Hypothese, daß 2,4-dien-VPA über die Glucuronidierung zum 2,4-dien-VPA-Glucuronid bioaktiviert wird und über eine weitere, wahrscheinlich GST-katalysierte Konjugation (Michael-Addition) mit GSH zu GSH-Glucuronid-Dikonjugaten in der Galle (5-GS-3-en-VPA-Glucuronid) und zu korrespondierenden Glucuroniden im Urin (5-NAC-3-en-VPA-Glucuronid) führen. Diese GSH-Konjugation ist also nicht abhängig von der Bioaktivierung des 2,4-dien-VPA zur CoA-Thioester-Form (TANG und ABBOTT, 1996a). Die Untersuchungen unterstützen die Annahme, daß die größte Menge des GSH-Glucuronid-Dikonjugats von 2,4-dien-VPA aus dem 2,4-dien-VPA entsteht, das mikrosomal aus 2-en-VPA gebildet wird. Demgegenüber wird das GSH-Konjugat aus 2,4-dien-VPA in Ratten vor allem aus dem 2,4-dien-VPA gebildet, das mitochondrial aus 4-en-VPA entsteht (KASSAHUN et al., 1994). Nach letzteren Autoren ist die 4-en-VPA-Bioaktivierung in den Mitochondrien in diesem Fall also effektiver. Das GSH-Glucuronid-Dikonjugat (5-GS-3-en-VPA-Glucuronid) von 2,4-dien-VPA wurde auch in der Galle und das NAC-Glucuronid-Dikonjugat (5-NAC-3-en-VPA-Glucuronid) von 2,4-dien-VPA sowohl in der Galle als auch im Urin von 4-en-VPA-behandelten Ratten identifiziert. Die Umwandlung der GSH-Konjugate in die korrespondierenden Mercaptursäuren scheint also in der Leber ablaufen zu können (TANG und ABBOTT 1996b). Die Abbildung 2.1-2 zeigt metabolische Wege von 4-en-VPA zu GSH-Konjugaten.⁹

2.1.4.5 Quantitative Verteilung der Hauptmetaboliten

Hauptmetaboliten im Plasma des Menschen sind 2-en-VPA, 3-keto-VPA und 2,3'-dien-VPA. In geringerer Konzentration wird 2,4-dien-VPA und 3-en-VPA gefunden. Die Metaboliten 4-en-VPA, 3-OH-VPA, 5-OH-VPA, PGA, 4-OH-VPA, 4-keto-VPA und 2-PSA sind gewöhnlich in sehr geringen Mengen vorhanden (KASSAHUN et al., 1990, NAU und SIEMES, 1992).

LÖSCHER et al. (1992) fanden *in vivo* im Plasma von Ratten, die eine Woche chronisch mit VPA behandelt wurden, vor allem 2-en-VPA, 3-keto-VPA, 2,3'-dien-VPA, 4-OH-VPA und 5-OH-VPA. GRANNEMAN et al. (1984a) ermittelten *in vivo* in chronischen Studien mit Ratten in den untersuchten Alters- und Gewichtsgruppen keine drastischen Unterschiede zwischen diesen.

Hauptmetaboliten im Urin des Menschen sind VPA-Glucuronide und die teilweise glucuronidierten Hydroxylierungsprodukte 3-OH-VPA, 4-OH-VPA und 5-OH-VPA und die Oxidationsprodukte PGA, 3-keto-VPA und 4-keto-VPA. In geringerer Konzentration wurden 2-en-VPA und 2-PSA und in sehr geringer Konzentration 2,4-dien-VPA, 3-en-VPA und 4-en-VPA

⁹ Zur Zusammenstellung dieses Schemas dienten die Arbeiten von JURIMA-ROMET et al. (1996), KASSAHUN et al. (1994), TANG und ABBOTT (1996a), TANG und ABBOTT (1996b), TANG et al. (1996) und TANG et al. (1995).

im Urin ermittelt. Die ungesättigten Metaboliten und Hydroxylierungsprodukte werden hauptsächlich in der glucuronidierten Form und die keto-Metaboliten in der freien Form ausgeschieden (KASSAHUN et al., 1990, NAU und SIEMES, 1992, NAU et al., 1981).

Hauptmetaboliten im Urin von chronisch VPA-behandelten Ratten sind die VPA-Glucuronide. In Untersuchungen von GRANNEMAN et al. (1984a) war die Wiederfindung der Metaboliten im Urin trotz der verschiedenen eingesetzten VPA-Dosen (350-700 mg/kg) und Gewichte der Ratten (150-250 g) vergleichbar. Die Wiederfindung in Prozent der verabreichten Dosis betrug bei 3-keto-VPA, 4-OH-VPA, 5-OH-VPA und PGA zwischen 1 und 10 %, bei t-2-en-VPA, t-3-en-VPA, 3-OH-VPA, 4-keto-VPA, 2-PSA und c-3-en-VPA zwischen 0,1 und 1 % und bei c-2-en-VPA, 4-en-VPA und 2,3'-dien-VPA zwischen 0,01 und 0,1 %.

GRANNEMAN et al. (1984a) und GRANNEMAN et al. (1984b) zeigten, daß die Konzentration von VPA und der Metaboliten im gesamten Leberhomogenat von Ratten nach i.p. Gabe von 600 mg/kg VPA über 5 Tage mit den Plasmawerten übereinstimmte, die zur selben Zeit entnommen wurden (Leberhomogenat, VPA: 629 µg/ml; 4-en-VPA: 0,51 µg/ml; Plasma, VPA: 837 µg/ml; 4-en-VPA: 0,54 µg/ml). Eine Ausnahme stellte PGA dar, das Verhältnis PGA/VPA war im Homogenat 30mal größer. Hepatozellulär ist der größte Anteil der Metaboliten im Homogenat, gefolgt von den Mitochondrien und Mikrosomen. Die Ausnahme ist der Metabolit 3-en-VPA, der im Homogenat und in den Mitochondrien in vergleichbaren Mengen vorhanden ist (GRANNEMAN et al., 1984a) und die β-Oxidationsmetaboliten 2-en-VPA und 3-OH-VPA, die vermehrt in den Mitochondrien zu finden sind (GRANNEMAN et al., 1984b).

Tabelle 2.1-3: VPA- und Metabolitenanteile in Prozent der eingesetzten VPA-Menge in isolierten Rattenhepatozyten nach 4 h Inkubation mit 1 mM VPA (GOFFLOT et al., 1994) bzw. 0,5 mM VPA (ROGIERS et al., 1988a)

	VPA	2-en	3-en	3-keto	4-en	4-keto	4-OH	5-OH	PGA
unkonjugiert ^a	28,76	0,25	-	0,12	-	0,08	0,07	1,65	0,00
unkonjugiert ^b	k.A.	1	1	3	-	k.A.	2	3	8
konjugiert ^a	36,99	0,05	-	0,22	-	0,00	0,29	0,64	0,23
konjugiert ^b	19	0,15	-	-	0,15	k.A.	2	2	13

Quellen: GOFFLOT et al. (1994) (a), ROGIERS et al. (1988a) (b)

GOFFLOT et al. (1994) ermittelten nach 4 h Inkubation von isolierten Hepatozyten der Ratte mit 1 mM VPA hauptsächlich VPA-Glucuronid. ROGIERS et al. (1988a) stellten im selben Modell mit Leberzellen von 24-h-hungernden Ratten dies ebenfalls fest. GOFFLOT et al. (1994) fanden mit Ausnahme der Metaboliten 3-OH-VPA, 3-en-VPA und 4-en-VPA in isolierten Rattenhepatozyten die Hauptplasmametaboliten von Mensch und Ratte. Die Ergebnisse korrespondieren auch mit denen von ROGIERS et al. (1988a) und SHIRLEY et al. (1993) im selben Modell. ROGIERS et al. (1988a) fanden als unkonjugierte Hauptmetaboliten

PGA, 3-keto-VPA und 5-OH-VPA und als konjugierte Hauptmetaboliten PGA, 4-OH-VPA und 5-OH-VPA. Zusätzlich ermittelten diese Autoren und SHIRLEY et al. (1993) 3-en-VPA bzw. 3-en-VPA und 3-OH-VPA. Der Metabolit 4-en-VPA wurde von ROGIERS et al. (1988a) nur in Spuren in konjugierter Form gefunden. GOFFLOT et al. (1994) detektierten ihn nicht. Der Metabolit 2,4-dien-VPA konnte weder von ROGIERS et al. (1988a) noch von GOFFLOT et al. (1994) ermittelt werden (s. Tabelle 2.1-3).

2.1.4.6 Beteiligung der β - bzw. ω -Oxidation endogener Fettsäuren und des Aminosäurestoffwechsels am VPA-Metabolismus

Es gibt Hinweise, daß für die β -Oxidation von VPA die Enzyme der endogenen β -Oxidation von Fettsäuren bzw. des Aminosäuremetabolismus genutzt werden. Nach KUHARA und MATSUMOTO (1974) scheint die ω -Oxidation endogener Fettsäuren an der ω -Oxidation von VPA zu 5-OH-VPA und PGA beteiligt zu sein.

Ähnlich den natürlichen Fettsäuren bildet VPA Acyl-Adenylat-Intermediate (Valproyl-AMP) (MAO et al., 1992), Acyl-CoA-Derivate (Valproyl-CoA)¹⁰ und Carnitinester (Valproylcarnitin) (BOHAN et al., 1984, MILLINGTON et al., 1985). Wie natürliche Acyl-CoA-Verbindungen unterliegt auch Valproyl-CoA der mitochondrialen β -Oxidation (BJORGE und BAILLIE, 1991, GRANNEMAN et al., 1984b, LI et al., 1991) und der peroxisomalen β -Oxidation (PONCHAUT et al., 1991, VAMECQ et al., 1993). Nach ITO et al. (1990) ist 2-en-VPA-CoA das Dehydrogenierungsprodukt der 2-methyl-verzweigt-kettigen Acyl-CoA-Dehydrogenase aus Valproyl-CoA und nach LI et al. (1991) ist 3-OH-VPA-CoA Hydrogenierungsprodukt der Enoyl-CoA-Hydratase (Crotonase) aus 2-en-VPA-CoA und 3-keto-VPA-CoA ist das Dehydrogenierungsprodukt der membrangebundenen NAD⁺-spezifischen 3-hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase von 3-OH-VPA-CoA.

MANNAERTS et al. (1979) und MANNAERTS et al. (1978) zeigten in isolierten Hepatozyten der Ratte, daß die β -Oxidation endogener Fettsäuren induzierende Clofibrat zu einer 3-4fachen Erhöhung der Fettsäure- β -Oxidation führt. Das wird auf eine Steigerung der mitochondrialen β -Oxidation zurückgeführt. In *in vivo*-Untersuchungen wurde von HEINEMEYER et al. (1983) nach einer Clofibratvorbehandlung im Urin von mit VPA behandelten Ratten eine signifikant erhöhte Menge der β -Oxidationsmetaboliten 2-en-VPA und 3-keto-VPA ermittelt. KOCH et al. (1989a) zeigten in ihren *in vivo*-Versuchen in Ratten, daß eine Clofibratvorbehandlung zu einer Erhöhung der 2-en-VPA-Bildungsclearance führt. In anderen Untersuchungen bei hungernden Ratten und fastenden Menschen wurde im Vergleich zu Ratten und Menschen, denen Glukose infundiert wurde, eine niedrigere Bildungsclearance der β -Oxidationsmetaboliten festgestellt (KOCH et al. 1989a, KOCH et al. 1989b). Diese Ergebnisse sprechen nach Meinung der Autoren für eine mögliche Beteiligung der endogenen β -Oxidation am VPA-Metabolismus. Die von MORTENSEN (1980) und MORTENSEN et al. (1980) beobachtete höhere Ausscheidung von C₆- bis C₁₀-Dicarboxylsäuren im Urin von VPA-

¹⁰ BECKER und HARRIS, (1983), KESTERSON et al. (1984), PONCHAUT et al. (1992b), THURSTON et al. (1985), TURNBULL et al. (1983a).

behandelten Ratten bzw. epileptischen Menschen weist ebenfalls auf die Konkurrenz um die β -Oxidationsenzyme hin (BAILLIE und LEVY, 1991). Außerdem bestehen nach BAILLIE und LEVY (1991) strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den mitochondrialen VPA-Metaboliten 2-en-VPA, 3-OH-VPA, 3-keto-VPA und den Intermediärprodukten des Fettsäure β -Oxidationszyklus.

ANDERSON et al. (1994) vermuten aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zwischen den β -Oxidationsmetaboliten von VPA und den β -Oxidationsmetaboliten der verzweigt-kettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin, daß VPA die Schlüsselenzyme des verzweigt-kettigen Aminosäuremetabolismus nutzen könnte. So stellten DICKINSON et al. (1985) strukturelle Ähnlichkeiten zwischen dem Isoleucinmetaboliten 2-Methyl-3-Ketobutyrat, einem Substrat der β -Ketothiolase, und 3-keto-VPA fest. LUO et al. (1995) charakterisierten ein neues Enzym im Isoleucinmetabolismus, die kurzkettige L-3-Hydroxy-2-Methylacyl-CoA-Dehydrogenase (SC-HMAD), das den zweiten Dehydrogenierungsschritt während der β -Oxidation des Isoleucinmetaboliten 2-Methylbutyryl-CoA katalysiert. Dieses Enzym könnte auch in die mitochondriale β -Oxidation von VPA zu 3-keto-VPA-CoA in der Leber einbezogen sein (LI et al., 1991, LUO et al., 1995).

2.1.5 Hungern und dessen Einfluß auf VPA-Kinetik und VPA-Metabolismus

2.1.5.1 Einfluß von Hungern auf den Organismus, insbesondere auf die Leber

Hungern verursacht Streß (MATSUZAWA und SAKAZUME, 1994) und ist mit einer Erhöhung des Spiegels von endogenen Fettsäuren bei Menschen und Tieren verbunden (FELIG, 1979, KOCH et al., 1989a, KOCH et al., 1989b). Alle Merkmale eines ketotischen Stadiums sind bei Ratten bereits nach 12 h Hungern voll ausgeprägt (MCGARRY et al., 1973). VAN DEN BRANDEN und ROELS (1985) ermittelten *in vivo* bereits nach 24 h eine starke und signifikant erhöhte 3-Hydroxybutyrat-Konzentration im Plasma von Ratten. Ähnliche Angaben wurden von MCGARRY et al. (1973) gemacht. Nach der gleichen Hungerzeit konnte in Mäusen (VAN DEN BRANDEN et al., 1984) und Ratten (VAN DEN BRANDEN und ROELS, 1985) eine signifikant gesteigerte H_2O_2 -Produktion in der Leber nachgewiesen werden, die auch zwischen 24 und 48 h weiter anstieg. Das zeigt einen erhöhten Durchfluß von Fettsäuren durch die peroxisomale β -Oxidation als eine langsame Antwort auf den höheren Anfall von Fettsäuren an. Bei BJÖRKHEM (1973) führte Hungern zur Stimulation der Bildung von Dicarboxylsäuren, die in den Peroxisomen β -oxidiert werden können (MORTENSEN et al., 1982). Die Verminderung des Körper- und Lebergewichtes in Abhängigkeit von der Hungerperiode ist in der Tabelle 2.1-4 dargestellt.

MCGARRY et al. (1973) stellten schon nach 12 h Hungern einen fast völligen Glykogenverlust der Leber von Ratten fest. RAKOTOAMBOA et al. (1994) beobachteten dies nach 24 h Hungern. LÖSCHER et al. (1993b) ermittelten in 40 h hungernden Ratten eine Verminderung des Glykogengehaltes um 64 %. Wie elektronenmikroskopisch nachgewiesen, verschwinden nach 48 h Hungern die Glykogengranula in den Hepatozyten und die Elektronendichte der Mitochondrien steigt (SORRENTINO et al., 1994). LÖSCHER et al. (1993b) stellten lichtmikroskopisch nur eine Verminderung des Volumens der Hepatozyten nach 25 h und 40 h Hungern fest. Durch 48 h Hungern verringern sich das Zellvolumen und die Zelloberfläche um jeweils ca. 40 %, und es werden pro Einheit Hepatozytenoberfläche mehr Fettsäuren aufgenommen (SORRENTINO et al., 1994). RAKOTOAMBOA et al. (1994) stellten *in vivo* in Ratten, die 24 h gehungert hatten, eine Verminderung der ALT-Aktivität (21 %) sowie der Glukose- (38 %) und Triglyceridkonzentration (64 %) im Plasma fest. LÖSCHER et al. (1993b) ermittelten in Ratten nach 40 h Hungern eine signifikante Erhöhung der AST-Aktivität und auch eine Verringerung der ALT-Aktivität sowie eine Verminderung von Bilirubin im Plasma im Vergleich zu den Werten vor dem Hungern. Der Ammoniakgehalt ist erhöht, und eine Lipidmobilisierung findet statt. Durch Hungern wird die Glucuronidierung in der Leber verringert (PRICE et al., 1987, SHIMIZU und MORITA, 1992). SOHN und FIALA (1995) stellten jedoch in der Ratte nach 48 h Hungern eine unveränderte UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität fest. Sie ermittelten nach 48 h Hungern eine um 21 % verringerte GST-Aktivität. Außerdem verursacht Hungern in Ratten einen Anstieg der Carnitinkonzentration der Leber (FRENCH et al., 1986). Die Glukose-6-Phosphatase-Aktivität steigt in Ratten in den ersten 48 h des Hungerns an und sinkt danach (MINASSIAN und MITHIEUX, 1994).

Tabelle 2.1-4: Körper- und Lebergewichtsverminderung bei hungernden Ratten

	Dauer des Hungerns						
	8 h	16 h	18 h	24 h	40 h	48 h	72 h
Körpergewichtsverminderung in %	6 ^a	5 ^b -10 ^a	-	11 ^a	-	10 ^c -15 ^d	19 ^e
Lebergewichtsverminderung in %	22,5 ^a	30 ^a	36 ^h	35 ^a -44 ^f	42 ^g	44 ^{c,d}	-

Quellen: BROWN et al. (1995) (a), MATSUZAWA und SAKAZUME (1994) (b), SORRENTINO et al. (1994) (c), SOHN und FIALA (1995) (d), HU et al. (1995) (e), RAKOTOAMBOA et al. (1994) (f), LÖSCHER et al. (1993b) (g), JAEGER et al. (1974) (h)

Hungern über 48 h verursacht in Ratten ein Ansteigen des totalen Leber-Cytochrom-P450-Gehaltes um 32 % (SOHN und FIALA, 1995). Ein durch Hungern erhöhter Acetonspiegel in der Leber kann zu einem starken Anstieg der Cytochrom-P450-2E1-mRNA (SONG et al., 1986) und zur Transkriptionsaktivierung (JOHANSSON et al., 1990) führen. Hungern über 24 h führt in Ratten zu einer Verdopplung der Cytochrom-P450-2E1-Aktivität (NAKAJIMA et al., 1991). BROWN et al. (1995) stellten bereits nach 8 h Hungern neben einer Erhöhung der Cytochrom-P450-2E1- auch eine unerwartete Erhöhung der Cytochrom-P450-2B1/2-Aktivität in der Leber von Ratten fest, wohingegen auch nach 24 h Hungern keine Aktivitätserhöhung von Cytochrom P450 1A1 ermittelt werden konnte. Für Cytochrom P450 2E1 wurde pro mg

mikrosomales Protein nach 8 h eine 1,2fache, nach 16 h eine 1,7fache und nach 24 h eine 1,9fache Steigerung festgestellt, die Aktivität von Cytochrom P450 2B1/2 stieg auf das 1,3-, 1,6- bzw. 1,7fache. Die Autoren schlußfolgerten, daß eine Hungerperiode von 16 h über Nacht geeigneter ist als eine 8-h-Hungerperiode und eine ähnliche Wirkung hat wie eine 24-h-Hungerperiode. Die Ergebnisse bekräftigen insgesamt, daß das Cytochromsystem hochempfindlich auf den Ernährungszustand von Tieren reagiert.

Cytochrom P450 2E1 kann Zytotoxizität durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und Radikalintermediärprodukten vermitteln (ALBANO et al., 1991, INGELMAN-SUNDBERG et al., 1989). Seine Expression erfolgt unter normalen Bedingungen und nach Induktion in der zentrilobulären Region der Leber (INGELMAN-SUNDBERG et al., 1988). Hungern über 48 h führt in Ratten zu einem 4- bis 5fachen Ansteigen der zentrilobulären Cytochrom-P450-2E1-Proteinmenge und der katalytischen Aktivität sowie zu einer 9fachen Erhöhung von Cytochrom-P450-2E1-mRNA, wohingegen keine signifikanten Effekte auf periportales Cytochrom-P450-2E1-Protein und -mRNA beobachtet wurden (HU et al., 1995). Diese zonenspezifische Expression führt zu einer regional unterschiedlichen Transkription des Cytochrom-P450-2E1-Gens und ist somit toxikologisch kritisch zu bewerten (JOHANSSON et al., 1990). Durch Cytochrom-P450-2E1-aktivierte Hepatotoxine wie Tetrachlorkohlenstoff und Acetaminophen schädigen daher die Zellen hauptsächlich in der zentrilobulären Region (LINDROS et al., 1990). Auf den Einfluß von Hungern auf den GSH-Gehalt wird im Abschnitt 2.3.3.3 eingegangen.

2.1.5.2 Hungern und VPA-Kinetik und -Metabolismus, Leberbiochemie und Leberhistologie

Eine chronische Behandlung mit VPA (3mal täglich 250 mg/kg i.p. über 7 Tage, 40 h Hungern vor dem Behandlungsende) verursacht in Ratten eine signifikante Verminderung des Körpergewichtes, jedoch keine Verminderung des Lebergewichtes. Die vor dem Behandlungsende liegende 40stündige Hungerperiode bewirkt sowohl in Behandlungs- als auch Kontrolltieren ein gleichstarkes Sinken des Körper- und Lebergewichtes gegenüber nicht-hungernden Kontrolltieren (LÖSCHER et al., 1993b). VPA vermindert nach chronischer Behandlung und 40 h Hungern die AST- und γ -GT-Aktivität, verändert nicht die ALT-Aktivität, aber erhöht die Bilirubinkonzentration im Plasma. NDANGIZA et al. (1992) stellten in Ratten fest, daß VPA (1000 mg/kg) nur bei 24 h Hungern vor und nach der einmaligen Behandlung eine Verminderung der ALT-Aktivität bewirkt.

Hungern hat bei chronischen *in vivo*-Untersuchungen an Menschen und Ratten einen starken Einfluß auf die Kinetik und den Metabolismus von VPA (KOCH et al., 1989a, KOCH et al., 1989b). Bei Mensch und Tier konnte bei Hungern ein höherer ungebundener VPA-Anteil im Plasma ermittelt werden (s. Abschnitt 2.1.3.2). Mit Hungern war die totale VPA-Clearance und die Clearance der ungebundenen VPA-Fraktion signifikant, die renale Clearance nicht signifikant niedriger. LÖSCHER et al. (1993b) ermittelten in 25- und 40-h-hungernden Ratten, die VPA, wie oben erwähnt, chronisch bekamen, 1 h nach der letzten Applikation nur einen signifikanten Anstieg der totalen VPA-Plasmakonzentration um 15 %. Die Elimination von

VPA wurde durch Hungern nicht signifikant verringert. So betrug die Halbwertszeit vor der Hungerperiode 0,62 h und nach dieser 0,75 h. Die Autoren erklärten den geringen Anstieg der VPA-Konzentration im Plasma mit Hungern trotz einer Hemmung der β -Oxidation von VPA durch einen eventuell kompensatorischen Anstieg der direkten Glucuronidierung von VPA, da mit steigender VPA-Konzentration im Plasma auch der Anteil ausgeschiedener konjugierter VPA im Urin stieg (DICKINSON et al., 1979) und die Glucuronidierung ein Hauptweg des VPA-Metabolismus in Ratten ist (FISHER et al., 1991). Demgegenüber stellten KOCH et al. (1989b) bei Menschen und KOCH et al. (1989a) bei Ratten mit 24 bzw. 48 h Hungern und VPA-Behandlung eine verminderte Glucuronidierung fest, obwohl diese im Metabolismus der Fettsäuren keine Rolle spielt. LANG (1976) ermittelte jedoch eine Hemmung der Glucuronidierung durch endogene Fettsäuren. Außerdem könnte eine verminderte Glucuronidierung auch mit dem Verlust der Kohlenhydratreserven bei Hungern zusammenhängen, da sie von den Kohlenhydratreserven abhängig ist. Das zeigte REINKE et al. (1981) in der isolierten perfundierten Rattenleber.

KOCH et al. (1989b) stellten bei gesunden Menschen und KOCH et al. (1989a) sowie LÖSCHER et al. (1993b) *in vivo* bei Ratten eine durch Hungern reduzierte β -Oxidation von VPA fest. Nach KOCH et al. (1989a) und KOCH et al. (1989b) scheint die endogene β -Oxidation der Fettsäuren am VPA-Metabolismus beteiligt zu sein (s. Abschnitt 2.1.4.6). Laut den Autoren konkurrieren die bei schlechter Ernährung bzw. bei Hungern erhöht anfallenden Fettsäuren (FELIG, 1979) mit VPA um die β -Oxidation und hemmen damit entscheidende enzymatische Wege von VPA (NAU et al., 1991). LÖSCHER et al. (1993b) stellten in chronisch mit VPA-behandelten Ratten nach 25 und 40 h Hungern stark verringerte Mengen der β -Oxidationsmetaboliten 2-en-VPA und 3-keto-VPA, jedoch eine erhöhte Bildung von 3-en-VPA im Plasma fest. Die 2,3'-dien-VPA-Bildung war nach 25 h Hungern höher, aber nach 40 h Hungern verringert. Der Metabolit 2,4-dien-VPA konnte nur mit Hungern nicht und der Metabolit 4-en-VPA ohne Hungern nur in Spuren und mit Hungern nicht detektiert werden (s. Tabelle 2.1-5). VAN DEN BRANDEN und ROELS (1985) zeigten, daß Hungern zu einer Verringerung der mitochondrialen und zu einer Erhöhung der peroxisomalen β -Oxidation von Fettsäuren führt. Die Autoren schlußfolgerten aus ihren Ergebnissen an Ratten, die nach 24 und 48 h Hungern 1 h vor der Tötung VPA (100-400 mg/kg, i.p.) erhielten, daß VPA die mitochondriale, nicht aber die peroxisomale β -Oxidation der Fettsäuren hemmt. Das ist von Bedeutung, da HEINEMEYER et al. (1983) zeigten, daß VPA auch über die Peroxisomen β -oxidiert werden kann. Nach VAN DEN BRANDEN und ROELS (1985) scheint dieser Weg bei geringeren VPA-Konzentrationen maximal genutzt zu werden. OLSON et al. (1986) ermittelten nach 24 h Hungern in der isoliert perfundierten Rattenleber eine erhöhte H_2O_2 -Produktion, die entweder durch eine steigende Oxidation von Valproyl-CoA über die Peroxisomen oder durch einen gesteigerten Metabolismus endogener Fettsäuren, die von der mitochondrialen zur peroxisomalen β -Oxidation umgeleitet werden, verursacht wird. Hungern reduziert darüber hinaus auch die ω -Oxidation zu 5-OH-VPA bei Ratten (LÖSCHER et al., 1993b) und Menschen (KOCH et al., 1989b). KOCH et al. (1989b) stellten beim Menschen mit Hungern eine unveränderte Ausscheidung von 4-OH-VPA und 3-OH-VPA mit dem Urin fest.

Auch histologische Ergebnisse sprechen für eine Konkurrenz von VPA und endogener Fettsäuren um die β -Oxidation. JEZEQUEL et al. (1984) beobachteten nach einmaliger i.p. Gabe von 200 bzw. 600 mg/kg VPA nach 10 h Hungern und OLSON et al. (1986) nach s.c. Gabe von 500 mg/kg VPA an 24 h hungernde Ratten bereits nach 2-4 h einen Anstieg von Lipiden in der Leber, die nach letzteren Autoren bevorzugt in der periportalen Region akkumulierten. LÖSCHER et al. (1993b) konnten bei einer chronischen VPA- oder 2-en-VPA-Behandlung (3mal täglich je 250 mg/kg i.p. über 7 Tage) und bei Hungerperioden von bis zu 40 h vor dem Behandlungsende keine mikrovesikuläre Steatose oder Nekrose ermitteln. Dagegen fanden NDANGIZA et al. (1992) nach einmaliger Gabe von 1000 mg/kg VPA bzw. 600 mg/kg 4-en-VPA-Gabe an bereits 24 h hungernde Ratten mit einer weiteren Hungerperiode von 24 h eine Lebermikrosteatose, bei Fütterung nach Verabreichung der Dosis jedoch nicht. LÖSCHER et al. (1993b) stellten darüber hinaus fest, daß die chronische VPA-Behandlung bei 40-h-hungernden Ratten den Glykogegehalt der Leberzellen weiter verringert.

Tabelle 2.1-5: VPA und VPA-Metaboliten bei Menschen und Ratten nach chronischer Behandlung ohne und mit Hungern in Prozent der totalen VPA-Plasmakonzentration

Metabolite	% der totalen VPA-Konzentration im Plasma			
	ohne Hungern		25 h Hungern	40 h Hungern
	Mensch, n=16 ^a	Ratte, n=10 ^b	Ratte, n=10 ^c	Ratte, n=10 ^d
2-en-VPA	8,56 [#]	1,30	0,68 [*]	0,26 ^{*,**}
2,3'-dien-VPA	n.d.	0,96	1,14	0,44 ^{*,**}
2,4-dien-VPA	n.d.	0,37	n.d. [*]	n.d. [*]
3-en-VPA	n.d.	0,23	0,65 [*]	0,29 ^{**}
4-en-VPA	n.d. [#]	0,04	n.d.	n.d.
3-OH-VPA	2,20	n.d.	0,31 (5 Tiere)	0,18 ^{**}
4-OH-VPA	0,69	1,49	0,94	0,90
5-OH-VPA	1,81	0,84	0,75	0,28 ^{**}
3-keto-VPA	5,30	3,21	1,32 [*]	0,29 ^{*,**}
4-keto-VPA	n.d.	n.d.	0,02 (2 Tiere)	0,03 (3 Tiere)
PGA	n.d.	0,03 (2 Tiere)	n.d.	n.d.

Quellen: LÖSCHER (1981) (a), LÖSCHER et al. (1992) (b), LÖSCHER et al. (1993b) (c, d) (mittlere Plasmakonzentration von VPA; a: 100,56 μ g/ml, b: 373 μ g/ml, c: 438 μ g/ml, d: 431 μ g/ml)

n.d. = nicht detektiert

* signifikant verändert im Vergleich zu Tieren ohne Hungern ($p < 0,05$)

** signifikant verändert im Vergleich zu Tieren mit 25 h Hungern ($p < 0,05$)

POLLACK et al. (1986) ermittelten beim Menschen für 2-en-VPA 11,90 % und für 4-en-VPA 1,80 %.

2.2 Allgemeines zur Hepatotoxizität von VPA

Seit VPA für den Einsatz in den USA 1978 lizenziert wurde, berichteten viele Autoren über unerwünschte Nebenwirkungen dieser Substanz. Eine VPA-Therapie kann mit einer reversiblen hepatischen Dysfunktion bzw. mit einem irreversiblen hepatischen Koma einhergehen. Die irreversible Form ist jedoch im Vergleich zur reversiblen selten beobachtet worden. Bis zum Jahr 1994 starben bei der Behandlung der Epilepsie mit VPA weltweit 132 Patienten an Leberversagen bzw. Pankreatitis (KÖNIG et al., 1994).

2.2.1 Formen der Hepatotoxizität

2.2.1.1 Reversible Hepatotoxizität

Die reversible hepatische Dysfunktion war bei 11 % der Patienten mit einer vorübergehenden Erhöhung der Leberenzymaktivität (AST, ALT) verbunden (KÖNIG et al., 1994, POWELL-JACKSON et al., 1984). YOUNG et al. (1980) stellten eine um das 1- bis 3fache erhöhte Aminotransferasenaktivität fest. WILLMORE et al. (1978) ermittelten bis auf das 6fache erhöhte Serumkonzentrationen dieser Enzyme. Diese Erhöhungen sind dosisabhängig (GRAM und BENTSEN, 1985), asymptomatisch (SUSSMAN und MCLAIN, 1979, WILLMORE et al., 1978) und gehen zurück, wenn die Dosis vermindert oder VPA abgesetzt wird¹¹. Gewöhnlich werden die Abweichungen kurz nach Beginn der Therapie beobachtet, wobei die VPA-Serumspiegel im therapeutischen Bereich liegen (GRAM und BENTSEN, 1985). WILLMORE et al. (1978) ermittelten eine verlängerte Prothrombinzeit und einen verringerten Serumalbuminspiegel. KÖNIG et al. (1994) und YOUNG et al. (1980) stellten erhöhte Bilirubinwerte und KÖNIG et al. (1994) eine stark verringerte Thrombinzeit, einen erhöhten Harnstoffgehalt und Hypoglycämie fest.

Nur 2 von 57 Patienten mit erhöhten Aktivitäten der Aminotransferasen zeigten Symptome wie Unwohlsein, Lethargie und Anorexie (DODSON und TASCH, 1981, WILLMORE et al., 1978). Nach Reduzierung der Dosis oder Absetzen von VPA verschwinden auch diese Symptome schnell. KÖNIG et al. (1994) stellten in Patienten mit reversiblen und irreversiblen Ausgang der Hepatotoxizität die gleichen klinischen Symptome wie Unwohlsein, Erbrechen, Apathie oder Koma, steigende Anfallrate und Fieber sowie ähnliche Laborwerte fest. Fieber tritt nur bei der Hälfte der reversiblen Fälle, aber bei fast allen fatalen Fällen auf.

2.2.1.2 Irreversible Hepatotoxizität

Bei der irreversiblen Hepatotoxizität durch VPA handelt es sich um das irreversible hepatische Koma (GRAM und BENTSEN, 1985). Dieser Reaktionstyp ist selten. Die große Mehrheit der Fälle werden innerhalb der ersten sechs Monate beobachtet (DREIFUSS et al., 1987, GRAM und BENTSEN, 1985, KÖNIG et al., 1994). Einer retrospektiven Studie aller fatalen Fälle von

¹¹ DREIFUSS und LANGER (1988), GRAM und BENTSEN (1985), JEAUVONS (1984), POWELL-JACKSON et al. (1984), WILLMORE et al. (1978).

1987 bis 1993 in den USA von BRYANT und DREIFUSS (1996) zufolge erscheint die Hepatotoxizität meistens 2 bis 3 Monate nach Therapiebeginn. Es konnte bisher weder eine Abhängigkeit von der Dosis (GRAM und BENTSEN, 1985, JEAUVONS, 1984, ZIMMERMAN und ISHAK, 1982), der Serumkonzentration noch dem Geschlecht festgestellt werden (GRAM und BENTSEN, 1985). Diese irreversible Schädigung tritt gewöhnlich bei Polytherapie und am häufigsten bei Kindern unter 2 Jahren mit schweren Epilepsien, die oft geistig zurückgeblieben sind, auf (DREIFUSS et al., 1987, KÖNIG et al., 1994). Nur eine Minderheit der betroffenen Patienten bekommt eine VPA-Monotherapie. Außerdem beobachteten GRAM und BENTSEN (1985) eine familiäre Häufung. Die ersten allgemeinen Symptome sind unspezifisch wie gastrointestinale Beschwerden, Anorexie, Erbrechen, plötzlicher Verlust der Anfallskontrolle, Übelkeit, Müdigkeit und Lethargie. Symptome wie Gelbsucht, Blutungsneigung und Ödeme treten später hinzu (DREIFUSS et al., 1987, SCHEFFNER et al., 1988). In einigen Fällen ist Gelbsucht eher festgestellt worden (GRAM und BENTSEN, 1985). Die von BRYANT und DREIFUSS (1996) am häufigsten berichteten Symptome der Fälle von 1987-1993 in den USA sind eine verminderte Aufmerksamkeit, Anorexie, Erbrechen, erhöhte Anfallraten, Hämorrhagie, Ödeme, Gelbsucht und Ascites. Nach KÖNIG et al. (1994) sind die initialen Symptome oft mit fieberhaften Erkrankungen kombiniert. SCHEFFNER et al. (1988) berichteten, daß unspezifische Symptome durchschnittlich 2-4 Wochen vor dem Tod auftreten. WILLMORE (1991) stellte fest, daß die irreversible Leberstörung gleichzeitig Ikterus, Encephalopathie und Coagulopathie verursacht. Die Tabelle 2.2-1 zeigt die Häufigkeit des Auftretens der Symptome in 130 Patienten mit fataler Hepatotoxizität von 1979-90 (WILLMORE, 1991).

Klinische Zeichen einer Hypersensitivität wie Fieber, Hautausschlag (BRYANT und DREIFUSS, 1996) oder Eosinophilie bestehen nicht (DREIFUSS et al., 1987, GRAM und BENTSEN, 1985). Auch histologische Anzeichen wie eine granulomatöse Infiltration sind nicht vorhanden (GRAM und BENTSEN, 1985). Aus diesem Grund wird dieser Typ als eine idiosynkratische Arzneimittelreaktion klassifiziert (PIPPENGER et al., 1991).

Die genannten prodromalen Symptome sind oft manifest, bevor Leberfunktionstests veränderte Parameter anzeigen, und sie scheinen zuverlässigere Indikatoren für die VPA-Hepatotoxizität zu sein (DREIFUSS und LANGER, 1988, JEAUVONS, 1984). Mehrere Autoren wiesen darauf hin, daß die Aminotransferasen keine guten Prädiktoren des Leberversagens sind, da Veränderungen nicht oder nur sehr spät nachweisbar sind (BRYANT und DREIFUSS, 1996, DREIFUSS et al., 1987, SIEMES et al., 1992). BRYANT und DREIFUSS (1996) ermittelten bei 38 % der Fälle mit fatalem Ausgang eine verminderte Synthesefunktion der Leber einschließlich einer Verlängerung der Prothrombinzeit.

Tabelle 2.2-1: Häufigkeit der Symptome bei fataler Hepatotoxizität (WILLMORE, 1991)

Symptom	Anteil der Patienten in %
Anorexie, Übelkeit, Erbrechen	82
Erbrechen	72
Lethargie	40
Anfallsverstärkung	40
Ödem	32
Fieber	23
Koma	23

2.2.2 Häufigkeit, Hauptrisikogruppe und Einflußfaktoren

Die Angaben zur Häufigkeit der reversiblen, nicht fatalen dosisabhängigen Lebertoxizität durch VPA reichen von wenigen Prozenten (SHERARD et al., 1980) bis 44 % (SUSSMAN und MCLAIN, 1979). Die Häufigkeit einer fatalen Lebertoxizität erhöhte sich mit steigendem Einsatz von VPA zur Therapie der Epilepsie in den 80er Jahren (JEAVONS, 1984, ZAFRANI und BERTHELOT, 1982, ZIMMERMAN, 1991, ZIMMERMAN und ISHAK, 1982). In den 90er Jahren konnte die Inzidenz der fatalen Hepatotoxizität durch die Beschränkung des Einsatzes von VPA auf Patienten mit geringem Risiko und als Monotherapie vermindert werden (BRYANT und DREIFUSS, 1996, DAVIS et al., 1994). Die Gesamthäufigkeit für das Auftreten einer fatalen Hepatotoxizität ist gering. Die Angaben in der Literatur schwanken von 1/5000 (SCHEFFNER, 1986) bis 1/20000 (JEAVONS, 1984). BINEK et al. (1991) gaben einen Bereich von 1/5000 - 1/10000 an, und DREIFUSS (1991) ermittelte eine Gesamthäufigkeit von 1/10000. Die höchste Häufigkeit mit 1/500 wurde bei Kindern bis zu 2 Jahren beobachtet, die VPA als Teil eines Multi-Antiepileptika-Regimes erhielten (DREIFUSS, 1991, DREIFUSS et al., 1987, ZIMMERMAN und ISHAK, 1982), schwere Epilepsien hatten und häufig Entwicklungsstörungen und andere neurologische Dysfunktionen aufwiesen. Diese stellen damit eine Hauptrisikogruppe dar (DREIFUSS, 1991, DREIFUSS et al., 1987). Patienten dieser Risikogruppe, die VPA als Monotherapie erhielten, wiesen nur eine Inzidenz von 1/7000 auf (DREIFUSS et al., 1987). In einer Studie wurden von BRYANT und DREIFUSS (1996) als zusätzlicher Risikofaktor auch metabolische Schäden herausgefunden. Bei Kindern über 2 Jahren lag die Gesamthäufigkeit eines fatalen Leberschadens bei Polytherapie bei 1/12000 und bei Monotherapie bei 1/40000 (DREIFUSS, 1991).

Die Hauptrisikogruppe für das Auftreten einer VPA-vermittelten Hepatotoxizität ist demnach bekannt. Weiterhin konnten eine Vielzahl von Faktoren und Bedingungen festgestellt werden, die die individuelle Empfindlichkeit für eine VPA-vermittelte Hepatotoxizität steigern. Dazu gehören eine beeinträchtigte Kapazität der mitochondrialen Fettsäure- β -Oxidation durch konstitutionelle oder erworbene Faktoren wie das Pfeiffersche Drüsenfieber (EADIE et al., 1990) und angeborene Defekte im Fettsäuremetabolismus (DICKINSON et al.,

1985, GRANNEMAN et al., 1991) und im Harnstoffzyklus (SEWELL et al., 1995). So wurden von verschiedenen Autoren¹² Defizite der Carnitin- oder Ornithin-Carbamyltransferase als Risikofaktoren festgestellt. KÖNIG et al. (1994) führten eine Vielzahl metabolischer Defekte als Einflußfaktoren auf, die durch eine VPA-Therapie demaskiert werden konnten. ANDERSON et al. (1994) stellten die Hypothese auf, daß vor allem Patienten mit einem genetisch bedingten Defizit der mitochondrialen β -Oxidation die Wirkungen von VPA auf den verzweigt-kettigen Aminosäuremetabolismus nicht wie normale Patienten mit Epilepsie tolerieren können. Als weitere Einflußfaktoren sind Glucuronidierungsdefekte (GRANNEMAN et al., 1991), bestehende Lebererkrankungen, eine Arzneimittel-induzierte hepatische Dysfunktion, akute fieberhafte Erkrankungen (DREIFUSS et al., 1987, SIEMES et al., 1992) oder Virusinfektionen, ein schlechter Ernährungszustand (DREIFUSS et al., 1987, GRANNEMAN et al., 1991) und Hungern (COTARIU und ZAIDMAN, 1988, KÖNIG et al., 1994) genannt worden. DREIFUSS et al. (1987) ermittelten bei 40 % der Patienten mit Leberversagen eine kurz vor Beginn der fatalen Hepatotoxizität auftretende akute fieberhafte Infektion. KÖNIG et al. (1994) stellten fest, daß Fieber und Hungern große Einflußfaktoren sind, da sie die Metabolisierungswege von VPA beeinträchtigen können. GRANNEMAN et al. (1991) ermittelten eine einmalige tägliche VPA-Gabe und KONDO et al. (1992b) einen hohen VPA-Serumspiegel als Risikofaktoren. Die Empfindlichkeit wird auch durch eine zusätzliche Therapie mit Acetylsalicylsäure (ABBOTT et al., 1986) und durch eine verminderte antioxidative Kapazität beim Menschen (PIPPENGER et al., 1991, WILDER und HURD, 1991) und bei der Ratte *in vivo* (COTARIU et al., 1990, HURD et al., 1991) und *in vitro* (BUCHI et al., 1984) gesteigert. ABBOTT et al. (1986) zeigten, daß Acetylsalicylsäure den VPA-Metabolismus, der normalerweise in den Mitochondrien abläuft, zu den Mikrosomen verlagern kann und die Belastung mit freien Radikalen nach PIPPENGER et al. (1991) demzufolge erhöht.

2.3 Mögliche Mechanismen der Hepatotoxizität und Beeinflussung von Stoffwechselwegen

Die vielfältigen Untersuchungen bei Menschen und Tieren lassen vermuten, daß die verschiedenen Formen und Grade des VPA-induzierten Leberschadens nicht das Ergebnis eines einzelnen Mechanismus sind, sondern die komplexe Wirkung mehrerer kausaler Faktoren, von denen nur einige in Tiermodellen simuliert werden können (COTARIU und ZAIDMAN, 1988, LÖSCHER et al., 1993b). Die für die Hepatotoxizität verantwortlichen präzisen biochemischen Mechanismen konnten noch nicht aufgeklärt werden (LÖSCHER et al., 1993b, SIEMES et al., 1992, ZIMMERMAN, 1991).

In der Literatur wurde wiederholt darauf hingewiesen, daß das Erscheinungsbild der fatalen Hepatotoxizität durch VPA für eine Arzneimittel-induzierte Hepatotoxizität untypisch ist (GRAM und BENTSEN, 1985), aber viele Parallelen zu zwei Krankheiten, dem Reye-Syndrom und der Jamaikanischen Brechkrankheit, bestehen. Aufgrund der histologischen und klini-

¹² HJELM et al. (1986), KAY et al. (1986), KÖNIG et al. (1994), KRÄHENBÜHL et al. (1995), TEIN et al. (1993), TRIPP et al. (1981).

schen Übereinstimmungen und strukturellen Ähnlichkeiten von VPA-Metaboliten mit den die oben genannten Krankheiten auslösenden Metaboliten wurde spekuliert, daß bei VPA-vermittelter Hepatotoxizität ähnliche biochemische Mechanismen den Leberschaden verursachen könnten (GERBER et al., 1979, KOCHEN und SCHEFFNER, 1980).

2.3.1 Veränderter Metabolismus von VPA bei Hepatotoxizität

Während der VPA-vermittelten Hepatotoxizität werden Veränderungen des VPA-Metabolismus beobachtet. Es ist noch nicht bekannt, ob die Veränderungen im VPA-Metabolismus eine Ursache oder ein Effekt dieser Lebertoxizität sind (LÖSCHER et al., 1993a). Beispielsweise vermuten SIEMES et al. (1992) im Gegensatz zu vielen anderen, unten aufgeführten Autoren, daß die erhöhten Konzentrationen ungesättigter Metaboliten nicht die Ursache, sondern die Auswirkung der mit VPA assoziierten Hepatotoxizität sein könnten.

Die Bestimmung der Metabolitenmuster erhielt vor allem deswegen große Aufmerksamkeit, da zum einen Kriterien zur Unterscheidung milder und reversibler Nebenwirkungen von fatalem Leberversagen gesucht wurden und zum anderen, um Anhaltspunkte zur Pathophysiologie der VPA-vermittelten Hepatotoxizität durch das Studium des veränderten VPA-Metabolismus zu erhalten (KÖNIG et al., 1994).

2.3.1.1 Metabolismusprofile bei Hepatotoxizität

Hoffnungen auf ein Screening von ungesättigten Metaboliten, um Patienten mit hohem Risiko zu definieren, entstanden mit der Arbeit von KOCHEN et al. (1983). Es wurde von einem Fall fataler Hepatotoxizität berichtet, in dem die ungesättigten Metaboliten in hoher Konzentration vorhanden waren. Aus den Literaturergebnissen bis 1991 wurden von BAILLIE und LEVY (1991) zunächst zwei fundamental unterschiedliche Metabolismusprofile bei VPA-vermittelter fataler Hepatotoxizität des Menschen zusammengefaßt. Das erste war gekennzeichnet durch eine Verminderung oder Abwesenheit der Metaboliten des β -Oxidationsweges im Plasma, vor allem von 3-keto-VPA (BÖHLES et al., 1982, KOCHEN et al., 1983), wohingegen die ω -Oxidation vor allem zu PGA stark erhöht war (BOHAN et al., 1987, KUHARA et al., 1990, KUHARA et al., 1985). Das zweite Metabolitenprofil war charakterisiert durch die erhöhte Bildung von zwei ungesättigten Metaboliten, dem δ -Dehydrogenierungsprodukt 4-en-VPA (KOCHEN et al., 1983) und dem β -Oxidationsmetaboliten 2,3'-dien-VPA, wohingegen die anderen β -Oxidationsmetaboliten in sehr geringen Konzentrationen gefunden wurden (KOCHEN et al., 1983, SCHEFFNER et al., 1988). Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen jedoch, daß weder die Bestimmung der VPA-Metaboliten Anhaltspunkte liefert, um Patienten mit einem Risiko für eine fatale Hepatotoxizität zu identifizieren, noch die Messung dieser Metaboliten von irgendwelchem Nutzen ist, um einen Leberschaden während der VPA-Therapie zu verhindern oder zu therapieren (KÖNIG et al., 1994). Insgesamt konnte kein Metabolitenprofil eindeutig mit dem fatalen Ausgang der Hepatotoxizität beim Menschen in Verbindung gebracht werden, da dieses von Patient zu Patient sehr stark variierte (EADIE et al., 1990, KÖNIG et al., 1994, SIEMES et al., 1993, SIEMES et al., 1992). Die Spezifität dieser Metabolitenprofile als Vorzeichen für eine Toxizität ist daher beschränkt (GRANNEMAN et al.,

1991). Die einzige Übereinstimmung bei allen untersuchten Kindern und Erwachsenen mit VPA-vermittelter Hepatotoxizität ist eine gestörte β -Oxidation von VPA. Die Konsequenz daraus ist für KÖNIG et al. (1994), daß die Bedeutung der anderen metabolischen Wege erhöht wird, wobei keine spezifischen Präferenzen für einen der Abbauwege in den Patienten mit fatalem Leberschaden festgestellt werden konnten. Andere Indikatoren wie der Ernährungszustand und die β -Hydroxybutyrat- oder Glukosekonzentration sind zugänglicher und interpretierbarer. GRANNEMAN et al. (1991) schlußfolgerten, daß beim Screening Patienten mit hohem Risiko für Harnstoffzyklus- oder andere intermediäre metabolische Defekte gesucht werden sollten.

2.3.1.2 Verantwortlichkeit von VPA und VPA-Metaboliten bzw. von Metabolismwegen für die Hepatotoxizität

Hinsichtlich der Verantwortlichkeit von VPA, ihrer Metaboliten bzw. einzelner Metabolismwege für die Hepatotoxizität kristallisierten sich in der Literatur drei zum Teil stark umstrittene „Theorien“ heraus:

1. Der Metabolit 4-en-VPA¹³ und seine Folgeprodukte wie 2,4-dien-VPA (BAILLIE, 1988, BALDWIN et al., 1996, KOCHEN et al., 1983, PORUBEK et al., 1989) und 3-keto-4-en-VPA¹⁴ sind potentielle Hepatotoxine. Die Bildung von GSH-Konjugaten dieser Metaboliten mit nachfolgendem Zellschaden und Zelltod durch eine beeinträchtigte antioxidative Kapazität des GSH-Redoxsystems ist möglich.¹⁵
2. Eine veränderte β -Oxidation von VPA steht im Zusammenhang mit der Hepatotoxizität.¹⁶
3. Andere Veränderungen im VPA-Metabolismus sind Ursache der Hepatotoxizität oder tragen zu ihrer Entstehung bei.

Nach Meinung einiger Autoren ist diese Frage noch völlig offen, das heißt, es gibt keine Theorie.¹⁷ SIEMES et al. (1992) schlossen aus ihren Untersuchungen an Patienten, die an VPA-induziertem fulminantem Leberversagen verstarben, daß auch VPA selbst das entscheidende Hepatotoxin sein könnte, das auf eine bisher unbekannte Weise wirkt. Die drei Theorien sollen nachfolgend näher erläutert werden.

¹³ GERBER et al. (1979), KINGSLEY et al. (1980), KOCHEN et al. (1983), KONDO et al. (1992b), KONDO et al. (1990), KUHARA et al. (1985).

¹⁴ BAILLIE (1988), KASSAHUN et al. (1991), KASSAHUN et al. (1994), PORUBEK et al. (1989), TANG et al. (1995).

¹⁵ JURIMA-ROMET et al. (1996), KASSAHUN et al. (1991), KASSAHUN et al. (1994), TANG und ABBOTT (1996a), TANG und ABBOTT (1996b), TANG et al. (1996).

¹⁶ BÖHLES et al. (1982), EADIE et al. (1990), FISHER et al. (1992a), GRANNEMAN et al. (1991), KEULEN und KOCHEN (1985), KOCHEN et al. (1983), KÖNIG et al. (1994), KUHARA et al. (1990), MATSUMOTO et al. (1986), NAU und SIEMES (1992), NAU et al. (1991), PENRY (1991), PONCHAUT und VEITCH (1993), SIEMES et al. (1993), ZACCARA et al. (1988).

¹⁷ GRANNEMAN et al. (1984b), KESTERSON et al. (1984), KOCHEN et al. (1984), LÖSCHER et al. (1993a), NAU und LÖSCHER (1984), KOCHEN et al. (1983).

Aufgrund der Ähnlichkeit der VPA-induzierten Hepatotoxizität mit dem Reye-Syndrom und der Jamaikanischen Brechkrankheit postulierten GERBER et al. (1979) als erste, daß 4-en-VPA für die Leberschäden durch VPA verantwortlich sein könnte, da eine strukturelle Ähnlichkeit dieses Metaboliten mit den diese Krankheiten auslösenden bekannten Hepatotoxinen 4-PA und Methylen-Cyclopropyllessigsäure besteht.

Für viele Autoren ist 4-en-VPA an den VPA-induzierten hepatotoxischen Effekten beteiligt.¹⁹ Für die durch 4-en-VPA verursachte dosisabhängige Hepatotoxizität wurden mehrere Mechanismen vorgeschlagen. KONDO et al. (1992b) fanden bei Untersuchungen an 106 Patienten heraus, daß die drei Risikofaktoren junges Alter, Polypharmazie und eine hohe VPA-Serumkonzentration eindeutig die Umwandlung von VPA zu 4-en-VPA erhöhen. Die beiden letzten Faktoren bewirken zusätzlich eine Hemmung der β -Oxidation zu 2-en-VPA und 3-en-VPA. Das geschieht bei hohen VPA-Serumspiegeln durch Sättigung und/oder Autohemmung der mitochondrialen β -Oxidation von VPA, da VPA ein potenter Hemmer der β -Oxidation der Fettsäuren ist (BJORGE und BAILLIE, 1985, s. Abschnitte 2.3.2.1 und 2.3.2.2). KINGSLEY et al. (1983) zeigten eine dosisabhängige Zytotoxizität von 4-en-VPA in Rattenhepatozytenkulturen. Die gesteigerte Häufigkeit des Leberschadens bei Polytherapie mit anderen Antiepileptika wurde ebenfalls von einigen Autoren mit einer verstärkten Bildung von 4-en-VPA erklärt (KONDO et al., 1992b, KONDO et al., 1990). KONDO et al. (1992b) begründeten dies mit der durch Phenobarbital, Phenytoin, Carbamazepin und Primidon verursachten Induktion von Cytochrom P450 (PERUCCA et al., 1984). Cytochrom P450 vermittelt seinerseits die Bildung von 4-en-VPA (RETTIE et al., 1987) (s. Abschnitt 2.1.4.3).

Für viele Autoren scheint 4-en-VPA aufgrund experimenteller Untersuchungen und klinischer Beweise nicht der entscheidende hepatotoxische Metabolit zu sein²⁰, oder zumindest ist diese These stark umstritten und wird kontrovers diskutiert (EADIE et al., 1990, GRANNEMAN et al., 1991, TENNISON et al., 1988).

Tatsache ist, daß die bloße Anwesenheit von 4-en-VPA im Serum weder einen abnormalen VPA-Metabolismus noch das Vorhandensein eines schweren Leberschadens indiziert. In ersten Untersuchungen von fatalen Fällen im Jahre 1988 wurde 4-en-VPA in allen Patienten mit fatalem Ausgang gefunden, wohingegen bei VPA-Behandlung ohne Nebenwirkungen 4-en-VPA nicht gemessen wurde (SCHEFFNER et al., 1988). Es wurde angenommen, daß 4-en-VPA ein Indikator des VPA-induzierten fulminanten Leberversagens ist (KOCHEN et al., 1983, KONDO et al., 1992b, SCHEFFNER et al., 1988). In den folgenden Jahren konnte in größeren Populationen diese These nicht mehr unterstützt werden (EADIE et al., 1990, KUHARA et al., 1990, SIEMES et al., 1993). EADIE et al. (1990) ermittelten, daß bei keinem Patienten der 4-en-

¹⁸ Die Bildung von GSH-Konjugaten dieser Metaboliten und die vorgeschlagenen Mechanismen der Schädigung werden ausführlich in den Abschnitten 2.1.4.4 und 2.3.3.3 beschrieben.

¹⁹ BAILLIE (1992), KOCHEN et al. (1983), KONDO et al. (1992b), KONDO et al. (1990), KUHARA et al. (1985), LEVY et al. (1991), SCHEFFNER et al. (1988), STEPHENS und LEVY (1992).

²⁰ KÖNIG et al. (1994), LÖSCHER et al. (1993a), LÖSCHER et al. (1992), NAU und SIEMES (1992), NAU et al. (1991), SIEMES et al. (1993), SIEMES et al. (1992).

VPA-Gehalt im Plasma bei Hepatotoxizität verändert war. TENNISON et al. (1988) fanden 4-en-VPA nur in 10 % der untersuchten Patienten, wobei bei Patienten mit geringerem Risiko für einen VPA-bedingten Leberschaden eine höhere 4-en-VPA-Konzentration gefunden wurde. Auch PAGANINI et al. (1987) stellten fest, daß keine Beziehung zwischen dem Plasmaspiegel von 4-en-VPA und den Nebenwirkungen von VPA bestanden. GRANNEMAN et al. (1991) ermittelten, daß in vielen Fällen von Hepatotoxizität, in denen das metabolische Profil ermittelt wurde, die Konzentration von 4-en-VPA oder seiner Metaboliten zu gering war, um einen signifikanten biologischen Effekt zu verursachen.

Ebenso wurde 2,4-dien-VPA als potentiell Hepatotoxin von mehreren Autoren kritisch bewertet. Bei klinischen Studien wies kein Kind mit Leberdysfunktion ungewöhnlich hohe 2,4-dien-Spiegel auf (SIEMES et al., 1993). LÖSCHER et al., 1993a) kamen bei vergleichenden *in vivo*-Studien von VPA und 2-en-VPA in Ratten zu dem Schluß, daß 4-en-VPA und 2,4-dien-VPA nicht die entscheidenden Faktoren für eine Hepatotoxizität waren, da das Auftreten einer mikrovesikulären Steatose unabhängig von den Plasmaspiegeln von 4-en-VPA und 2,4-dien-VPA war. Laut LÖSCHER et al. (1993b) spricht gegen eine hepatotoxische Rolle von 2,4-dien-VPA, daß nach 2-en-VPA-Behandlung von Ratten der 2,4-dien-VPA-Spiegel viel höher war als nach VPA-Behandlung, jedoch hohe 2-en-VPA-Dosen deutlich weniger toxisch waren (KESTERSON et al., 1984, LÖSCHER et al., 1993a, LÖSCHER et al., 1992).

Da die Toxizität nicht mit der Serumkonzentration von 4-en-VPA oder 2,4-dien-VPA bei Mensch und Tier korrelierte, wurde die Rolle von 4-en-VPA und seiner Folgeprodukte wie 2,4-dien-VPA und 3-keto-4-en-VPA als entscheidende Hepatotoxine immer stärker bestritten. Nach TANG et al. (1995) ist jedoch eine Voraussage einer Korrelation zwischen Metaboliten und toxischen Effekten nicht notwendigerweise zu erwarten. So existieren für VPA und seine Metaboliten zwei Phase-I-Wege, die mitochondriale β -Oxidation und die mikrosomale P450-katalysierte Oxidation. Die vermeintlich toxischen Metaboliten können durch beide Wege entstehen. Der Unterschied besteht darin, daß das in den Mitochondrien gebildete reaktive Intermediärprodukt 2,4-dien-VPA-CoA sich bereits am Ort der potentiellen Schädigung befindet. Das mikrosomal gebildete 2,4-dien-VPA könnte aufgrund seiner Lokalisation im zytosolischen Kompartiment einen geringeren Anteil an der Hepatotoxizität haben (KASSAHUN et al., 1994). Im *in vivo*-Experiment kann nur sehr schwer entschieden werden, ob 2,4-dien-VPA in den Mikrosomen aus 2-en-VPA oder in den Mitochondrien aus 4-en-VPA entstanden ist, wenn beide Precursor vorhanden waren. Für TANG et al. (1995) folgt daraus, daß es unwahrscheinlich ist, die Toxizität aus der Serumkonzentration von 4-en-VPA oder 2,4-dien-VPA vorauszusagen. Im Gegenteil: Eine Verminderung des Serumspiegels von 4-en-VPA oder 2,4-dien-VPA könnte mit einer schwereren toxischen Folge verbunden sein, wenn gerade das Angriffsziel der reaktiven Metaboliten wesentlich für die Entstehung der Toxizität ist.

Eine veränderte β -Oxidation von VPA ist verantwortlich für die Hepatotoxizität

Die einzige metabolische Abweichung, die in fast allen verfügbaren Studien zum Metabolismus während der VPA-vermittelten Hepatotoxizität ermittelt werden konnte, ist eine veränderte β -Oxidation.²¹ In Untersuchungen zum VPA-Metabolismus bei Patienten mit irreversiblen Leberversagen zeigt sich in der Regel eine Hemmung der β -Oxidation verbunden mit dem Auftreten von VPA-Metaboliten alternativer Stoffwechselwege.²² Nach EADIE et al. (1990) schien die Art der Störung der β -Oxidation von Fall zu Fall zu differieren. FISHER et al. (1992a) stellten in zwei Kindern mit Hepatomegalie vermehrt 2-en-VPA, 3-en-VPA und 2,3'-dien-VPA im Serum fest, wohingegen die Endprodukte der β -Oxidation, 3-OH-VPA und 3-keto-VPA, nicht vermehrt gebildet wurden und die anderen Metaboliten im normalen Bereich lagen. DICKINSON et al. (1985) und EADIE et al. (1988) fanden bei schwerer reversibler Hepatotoxizität erhöhte Konzentrationen von 2-en-VPA und verringerte Konzentrationen von 3-keto-VPA im Urin.

Die beobachteten Veränderungen könnten eine Sättigung oder Unterbrechung des β -Oxidationsweges bedeuten, da die β -Oxidation dosisabhängig ist und eine limitierte Kapazität zur Anpassung an steigende Substratbelastung hat (DICKINSON et al., 1989, FISHER et al., 1992a). Außerdem hemmen VPA und verschiedene Metaboliten die β -Oxidation an bestimmten Punkten (s. Abschnitte 2.3.2.1 und 2.3.2.2). In den oben genannten Fällen war die β -Oxidation von VPA zwischen 2-en-VPA und 3-keto-VPA gestört (DICKINSON et al., 1985, EADIE et al., 1988). Die höhere Konzentration von 3-en-VPA und 2,3'-dien-VPA unterstützt nach FISHER et al. (1992a) diese Vermutung, da diese Metaboliten wahrscheinlich durch einen anderen Biotransformationsweg aus 2-en-VPA entstehen. Nach GRANNEMAN et al. (1991) kann eine Veränderung der mitochondrialen Metaboliten auch eine Dysfunktion dieser Organelle anzeigen, so daß die beobachtete Veränderung der β -Oxidation von VPA eher die Folge anderer Risikofaktoren sein könnte (s. Abschnitt 2.2.2).

SIEMES et al. (1993) stellten bei Patienten jedoch eine generelle Erhöhung der Metabolitenkonzentrationen, insbesondere der β -Oxidationsmetaboliten, fest. Auch GRANNEMAN et al. (1991) ermittelten eine hohe Plasmakonzentration von 3-keto-VPA und eine hohe Plasma- und Urinkonzentration von 3-OH-VPA bei fatalem Leberschaden des Menschen. Eine hohe Plasma- und Urin-Konzentration von 3-OH-VPA könnte eine Folge der Hemmung von β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase sein, allerdings wird 3-OH-VPA auch partiell über Cytochrom P450 und daher bei dessen Induktion verstärkt produziert. Eine hohe Plasmakonzentration von 3-keto-VPA könnte eine Hemmung der β -Ketoacyl-CoA-Thiolase bedeuten, aber auch durch eine verringerte renale Clearance bedingt sein. Weiterhin kann 3-keto-VPA auch

²¹ BÖHLES et al. (1982), EADIE et al. (1990), FISHER et al. (1992a), GRANNEMAN et al. (1991), KEULEN und KOCHEN (1985), KOCHEN et al. (1983), KÖNIG et al. (1994), KUHARA et al. (1990), MATSUMOTO et al. (1986), NAU und SIEMES (1992), NAU et al. (1991), PENRY (1991), PONCHAUT und VEITCH (1993), SIEMES et al. (1993), ZACCARA et al. (1988).

²² EADIE et al. (1988), FISHER et al. (1992a), KOCHEN et al. (1983), KUHARA et al. (1990), KUHARA et al. (1985), SCHEFFNER et al. (1988), SIEMES und NAU (1991), SIEMES et al. (1993).

direkt aus 2-en-VPA gebildet werden (GRANNEMAN et al., 1991). Wie schon erwähnt, konnte kein typisches Metabolitenprofil gefunden werden.

Andere Veränderungen im VPA-Metabolismus sind verantwortlich für die Hepatotoxizität

Die These, daß auch andere Metaboliten ein hepatotoxisches Potential besitzen, stützt sich vor allem auf tierexperimentelle Untersuchungen. KINGSLEY et al. (1983) und KINGSLEY et al. (1980) ermittelten in Hepatozytenkulturen von Ratten eine dosisabhängige Toxizität von VPA, 4-en-VPA, 4-OH-VPA und eventuell 5-OH-VPA, wohingegen für PGA und 3-OH-VPA keine direkte Zytotoxizität festgestellt werden konnte. Nach GRANNEMAN et al. (1984a) könnten auch 3-keto-VPA und 4-keto-VPA mit einer Hepatotoxizität verbunden sein. Ebenso könnte PGA ein hepatotoxisches Potential besitzen, da viel höhere Mengen im Leberhomogenat im Vergleich zum Plasma gefunden wurden und PGA mit den Transportern der Dicarboxyl- und Tricarboxylsäuren in Wechselwirkung treten kann und damit den Transfer von reduzierenden Äquivalenten vermindert. Das hat schwerwiegende Auswirkungen für die Mitochondrien, denen bereits Reduktionsäquivalente fehlen. In geringerem Maße verursachte auch 3-en-VPA mitochondriale Läsionen, eine Hemmung der β -Oxidation und mikrovesikuläre Steatose bei Ratten (GRANNEMAN et al., 1984b).

2.3.2 Veränderung des Fettstoffwechsels, der Gluconeogenese und des Harnstoffzyklus durch VPA²³

2.3.2.1 Hemmung der mitochondrialen β -Oxidation endogener Fettsäuren - Rolle von CoA und Carnitin

Es wurde schon früh die Hypothese aufgestellt, daß die Hemmung der β -Oxidation der Fettsäuren eine Ursache für die hepatotoxischen Wirkungen von VPA sein könnte (DICKINSON et al., 1985). Die Hemmung der mitochondrialen β -Oxidation der Fettsäuren konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wiederholt festgestellt werden, insbesondere die von lang-²⁴ und mittelkettigen (BJORGE und BAILLIE, 1985) Fettsäuren durch VPA und seine ungesättigten Metaboliten 4-en-VPA (THURSTON et al., 1983b, TURNBULL et al., 1983a) und 2,4-dien-VPA (KESTERSON et al., 1984). Der Mechanismus dieser Hemmung ist noch nicht völlig aufgeklärt. Eine reduzierte β -Oxidationskapazität induziert bei fatalem Leberversagen bei Kindern eine erhöhte Kapazität der ω -Oxidation von mittelkettigen Fettsäuren (KOCHEN et al., 1983). Eine erhöhte Ausscheidung von verschiedenen ungesättigten und gesättigten Dicarboxylsäuren (vor allem C₆-C₁₀) im Urin konnte auch in der experimentell verursachten Jamaikanischen Brechkrankheit (TANAKA, 1972) und beim Reye-Syndrom des Menschen gezeigt werden (CHALMERS et al., 1980).

²³ Hier soll nur auf die für das Thema der Arbeit wesentlichen metabolischen Veränderungen eingegangen werden.

²⁴ BECKER und HARRIS, (1983), COUDÉ et al. (1983b), DRAYE und VAMECQ (1987), GRANNEMAN et al. (1984a), KESTERSON et al. (1984).

Dem CoA wird bei der Hemmung der β -Oxidation durch VPA eine Hauptrolle zugewiesen (FROMENTY und PESSAYRE, 1995, KESTERSON et al., 1984, PONCHAUT et al., 1992b). Bei fataler VPA-induzierter Hepatotoxizität im Menschen war die totale CoA-Konzentration durch eine Abnahme der CoASH-, Acetyl-CoA- und langkettigen Acyl-CoA-Konzentration in der Leber um 84 % vermindert, die von CoASH, einem kritischen Substrat der β -Oxidation, sogar um 93 % (KRÄHENBÜHL et al., 1995). Dagegen wurde von KÖNIG et al. (1994) bei Patienten mit VPA-Therapie zwar eine Verminderung des freien CoA ermittelt, ein Lebersversagen beobachteten sie jedoch nur selten.

Eine kurzzeitige Gabe von VPA an Mäuse oder Ratten (BECKER und HARRIS, 1983, THURSTON et al., 1985, THURSTON und HAUHART, 1992) und die VPA-Behandlung von isolierten Hepatozyten (BECKER und HARRIS, 1983) und isolierten Mitochondrien (PONCHAUT et al., 1992b) verminderte den CoASH-Gehalt der Leber, jedoch nicht den totalen CoA-Gehalt, und induzierte einen Shift von CoASH zu Acyl-CoA-Verbindungen. Die VPA-Behandlung verursachte in isolierten Rattenhepatozyten (BECKER and HARRIS, 1983, COUDÉ et al., 1983a, COUDÉ et al., 1983b, KOCHEN, 1984) und *in vivo* in der Leber von gesunden Ratten (BECKER und HARRIS, 1983) und infantilen Mäusen (THURSTON et al., 1985) einen deutlichen Abfall der Acetyl-CoA-Konzentration und des freien CoA. PONCHAUT et al. (1992b) ermittelten in isolierten Mitochondrien der Ratte eine starke Verminderung von freiem CoA durch VPA, 4-en-VPA, 2,4-dien-VPA und PGA. Vor allem VPA, 4-en-VPA und 2,4-dien-VPA, aber auch PGA, 3-keto-VPA, 2-en-VPA und 4-OH-VPA bewirkten eine Abnahme von Acetyl-CoA. Das Sinken der Konzentration von freiem CoA könnte durch die Bildung und Akkumulation von Valproyl-CoA (KESTERSON et al., 1984, LI et al., 1991, SCHULZ, 1991, THURSTON et al., 1985) und dessen Metaboliten 2-en-VPA-CoA, 3-OH-VPA-CoA und 3-keto-VPA-CoA (BECKER und HARRIS, 1983, SCHULZ, 1991, TURNBULL et al., 1983a) in der Mitochondrienmatrix verursacht werden. Das wird durch die erwähnte verminderte Konzentration von Acetyl-CoA, dem finalen Produkt der β -Oxidation, bestätigt. Außerdem ermittelten BECKER und HARRIS (1983) in der Leber von VPA-behandelten Ratten Valproyl-CoA. PONCHAUT et al. (1992b) schlußfolgern, daß die Hemmung der β -Oxidation der Fettsäuren, der Fettsäuresynthese und der weiter unten zu besprechenden Gluconeogenese und Harnstoffsynthese durch ein erhöhtes Verhältnis von Acyl-CoA zu freiem CoA - verbunden mit einer Verminderung von Acetyl-CoA in der Mitochondrienmatrix - erklärbar ist.

Einige klinische und experimentelle Beweise unterstützen außerdem die These, daß auch die Hepatotoxizität von 4-PA (Reye-Syndrom) und Hypoglycin A (Jamaikanische Brechkrankheit) sowie einer Vielzahl angeborener metabolischer Störungen durch die Verminderung von freiem CoA verursacht werden (THURSTON et al., 1985, THURSTON und HAUHART, 1992, TURNBULL et al., 1983a). VPA und die beiden Hepatotoxine zeigen die beschriebenen Effekte laut KÖNIG et al. (1994) nur als CoA-Komplex.

Auch der Verlust von Carnitin wird als eine mögliche Hauptursache der Hemmung der mitochondrialen β -Oxidation diskutiert (FROMENTY und PESSAYRE, 1995). Carnitin ist unter anderem verantwortlich für den Transport langkettiger Fettsäuren zur β -Oxidation (DE VIVO und TEIN, 1990, HARPEY et al., 1990, KENDLER, 1986, WANDERS et al., 1990) in die innermitochondrialen Kompartimente, für den Transport der Endprodukte der Fettsäure- β -Oxidation,

für die Bereitstellung von freiem CoA für die enzymatische Katalyse in den Mitochondrien und für den Schutz vor Schäden durch freie Radikale mittels Propionylcarnitinbildung (DE VIVO und TEIN, 1990, WANDERS et al., 1990). Carnitin spielt eine Rolle in der Ketogenese (MCGARRY, 1979) und ist für die Aufrechterhaltung des zellulären Acyl-CoA/CoA-Verhältnisses verantwortlich (BIEBER et al., 1982). Letzteres ist sehr wichtig, da Acyl-CoA-Verbindungen toxisch sind (STUMPF et al., 1985). VPA benötigt für die Oxidation auch Carnitin (LÖSCHER et al., 1993b).

Es wurde wiederholt festgestellt, daß eine verlängerte VPA-Behandlung bei Ratten und Menschen ein Carnitindefizit verursacht.²⁵ VPA vermindert nicht nur den freien Carnitingehalt der Leber, sondern auch den totalen Serumcarnitingehalt²⁶, und erhöht den Acylcarnitinspiegel im Serum (SUGIMOTO et al., 1987b). KRÄHENBÜHL et al. (1995) zeigten, daß bei fataler Hepatotoxizität durch VPA beim Menschen im Plasma und in der Leber ein verminderter freier und totaler Carnitingehalt vorliegt. Die Verminderung des freien Carnitins in der Leber wird auf die Bildung von Carnitinderivaten von VPA und einigen VPA-Metaboliten zurückgeführt (BECKER und HARRIS, 1983, KESTERSON et al., 1984, THURSTON et al., 1985). So unterliegt VPA in der Leber einem Metabolismus zur Bildung von Acyl-CoA. Dies kann in das korrespondierende Acylcarnitin (Valproylcarnitin) umgewandelt werden (PONCHAUT und VEITCH, 1993, ZACCARA et al., 1988). Im Gegensatz zu Acyl-CoA kann Acylcarnitin aus der Leber transportiert werden und wird dann über die Niere ausgeschieden. Zusätzlich kann dadurch die renale Reabsorption von filtriertem Carnitin gehemmt werden (MURAKAMI et al., 1992, STANLEY et al., 1993, TEIN et al., 1993). Das verursacht einen signifikanten Carnitinverlust, der eventuell zu einem sekundären Carnitindefizit führt (LAUB et al., 1986, RIVA et al., 1993, STANLEY et al., 1993). Dieses könnte die β -Oxidation langkettiger Fettsäuren hemmen (HARPEY et al., 1990).

Allerdings muß hier wie auch schon für CoA festgestellt werden, daß die Verminderung der freien und totalen Plasmacarnitinkonzentration beim Menschen sowohl mit (BOHAN et al., 1992, BÖHLES et al., 1982, MURAKAMI et al., 1992) als auch ohne (HUG et al., 1991, LAUB et al., 1986, MURPHY et al., 1985) Hepatopathie auftrat. LAUB et al. (1986) berichteten dagegen von Fällen, in denen VPA-induzierte Leberschädigungen beim Menschen nicht mit einem Carnitindefizit verbunden waren. BEGHI et al. (1990) halten eine Beeinträchtigung des Carnitinmetabolismus und der Leberfunktion durch VPA für möglich, wenn keine VPA-Monotherapie erfolgt und die Patienten schlecht ernährt sind. Das wird unterstützt durch die Erkenntnisse, daß der Serumcarnitinspiegel durch alle bedeutenden Antiepileptika vermindert wird, z.B. hat Phenobarbital einen viel stärkeren Effekt auf die Carnitinkonzentration als VPA, Phenytoin und Carbamazepin (HUG et al., 1991).

Ein Carnitindefizit konnte ebenfalls bei Patienten mit Reye-Syndrom gefunden werden, die nicht mit VPA behandelt wurden (SUGIMOTO et al., 1986). GLASGOW et al. (1980) fanden im Tiermodell und BÖHLES et al. (1982) und MURPHY et al. (1985) beim Menschen mit VPA-

²⁵ BEGHI et al. (1990), BÖHLES et al. (1982), GLASGOW et al. (1980), KENDLER (1986), LAUB et al. (1986), MURPHY et al. (1985), SUGIMOTO et al. (1987a), THURSTON et al. (1983a).

²⁶ BÖHLES et al. (1982), LAUB et al. (1986), RIVA et al. (1993), SUGIMOTO et al. (1986), WOUWE (1995).

Behandlung niedrige Carnitinsermengen, verbunden mit charakteristischen Merkmalen des Reye-Syndroms.

2.3.2.2 Weitere mögliche Mechanismen der Hemmung der β -Oxidation

Ein weiterer Mechanismus könnte eine direkte Hemmung der β -Oxidationsenzyme durch VPA und seine Metaboliten sein. SCHMIDT-SOMMERFELDT et al. (1992) ermittelten, daß die VPA-Behandlung zu einer Hemmung der mittelkettigen Acyl-CoA-Dehydrogenase beim Menschen führt. Das stimmt mit den Ergebnissen von ITO et al. (1990) überein, die einen moderaten inhibitorischen Effekt von Valproyl-CoA in einer Konzentration von 0,3 mM auf dieses Enzym und die kurzkettige Acyl-CoA-Dehydrogenase von Ratten und Menschen *in vitro* fanden. Die Autoren demonstrierten an fünf Acyl-CoA-Dehydrogenasen, daß VPA nicht Substrat dieser Enzyme sein mußte, um als Inhibitor zu fungieren (ITO et al., 1990). Die Ergebnisse von ANDERSON et al. (1994) *in vivo* in Untersuchungen beim Menschen unterstützen diese *in vitro*-Erkenntnisse. Sie ermittelten eine Hemmung von vier Acyl-CoA-Dehydrogenasen durch VPA, die am Metabolismus der verzweigtkettigen Aminosäuren und dem der kurz- und mittelkettigen Fettsäuren beteiligt sind. In isolierten Mitochondrien der Ratte zeigten PONCHAUT et al. (1992b), daß durch die β -Oxidationsmetaboliten 2-en-VPA und 3-keto-VPA die mittelkettige Acyl-CoA-Synthetase gehemmt wird, die zur Bildung von Valproyl-CoA nötig ist.

Nach SCHULZ (1991) könnte die reversible Bindung von VPA-Metaboliten, z.B. 3-keto-VPA-CoA, an ein oder verschiedene β -Oxidationsenzyme die Ursache dafür sein, daß sie mit diesen Metaboliten nicht oder nur langsam reagieren. KESTERSON et al. (1984) vermuten, daß die CoA-Ester einiger „en“-Metaboliten von VPA, vor allem 4-en-VPA, spezifische Enzyme der β -Oxidation hemmen könnten. BALDWIN et al. (1996) zeigten, daß sich der β -Oxidationsmetabolit 2,4-dien-VPA oder seine CoA-Ester-Form reversibel an die für den zweiten und dritten Schritt der mitochondrialen β -Oxidation verantwortliche α -Untereinheit des trifunktionalen Proteins des β -Oxidationskomplexes bindet und somit zur Hemmung der Fettsäureoxidation führen könnte. Die Bindung von VPA selbst oder der Metaboliten 2-en-VPA, 4-en-VPA und 3-keto-4-en-VPA ist beträchtlich schwächer.

BAILLIE (1984) vermutet, daß die Alkylierung der Schlüsselenzyme der β -Oxidation durch VPA oder VPA-Derivate für die irreversible Hemmung der β -Oxidation verantwortlich ist. Erste indirekte Beweise dafür, daß 4-en-VPA chemisch reaktive Metaboliten bilden kann, die ebenso wie 4-PA das Potential zu dieser Hemmung haben könnten, wurden *in vitro* bei der Ratte von RETTENMEIER et al. (1985) und *in vivo* bei Rhesus-Affen von RETTENMEIER et al. (1986) sowie von BAILLIE (1988) erbracht. So könnte 2,4-dien-VPA den bei weitem reaktiveren Metaboliten 3-keto-4-en-VPA liefern, der zur Alkylierung der β -Oxidationsenzyme führen könnte (BAILLIE, 1988, KASSAHUN et al., 1994). Es wird vermutet, daß 4-en-VPA, 2,4-dien-VPA bzw. 3-keto-4-en-VPA auf diese Weise das terminale Enzym des Fettsäure- β -Oxidationskomplexes, die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase, hemmen (KASSAHUN et al., 1991, PORUBEK et al., 1989, RETTENMEIER et al., 1985). Diese Möglichkeit, die zuerst von GERBER et al. (1979) vorgeschlagen wurde, basiert auf den ähnlichen toxischen Wirkungen von VPA,

4-en-VPA und 4-PA in der Ratte *in vivo* und *in vitro*, wobei für die CoA-Metaboliten von 4-PA der hemmende Effekt auf dieses Enzym von SCHULZ (1983) und HOLLAND et al. (1973) nachgewiesen wurde. So stellten HOLLAND et al. (1973) in Herzmitochondrien von Schweinen fest, daß 2,4-dien-PA-CoA, ein Metabolit von 4-PA, die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase hemmt. SCHULZ (1983) ermittelte in Herzmitochondrien von Ratten, daß 2,4-dien-PA-CoA ein schwächerer Hemmer der 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase ist und vor allem 3-keto-4-PA-CoA zu einer starken reversiblen bzw. irreversiblen Hemmung des Enzyms führt. Nach KOCHEN et al. (1983) könnte 2,4-dien-PA-CoA äquivalent zum VPA-Metaboliten 2,4-dien-VPA sein. Einen Nachweis für die mögliche irreversible Hemmung von Thiolase-Enzymen durch VPA und deren Metaboliten lieferten PORUBEK et al. (1991), die feststellten, daß Acetoacetyl-CoA-Thiolase durch 4-PA, aber auch durch VPA und vor allem durch 4-en-VPA in Rattenhepatozyten gehemmt wird.

Der Metabolit 3-keto-4-en-VPA wurde bisher nicht detektiert, jedoch dessen GSH-Konjugat (KASSAHUN und ABBOTT, 1993, KASSAHUN et al., 1994). So könnte die tatsächliche elektrophile Spezies ein vorausgehender Metabolit, das 2,4-dien-VPA-CoA, sein (KASSAHUN und ABBOTT, 1993, KASSAHUN und BAILLIE, 1993, KASSAHUN et al., 1991). Das ist der erste reaktive β -Oxidations-Metabolit von 4-en-VPA-CoA, dessen Reaktivität dadurch gezeigt wurde, daß die 4-en-Doppelbindung sofort mit GSH reagiert, um das 5-Thioetherkonjugat zu bilden (KASSAHUN und ABBOTT, 1993) (s. Abschnitt 2.3.3.3). Die Reaktivität von 2,4-dien-VPA-CoA könnte erklären, weshalb die β -Oxidation von 4-en-VPA-CoA nicht bis zu 3-keto-4-en-VPA-CoA weiterläuft (FROMENTY und PESSAYRE, 1995).

PORUBEK et al. (1989) ermittelten mit VPA und vor allem 4-en-VPA sowohl *in vivo* in der Leber als auch *in vitro* in Rattenhepatozyten eine kovalente Bindung an zelluläre Proteine. Die Leber ist das primäre Zielorgan für die Alkylierung *in vivo*. *In vitro* führt Clofibrat, ein Induktor der β -, ω - und ω_1 -Oxidationsenzyme, zu einer merklichen Steigerung der irreversiblen Bindung, wohingegen Hemmer der Glucuronidierung diese Bindung vermindern. TANG und ABBOTT (1996a) schlußfolgern daraus, daß das nach 2,4-dien-Behandlung von Ratten vor allem ermittelte reaktive 2,4-dien-VPA-Glucuronid ohne Konjugation mit GSH zum GSH-Glucuronid-Dikonjugat direkt kritische Proteine angreift und damit eine Toxizität auslösen könnte.

2.3.2.3 Hemmung der Ketogenese

VPA führt zu einem Abfall der totalen Ketonkörperkonzentration im Plasma von Patienten (GRANNEMAN et al., 1984a, THURSTON et al., 1983a) und von gefütterten und hungernden Ratten (TURNBULL et al., 1983a). VPA hemmt die Ketogenese, wobei der Mechanismus dieser Hemmung noch nicht aufgeklärt ist. Da Acetyl-CoA ein Faktor ist, der die Ketogeneserate kontrolliert, kann nach COTARIU und ZAIDMAN (1988) dessen Erschöpfung durch VPA die sinkende Konzentration von β -Hydroxybuttersäure erklären. So beobachteten viele Autoren ein Sinken der Plasmakonzentration von β -Hydroxybuttersäure sowohl in *in vivo*-Versuchen bei Menschen (THURSTON et al., 1983a, THURSTON et al., 1985), infantilen Mäusen (THURSTON et al., 1981), jungen Ratten (KESTERSON et al., 1984) und hungernden Ratten

(BECKER und HARRIS, 1983) als auch bei *in vitro*-Versuchen in isolierten Hepatozyten (COUDÉ et al., 1983b) und in der isoliert perfundierten Leber der Ratte (OLSON et al., 1986). OLSON et al. (1986) fanden heraus, daß die Ketogenese überwiegend in periportalen Regionen der Leberlappen gehemmt wird. Laut KOSSAK et al. (1991) weisen die Veränderungen der Ketonkörper und freien Fettsäuren im Plasma, die Dicarboxylsäureazidurie und eine unnormale Acylcarnitinausscheidung während der VPA-Therapie auf eine Beeinträchtigung der β -Oxidation und eine Stimulierung der ω -Oxidation der Fettsäuren hin.

2.3.2.4 Hemmung der Gluconeogenese

VPA-Behandlung führt zu einem Absinken der Glukosekonzentration in der Leber beim Kind (THURSTON et al., 1983a). Ebenfalls konnte nach VPA-Applikation *in vivo* bei infantilen Mäusen (THURSTON et al., 1985), erwachsenen Mäusen (GRAF et al. 1985), jungen Ratten (KESTERSON et al., 1984) und *in vivo* und *in vitro* bei hungernden Ratten (TURNBULL et al., 1983a) ein Sinken der Glukosekonzentration im Blut beobachtet werden. VPA verursacht in gesunden Ratten (TURNBULL et al., 1983a) und in isolierten Hepatozyten der Ratte (BECKER und HARRIS, 1983, KOCHEN, 1984, ROGIERS et al., 1985, TURNBULL et al., 1983a) eine dosisabhängige Gluconeogenesehemmung. KOCHEN (1984) und ROGIERS et al. (1985) ermittelten in isolierten Hepatozyten der Ratte für VPA und die Produkte der δ -Dehydrogenierung die stärksten inhibitorischen Effekte. Es wurde jedoch auch eine Hemmung durch die ω -Oxidationsprodukte festgestellt. Der Mechanismus dieser Hemmung ist noch ungeklärt. Nach THURSTON et al. (1985) und COUDÉ et al. (1983a) könnte das erste Enzym der Gluconeogenese, die Pyruvatcarboxylase, aufgrund des Fehlens des allosterischen Aktivators Acetyl-CoA gehemmt sein.

2.3.2.5 Hemmung der Harnstoffsynthese und Hyperammonämie

Es wurde nach VPA-Behandlung eine Harnstoffsynthesehemmung beim gesunden Menschen (HJELM et al., 1987) und *in vivo* und in isolierten Leberzellen von hungernden und nicht hungernden Ratten (TURNBULL et al., 1983a, COUDÉ et al., 1983a) beobachtet. Sowohl beim Menschen (KAY et al., 1986, TRIPP et al., 1981) als auch bei Mäusen (QURESHI ET AL., 1985) steigern angeborene Defizite von Harnstoffzyklusenzymen die Empfindlichkeit gegenüber diesen Effekten von VPA.

Die dadurch verminderte Umwandlung von Ammoniak zu Harnstoff in der Leber kann eine Hyperammonämie zur Folge haben (FROMENTY und PESSAYRE, 1995). Diese Nebenwirkung wurde nicht nur bei Patienten mit schwerem VPA-bedingten Leberschaden gefunden (SCHEFFNER et al., 1988, ZIMMERMAN und ISHAK, 1982), sondern auch bei asymptomatischen Patienten (KONDO et al., 1992a, OHTANI et al., 1982, POWELL-JACKSON et al., 1984). Eine symptomatische Hyperammonämie durch VPA wurde nur bei Patienten mit Defiziten von Harnstoffzyklusenzymen beobachtet (LEÃO, 1995, TRIPP et al., 1981). Nach COTARIU und ZAIMAN (1988) ist die durch VPA verursachte Hyperammonämie eine reversible Nebenwirkung, die unabhängig von der Hepatotoxizität zu sein scheint (COULTER und ALLAN, 1981, ZARET et al., 1982). Allerdings wurde von einer VPA-induzierten hyperammonämischen

Encephalopathie berichtet (BAGANZ und DROSS, 1994). COULTER und ALLEN (1981) stellten für die Hyperammonämie eine Dosisabhängigkeit fest, die ZARET et al. (1982) nicht nachweisen konnten. Durch gleichzeitige Verabreichung von anderen Antiepileptika wird sie verstärkt (COULTER und ALLEN, 1981, WILLIAMS et al., 1984).

Der exakte Mechanismus dieser Nebenwirkung ist unbekannt (BAGANZ und DROSS, 1994). Eine erste Möglichkeit ist die direkte Unterdrückung der Harnstoffzyklusenzyme, insbesondere die Hemmung der Carbamylphosphatsynthetase I durch eine erhöhte Propionsäurekonzentration bei VPA-Behandlung (COULTER und ALLEN, 1981, ZARET et al., 1982). Carbamylphosphatsynthetase, das erste Enzym des Harnstoffzyklus zur Bildung von Carbamylphosphat aus Ammoniak, könnte auch durch ein hohes Acyl-CoA/CoASH-Verhältnis gehemmt werden (TURNBULL et al., 1983a). Auch der Verlust von mitochondrialem Acetyl-CoA kann zu einer Hyperammonämie beitragen (WILLIAMS et al., 1984). Eine weitere Möglichkeit besteht in der indirekten Harnstoffsynthesehemmung durch VPA-CoA (COUDÉ et al., 1981). Dabei wird die Bildung von N-Acetylglutamat, des essentiellen allosterischen Aktivators von Carbamylphosphatsynthetase, verhindert (COUDÉ et al., 1983a, WILLIAMS et al., 1984). Außerdem könnte eine steigende Glutamatdehydrogenaseaktivität, die freies Ammoniak durch oxidative Desaminierung von Glutamat bildet, die Ursache sein (COTARIU et al., 1985). Eine Carnitinapplikation führt zur Umkehr der Hyperammonämie und der steatogenen Effekte von VPA beim Menschen (OHTANI et al., 1982) und bei Ratten (SUGIMOTO et al., 1987a, TAKEUCHI et al., 1988).

2.3.3 Einfluß von VPA auf Elemente des komplexen Verteidigungssystems zur Abwehr freier Radikale

In den letzten Jahren gewann die Hypothese, daß ein Versagen des Abfangsystems für freie Radikale die fatale Hepatotoxizität verursachen könnte, zunehmend an Bedeutung. Dies stützt sich auf tierexperimentelle und klinische Ergebnisse (SIEMES et al., 1992). Darüber hinaus spricht dafür, daß die Gabe von Vitaminen, Spurenelementen und Aminosäuren, die das Verteidigungssystem zur Abwehr freier Radikale unterstützen, die Nebenwirkungen von VPA bei Menschen und Tieren mildern konnten. So führte die Gabe von N-Acetylcystein bei drei Kindern zu einer Rückbildung des VPA-vermittelten Leberschadens (FARRELL et al., 1989). Laut WILDER und HURD (1991) sollte die VPA-induzierte Hepatotoxizität passender als „VPA-Toxizitätssyndrom“ bezeichnet werden, da eine hohe Inzidenz von Ödemen, hämorrhagischer Pankreatitis, Gerinnungsstörungen (SCHEFFNER et al., 1988, ZIMMERMAN und ISHAK, 1982) und auch renale tubuläre Veränderungen (LENOIR und PERIGNON, 1981) zu beobachten sind, wie sie auch für das Reye-Syndrom beschrieben wurden (BALIGA et al., 1979, CHAVES-CARBALLO et al., 1979). WILDER und HURD (1991) postulieren, daß das Gesamterscheinungsbild der VPA-Toxizität einer durch Arzneimittel verursachten Toxizität gleicht, die als Folge eines Defizits an freien Radikalfängern auftritt. Die Autoren sind der Ansicht, daß die Opfer der VPA-induzierten Hepatotoxizität eine heterogene Gruppe sind. Bei einigen demaskiert VPA einen bestehenden Defekt im Fettsäuremetabolismus oder einen Harnstoffzyklusdefekt. In den meisten Fällen treten jedoch mehrere ungünstige Umstände gemeinsam auf. Bei der Hauptrisikogruppe, Kindern bis zu 2 Jahren, ist die Aktivität des Ra-

dikalfängersystems im Verhältnis zur Körpergröße generell geringer (HALLIWELL, 1988). Wenn die antioxidative Kapazität durch genetische Faktoren oder einen schlechten Ernährungsstatus zusätzlich verringert wird und diese Person sekundären oder tertiären Belastungen wie Polytherapie, viralen Infektionen oder anderen Toxinen ausgesetzt wird, kann ein Kaskadenphänomen verursacht und das antioxidative Abwehrsystem sehr stark geschwächt werden (WILDER und HURD, 1991). PIPPENGER et al. (1991) unterstützen diese Theorie.

2.3.3.1 Einfluß von VPA auf die Enzymaktivität

Epileptische Kinder, die eine VPA-Therapie erhalten, weisen in den Erythrozyten eine Verminderung der Aktivität der GSH-Peroxidase (GSH-Px), der GSSG-Reduktase (GSSG-Rd) (COTARIU et al., 1994, COTARIU et al., 1992), der Superoxiddismutase (SOD) und der Katalase auf (PIPPENGER et al., 1991). VPA hemmt in therapeutischen Dosen die GSSG-Rd-Aktivität in roten Blutzellen vom Kind. Die Hemmung ist dosisabhängig, reversibel, nicht kompetitiv und nicht vom Redoxstatus des Enzyms abhängig. In VPA-behandelten Erwachsenen wurde keine Hemmung der GSSG-Rd beobachtet (COTARIU et al., 1992). NORDHOFF et al. (1994) konnten Veränderungen der GSSG-Rd-Aktivität durch 0,9-1,8 mM VPA weder in Hämolysaten von gesunden Kindern noch in denen von Kindern mit VPA-Therapie feststellen. Bei VPA-Gabe an Kinder wurde eine erhöhte GSH-S-Transferaseaktivität (GST) in den Erythrozyten ermittelt (COTARIU et al., 1994, PIPPENGER et al., 1991). Die steigende GST-Aktivität mit gleichzeitiger Hemmung der GSSG-Rd- und GSH-Px-Aktivität weist auf eine kompensierende Antwort der Zellen mit dem Ziel hin, die verminderte Entgiftungskapazität zu erhöhen (COTARIU et al., 1994, PIPPENGER et al., 1991). HURD et al. (1984) und PIPPENGER et al. (1991) schlußfolgern aus ihren Untersuchungen, daß die Verminderung der GSH-Px-Aktivität zum Teil mit der Verminderung des Selen-Serumgehaltes im Plasma epileptischer Kinder mit VPA-Therapie in Beziehung stehen könnte.

Die GST-Aktivität wurde allerdings in der Leber von Ratten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* moderat durch VPA gehemmt (ROGIERS et al., 1992, ROGIERS et al., 1988b). ROGIERS et al. (1995) ermittelten in einem Rattenhepatozyten-Modell (cokultiviert mit primitiven biliären Epithelzellen der Ratte) eine selektive Verminderung der GST um 35 %. *In vivo* wurde in nicht hungernden Ratten nach einmaliger i.p. Injektion von 100-750 mg/kg VPA eine relativ schnelle Hemmung der GSH-Px von 30-55 % und eine dosis- und zeitabhängige Hemmung der GSSG-Rd-Aktivität von 10-40 % in der Leber erzielt (COTARIU et al., 1990). Diese Hemmung der Enzyme zeigt auch einen Verlust der Kapazität der Leber zur Entgiftung von Peroxiden an. Die chronische i.p. Behandlung von jungen Ratten mit 100 mg/kg 4-en-VPA über 5 Tage führte zwar zu keiner entscheidenden Veränderung des totalen und mitochondrialen GSH-Gehaltes der Leber, verursachte aber eine signifikante Hemmung der mitochondrialen GSSG-Rd-Aktivität um 43 % (TANG et al., 1995). Eine positive Korrelation zwischen der GSH-Verminderung und der Abnahme der GSSG-Rd-Aktivität wurde im Gegensatz dazu von COTARIU et al. (1990) nach einmaliger i.p. Gabe von unterschiedlichen VPA-Dosen (100-750 mg/kg) bei der Ratte ermittelt. Ebenso wurde bei hoher VPA-Dosis eine Hemmung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase um 70-90 % ermittelt, was eine Verringerung des reduzierenden Äquivalents NADPH bewirkte (COTARIU et al., 1990). Für beide Parameter

konnte eine Dosis- und Zeitabhängigkeit ermittelt werden. OLSON et al. (1986) stellten *in vivo* bei adulten Ratten und *in vitro* in der isoliert perfundierten Rattenleber mit VPA nach 24 h Hungern eine erhöhte Katalaseaktivität fest.

2.3.3.2 Einfluß von VPA auf die Spurenelemente

Selen ist ein integrierter Bestandteil des Enzyms GSH-Px (ROTRUCK et al., 1973) und trägt damit zum Schutz gegen membranperoxidative Schädigungen bei (BURK et al., 1995). Beim Menschen konnte bei VPA-Behandlung eine verminderte Selenkonzentration im Plasma bzw. Blut beobachtet werden (HURD et al., 1984, PIPPENGER et al., 1989b, WILDER und HURD, 1991). Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem Gesamtseleengehalt im Blut und der GSH-Px-Aktivität in den Erythrozyten ermittelt (PIPPENGER et al., 1991). Ebenfalls wurde eine herabgesetzte Kupfer- (HURD et al., 1984, PIPPENGER et al., 1991) und Zinkkonzentration im Gesamtblut von VPA-behandelten Patienten festgestellt (PIPPENGER et al., 1991). Die Ursache der Verminderung könnte eine Komplexbildung des freien Kupfers und Zinks mit VPA im Blut sein (HURD et al., 1981). Beide Spurenelemente sind Cofaktoren der aktiven Seite der zytosolischen SOD. Zink- und Kupferdefizite verursachen in Tierexperimenten eine Verminderung der SOD-Aktivität (SOUTHERN und POWIS, 1988). Nur das für die Aktivität der mitochondrialen SOD wichtige Mangan zeigt eine höhere Gesamtblutkonzentration im Vergleich zu Patienten ohne VPA-Therapie (PIPPENGER et al., 1991).

HURD et al. (1984) ermittelten *in vivo* in chronisch mit VPA behandelten adulten Ratten (2mal 150 mg/kg und d i.p. über 7 Tage) eine signifikante Verminderung der Selen- und Zinkkonzentration im Plasma und eine Verminderung des Selengehaltes der Leber um 30 %, wohingegen der Zinkgehalt der Leber nicht verändert wurde. In Ratten, bei denen nach einer selenarmen Diät über 7 Wochen eine signifikante Verminderung der Selenkonzentration festgestellt wurde, traten bei diesen VPA-Gaben im Vergleich zu Kontrolltieren und Tieren mit Selen-supplementation und VPA-Gabe verstärkt hepatotoxische Wirkungen, insbesondere extensive Lebernekrosen, auf (HURD et al., 1991). ANDRES et al. (1987) ermittelten in Mäusen, die eine selenfreie Diät erhielten und mit H1N1-Influenza-A-Virus infiziert wurden, einen erhöhten hepatozellulären Fettgehalt, wie er auch bei fataler VPA-induzierter Hepatotoxizität bei Kindern (SCHEFFNER et al., 1988) und beim Reye-Syndrom beobachtet wurde (WILDER und HURD, 1991). Es kam zusätzlich zu einem signifikanten hepatozellulären Schaden mit einer hepatozellulären Desorganisation und einer Proliferation der Gallengänge. Die nekrotischen Veränderungen stimmen mit den Veränderungen, die bei einigen Patienten mit VPA-Hepatotoxizität beobachtet wurden, überein (ZIMMERMAN und ISHAK, 1982). Wurde virusinfizierten Mäusen bei gleichen Versuchsbedingungen Selen zusätzlich über das Trinkwasser gegeben, konnten nur zelluläre Fettablagerungen in der Leber ermittelt werden (ANDRES et al., 1987).²⁷

²⁷ Das Reye-Syndrom führt auch zu verminderten Selen- und Kupferserumkonzentrationen bei Menschen (ANDRES et al., 1987). BROWN und FORMAN (1982) vermuten, daß die Lipidperoxidation eine mögliche Ursache des Reye-Syndroms ist, da die geringen Serumkonzentrationen von Selen und Kupfer bei Reye-Syndrom-Patienten stark auf ein Defizit der freien Radikalfängerfunktion hinweisen.

Nach PIPPENGER et al. (1991) führt der erhöhte Verbrauch von Selen, Kupfer und Zink durch VPA zu einer Verminderung der Synthese von GSH-Px und SOD und damit sekundär zu einer Beeinträchtigung des Enzymsystems zur Abwehr freier Radikale. Die Autoren vermuten, daß Kinder ein größeres Risiko besitzen, an einer VPA-induzierten idiosynkratischen Arzneimittelreaktion zu erkranken, da sie aufgrund einer geringeren Nahrungsaufnahme im Vergleich zu Erwachsenen nicht ausreichende Mengen an Spurenelementen aufnehmen.

2.3.3.3 GSH-Status und dessen Beeinflussung durch VPA und VPA-Metaboliten

GSH ist ein ubiquitäres und physiologisch bedeutendes Tripeptid, das eine funktionelle Thiolgruppe im Cysteinmolekül besitzt. Es ist das am häufigsten vorkommende Nichtproteinthiol in Zellen (GRIFFITH und MEISTER, 1979, MEISTER, 1983) und ist in hohen Konzentrationen im Säugetiergewebe, vor allem der Niere, dem Darm und der Leber, vorhanden (KOSOWER und KOSOWER, 1978). GSH hat eine Vielzahl von Funktionen wie den Transport von Aminosäuren, den zellulären Schutz gegen elektrophile Angriffe von Chemikalien bzw. deren Metaboliten und im Arzneimittelmetabolismus (GRIFFITH und MEISTER, 1979, MITCHELL und RUSSO, 1987). Außerdem ist GSH ein Substrat im GSH-Px-vermittelten Abbau von Hydroperoxiden (REED, 1990a). Es existieren zwei zelluläre GSH-Poole. Der eine ist im Zytosol und der andere in den Mitochondrien lokalisiert (REED, 1990a). Der zytosolische Pool enthält 85 % und der mitochondriale Pool 15 % des totalen zellulären GSH (MEREDITH und REED, 1982, WAHLLÄNDER et al., 1979). Es wurde eine Halbwertszeit von 2 h für den zytosolischen und von 30 h für den mitochondrialen GSH-Pool in isolierten Hepatozyten ermittelt (MEREDITH und REED, 1982). Den Mitochondrien der Leber fehlt die Kata-lase. GSH und die GSH-Px sind die einzige antioxidative Abwehr dieser Organelle (MARTENSSON und MEISTER, 1989, REED, 1990a).

Die Verfügbarkeit von GSH-Substraten, der GSH-synthetisierenden Enzyme und die Aufnahme- und Abgabemechanismen von GSH werden durch die Nahrung und den Ernährungsstatus beeinflusst und bestimmen die GSH-Konzentration in den Geweben (BRAY und TAYLOR, 1993). Hungern führt zu einem Sinken des GSH-Gehaltes der Leber (JAEGER et al., 1974, PESSAYRE, et al., 1979, PRICE et al., 1987, SHIMIZU und MORITA, 1992). Der physiologische GSH-Gehalt der Leber ist stark reguliert. Es ist schwer, ihn durch verlängertes Hungern unter ein Minimum zu senken.²⁸ Zum Beispiel zeigten TATEISHI et al. (1977), daß bei hungernden Tieren der GSH-Gehalt innerhalb des ersten Tages schnell um ein Drittel sank, sich in den nächsten 3-4 Tagen dagegen kaum noch veränderte. Auch BENUCK et al. (1995), PRICE et al. (1987) und TANG et al. (1995) ermittelten eine GSH-Verminderung durch Hungern um ca. 30 % (s. Tabelle 2.3-1). Die Aktivität der GSH-synthetisierenden Enzyme wird während des Hungerns aufrechterhalten (TATEISHI et al., 1974).

Die GSH-Konjugation spielt eine entscheidende Rolle bei der Metabolisierung vieler Xenobiotika (POLHUIJS et al., 1992). In den meisten Fällen führt dieser Weg zu weniger toxischen

Produkten, aber bei einigen Verbindungen sind die Konjugate toxischer als die Mutter-substanzen (KETTERER und MULDER, 1990, SIES und KETTERER, 1988). Die GSH-Konzentration muß beträchtlich abfallen, bevor die Konjugationsrate sich verändert. So ist nur bei einem schweren GSH-Verlust unter 1,85 mmol/l ZW eine ernsthafte Verminderung der Leber-GSH-Konjugationsrate zu erwarten. Der Abfall des GSH-Gehaltes von 9,26 mmol/l ZW auf 1,85 mmol/l ZW reduzierte die Konjugationsrate nur um 20 % (POLHUIJS et al., 1992).

Eine verminderte GSH-Konzentration wird bei vielen Krankheiten beobachtet. Sie ist mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Streß und einem steigenden Risiko für Infektionen verbunden (BRAY und TAYLOR, 1993). Nach MOLDEUS und QUANGUAN (1987), REED und FARISS (1984) und REED (1990a) beeinträchtigt eine Verringerung des totalen GSH-Gehaltes um 70-80 % die Zellabwehr gegen toxische Wirkungen z.B. von Hydroperoxiden und kann zum Zellschaden und Zelltod führen. Der Verlust von intrazellulärem GSH unter 20 % des physiologischen Spiegels wird allgemein als schädlich für die Zellen angesehen (CASINI et al., 1985, CHENERY et al., 1981, HÖGBERG und KRISTOFERSON, 1977, YOUNES und SIEGERS, 1980). In verschiedenen Untersuchungen²⁹ konnte gezeigt werden, daß Zytotoxizität, gemessen durch Lipidperoxidation, Lebernekrose und Freisetzung von intrazellulären Enzymen, *in vivo* und *in vitro* nur auftritt, wenn die intrazelluläre GSH-Konzentration unter 10-15 % des Initialwertes fällt. Das entspricht der Menge, die in den Mitochondrien vorhanden ist (REED (1990a). MEREDITH und REED (1982, 1983) vertraten als erste die Ansicht, daß das mitochondriale GSH eine vor Zytotoxizität schützende Rolle spielt. Die kritische Rolle des mitochondrialen GSH für den Zellschutz wurde von SHAN et al. (1993) bestätigt, die mit (R,S)-3-OH-4-PA den mitochondrialen GSH-Pool selektiv entleerten. Mit toxischen Konsequenzen ist zu rechnen, wenn dieser Pool um mindestens 50 % entleert wird (TANG et al., 1996). Ein Transportsystem für den GSSG-Ausstrom fehlt in den Mitochondrien anscheinend. Daher muß das dort gebildete GSSG auch ebenda reduziert werden (REED, 1990a). Die Mitochondrien sind ebenfalls nicht in der Lage, selbst GSH neu zu synthetisieren. Die Aufnahme erfolgt aus dem Zytosol (GRIFFITH und MEISTER, 1985). Der Redoxstatus in den Mitochondrien kann intramitochondriale Proteinthiolgruppen und die Integrität der mitochondrialen Membranen beeinflussen (KOSOWER und KOSOWER, 1983). Da die Fähigkeit, GSSG aus den Mitochondrien zu transportieren, fehlt, können die Mitochondrien empfindlicher als der Rest der Zelle gegenüber Proteinthioloxidation sein. Das erklärt, warum der Verlust von mitochondrialem GSH eher als der von zytosolischem GSH eine kritische Rolle in einigen Typen von Zellschädigung spielt (MEREDITH und REED, 1982, OLAFSDOTTIR et al., 1988).

²⁸ CHO et al. (1981), HAZELTON et al. (1986), JAESCHKE und WENDEL (1985), TATEISHI et al. (1977), TATEISHI et al. (1974), WILLIAMSON et al. (1982).

²⁹ ANUNDI et al. (1979), CASINI et al. (1985), MITCHELL et al. (1985), YOUNES und SIEGERS (1980), YOUNES und SIEGERS (1981).

Tabelle 2.3-1: GSH-Gehalt in Hepatozyten, Zytosol und Mitochondrien von Ratten

Modell	Ort/ Messung	Autor / Jahr	GSH in mmol/l ZW	Angaben zu den Versuchstieren ³⁰
<i>in vivo</i>	total	COTARIU et al. (1990)	8,9	w, CR, 150-200 g
		STIO et al. (1994)	7,2	m, W, 2 Mon.
		TANG et al. (1995)	14,0	m, SD, 130-150 g
		TANG et al. (1995)	9,7	m, SD, 130-150 g, 24 h H.
		PRICE et al. (1987)	12,5	m, LE, 75-125 g
		PRICE et al. (1987)	8,7	m, LE, 75-125 g, 24 h H.
		KASSAHUN et al. (1994)	8,3	m, SD, 200-220 g, 24 h H.
		BENUCK et al. (1995)	25,7	m, SD, 3 Mon.
		BENUCK et al. (1995)	16,3	m, SD, 3 Mon., 48 h H.
		JAEGER et al. (1974)	10,5	m, HM, 250, 400 g
		JAEGER et al. (1974)	9,0	m, HM, 250, 400 g, 18 h H.
	Zytosol	MERTENS et al. (1991)	16,5	m, BN, 3 Mon.
	Mitochon- drien	TANG et al. (1995)	1,5	m, SD, 130-150 g
TANG et al. (1995)		1,4	m, SD, 130-150 g, 24 h H.	
KASSAHUN et al. (1994)		1,7	m, SD, 200-220 g, 24 h H.	
<i>in vitro</i> , isolierte Hepato- zyten	intra- zellulär	KHAN et al. (1992)	6,2-9,3	allgemein
		KHAN/O'BRIEN (1991)	9,7	m, SD, 220-250 g, Zp. 0
		KHAN et al. (1992)	5,2	m, SD, 287-379 g, Zp. 0
		CARINI et al. (1992)	5,4	m, SD, 200-250 g, Zp. 0
		ANARI et al. (1995)	8,5	m, SD, 250-300 g, Zp. 0
		KHAN et al. (1992)	4,6	m, SD, 287-379 g, nach 2 h
		CARINI et al. (1992)	4,6	m, SD, 200-250 g, nach 3 h
		KLEE (1992)	5,8	m, W, 200-250 g, Zp. 0
		KLEE (1992)	8,8	m, W, 200-250 g, nach 2 h
		NÜRNBERGER (1995)	5,2	m, W, 200-300 g, 24 h H., Zp. 0
		NÜRNBERGER (1995)	5,9	m, W, 200-300g, 24 h H., Zp. 2h
		KLEE et al. (1994)	5,5	m, W, 200-250 g, 18 h H., Zp. 0
		KLEE et al. (1994)	6,2	m, W, 200-250 g, 18 h H., Zp. 2h
	Zytosol	SHAN et al. (1993)	4,5	m, SD, 180-250 g, Zp. 0
Mitochon- drien	SHAN et al. (1993)	0,7	m, SD, 180-250 g, Zp. 0	

³⁰ w=weiblich, m=männlich, CR=Charles-River, W=Wistar, BN=Brown-Norway, SD=Sprague-Dawley, LE=Long-Evans, HM=Holtzman, H.=Hungern, Zp.=Zeitpunkt.

VPA verursacht eine Verminderung des GSH-Gehaltes in der Leber (COTARIU et al., 1990, JEZEQUEL et al., 1984), dem Gehirn (RUNCI et al., 1990), in Kultur-Embryonen (HARRIS et al., 1988) von Ratten und in T-Zelllinien des Menschen (SIMON et al., 1994). In einigen *in vivo*-Untersuchungen wurde ein dosisabhängiger GSH-Verlust in der Rattenleber nachgewiesen. Bei COTARIU et al. (1990) verursachte die einmalige i.p. Gabe der nichttoxischen Menge von 100 mg/kg VPA an junge Ratten keine signifikanten Veränderungen, wohingegen höhere Mengen von 300, 500 und 750 mg/kg i.p. den GSH-Gehalt 30 min nach Gabe um ca. 30 %, 48 % bzw. 58 % verminderten. Nach 180 min wurde mit niedrigen VPA-Mengen (100 und 300 mg/kg) der GSH-Gehalt der Kontrollen wieder erreicht. Mit hohen VPA-Mengen stabilisierte sich der GSH-Gehalt, blieb jedoch niedriger als in der Kontrolle. Auch KASSAHUN et al. (1994) stellten in adulten Ratten, die über Nacht hungerten, 180 min nach Gabe von 100 mg/kg VPA bzw. 2-en-VPA keine Veränderungen des GSH-Gehaltes im totalen Leberhomogenat und in den Mitochondrien fest. In einer akuten Studie verursachten 200 mg/kg 4-en-VPA nach 240 min einen totalen GSH-Verlust im Leberhomogenat von 44 %. Der mitochondriale GSH-Gehalt fiel um 32 % in jungen Ratten (TANG et al., 1995). Eine Verminderung des totalen und mitochondrialen GSH-Gehaltes bis zu 50 % wurde von KASSAHUN et al. (1994) mit 100 mg/kg 4-en-VPA 180 min nach Gabe ermittelt.

Der GSH-Verlust könnte durch die Bildung von GSH-Konjugaten aus reaktiven Metaboliten von 4-en-VPA verursacht werden (s. Abbildung 2.1-2). TANG und ABBOTT (1996a) nehmen an, daß der Metabolismus von 4-en-VPA zu 2,4-dien-VPA essentiell für die 4-en-VPA-vermittelte Hepatotoxizität ist. Diese Vermutung wurde dadurch unterstützt, daß das GSH-Konjugat 5-GS-3-en-VPA und das daraus entstehende NAC-Konjugat 5-NAC-3-en-VPA von 2,4-dien-VPA in der Galle bzw. im Urin in mit 2,4-dien-VPA oder mit 4-en-VPA behandelten Ratten (KASSAHUN et al., 1991, KASSAHUN et al., 1994) und das GSH-Konjugat 5-GS-3-keto-VPA von 3-keto-4-en-VPA in mit 100 mg/kg 4-en-VPA i.p. behandelten adulten Ratten in der Galle identifiziert wurden (KASSAHUN et al., 1994). Das NAC-Konjugat von 2,4-dien-VPA wurde im Urin von Patienten, die eine VPA-Therapie erhielten, entdeckt. Die Konzentration war in zwei Patienten, die einen VPA-induzierten Leberschaden entwickelten, 3-4mal höher als durchschnittlich bei einer VPA-Therapie (KASSAHUN et al., 1991). Darüber hinaus wurden Patienten mit VPA-assoziiierter Hepatotoxizität erfolgreich mit NAC behandelt, was zu einer Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehaltes führen sollte (FARRELL und ABBOTT, 1991). Der Metabolit 2,4-dien-VPA und das NAC-Konjugat waren nach einer chronischen 4-en-VPA-Behandlung von jungen Ratten (100 mg/kg und d über 5 Tage) *in vivo* die Hauptmetaboliten im Urin (TANG et al., 1995). Eine Konjugation der 4-en-VPA-Metaboliten wie 2,4-dien-VPA und in geringerem Umfang 3-keto-4-en-VPA mit GSH in den Mitochondrien könnte für die selektive Entleerung des mitochondrialen GSH-Pools verantwortlich sein. Zusätzlich führt die beobachtete Hemmung der GSSG-Rd-Aktivität zur Akkumulation von GSSG in den Mitochondrien. Diese Akkumulation von GSSG verändert, wie oben beschrieben, den mitochondrialen Redoxstatus und führt zum oxidativen Streß in den Zellen. Durch α -fluor-4-en-VPA konnten keine steatogenen Effekte, keine Bildung eines 2,4-dien-VPA-Metaboliten und keine Entleerung des mitochondrialen GSH-Pools verursacht werden. Das unterstützt die Hypothese, daß die selektive Entleerung der mitochondrialen GSH-Speicher durch reaktive Intermediate der β -Oxidation von 4-en-VPA in empfindlichen Individuen zu oxidativem Streß

und einem hepatozellulären Schaden führen könnte (KASSAHUN et al., 1991, KASSAHUN et al., 1994, TANG et al., 1995) und somit eine kritische Rolle in der Hepatotoxizität von 4-en-VPA und von VPA selbst spielt (JURIMA-ROMET et al., 1996, TANG und ABBOTT, 1996b, TANG et al., 1996, TANG et al., 1995).

Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen von TANG et al. (1996) in Ratten weisen darauf hin, daß die *in vivo*-Produktion der GSH-Konjugate von 2,4-dien-VPA wahrscheinlich von der mitochondrialen GST katalysiert wird. Die Toxizität des 2,4-dien-VPA-CoA-Thioesters könnte entweder durch einen GST-bedingten mitochondrialen GSH-Verlust oder eine direkte Modifizierung von Schlüsselproteinen oder durch beides ausgelöst werden (TANG et al. 1996). Auf letzteres deuteten bereits die Ergebnisse von KASSAHUN et al. (1994) in isolierten Mitochondrien hin. Dabei ist die Veresterung des Diens wahrscheinlich essentiell für die Konjugationsreaktion (TANG et al., 1996). Das stimmt auch mit Erkenntnissen aus chemischen Syntheseversuchen von KASSAHUN et al. (1991) überein, in denen erst eine Reaktion von GSH mit 2,4-dien-VPA festgestellt wurde, wenn 2,4-dien-VPA in die Thioesterform umgewandelt wurde.

TANG und ABBOTT (1996a) berichteten zum ersten Mal über die Konjugation von 2,4-dien-VPA-Glucuronid mit GSH zu GSH-Glucuronid-Dikonjugaten. Das ist nach Meinung dieser Autoren eine Reaktion mehr, die zu der von COTARIU et al. (1990) und JEZEQUEL et al. (1984) beobachteten Verminderung von Leber-GSH durch VPA beitragen könnte. Die Konjugation von GSH mit dem ungesättigten 2,4-dien-VPA-Glucuronid ist allerdings wahrscheinlich auf das zytosolische Kompartiment begrenzt, da das Enzym zur Katalyse der Glucuronidierung, die 5'-Diphosphoglucuronosyl-Transferase, in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (MULDER et al., 1990). Der Metabolit 2,4-dien-VPA wird vor allem als Glucuronidester *in vitro* nach 2,4-dien-VPA-Behandlung von Ratten in der Galle (TANG und ABBOTT, 1996a) und *in vivo* im Urin der Ratte (TANG et al., 1995) und des Menschen (KASSAHUN et al., 1990) ausgeschieden. Somit steht nach TANG und ABBOTT (1996a) eine signifikante Menge des ungesättigten Glucuronids für die Konjugation mit GSH zur Verfügung. Die Umwandlung des GSH-Glucuronid-Dikonjugats 5-GS-3-en-VPA-Glucuronid in das korrespondierende NAC-Glucuronid-Dikonjugat 5-NAC-3-en-VPA-Glucuronid scheint in der Leber ablaufen zu können, da letzteres sowohl in der Galle als auch im Urin nach 4-en-VPA-Behandlung von Ratten gemessen wurde (TANG und ABBOTT, 1996b).

JURIMA-ROMET et al. (1996) konnten die Zytotoxizität von 4-en-VPA in Hepatozytenkulturen nachweisen, wenn der mitochondriale GSH-Pool durch DL-Buthionin-(R,S)-Sulfoximin (BSO) vermindert wurde. Der Metabolit 4-en-VPA verursachte in Mengen bis zu 20 mM mit und ohne Phenobarbital-Induktion bei Inkubation über 20 h keine Erhöhung der Laktatdehydrogenase-Freisetzung (LDH). Bei einer Verminderung des GSH-Gehaltes durch BSO wurde bereits mit 1 µM 4-en-VPA ein Vitalitätsverlust beobachtet, der mit 10 µM ungefähr 75 % (LDH-Abgabe) betrug. Die Phenobarbital-Vorbehandlung erhöhte die Toxizität von 4-en-VPA. Die Zytotoxizität wurde mit Diethylmaleat (DEM) als selektivem Verarmer von zytosolischem GSH nicht beobachtet. Daraus schließen die Autoren, daß mit BSO der kritische mitochondriale GSH-Pool vermindert wird und 2,4-dien-VPA nicht mehr ausreichend mit GSH zur Entgiftung konjugieren kann. So wurde das GSH-Konjugat von 2,4-dien-VPA, 5-

GS-3-en-VPA, in BSO- und 4-en-VPA-behandelten Kulturen in geringerer Menge ermittelt. Dieser β -Oxidationsweg wurde vor allem bei geringen 4-en-VPA-Konzentrationen nachgewiesen (10 μ M) und scheint nach JURIMA-ROMET et al. (1996) eine Hauptrolle in der 4-en-VPA-Hepatotoxizität zu spielen. Bei höheren 4-en-VPA-Konzentrationen (100 μ M) wurde wahrscheinlich durch die Sättigung der β -Oxidation von 4-en-VPA zusätzlich die Cytochrom-abhängige mikrosomale Epoxidation zu 4,5-epoxy-VPA beobachtet und auch das entsprechende GSH-Konjugat 5-GS-4-OH-VPA-Lacton ermittelt. Es handelt sich also um Metaboliten, die sowohl den mitochondrialen als auch den zytosolischen GSH-Pool entleeren. Der zytosolische GSH-Verlust durch Konjugation mit 4,5-epoxy-VPA wurde bereits von KASSAHUN et al. (1994) vermutet, wobei dies für die Entstehung einer Schädigung wie die Steatose von geringerer Bedeutung zu sein scheint (TANG et al., 1995). Die nicht entgifteten elektrophilen Metaboliten scheinen mit kritischen Makromolekülen reagieren zu können (KASSAHUN et al., 1994, TANG et al., 1996). VPA verursachte dagegen sowohl ohne als auch mit BSO eine gleichermaßen ausgeprägte dosisabhängige LDH-Freisetzung, die bei Phenobarbital-Vorbehandlung ebenso wie bei 4-en-VPA-Behandlung durch die BSO-Behandlung erhöht wurde (JURIMA-ROMET et al., 1996). Dies stützt die These der Autoren, daß die VPA-Hepatotoxizität Metaboliten-vermittelt ist und der oxidative Cytochrom-P450-abhängige Metabolismus dafür verantwortlich ist.

KASSAHUN et al. (1994) schlußfolgern, daß das mikrosomal aus 2-en-VPA gebildete 2,4-dien-VPA aufgrund seiner Lokalisation im zytosolischen Kompartiment einen geringen Anteil an der Hepatotoxizität haben könnte, da es mit GSH im Zytosol konjugieren würde und weniger verfügbar für intramitochondriale Enzyme wäre (s. Abbildung 2.1-2).

2.3.3.4 VPA und Lipidperoxidation

Lipidperoxidation ist ein Prozeß, der zwar auch unter physiologischen Bedingungen stattfindet, in Anwesenheit prooxidativer Substanzen, die zur Bildung freier Radikale führen können, aber umfangreiche Schäden in biologischen Membranen bewirken kann (UNGEMACH, 1982, UNGEMACH, 1987). Dies führt zum Verlust der funktionellen Membranintegrität und bei schweren Schäden zum Zelltod. Übersichten zu freien Radikalen als Vermittler von Gewebeschäden und Krankheiten, zu Mechanismen der radikalinduzierten Zytotoxizität und zu Folgen der Schädigung der Plasmamembran von Hepatozyten nach Lipidperoxidation sind in Arbeiten von GUTTERIDGE (1995), HALLIWELL (1988), KEHRER (1993), NÜRNBERGER (1995) und UNGEMACH (1982) zu finden. Einige Autoren wiesen darauf hin, daß freie Radikale eine bedeutende Rolle in der Ätiologie der Hepatotoxizität und der akuten Pankreatitis durch VPA spielen.³¹

Es existieren Hinweise, daß während des Metabolismus von VPA in der Leber freie Radikale entstehen. RETTIE et al. (1987) vertreten die Ansicht, daß Zellschäden, die mit einer VPA-induzierten Hepatotoxizität verbunden sind, direkt in Beziehung zu einem erhöhten mikrosomalen Metabolismus von VPA zu „en“-Verbindungen stehen, da die Synthese von „en“-

VPA instabile Epoxid-Intermediate erfordert, deren Zerfall mit der Abgabe freier Radikale verbunden ist. BUCHI et al. (1984) zeigten, daß die hepatotoxische Wirkung von VPA *in vitro* in isolierten Hepatozyten von adulten Ratten (500 µg/ml, ohne Hungern) durch den Radikalfänger *N,N'*-Diphenyl-*p*-Phenylendiamin (DPPD) verhindert und durch Vitamin E wahrscheinlich über eine Stabilisierung der Hepatozytenmembran vermindert wird. Die Daten deuten darauf hin, daß reaktive Metaboliten entweder die freien Radikalspezies sind oder die freien Radikalspezies bilden, die die Toxizität initiieren. Darüber hinaus wurde die Membranlipidperoxidation als ein Hauptmechanismus der toxischen Wirkungen von Arzneimittelmetaboliten des Cytochrom-P450-Systems ermittelt (KAPLOWITZ et al., 1986, MITCHELL et al., 1981). Konjugierte Diene wurden von MEAD (1976) als Intermediärprodukte der Peroxidation von Membranlipiden gefunden. Nach BUCHI et al. (1984) ist es also möglich, daß 2,4-dien-VPA durch diesen Mechanismus erzeugt wird und dies auf die Gegenwart von freien Radikalen im VPA-Oxidationsprozeß hinweisen könnte. In neueren Untersuchungen zeigten RETTIE et al. (1995), daß bei der Cytochrom-P450-abhängigen Bildung (4B1, 2B1) von 4-en-VPA und 4-OH-VPA ein C-4-Radikal als gewöhnliches Intermediärprodukt entsteht.

KOCHEN (1984) stellte in isolierten Hepatozyten von Ratten nach 14tägiger chronischer Vorbehandlung mit VPA in Kombination mit Phenobarbital bzw. Ethanol eine erhöhte Bildung von Malondialdehyd (MDA) fest. VPA-Behandlung allein führte im Vergleich zur Behandlung mit Phenobarbital allein zu einer sehr viel geringeren Erhöhung der MDA-Bildung.

2.3.4 Rolle des Hungerns bei VPA-vermittelter Hepatotoxizität

Es existieren Hinweise, daß Hungern in Kombination mit fieberhaften Erkrankungen die schweren Leberschäden bei VPA-Therapie mit verursachen könnte. So wurden bei kleinen Kindern mit Leberdysfunktion während der Therapie mit VPA die stärksten Veränderungen der β -Oxidation von VPA beobachtet, wenn die Patienten durch Anorexie bei viralen und fieberhaften Infektionen in einem schlechten Ernährungszustand waren (NAU und SIEMES, 1992, NAU et al., 1991). Vergleichbare Untersuchungen beim Versuchstier sind derzeit nicht verfügbar.

NDANGIZA et al. (1992) zeigten, daß eine einmalige Gabe von VPA (1000 mg/kg) an 24 h hungernde Ratten nur bei nachfolgenden weiteren 24 h Hungern zu einer multifokalen Einzelzellnekrose und zu einer moderaten perilobulären oder mittelzonalen Mikrovakuolisierung der Leber führt. Letzteres wurde auch mit 4-en-VPA (600 mg/kg) beobachtet. LÖSCHER et al. (1993b) stellten jedoch bei chronischen *in vivo*-Untersuchungen (3mal 250 mg/kg und d VPA i.p. über 7 Tage) in jungen Ratten fest, daß Hungern allein (25 h bzw. 40 h) oder eine schlechte Ernährung im Vergleich zu Studien mit nicht hungernden Tieren³² kein Risikofaktor für eine erhöhte Hepatotoxizität ist. Hungern bewirkt lediglich eine Hemmung der VPA-Elimination und eine verminderte β -Oxidation von VPA. Im Gegenteil, die Autoren kommen

³¹ HURD et al. (1991), KOCHEN (1984), PIPPENGER et al. (1989a), SANFREY et al. (1984), SPIELBERG et al. (1981), WILDER und HURD (1991).

³² COTARIU et al. (1987), KESTERSON et al. (1984), LEVY et al. (1991), LEWIS et al. (1982), LÖSCHER et al. (1992), SUGIMOTO et al. (1987b).

zu dem Schluß, daß Hungern die Hepatotoxizität von VPA sogar zu reduzieren scheint. Sie begründen das zum einen damit, daß ein durch Hungern induzierter Carnitinanstieg (FRENCH et al., 1986) die Ketogeneserate erhöhen könnte und somit den hepatotoxischen Effekt von VPA abschwächt. Diese Schlußfolgerung stützt sich auf die Untersuchungen von LEVY et al. (1991) und SUGIMOTO et al. (1987a), die nach Carnitingabe den hyperammonämischen und steatogenen Effekt von VPA in Ratten umkehren konnten, und auf die von OHTANI et al. (1982), die den gleichen Effekt bei der VPA-assoziierten Hyperammonämie beim Menschen beobachteten. Zum anderen könnte ebenfalls zum von LÖSCHER et al. (1993b) postulierten hepatoprotektiven Effekt des Hungerns in VPA-behandelten Ratten beitragen, daß zusätzlich zur Hemmung der β -Oxidation auch die Cytochrom-P450-abhängigen Wege durch Hungern gehemmt zu sein scheinen. Da beide Wege aber für die Umwandlung von VPA zum potentiellen Hepatotoxin 2,4-dien-VPA nötig sind (NAU und SIEMES, 1992, SIEMES et al., 1993), erklärt dies auch das beobachtete Sinken der Konzentration dieses zirkulierenden Diens. Andererseits weisen Ergebnisse darauf hin, daß die Wechselwirkung von VPA mit der β -Oxidation endogener Fettsäuren ein bedeutender Faktor für die Hepatotoxizität von VPA ist (NAU et al., 1991, STEPHENS und LEVY, 1992).

2.3.5 Einfluß von Polytherapie der Epilepsie auf die VPA-Hepatotoxizität

Bei Polytherapie der Epilepsie besteht ein höheres Risiko, an einer fatalen Hepatotoxizität zu erkranken. Klinische Beobachtungen ergaben, daß VPA-induzierte Leberschäden bei Gabe von VPA mit Cytochrom-P450-Induktoren wie Phenytoin, Phenobarbital oder Carbamazepin stärker ausgeprägt sind als bei VPA-Monotherapie.³³ Diese Kombinationen erhöhen *in vivo* und *in vitro* die Bildung von 4-en-VPA beim Menschen (KONDO et al., 1992b, LEVY et al., 1990, SIEMES et al., 1993) und Ratten (GRANNEMAN et al., 1984a, GRANNEMAN et al., 1984b, RETTIE et al., 1988, RETTIE et al., 1987). KONDO et al. (1992b) ermittelten bei epileptischen Kindern, daß Polytherapien nur bei Kindern über 10 Jahren ein signifikant erhöhtes 4-en-VPA/VPA-Verhältnis verursacht, wohingegen bei Kindern unter 10 Jahren keine Unterschiede im Metaboliten/VPA-Verhältnis zwischen Mono- und Polytherapie festgestellt wurden. Eine Phenobarbitalcoadministration in jungen Ratten verursacht außerdem einen Anstieg von 5-OH-VPA, 4-OH-VPA und 4-keto-VPA im Plasma (GRANNEMAN et al., 1984a).

Sowohl VPA (ROGIERS et al., 1995) als auch Phenobarbital (OMIECINSKI, 1986, PHILLIPS et al., 1981) induzieren die Cytochrom-P450-2B-Subfamilie, wobei vor allem die Aktivität der Cytochrome P450 2B1 und 2B2 steigt, ersteres in stärkerem Ausmaß. Die 4-en-VPA-Bildung wird durch das Cytochrom P450 2B1 katalysiert (s. Abschnitt 2.1.4.3). Deshalb trägt laut ROGIERS et al. (1995) eine Polytherapie von VPA mit Phenobarbital in den von KONDO et al. (1992b) untersuchten Fällen zur Hepatotoxizität von VPA bei. Die verlängerte Gabe von Stiripentol, einem bekannten Hemmer der Cytochrom-P450-Enzyme (MARCUS et al., 1985, MESNIL et al., 1988), vermindert bei gleichzeitiger chronischer Gabe von VPA bei Menschen

³³ COTARIU und ZAIMAN (1988), DREIFUSS et al. (1987), FROMENTY und PESSAYRE (1995), LEVY et al. (1990), ZIMMERMAN und ISHAK (1982).

die Bildungsclearance von 4-en-VPA (LEVY et al., 1990). Das unterstützt nach diesen Autoren die epidemiologischen Erkenntnisse, daß die Häufigkeit der VPA-induzierten Hepatotoxizität während der Polytherapie mit Cytochrom-P450-Induktoren steigt.

Ebenso wie die Erhöhung des 4-en-VPA/VPA-Verhältnisses konnten KONDO et al. (1992b) die Verringerung des 2-en-VPA/VPA-Verhältnisses nur bei Kindern über 10 Jahren beobachten. Die gehemmte β -Oxidation von VPA bei Polytherapie wird von ihnen damit erklärt, daß es bei Polytherapie zu einer verminderten Bildung von VPA-CoA (ABBOTT et al., 1986) und einem stärkeren Carnitinverlust kommt (BEGHI et al., 1990, LAUB et al., 1986, SUGIMOTO et al., 1987b). GRANNEMAN et al. (1984a) ermittelten in Ratten dagegen, daß bei der Kombination mit Phenobarbital mehr β -Oxidationsmetaboliten als bei der Behandlung mit VPA allein (350 mg/kg) gemessen wurden. Sie schlußfolgern daraus, daß die Phenobarbitalwirkung auf die von ihnen festgestellte Lebersteatose nicht mit der β -Oxidationshemmung, sondern mit einem anderen Mechanismus, wie z.B. der Konkurrenz um die Entgiftung reaktiver Intermediate, in Beziehung steht.

2.3.6 Histologische Veränderungen bei VPA-Hepatotoxizität

2.3.6.1 Mikrovesikuläre Steatose und Nekrose der Leber

Bei einer mikrovesikulären Steatose sind die Hepatozyten mit zahlreichen kleinen Lipidvesikeln gefüllt, die den Zellkern nicht von der Mitte der Zelle verdrängen. Sie impliziert eine schwere Erkrankung, und in Abhängigkeit von ihrer Ätiologie sind der ganze Leberlappen oder insbesondere die zentrizonalen, mittelzonalen oder periportalen Hepatozyten betroffen. Andere Leberveränderungen wie Nekrose, Cholestasis oder Fibrose können gleichzeitig auftreten. Die VPA-vermittelte Toxizität des Menschen ist durch eine mikrovesikuläre Steatose charakterisiert, die häufig mit einer Nekrose verbunden sein kann.³⁴ Jedoch beschrieb POWELL-JACKSON et al. (1984) auch Fälle, bei denen eine zentrilobuläre Nekrose ohne Fettablagerung die dominante Schädigung ist. Hauptsächlich scheint eine schwere Beeinträchtigung der mitochondrialen β -Oxidation endogener Fettsäuren zur mikrovesikulären Steatose zu führen (FORMENTY und PESSAYRE, 1995). BELLRINGER et al. (1988) sehen die Ursache nicht nur in der Anhäufung von VPA-Estern und ihrer Metaboliten, sondern in einer Hemmung der Triglyceridsekretion durch die *in vitro* beobachtete Hemmung der Bewegung von sekretorischen Vesikeln in Hepatozyten. Eine mikrovesikuläre Steatose wurde bei 80 % der Patienten ermittelt und erschien zuerst in periportalen Regionen der Leberlappen (ZAFRANI und BERTHELOT, 1982, ZIMMERMAN und ISHAK, 1982). In Fällen von fatalem Ausgang wurde ein hepatozellulärer Schaden mit mikrovesikulärer Steatose, Zellschwellung und Nekrose einzelner Zellen oder Zellgruppen beobachtet (KÖNIG et al., 1994). Andererseits sollte das Auftreten einer mikrovesikulären Steatose nicht mit einer schweren VPA-Hepatotoxizität gleichgesetzt werden (SCOTT et al., 1991).

³⁴ BRYANT und DREIFUSS (1996), DREIFUSS (1987), GERBER et al. (1979), KOCHEN et al. (1983), POWELL-JACKSON et al. (1984), SCHEFFNER (1986), SUSSMAN und MCLAIN (1979), ZAFRANI und BERTHELOT (1982), ZIMMERMAN (1991), ZIMMERMAN und ISHAK (1982), WILLMORE et al. (1978).

Während im chronischen *in vivo*-Tiermodell bei adulten Ratten schon eine hohe VPA-Dosis (750 mg/kg) allein oder eine niedrige VPA-Dosis (350 mg/kg) in Kombination mit Phenobarbital eine mikrovesikuläre Steatose verursachte (KESTERSON et al., 1984, LEWIS et al., 1982), wurden diese Veränderungen bei jungen Ratten nur in Kombination einer hohen VPA-Dosis (bis 750 mg/kg) mit Phenobarbital bei normaler Fütterung in geringem Ausmaß (LÖSCHER et al., 1993a, LÖSCHER et al., 1992), bei Hungern in stärkerem Ausmaß ermittelt (KESTERSON et al., 1984, SUGIMOTO et al., 1987b).

Die akute Gabe einer niedrigen VPA-Dosis (200 mg/kg) führte in adulten Ratten zu keiner Erhöhung des Lipidgehaltes der Leber, wohingegen bereits eine einmalige hohe Dosis (600 mg/kg VPA) 3 h nach der Gabe eine Erhöhung der Leberlipide um 20 %, vor allem von Triglyceriden, verursachte (JEZEQUEL et al., 1984).

Eine mikrovesikuläre Steatose mit einem ähnlichen histologischen Bild wurde auch beim Reye-Syndrom, der Jamaikanischen Brechkrankheit und bei angeborenen Defekten der Harnstoffzyklusenzyme beobachtet (DREIFUSS et al., 1987, SHERLOCK, 1983). So sind die Hepatotoxine 4-PA und Methylen-Cyclopropylessigsäure potentielle Induktoren einer mikrovesikulären Steatose. Dies wurde auch für VPA-Metaboliten festgestellt. Es zeigte sich in chronischen *in vivo*-Untersuchungen in jungen Ratten, daß 4-en-VPA der potenteste Induktor einer mikrovesikulären Steatose ist, gefolgt von 4-PA, 2,4-dien-VPA, 3-en-VPA, 2-en-VPA und VPA (GRANNEMAN et al., 1984a, KESTERSON et al., 1984, RETTIE et al., 1987). *In vivo* in jungen Ratten erhöhte 24-h-Hungern die Steatosebildung bei der chronischen 4-en-VPA-Behandlung sehr stark (KESTERSON et al., 1984, LÖSCHER et al., 1993a, TANG et al., 1995). Nekrotische Leberveränderungen wurden *in vivo* in Ratten nur mit induziertem Selendefizit nach chronischer Behandlung mit VPA (2mal 150 mg/kg und d i.p. über 7 Tage) festgestellt (HURD et al., 1991).

Nach WILDER und HURD (1991) könnten sowohl eine mikrovesikuläre Steatose als auch eine Nekrose oder beide Formen der Leberschäden bei VPA-induzierter Hepatotoxizität eine Folge des gestörten Schutzes vor freien Radikalen sein. Das wird durch die Ergebnisse von LETÉRON et al. (1996) bestätigt, die nach akuter Gabe von VPA *in vivo* in Mäusen sowohl eine mikrovesikuläre Lebersteatose als auch eine erhöhte Bildung von thiobarbitursäureaktiven Produkten und eine Ethanexhalation feststellten.

2.3.6.2 Mitochondrien

VPA verändert die Struktur und beeinträchtigt die Funktion der Mitochondrien (COTARIU und ZAIDMAN, 1988). Eine mitochondriale Dysfunktion wird für eine mögliche Erklärung der VPA-induzierten Toxizität gehalten (FROMENTY und PESSAYRE, 1995). Elektronenmi-

kroskopisch wurden in epileptischen Kindern mit VPA-bedingten Leberschäden (KEENE et al., 1982, MATHIS et al., 1979a, SUGIMOTO et al., 1983) und mit irreversiblen Leberschaden (MATHIS et al., 1979b, TRIPP et al., 1981) neben geschwollenen Lebermitochondrien und desorganisierten Cristae eine erhöhte Matrixdichte festgestellt. Es wurden jedoch auch normale Mitochondrien bei VPA-bedingtem Leberschaden beobachtet (CAPARROS-LEFEBVRE et al., 1993). Eine Mitochondrienschwellung wurde in der Leber nach chronischer VPA-Gabe an Mäuse (GRAF et al., 1985) und Ratten ermittelt (HAYASAKA et al., 1986, JIMENEZ-RODRIGUEZVILA et al., 1985, SUGIMOTO et al., 1987b). VPA tritt mit der Innenmembran der Mitochondrien durch eine Desintegration der Cristae in Wechselwirkung (HAYASAKA et al., 1986, RUMBACH et al., 1986, RUMBACH et al., 1983). Dosisabhängige ultrastrukturelle Veränderungen der Hepatozyten einschließlich veränderter Mitochondrien und Bildung autophagischer Vakuolen erschienen innerhalb von 3 bis 5 h nach einer einmaligen niedrigen VPA-Dosis (200 mg/kg) und innerhalb von 3 h bei einer einmaligen hohen VPA-Dosis (600 mg/kg) *in vivo* bei Ratten (JEZEQUEL et al., 1984). Sowohl in hungernden Ratten (einmalig 200 mg/kg VPA) als auch in isolierten Lebermitochondrien (0,01-10 mM VPA) verursachte VPA strukturelle Veränderungen der inneren mitochondrialen Membran, vor allem der Proteinkonformation (RUMBACH et al., 1986).

In neueren Untersuchungen wird die Bedeutung der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätsübergangspore mit nachfolgender Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und einem ATP-Verlust als pathophysiologischer Mechanismus für den Leberschaden durch VPA und Substanzen, die das Reye-Syndrom und die Jamaikanische Brechkrankheit hervorrufen, unterstrichen (TROST und LEMASTERS, 1996). Eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und deren Entkopplung konnten in *in vitro*-Untersuchungen mit hohen VPA-Mengen in Lebermitochondrien von Ratten nachgewiesen werden (BECKER und HARRIS, 1983, HAYASAKA et al., 1986, JIMENEZ-RODRIGUEZVILA et al., 1985, RUMBACH et al., 1983), wohingegen keine Veränderung der ATP- und ADP-Konzentrationen in isolierten Hepatozyten der Ratte beobachtet wurden (BECKER und HARRIS, 1983, COUDÉ et al., 1983a, COUDÉ et al., 1983b).

2.4 Substanzen zum Auslösen von oxidativem Streß

„Oxidativer Streß“ wird in der Literatur unterschiedlich definiert. Nach SIES (1985) wurde der Begriff „oxidativer Streß“ eingeführt, um die Störung der Prooxidantien-Antioxidantien-Balance zu benennen. HALLIWELL (1987) und KLEE et al. (1994) verstehen unter oxidativem Streß ein pathophysiologisches Phänomen, das auf einer erhöhten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beruht. Oxidativer Streß wird dem Schaden gleichgesetzt und ist die logische Konsequenz der Störung im Redoxstatus der Zelle durch eine reaktive Sauerstoffspezies oder andere freie Radikalspezies (HALLIWELL, 1987). Da auch Gewebeveränderungen durch Veränderungen in der antioxidativen Abwehr oder von Reparatursystemen auftreten können, die ebenfalls als oxidativer Streß definiert werden müssen, aber nicht notwendigerweise schädlich für das Gewebe sind, wurde die Definition von SIES (1991) modifiziert. Danach ist unter oxidativem Streß eine Störung zwischen der Prooxidantien-Antioxidantien-Ba-

lance zu verstehen, die potentiell zu Schäden führen kann. Diese Definition impliziert keine schädlichen Wirkungen einer solchen Veränderung auf die Funktion des Gewebes. Sie sagt auch nicht, ob die Störung das Ergebnis einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ist oder eine Verminderung der homöostatischen Antwort des Gewebes. Auf der Grundlage dieser Definition ist der Begriff oxidativer Streß in dieser Arbeit zu verstehen.

Die Toxizität zahlreicher Chemikalien und die Pathogenese vieler Krankheiten hängt mit oxidativem Streß zusammen (KEHRER, 1993). Akuter oxidativer Streß kann zu Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase (BELLOMO und ORRENIUS, 1985), zur Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen nichtlysosomalen Proteasen (NICOTERA et al., 1986), zu veränderten Proteinthiolgehalten (BELLOMO und ORRENIUS, 1985), DNA-Schäden und -Reparaturen (CANTONI et al., 1987), Veränderungen der mitochondrialen Funktionen (STARKE und FARBER, 1986) und zur Peroxidation von zellulären Lipiden (TRIBBLE et al., 1987) führen. Zur experimentellen Induktion von oxidativem Streß werden synthetische Hydroperoxide genutzt (CHANCE et al., 1978).

2.4.1 Wirkungsmechanismus der Hydroperoxide Cumolhydroperoxid (CuOOH) und tert-Butylhydroperoxid (t-BuOOH)

Es werden vor allem zwei Wirkungsmechanismen für Hydroperoxide in der Literatur beschrieben. Der Hydroperoxidmetabolismus ist nicht zytotoxisch und tritt bei niedrigen Konzentrationen auf. Der bei hohen Konzentrationen vorherrschende Hydroperoxidzerfall ist dagegen mit der Freisetzung freier Radikale verbunden (GOGVADZE und ZHUKOVA, 1991).

2.4.1.1 Hydroperoxidmetabolismus

Der erste Mechanismus ist eine Reduktion der organischen Hydroperoxide durch den endogenen Enzymkomplex GSH-Px-GSSG-Rd-Transhydrogenase zu den korrespondierenden Alkoholen (JOCELYN und DICKSON, 1980), zu Cumyl-Alkohol bei CuOOH (REED, 1990a) und zu tert-butyl-Alkohol bei t-BuOOH (BELLOMO et al., 1984b, CADENAS et al., 1981). Dieser nicht zytotoxische Mechanismus wurde für CuOOH bei niedrigen Konzentrationen bis zu 100 μM in isolierten Lebermitochondrien ermittelt (GOGVADZE und ZHUKOVA, 1991) und bis zu 225 μM in isolierten Hepatozyten der Ratte (HÖGBERG und KRISTOFERSON, 1977). t-BuOOH war in frisch isolierten Hepatozyten in einer Konzentration von 150 μM (ANARI et al., 1995), 300 μM (SHAN et al., 1993), 800 μM (YUAN et al., 1991) und in kultivierten Hepatozyten in einer Konzentration von 200 μM (COLEMAN et al., 1989) nicht zytotoxisch.

Der Hydroperoxidmetabolismus ist verbunden mit der Oxidation der Reduktionsäquivalente GSH durch die GSH-Px-Reaktion zu GSSG und der Oxidation des reduzierten Pyridinnucleotid (NADPH), des Cofaktors bei der GSSG-Rd-Reaktion zu GSH unter Bildung von oxidiertem Pyridinnucleotid (NADP^+) (HINO et al., 1987). GOGVADZE et al. (1992) beschrieben in Lebermitochondrien der Ratte nach Hydroperoxidbehandlung einen progressiven und irreversiblen Verlust von NADPH durch Hydrolyse von NADP^+ .

HÖGBERG und KRISTOFERSON (1977) stellten mit 225 μM CuOOH in isolierten Hepatozyten der Ratte in den ersten 15 min der Inkubation einen GSH-Abfall von ca. 38 % fest. Innerhalb der nächsten 15 min verringerte sich der Unterschied auf 27 %. Der GSH-Gehalt stieg ähnlich wie in der Kontrolle stark an und erreichte nach 5 h 90 % der Kontrollwerte. EKLÖW et al. (1984) stellten in isolierten Hepatozyten der Ratte sofort nach Zugabe von 100 μM t-BuOOH einen rapiden GSH-Abfall von ca. 26 % fest. Nach 3 min betrug der Unterschied ca. 32 %, um nach 10 min auf ca. 26 % zu sinken. ANARI et al. (1995) ermittelten im selben Modell mit 150 μM t-BuOOH eine vorübergehende Oxidation von 90 % des GSH zu GSSG. Dies wurde allerdings innerhalb von 10 min wieder zu GSH reduziert. YUAN et al. (1991) stellten ebenfalls in isolierten Hepatozyten mit 800 μM t-BuOOH eine Senkung des zellulären GSH-Gehaltes um ca. 33 % fest. EKLÖW et al. (1984) beobachteten daneben einen kurzzeitigen starken Abfall des NADPH/NADP⁺-Verhältnisses, das danach wieder anstieg, und einen kurzzeitigen starken Anstieg der intrazellulären GSSG-Konzentration mit nachfolgendem rapidem Abfall durch eine GSSG-Abgabe aus den Hepatozyten in das Medium. Eine konzentrationsunabhängige Akkumulation von GSSG im Kulturmedium wurde ebenfalls von MASAKI et al. (1989) im Modell der Kulturhepatozyten mit t-BuOOH (0,25-1,5 mM) ermittelt. OLAFSDOTTIR und REED (1988) beobachteten in isolierten Mitochondrien mit t-BuOOH trotz drastischer Verminderung des mitochondrialen GSH/GSSG-Verhältnisses keine Abgabe von GSSG ins Medium. BELLOMO et al. (1982) stellten in isolierten Rattenhepatozyten eine konzentrationsabhängige Verkleinerung des GSH/GSSG- und des NADPH/NADP⁺-Redoxverhältnisses durch Oxidation von GSH und Pyridinnucleotid und eine Verminderung der intrazellulären Konzentration von austauschbarem Ca²⁺ fest. Es wurden keine Produkte freier Radikale wie MDA gebildet (GOGVADZE und ZHUKOVA, 1991).

Die bei Hydroperoxidreduktion entstehenden oxidierten Formen GSSG und NADP⁺ können akkumuliert werden und sind dann fähig, direkt oder indirekt die Ionenpermeabilität der Mitochondrieninnenmembran zu erhöhen (BELLOMO et al., 1982, NOVGORODOV et al., 1991, RIZZUTO et al., 1987). Dadurch kommt es zur Ca²⁺-Abgabe aus den Mitochondrien, wobei die Mitochondrieninnenmembran noch intakt ist.³⁵ Für den durch Hydroperoxide induzierten Permeabilitätsübergang werden verschiedene Mechanismen diskutiert.³⁶

Auch eine Cytochrom-P450-vermittelte Metabolisierung von Hydroperoxiden zu korrespondierenden Alkoholen wurde beschrieben, die nicht zur Bildung von freien Radikalen führt. Für diese peroxidative Reaktion liefern NADPH bzw. NADH die Elektronen (BIDLACK, 1980).

Nach HINO et al. (1987) könnte der Glukose-6-Phosphat-Weg eine Rolle beim Schutz der Zellen bei oxidativem Streß spielen. Durch oxidativen Streß wird in intakten Mikrosomen der Rattenleber der Pentose-Phosphat-Zyklus aktiviert, indem das durch die Reduktion von CuOOH gebildete NADP⁺ die Oxidation von Glukose-6-Phosphat steigert. In dieser Reaktion dient NADP⁺ als Cofaktor und wird zu NADPH reduziert.

³⁵ BELLOMO et al. (1982), BELLOMO et al. (1984a), JONES et al. (1983), MOORE et al. (1983), RICHTER und KASS (1991), WEIS et al. (1992).

³⁶ BEATRICE et al. (1984), GOGVADZE et al. (1992), RICHTER und FREI (1988), RICHTER und KASS (1991), RICHTER et al. (1990), WEIS et al. (1992).

2.4.1.2 Hydroperoxidzerfall

Der Hydroperoxidzerfall führt in einem Cytochrom-P450-vermittelten Mechanismus zur Bildung von radikalischen Produkten mit nachfolgender Initiation der Lipidperoxidationskettenreaktion (BINDOLI et al., 1982, KENNEDY et al., 1986, NOVGORODOV et al., 1989b, WEISS und ESTABROOK, 1986), wenn die Hydroperoxidkonzentration die Kapazität des Entgiftungssystems überschreitet oder die reduzierenden Äquivalente verbraucht sind und keine weitere Reduktion ablaufen kann (GOGVADZE und ZHUKOVA, 1991).

Für CuOOH wurde dieser Mechanismus in isolierten Lebermitochondrien der Ratte bei Konzentrationen über 100 µM beschrieben (GOGVADZE und ZHUKOVA, 1991). Mit steigenden Konzentrationen stieg progressiv die Aktivierung der Lipidperoxidation (GOGVADZE und ZHUKOVA, 1991). In isolierten Hepatozyten der Ratte stellte NÜRNBERGER (1995) bei 250 µM CuOOH eine starke MDA-Bildung fest, wobei der GSH-Gehalt nach 2 h Inkubation auf 37 % des Initialwertes fiel. Dagegen fanden HÖGBERG und KRISTOFERSON (1977) im selben Modell mit 225 µM CuOOH zwar einen GSH-Abfall ähnlichen Ausmaßes, aber keine Erhöhung der MDA-Bildung. YUAN et al. (1991) beobachteten für t-BuOOH nur bei einer Konzentration von 1,5 mM einen leichten Effekt auf die Vitalität von Hepatozyten und die LDH-Abgabe, verbunden mit einer leichten Erhöhung der Bildung thiobarbitursäureaktiver Produkte. Die GSH-Menge wurde bei dieser Konzentration auf ca. 33 % gesenkt (YUAN et al., 1991). FERNANDES et al. (1995) zeigten, daß durch 1 mM t-BuOOH innerhalb von 30 min Inkubation die Vitalität isolierter Hepatozyten der Ratte auf 25 % sank (Trypanblautest) und 65 % der LDH abgegeben wurde. Ebenso sank der GSH-Gehalt auf ca. 44 %, der GSSG-Gehalt stieg auf ca. 283 %, und es fand eine starke Bildung von MDA statt. COLEMAN et al. (1989) zeigten in kultivierten Hepatozyten mit 750 µM t-BuOOH, daß der Radikalfänger DPPD den Zelltod verhinderte. MASAKI et al. (1989) bestätigten im selben Modell, daß t-BuOOH in Konzentrationen unter 1 mM letal wirkt, und wiesen einen konzentrationsabhängigen Anstieg des MDA-Gehaltes im Kulturmedium nach.

Die CuOOH-abhängige Lipidperoxidation beinhaltet die durch das in der innermitochondrialen Membran vorkommende Cytochrom-P450-katalysierte homolytische Spaltung. Das entstehende Cumylperoxyl-Radikal initiiert nachfolgend die Lipidperoxidation durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms vom Lipid (BINDOLI et al., 1982, KENNEDY et al., 1986, THOMPSON und YUMIBE, 1989, WEISS und ESTABROOK, 1986). Nach Untersuchungen von STEFEK et al. (1992) scheinen Alkoxy- und Peroxylradikale bei dieser Lipidperoxidation beteiligt zu sein. Nach THOMPSON und YUMIBE (1989) und WEISS und ESTABROOK (1986) sind Superoxid-anionradikale und Hydroxylradikale nicht einbezogen. Auch bei t-BuOOH handelt es sich um eine homolytische Spaltung (CADENAS und SIES, 1982). Es entstehen die Radikalintermediate t-Butylalkoxyradikal und t-Butylperoxyradikal, die die Propagation mit ungesättigten Lipiden initiieren können. Es werden Lipidradikale und Lipidperoxyradikale gebildet.

Die Rolle der Bildung freier Radikale und der Lipidperoxidation durch organische Hydroperoxide für die Induktion der unspezifischen Permeabilität ist noch nicht eindeutig geklärt. Nach vielen Autoren könnte die Erhöhung der Ionenpermeabilität der Mitochondrien das Ergebnis

der Lipidperoxidation sein (BINDOLI et al., 1982, NOVGORODOV et al., 1989a, NOVGORODOV et al., 1991, NOVGORODOV et al., 1989b). KENNEDY et al. (1986) und KENNEDY et al. (1989) ermittelten Alkyl- und Alkoxyradikale als Ursache der Induktion der unspezifischen Permeabilität. Die Behandlung mit dem Radikalfänger Butylhydroxytoluol (BHT) verhinderte die Induktion der unspezifischen Permeabilität (NOVGORODOV et al., 1989b). Von einigen Autoren wurde eine ursächliche Beziehung zwischen der Störung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase, Mitochondrienschaden und folgendem Zelltod und der Bildung von aktiven Sauerstoffradikalen festgestellt.³⁷ In Untersuchungen von GOGVADZE und ZHUKOVA (1991) war jedoch die intensive Akkumulation von Lipidperoxidationsprodukten durch CuOOH nicht mit einer erhöhten Ca^{2+} -Abgabe aus den Mitochondrien verbunden. Geringe Konzentrationen des Radikalfängers BHT unterdrückten zwar signifikant die Lipidperoxidation, hatten jedoch keinen Effekt auf die Ca^{2+} -Abgabe aus den Mitochondrien. Die Ergebnisse zeigen, daß die Ca^{2+} -Abgabe zu einem beträchtlichen Ausmaß eher durch den Hydroperoxidmetabolismus als durch den Hydroperoxidzerfall verursacht wird. Die Untersuchungen von NÜRNBERGER (1995) bestätigten dies, da kein erkennbarer Zusammenhang zwischen der radikalinduzierten Zellschädigung und der Erhöhung des zytosolischen Calciums in isolierten Hepatozyten der Ratte vorhanden zu sein scheint. Er schlußfolgert, daß die Erhöhung des zytosolischen Calcium kein universeller pathobiochemischer Mechanismus radikalinduzierter Zytotoxizität ist.

Neben der in der Literatur beschriebenen Ca^{2+} -Abgabe kommt es durch eine Steigerung der unspezifischen Ionenpermeabilität der Mitochondrieninnenmembran auch zur K^+ - und Mg^{2+} -Abgabe (BROKEMEIER und PFEIFFER, 1995, NOVGORODOV et al., 1989c). Freie endogene und exogene Fettsäuren induzieren geringfügig die Permeabilitätserhöhung und vergrößern somit die Empfindlichkeit der Mitochondrien gegenüber potenteren Agenzien wie $t\text{-BuOOH}$ (BROKEMEIER und PFEIFFER, 1995).

Während der Lipidperoxidation wird Cytochrom P450 zerstört (CADENAS und SIES, 1982). CuOOH verursacht in Lebermikrosomen von Ratten eine schnelle und extensive Zerstörung von Cytochrom P450, wahrscheinlich durch die Interaktion von peroxidierten Lipiden mit Cytochrom P450 (POLI et al., 1987, STEFEK et al., 1992), was zur Zerstörung von mehr als 60 % des Hämproteins innerhalb von 45 min Inkubation führte (STEFEK et al., 1992). YAO et al. (1993) stellten in Untersuchungen mit Cytochrom P450 2B1 bei hoher CuOOH -Menge eine „Suizid-Inaktivierung“ des Cytochroms fest. Sowohl NADH als auch NADPH schützen während der Inkubation mit $t\text{-BuOOH}$ das Cytochrom P450 (CADENAS und SIES, 1982).

³⁷ HYSLOP et al. (1986), JONES et al. (1983), KAKKAR et al. (1992), KAKKAR et al. (1996), KASS et al. (1992), MEHROTA et al. (1991), NICOTERA et al. (1985), REED (1990b).

2.4.1.3 Bioaktivierung von Xenobiotika durch Hydroperoxide

ANARI et al. (1995) lieferten mit ihren Untersuchungen in frisch isolierten Hepatozyten der Ratte den ersten Beweis, daß Hydroperoxide von intakten Zellen zur Unterstützung der Bioaktivierung von Xenobiotika durch das Cytochrom-P450-Peroxidase/Peroxygenasesystem genutzt werden können. Bei dieser Reaktion dient das Hydroperoxid als Quelle für Sauerstoffatome und Elektronen für den Hydroxylierungsprozeß, um molekularen Sauerstoff und NADPH in der Monooxygenasereaktion zu ersetzen (ASHLEY und GRIFFIN, 1981, ELLIN und ORRENIUS, 1975). Daneben können auch Lipidhydroperoxide als oxidative Quelle genutzt werden (HRYCAY et al., 1976, RAHIMTULA und O'BRIEN, 1974). Dabei werden gewöhnlich die gleichen xenobiotischen Metaboliten gebildet (CAPDEVILA et al., 1980, O'BRIEN, 1978). ANARI et al. (1995) fanden in frisch isolierten Hepatozyten der Ratte heraus, daß nichttoxische Konzentrationen von t-BuOOH (150 µM) die Cytochrom-P450-abhängige Bioaktivierung von Xenobiotika in einem solchen Ausmaß erhöhen, daß Hepatotoxine, die normalerweise in isolierten Hepatozyten entgiftet werden können, zur Zellschädigung führen.

2.4.2 Wirkungsmechanismus von Bromheptan (BrH)

GSH spielt eine bedeutende Rolle bei der Entgiftung vieler toxischer elektrophiler Verbindungen. Die Entleerung des intrazellulären GSH durch Testsubstanzen ist eine gängige Methode, um die Rolle von GSH in Zytotoxizitätsmechanismen von Xenobiotika zu studieren.

1-Bromheptan (BrH), ein 1-Bromoalkan, ist ein Substrat der GSH-S-Transferase und vermindert in isolierten Hepatozyten der Ratte weitaus effektiver den GSH-Gehalt als andere Substanzen mit diesem Wirkungsmechanismus wie DEM und Phoron (KHAN und O'BRIEN, 1991). So verursachte eine Konzentration von 100 µM BrH innerhalb von 30 min Inkubation einen GSH-Verlust von 87 % (KHAN und O'BRIEN, 1991). Diese Verminderung wurde für 2-3 h aufrechterhalten. Auch nach 4 h konnte keine Zytotoxizität ermittelt werden. Mit 300 µM betrug der GSH-Gehalt bereits nach 1 min Inkubation ca. 67 %, nach 10 min ca. 31 %, nach 30 min ca. 13 % und nach 60 min Inkubation ca. 12 % der Kontrolle. Erst ab einer Konzentration von 3 mM stellten die Autoren eine beginnende Zytotoxizität mit Hilfe des Trypanblautestes fest. Nach 3 h Inkubation waren mit 3 mM noch 75 %, mit 4 mM noch 57 % und mit 5 mM noch 25 % vitale Zellen vorhanden. Eine Lipidperoxidation wurde bis zu Konzentrationen von 2 mM BrH nicht ermittelt (KHAN und O'BRIEN, 1991). Die Autoren stellten für BrH in dieser Konzentration keinen Effekt auf die hepatische Anilin-Hydroxylaseaktivität fest, die primär durch Cytochrom P450 2E1 metabolisiert wird. Sie schlußfolgern daraus, daß die durch BrH GSH-entleerten Hepatozyten ein adäquates antioxidatives und enzymatisches System besitzen, um physiologischen oxidativen Streß zu bekämpfen. GRAUPNER et al. (1993) ermittelten 60 min nach i.p. Gabe von 400 µmol/kg Körpermasse BrH an Ratten nur noch 42 % des Leber-GSH-Gehaltes der Kontrolltiere, die nur mit dem Lösungsvermittler Kornöl behandelt wurden. Die Applikation von 200 µmol/kg Körpermasse BrH führte zu keiner Veränderung von GSH gegenüber der Kontrolle.

3 Material und Methoden

3.1 Substanzen zur Behandlung

Bei den Versuchen wurden die arzneilich wirksame Substanz VPA als Natriumsalz und die Prooxidantien CuOOH, t-BuOOH bzw. BrH verwendet, die im folgenden näher charakterisiert werden.

VPA ist eine acht Kohlenstoffatome enthaltende verzweigte kurzkettige Fettsäure. Die chemische Struktur von VPA unterscheidet sich damit völlig von den anderen gebräuchlichen Antiepileptika (Phenobarbital, Primidon, Phenytoin, Carbamazepin, Ethosuximid, Diazepam, Clonazepam, Nitrazepam, Trimethadion, Sultiam) (DAVIS et al., 1994, FEUERSTEIN und JURNA, 1996).

Tabelle 3.1-1: Chemische Charakterisierung der zur Behandlung der Leberzellen verwendeten Substanzen

Freiname	Valproinsäure (VPA)	Natriumvalproinsäure (Na-VPA)	Cumolhydroperoxid (CuOOH)	tert-Butylhydroperoxid (t-BuOOH)	1-Bromheptan (BrH)
chemischer Name	2-n-Propyl-Pentansäure	2-n-Propyl-Pentansäure, Natriumsalz	α, α -Dimethylbenzylhydroperoxid	1,1-Dimethylethylhydroperoxid	Heptylbromid 99%
Summenformel	$C_8H_{16}O_2$	$C_8H_{15}NaO_2$	$C_9H_{12}O_2$	$C_4H_{10}O_2$	$CH_3(CH_2)_6Br$ ($C_7H_{15}Br$)
Molekulargewicht in g/l	144,21	166,19	152,20	90,12	179,11
Dichte in g/cm^3	-	-	1,0618	0,94	1,14
pKa-Wert	4,56 ^a	4,5 - 4,95 ^b	-	-	-

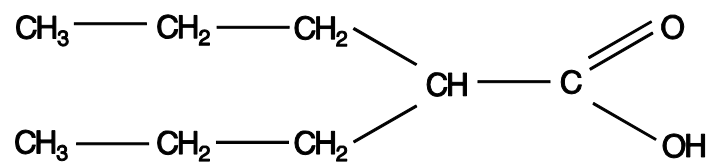
Quellen:

(a) LÖSCHER und ESENWEIN (1978)

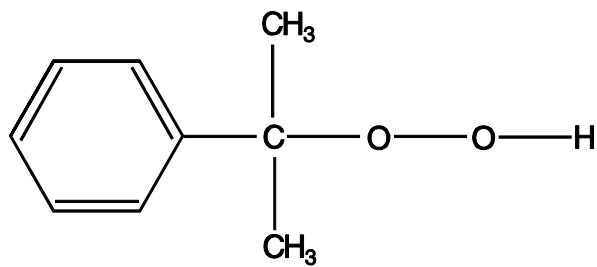
(b) EADIE und TYRER (1980), KUPFERBERG (1980), LÖSCHER und ESENWEIN (1978), SIMON und PENRY (1975)

Die folgende Abbildung 3.1-1 zeigt die Strukturformeln der zur Behandlung der Leberzellen verwendeten Substanzen.

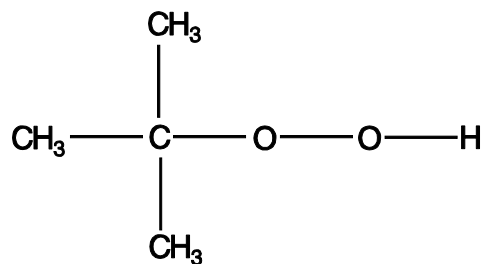
VPA:



CuOOH:



t-BuOOH:



BrH:

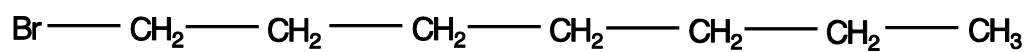


Abbildung 3.1-1: Strukturformeln der zur Behandlung der Leberzellen verwendeten Substanzen

3.2 Versuchstiere

3.2.1 Rasse, Geschlecht, Gewicht und Alter

Für die Experimente wurden Wistar-Ratten männlichen Geschlechts mit einem Gewicht von 250-300 g verwendet. In dieser Gewichtsklasse sind die Tiere zwischen 70-90 Tage alt.

3.2.2 Versuchstierhaltung

Die Ratten stammten aus der Zentralen Versuchstierzucht (ZVZ) des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV). Die Tiere wurden in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Zyklus gehalten mit einer Lichtperiode in der Zeit von 5.00 bis 17.00 Uhr. Die Temperatur betrug 21°C (± 1) und die relative Luftfeuchtigkeit 45-55 %. Als Futter diente die Standard-Diät Altromin®, und sie erhielten Wasser ad libitum. Die Tiere wurden ein bis zwei Tage vor Versuchsbeginn aus der ZVZ in die Laborräume gebracht, um eine Anpassung an die Laborbedingungen zu ermöglichen und um den Ernährungsstatus der Tiere variieren zu können. Die Versuche wurden sowohl in frisch isolierten Leberzellen von 20 h hungernden (von 11.30 Uhr des Vortages bis 7.30 Uhr des Versuchstages) als auch nicht hungernden Ratten (Futter bis zum Versuch) durchgeführt. Alle Tiere bekamen bis zum Versuch Wasser ad libitum.

3.3 Die Methode isolierter Hepatozyten

Die Leberzellen der Ratten wurden nach einer Methode von BAUR et al. (1975), modifiziert von UNGEMACH (1982), isoliert. Die Versuche wurden immer zur gleichen Zeit zwischen 7.30 bis 8.00 Uhr morgens begonnen.

3.3.1 Lösungen und Collagenasen¹

Als Perfusionsmedium zur Gewinnung der Leberzellen wurde Ca²⁺-freier Hanks-Puffer verwendet. Das Inkubationsmedium der Leberzellen war Krebs-Henseleit-Puffer. Zur Zellaufbereitung diente Krebs-Henseleit-Puffer mit Albumin.

Von den aufgeführten Lösungen wurden Stammlösungen hergestellt, die im Kühlschrank bei 4°C maximal 4 Wochen aufbewahrt wurden. Die Stammlösungen enthielten dabei noch nicht die Substanzen NaHCO₃ im Hanks-Puffer und Hepes im Krebs-Henseleit-Puffer. Diese wurden jeweils frisch zur am Versuchstag in den benötigten Mengen angesetzten Gebrauchslösung (Verdünnung 1:10) zugegeben. Anschließend wurden die Gebrauchslösungen sterilfiltriert und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Zur Zellaufbereitung wurden in 50 ml des sterilfil-

¹ Die Zusammensetzung der Lösungen, Puffer und Collagenasen ist im Abschnitt 3.6.1 aufgeführt.

trierten Krebs-Henseleit-Puffers mit einem pH-Wert von 7,4 zusätzlich 0,75 g Rinderserumalbumin gelöst. Der pH-Wert wurde nochmals auf 7,4 eingestellt. Als Wasser wurde Aqua dest. verwendet. Sowohl der Krebs-Henseleit-Puffer als auch der albuminhaltige Krebs-Henseleit-Puffer wurden noch vor Operationsbeginn in einen Behälter mit Eis verbracht.

Von besonderer Bedeutung für das Gelingen der Leberzellperfusion zur Gewinnung vitaler Zellen war die Verwendung sowohl der richtigen Collagenasenart einer bestimmten Aktivität (Firma) als auch des richtigen Anteils in der Mischung. Die beiden verwendeten Collagenasen Clostridiopeptidase A, aus *Clostridium histolyticum* hergestellt, wurden bei -20°C aufbewahrt und erst kurz vor der Leberperfusion in ca. 5 ml Hanks-Puffer gelöst.

3.3.2 Präparation isolierter Hepatozyten

3.3.2.1 Operation

Das Tier wurde in einer Etherglocke mit Ether pro narcosi in 3-5 min narkotisiert. Danach wurde das Gewicht der Ratte bestimmt. Nach Heparinisierung des Blutes mit ca. 30 I.E. Heparin (Liquemin[®]) über die V. femoralis wurde die Bauchhöhle in der Medianen eröffnet, die V. portae kanüliert und die Leber mit zimmerwarmem carbogenbegastem Hanks-Puffer über die Pfortader durch Inzision der V. cava caudalis entblutet. Die Milz, der Magen und das Darmgekröse wurden entfernt, die Brusthöhle eröffnet und die V. cava cranialis kanüliert. Danach konnte die Leber entnommen werden, ihr Gewicht wurde bestimmt, und der bei der Perfusion verwendete Ausgang (Kanüle in der V. cava cranialis) wurde in die Öffnung eines Plexiglastellers zur Perfusion gebracht.

3.3.2.2 Perfusion

Der Aufbau der Apparatur zur Perfusion isolierter Lebern von kleinen Versuchstieren entsprach den Angaben von MILLER et al. (1951). Das Perfusionsmedium befand sich in einem Vorratsgefäß und wurde durch einen Magnetrührer bewegt. Unter der Bodenplatte war eine Rollenschlauchpumpe dafür verantwortlich, den Hanks-Puffer über einen Schlauch in eine künstliche gläserne Lunge zu befördern und dort mit einem von unten einströmenden Sauerstoff-CO₂-Gemisch zu begasen. Von der Lunge aus wurde das Perfusionsmedium über ein T-Rohr zum Druckausgleich in die V. portae der Leber geleitet, die auf einem Plexiglasteller lag, der sich in einem tischartigen Sockel befand. Dieser Sockel saß auf einem graduierten Glasgefäß zur Bestimmung der Durchflußrate auf. Das ausfließende Perfusionsmedium gelangte über die Kanüle in der V. cava cranialis über das graduierte Glasgefäß in das Vorratsgefäß zurück und wurde von dort wieder in den künstlichen Kreislauf gepumpt. Am graduierten Glasgefäß war ein Dreiwegehahn angebracht. Überschüssiges über die Lunge gefördertes Medium wurde über einen Überlaufschlauch ins Vorratsgefäß geleitet. Eine gleichartige Vorrichtung war vom graduierten Glasgefäß zum Vorratsgefäß vorhanden. Das Carbogengasgemisch wurde über ein Waschflaschensystem in die untere Hälfte der gläsernen Lunge eingeleitet. Die Apparatur befand sich in einem Plexigehäuse mit Schiebetür an der

Vorderseite, so daß während der gesamten Leberperfusion eine Temperatur von 37°C aufrechterhalten werden konnte.

Bereits 15 min vor Perfusionsbeginn wurde die Anlage mit 180 ml Hanks-Puffer gefüllt, mit Carbogengas gesättigt und auf 37°C erwärmt. Sofort nach der Leberentnahme wurde das Organ in die Anlage gebracht und nicht rezirkulierend mit 60 ml carbogenbegastem Hanks-Puffer durchspült. Es folgte eine anterograde, rezirkulierende Perfusion der Leber mit einer durchschnittlichen Perfusionsrate von 44 ml/min bei einem mittleren Perfusionsdruck (hydrostatischen Druck) von 7 cm Wassersäule. Nach einer Anpassungsphase für die Leber von 5 min wurde das Collagenasegemisch in den Vorratsbehälter der Perfusionsapparatur gegeben. Die Perfusion wurde je nach Auflösungszustand der Leber nach weiteren 19-23 min beendet.

3.3.2.3 Leberzellaufbereitung

Die nach Perfusionsende weiche und brüchige Leber wurde mit den Kanülen in einer Hand fixiert und unter dem abfließenden Perfusionsmedium in ein Becherglas, das dabei leicht geschüttelt wurde, ausgestrichen. Die gewonnene Leberzellsuspension wurde in einen Rundkolben gegeben. Je nach Auflösungsgrad des Zellverbandes wurde die Suspension 1-2 min in einem Wasserbad bei 37°C unter leichten Kreisbewegungen vorsichtig geschüttelt und danach durch eine doppellagige Gaze filtriert, in vier eisgekühlte Zentrifugenröhrchen gefüllt, sofort 5 min bei 4°C und 20 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zwei Waschvorgänge schlossen sich an: Zuerst wurde in jedes Zentrifugenröhrchen 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer mit Albumin pipettiert, auf einem Schüttler kurz mit den Zellen vermischt, 3 min bei 4°C und 20 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dieselbe Vorgehensweise wurde mit Krebs-Henseleit-Puffer ohne Albumin wiederholt. Als letztes wurden die Zellen mit insgesamt 10 ml Krebs-Henseleit ohne Albumin versetzt, vorsichtig geschüttelt und durch eine doppellagige Gaze filtriert. Die ZelldichteEinstellung erfolgte mit weiteren 40-50 ml Krebs-Henseleit-Puffer ohne Albumin auf 77 mg/ml Naßgewicht. Die Leberzellpräparationen wurden nur dann für die Versuche verwendet, wenn die Kaltzellen, die kurz nach der ZelldichteEinstellung von jeder Präparation entnommen wurden, mindestens 85-90 % vitale Zellen, ermittelt mit dem Trypanblautest, aufwiesen.

3.3.3 Durchführung der Inkubation

Je 13 ml der Leberzellsuspension wurden auf Kristallisierschalen verteilt. Pro Leber konnten von hungernden Tieren 5-6 Ansätze und von nicht hungernden Tieren 6-7 Ansätze à 13 ml gewonnen werden. Die Schalen mit einer Wandhöhe von 2 cm wurden in einen mit Aqua dest. gefüllten Rundschüttler gestellt, so daß sich der Wasserspiegel ca. 0,5 cm über der Bodenfläche befand, und mit 70-80 Bewegungen pro min geschüttelt. Die Zellinkubation erfolgte unter wasserdampfgesättigter Luft. Nach einer Vorinkubationszeit von 15-30 min zur langsamen Erwärmung der Suspension von 4°C auf 37°C wurden die Ansätze, wie in den Abschnitten 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben, behandelt und Proben entnommen, die zur Be-

stimmung der unter 3.5 dargestellten Parameter dienen. Insgesamt betrug die Inkubationszeit 270 min.

3.4 Versuchsanordnung

3.4.1 Behandlungen und Probenentnahmen

Zunächst wurde der Einfluß von Hungern ohne weitere Behandlung und der von VPA und der Hydroperoxide CuOOH und t-BuOOH allein bei unterschiedlichen Ernährungszuständen auf die im Abschnitt 3.5 näher beschriebenen Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter der isolierten Hepatozyten untersucht. Bei VPA-Behandlung allein wurde auch der Metabolismus bestimmt. Danach wurden Kombinationsbehandlungen mit VPA und Hydroperoxiden durchgeführt. Zu den mit unterschiedlichen VPA-Konzentrationen behandelten Leberzellen wurde entweder CuOOH oder t-BuOOH in verschiedenen Mengen zugegeben. Diese Behandlungen wurden sowohl in Leberzellen von nicht hungernden als auch hungernden Ratten durchgeführt. Alle in diesem Zeitraum angestellten Versuche wurden als erste Versuchsreihe bezeichnet. Die Behandlung mit VPA erfolgte immer nach der Vorinkubationszeit sofort nach dem Probenentnahmezeitpunkt 0 min. Die Zugabe der Hydroperoxide wurde immer nach 120 min Inkubation sofort nach dem Probenentnahmezeitpunkt 120 min durchgeführt. Im folgenden sind die entsprechenden Probenentnahme- und Behandlungszeitpunkte dargestellt:

	vor der Behandlung Vorinkubationszeit (mittlere Dauer: 28 min)
0 min	Probenentnahme, danach Behandlung mit VPA (0 / 1 / 2,5 / 5 / 10 mM)
60 min	Probenentnahme
120 min	Probenentnahme, danach Behandlung mit CuOOH (0 / 50 / 100 µM) bzw. Behandlung mit t-BuOOH (0 / 200 / 400 µM)
150 min	Probenentnahme
180 min	Probenentnahme
210 min	Probenentnahme
240 min	Probenentnahme
270 min	Probenentnahme

Nach Beendigung der ersten Versuchsreihe wurde zunächst der Einfluß des GSH-Verarmers BrH auf die gewählten Parameter (s. Abschnitt 3.5) in isolierten Hepatozyten bei unterschiedlichen Ernährungszuständen untersucht. Danach wurden Kombinationsbehandlungen mit BrH und VPA durchgeführt. Nach Vorbehandlung mit BrH schloß sich eine Behandlung mit unterschiedlichen VPA-Mengen an. Das erfolgte sowohl in Leberzellen von hungernden als auch in Leberzellen von nicht hungernden Ratten. Alle im Rahmen dieses Zeitabschnittes an-

gestellten Versuche wurden als zweite Versuchsreihe bezeichnet. Die Vorbehandlung mit BrH erfolgte immer sofort nach der Vorinkubationszeit und 15 min vor dem Probenentnahmezeitpunkt 0 min. Die Behandlung mit VPA wurde immer sofort nach dem Probenentnahmezeitpunkt 0 min durchgeführt. Es wurde das nachfolgende Versuchsschema verwendet:

	vor der Behandlung Vorinkubationszeit (Dauer: 15 min)
	Vorbehandlung mit BrH (0 / 500 μ M)
	Vorbehandlungszeit (Dauer: 15 min)
0 min	Probenentnahme, danach Behandlung mit VPA (0 / 1 /10 mM)
30 min	Probenentnahme
60 min	Probenentnahme
120 min	Probenentnahme
150 min	Probenentnahme
180 min	Probenentnahme
210 min	Probenentnahme
240 min	Probenentnahme
270 min	Probenentnahme

Die Vorinkubationszeit diente, wie bereits erwähnt, dazu, die Leberzellsuspension von 4°C langsam auf eine Temperatur von 37°C zu erwärmen. Diese Temperatur wurde in der Regel nach ca. 15 min erreicht. Da alle zur Behandlung genutzten Substanzen immer frisch kurz vor der Behandlung angesetzt wurden, konnte in der ersten Versuchsreihe jedoch erst ca. 10-15 min später mit der Behandlung begonnen werden. Dadurch wurde auch die zeitliche Vergleichbarkeit der Gruppen zwischen beiden Versuchsreihen gewährleistet.

Als Lösungsmittel für CuOOH, t-BuOOH und BrH diente Dimethylformamid (DMFA). Es wurden 1%ige Lösungen hergestellt und der Leberzellsuspension 10 μ l/ml zugegeben. Na-VPA wurde im Inkubationsmedium Krebs-Henseleit-Puffer gelöst und in einer Menge von 100 μ l/ml zugesetzt.² In allen Behandlungsgruppen mit VPA bzw. Prooxidantien allein wurde zu den Behandlungszeitpunkten bei entsprechender Kombinationsbehandlung 10 μ l/ml bzw. 100 μ l/ml Krebs-Henseleit-Puffer zugegeben.

Zu jedem Probenentnahmezeitpunkt wurden 10 μ l Zellsuspension für den Trypanblautest, 100 μ l Zellsuspension zur Bestimmung von MDA und 1000 μ l Suspension, die nach entsprechender Probenaufarbeitung zur Ermittlung der LDH-Freisetzung, des reduzierten GSH, des K⁺- und Na⁺-Gehaltes und der Proteinmenge dienten, entnommen.³ Zu den Probenentnahmezeitpunkten 0 min, 60 min und 270 min wurden ferner je 300 μ l Zellsuspension für die

² Zur Zusammensetzung des Inkubationsmediums siehe Abschnitt 3.6.1.

³ Die genaue Beschreibung der Probenaufbereitung ist im Abschnitt 3.5.1 zu finden.

Untersuchung des VPA-Metabolismus entnommen und sofort bei -20°C ohne vorherige Aufbereitung eingefroren.⁴

Für die Elektronenmikroskopie wurden zusätzliche Versuche durchgeführt. Es erfolgten eine Vitalitätskontrolle mit dem Trypanblautest und die Ermittlung des MDA-Gehaltes. Die Probenentnahmen von je 700 µl wurden zu den Zeitpunkten 0 min, 60 min, 180 min und 270 min durchgeführt.⁵

Von den durchschnittlich sechs aus einer Leber zu gewinnenden Suspensionsansätzen wurde in der Regel nur ein Ansatz, in Ausnahmefällen zwei Ansätze, gleich behandelt. Es wurde in jedem Versuch eine unbehandelte bzw. nur mit dem Lösungsmittel DMFA behandelte Leberzellsuspension als Kontrolle mitgeführt.

3.4.2 Kontroll- und Behandlungsgruppen

Es wurden Versuche mit zwei Hydroperoxiden und BrH zum Auslösen von oxidativem Streß durchgeführt, um Substanzen mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus in die Versuche einzubeziehen und um auszuschließen, daß es sich bei den beobachteten Effekten um stoffspezifische Wirkungen handelt. Darüber hinaus wurde in den Versuchen mit BrH die Bedeutung des GSH-Gehaltes für die Vitalität und Funktionalität der Leberzellen untersucht.

In Vorversuchen wurde der Einfluß verschiedener Konzentrationen einer alleinigen Behandlung von CuOOH, t-BuOOH und BrH auf die Vitalität der Hepatozyten getestet. Für die Versuche wurden nur Konzentrationen verwendet, bei denen noch keine Veränderungen der Vitalitätsparameter festgestellt wurden und keine Lipidperoxidation stattfand. Die Hydroperoxide allein führten darüber hinaus noch nicht zu einer meßbaren Veränderung des GSH-Gehaltes. Bei der Substanz BrH wurde eine Konzentration gewählt, mit der eine größtmögliche und anhaltende GSH-Verarmung ohne Vitalitätseinbußen erzielt werden konnte. Für die Wahl der VPA-Dosierungen wurden vor allem Literaturergebnisse über die zu erwartende VPA-Menge in der Leber nach Behandlung mit der für Ratten effektiven therapeutischen VPA-Dosis⁶ und VPA-Konzentrationen herangezogen, die bei in vitro-Versuchen in isolierten Rattenhepatozyten (ROGIERS et al., 1985) und der perfundierten Rattenleber noch keine hepatotoxischen Effekte zeigten (KELLER et al., 1992). Die Tabellen 3.4-1 und 3.4-2 zeigen alle Kontroll- und Behandlungsgruppen der ersten bzw. zweiten Versuchsreihe. Die Tabellen 3.4-3 und 3.4-4 zeigen, welche Gruppen miteinander verglichen wurden.

⁴ Die Aufbereitung dieser Proben wird im Abschnitt 3.5.2 beschrieben.

⁵ Die weitere Behandlung dieser Proben wird im Abschnitt 3.5.3 beschrieben.

⁶ ALY und ABDEL-LATIF (1980), CHAPMAN et al. (1982), LÖSCHER und NAU (1983), MEIJER und HESSING-BRAND (1973).

Tabelle 3.4-1: Kontroll- und Behandlungsgruppen bei beiden Ernährungszuständen der ersten Versuchsreihe

Gruppen	Substanzen zur Behandlung			Gruppengröße (Vitalitätsparameter)		Ansätze pro Gruppe (GC/MS)	
	VPA in mM	CuOOH in μ M	t-BuOOH in μ M	ohne Hungern	mit Hungern	ohne Hungern	mit Hungern
Kontrollgruppen (Krebs-Henseleit-Kontrolle und DMFA-Kontrolle)							
KV	Krebs	Krebs		6	9	-	-
KCT	Krebs	DMFA		6	8	-	-
Prooxidantiengruppen							
C50	Krebs	50	-	6	6	-	-
C100	Krebs	100	-	5	9	-	-
T200	Krebs	-	200	1	5	-	-
T400	Krebs	-	400	6	7	-	-
VPA-Gruppen							
V1	1	Krebs		6	8	5	6
V2,5	2,5	Krebs		-	6	-	-
V5	5	Krebs		6	7	6	5
V10	10	Krebs		7	8	5	4
VPA-Prooxidantien-Kombinationsgruppen							
V1C50	1	50	-	-	6	-	-
V1C100	1	100	-	6	7	5	5
V1T400	1	-	400	6	7	6	7
V2,5C50	2,5	50	-	-	5	-	-
V2,5C100	2,5	100	-	-	5	-	-
V5C50	5	50	-	5	6	-	-
V5C100	5	100	-	8	11	6	5
V10C50	10	50	-	8	9	5	5
V10C100	10	100	-	10	11	5	8
V10T200	10	-	200	6	6	5	5
V10T400	10	-	400	7	7	6	6

Tabelle 3.4-2: Kontroll- und Behandlungsgruppen bei beiden Ernährungszuständen der zweiten Versuchsreihe

Gruppen	Substanzen zur Behandlung		Gruppengröße (Vitalitätsparameter)		Ansätze pro Gruppe (GC/MS)	
	BrH in μM	VPA in mM	ohne Hungern	mit Hungern	ohne Hungern	mit Hungern
Kontrollgruppe (DMFA-Kontrolle)						
KB	DMFA	Krebs	6	6	-	-
Prooxidantiengruppe						
B500	500	Krebs	6	6	-	-
VPA-Prooxidantien-Kombinationsgruppen						
B500V1	500	1	6	6	6	6
B500V10	500	10	6	5	6	5

Tabelle 3.4-3: Vergleichsgruppen für die Ermittlung der Einflüsse auf die Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter und den VPA-Metabolismus ohne und mit Hungern

	Versuchsgruppen ohne Hungern		Versuchsgruppen mit Hungern	
Einfluß von Prooxidantien				
1. Versuchsreihe	KCT	C50	KCT	C50
	KCT	C100	KCT	C100
			KCT	T200
	KCT	T400	KCT	T400
2. Versuchsreihe	KB	B500	KB	B500
Einfluß von VPA				
1. Versuchsreihe	KV	V1	KV	V1
			KV	V2,5
	KV	V5	KV	V5
	KV	V10	KV	V10
Einfluß von Prooxidantien bei VPA-Prooxidantien-Kombinationen				
1. Versuchsreihe	V1	V1 C50	V1	V1C50
	V1	V1 C100	V1	V1C100
			V2,5	V2,5C50
			V2,5	V2,5C100
	V5	V5C50	V5	V5C50
	V5	V5C100	V5	V5C100
	V10	V10C50	V10	V10C50
	V10	V10C100	V10	V10C100
	V1	V1T400	V1	V1T400
	V10	V10T200	V10	V10T200
	V10	V10T400	V10	V10T400
2. Versuchsreihe	V1	B500V1	V1	B500V1
	V10	B500V10	V10	B500V10
Einfluß von VPA bei VPA-Prooxidantien-Kombinationen				
1. Versuchsreihe			C50	V1C50
			C50	V2,5C50
	C50	V5C50	C50	V5C50
	C50	V10C50	C50	V10C50
	C100	V1C100	C100	V1C100
			C100	V2,5C100
	C100	V5C100	C100	V5C100
	C100	V10C100	C100	V10C100
			T200	V10T200
	T400	V1T400	T400	V1T400
	T400	V10T400	T400	V10T400
2. Versuchsreihe	B500	B500V1	B500	B500V1
	B500	B500V10	B500	B500V10

Tabelle 3.4-4: Vergleichsgruppen für die Ermittlung des Einflusses des Ernährungszustandes auf die Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter und den VPA-Metabolismus

	Versuchsgruppen ohne Hungern	Versuchsgruppen mit Hungern
Einfluß von Hungern - Kontrollgruppen		
1. Versuchsreihe	KV	KV
1. Versuchsreihe	KCT	KCT
2. Versuchsreihe	KB	KB
Einfluß von Hungern - Prooxidantiengruppen		
1. Versuchsreihe	C50	C50
	C100	C100
	T400	T400
2. Versuchsreihe	B500	B500
Einfluß von Hungern - VPA-Gruppen		
1. Versuchsreihe	V1	V1
	V5	V5
	V10	V10
Einfluß von Hungern - Kombinationsgruppen		
1. Versuchsreihe	V5C50	V5C50
	V10C50	V10C50
	V1C100	V1C100
	V5C100	V5C100
	V10C100	V10C100
	V1T400	V1T400
	V10T200	V10T200
	V10T400	V10T400
2. Versuchsreihe	B500V1	B500V1
	B500V10	B500V10

3.5 Parameter

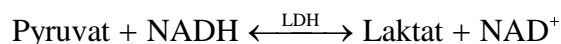
3.5.1 Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter

3.5.1.1 Trypanblautest

Zu jedem Probenentnahmezeitpunkt wurden je Ansatz 10 µl der Zellsuspension in 100 µl 0,2 %iger Trypanblaulösung angefärbt. Die Zellzählung erfolgte lichtmikroskopisch mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bei 150facher Vergrößerung, wobei mindestens 300 Zellen nach gleichem Schema ausgezählt wurden und der prozentuale Anteil der nicht gefärbten vitalen Zellen ermittelt wurde.

3.5.1.2 Laktatdehydrogenase (LDH)

Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand von 1 ml Zellsuspension nach Zentrifugation (5 s bei 20 g) erfolgte mittels eines Monotests für automatisierte und manuelle Analysen nach einer „Optimierten Standard-Methode“ der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie nach folgendem Testprinzip:



Die Messung des NADH, das nach Probenzugabe durch LDH katalysiert aus Laktat und NAD^+ entsteht, erfolgte spektralphotometrisch in Acrylküvetten (Reduzierküvette mit 1 cm Schichtdicke) bei 340 nm im ultravioletten Spektralbereich und bei einer Temperatur von 25°C.

Die Proben wurden sofort nach der Gewinnung im Kühlschrank bei 4°C bis zur Messung am Versuchstag aufbewahrt, so daß ein Aktivitätsverlust, der im Serum nach drei Tagen mit 8 % (bei 4°C) angegeben wird, nicht auftreten konnte. Die Proben zur Messung der Gesamt-LDH-Aktivität wurden durch Zellmembranlyse nach Zugabe von 100 µl 10%igem Triton X 100® zu 1 ml Kaltleberzellsuspension vor Abzentrifugation des Zelldetritus gewonnen. Der Überstand der Proben wurde 1:11 und der der Triton-X-100®-Proben 1:21 mit Aqua dest. verdünnt. Je 30 µl wurden kurz vor der Messung mit 750 µl Reagenz des Monotests vermischt. Die LDH-Aktivität wurde auf mg Leberzellen bezogen (mU/mg Zellen).

3.5.1.3 Intrazelluläres Kalium (K^+) und Natrium (Na^+)

Der intrazelluläre K^+ - und Na^+ -Gehalt wurde flammenphotometrisch bestimmt. Zunächst wurde das durch die unter 3.5.1.2 beschriebene Zentrifugation gewonnene Zellpellet zweimal mit Trispuffer (150 mM) gewaschen und jeweils zentrifugiert (5 s bei 20 g). Das gewonnene Zellpellet wurde dann mit 1 ml eiskalter Perchlorsäure (1 n) gefällt, erneut zentrifugiert (10 s, 10000 g) und der K^+ - und Na^+ -Gehalt im Perchlorsäureüberstand ermittelt. Die Proben wurden bei -20°C bis zur Messung innerhalb einer Woche nach dem Versuch aufbewahrt. Die Werte wurden auf das Zellwasser bezogen, da dies proportional zum Zellproteingehalt ist

(mmol/l Zellwasser (ZW)). UNGEMACH (1982) ermittelte einen hepatozellulären Wassergehalt bei Ratten von $2,4 \pm 0,08 \mu\text{l/mg Protein}$.

3.5.1.4 Reduziertes Glutathion (GSH)

Die Bestimmungsmethode beruht auf einer enzymatischen Reaktion von reduziertem GSH und 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) zu 2-Carboxy-4-Nitrobenzothiol-Anion (KAKÁ• und VEJD•LEK, 1974). Letzteres ist gelb gefärbt und entsteht proportional zur Menge der umgesetzten Ausgangsstoffe.

Die Messung des reduzierten GSH erfolgte im Perchlorsäureüberstand, der wie unter 3.5.1.3 beschrieben gewonnen wurde. Von diesem Perchlorsäureüberstand wurden 250 μl zu 640 μl Phosphatpuffer nach Sörensen (0,1 M), der zuvor mit 110 μl tri-Kaliumphosphat-7-hydrat-Lösung (1,75 M) versetzt wurde, gegeben. Nach dem Zusatz von 50 μl DTNB-Reagenz wurde der entstehende Niederschlag bei 10000 g in 5 min abzentrifugiert und nach weiteren 5 min bei 412 nm photometrisch im sichtbaren Bereich mit Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) im Überstand gegen den Leerwert gemessen. Der Gehalt der Zellen an reduziertem GSH wurde mittels vier Punkte umfassender Eichkurven (31,25-250 $\mu\text{mol/l}$ GSH-Standard) berechnet. Es wurden bei jedem Versuch zwei Eichkurven mitgeführt und der Mittelwert bestimmt. Der GSH-Gehalt wurde in mmol/l Zellwasser (ZW) angegeben.

3.5.1.5 Malondialdehyd (MDA)

Die Lipidperoxidation wurde nach einer Methode von OHKAWA et al. (1979) bestimmt. Es erfolgte die Messung von MDA, einem Abbauprodukt von peroxidierten Fettsäuren, das nach einstündiger Inkubation bei 95°C in einem sauren Reagenz mit Thiobarbitursäure einen roten Komplex bildet, der bei 532 nm sein Extinktionsmaximum hat. Hierzu wurden 100 μl der Zellsuspension in 2 ml eines vor Versuchsbeginn vorbereiteten MDA-Reagenzes gegeben. Das Reagenz selbst diente als Leerwert, und 1,1,3,3-Tetramethoxypropan wurde als externer Standard genutzt (12,5-50 nmol/ml). Der MDA-Gehalt wurde in nmol/mg Zellen (Naßgewicht) angegeben.

3.5.1.6 Protein

Der Proteingehalt isolierter Hepatozyten wurde mit einer von GORNALL et al. (1949) modifizierten Biuretmethode bestimmt. Das nach der Perchlorsäurefällung und Zentrifugation vorhandene Zellpellet (s. Abschnitt 3.5.1.3) wurde in 1 ml Aqua dest. mit einem Ultraschallstab resuspendiert. Zu 750 μl Biuretreagenz wurden 100 μl dieser Zellsuspension gegeben, 30 min geschüttelt und bei 546 nm der entstandene Biuretkomplex gegen das Reagenz spektral-photometrisch gemessen (E_1). Durch Zugabe von 20 μl einer aus 0,3 mg Kaliumcyanid und 2 ml Natronlauge (1 n) bestehenden Lösung wurde der Farbkomplex entfärbt und 15 min später nochmals die Extinktion ermittelt (E_2). Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte

aus der Extinktionsdifferenz ($E_1 - E_2$) anhand des Mittelwertes aus zwei mitgeführten Eichkurven, wobei Rinderserumalbumin als Standard diente (5-20 mg/ml).

3.5.2 VPA- und Metabolitenbestimmung mit Hilfe der Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

3.5.2.1 Extraktion und Derivatisierung

Die Bestimmung erfolgte mit einer modifizierten Methode nach FISHER et al. (1992b). Diese erlaubt die Detektion von VPA und 14 ihrer Metaboliten. Zunächst wurden die Stichproben der Leberzellsuspensionen entsprechend der zu erwartenden VPA- bzw. Metabolitenmengen mit Natriumphosphatpuffer (pH 8) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 20 µl in Eppendorfgefäßen (1,5 ml) pipettiert und mit Aqua dest. ad 200 µl aufgefüllt. Diese Proben wurden dann mit 50 µl Natriumphosphatpuffer (pH 5) und danach mit 1 ml Ethylacetat, das 0,5 µg des internen Standards 2-Ethyl-2-Methyl-Caprinsäure (MEC) enthält, versetzt. Nach einer ersten Schüttelperiode wurden die Proben 2 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand in ein Bestimmungsgefäß überpipettiert. Der Überstand wurde unter Stickstoffbegasung bis auf ca. 100 µl eingedampft. Die Extraktion wurde mit 1 ml Ethylacetat wie oben beschrieben wiederholt. Der Überstand wurde mit 100 µl Acetonitril versetzt und unter Stickstoffbegasung aufkonzentriert. Der verbleibende Rückstand (ca. 20 µl) wurde mit 30 µl Pyridin und 30 µl N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) zur Bildung von Trimethylsilylderivaten behandelt. Die Probengefäße wurden dicht verschlossen und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Blindproben, VPA- und Metabolitenstandards sowie mit VPA- und Metabolitenstandards versetzte Leberzellsuspensionen wurden mit jeder Messung mitgeführt. Zur Blindwertermittlung dienten nicht dotierte Leberzellsuspensionen. Alle Standards und Blindproben wurden wie oben beschrieben extrahiert.

Um den Anteil konjugierter Metaboliten bestimmen zu können, wurden je 20 µl derselben Leberzellsuspensionsverdünnung ebenfalls mit Aqua dest. bis 200 µl aufgefüllt und mit 50 µl Natriumphosphatpuffer (pH 5) versetzt. Die Proben erhielten je 10 µl β -Glucuronidase-Arylsulphatase und wurden dann eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit den oben aufgeführten Extraktionen fortgefahren.

3.5.2.2 Analyse und Quantifizierung

Aliquots von 1 µl jeder Probe wurden „splitless“ in das GC/MS-System injiziert. Die Trennung der Derivate von VPA und der Metaboliten erfolgte gaschromatographisch unter Verwendung eines einfachen Temperaturprogramms auf „fused silica“-Kapillarsäule mit einer Filmdicke von 1 µm. Als Trägergas diente Helium mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml/min. Die Initialtemperatur von 110°C wurde 4 min aufrechterhalten und dann mit 20°C/min auf eine Temperatur von 220°C erhöht. Die Injektortemperatur betrug 220°C.

Die Massenspektrometeranalysen wurden im EI-Modus („electron impact“-Ionisierungsmethode oder Massenfragmentographie) bei 70 eV Elektroenergie durchgeführt und die Ionen im SIM-Modus (Einzelionendetektion) detektiert. Die totale Laufzeit betrug 15 min. Die Steuerung des Massenspektrometers und die Erfassung und Auswertung der Meßdaten erfolgten mit einem Datenerfassungs- und Verarbeitungssystem.

3.5.2.3 Standards und Wiederfindung in der Leberzellsuspension

Nach FISHER et al. (1992b) waren die Kalibrierungskurven im untersuchten Konzentrationsbereich von 1 µg/ml bis 120 µg/ml für VPA und von 0,01 µg/ml bis 20 µg/ml für VPA-Metaboliten linear. Es wurde daher im Rahmen dieser Arbeit nur untersucht, ob im zu erwartenden Meßbereich ein linearer Zusammenhang zwischen der VPA- und Metabolitenkonzentration und dem GC/MS-Signal (Ratiowert=Peakfläche von VPA bzw. Metaboliten/Peakfläche des internen Standards) besteht und welchen Einfluß das Medium Leberzellsuspension hat. Es wurde für VPA eine Standardlösung mit 87 µg/ml verwendet. Für die Metabolitenstandardlösungen werden stellvertretend hier dargestellt: 4-en-VPA: 72,6 µg/ml, 2-en-VPA: 103,3 µg/ml, 4-OH-VPA: 47,6 µg/ml, 5-OH-VPA: 47,7 µg/ml. Die entsprechend eingewogenen Standards und die mit Standardlösungen aufgestockten Leberzellsuspensionen wurden wie im Abschnitt 3.5.2.1 beschrieben aufbereitet. Von den gewählten jeweils 7 Meßpunkten wurden je 3 Proben für jede Substanz aufgearbeitet, mit der GC/MS-Anlage gemessen und der Korrelationskoeffizient errechnet (s. Tabelle 3.5-1).

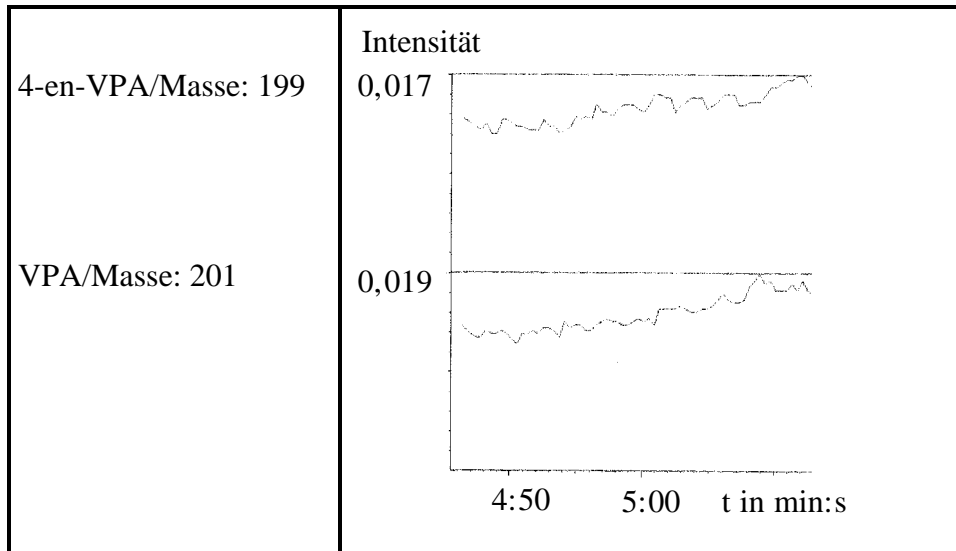
Tabelle 3.5-1: Linearität im Meßbereich

		Masse/ Ladung m/z	Meßbereich (µg/ml)		Korrelations- koeffizient
			von	bis	
Standardlösung	VPA	201	2	20	0,997
	4-en-VPA	199	0,01	0,21	0,981
	2-en-VPA	199	0,02	0,30	0,998
	4-OH-VPA	199	0,01	0,14	0,990
	5-OH-VPA	289	0,01	0,14	0,992
Leberzellsuspension dotiert mit	VPA	201	2	20	0,998
	4-en-VPA	199	0,01	0,21	0,976
	2-en-VPA	199	0,02	0,30	0,994
	4-OH-VPA	199	0,01	0,14	0,996
	5-OH-VPA	289	0,01	0,14	0,985

In der Abbildung 3.5-1 ist ein Beispielchromatogramm einer Blindprobe der Leberzellsuspension dargestellt, die mit jeder Messung mitgeführt wurde. Es ist die Blindprobe der VPA- und

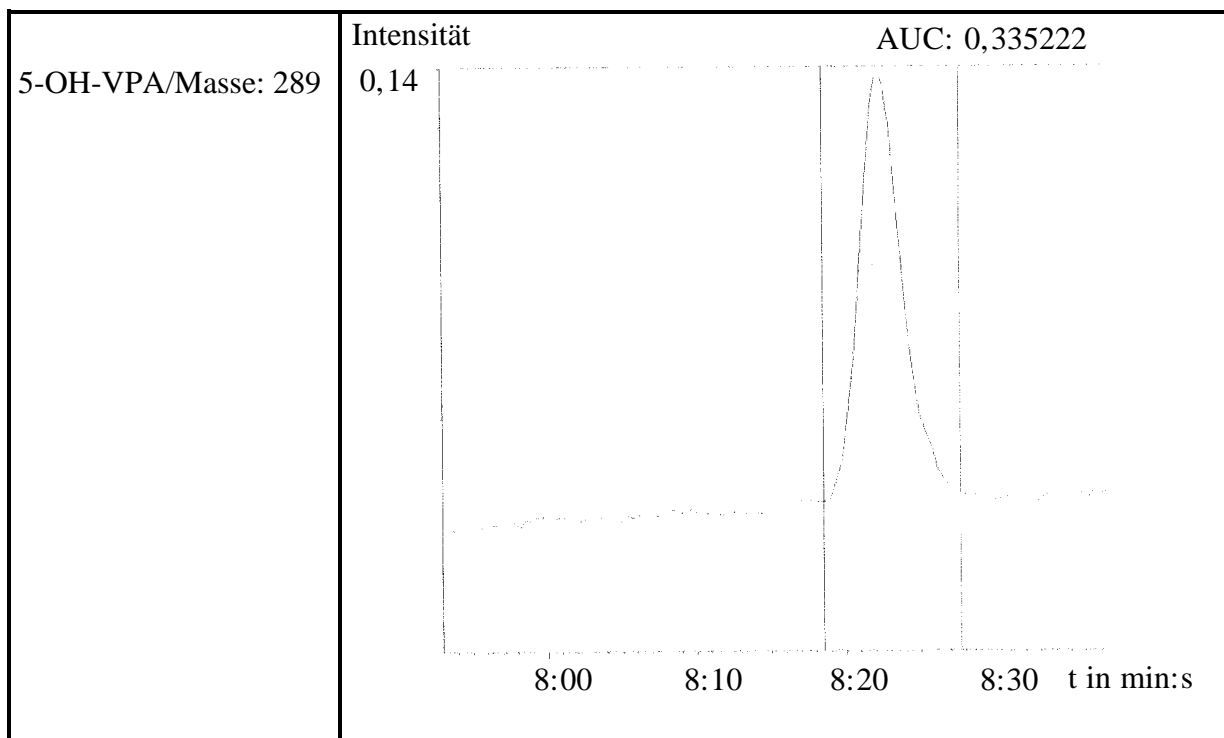
4-en-VPA-Spur zu sehen. Für alle anderen Metaboliten-Spuren wurden vergleichbare Chromatogramme festgestellt.

Abbildung 3.5-1: Chromatogramm einer Blindprobe der Leberzellsuspension (VPA-, 4-en-VPA-Spur)



Die Abbildung 3.5-2 zeigt anhand eines Beispielchromatogramms einer Standardprobe von 5-OH-VPA die neben den ermittelten Peaks aller Standard- und Meßproben vorhandene Basislinie ohne Störpeaks.

Abbildung 3.5-2: Chromatogramm einer Standardprobe von 5-OH-VPA (Einwaage: 0,092 µg/ml) und Basislinie



Die Tabelle 3.5-2 enthält die Wiederfindung von VPA und Metaboliten in der Leberzellsuspension für jeweils 7 aufgeführte Meßpunkte.

Die Abbildung 3.5-3 zeigt repräsentative Chromatogramme von jeweils einer eingesetzten Menge der Standardlösungen von VPA bzw. Metaboliten. Die Abbildung 3.5-4 zeigt repräsentative Chromatogramme von jeweils einer eingesetzten Menge der mit VPA bzw. Metaboliten aufgestockten Leberzellsuspensionen.

3.5.2.4 Präzision und Genauigkeit

Für die Bestimmung der Präzision und Genauigkeit der Methode wurde eine Standardlösung von VPA mit 87 µg/ml verwendet. Zur Ermittlung des Gesamtfehlers bei der Aufarbeitung und Messung der Proben wurden Leberzellsuspensionen fünfmal mit derselben eingewogenen Menge dieser Standardlösung aufgestockt und, wie in den Abschnitten 3.5.2.1 und 3.5.2.2 beschrieben, aufgearbeitet und gemessen. Für die Feststellung der Meßgenauigkeit des Gerätes wurde eine dieser so aufbereiteten Proben fünfmal nacheinander gemessen (s. Tabelle 3.5-3).

Tabelle 3.5-2: Wiederfindung von VPA und Metaboliten in der Leberzellsuspension

VPA	Einwaage in µg/ml*	2,190	4,394	6,757	8,787	10,948	12,818	16,907
	Wiederfindung in %*	84,61	90,41	93,05	96,31	102,34	100,21	101,45
	s in %	10,53	8,94	5,42	2,39	5,68	6,19	6,93
	VK in %	12,44	9,88	5,82	2,48	5,55	6,17	6,83
4-en	Einwaage in µg/ml*	0,019	0,036	0,074	0,104	0,136	0,179	0,207
	Wiederfindung in %*	53,49	98,03	114,19	102,82	98,65	113,33	125,47
	s in %	0,88	18,82	10,01	12,82	5,91	5,41	10,95
	VK in %	1,64	19,19	8,77	12,47	5,99	4,78	8,73
2-en	Einwaage in µg/ml*	0,026	0,051	0,102	0,148	0,197	0,257	0,292
	Wiederfindung in %*	99,43	93,80	95,78	100,47	103,37	105,39	92,30
	s in %	11,51	14,53	7,61	8,06	3,58	10,36	13,68
	VK in %	11,57	15,48	7,95	8,03	3,47	9,83	14,82
4-OH	Einwaage in µg/ml*	0,012**	0,024	0,047	0,068	0,090	0,118	0,133
	Wiederfindung in %*	148,94**	75,73	104,07	83,48	92,44	78,34	83,69
	s in %	-**	10,75	6,45	6,71	9,40	9,66	10,95
	VK in %	-**	14,19	6,19	8,03	10,17	12,32	13,08
5-OH	Einwaage in µg/ml*	0,013	0,024	0,048	0,066	0,091	0,118	0,135
	Wiederfindung in %*	98,16	94,96	95,93	77,60	101,88	81,01	77,54
	s in %	13,21	8,63	3,02	11,97	7,31	11,50	8,81
	VK in %	13,45	9,09	3,14	15,43	7,17	14,19	11,36

* Mittelwert \bar{x} von n=3

** nur bei einer Probe gemessen

Tabelle 3.5-3: Gesamtfehler und Meßgenauigkeit des Gerätes

mit VPA aufgestockte Leberzellsuspension	Gesamtfehler*	Meßgenauigkeit des Gerätes**
Einwaage in µg/ml (\bar{x})	8,932	8,918
Meßwert in µg/ml (\bar{x})	8,962	8,891
s in µg/ml	0,069	0,316
VK in %	0,766	3,557

* fünf Proben mit gleicher Einwaage jeweils einmal gemessen

** eine Probe fünfmal gemessen

Abbildung 3.5-3: Chromatogramme von Standardlösungen von VPA, 4-en-VPA, 2-en-VPA, 4-OH-VPA und 5-OH-VPA und des internen Standards MEC (Der Metabolit 4-OH-VPA wird immer als Doppelppeak detektiert, der größte Peak wird verwendet.)

MEC/Masse: 215	VPA/Masse: 201	4-en-VPA/Masse: 199	2-en-VPA/Masse: 199	4-OH-VPA/Masse: 199	5-OH/Masse: 289
Einwaage in µg/ml	6,699	0,137	0,198	0,090	0,092
Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC
5,646 22,4587	3,079 14,8812	0,097 0,247242	0,147 0,376537	0,109 0,112572	0,14 0,335222
t in min:s	t in min:s	t in min:s	t in min:s	t in min:s	t in min:s

Abbildung 3.5-4: Chromatogramme von aufgestockten Leberzellsuspensionen mit VPA, 4-en-VPA, 2-en-VPA, 4-OH-VPA und 5-OH-VPA und des internen Standards MEC (Der Metabolit 4-OH-VPA wird immer als Doppelpeak detektiert, der größte Peak wird verwendet.)

MEC/Masse: 215	VPA/Masse: 201	4-en-VPA/Masse: 199	2-en-VPA/Masse: 199	4-OH-VPA/Masse: 199	5-OH/Masse: 289
Einwaage/Meßwert in µg/ml	6,829 / 6,447	0,136 / 0,140	0,197 / 0,209	0,088 / 0,088	0,091 / 0,088
Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC
5,814 23,008	3,067 15,503	0,076 0,311529	0,122 0,374087	0,088 0,1079	0,128 0,31263
t in min:s	t in min:s	t in min:s	t in min:s	t in min:s	t in min:s

3.5.3 Elektronenmikroskopie

Von der frischen Leberzellsuspension wurden 700 µl 1 min bei 20 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellsediment wurde mit 2,5%igem Glutardialdehyd in 0,1 ml Cacodylatpuffer überschichtet und fixiert und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Danach wurde das Zellpellet zweimal in 0,1 ml Cacodylatpuffer gewaschen und mit 1%igem Osmiumtetroxid im gleichen Puffer für 1 h nachfixiert. Anschließend wurde gewaschen, in 2%iger wässriger Uranylacetatlösung 90 min kontrastiert und wieder gewaschen. Nach der Entwässerung in einer Ethanolreihe und Propylenoxid wurden die Zellen in Epon 812 eingebettet. Nach einer Vorauswahl an Semidünnschnitten wurden Ultradünnschnitte mit einem Ultramikrotom hergestellt. Die Dünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert und in einem Elektronenmikroskop bei 50 KV und Primärvergrößerungen von 3000fach bis 50000fach untersucht.

3.6 Verwendete Materialien

3.6.1 Lösungen, Puffer und Collagenasen

Tabelle 3.6-1: Hanks (Gebrauchslösung), Perfusionsmedium für die Leber (pH 7,4)

Substanz	Menge in mmol/l
KCL	5,36
MgSO ₄	0,81
NaCl	136,89
NaHCO ₃	17,85
Na ₂ HPO ₄	0,42

Tabelle 3.6-2: Krebs-Henseleit (Gebrauchslösung), Inkubationsmedium für Hepatozyten (pH 7,4)

Substanz	Menge in mmol/l
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	2,5
Hepes	20,98
KCl	4,69
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	1,2
NaCl	118,5

Tabelle 3.6-3: Collagenasen

Herstellerfirma	Aktivität in U/mg Lyophilisat	Menge für 1 Leber in mg
Boehringer	ca. 0,22	20
Sigma	ca. 500	9-10

Tabelle 3.6-4: Phosphatpuffer nach Sørensen 0,1 M (pH 8)

Puffer	Menge in mol/l	Menge in ml/l
Na ₂ HPO ₄	0,1	969
KH ₂ PO ₄	0,1	31

Tabelle 3.6-5: Phosphatpuffer nach Sørensen 0,5 M (pH 6,9)

Puffer	Menge in mol/l	Menge in ml/l
Na ₂ HPO ₄ (0,5 M)	0,5	552
KH ₂ PO ₄ (0,5 M)	0,5	448

Tabelle 3.6-6: DTNB-Reagenz (pH 6,9)

Substanz	Menge in mmol/l	Menge in g/l
DTNB in Phosphatpuffer nach Sørensen (0,5 M)	10	3,96

Tabelle 3.6-7: MDA-Reagenz

Substanz	Menge in mmol/l	Menge in µl pro Probe
Essigsäure, 20%ig, pH 3,5	3330	790
2-Thiobarbitursäure, 0,8%ig, pH 3,5	55,5	790
Butylhydroxytoluol in Ethanol, 0,22%ig	13,4	53
Aqua dest.	-	260
Sodiumdodecylsulfat 8,1%ig	280,4	110

Tabelle 3.6-8: Biuretreagenz (Stammlösung)

	Menge in mmol/l	Menge in g/l
KNa-Tartrat	31,89	9
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	12,02	3
KJ	30,1	5
NaOH-Plätzchen	200	8

Tabelle 3.6-9: Biuretreagenz (Gebrauchslösung)

	Menge in ml/l
Biuretreagenz (Stammlösung)	666,6
Aqua dest.	266,6
NaOH (1 n)	66,6

3.6.2 Substanzen und Chemikalien

Chemikalie	Firma
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Albumin, bovines	Sigma, Deisenhofen
Bleicitrat	Fluka AG, Buchs
1-Bromheptan	Aldrich, Steinheim
tert-Butylhydroperoxid	Sigma, Deisenhofen
Butylhydroxytoluol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Cacodylsäure, Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Collagenase, Clostridiopeptidase A, EC 3.4.24.3 aus Clostridium histolyticum	Boehringer, Mannheim
Collagenase, Clostridiopeptidase A, EC 3.4.24.3 aus Clostridium histolyticum	Sigma, Deisenhofen
Cumolhydroperoxid	Sigma, Deisenhofen
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)	Sigma, Deisenhofen
Epon 812	Serva, Heidelberg
Essigsäure, 20 %	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ether pro narcosi	Hoechst, Frankfurt/Main
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
2-Ethyl-2-Methyl-Caprinsäure	Fluka, Neu-Ulm; U. Bojic, Institut für Toxikologie und Embryopharmakologie, FU Berlin
β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus Helix pomatia	Boehringer, Mannheim
Glutardialdehydlösung, 25 %	Merck, Darmstadt
Glutathion, reduziertes	Sigma, Deisenhofen
Heparin, Liquemin® N, 25.000 I.E.	Hoffmann La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Hepes	Sigma, Deisenhofen
LDH-Test-Kit, LDH optimiert, MPR 3, Nr. 1442619	Boehringer, Mannheim
Lithiumstammlösung zur Eichung des Flammenphotometers	Eppendorf, Hamburg
N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid	Pierce, Günter Karl OHG, Geisenheim
NaOH-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt
Perchlorsäure, 60%	Merck, Darmstadt
Perfluorkerosin	Merck, Darmstadt
Propylenoxid	Serva, Heidelberg
Pyridin, getrocknet, max. 0,01 % H ₂ O	Merck, Darmstadt
Salze, Kalium-, Kupfer-, Magnesium-, Natriumsalze	Merck, Darmstadt

Salzsäure, rauchend, 37 %	Merck, Darmstadt
Serumstandardlösung zur Eichung des Flammenphotometers	Eppendorf, Hamburg
Sodiumdodecylsulfat	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
1,1,3,3-Tetramethoxypropan	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
2-Thiobarbitursäure	Serva, Heidelberg
Tris (Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan)	Merck, Darmstadt
Triton X 100®	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Uranylacetat	Lachema, Brno
VPA, Natriumsalz	Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg
VPA-Metaboliten	H. Schäfer, Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg; T. Baillie, Seattle, USA; B. Abbott, Vancouver, B.C., Kanada; U. Bojic, R.-S. Hauck, Institut für Toxikologie und Embryo- pharmakologie, FU Berlin

3.6.3 Geräte und Material

Geräte und Material	Firma
Analysenwaage, 2004 MP	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage, AE 166	Mettler, Gießen
DP 10 Datenerfassungs- und Verarbeitungssystem	AMD-Intectra, Deutschland
Elektronenmikroskop, EM 109	Zeiss, Deutschland
Eppendorfpipetten	Eppendorf, Hamburg
Exsikkator, Ether-Narkose-Glocke	Schmid, Berlin
Flammenphotometer, Elex 6361	Eppendorf, Hamburg
„fused silica“-Kapillarsäule, a 60 m x 0,53 mm mit gebundener Phase, Rtx-1701, 14 % Cyanopropyl-Phenyl-Methylpolysiloxan	Restek-GmbH, Deutschland
Gaschromatograph, F-22	Perkin Elmer, Deutschland
Kühlzentrifuge	Sorvall, Bad Homburg
Massenspektrometer, MAT CH-7A	Finnigan, Deutschland
Perfusionsanlage	Krannich KG, Göttingen
Schlauchpumpe, Favorit	Deuster, München
Schüttelgerät, Vortex-Genie	Winn, USA
Schüttelwasserbad, Gyrotory® water bath shaker, Model G76	New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, N.J., USA
Spectralphotometer, Ultrospec III	Pharmacia, Freiburg
Tischzentrifuge, 5415 C	Eppendorf, Berlin
Ultramikrotom, Ultratom III	LKB, Schweden
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen

3.7 Versuchsauswertung und Statistik

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß verschiedener Prooxidantien und von VPA auf isolierte Hepatozyten von ad libitum gefütterten und hungernden Ratten durch den Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgruppen (DMFA-Kontrolle, Krebs-Henseleit-Kontrolle) untersucht. Es wurde der Einfluß von Prooxidantien bzw. VPA bei kombinierter VPA-Prooxidantien-Behandlung auf Leberzellen bei beiden Ernährungszuständen durch den Vergleich mit den nur mit VPA bzw. Prooxidantien behandelten Gruppen ermittelt. Von besonderer Bedeutung war bei allen Gruppen die Feststellung des Einflusses von Hungern. Die Vergleichsgruppen sind im Abschnitt 3.4.2 in den Tabellen 3.4-3 und 3.4-4 aufgeführt.

Es wurde zunächst für alle Stichproben mit dem KOLMOGOROV-SMIRNOV-Anpassungstest untersucht, ob eine Normalverteilung der zu vergleichenden Größen vorliegt. Des weiteren wurde mittels Boxplots überprüft, ob die Behandlungsgruppen pro Untersuchungszeitpunkt eine gleichmäßige Verteilung aufwiesen. Da nicht in jedem Fall eine Normalverteilung und eine gleichmäßige Verteilung vorlagen, wurde zur Feststellung von signifikanten Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen hinsichtlich der Vitalität, Funktionalität und des VPA-Metabolismus der Leberzellen ein parameterfreies Verfahren, der MANN-WHITNEY-TEST (U-TEST), eingesetzt (LOZÁN, 1992). Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Programms WinSTAT 3.1 (Kalmia Company Inc., Cambridge, MA, USA). Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit 5 % festgelegt. In den Graphiken sind für die Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter die arithmetischen Mittelwerte der gemessenen Einzelwerte und für den VPA-Metabolismus der Einzelwerte in Prozent der VPA-Ausgangsdosis dargestellt. In den Tabellen im Anhang (s. Kapitel 9) sind zusätzlich die Standardabweichungen aller untersuchten Gruppen angegeben. Im Sinne der beschreibenden Statistik erfolgte in den Graphiken die Angabe der Überschreitungswahrscheinlichkeiten sowohl von $p < 0,05$ als auch von $p < 0,01$. Die nachfolgende Tabelle zeigt die in allen Graphiken für die entsprechenden Vergleiche verwendeten Symbole für die p-Werte.

Tabelle 3.7-1: Verwendete Zeichen für die p-Werte in den Graphiken

Einfluß von:	Irrtumswahrscheinlichkeit	
	$p < 0,05$	$p < 0,01$
Prooxidantien	*	**
VPA	o	oo
Hungern	•	••

4 Ergebnisse

4.1 Zoologische, zotechnische und versuchsbedingte Parameter

Die genaue Aufzeichnung aller wichtigen Parameter der verwendeten Tiere und während der Versuche diente dazu, die Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwei Jahren zu überprüfen. Durch die Länge der Versuchsperiode können Schwankungen in der Qualität von Fütterung und Haltung und in der Qualität des Tiermaterials trotz grundsätzlich gleichbleibender Fütterungs-, Haltungs- und Zuchtbedingungen nicht vollkommen vermieden werden. Ebenfalls können zirkadiane Rhythmen und jahreszeitlich bedingte Einflüsse auf die Versuche nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher wurden die Versuche mit und ohne Hungern möglichst über alle Monate gestreut, was allerdings aus versuchstechnischen Gründen nicht immer zu realisieren war. Die Auswirkungen waren vor allem bei dem metabolischen Parameter intrazellulärer GSH-Gehalt der Leberzellen zu beobachten.

4.1.1 Versuchstiere und Versuchsanordnung

Der Ernährungszustand beeinflusste sowohl das Gewicht der Ratten als auch das Lebergewicht. So wurde mit 20 h Hungern eine signifikante Gewichtsreduzierung von 10 % und eine signifikante Lebergewichtsverminderung von 24 % im Vergleich zu den ad libitum gefütterten Ratten festgestellt.

Tabelle 4.1-1: Arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (s) der ermittelten Versuchs- und Versuchstierparameter am Versuchstag

	ohne Hungern		mit Hungern	
Versuchstierzahl	20		41	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Gewicht der Tiere in g	284,1**	18,7	257,1**	25,7
Gewicht der Leber in g	15,2**	1,5	11,6**	1,5
Narkosedauer in min	4	2,1	4	1,6
Operationsdauer in min	16	2,0	18	4

** signifikanter Unterschied zwischen ohne und mit Hungern ($p < 0,01$)

4.1.2 Leberperfusion und Inkubation

Die Tabelle 4.1-2 zeigt, daß die Bedingungen während der Perfusion und Inkubation konstant gehalten werden konnten. Wie ersichtlich, hatte der Ernährungszustand keinen Einfluß. Es wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt.

Tabelle 4.1-2: Arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (s) der während der Gewinnung der Leberzellen und bei Inkubationsbeginn festgestellten Parameter

Perfusionszeitpunkt in min	ohne Hungern									
	0		5		10		15		20	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Perfusionsdruck in cm Wassersäule	6,7	0,6	6,8	0,6	6,7	0,6	6,9	0,5	6,9	0,6
Leberdurchfluß in ml/min	41	6,4	44	6,5	46	6,9	45	8,3	47	7,7
	\bar{x}					s				
Perfusionsdauer in min	21					2,5				
Vorinkubationszeit bis 37 °C*	28					3,8				
Perfusionszeitpunkt in min	mit Hungern									
	0		5		10		15		20	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Perfusionsdruck in cm Wassersäule	7,1	1,1	7,0	1,2	6,9	1,3	7,0	1,3	7,0	1,4
Leberdurchfluß in ml/min	41	7,8	43	8,3	44	8,6	45	8,4	46	8,3
	\bar{x}					s				
Perfusionsdauer in min	21					2,0				
Vorinkubationszeit bis 37 °C*	28					3,9				

* Werte der 1. Versuchsreihe
In der 2. Versuchsreihe betrug die Vorinkubationszeit immer 15 min.

4.2 Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter¹

Die Vitalität der isolierten Hepatozyten wurde mit den Parametern Trypanblautest, LDH-Freisetzung, intrazellulärer K^+ - und Na^+ -Gehalt bestimmt.

Eine Trypanblauaufnahme oder die Freisetzung intrazellulärer Enzyme setzt eine umfangreiche Schädigung der Plasmamembran voraus und gibt lediglich Auskunft darüber, daß die Plasmamembran ihre Funktion als Permeationsbarriere verloren hat. Der Endzustand der freien Diffusion wird reflektiert. Auslösende Veränderungen in den physikochemischen Eigenschaften des Membranlipids bleiben unberücksichtigt (BAUR et al., 1975, UNGEMACH, 1982). Der intrazelluläre K^+ -Gehalt hingegen spiegelt die Aktivität der Na^+K^+ -ATPase, eines funktionellen Membranproteins, wider. Dieses ist in die Lipidphase der Plasmamembran eingebettet und ist ein integraler Membranparameter, da die Funktion des Enzyms vom physikochemischen Zustand der Membranlipide abhängig ist (GAZZOTTI und PETERSON, 1977). Bei Schädigung der Leberzellen ist im Gegensatz zum intrazellulären K^+ -Gehalt ein Anstieg von intrazellulärem Natrium zu beobachten.

Bei dem Tripeptid GSH handelt es sich um einen metabolischen Parameter. Intrazelluläres GSH besitzt in der Leber eine große Bedeutung bei der Entgiftung. Neben mehreren anderen Mechanismen dient GSH als Akzeptor für auszuscheidende Stoffe. Spezifische Enzyme koppeln toxische Substanzen, z.B. elektrophile Metaboliten des Fremdstoffmetabolismus oder reaktive Sauerstoffspezies, an GSH, die dann von der Niere in Form von Merkaptursäuren ausgeschieden werden. In der Literatur (s. Abschnitt 2.3.3.3) sind Hinweise zu finden, daß der VPA-Metabolismus mit einer Verminderung des intrazellulären GSH-Gehaltes einhergeht und daß reaktive Intermediärprodukte und freie Radikale beim VPA-Abbau eine Rolle spielen könnten. Mit der Bestimmung des intrazellulären GSH-Gehaltes wurde untersucht, ob auch im vorliegenden Modell VPA zu einer Verminderung des GSH-Gehaltes der Leberzellen führt. Es wurde vor allem getestet, welche Faktoren (VPA-Menge, Prooxidantien, Ernährungszustand) diesen VPA-vermittelten GSH-Verlust beeinflussen und ob ein Zusammenhang mit den anderen untersuchten Parametern besteht.

MDA, das zum größten Teil bei der Erhitzung des Testansatzes aus zyklischen Peroxiden gebildet wird, die während der Lipidperoxidation entstehen, ist ein Indikator für die Peroxidation von zellulären Lipiden (HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989). Es wurde überprüft, ob in diesem Modell eine Behandlung von Leberzellen mit VPA zur Lipidperoxidation führt und - wenn das nicht der Fall ist - ob Bedingungen existieren, mit denen eine Lipidperoxidation bei VPA-Behandlung in Leberzellen zu beobachten ist.

¹ Alle ermittelten absoluten Werte der Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter sind als arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (s) in Tabellen im Anhang (Kapitel 9) enthalten. Im Abschnitt 4.2 werden die mittleren Unterschiede beschrieben.

4.2.1 Kontrollgruppen²

4.2.1.1 Trypanblautest

Weder das Inkubationsmedium Krebs-Henseleit noch das Lösungsmittel DMFA hatte einen Einfluß auf die Hepatozyten. Es konnte auch keine Veränderung durch den unterschiedlichen Ernährungszustand der Ratten ermittelt werden. In beiden Versuchsreihen sank in den Gruppen KV, KCT und KB der prozentuale Anteil ungefärbter Zellen nach 270 min Inkubation tendenziell um durchschnittlich 5 % (s. Tabellen 9-3 und 9-4).

4.2.1.2 LDH-Freisetzung

Auch auf die Freisetzung von LDH hatte weder Krebs-Henseleit, DMFA noch der Ernährungszustand einen Einfluß. Sie erhöhte sich in beiden Versuchsreihen während der Inkubation um maximal 5 % (s. Tabellen 9-5 und 9-6). Jedoch war die Gesamt-LDH-Aktivität signifikant abhängig vom Ernährungszustand. Sie betrug ohne Hungern 292,5 mU/mg Zellen und mit Hungern 263,5 mU/mg Zellen. Davon wurden in den Gruppen KV, KCT und KB nach der Vorinkubationszeit ohne Hungern durchschnittlich 12 % und mit Hungern 14 % und am Inkubationsende ohne Hungern 15 % und mit Hungern 20 % extrazellulär gemessen.

4.2.1.3 Intrazellulärer Kaliumgehalt

Ähnlich wie bei den anderen Vitalitätsparametern, hatte weder Krebs-Henseleit noch DMFA einen Einfluß auf den intrazellulären K^+ -Gehalt von Leberzellen. Der Ernährungszustand der Tiere spielte keine entscheidende Rolle. Tendenziell lagen die Werte in Leberzellen mit Hungern niedriger. Der K^+ -Gehalt der Gruppen KV und KCT stieg ohne und mit Hungern im Inkubationsverlauf in der ersten Versuchsreihe durchschnittlich um 12,0 mmol/l ZW an und war in der Gruppe KB der zweiten Versuchsreihe mit Hungern ähnlich ausgeprägt. Ohne Hungern wurde aufgrund hoher Anfangsgehalte nur ein geringfügiger Anstieg verzeichnet (s. Tabellen 9-7 und 9-8).

4.2.1.4 Intrazellulärer Natriumgehalt

Der intrazelluläre Na^+ -Gehalt verhielt sich spiegelbildlich zum K^+ -Gehalt. Er war bei hungerten Tieren höher und sank im Zeitverlauf ohne und mit Hungern in den Gruppen KV und KCT der ersten Versuchsreihe durchschnittlich um 4,1 mmol/l ZW und in den Gruppen KB der zweiten Versuchsreihe um 2,7 mmol/l ZW. Der Ernährungszustand hatte zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Einfluß (s. Tabellen 9-9 und 9-10).

² Bei der Darstellung der Ergebnisse für jeden Parameter wird der Einfluß der Kontrollbehandlungen auf die Leberzellen sowohl ohne als auch mit Hungern aufgezeigt. Außerdem erfolgt ein Vergleich der beiden Ernährungszustände bei gleicher Behandlung.

4.2.1.5 Intrazellulärer GSH-Gehalt

Wie für die Vitalitätsparameter festgestellt, hatte weder Krebs-Henseleit noch DMFA einen Einfluß auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Leberzellen. Es wurde in den Gruppen KV und KCT der ersten Versuchsreihe ohne Hungern durchschnittlich 2,1 mmol/l ZW GSH und mit Hungern 2,4 mmol/l ZW GSH während der Inkubation neu gebildet bzw. regeneriert. In der Gruppe KB der zweiten Versuchsreihe wurde mit Hungern ein ähnliches Ergebnis ermittelt. Ohne Hungern wurde aufgrund hoher GSH-Ausgangswerte nur durchschnittlich 0,3 mmol/l ZW mehr GSH gefunden.

Dagegen bewirkte 20 h Hungern eine stark signifikante Verminderung des GSH-Status der Hepatozyten. Durch Hungern reduzierte sich der beim Inkubationsbeginn gemessene GSH-Gehalt in den Gruppen KV und KCT der ersten Versuchsreihe um 45 % (s. Abbildung 4.2-1). In der Gruppe KB der zweiten Versuchsreihe wurde mit Hungern zum Zeitpunkt 0 min um 53 % weniger GSH im Vergleich zur gleichen Gruppe ohne Hungern ermittelt (s. Abbildung 4.2-3, s. Tabellen 9-11 und 9-12). Der Unterschied im GSH-Gehalt zwischen den Ernährungszuständen blieb während der gesamten Inkubation erhalten. Das war zu allen Zeitpunkten signifikant.

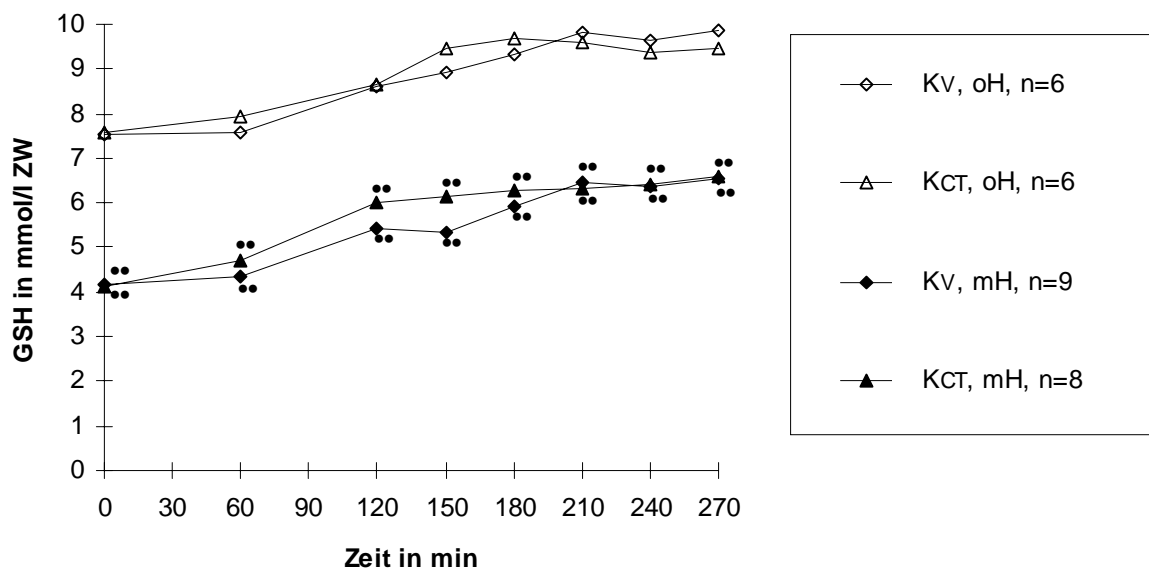


Abbildung 4.2-1: Einfluß von Krebs-Henseleit, DMFA und des Ernährungszustandes auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Hepatozyten

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. DMFA: nach dem Zeitpunkt 120 min

•• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (•• $p < 0,01$)

4.2.1.6 MDA-Nachweis

Die MDA-Bildung wurde durch Krebs-Henseleit, DMFA und den Ernährungsstatus nicht beeinflusst. Während der Inkubationsperiode von 270 min kam es bei beiden Ernährungszuständen zu einem minimalen Anstieg der MDA-Werte. So wurden am Anfang der Inkubation in den Gruppen KV und KCT der ersten Versuchsreihe durchschnittlich 0,080 nmol/mg Zellen und in der Gruppe KB der zweiten Versuchsreihe 0,070 nmol/mg Zellen festgestellt. Nach 270 min wurden in den Gruppen KV, KCT und KB 0,098 nmol/mg Zellen ermittelt (s. Tabellen 9-13 und 9-14).

4.2.2 Einfluß von Prooxidantien³

4.2.2.1 Trypanblautest

Die organischen Hydroperoxide (CuOOH, t-BuOOH) bewirkten in den untersuchten Gruppen C50, C100, T200 und T400 keine signifikante Erhöhung des Anteils gefärbter Zellen gegenüber der DMFA-Kontrolle KCT. Auch in der zweiten Versuchsreihe mit BrH wurde keine wesentliche Veränderung der Werte der Gruppe B500 gegenüber der DMFA-Kontrolle KB beobachtet. Der Ernährungszustand hatte keinen Einfluß (s. Tabellen 9-3 und 9-4).

4.2.2.2 LDH-Freisetzung

Die Hydroperoxide verursachten sowohl mit als auch ohne Hungern in keiner Konzentration signifikante Veränderungen der LDH-Freisetzung gegenüber der DMFA-Kontrolle KCT. Auch bei BrH-Vorbehandlung wurden bei beiden Ernährungszuständen im Vergleich zur DMFA-Kontrolle KB keine wesentlichen Unterschiede ermittelt. In den Gruppen C50, C100, T200 und T400 der ersten Versuchsreihe hatte der Ernährungszustand keinen Einfluß. In der Gruppe B500 der zweiten Versuchsreihe wurde ohne Hungern während der gesamten Inkubation eine geringe LDH-Abgabe ermittelt. Die LDH-Werte dieser Gruppe waren zu allen Zeitpunkten ca. 24 % niedriger als in der gleichen Behandlungsgruppe mit Hungern (s. Tabellen 9-5 und 9-6).

4.2.2.3 Intrazellulärer Kaliumgehalt

CuOOH, t-BuOOH bzw. BrH allein führten bei beiden Ernährungszuständen zu keinen entscheidenden Veränderungen des intrazellulären K⁺-Gehaltes. Die in den Kontrollgruppen KV, KCT und KB mit Hungern im Vergleich zu ohne Hungern festgestellte Tendenz niedrigerer K⁺-Gehalte wurde auch in den Gruppen C50, C100, T200, T400 und B500 ermittelt (s. Tabellen 9-7 und 9-8).

³ Bei der Darstellung der Ergebnisse für jeden Parameter wird der Einfluß der Prooxidantienbehandlungen der ersten und zweiten Versuchsreihe gegenüber den entsprechenden DMFA-Kontrollen auf die Leberzellen sowohl ohne als auch mit Hungern aufgezeigt. Außerdem erfolgt ein Vergleich der beiden Ernährungszustände bei gleicher Behandlung.

4.2.2.4 Intrazellulärer Natriumgehalt

Der Na⁺-Gehalt der Hepatozyten veränderte sich durch den Einsatz der Prooxidantien und den Ernährungszustand nicht. Lediglich mit Hungern waren in der Gruppe B500 die Na⁺-Werte gegenüber der DMFA-Kontrolle KB leicht erhöht (s. Tabellen 9-9 und 9-10).

4.2.2.5 Intrazellulärer GSH-Gehalt

In der ersten Versuchsreihe führte weder CuOOH noch t-BuOOH zur Veränderung des GSH-Gehaltes gegenüber der DMFA-Kontrolle KCT. Die während der Inkubation beobachtete GSH-Neubildung bzw. -Regenerierung war in den Gruppen C50, C100, T200 und T400 mit und ohne Hungern aufgrund höherer durchschnittlicher Gehalte bei der ersten Probenentnahme etwas geringer als in den Kontrollgruppen KV, KCT und KB. Die erreichten GSH-Gehalte nach 270 min Inkubation waren jedoch für den jeweiligen Ernährungszustand vergleichbar und betragen für die Hydroperoxid- und Kontrollgruppen ohne Hungern durchschnittlich 9,6 mmol/l ZW und mit Hungern 6,8 mmol/l ZW. Die Fähigkeit der Leberzellen, GSH neu zu bilden bzw. zu regenerieren, war in allen CuOOH- und t-BuOOH-Gruppen mit Hungern höher. Es wurde im Inkubationsverlauf ohne Hungern 1,4 mmol/l ZW und mit Hungern 1,9 mmol/l ZW GSH gebildet. Diese Tendenz deutete sich schon für die Gruppen KV, KCT und KB an. Der starke signifikante Einfluß von Hungern auf den GSH-Status der Leberzellen bestätigte sich, da der GSH-Gehalt zu Beginn der Inkubation in allen Hydroperoxidgruppen um durchschnittlich 38 % verringert war. Ebenso wie in den Kontrollen blieb dieser Unterschied bis zum Inkubationsende bestehen (s. Abbildung 4.2-2).

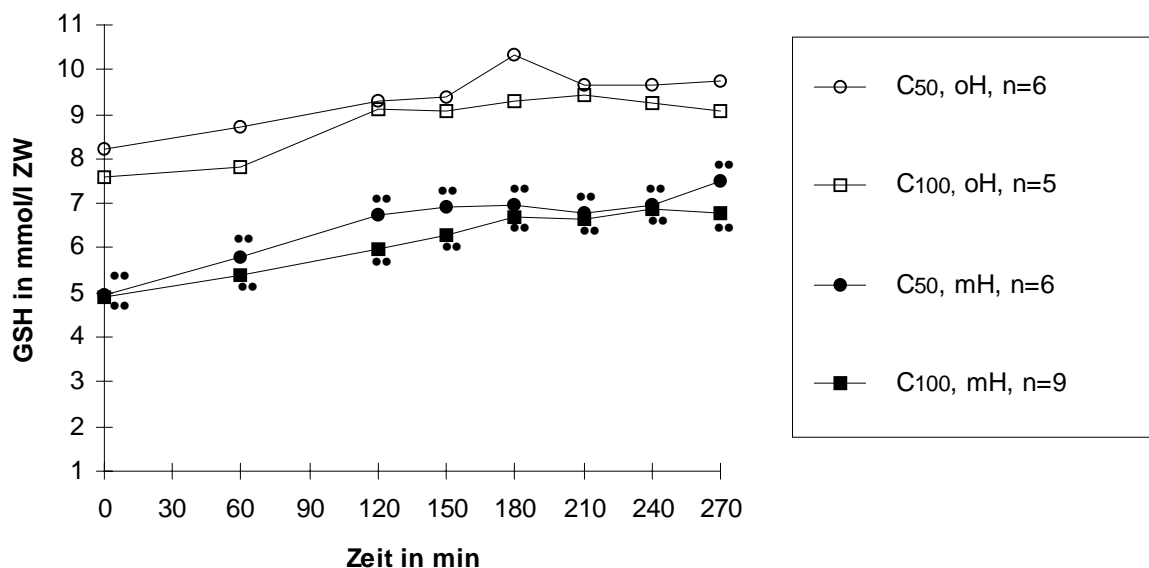


Abbildung 4.2-2: Einfluß von CuOOH und des Ernährungszustandes auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Hepatozyten

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• p<0,05, •• p<0,01)

In der zweiten Versuchsreihe wurde ohne Hungern durch BrH in der Gruppe B500 während der 15minütigen Vorbehandlung eine GSH-Verarmung um 77 % gegenüber der Gruppe KB erreicht. Der GSH-Gehalt sank in den ersten 30 min der Inkubation weiter und blieb dann bis zum Zeitpunkt 120 min konstant (80 %). Mit Hungern wurde nach der BrH-Vorbehandlung eine Verminderung um 63 % festgestellt. Auch hier fiel der GSH-Gehalt noch weiter bis zum Zeitpunkt 120 min (77%) und blieb bis 150 min auf diesem Niveau. Unabhängig vom Ernährungszustand kam es auch nach BrH-Vorbehandlung zu einer erneuten Bildung von GSH in den Zellen. Das war jedoch nur ohne Hungern ab 150 min Inkubation stark ausgeprägt. Im Inkubationsverlauf wurden ohne Hungern durchschnittlich 2,6 mmol/l ZW und mit Hungern im Gegensatz zu den bisher dargestellten Gruppen nur 0,8 mmol/l ZW GSH mehr ermittelt. In der Gruppe B500 wurde mit Hungern bis zum Ende der Inkubation die Verminderung des GSH-Gehaltes gegenüber der DMFA-Kontrolle KB aufrechterhalten und betrug 64 %. Ohne Hungern sank sie auf 50 %. Der Ernährungszustand hatte einen starken Einfluß. So wurden mit Hungern auch nach GSH-Verarmung zu allen Zeitpunkten signifikant niedrigere GSH-Gehalte im Vergleich zu ohne Hungern ermittelt. Sofort nach der BrH-Vorbehandlung war mit Hungern um 25 % weniger GSH vorhanden und am Inkubationsende wurde sogar um 49 % weniger GSH ermittelt (s. Abbildung 4.2-3 und Tabellen 9-11 und 9-12).

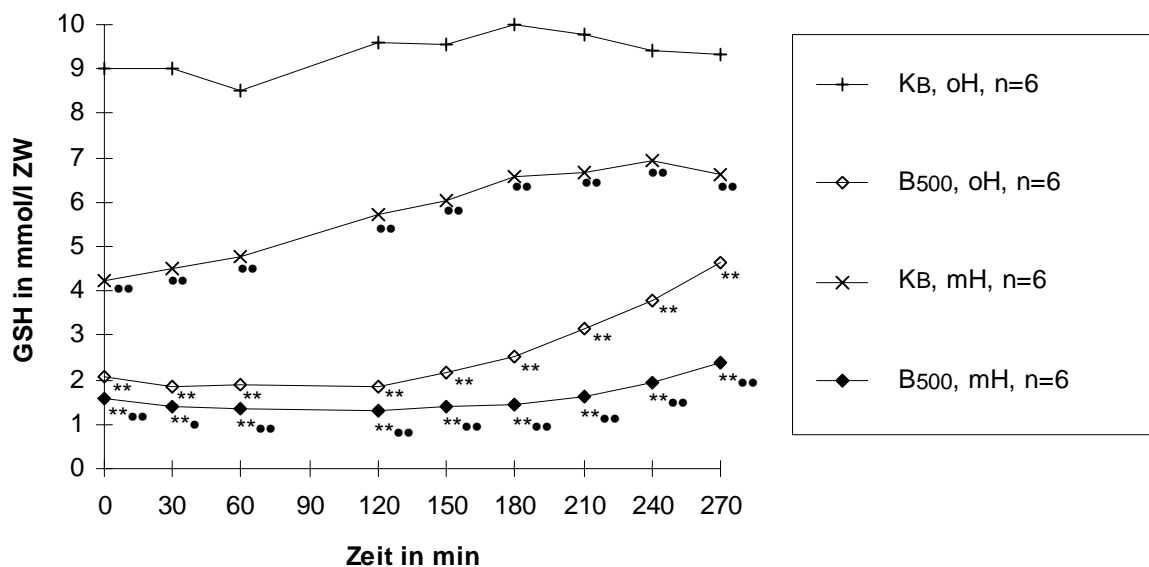


Abbildung 4.2-3: Einfluß von DMFA, BrH und des Ernährungszustandes auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Hepatozyten

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von DMFA bzw. Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit: nach dem Zeitpunkt 0 min

*, ** signifikanter Einfluß von BrH gegenüber der DMFA-Kontrolle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$, •• $p < 0,01$)

4.2.2.6 MDA-Nachweis

Das im Kapitel 4.2.1.6 für die Kontrollgruppen KV, KCT und KB Aufgeführte trifft auch für die Hydroperoxidgruppen C50, C100, T200 und T400 und die BrH-Gruppe B500 zu. Die ermittelten Werte sind ebenfalls mit den Kontrollgruppen vergleichbar (s. Abbildung 4.2-4, s. Tabellen 9-13 und 9-14).

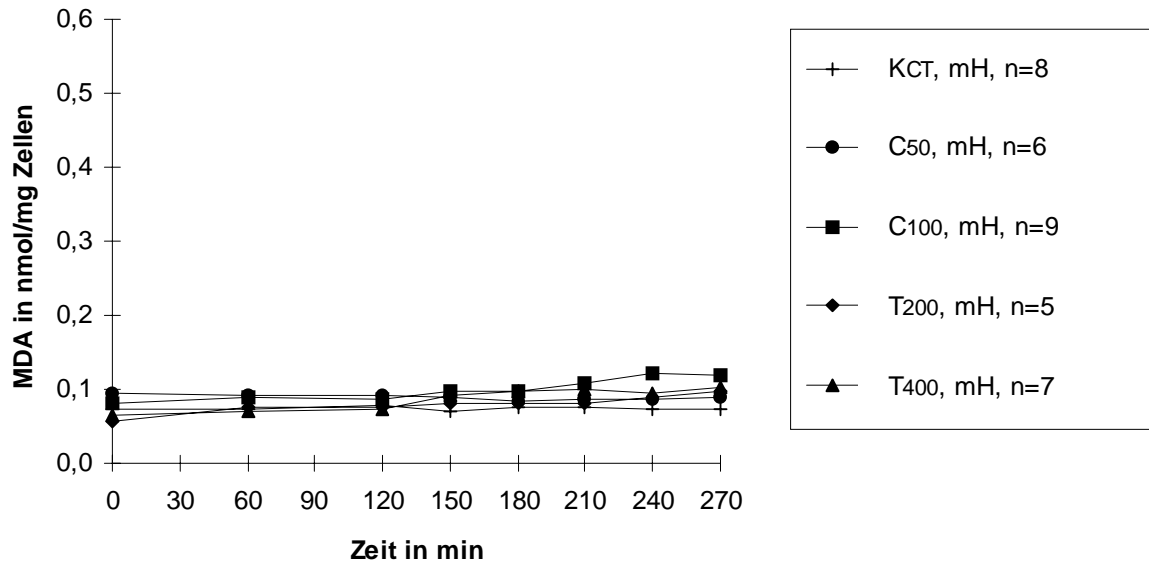


Abbildung 4.2-4: Einfluß von CuOOH bzw. *t*-BuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf die MDA-Bildung der Hepatozyten

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in nmol/mg Zellen dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von DMFA bzw. CuOOH oder *t*-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

4.2.3 Einfluß von VPA⁴

4.2.3.1 Trypanblautest

Unterschiedliche VPA-Mengen führten ohne Hungern im Inkubationsverlauf zu keiner Veränderung des Anteils ungefärbter Zellen gegenüber der Krebs-Henseleit-Kontrolle KV. Mit Hungern wurde nur mit 10 mM VPA (V10) ein ab 210 min Inkubation höherer Anteil gefärbter Zellen, signifikant nur zum Zeitpunkt 240 min, festgestellt (s. Abbildung 4.2-5). Wie in allen Kontroll- und Prooxidantiengruppen sank in den anderen untersuchten VPA-

⁴ Bei der Darstellung der Ergebnisse für jeden Parameter wird der Einfluß der VPA-Behandlungen auf die Leberzellen gegenüber der Krebs-Henseleit-Kontrolle sowohl ohne als auch mit Hungern aufgezeigt. Außerdem erfolgt ein Vergleich der beiden Ernährungszustände bei gleicher Behandlung.

Gruppen der prozentuale Anteil ungefärbter Zellen in 270 min Inkubation um durchschnittlich 5 %. Der Ernährungszustand hatte keinen Einfluß (s. Tabellen 9-3 und 9-4).

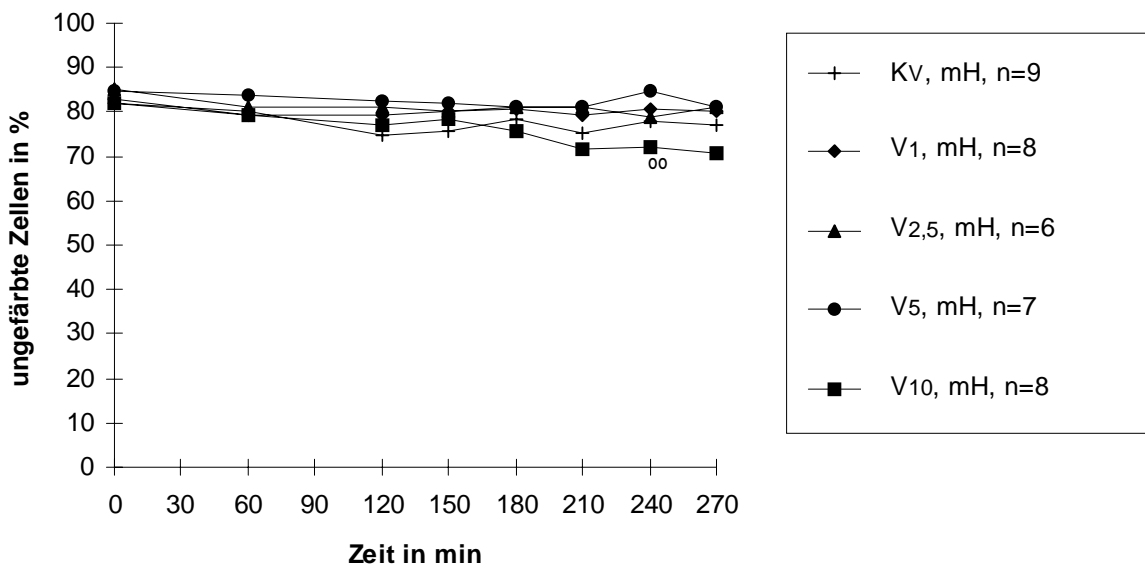


Abbildung 4.2-5: Einfluß von VPA beim Ernährungszustand Hungern auf den Anteil ungefärbter Hepatozyten

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit: nach dem Zeitpunkt 120 min

⁰⁰ signifikanter Einfluß von VPA gegenüber der Krebs-Henseleit-Kontrolle (⁰⁰ p<0,01)

4.2.3.2 LDH-Freisetzung

Mit VPA behandelte Leberzellen zeigten weder mit noch ohne Hungern eine Erhöhung der LDH-Freisetzung gegenüber der Krebs-Henseleit-Kontrolle KV. Der Ernährungszustand hatte keinen Einfluß auf die LDH-Freisetzung bei gleicher VPA-Behandlung der Zellen (s. Tabellen 9-5 und 9-6).

4.2.3.3 Intrazellulärer Kaliumgehalt

Insgesamt waren die K⁺-Werte mit denen in den Kontroll- und Prooxidantiengruppen vergleichbar (s. Abschnitte 4.2.1.3 und 4.2.2.3, s. Tabellen 9-7 und 9-8). Die Gruppen V1, V5 und V10 ohne Hungern wiesen zu Beginn der Inkubation tendenziell höhere K⁺-Gehalte auf, so daß hier die sonst beobachtete Zunahme von intrazellulärem Kalium bis zum Inkubationsende nicht ermittelt werden konnte. Der Ernährungszustand hatte mit Ausnahme der 10-mM-VPA-Behandlungsgruppen keinen entscheidenden Einfluß. So wurden in der Gruppe V10 mit Hungern nach 270 min Inkubation um 18 % signifikant verminderte Werte gemessen.

4.2.3.4 Intrazellulärer Natriumgehalt

Die Behandlung mit unterschiedlichen VPA-Mengen hatte keinen Einfluß auf den Na⁺-Gehalt der Leberzellen von nicht hungernden und hungernden Ratten mit Ausnahme der Gruppe V10 mit Hungern gegenüber der Krebs-Henseleit-Kontrolle KV (s. Abbildung 4.2-6, s. Tabellen 9-9 und 9-10).

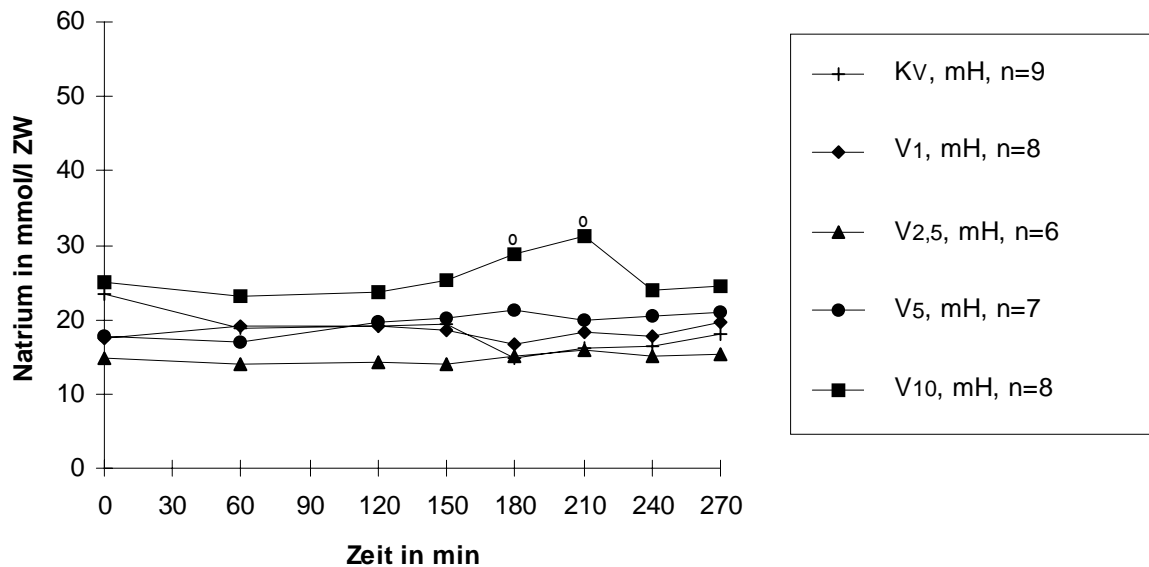


Abbildung 4.2-6: Einfluß von VPA beim Ernährungszustand Hungern auf den intrazellulären Na⁺-Gehalt der Hepatozyten

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit: nach dem Zeitpunkt 120 min

^o signifikanter Einfluß von VPA gegenüber der Krebs-Henseleit-Kontrolle (^o p<0,05)

4.2.3.5 Intrazellulärer GSH-Gehalt

VPA führte bei beiden Ernährungszuständen dosis- und zeitabhängig zu einer Verminderung des GSH-Gehaltes der Leberzellen. Bei VPA-Mengen über 1 mM wurden im Inkubationsverlauf zunehmende GSH-Verluste ohne Hungern (V5: 1,7 mmol/l ZW; V10: 2,3 mmol/l ZW) und mit Hungern (V2,5: 0,8 mmol/l ZW; V5: 1,2 mmol/l ZW; V10: 1,8 mmol/l ZW) ermittelt.

Ab dem Probenentnahmezeitpunkt 210 min wiesen alle VPA-Behandlungsgruppen mit und ohne Hungern niedrigere GSH-Gehalte gegenüber der Krebs-Henseleit-Kontrolle KV auf. Ohne Hungern wurden gegenüber der Kontrolle KV mit 1 mM VPA nach 210 min um 18 % signifikant niedrigere GSH-Gehalte ermittelt. Dieser Unterschied blieb bis zum Ende. Mit 5 mM und 10 mM VPA wurden signifikante GSH-Verluste dieser Größenordnung bereits nach 120 min Inkubation festgestellt (V5: 19 %; V10: 18 %). Am Inkubationsende wurde für 5 mM VPA 38 % und für 10 mM VPA 42 % weniger GSH gemessen. Mit Hungern wurden

nur in der Gruppe V10 ab 120 min Inkubation bis zum Ende signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Krebs-Henseleit-Kontrolle KV festgestellt, die zum Zeitpunkt 120 min schon um 35 % vermindert waren und nach 270 min sogar um 58 %. Die Ursache dafür, daß mit den anderen VPA-Dosen keine signifikanten Unterschiede ermittelt wurden, liegt, wie schon in Abschnitt 4.1 erklärt, an den hohen GSH-Gehalten der entsprechenden Gruppen zu Versuchsbeginn (V1 ohne Hungern; V1, V2,5 und V5 mit Hungern). Daher wird in diesem Fall zur besseren Veranschaulichung der VPA-Dosisabhängigkeit die prozentuale Änderung des GSH-Gehaltes während der Inkubation dargestellt. Ohne Hungern war die prozentuale Änderung des GSH-Gehaltes in allen untersuchten VPA-Gruppen ab 120 min und mit Hungern ab 60 min gegenüber der Kontrolle KV signifikant (s. Abbildung 4.2-7).

Der starke signifikante Einfluß des Ernährungszustandes auf den GSH-Status wurde bei allen VPA-Behandlungsgruppen beobachtet. Während der gesamten Inkubation und bei allen VPA-Dosierungen wiesen die Leberzellen von hungrigen Ratten signifikant niedrigere GSH-Gehalte zu den Vergleichsgruppen ohne Hungern auf (s. Tabellen 9-11 und 9-12).

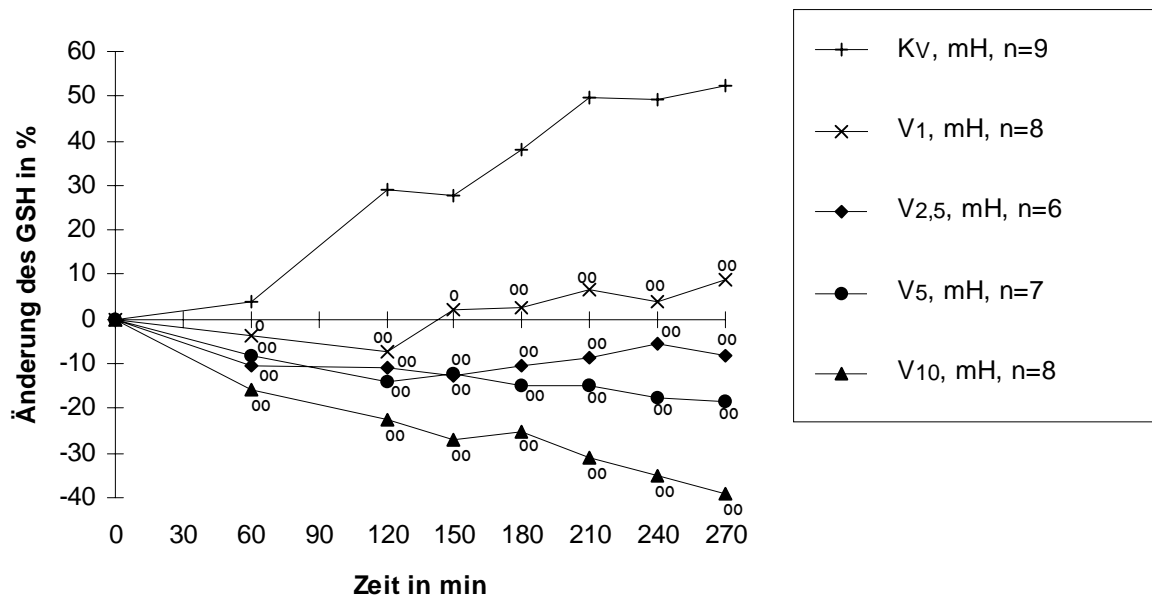


Abbildung 4.2-7: Einfluß von VPA beim Ernährungszustand Hungern auf die prozentuale Änderung des intrazellulären GSH-Gehaltes der Hepatozyten

Es sind die arithmetischen Mittelwerte dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit: nach dem Zeitpunkt 120 min

°, °° signifikanter Einfluß von VPA gegenüber der Krebs-Henseleit-Kontrolle (° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$)

4.2.3.6 MDA-Nachweis

VPA hatte in keiner der verwendeten Konzentrationen weder mit Hungern noch ohne Hungern im Vergleich zu den Kontrollen KV noch im Vergleich beider Ernährungszustände einen Einfluß auf die MDA-Bildung (s. Abbildung 4.2-8, s. Tabellen 9-13 und 9-14).

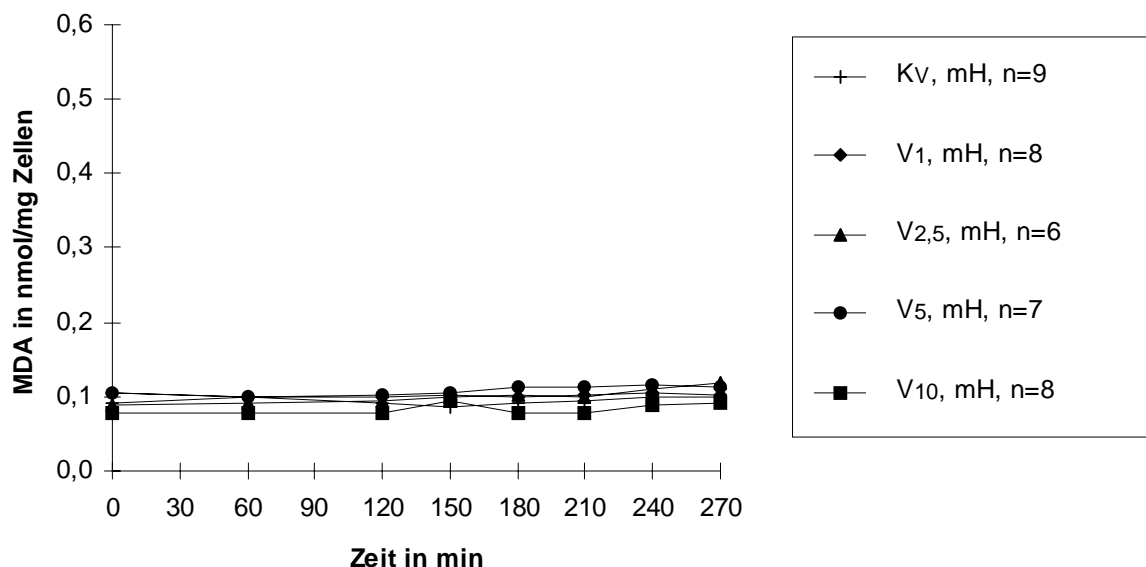


Abbildung 4.2-8: Einfluß von VPA beim Ernährungszustand Hungern auf die MDA-Bildung der Hepatozyten

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in nmol/mg Zellen dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit: nach dem Zeitpunkt 120 min

4.2.4 Einfluß der Kombination von Prooxidantien und VPA⁵

4.2.4.1 Trypanblautest

CuOOH (s. Tabellen 9-3 und 9-4)

Ohne Hungern hatte CuOOH in allen verwendeten Konzentrationen keinen Einfluß auf den Anteil ungefärbter Hepatozyten bei Anwesenheit von 1 mM, 5 mM bzw. 10 mM VPA. Eben-

⁵ Bei der Darstellung der Ergebnisse für jeden Parameter wird für jedes verwendete Prooxidanz separat der Einfluß der Prooxidantien bei Kombinationsbehandlungen sowohl ohne als auch mit Hungern aufgezeigt. Es wird in der gleichen Weise der Einfluß von VPA bei Kombinationsbehandlungen dargestellt. Außerdem erfolgt ein Vergleich der beiden Ernährungszustände bei gleicher Kombinationsbehandlung. Alle Vergleiche zur Ermittlung des Einflusses von Prooxidantien beziehen sich auf die jeweiligen nur mit derselben VPA-Menge behandelten Hepatozyten und des Einflusses von VPA auf die jeweiligen nur mit derselben CuOOH- bzw. t-BuOOH- oder BrH-Menge behandelten Leberzellen.

so hatte VPA ohne Hungern keinen Einfluß bei Kombination mit CuOOH (s. Abbildung 4.2-10).

Mit Hungern verursachte 50 µM CuOOH in der Gruppe V5C50 zum Probenentnahmezeitpunkt 240 min eine erste signifikante Abnahme ungefärbter Zellen um 13 %. Entscheidende Vitalitätsverluste waren bei dieser CuOOH-Menge erst in der Gruppe V10C50 zu beobachten. Hier waren ab 150 min Inkubation signifikante Veränderungen gegenüber der Gruppe V10 zu sehen. Der Anteil ungefärbter Zellen war um 16 % vermindert, und diese Differenz erhöhte sich auf 44 % bis zum Inkubationsende. Die Verdopplung der CuOOH-Konzentration führte in den Gruppen V1C100 und V2,5C100 zu einer geringfügigen dosisabhängigen Verringerung des Anteils ungefärbter Zellen im Vergleich zu den Gruppen V1 bzw. V2,5. Diese CuOOH-Menge verursachte in der Gruppe V5C100 ab dem Zeitpunkt 150 min eine geringfügige signifikante Verringerung des Anteils ungefärbter Zellen gegenüber der Gruppe V5, die sich bis zum Inkubationsende auf 33 % erhöhte. Bei der Kombination V10C100 war ein derartiger Vitalitätsverlust durch CuOOH schon 30 min nach Zugabe des Hydroperoxids vorhanden, der sich bis zum Probenentnahmezeitpunkt 270 min gegenüber der Gruppe V10 auf 57 % erhöhte.

Ein signifikanter Einfluß von 5 mM VPA auf die Vitalität der Leberzellen war bei der Kombination V5C50 nach 270 min mit einer Verminderung um 15 % zu beobachten. In der Gruppe V10C50 hatte 10 mM VPA einen viel stärkeren Einfluß. Ab 180 min zeigten sich um durchschnittlich 22 % signifikant niedrigere Werte. Am Inkubationsende betrug die Differenz zwischen den Gruppen V10C50 und C50 51 %. Bei einer CuOOH-Konzentration von 100 µM waren erste signifikante Veränderungen in der Gruppe V5C100 vorhanden. Die ungefärbten Zellen waren nach 180 min um 13 % und nach 270 min um 30 % signifikant vermindert. Die stärksten Veränderungen traten bei der Kombination von V10C100 auf. Schon 30 min nach CuOOH-Zugabe verringerte sich der Anteil vitaler Zellen gegenüber der Gruppe C100 um 35 %. Bis zum Inkubationsende vergrößerte sich die Differenz zwischen den Gruppen V10C100 und C100 auf 63 % (s. Abbildung 4.2-9).

Der Ernährungszustand hatte bei hoher VPA-Konzentration einen entscheidenden Einfluß. In der Gruppe V5C100 war der Anteil ungefärbter Zellen von hungernden Tieren am Ende der Inkubation um 26 % signifikant niedriger als in der Gruppe V5C100 von nicht hungernden Tieren. In der Kombination V10C50 verursachte Hungern nach 150 min Inkubation eine Verminderung des Anteils vitaler Zellen von 14 %. Diese Differenz erhöhte sich nach 270 min auf 50 %. Bei der doppelten Menge CuOOH betrug zu diesen Zeitpunkten der Unterschied zwischen beiden Gruppen V10C100 sogar 30 % bzw. 60 % (s. Abbildung 4.2-10).

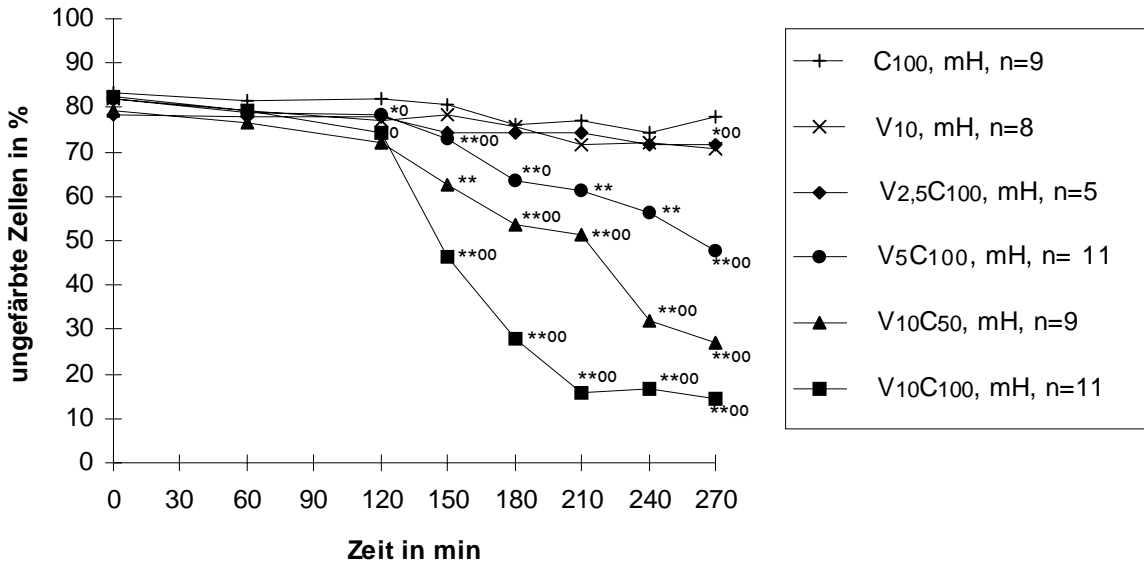


Abbildung 4.2-9: Einfluß von VPA bzw. CuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf den Anteil ungefärbter Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist jeweils nur eine CuOOH- und eine VPA-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von CuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

⁰, ⁰⁰ signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber CuOOH allein (⁰ $p < 0,05$, ⁰⁰ $p < 0,01$)

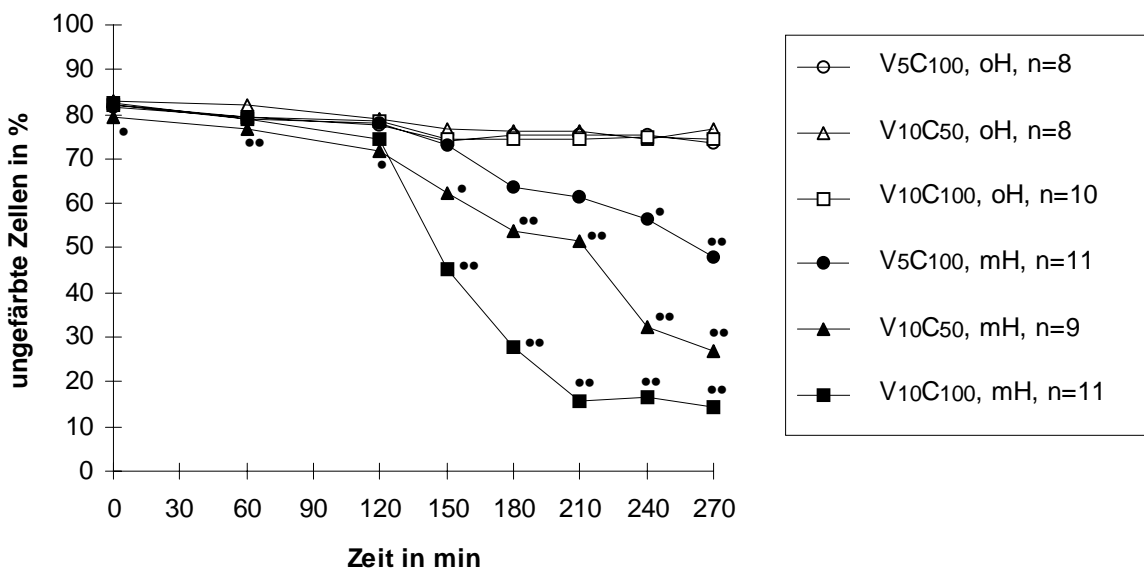


Abbildung 4.2-10: Einfluß des Ernährungszustandes auf den Anteil ungefärbter Hepatozyten bei kombinierter VPA-CuOOH-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$, •• $p < 0,01$)

t-BuOOH (s. Tabellen 9-3 und 9-4)

Ohne Hungern wurden auch mit dem Hydroperoxid t-BuOOH keine Veränderungen im Trypanblautest ermittelt (s. Abbildung 4.2-12).

Die t-BuOOH-Menge 200 μM führte mit Hungern nur in der Gruppe V10T200 zu geringfügigen signifikanten Veränderungen. Unmittelbar nach der Zugabe von 400 μM t-BuOOH wurde bereits in der Kombination V1T400 eine signifikante Verringerung des Anteils ungefärbter Zellen im Vergleich zur Gruppe V1 ermittelt. Einen ausgeprägten Einfluß hatte 400 μM t-BuOOH nur in der Gruppe V10T400 ab 210 min (25 %). Der Anteil ungefärbter Zellen reduzierte sich bis zum Inkubationsende gegenüber der Gruppe V10 um 65 %.

Die Behandlung mit 10 mM VPA führte mit Hungern in der Gruppe V10T200 zu einer signifikanten Verringerung der Vitalität. Nach 270 min betrug der Unterschied zwischen den Gruppen V10T200 und T200 17 %. In der Gruppe V1T400 verursachte bereits 1 mM VPA am Ende der Inkubation eine um 19 % signifikante Verminderung des Anteils ungefärbter Zellen. Der stärkste Abfall des Anteils ungefärbter Zellen wurde durch 10 mM VPA in der Kombination V10T400 beobachtet: signifikant bereits 30 min nach t-BuOOH-Zugabe. Die Differenz zwischen den Gruppen V10T400 und T400 betrug am Ende der Inkubation 74 % (s. Abbildung 4.2-11).

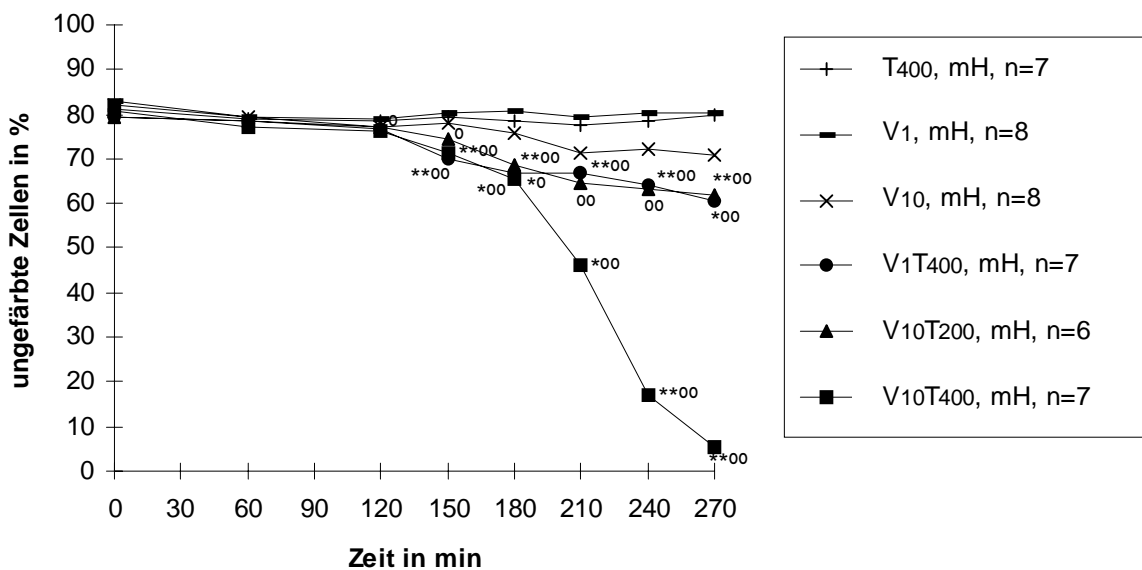


Abbildung 4.2-11: Einfluß von VPA bzw. t-BuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf den Anteil ungefärbter Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. t-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist nur eine t-BuOOH-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von t-BuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

⁰, ⁰⁰ signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber t-BuOOH allein (⁰ $p < 0,05$, ⁰⁰ $p < 0,01$)

Der Ernährungszustand hatte bei allen untersuchten Gruppen einen signifikanten Einfluß. Zwischen den Gruppen V10T200 betrug die Differenz des Anteils ungefärbter Zellen am Ende der Inkubation 17 %, zwischen den Gruppen V1T400 20 %. Am ausgeprägtesten war die Wirkung von Hungern bei der Kombination V10T400. Hier war bereits nach 210 min eine um 30 % starke Verminderung des Anteils vitaler Zellen ermittelt worden. Diese betrug nach 270 min Inkubation 71 % (s. Abbildung 4.2-12).

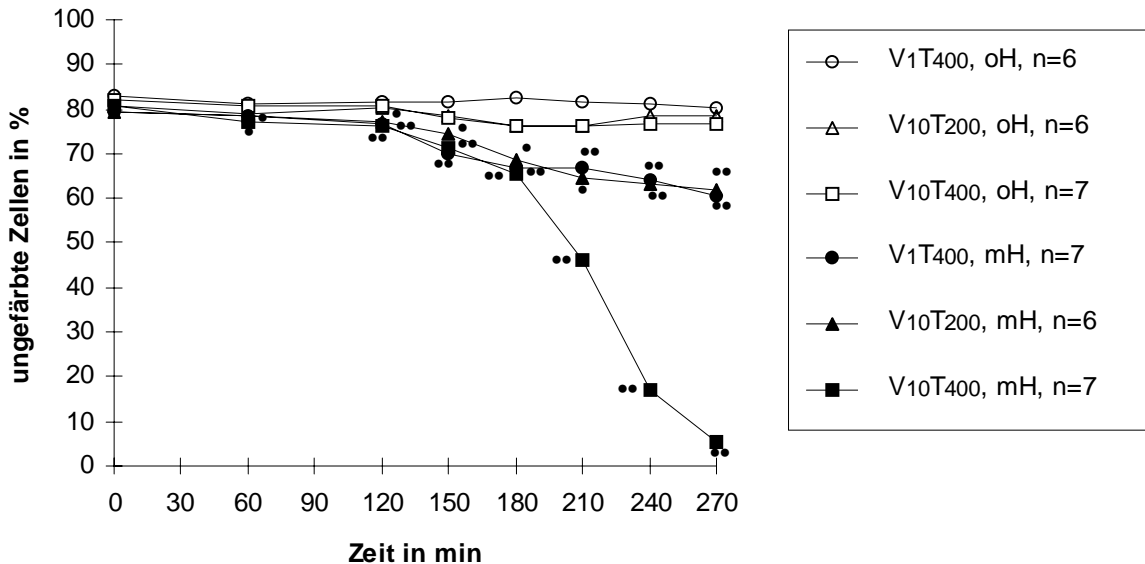


Abbildung 4.2-12: Einfluß des Ernährungszustandes auf den Anteil ungefärbter Hepatozyten bei kombinierter VPA-t-BuOOH-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von *t*-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$, •• $p < 0,01$)

BrH (s. Tabellen 9-3 und 9-4)

BrH-Vorbehandlung verursachte ohne Hungern in der Gruppe B500V1 gegenüber der Vergleichsgruppe V1 über den Zeitraum von 120 min bis 210 min eine zeitweise geringfügige Verminderung des Anteils ungefärbter Zellen um ca. 10 %. BrH führte in der Gruppe B500V10 120 min nach VPA-Zugabe zu einer signifikanten Vitalitätsverminderung um 22 %. Der Anteil ungefärbter Zellen sank weiter stetig ab und war nach 270 min um 60 % gegenüber der Gruppe V10 vermindert.

Die Menge 1 mM VPA führte ohne Hungern in der Gruppe B500V1 zu den Zeitpunkten 120 und 150 min zu einem geringfügigen Absinken der Vitalität um ca. 10 %. In der Gruppe B500V10 verursachte 10 mM VPA von 120 min bis zum Inkubationsende eine Verminderung des Anteils ungefärbter Zellen, wobei die Differenz zwischen den Gruppen B500V10 und B500 nach 120 min 23 % und nach 270 min 62 % betrug (s. Abbildung 4.2-13).

In der Kombination B500V1 führte 500 µM BrH nur bei Leberzellen von hungernden Tieren zu einem entscheidenden signifikanten Vitalitätsverlust ab dem Probenentnahmezeitpunkt 120 min. Nach 270 min war die Vitalität um 67 % vermindert. In der Gruppe B500V10 wurde ab 120 min eine starke signifikante Abnahme des Anteils ungefärbter Zellen im Vergleich zur Gruppe V10 beobachtet. Sie betrug nach 120 min 34 %, und ab dem Zeitpunkt 210 min waren hier keine ungefärbten Zellen mehr vorhanden.

Im Vergleich zur Gruppe B500 verursachte 1 mM VPA in der Gruppe B500V1 mit Hungern ab 120 min einen entscheidenden signifikanten Abfall des Anteils ungefärbter Zellen. Dieser betrug nach 270 min 61 %. Die Behandlung mit 10 mM VPA verursachte in der Gruppe B500V10 schon zum Zeitpunkt 120 min eine Differenz von 35 % zur Gruppe B500. Ab dem Zeitpunkt 210 min waren keine ungefärbten Zellen mehr vorhanden (s. Abbildung 4.2-13).

Der Ernährungszustand Hungern verstärkte die Auswirkungen der Vorbehandlung mit BrH. In der Gruppe B500V1 wurde durch Hungern ab dem Probenentnahmezeitpunkt 150 min ein entscheidender signifikanter Vitalitätsverlust festgestellt. Der Anteil ungefärbter Zellen war mit Hungern am Ende der Inkubation um 64 % vermindert. In der Kombination B500V10 traten entscheidende signifikante Veränderungen schon nach 120 min auf. Mit Hungern waren ab 210 min keine ungefärbten Zellen mehr vorhanden (s. Abbildung 4.2-13).

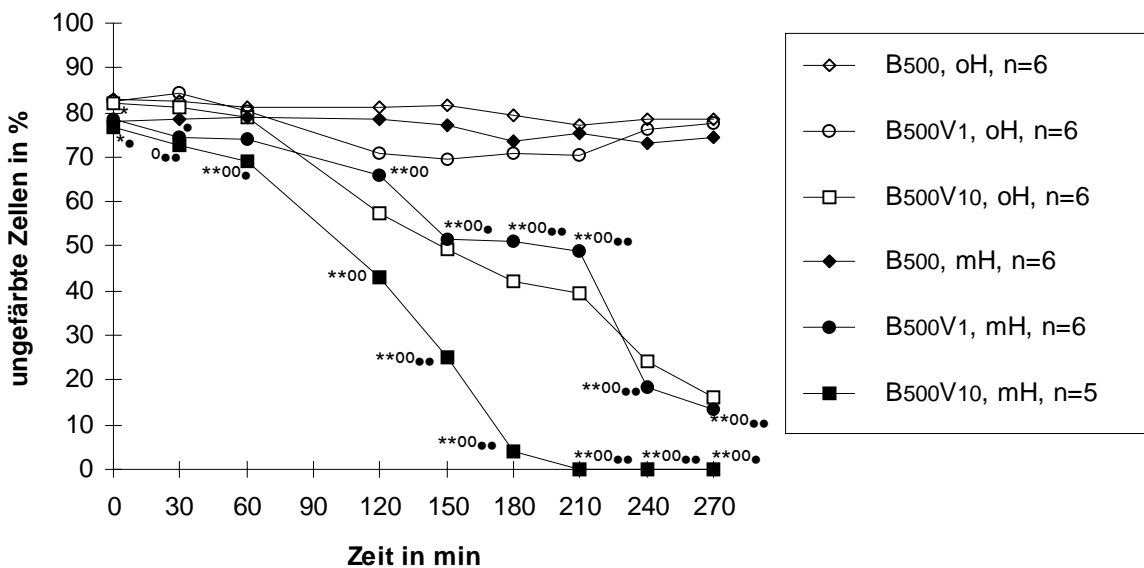


Abbildung 4.2-13: Einfluß von VPA bzw. BrH und des Ernährungszustandes auf den Anteil ungefärbter Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min

Wegen der Übersichtlichkeit sind die VPA-Vergleichsgruppen nicht dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von BrH bei Kombination gegenüber VPA allein (* p<0,05, ** p<0,01)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber BrH allein (° p<0,05, °° p<0,01)

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• p<0,05, •• p<0,01)

4.2.4.2 LDH-Freisetzung

CuOOH (s. Tabellen 9-5 und 9-6)

In den Gruppen V1C50, V5C50, V1C100 und V5C100 hatte CuOOH keinen Einfluß auf die LDH-Abgabe der Leberzellen von nicht hungernden Tieren. Nur in der Gruppe V10C100 führte 100 µM CuOOH zu den Zeitpunkten 240 min und 270 min zu einer leicht erhöhten LDH-Freisetzung. Im Vergleich zur Gruppe V10 war sie nach 270 min um 20 % erhöht.

Ein geringfügiger Einfluß von VPA auf die LDH-Freisetzung der Hepatozyten war ohne Hungern nur bei hohen Konzentrationen in den Gruppen V5C100 und V10C100 vorhanden. In der ersten Gruppe verursachte 5 mM VPA nur zum Zeitpunkt 270 min eine um 34 % signifikant erhöhte LDH-Freisetzung. In der zweiten Gruppe stieg die LDH-Freisetzung ab 120 min gegenüber der Gruppe C100 an. Sie war zum Zeitpunkt 120 min um 30 % und nach 270 min Inkubation um 45 % signifikant erhöht (s. Abbildung 4.2-15).

Mit Hungern bewirkte CuOOH in der Gruppe V5C100 eine ausgeprägte allmähliche Erhöhung der LDH-Freisetzung ab dem Zeitpunkt 180 min, die ab 210 min signifikant war. Sie betrug nach 270 min 127 %. In der Gruppe V10C50 verursachte CuOOH nach 270 min einen um 38 % signifikanten LDH-Anstieg. Bei der Verdopplung der CuOOH-Menge begann in der Gruppe V10C100 durch CuOOH die LDH-Freisetzung 30 min nach der CuOOH-Zugabe. Sie war nach weiteren 30 min zum Zeitpunkt 180 min signifikant und am Ende der Inkubation um 225 % gegenüber der Gruppe V10 erhöht.

Mit Hungern führte erst 5 mM VPA in der Gruppe V5C50 am Inkubationsende zu einer leicht erhöhten, aber nicht signifikanten LDH-Freisetzung. In der Gruppe V10C50 bewirkte 10 mM VPA ab 210 min einen signifikanten Anstieg der LDH-Freisetzung. Sie war am Ende um 39 % erhöht. In mit V5C100 behandelten Leberzellen bewirkte 5 mM VPA ab 180 min eine signifikante Veränderung der LDH-Freisetzung. Sie war nach 270 min um 145 % erhöht. In der Gruppe V10C100 war bereits nach 150 min ein signifikanter Anstieg der LDH-Freisetzung gegenüber der Gruppe C100 zu erkennen. Dieser betrug am Inkubationsende 254 % (s. Abbildung 4.2-14).

Hungern führte beim Vergleich der Kombinationen V10C50 zu einer erhöhten LDH-Freisetzung, die ab 240 min signifikant war. In der Gruppe V5C100 verursachte Hungern ab 180 min höhere LDH-Werte als ohne Hungern, die 30 min später gegenüber der Vergleichsgruppe signifikant waren. Die LDH-Freisetzung war nach 270 min um 91 % erhöht. In der Gruppe V10C100 begann durch Hungern schon ab 150 min eine erhöhte und ausgeprägte LDH-Freisetzung, die ab dem Zeitpunkt 180 min signifikant war. Der Unterschied zwischen den Gruppen V10C100 ohne und mit Hungern betrug nach 270 min 155 %. (s. Abbildung 4.2-15).

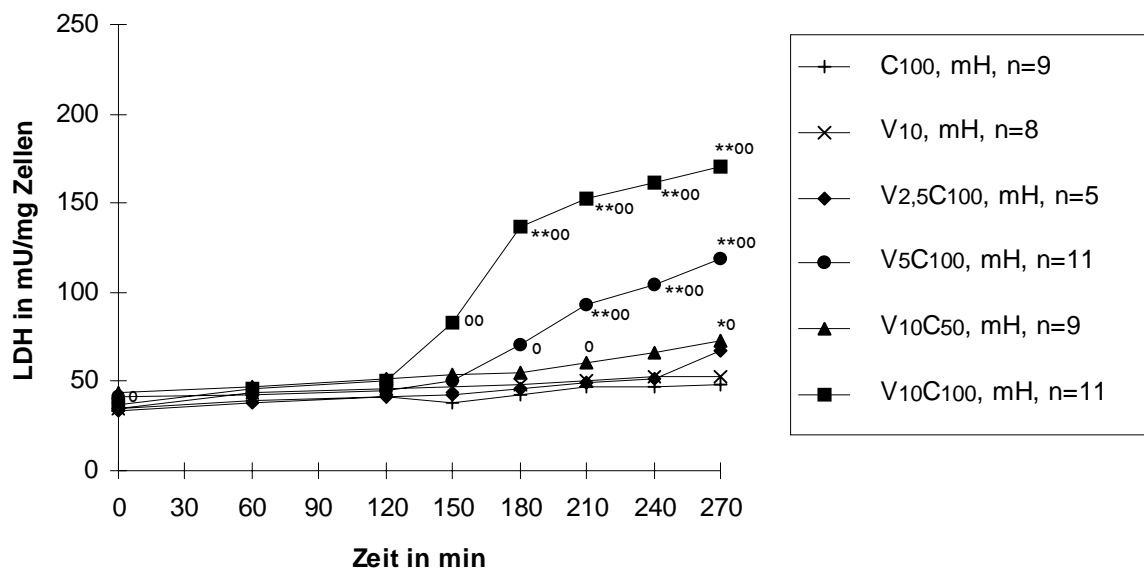


Abbildung 4.2-14: Einfluß von VPA bzw. CuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf die LDH-Freisetzung der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mU/mg Zellen dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist jeweils nur eine CuOOH- und eine VPA-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von CuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber CuOOH allein (° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$)

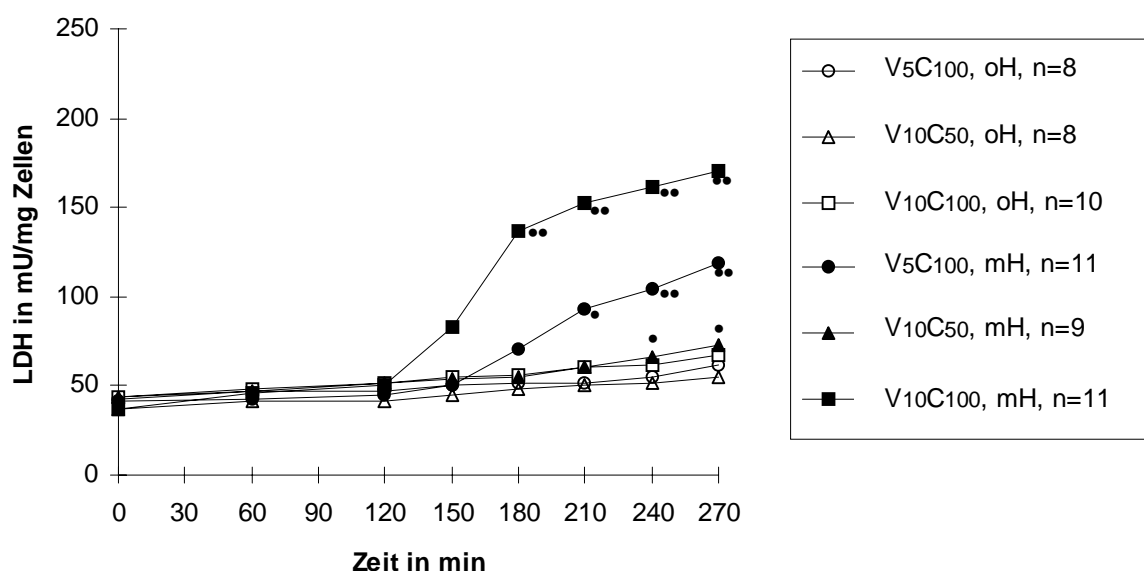


Abbildung 4.2-15: Einfluß des Ernährungszustandes auf die LDH-Freisetzung der Hepatozyten bei kombinierter VPA-CuOOH-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mU/mg Zellen dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$, •• $p < 0,01$)

t-BuOOH (s. Tabellen 9-5 und 9-6)

Ohne Hungern waren bei den Kombinationsbehandlungen mit VPA und *t*-BuOOH keine signifikanten Veränderungen gegenüber den nur mit *t*-BuOOH- oder nur mit VPA-behandelten Leberzellen festzustellen (s. Abbildung 4.2-17).

Mit Hungern war in der Gruppe V1T400 durch 400 μ M *t*-BuOOH ab 210 min eine erhöhte Freisetzung von LDH zu beobachten. In der Gruppe V10T200 bewirkte 200 μ M *t*-BuOOH noch keine signifikante Erhöhung der LDH-Freisetzung gegenüber der Gruppe V10. Sie stieg ab 240 min leicht an. *t*-BuOOH verursachte in der Kombination V10T400 ab 210 min Inkubation eine steile Erhöhung der LDH-Freisetzung, die aber erst ab dem Zeitpunkt 240 min signifikant und nach 270 min um 347 % gegenüber der Gruppe V10 erhöht war.

In der Gruppe V10T200 mit Hungern verursachte VPA eine nicht signifikante Erhöhung der LDH-Freisetzung gegenüber der Behandlung mit T200. Sowohl in der Kombination V1T400 als auch V10T400 führte VPA ab dem Probenentnahmezeitpunkt 210 min zu einer signifikanten LDH-Freisetzung, wobei 1 mM VPA nach 270 min eine Erhöhung um 97 % und 10 mM VPA um 398 % bewirkte (s. Abbildung 4.2-16).

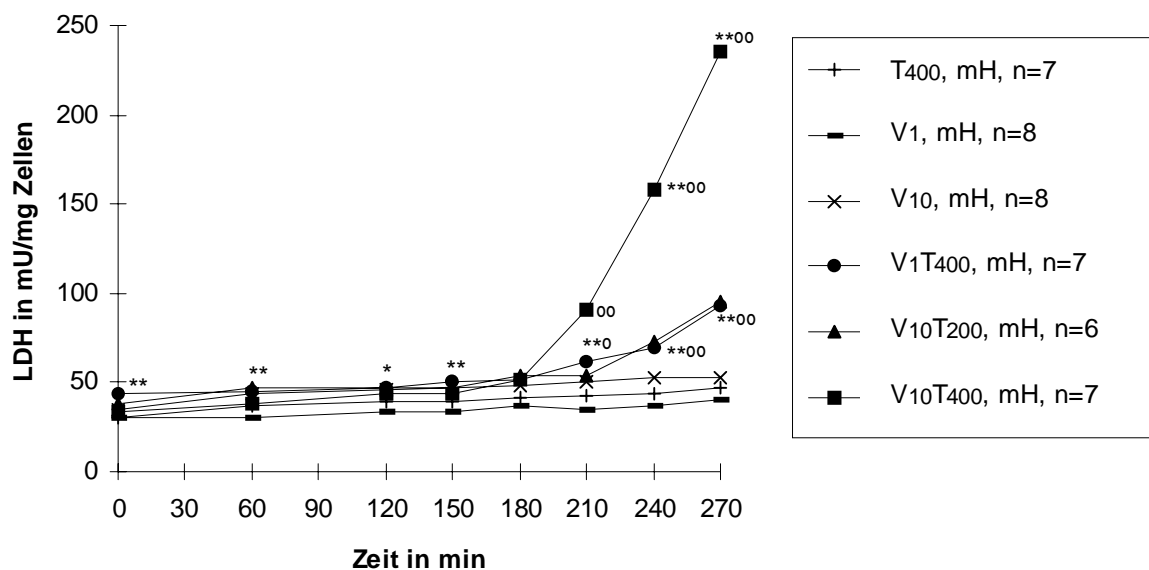


Abbildung 4.2-16: Einfluß von VPA bzw. *t*-BuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf die LDH-Freisetzung der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mU/mg Zellen dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. *t*-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist nur eine *t*-BuOOH-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von *t*-BuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber *t*-BuOOH allein (° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$)

Der Ernährungszustand spielte bei der Kombination V10T200 nur in der letzten Stunde der Inkubation mit einer signifikant höheren LDH-Freisetzung durch Hungern am Inkubationsende eine Rolle. Bei den Gruppen V1T400 und V10T400 war in Leberzellen von hungrigen Tieren ab dem Zeitpunkt 210 min eine signifikant erhöhte LDH-Freisetzung vorhanden. Sie war vor allem mit 10 mM VPA stark ausgeprägt und lag hier am Ende der Inkubation mit Hungern um 368 % höher (s. Abbildung 4.2-17).

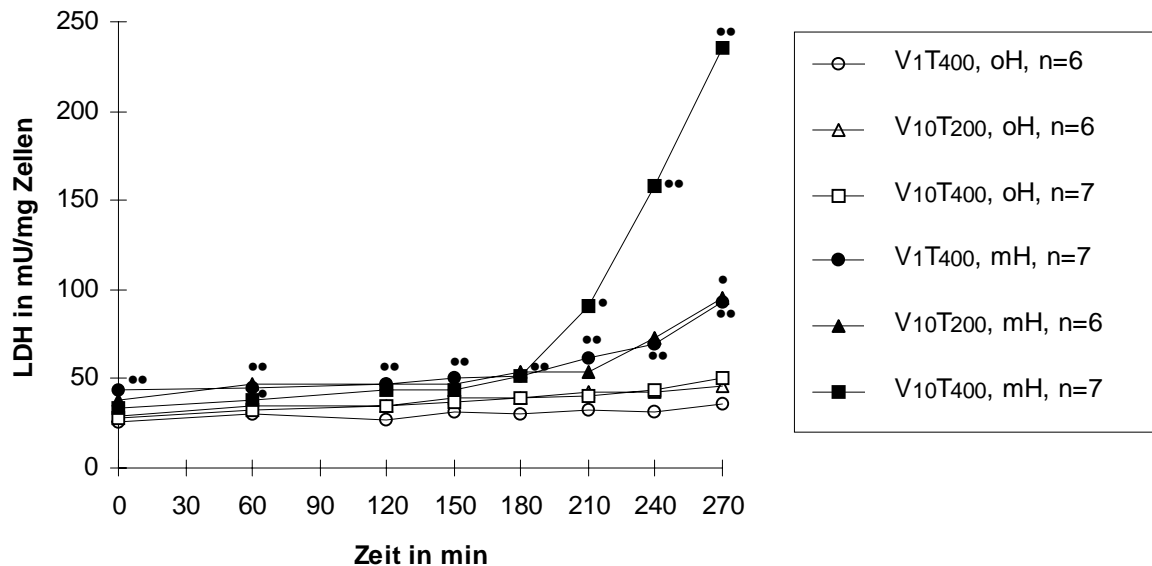


Abbildung 4.2-17: Einfluß des Ernährungszustandes auf die LDH-Freisetzung der Hepatozyten bei kombinierter VPA-t-BuOOH-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mU/mg Zellen dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von t-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• p<0,05, •• p<0,01)

BrH (s. Tabellen 9-5 und 9-6)

Ohne Hungern hatte 500 µM BrH, abweichend von den Trypanblautest-Werten in den Gruppen B500V1 und B500V10, keinen Einfluß auf die LDH-Freisetzung der Leberzellen.

In Leberzellen von nicht hungrigen Tieren wurde in der Gruppe B500V1 durch VPA keine Veränderung der LDH-Abgabe festgestellt, wohingegen VPA in der Gruppe B500V10 ab 210 min eine geringgradige, aber signifikant erhöhte LDH-Freisetzung bedingte, die nach 270 min um 29 % höher als in der Gruppe B500 war (s. Abbildung 4.2-18).

Mit Hungern wurde in der Gruppe B500V1 durch BrH ab 210 min eine leicht erhöhte Freisetzung von LDH beobachtet. In der Kombination B500V10 verursachte BrH ab dem Zeitpunkt 210 min eine signifikante LDH-Abgabe, die nach 270 min um 130 % im Vergleich zur Gruppe V10 erhöht war.

Beim Vergleich der Gruppen B500V1 und B500 mit Hungern ergaben sich durch VPA am Inkubationsende signifikant erhöhte LDH-Werte (29 %). In der Gruppe B500V10 führte VPA bereits nach 180 min zu einer signifikanten Steigerung der LDH-Freisetzung, die nach 270 min um 127 % über der Gruppe B500 lag (s. Abbildung 4.2-18).

Der Ernährungszustand verursachte in den Gruppen B500V1 und B500V10 zu fast allen Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied in der LDH-Freisetzung. Diese war jedoch nur mit 10 mM VPA mit Hungern ab dem Zeitpunkt 210 min entscheidend ausgeprägt und betrug nach 270 min 111 % (s. Abbildung 4.2-18).

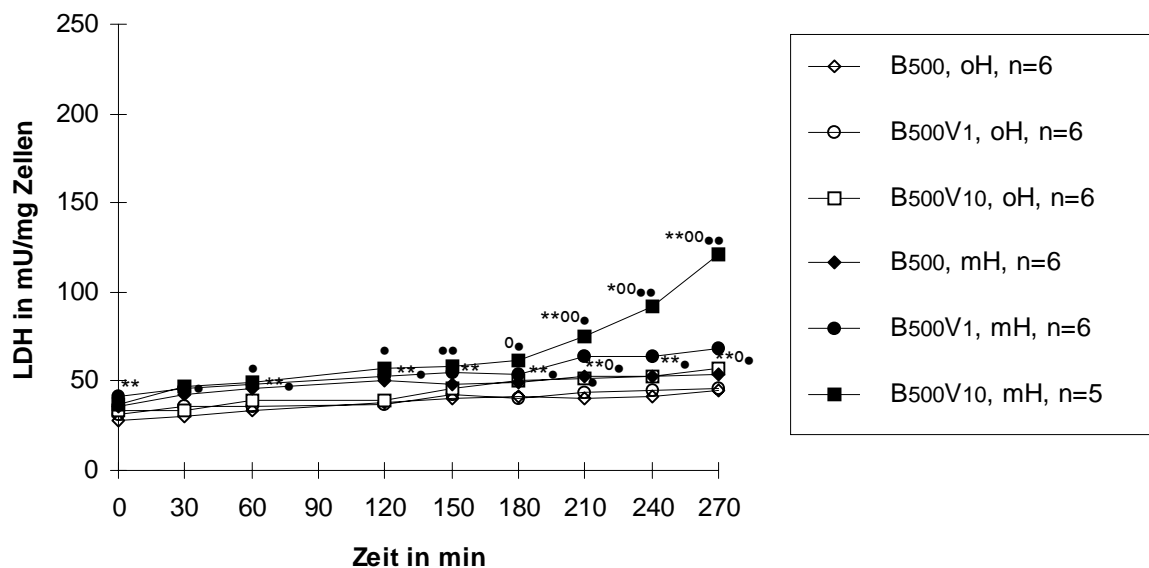


Abbildung 4.2-18: Einfluß von VPA bzw. BrH und des Ernährungszustandes auf die LDH-Freisetzung der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mU/mg Zellen dargestellt.

Zugabe von DMFA bzw. Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min

Wegen der Übersichtlichkeit sind die VPA-Vergleichsgruppen nicht dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von BrH bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber BrH allein (° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$)

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$, •• $p < 0,01$)

4.2.4.3 Intrazellulärer Kaliumgehalt

CuOOH (s. Tabellen 9-7 und 9-8)

Ohne Hungern verursachte weder CuOOH noch VPA in allen untersuchten VPA-CuOOH-Kombinationen eine Verminderung des K^+ -Gehaltes der Leberzellen (s. Abbildung 4.2-20).

Mit Hungern verursachte erst 100 μM CuOOH in der Gruppe V5C100 zu den Zeitpunkten 210 und 270 min signifikant niedrigere K^+ -Werte, die nach 270 min um 27 % vermindert waren.

Der Verlust von intrazellulärem Kalium durch CuOOH war in der Gruppe V10C100 schon ab 150 min mit 45 % stark signifikant ausgeprägt. Am Inkubationsende betrug er 69 %.

Mit Hungern bewirkte VPA in den Gruppen V5C50 und V10C50 nur einen leichten K⁺-Verlust. Nur in der Gruppe V10C100 führte VPA zu einer starken K⁺-Gehaltsverminderung. Hier fiel der K⁺-Gehalt in den ersten 30 min nach CuOOH-Zugabe steil ab und war ab dem Zeitpunkt 150 min signifikant und nach 270 min um 71 % verringert (s. Abbildung 4.2-19).

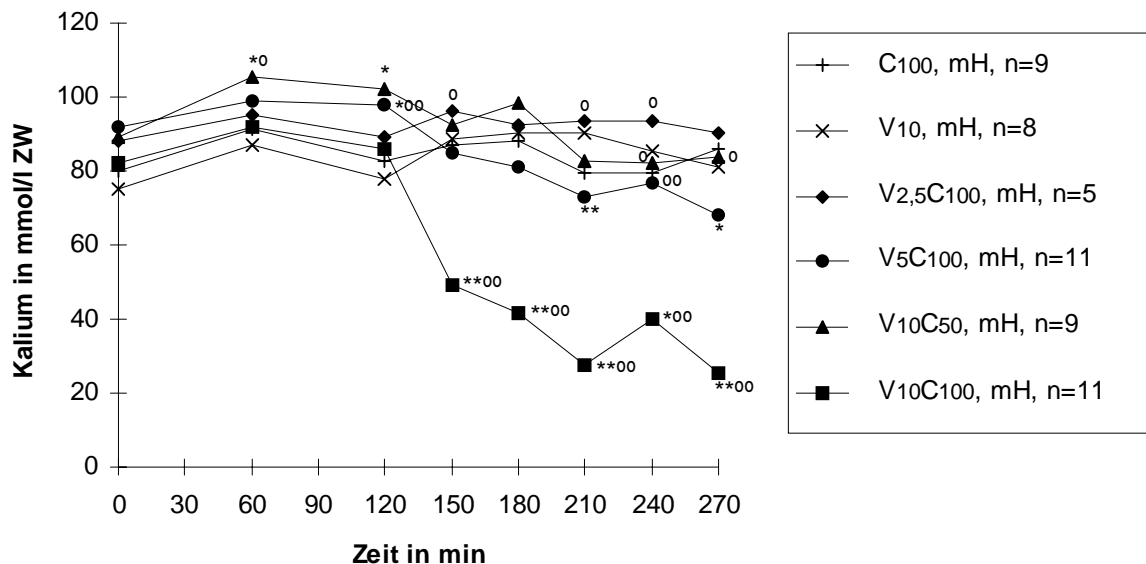


Abbildung 4.2-19: Einfluß von VPA bzw. CuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf den intrazellulären K⁺-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist jeweils nur eine CuOOH- und eine VPA-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von CuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* p<0,05, ** p<0,01)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber CuOOH allein (° p<0,05, °° p<0,01)

Hungern führte nur bei der Gruppe V10C100 ab 150 min Inkubation zu einem starken signifikanten K⁺-Verlust im Vergleich zu ohne Hungern. Nach 270 min Inkubation war der K⁺-Gehalt durch Hungern um 73 % vermindert. Der Einfluß von Hungern hinsichtlich einer K⁺-Gehaltsverminderung (s. Abschnitte 4.2.1.3, 4.2.2.3 und 4.2.3.3) bereits vor der CuOOH-Zugabe machte sich nur in der Gruppe V10C100 bemerkbar (s. Abbildung 4.2-20).

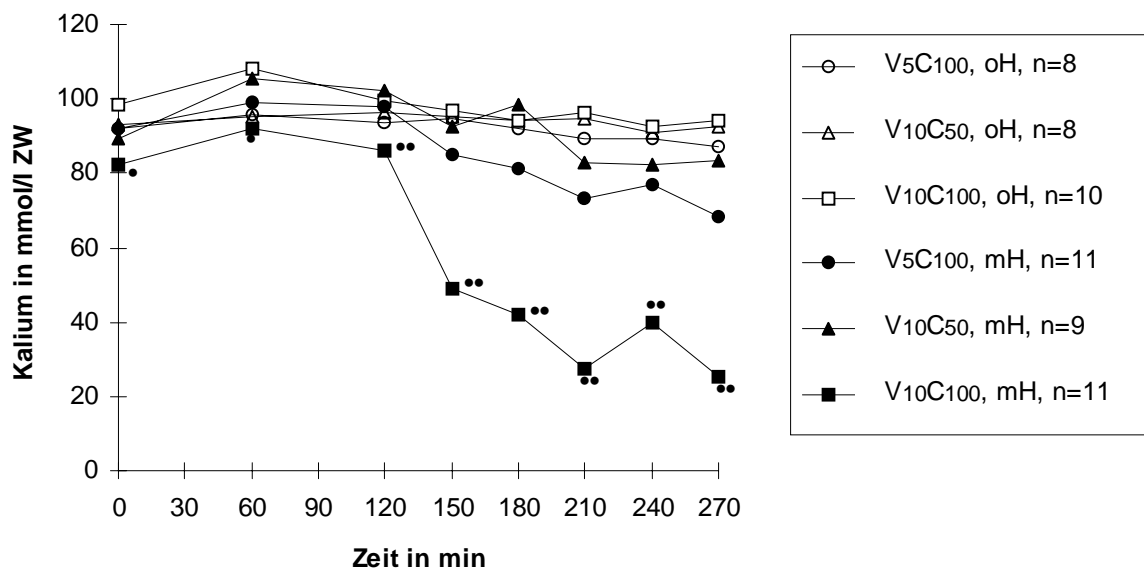


Abbildung 4.2-20: Einfluß des Ernährungszustandes auf den intrazellulären K^+ -Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter VPA-CuOOH-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$, •• $p < 0,01$)

t-BuOOH (s. Tabellen 9-7 und 9-8)

Ohne Hungern war nur in der Gruppe V10T400 durch *t*-BuOOH der K^+ -Gehalt ab dem Zeitpunkt 180 min signifikant verringert. Er war nach 270 min um 29 % vermindert.

VPA hatte in VPA-*t*-BuOOH-Gruppen ohne Hungern keinen Einfluß (s. Abbildung 4.2-22).

Mit Hungern wurde durch 400 μ M *t*-BuOOH in der Gruppe V1T400 30 min nach Zugabe ein signifikant niedrigerer K^+ -Gehalt ermittelt. Dieser war nach 270 min um 47 % vermindert. Die Menge 200 μ M *t*-BuOOH hatte in der Kombination V10T200 ab dem Zeitpunkt 180 min einen signifikanten K^+ -Verlust zur Folge. Nach 270 min war der K^+ -Gehalt um 43 % vermindert. Die Auswirkung von 400 μ M *t*-BuOOH in der Kombination V10T400 war ausgeprägt und ab dem Zeitpunkt 150 min signifikant. Am Inkubationsende lag eine Reduktion von Kalium um 79 % vor.

Die Behandlung mit 10 mM VPA führte in der Kombination V10T200 mit Hungern ab dem Zeitpunkt 150 min zu einer Verminderung des K^+ -Gehaltes. Dieser sank allmählich weiter. Die Verminderung war ab 210 min signifikant und betrug am Ende 49 %. VPA bewirkte sowohl in der Menge 1 mM als auch 10 mM in den Gruppen V1T400 und V10T400 ab dem Zeitpunkt 150 min eine signifikante Verminderung des K^+ -Gehaltes. Der K^+ -Gehalt war am Ende der Inkubation gegenüber der Gruppe T400 bei der zuerst genannten Kombination um 45 % und bei der zuletzt genannten um 80 % vermindert (s. Abbildung 4.2-21).

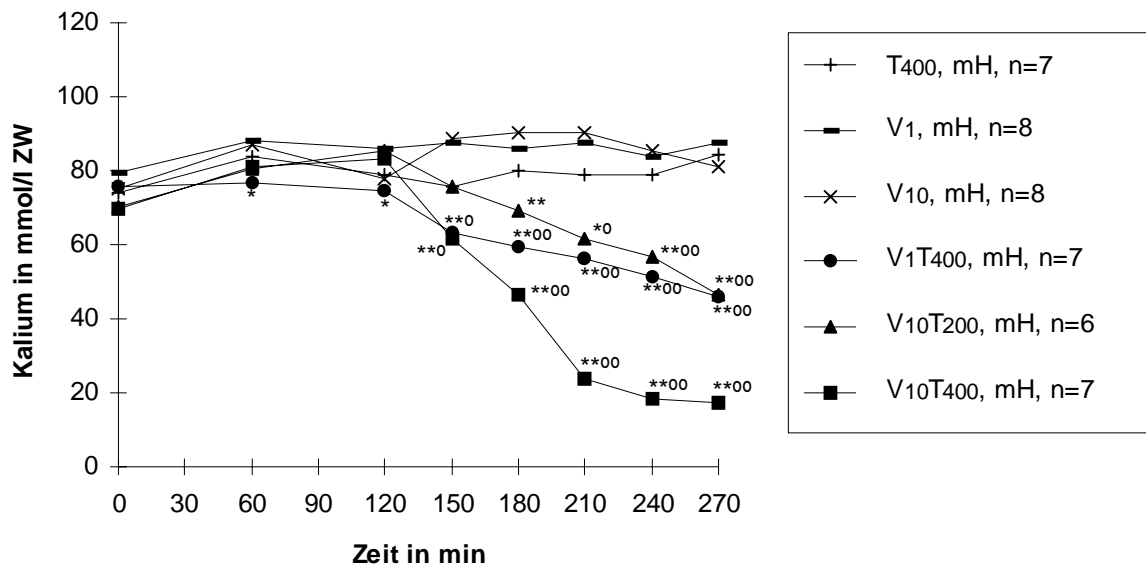


Abbildung 4.2-21: Einfluß von VPA bzw. *t*-BuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf den intrazellulären K^+ -Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. *t*-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist nur eine *t*-BuOOH-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von *t*-BuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

⁰, ⁰⁰ signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber *t*-BuOOH allein (⁰ $p < 0,05$, ⁰⁰ $p < 0,01$)

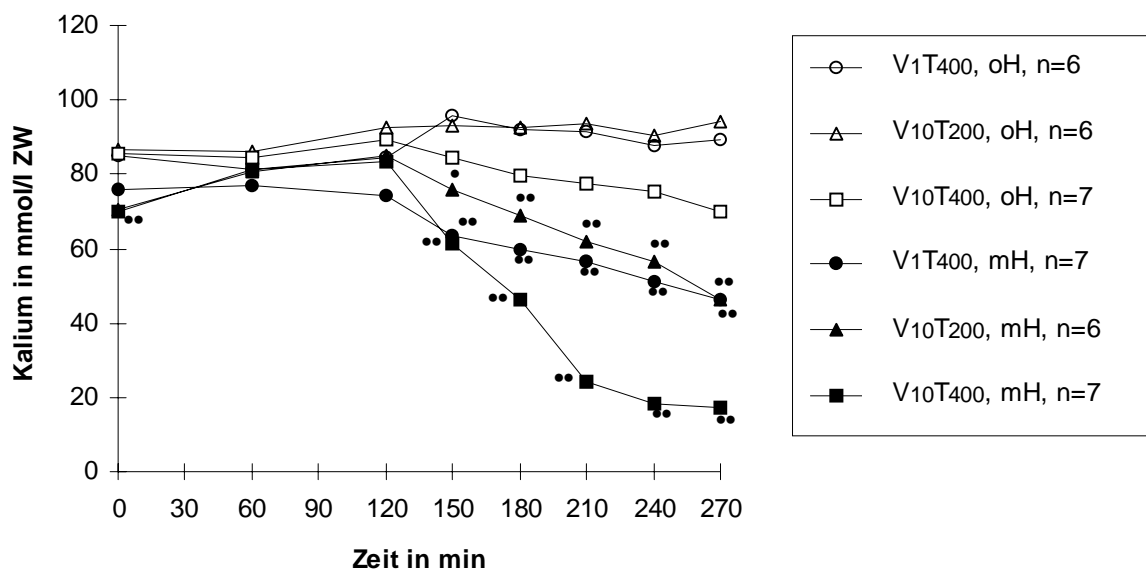


Abbildung 4.2-22: Einfluß des Ernährungszustandes auf den intrazellulären K^+ -Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter VPA-*t*-BuOOH-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von *t*-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$, •• $p < 0,01$)

Alle Behandlungen mit t-BuOOH führten ab dem Probenentnahmezeitpunkt 150 min zu signifikanten Unterschieden zwischen den gleich behandelten Leberzellen von unterschiedlich ernährten Ratten. Dabei wurden durch Hungern am Inkubationsende für die Kombination V1T400 um 48 %, für V10T200 um 51 % und für V10T400 um 75 % verminderte K⁺-Gehalte ermittelt (s. Abbildung 4.2-22).

BrH (s. Tabellen 9-7 und 9-8)

Weder BrH noch VPA hatten bei BrH-VPA-Behandlung ohne Hungern einen Einfluß.

Mit Hungern führte die Vorbehandlung mit 500 µM BrH nur in der Gruppe B500V10 ab dem Zeitpunkt 210 min zu einem signifikanten K⁺-Verlust. Die Verringerung des K⁺-Gehaltes betrug nach 270 min Inkubation 34 %.

Beim Vergleich der Gruppen B500V10 und B500 mit Hungern bewirkte VPA ab dem Zeitpunkt 210 min eine signifikante Verminderung des K⁺-Gehaltes. Diese betrug am Ende der Inkubation 40 % (s. Abbildung 4.2-23).

Hungern verursachte nur in der Gruppe B500V10 in den letzten eineinhalb Stunden einen signifikanten K⁺-Verlust gegenüber der gleichen Behandlung ohne Hungern. Nach 270 min war der K⁺-Gehalt um 40 % vermindert (s. Abbildung 4.2-23).

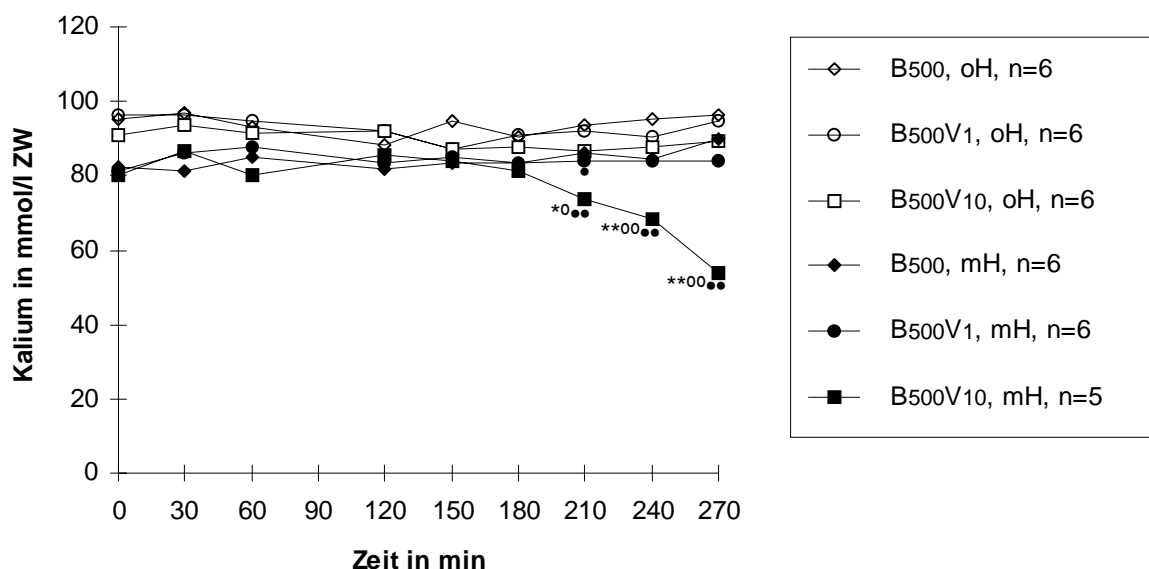


Abbildung 4.2-23: Einfluß von VPA bzw. BrH und des Ernährungszustandes auf den intrazellulären K⁺-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter BrH-VPA-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min

Wegen der Übersichtlichkeit sind die VPA-Vergleichsgruppen nicht dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von BrH bei Kombination gegenüber VPA allein (* p<0,05, ** p<0,01)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber BrH allein (° p<0,05, °° p<0,01)

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• p<0,05, •• p<0,01)

4.2.4.4 Intrazellulärer Natriumgehalt

CuOOH (s. Tabellen 9-9 und 9-10)

Ohne Hungern zeigte nur 100 μM CuOOH bei der Kombination V10C100, beginnend mit dem Zeitpunkt 150 min, eine signifikante Erhöhung des Na^+ -Gehaltes. Dieser war nach 270 min um 62 % erhöht.

Ohne Hungern führte die Behandlung mit 10 mM VPA in der Gruppe V10C50 zu einer leichten Erhöhung der Na^+ -Werte, die zu den Zeitpunkten 210 min und 270 min signifikant war. Diese hohe VPA-Konzentration verursachte in der Gruppe V10C100 eine Erhöhung des Na^+ -Gehaltes, die nach 150 min Inkubation signifikant war und nach 270 min 71 % betrug (s. Abbildung 4.2-25).

Mit Hungern führte die Behandlung mit 100 μM CuOOH in den Gruppen V2,5C100 und V5C100 zu den Zeitpunkten 240 und 270 min zu einer leichten signifikanten Na^+ -Gehaltserhöhung. In der Gruppe V10C50 verursachte 50 μM CuOOH ab dem Zeitpunkt 180 min eine signifikante Na^+ -Gehaltserhöhung gegenüber der Behandlung mit 10 mM VPA allein. Diese betrug am Ende der Inkubation 148 %. In der Gruppe V10C100 war die 85%ige Erhöhung des Na^+ -Gehaltes nach 150 min und die 50%ige nach 270 min durch 100 μM CuOOH nicht signifikant gegenüber der Gruppe V10.

In der Kombination V5C50 mit Hungern führte 5 mM VPA zum Zeitpunkt 270 min zu signifikant erhöhten Na^+ -Werten. In der Gruppe V10C50 war der Anstieg von intrazellulärem Natrium ab 150 min Inkubation im Vergleich zur Gruppe C50 signifikant und stark ausgeprägt. So war der Na^+ -Gehalt nach 270 min um 208 % erhöht. In der Gruppe V5C100 führte VPA ab 150 min zu einer Erhöhung des Na^+ -Gehaltes, die am Inkubationsende gegenüber der Gruppe C100 signifikant war. Der Na^+ -Gehalt war um 118 % erhöht. Durch 10 mM VPA wurden in der Kombination V10C100 ab 150 min signifikant höhere Na^+ -Werte festgestellt, die nach 270 min Inkubation um 146 % erhöht waren (s. Abbildung 4.2-24).

Hungern führte in der Gruppe V5C50 zum letzten Zeitpunkt zu einer signifikanten Na^+ -Gehaltserhöhung gegenüber der gleichen Behandlungsgruppe ohne Hungern. Dagegen rief Hungern in der Gruppe V5C100 schon ab 150 min signifikant höhere Na^+ -Werte hervor. Die Kombination V10C50 verursachte, durch Hungern bedingt, ab dem Zeitpunkt 0 min signifikant höhere Na^+ -Werte. Diese stiegen nach Zugabe von CuOOH nur mit Hungern stark an und waren am Inkubationsende gegenüber ohne Hungern um 171 % erhöht. In den Kombinationen V10C100 wurde sowohl mit als auch ohne Hungern nach CuOOH-Zugabe eine Erhöhung des Na^+ -Gehaltes ermittelt. Trotzdem war mit Hungern zum Zeitpunkt 150 min ein signifikant höherer Wert im Vergleich zu ohne Hungern vorhanden (s. Abbildung 4.2-25).

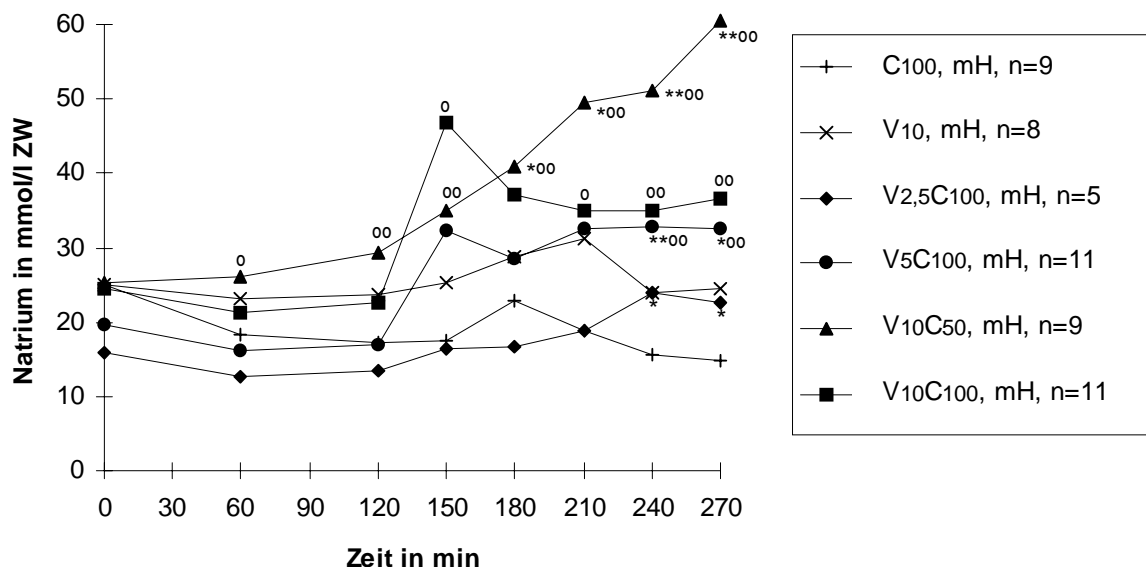


Abbildung 4.2-24: Einfluß von VPA bzw. CuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf den intrazellulären Na⁺-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist jeweils nur eine CuOOH- und eine VPA-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von CuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* p<0,05, ** p<0,01)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber CuOOH allein (° p<0,05, °° p<0,01)

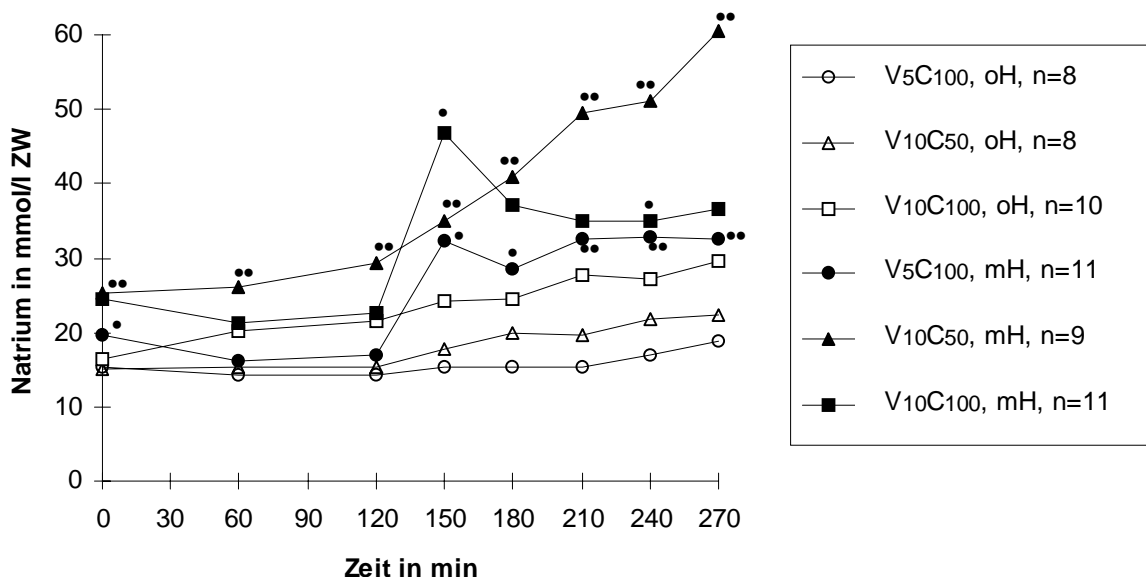


Abbildung 4.2-25: Einfluß des Ernährungszustandes auf den intrazellulären Na⁺-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter VPA-CuOOH-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• p<0,05, •• p<0,01)

t-BuOOH (s. Tabellen 9-9 und 9-10)

Ohne Hungern verursachte 400 μM t-BuOOH in der Gruppe V1T400 keine Veränderung des Na^+ -Gehaltes der Leberzellen. In der Gruppe V10T200 führte 200 μM t-BuOOH ab dem Zeitpunkt 180 min zu signifikant erhöhten Werten. Der Na^+ -Gehalt war am Ende um 46 % erhöht. In der Gruppe V10T400 bewirkte 400 μM t-BuOOH ab 180 min eine signifikante und ausgeprägte Na^+ -Gehaltserhöhung. Sie betrug nach 270 min Inkubation 169 %.

Die VPA-Menge 1 mM hatte in der Kombination V1T400 ohne Hungern keinen Einfluß. Die Menge 10 mM VPA verursachte in der Gruppe V10T400 ab dem Zeitpunkt 150 min eine signifikante Erhöhung des Na^+ -Gehaltes, der bis zum Ende der Inkubation gegenüber der Gruppe T400 um 261 % anstieg (s. Abbildung 4.2-27).

Mit Hungern verursachte 400 μM t-BuOOH in der Gruppe V1T400 eine Stunde nach t-BuOOH-Zugabe signifikant erhöhte Na^+ -Werte. Sie waren nach 270 min um 174 % erhöht. Die Behandlung mit 200 μM t-BuOOH führte in der Kombination V10T200 ab 240 min Inkubation zu einer signifikanten Na^+ -Gehaltserhöhung (nach 270 min 139 %). In der Gruppe V10T400 bewirkte t-BuOOH zu den Zeitpunkten 180 und 210 min eine starke signifikante Erhöhung des Na^+ -Gehaltes. Der Na^+ -Wert fiel danach schnell ab. So war er gegenüber der Gruppe V10 nach 180 min um 96 % erhöht und nach 270 min sogar um 4 % verringert.

Mit Hungern führte 10 mM VPA in der Gruppe V10T200 ab dem Zeitpunkt 150 min zu einer signifikanten Erhöhung des Na^+ -Gehaltes. Dieser stieg bis zum Zeitpunkt 270 min um 261 % stark an. Sowohl 1 als auch 10 mM VPA hatten in den Gruppen V1T400 bzw. V10T400 einen signifikanten Einfluß auf den Na^+ -Gehalt der Leberzellen. Die Menge 1 mM VPA bewirkte in der Gruppe V1T400 ab 180 min eine starke signifikante Erhöhung des Na^+ -Gehaltes. Der Wert war nach 270 min um 183 % erhöht. In der Gruppe V10T400 setzte der steile Na^+ -Anstieg durch VPA bereits zum Zeitpunkt 150 min signifikant ein. Der Na^+ -Gehalt erreichte seinen höchsten Wert zum Zeitpunkt 210 min, war hier gegenüber der Gruppe T400 um 246 % signifikant erhöht und fiel von da an stark ab, so daß der Wert nach 270 min Inkubation nur noch um 22 % gegenüber T400 erhöht war (s. Abbildung 4.2-26).

Hungern führte bei der Kombination V1T400 im Vergleich zur gleichen Kombination ohne Hungern ab 180 min zur signifikanten Na^+ -Gehaltserhöhung, die am Inkubationsende 231 % betrug. In der Gruppe V10T200 verursachte Hungern bis zum Zeitpunkt 210 min einen starken signifikanten Na^+ -Anstieg. Der Na^+ -Wert war nach 270 min gegenüber der gleichen Gruppe ohne Hungern um 118 % erhöht. Da die Behandlung V10T400 ohne Hungern bis zum Ende zum Na^+ -Anstieg führte und die Na^+ -Werte mit Hungern nach 210 min sanken, waren mit Hungern nur zu den Zeitpunkten 150 und 180 min signifikant höhere Werte im Vergleich zur Gruppe V10T400 ohne Hungern vorhanden (nach 180 min 72 %). Sowohl der 240-min- als auch der 270-min-Wert war mit Hungern niedriger (nach 270 min 52 %) (s. Abbildung 4.2-27).

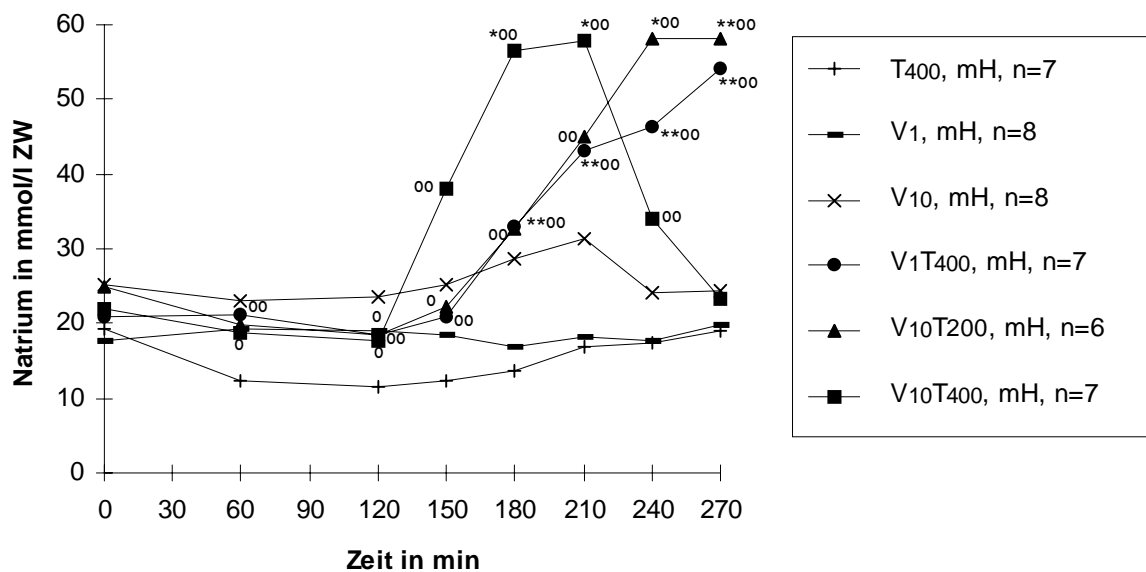


Abbildung 4.2-26: Einfluß von VPA bzw. t-BuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf den intrazellulären Na⁺-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. t-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist nur eine t-BuOOH-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von t-BuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* p<0,05, ** p<0,01)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber t-BuOOH allein (° p<0,05, °° p<0,01)

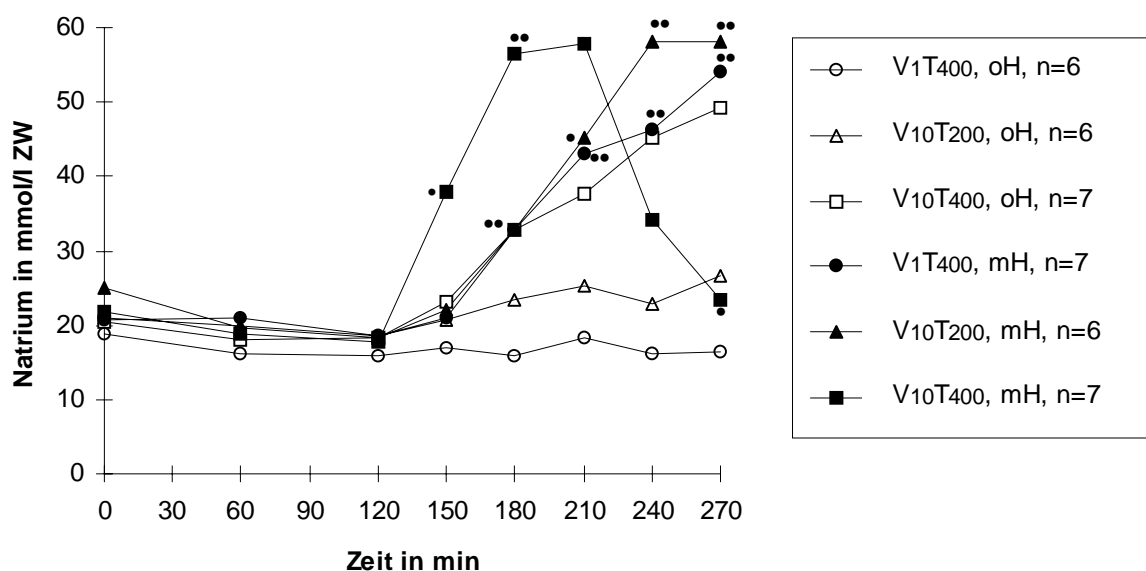


Abbildung 4.2-27: Einfluß des Ernährungszustandes auf den intrazellulären Na⁺-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter VPA-t-BuOOH-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von t-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• p<0,05, •• p<0,01)

BrH (s. Tabellen 9-9 und 9-10)

Ohne Hungern führte BrH-Vorbehandlung nur in der Kombination B500V10 ab 150 min Inkubation zu einem signifikanten Na^+ -Anstieg. Dieser betrug nach 270 min 114 %.

Ohne Hungern hatte VPA nur in der Gruppe B500V10 ab 180 min einen signifikanten Einfluß auf den Na^+ -Gehalt. Er war nach 270 min um 180 % erhöht (s. Abbildung 4.2-28).

Mit Hungern führte 500 μM BrH in der Gruppe B500V1 ab dem Zeitpunkt 240 min zu einer leichten signifikanten Erhöhung von intrazellulärem Natrium. In der Gruppe B500V10 wurde eine Na^+ -Gehaltserhöhung gegenüber der Gruppe V10 ab 150 min beobachtet. Diese war ab dem Zeitpunkt 240 min signifikant und betrug nach 270 min 85 % (s. Abbildung 4.2-28).

Mit Hungern wurde in der Gruppe B500V10 durch VPA ab 150 min ein Anstieg des Na^+ -Gehaltes ermittelt. Dieser war ab 180 min signifikant und betrug nach 270 min 83 %.

Bei BrH-Vorbehandlung wurden keine signifikanten Abweichungen zwischen den gleich behandelten Gruppen mit und ohne Hungern festgestellt. Tendenziell wurden mit Hungern in der Gruppe B500V1 ab dem Zeitpunkt 210 min und in der Gruppe B500V10 ab dem Zeitpunkt 180 min höhere Na^+ -Werte bis zum Inkubationsende im Vergleich zu ohne Hungern ermittelt (s. Abbildung 4.2-28).

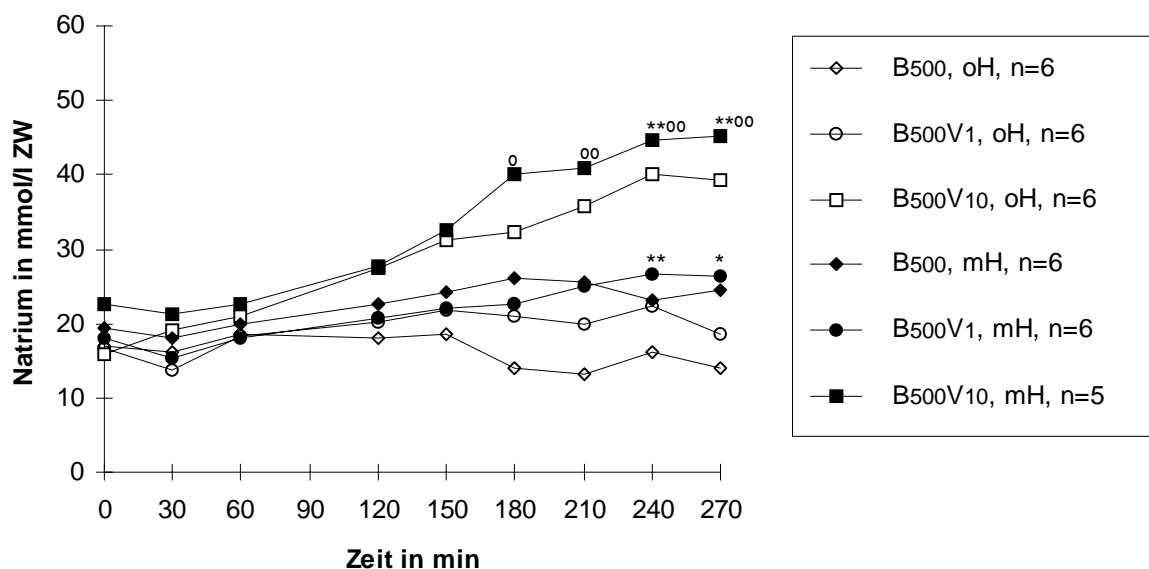


Abbildung 4.2-28: Einfluß von VPA bzw. BrH und des Ernährungszustandes auf den intrazellulären Na^+ -Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter BrH-VPA-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min

Wegen der Übersichtlichkeit sind die VPA-Vergleichsgruppen nicht dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von BrH bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber BrH allein (° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$)

4.2.4.5 Intrazellulärer GSH-Gehalt

CuOOH (s. Tabellen 9-11 und 9-12)

Ohne Hungern verursachte 100 µM CuOOH in der Kombination V1C100 ab 210 min signifikant niedrigere GSH-Werte gegenüber der Gruppe V1 mit einer Verminderung um 20 % zum letzten Zeitpunkt. Nur in der Gruppe V10C50 mit der höchsten VPA-Konzentration bewirkte 50 µM CuOOH ab dem Zeitpunkt 180 min einen um ca. 10 % geringradig verminderten GSH-Gehalt. In der Gruppe V10C100 war die Verminderung von GSH im Vergleich zur Gruppe V10 ab 180 min signifikant. Es wurden nach 270 min Inkubation um 13 % niedrigere GSH-Gehalte gegenüber VPA allein festgestellt.

In den Gruppen V5C50 und V10C50 ohne Hungern verursachten 5 mM VPA ab 120 min und 10 mM VPA bereits ab 60 min nach Zugabe signifikant niedrigere GSH-Werte im Vergleich zur Gruppe C50. Bei beiden Kombinationen verminderte sich der GSH-Gehalt erst nach Zugabe von 50 µM CuOOH zu den VPA-behandelten Leberzellen erheblich. So wurde der GSH-Gehalt am Inkubationsende bei der Kombination V5C50 um 39 % und bei der Kombination V10C50 um 47 % gegenüber der Gruppe C50 vermindert. Eine ähnliche Wirkung mit Signifikanzen ab 120 min Inkubation hatte VPA auch in den Gruppen V1C100, V5C100 und V10C100 gegenüber der Gruppe C100. Die Reduktion des GSH-Gehaltes betrug durch 1 mM VPA 28 %, durch 5 mM 42 % und durch 10 mM VPA 45 % (s. Abbildung 4.2-29).

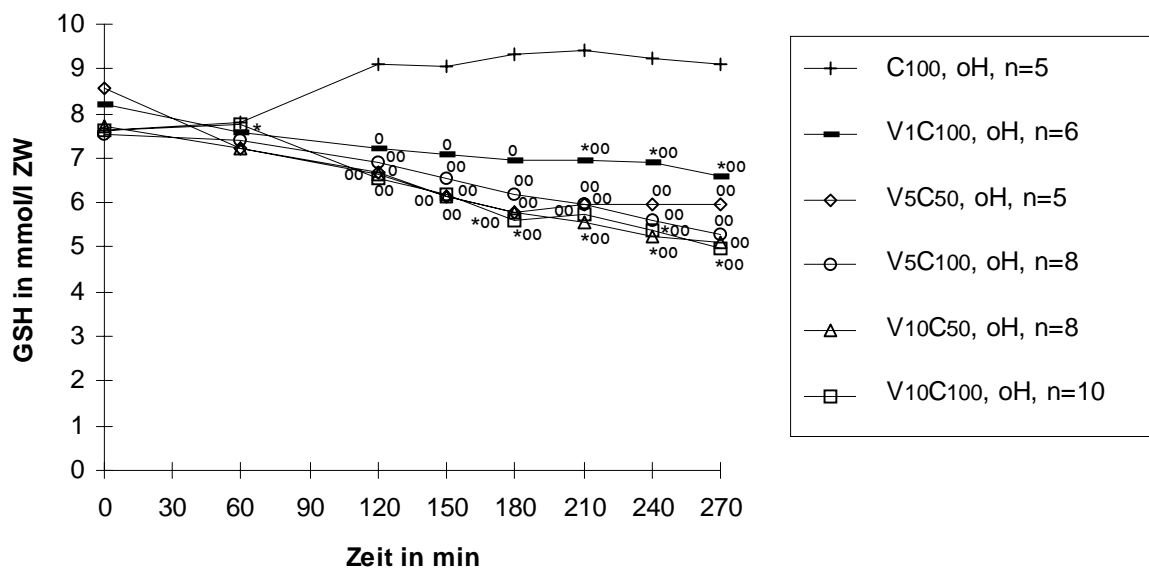


Abbildung 4.2-29: Einfluß von VPA bzw. CuOOH beim Ernährungszustand ohne Hungern auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist nur eine CuOOH- Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von CuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* p<0,05, ** p<0,01)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber CuOOH allein (° p<0,05, °° p<0,01)

Mit Hungern wurden signifikante Veränderungen im Vergleich zur jeweiligen VPA-Behandlung erst ab einer VPA-Menge von 5 mM beobachtet. Mit steigender VPA-Menge stieg der Einfluß von CuOOH dosisabhängig. In der Gruppe V5C50 verursachte 50 µM CuOOH nur zum Zeitpunkt 270 min einen um 28 % signifikant niedrigeren GSH-Gehalt. Die Menge 100 µM CuOOH führte in der Kombination V5C100 ab dem Zeitpunkt 150 min zu einer signifikanten Verminderung der GSH-Werte, die am Ende 40 % betrug. In der Gruppe V10C50 bewirkte 50 µM CuOOH nur zu den Zeitpunkten 210 und 240 min eine signifikante Verminderung von GSH. Zum letzten Zeitpunkt war der GSH-Gehalt nur um 13 % verringert, da schon 10 mM VPA allein mit Hungern einen starken GSH-Verlust verursachte. In der Gruppe V10C100 führte CuOOH ab 150 min Inkubation zu signifikantem GSH-Abfall. Er betrug am Ende 37 % gegenüber der Gruppe V10.

Mit Hungern wurde durch die Behandlung mit 1 bis 10 mM VPA sowohl in Kombination mit 50 µM CuOOH als auch in Kombination mit 100 µM CuOOH ein ähnliches dosisabhängiges Verhalten des intrazellulären GSH verursacht. Die Menge 5 mM VPA führte in der Gruppe V5C50 schon vor Zugabe von 50 µM CuOOH nach 120 min Inkubation zu einem signifikant niedrigeren GSH-Wert. Am Ende der Inkubation wurde eine Verminderung um 52 % festgestellt. Bei der Verdopplung der VPA-Menge wurden in der Gruppe V10C50 bereits nach 60 min Inkubation vor der Zugabe der gleichen CuOOH-Menge signifikant niedrigere GSH-Werte ermittelt. Nach Zugabe von 50 µM CuOOH sank der GSH-Gehalt nochmals stark ab. Am Inkubationsende wurde eine Verminderung des GSH gegenüber der Gruppe C50 um 68 % erreicht. In der Gruppe V1C100 verursachte 1 mM VPA eine Abnahme des GSH-Gehaltes, der zum Zeitpunkt 270 min um 15 % signifikant vermindert war. Die VPA-Menge 2,5 mM bewirkte in der Gruppe V2,5C100 ab dem Zeitpunkt 150 min signifikant niedrigere Werte gegenüber der Behandlungsgruppe C100. Der GSH-Gehalt war nach 270 min um 32 % vermindert. Noch stärker war die Wirkung durch 5 mM VPA in der Gruppe V5C100 ausgeprägt. Die signifikante GSH-Verminderung war nach 120 min festzustellen und betrug am Ende 56 %. Schließlich sorgte 10 mM VPA in der Gruppe V10C100 ebenfalls vor der Zugabe von CuOOH ab 60 min für signifikante Veränderungen. Der GSH-Verlust betrug zum Ende der Inkubationszeit 74 % (s. Abbildung 4.2-30).

Hungern führte bei allen mit CuOOH kombinierten Gruppen zu allen Zeitpunkten unabhängig von der verwendeten VPA- und CuOOH-Menge zu signifikant niedrigeren GSH-Gehalten der Leberzellen im Vergleich zu ohne Hungern. In der Behandlungsgruppe V1C100 betrug diese Verminderung am Ende der Inkubation 12 %. Bei einer erhöhten VPA-Menge von 5 mM VPA betrug diese Verringerung bei der Gruppe V5C50 40 % und bei der Gruppe V5C100 44 %. Lag die VPA-Menge bei 10 mM VPA, ergaben sich bei der Gruppe V10C50 GSH-Verluste von 53 % bzw. bei der Gruppe V10C100 von 65 % (s. Abbildung 4.2-31).

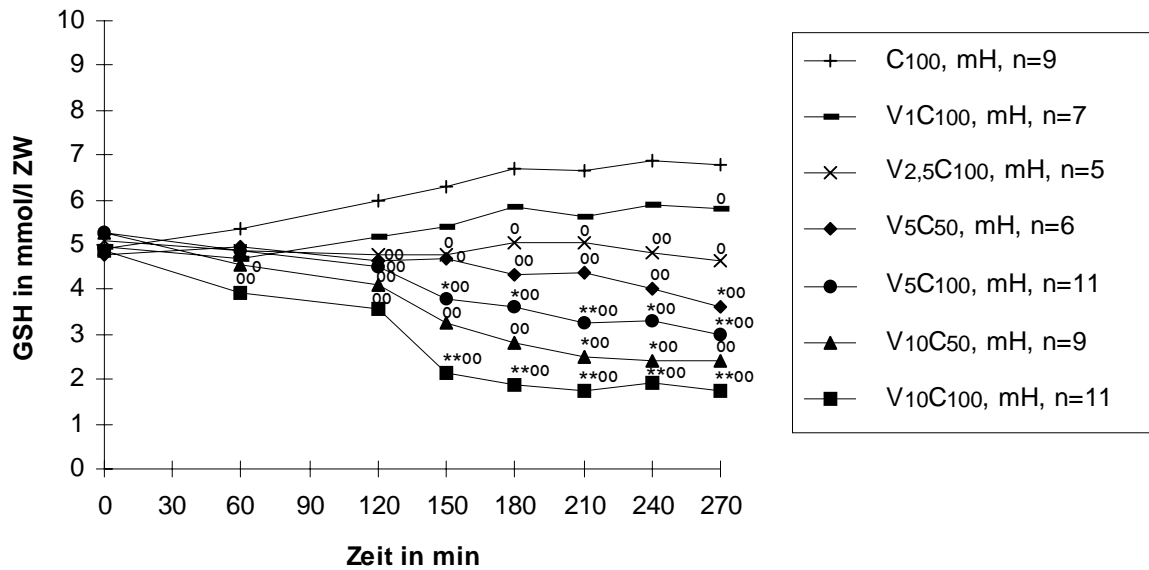


Abbildung 4.2-30: Einfluß von VPA bzw. CuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist nur eine CuOOH-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von CuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber CuOOH allein (° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$)

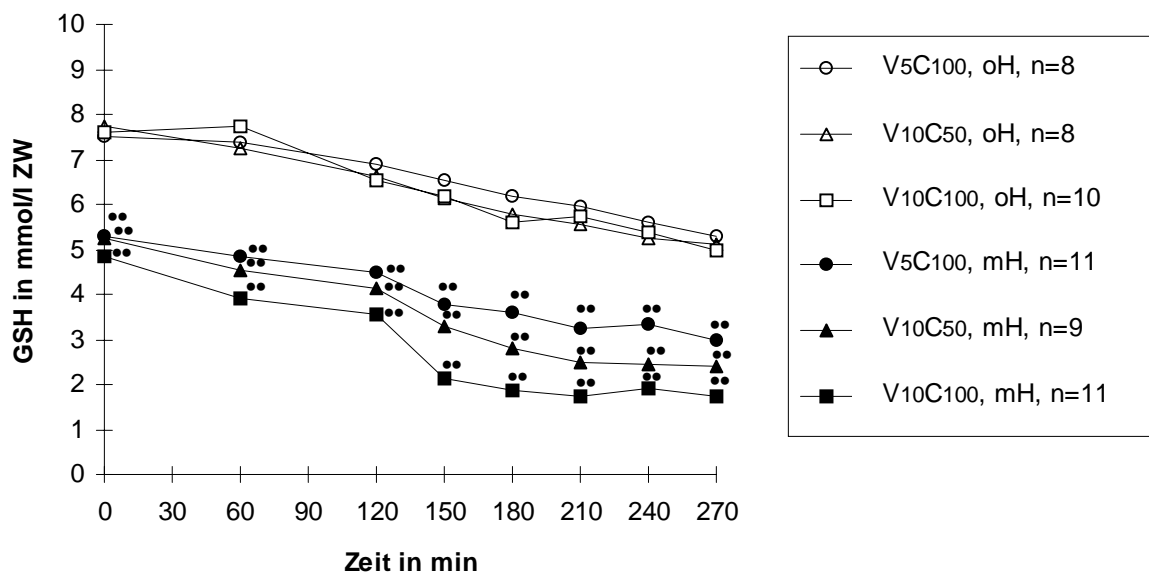


Abbildung 4.2-31: Einfluß des Ernährungszustandes auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter VPA-CuOOH-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$, •• $p < 0,01$)

t-BuOOH (s. Tabellen 9-11 und 9-12)

Ohne Hungern verursachte 400 μM t-BuOOH in der Gruppe V1T400 ab 210 min signifikant niedrigere GSH-Werte gegenüber der Gruppe V1. Die GSH-Verminderung betrug zum letzten Zeitpunkt 25 %. In den Gruppen V10T200 und V10T400 führte t-BuOOH ab 150 min dosisabhängig zu signifikant niedrigeren GSH-Werten im Vergleich zur Gruppe V10. Die Verminderungen betragen am Ende 18 % bzw. 30 %.

Ebenso, wie für CuOOH ohne Hungern festgestellt wurde, bewirkten alle getesteten VPA-t-BuOOH-Kombinationen viel niedrigere GSH-Werte im Vergleich zur jeweiligen Hydroperoxid-Behandlung allein. Der Einfluß von VPA auf den GSH-Gehalt der Leberzellen war dosisabhängig und ab 120 min signifikant. Der GSH-Verlust betrug nach 270 min in der Gruppe V1T400 35 % und in der Gruppe V10T400 58 % (s. Abbildung 4.2-32).

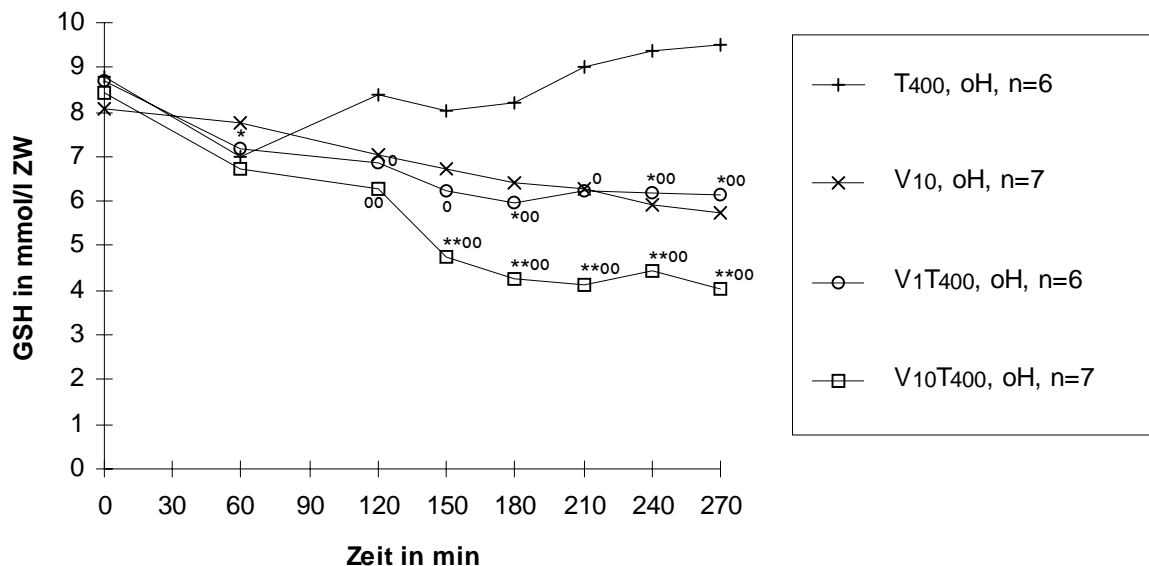


Abbildung 4.2-32: Einfluß von VPA bzw. t-BuOOH beim Ernährungszustand ohne Hungern auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. t-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist nur eine VPA-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von t-BuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber t-BuOOH allein (° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$)

Ebenso wie bei CuOOH wurde bei den VPA-t-BuOOH-Kombinationen mit Hungern durch t-BuOOH eine eindeutige Dosisabhängigkeit festgestellt. Mit 400 μM t-BuOOH wurde in der Gruppe V1T400 ein starker signifikanter GSH-Verlust nach t-BuOOH-Zugabe beobachtet, der ab dem Zeitpunkt 150 min signifikant war. Am Ende der Inkubationszeit war der GSH-Gehalt um 52 % vermindert. Die Behandlung mit 200 μM t-BuOOH führte in der Gruppe V10T200 ab

180 min Inkubation zu signifikant niedrigeren Werten. Diese waren nach 270 min Inkubation um 28% vermindert. Die Verdopplung der t-BuOOH-Menge bewirkte in der Kombination V10T400 ab 150 min eine sehr starke signifikante Verminderung von GSH. Sie betrug am Inkubationsende 55 %.

Mit Hungern verursachten alle getesteten VPA-t-BuOOH-Kombinationen im Vergleich zur Hydroperoxid-Behandlung allein viel niedrigere GSH-Werte. Diese Unterschiede waren ab dem Zeitpunkt 120 min signifikant. Die GSH-Werte waren durch VPA am Inkubationsende bei V10T200 um 72 %, bei V1T400 um 51 % und bei V10T400 um 80 % vermindert (s. Abbildung 4.2-33).

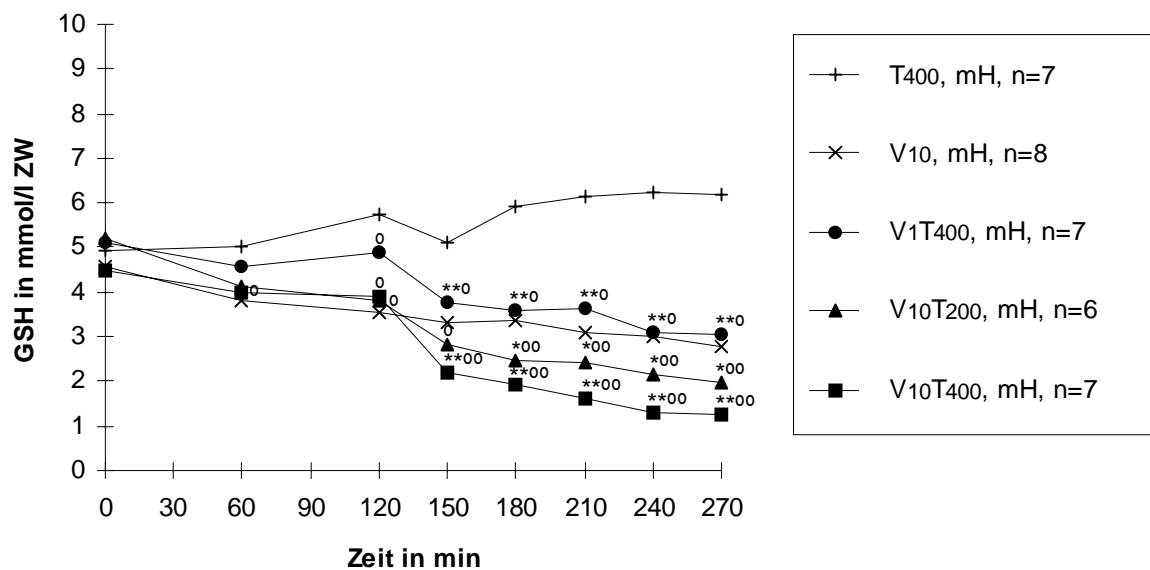


Abbildung 4.2-33: Einfluß von VPA bzw. t-BuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. t-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist nur jeweils eine t-BuOOH und eine VPA-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von t-BuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* p<0,05, ** p<0,01)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber t-BuOOH allein (° p<0,05, °° p<0,01)

Auch hier hatte der Ernährungszustand ebenso wie bei den VPA-CuOOH-Gruppen einen entscheidenden Einfluß auf den GSH-Gehalt. Dieser war in Leberzellen von hungernden Tieren zu allen Zeitpunkten signifikant niedriger als in Leberzellen von nicht hungernden Tieren. Die GSH-Verringerung betrug nach 270 min Inkubation in der Gruppe V10T200 58 %, in der Gruppe V1T400 50 % und in der Gruppe V10T400 69 % (s. Abbildung 4.2-34).

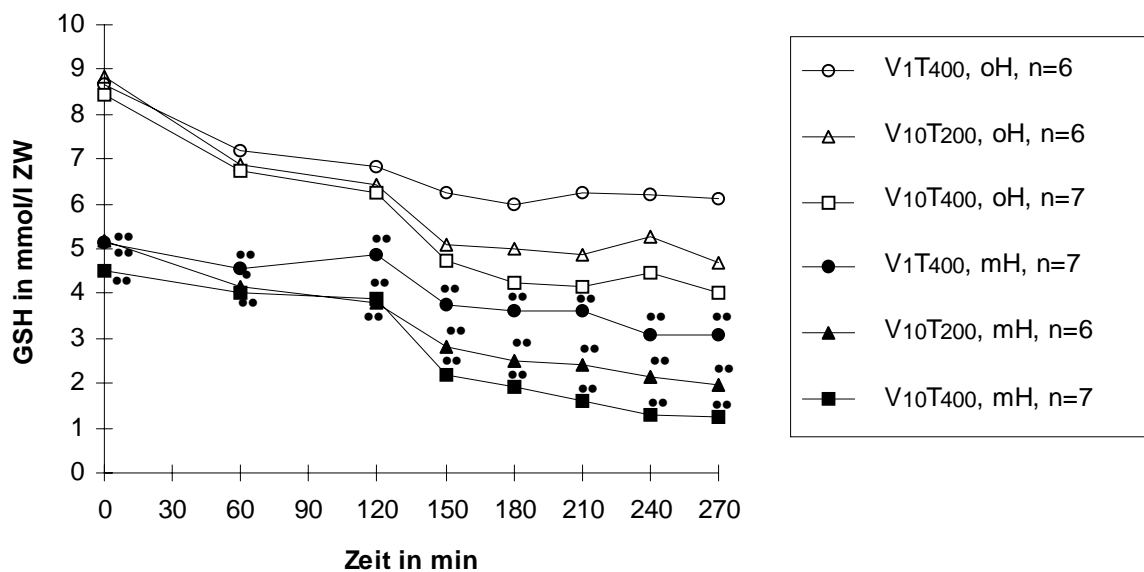


Abbildung 4.2-34: Einfluß des Ernährungszustandes auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter VPA-t-BuOOH-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von t-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$, •• $p < 0,01$)

BrH (s. Tabellen 9-11 und 9-12)

BrH als typischer GSH-Verarmer verursachte natürlich sowohl ohne als auch mit Hungern in Kombination mit VPA zu allen Zeitpunkten signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Behandlung mit 1 bzw. 10 mM VPA allein (V1 bzw. V10).

Ohne Hungern führte eine VPA-Gabe nach BrH-Vorbehandlung sofort zu einer Verminderung des GSH-Gehaltes im Vergleich zur BrH-Behandlung allein (B500). Diese war sowohl in der Gruppe B500V1 als auch B500V10 ab 60 min Inkubation signifikant. Der GSH-Verlust war bei der hohen VPA-Menge ausgeprägter. Die in allen Gruppen zu beobachtende GSH-Neubildung bzw. -Regenerierung wurde VPA-dosisabhängig verzögert. Nach 270 min war der GSH-Gehalt durch VPA in der Gruppe B500V1 um 46 % und in der Gruppe B500V10 um 61 % gegenüber der Gruppe B500 vermindert (s. Abbildung 4.2-35).

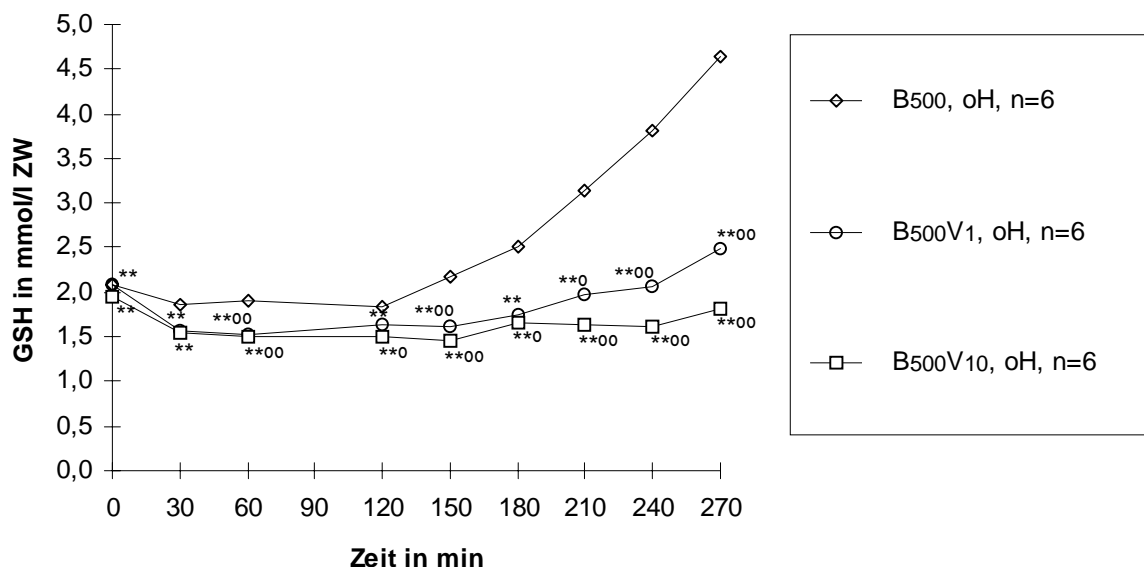


Abbildung 4.2-35: Einfluß von VPA bzw. BrH beim Ernährungszustand ohne Hungern auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min

Wegen der Übersichtlichkeit sind die VPA-Vergleichsgruppen nicht dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von BrH bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

^o, ^{oo} signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber BrH allein (^o $p < 0,05$, ^{oo} $p < 0,01$)

Mit Hungern wurde bei BrH-Vorbehandlung eine signifikante Wirkung von VPA in der Gruppe B500V1 nur zu den Zeitpunkten 240 und 270 min und in der Gruppe B500V10 zu den Zeitpunkten 210 bis 270 min beobachtet. Nach 270 min war der GSH-Gehalt in der Gruppe B500V1 um 27 % und in der Gruppe B500V10 um 46 % gegenüber der Gruppe B500 vermindert. Hier wurde ebenso wie ohne Hungern festgestellt, daß durch VPA die GSH-Neubildung bzw. -Regenerierung dosisabhängig verzögert war (s. Abbildung 4.2-36).

Der GSH-Gehalt war bei VPA-BrH-Behandlung mit Hungern zu allen Zeitpunkten signifikant niedriger als ohne Hungern. Nur nach 30 min Inkubation wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Bereits 15 min nach BrH-Vorbehandlung wurden mit Hungern in der Gruppe B500V1 um 30 % und in der Gruppe B500V10 um 27 % niedrigere GSH-Werte ermittelt. Dieser Unterschied blieb während der Inkubation bestehen. Die Werte betragen nach 270 min Inkubation 31 % bzw. 30 % (s. Abbildung 4.2-37).

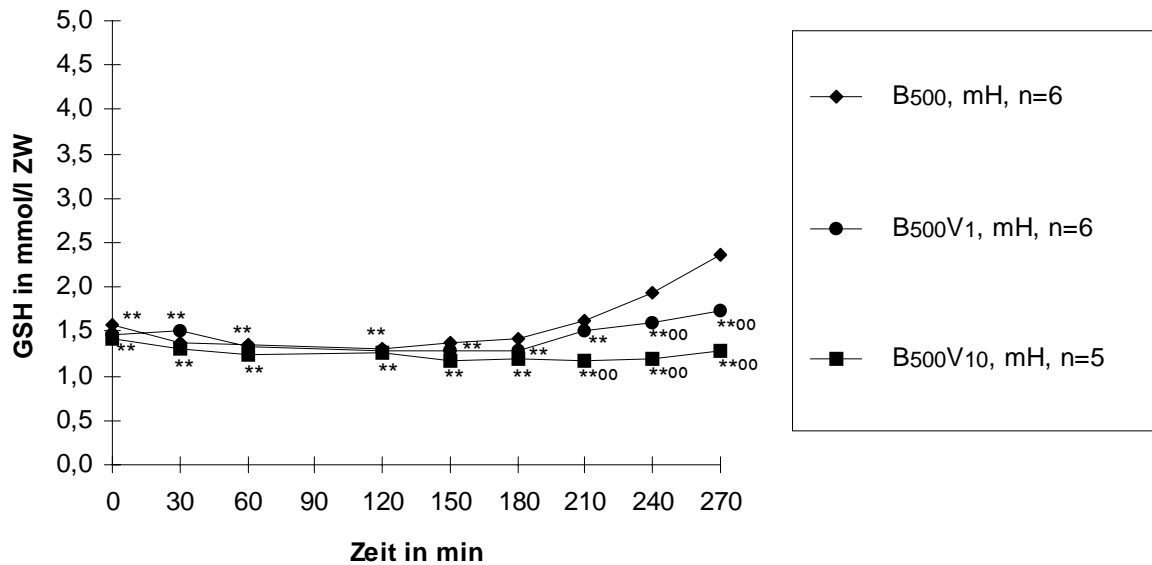


Abbildung 4.2-36: Einfluß von VPA bzw. BrH beim Ernährungszustand Hungern auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min

Wegen der Übersichtlichkeit sind die VPA-Vergleichsgruppen nicht dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von BrH bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber BrH allein (° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$)

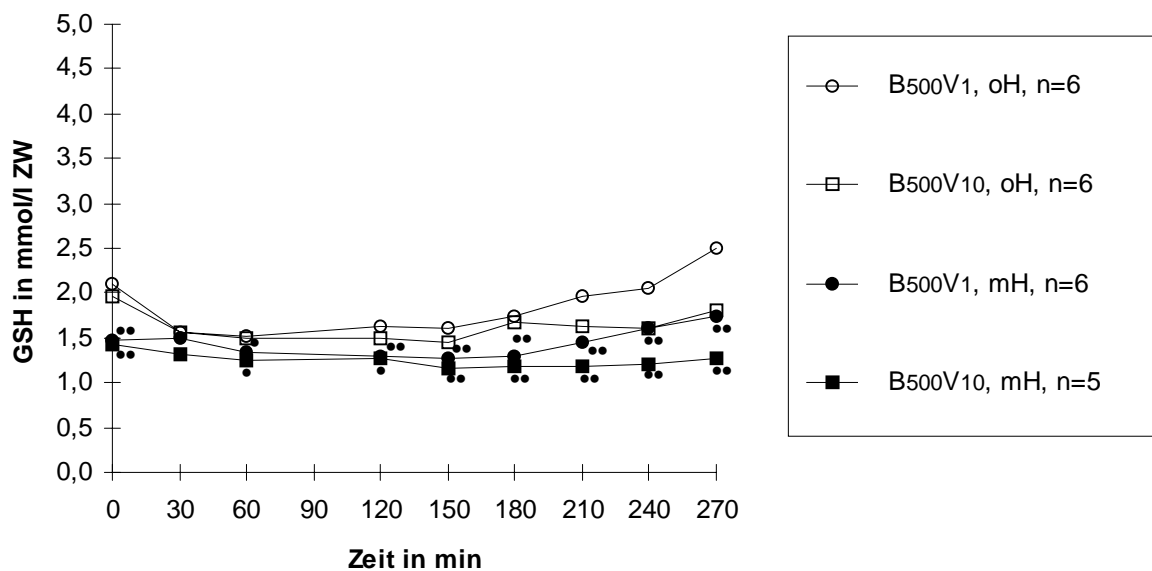


Abbildung 4.2-37: Einfluß des Ernährungszustandes auf den intrazellulären GSH-Gehalt der Hepatozyten bei kombinierter BrH-VPA-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in mmol/l ZW dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$, •• $p < 0,01$)

Die Tabelle 4.2-1 zeigt den prozentualen Anteil des GSH-Gehaltes der untersuchten Kontroll-, Prooxidantien-, VPA-, VPA-CuOOH-, VPA-t-BuOOH- und BrH-VPA-Gruppen am Ende der Inkubation im Vergleich zum initialen GSH-Gehalt beim jeweils gleichen Ernährungszustand und in den Gruppen mit Hungern im Vergleich zum initialen GSH-Gehalt der Gruppen ohne Hungern.

Tabelle 4.2-1: Veränderungen des GSH-Gehaltes im Inkubationsverlauf

Gruppen	GSH-Gehalt in % nach 270 min Inkubation		
	ohne Hungern	mit Hungern	
	gegenüber Zeitpunkt 0		
	ohne Hungern	mit Hungern	ohne Hungern ^a
Kv	131	157	80
KCT	125	159	80
C50	119	152	92
C100	119	139	83
T200	126	138	86
T400	108	126	76
V1	77	101	78
V2,5	-	87	66
V5	79	81	60
V10	71	61	34
V1C50	-	91	71
V1C100	80	117	70
V1T400	71	60	37
V2,5C50	-	121	69
V2,5C100	-	91	57
V5C50	70	75	44
V5C100	71	56	36
V10C50	67	46	29
V10C100	65	36	21
V10T200	53	38	24
V10T400	48	28	15
KB	104	156	74 ^{**}
B500	222/52 [*]	151/56 [*]	26 ^{**}
B500V1	119/28 [*]	118/41 [*]	19 ^{**}
B500V10	93/20 [*]	90/30 [*]	14 ^{**}

(a) Bezogen auf den mittleren initialen Wert aller Gruppen der 1. Versuchsreihe ohne Hungern, außer

* bezogen auf den initialen Wert der Gruppe KB beim jeweiligen Ernährungszustand,

** bezogen auf den initialen Wert der Gruppe KB ohne Hungern.

4.2.4.6 MDA-Nachweis

CuOOH (s. Tabellen 9-13 und 9-14)

Ohne Hungern wurde nur bei der Behandlungsgruppe V10C100 zum letzten Zeitpunkt eine um 20 % leicht signifikant erhöhte MDA-Bildung im Vergleich zur Gruppe V10 ermittelt.

Ohne Hungern führte lediglich 10 mM VPA in der Kombination V10C100 zum Zeitpunkt 270 min zu einer geringgradigen, aber signifikanten Erhöhung der MDA-Bildung gegenüber der Gruppe C100. Diese betrug 35 % (s. Abbildung 4.2-39).

Mit Hungern führte die Behandlung mit 100 µM CuOOH bereits in der Gruppe V2,5C100 zu einem moderaten Anstieg der MDA-Bildung, die ab dem Zeitpunkt 150 min signifikant war. Die Erhöhung betrug am Ende der Inkubation 43 %. Eine wesentlich stärkere signifikante Bildung von MDA wurde bei dieser CuOOH-Menge in der Gruppe V5C100 ab dem Zeitpunkt 150 min festgestellt. Hier war der MDA-Wert am Inkubationsende um 220 % erhöht. In der Gruppe V10C50 bewirkte schon 50 µM CuOOH ab 180 min eine signifikante MDA-Bildung. Diese war nach 270 min um 69 % erhöht. Bei der gleichen VPA-Menge der Gruppe V10C100 verursachte 100 µM CuOOH die höchste MDA-Bildung. Diese Erhöhung war ab dem Probenentnahmezeitpunkt 150 min signifikant und betrug am Ende 430 %.

Eine erhöhte MDA-Bildung durch VPA wurde mit Hungern bei jeder kombinierten Behandlung beobachtet. Sie war dosisabhängig. In der Gruppe V1C50 führte 1 mM VPA nach Zugabe von CuOOH ab 180 min zu einer signifikant höheren MDA-Bildung. Nach 270 min war sie um 54 % erhöht. Bei dieser CuOOH-Menge verursachte 2,5 mM VPA (V2,5C50) nur eine geringgradige, nicht signifikant höhere MDA-Bildung und 5 mM VPA (V5C50) eine ab 180 min signifikant höhere MDA-Bildung im Vergleich zur Gruppe C50. Am Inkubationsende betrug der Unterschied 15 % bzw. 34 %. In der Gruppe V10C50 war die MDA-Bildung durch 10 mM VPA ausgeprägter. Signifikanzen traten schon ab 150 min Inkubation auf. Am Inkubationsende wurde um 73 % mehr MDA gefunden. Nach Zugabe von 100 µM CuOOH verursachte VPA bereits ab dem Zeitpunkt 150 min in der Gruppe V2,5C100 leicht signifikant erhöhte MDA-Werte und in den Gruppen V5C100 bzw. V10C100 stark signifikant erhöhte MDA-Werte. Diese Erhöhungen betragen im Vergleich zur Gruppe C100 40 %, 203 % bzw. 305 % (s. Abbildung 4.2-38).

Der Ernährungszustand hatte in den Kombinationen VPA mit 100 µM CuOOH einen starken Einfluß auf die MDA-Bildung der Leberzellen. Mit Hungern traten bei den Kombinationen V5C100 und V10C100 bereits 30 min nach Hydroperoxidzugabe stark signifikant erhöhte MDA-Werte im Vergleich zu ohne Hungern auf. Die Erhöhungen betragen am Inkubationsende 167 % bzw. 205 %. Dagegen bewirkte Hungern in der Gruppe V10C50 lediglich am Inkubationsende eine nicht signifikante Erhöhung um 29 % (s. Abbildung 4.2-39).

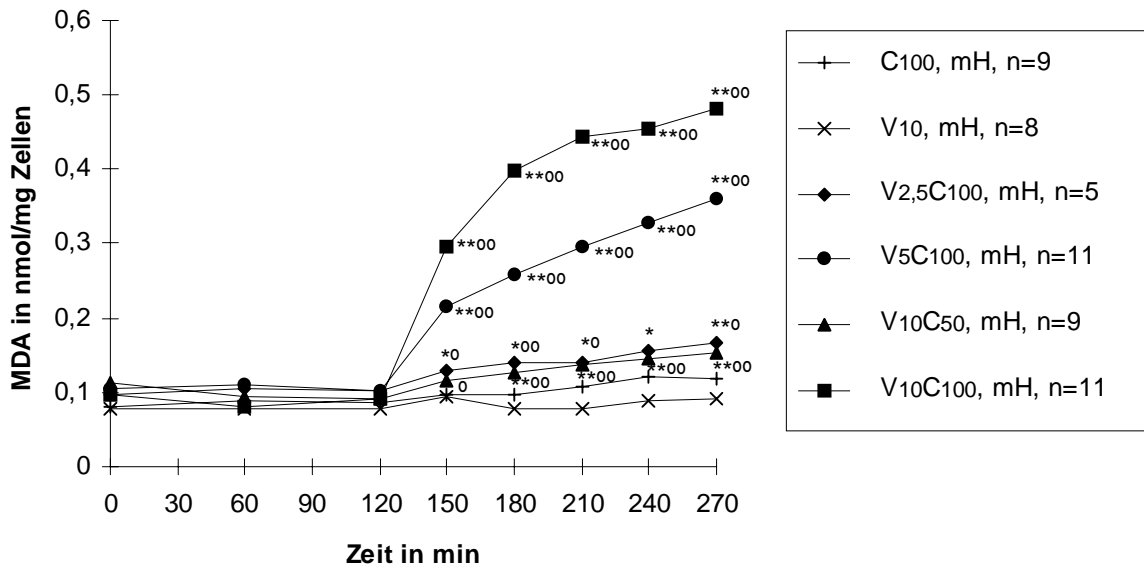


Abbildung 4.2-38: Einfluß von VPA bzw. CuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf die MDA-Bildung der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in nmol/mg Zellen dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist nur jeweils eine CuOOH- und eine VPA-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von CuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* p<0,05, ** p<0,01)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber CuOOH allein (° p<0,05, °° p<0,01)

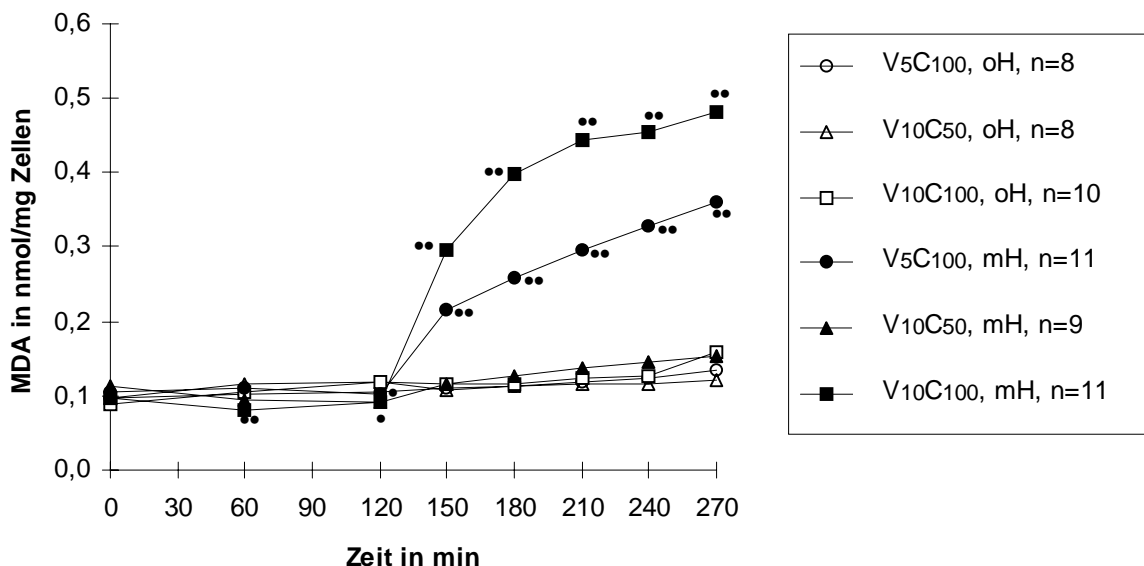


Abbildung 4.2-39: Einfluß des Ernährungszustandes auf die MDA-Bildung der Hepatozyten bei kombinierter VPA-CuOOH-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in nmol/mg Zellen dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von CuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• p<0,05, •• p<0,01)

t-BuOOH (s. Tabellen 9-13 und 9-14)

t-BuOOH verursachte ohne Hungern nur in einer Konzentration von 400 μM in der Gruppe V10T400 eine leichte Erhöhung der MDA-Werte.

VPA führte ohne Hungern nur in einer Menge von 10 mM in der Gruppe V10T400 zu einer geringgradig vermehrten MDA-Bildung, die jedoch ab 150 min Inkubation signifikant war. Sie war nach 270 min um 37 % gegenüber der Gruppe T400 erhöht (s. Abbildung 4.2-41).

Mit Hungern verursachten alle t-BuOOH-Mengen der untersuchten Kombinationen 30 min nach Zugabe eine bedeutende signifikante und dosisabhängige Erhöhung der MDA-Bildung im Vergleich zu VPA allein. In der Gruppe V1T400 führte 400 μM t-BuOOH am Inkubationsende zu einer Erhöhung um 177 %. Bei Behandlung mit 10 mM VPA verursachte 200 μM t-BuOOH in der Gruppe V10T200 eine Erhöhung um 166 % und 400 μM t-BuOOH in der Gruppe V10T400 sogar eine Erhöhung um 562 % gegenüber der Gruppe V10.

VPA bewirkte mit Hungern bei allen VPA-t-BuOOH-Gruppen sofort nach der Hydroperoxidzugabe einen bedeutenden signifikanten und dosisabhängigen Anstieg der MDA-Bildung gegenüber den nur mit t-BuOOH behandelten Gruppen. In der Gruppe V1T400 wurde nach 270 min eine MDA-Erhöhung um 179 % gegenüber der Gruppe T400 bestimmt. In der Gruppe V10T200 wurde durch 10 mM VPA am Inkubationsende eine Erhöhung um 152 % und in der Gruppe V10T400 sogar um 490 % festgestellt (s. Abbildung 4.2-40).

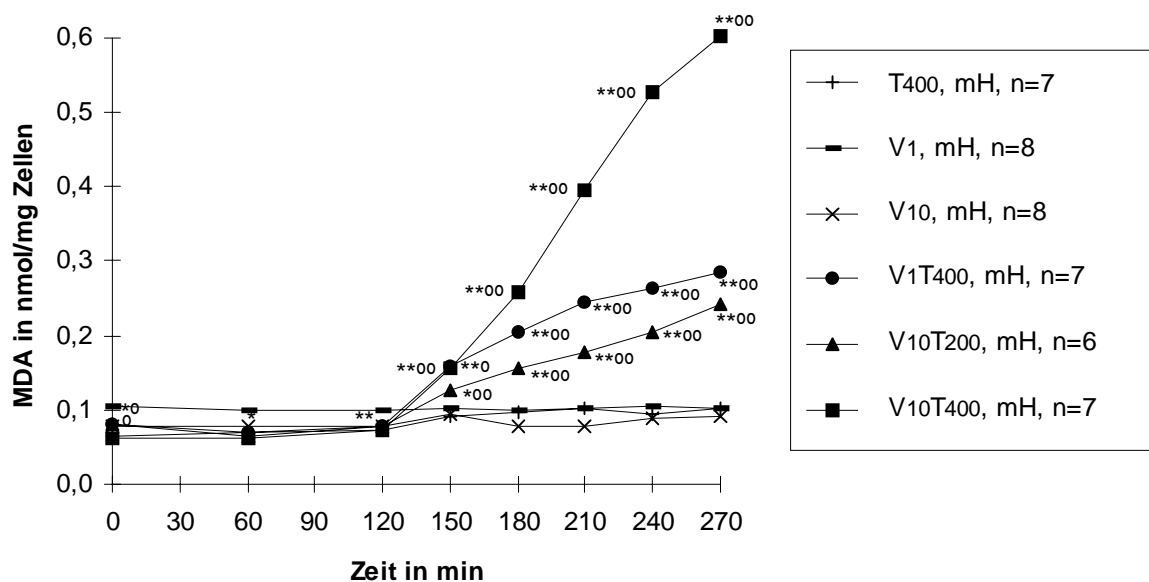


Abbildung 4.2-40: Einfluß von VPA bzw. t-BuOOH beim Ernährungszustand Hungern auf die MDA-Bildung der Hepatozyten bei kombinierter Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in nmol/mg Zellen dargestellt.

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. t-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

Wegen der Übersichtlichkeit ist nur eine t-BuOOH-Vergleichsgruppe dargestellt.

*, ** signifikanter Einfluß von t-BuOOH bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

^o, ^{oo} signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber t-BuOOH allein (^o p<0,05, ^{oo} p<0,01)

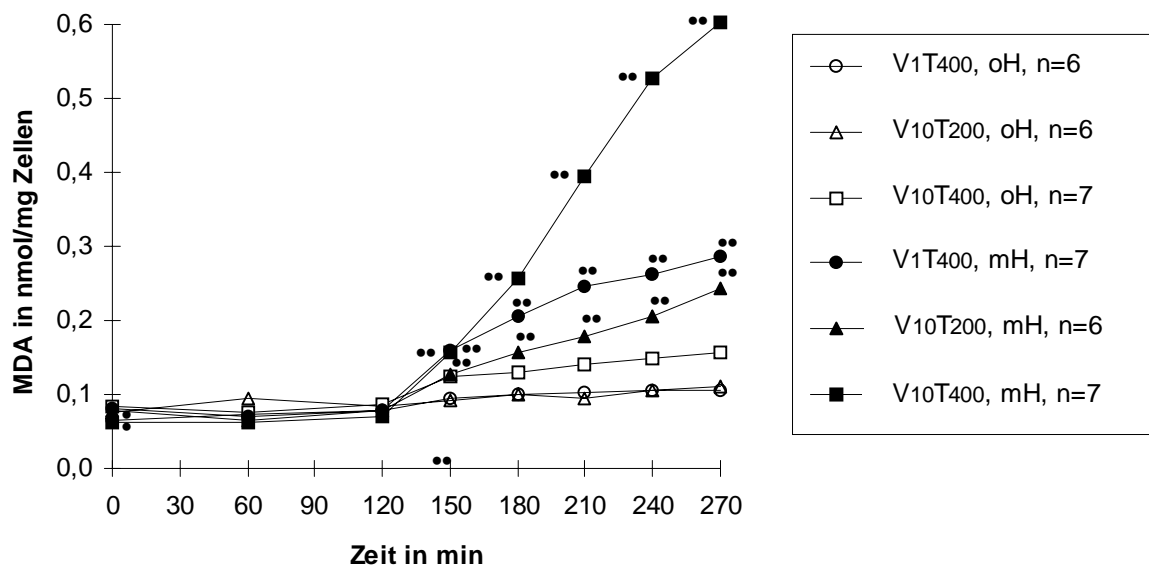


Abbildung 4.2-41: Einfluß des Ernährungszustandes auf die MDA-Bildung der Hepatozyten bei kombinierter VPA-t-BuOOH-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in nmol/mg Zellen dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von t-BuOOH: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• p<0,05, •• p<0,01)

In allen VPA-t-BuOOH-Gruppen (V1T400, V10T200 und V10T400) traten ab 150 min nur mit Hungern stark signifikant erhöhte MDA-Werte auf. Im Vergleich zu ohne Hungern betragen die Erhöhungen nach 270 min 169 %, 116 % bzw. 286 % (s. Abbildung 4.2-41).

BrH (s. Tabellen 9-13 und 9-14)

Ohne Hungern führte die BrH-VPA-Behandlung weder gegenüber den VPA-Gruppen noch gegenüber der BrH-Gruppe zu einer höheren MDA-Bildung (s. Abbildung 4.2-42).

Mit Hungern zeigte der Vergleich der BrH-VPA-Gruppen mit den VPA-Gruppen, daß BrH-Vorbehandlung nur in der Gruppe B500V10 eine ab 180 min signifikant höhere MDA-Bildung induzierte. Am Ende war eine Erhöhung der MDA-Bildung um 301 % vorhanden.

Mit Hungern ergab der Vergleich der BrH-VPA-Gruppen mit der BrH-Gruppe, daß 1 mM VPA in der Gruppe B500V1 nach 270 min nur zu einer um 29 % erhöhten MDA-Bildung führte. In der Gruppe B500V10 war die Erhöhung der MDA-Bildung stark ausgeprägt und ab 180 min signifikant. Sie betrug am Inkubationsende 254 % (s. Abbildung 4.2-42).

Hungern verursachte nur in der Gruppe B500V10 eine signifikante Erhöhung der MDA-Bildung im Vergleich zur gleichen Behandlungsgruppe ohne Hungern. Sie war ab 180 min signifikant und betrug am Ende der Inkubation 244 % (s. Abbildung 4.2-42).

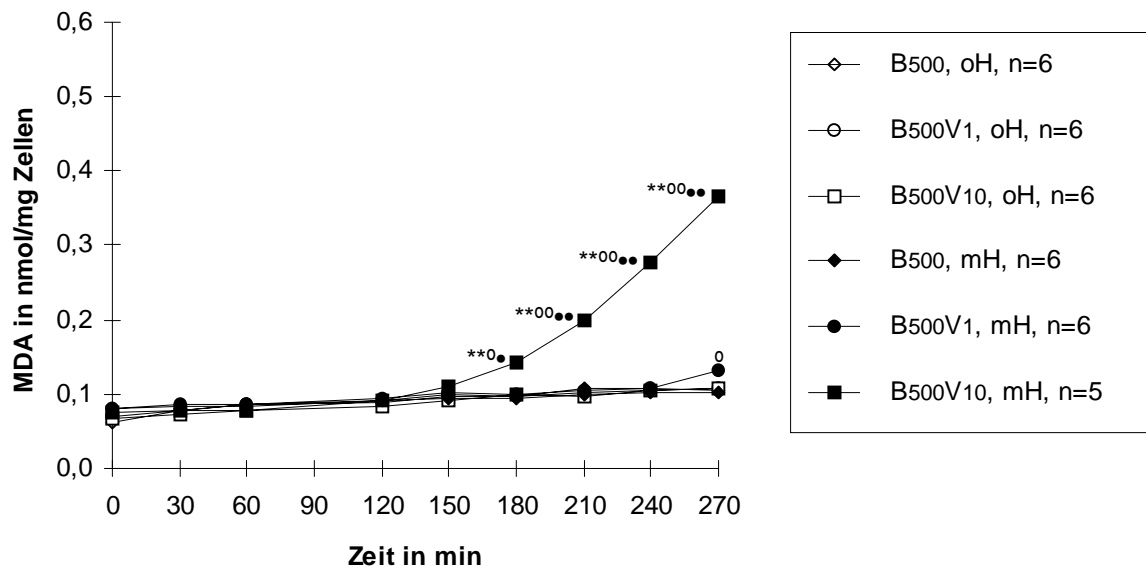


Abbildung 4.2-42: Einfluß von VPA bzw. BrH und des Ernährungszustandes auf die MDA-Bildung der Hepatozyten bei kombinierter BrH-VPA-Behandlung

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in nmol/mg Zellen dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min

Wegen der Übersichtlichkeit sind die VPA-Vergleichsgruppen nicht dargestellt.

** signifikanter Einfluß von BrH bei Kombination gegenüber VPA allein (** p<0,01)

°, °° signifikanter Einfluß von VPA bei Kombination gegenüber BrH allein (° p<0,05, °° p<0,01)

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• p<0,05, •• p<0,01)

4.3 VPA-Metabolismus⁶

Die Metabolismusstudien wurden durchgeführt, um zu erfahren, ob sich die mit den Vitalitäts- und Funktionalitätsparametern festgestellten Veränderungen auch im Metabolismus von VPA widerspiegeln. Es wurden sowohl die unkonjugierten als auch die konjugierten VPA- und Metabolitenanteile ermittelt. Eine Glucuronidierung konnte für alle detektierten Metaboliten in unterschiedlichem Ausmaß festgestellt werden. Sie war jedoch im allgemeinen in allen Gruppen ohne und mit Hungern für die jeweiligen Metaboliten gleichermaßen ausgeprägt. Da sich die Ergebnisse der unkonjugierten VPA- und Metabolitenanteile somit qualitativ nicht von den Gesamt-VPA- und Metabolitenanteilen unterscheiden, beschränkt sich die folgende Darstellung auf die unkonjugierten Anteile. Die Angabe der ermittelten VPA- und Metabolitenmengen zu den Probenentnahmezeitpunkten 60 min und 270 min erfolgt in den Graphiken und Tabellen in Prozent der eingesetzten VPA-Ausgangskonzentration.

⁶ Von den ermittelten VPA- und Metabolitenwerten werden nur ausgewählte Gruppen ausführlich dargestellt. Alle aufgeführten VPA- und Metabolitenanteile in Prozent der Ausgangsdosis sind als arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (s) in Tabellen im Anhang (Kapitel 9) enthalten. Im Abschnitt 4.3 werden die mittleren Unterschiede beschrieben.

Bei geringem Metabolismus wurden zum Teil VPA-Mengen ermittelt, die über 100 % der Ausgangsdosis liegen. Diese Abweichungen nach oben wurden nach 270 min Inkubation sowohl in Leberzellen von nicht hungernden als auch hungernden Ratten ermittelt. Sie sind die Folge der durch die Verdunstung des Inkubationsmediums auftretenden Aufkonzentrierung. Der Verdunstungseffekt konnte gravimetrisch nachgewiesen werden. Eine Neubildung von VPA, wie in der Literatur von GRANNEMAN et al. (1984b), KOCH et al. (1989a) und SHIRLEY et al. (1993) beschrieben, wurde ausgeschlossen, da in diesen Gruppen eine starke Hemmung des VPA-Metabolismus festgestellt wurde.

4.3.1 VPA-Metabolismus bei unterschiedlichen VPA-Mengen⁷

Anhand der Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter konnte gezeigt werden, daß VPA allein auch in der höchsten verwendeten Dosis ohne Hungern die Vitalität der Leberzellen gar nicht und mit Hungern nur zum Teil einschränkte. Eine Lipidperoxidation wurde nicht festgestellt. Mit steigender VPA-Dosis wurde ein zunehmender GSH-Verlust beobachtet. Es wurde untersucht, ob der VPA-Metabolismus dosisabhängige Veränderungen aufweist und ob der Metabolismus durch den Ernährungszustand der Ratten beeinflußt wird.

4.3.1.1 Anteil bzw. Menge nicht metabolisierter VPA

In den ersten 60 min Inkubation fand nur ein sehr geringer VPA-Metabolismus in allen VPA-Behandlungsgruppen statt. Zu diesem Zeitpunkt waren in den Gruppen V1, V5 bzw. V10 nur geringe Unterschiede der gemessenen Muttersubstanzanteile vorhanden. Mit steigender VPA-Menge wurden ohne Hungern Werte von durchschnittlich 83 %, 86 % bzw. 92 % ermittelt und mit Hungern 72 %, 100 % bzw. 87 % (s. Tabellen 9-15 und 9-16).

Hungern führte nach 60 min Inkubation nur mit 5 mM VPA (V5) zu einer signifikant höheren nicht metabolisierten VPA-Menge (s. Abbildung 4.3-1).

Nach 270 min Inkubation waren deutliche Unterschiede in den nicht metabolisierten VPA-Anteilen zwischen der 1-mM-VPA-Gruppe und der 5-mM- bzw. 10-mM-VPA-Gruppe sowohl ohne als auch mit Hungern zu erkennen. In der Gruppe V1 zeigten die Leberzellen einen starken VPA-Metabolismus, so daß ohne Hungern nur noch durchschnittlich 11 % und mit Hungern 21 % der Ausgangsdosis als VPA vorlagen, wohingegen in den Gruppen V5 bzw. V10 noch fast die gesamte VPA-Ausgangsmenge gemessen wurde. So betragen die VPA-Anteile ohne Hungern 88 % bzw. 112 % und mit Hungern 108 % bzw. 99 % (s. Tabellen 9-17 und 9-18 und Abbildung 4.3-2).

Der in der Gruppe V1 mit Hungern festgestellte doppelt so hohe nicht metabolisierte VPA-Anteil nach 270 min Inkubation weist auf eine Hemmung des VPA-Metabolismus durch Hungern hin. In der Gruppe V5 wurde mit Hungern sogar ein signifikant höherer VPA-Anteil

⁷ Der Einfluß unterschiedlicher VPA-Mengen auf den VPA-Metabolismus der Leberzellen sowohl ohne als auch mit Hungern wird beschreibend dargestellt. Außerdem erfolgt ein statistischer Vergleich der beiden Ernährungszustände bei gleicher Behandlung.

im Vergleich zu ohne Hungern wiedergefunden. Das war in der Gruppe V10 nicht der Fall (s. Abbildung 4.3-2).

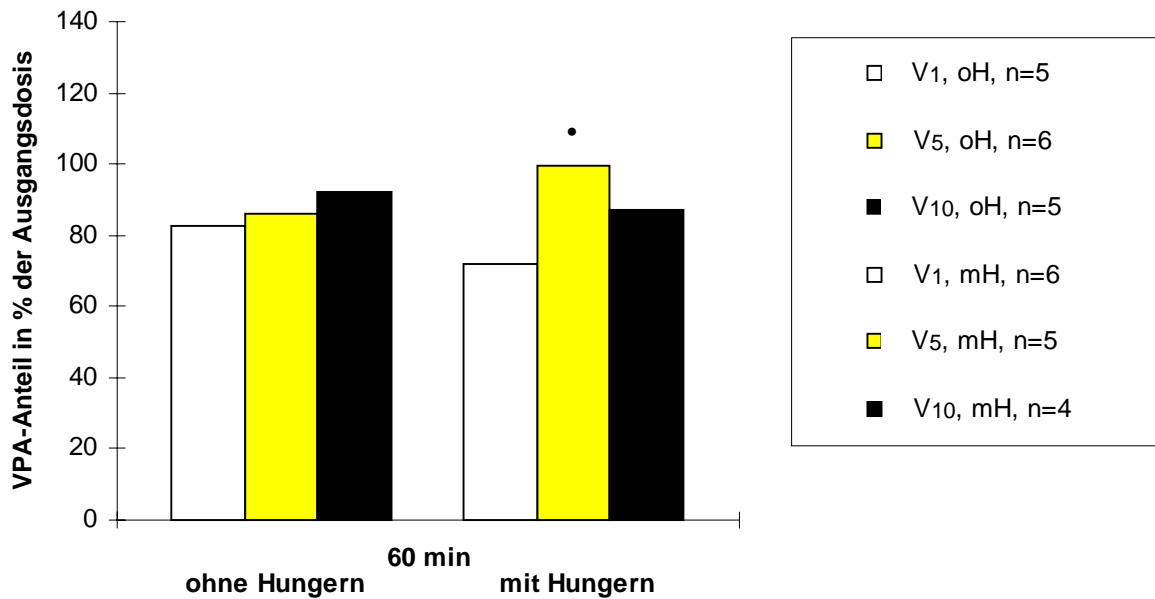


Abbildung 4.3-1: Anteil nicht metabolisierter VPA an der eingesetzten VPA-Menge nach 60 min Inkubation - Einfluß von unterschiedlichen VPA-Mengen und des Ernährungszustandes

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.
Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min

- signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$)

4.3.1.2 Anteil bzw. Menge der detektierten Metaboliten

Der nach 60 min Inkubation noch geringe VPA-Metabolismus spiegelte sich in den ermittelten Metabolitenanteilen wider (s. Tabellen 9-15 und 9-16). Der Gesamtmetabolitenanteil an der eingesetzten VPA-Menge betrug mit 1 mM VPA ohne Hungern 2,18 % und mit Hungern 3,64%, mit 5 mM VPA 0,79 % bzw. 0,73% und mit 10 mM VPA 0,56 % bzw. 0,21% (s. Tabelle 4.3-1). Die Auswertung der absoluten Werte ergab, daß ohne Hungern mit steigender VPA-Dosis eine größere Gesamtmetabolitenmenge vorhanden war, wohingegen mit Hungern sich die Mengen in den Gruppen V1 bzw. V5 kaum voneinander unterschieden und in der Gruppe V10 eine niedrigere Gesamtmetabolitenmenge im Vergleich zu V5 bzw. V1 festgestellt wurde (s. Tabelle 4.3-2).

Es konnten zu diesem Zeitpunkt noch keine eindeutigen Änderungen der Gesamtmetabolitenanteile und -mengen in Abhängigkeit vom Ernährungszustand festgestellt werden. Tendenziell verminderte Hungern den Metabolismus von 5 bzw. 10 mM VPA in geringem Ausmaß. Bei 1 mM VPA war der Gesamtmetabolitenanteil bzw. die Gesamtmetabolitenmenge durch Hungern nicht verringert.

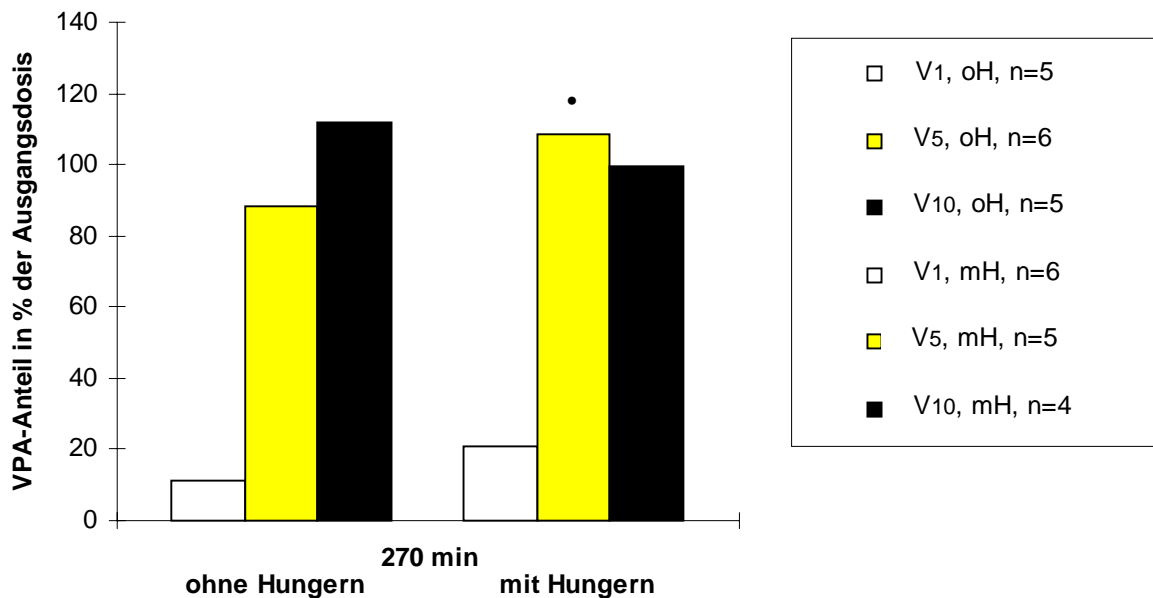


Abbildung 4.3-2: Anteil nicht metabolisierter VPA an der eingesetzten VPA-Menge nach 270 min Inkubation - Einfluß von unterschiedlichen VPA-Mengen und des Ernährungszustandes

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit: nach dem Zeitpunkt 120 min

• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$)

Nach 270 min Inkubation wurde in allen VPA-Behandlungsgruppen ohne und mit Hungern ein ähnliches Metabolitenmuster gefunden. Es konnten jedoch Unterschiede in den Gesamtmetabolitenanteilen zwischen der 1-mM- und den 5-mM- bzw. 10-mM-VPA-Gruppen ermittelt werden, die die Ergebnisse der Muttersubstanzbestimmungen widerspiegeln (s. Abbildung 4.3-2). Der Gesamtanteil der Metaboliten betrug in der Gruppe V1 ohne Hungern 14,06 % und mit Hungern 12,49%, wohingegen in der Gruppe V5 Gesamtanteile von 2,92 % bzw. 2,45% und in der Gruppe V10 von 1,78 % bzw. 1,00 % berechnet wurden (s. Tabelle 4.3-3). Die absoluten Werte unterschieden sich vor allem ohne aber auch mit Hungern trotz der unterschiedlichen VPA-Mengen nicht sehr voneinander. Mit steigender VPA-Dosis wurden tendenziell ohne Hungern steigende und mit Hungern sinkende Gesamtmetabolitenmengen festgestellt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen nach 60 min Inkubation (s. Tabellen 4.3-2 und 4.3-4).

Ohne Hungern wurden die einzelnen Metaboliten bei höheren VPA-Mengen (5 bzw. 10 mM VPA) in geringeren Anteilen ermittelt. Eine Ausnahme davon stellten 2-en-VPA, der mit ähnlichem Anteil festgestellt wurde, und 3-OH-VPA und 4-en-VPA dar, die nur bei 10 mM VPA detektiert wurden. Mit Hungern waren die einzelnen Metaboliten bei höheren VPA-Mengen (V5 bzw. V10) in geringeren Anteilen vorhanden (s. Abbildungen 4.3-3 und 4.3-4).

Weder ohne noch mit Hungern wurden bei allen VPA-Behandlungen allein zu den untersuchten Zeitpunkten die Metaboliten 2,4-dien-VPA bzw. 3-keto-4-en-VPA nachgewiesen.

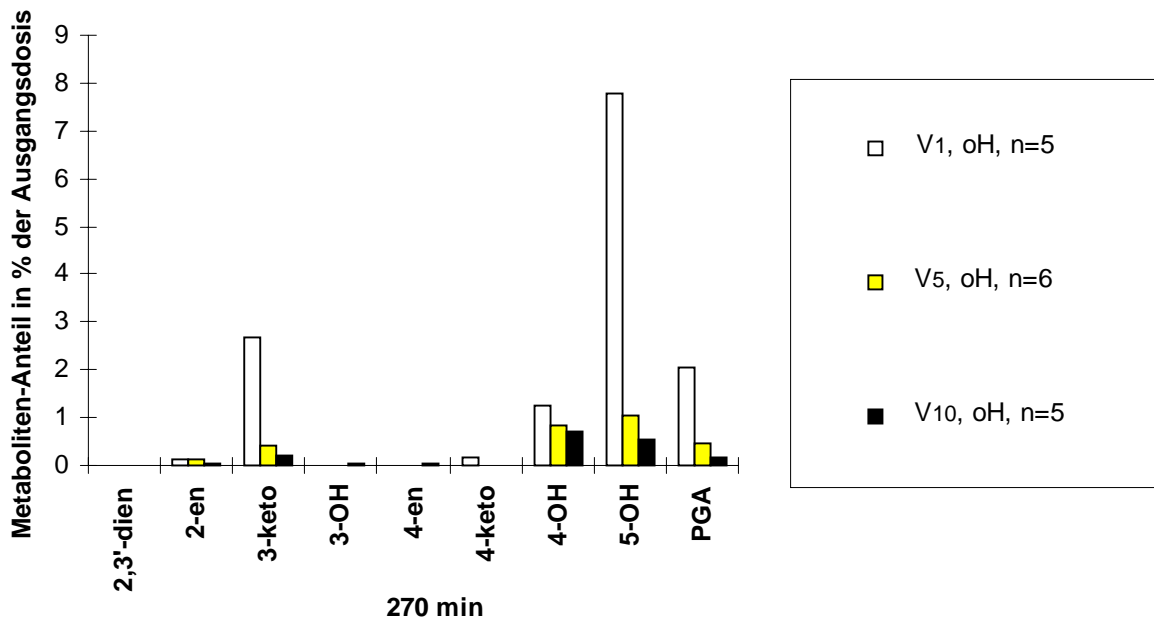


Abbildung 4.3-3: Anteil der VPA-Metaboliten an der eingesetzten VPA-Menge nach 270 min Inkubation - Einfluß von unterschiedlichen VPA-Mengen beim Ernährungszustand ohne Hungern

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit: nach dem Zeitpunkt 120 min

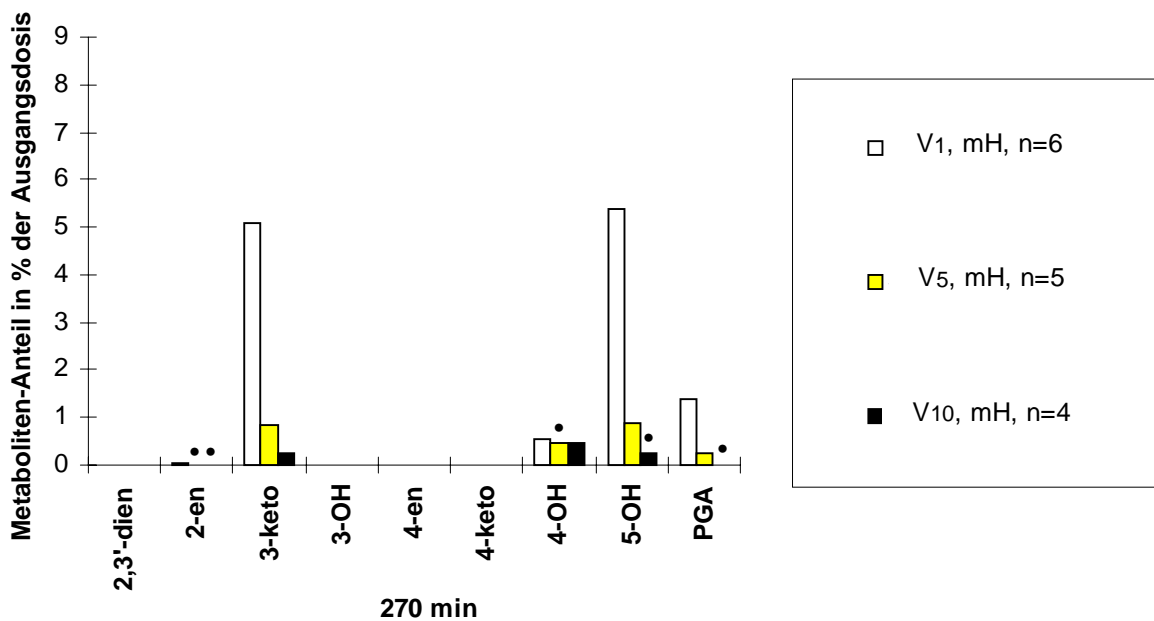


Abbildung 4.3-4: Anteil der VPA-Metaboliten an der eingesetzten VPA-Menge nach 270 min Inkubation - Einfluß von unterschiedlichen VPA-Mengen beim Ernährungszustand Hungern und Einfluß des Ernährungszustandes

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit: nach dem Zeitpunkt 120 min

• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$)

Bei gleicher VPA-Behandlung waren mit Hungern im Vergleich zu ohne Hungern alle gemessenen Metaboliten außer 3-keto-VPA in allen VPA-Behandlungsgruppen in geringeren Anteilen bzw. Mengen vorhanden. Signifikante Unterschiede wurden nur bei höheren VPA-Dosen ermittelt. So war die β -Oxidation zu 2-en-VPA mit 5 bzw. 10 mM VPA signifikant verringert. Ebenso waren weniger Produkte der ω -Oxidationswege meßbar. Für die Gruppe V5 traf das für die ω_1 -Oxidation zu 4-OH-VPA und für V10 für die ω -Oxidation zu 5-OH-VPA und PGA zu (s. Abbildungen 4.3-3 und 4.3-4 und Tabellen 9-17 und 9-18).

4.3.2 Einfluß von Prooxidantien auf den VPA-Metabolismus⁸

Es war das Ziel der Untersuchung herauszufinden, ob sich die in Abhängigkeit von der VPA-Dosis bei Anwesenheit von Prooxidantien und Hungern festgestellte Verschlechterung der Vitalität und die Lipidperoxidation auch in bestimmten Veränderungen des VPA-Metabolismus zeigten.

4.3.2.1 Anteil bzw. Menge nicht metabolisierter VPA

Zum Zeitpunkt 60 min, also noch vor Behandlung mit CuOOH/t-BuOOH, aber schon nach der Vorbehandlung mit BrH, unterschieden sich die nicht metabolisierten VPA-Anteile in den Gruppen mit 1 mM bzw. 10 mM VPA bei beiden Ernährungszuständen nur unbedeutend voneinander. Die VPA-Anteile lagen in den Gruppen V1C100, V1T400 bzw. B500V1 ohne Hungern zwischen 80 % und 85 % und mit Hungern zwischen 80 % und 106 %. In den Kombinationen V10C100, V10T400 bzw. B500V10 betragen die Werte zwischen 90 % und 111 % bzw. zwischen 91 % und 105 % (s. Tabellen 9-15 und 9-16 und Abbildungen 4.3-5 und 4.3-6). Insgesamt war der Metabolismus wie in den Behandlungsgruppen mit VPA allein (s. Abbildung 4.3-1) zu diesem Zeitpunkt noch gering ausgeprägt. Ein relevanter Einfluß der Prooxidantien wurde, wie zu diesem Zeitpunkt zu erwarten, nur bei BrH-Vorbehandlung und nur in Kombination mit Hungern beobachtet. So konnten signifikant höhere VPA-Anteile bei den Behandlungsgruppen B500V1 und B500V10 im Vergleich zu den Gruppen V1 bzw. V10 festgestellt werden (s. Abbildungen 4.3-5 und 4.3-6). Die BrH-Vorbehandlung hemmte den VPA-Metabolismus in Leberzellen von hungernden Ratten. Die signifikanten Unterschiede in den Behandlungsgruppen V10T400 bei beiden Ernährungszuständen und in der Gruppe V1T400 mit Hungern gegenüber den Gruppen V10 bzw. V1 können nicht auf die Hydroperoxide zurückgeführt werden, da erst nach 120 min Inkubation deren Zugabe erfolgte.

Der Ernährungszustand bewirkte nach 60 min Inkubation sowohl in den Kombinationsgruppen mit 1 mM VPA als auch mit 10 mM VPA keine wesentlichen Veränderungen des VPA-Metabolismus. Hungern führte zu diesem Zeitpunkt nur in der Gruppe B500V1 zu einem signifikant höheren nicht metabolisierten VPA-Anteil (s. Abbildung 4.3-5).

⁸ Die Vergleiche zwischen den einzelnen Kombinationsgruppen erfolgen beschreibend. Der Einfluß der verwendeten Prooxidantien bei Kombinationsbehandlungen auf den VPA-Metabolismus der Leberzellen sowohl ohne als auch mit Hungern gegenüber den jeweils mit den gleichen VPA-Mengen allein behandelten Gruppen wird dargestellt. Außerdem erfolgt ein statistischer Vergleich der beiden Ernährungszustände bei gleicher Behandlung.

Nach 270 min Inkubation konnte anhand der nicht metabolisierten VPA-Anteile in den mit 1 mM VPA kombinierten Behandlungsgruppen ein deutlich ausgeprägter Metabolismus als in den mit 10 mM VPA kombinierten ermittelt werden (s. Tabellen 9-17 und 9-18). Das entspricht den im Abschnitt 4.3.1.1 für VPA allein gemachten Feststellungen. Zu diesem Zeitpunkt unterschieden sich die kombinierten Behandlungen V1C100, V1T400 bzw. B500V1 bei beiden Ernährungszuständen sehr stark und signifikant von der Gruppe V1 (s. Abbildung 4.3-7). Für die Gruppen V10C100, V10T400 bzw. B500V10 traf dies weder ohne noch mit Hungern im Vergleich zu den Gruppen V10 zu, obwohl in den mit 10 mM VPA kombinierten Gruppen und Hungern eine starke Lipidperoxidation festgestellt wurde (s. Abbildung 4.3-8 und Abschnitt 4.2.4.6). Am Inkubationsende war der VPA-Anteil in allen mit 1 mM VPA kombinierten Gruppen in Abhängigkeit von der Art der eingesetzten Prooxidantien und vom Ernährungszustand signifikant höher als in der Behandlungsgruppe V1. Die geringste Metabolismushemmung wurde sowohl ohne als auch mit Hungern durch 100 μ M CuOOH verursacht, eine mittlere Hemmung durch 400 μ M t-BuOOH bedingt, und am stärksten wurde diese Hemmung durch 500 μ M BrH hervorgerufen (s. Abbildung 4.3-7). In den Gruppen V1T400 und B500V1 wurde mit Hungern bereits eine Lipidperoxidation beobachtet (s. Abschnitt 4.2.4.6). In diesen Gruppen war der VPA-Metabolismus am stärksten gehemmt. In den Kombinationen V10C100, V10T400 und B500V10 bewirkten die Prooxidantien bei beiden Ernährungszuständen im Vergleich zur Gruppe V10 eine Metabolismushemmung, die mit Hungern geringgradig stärker war (s. Abbildung 4.3-8). Alle ermittelten Endwerte lagen durch den Verdunstungseffekt über denen zum Zeitpunkt 60 min gemessenen. Ohne Hungern waren keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Gruppe V10 vorhanden. Mit Hungern wurde nur bei der Kombination V10T400 ein höherer VPA-Anteil ermittelt (s. Abbildung 4.3-8).

Nach 270 min Inkubation waren in den Gruppen mit 1 mM VPA (V1C100, V1T400, B500V1) signifikante Veränderungen des Metabolismus in Abhängigkeit vom Ernährungszustand vorhanden. In Kombination mit 100 μ M CuOOH wurden ohne Hungern 23 % und mit Hungern 60 %, mit 400 μ M t-BuOOH 43 % bzw. 85 % und in Kombination mit BrH 70 % bzw. 113 % der VPA-Ausgangskonzentration gemessen (s. Tabellen 9-17 und 9-18 und Abbildung 4.3-7). Auch bei VPA-Behandlung allein wurde mit Hungern in der Gruppe V1 ca. ein doppelter VPA-Anteil ermittelt, jedoch war dieser Unterschied noch nicht signifikant (s. Abbildung 4.3-2). In den Kombinationsgruppen mit 10 mM VPA (V10C100, V10T400, B500V10) war ebenso wie nach 60 min auch nach 270 min Inkubation anhand der nicht metabolisierten VPA keine wesentliche Abhängigkeit vom Ernährungszustand vorhanden. Die Metabolisierung war, abhängig von der Art der Prooxidantien, mit Hungern nur leicht gehemmt (s. Abbildung 4.3-8).

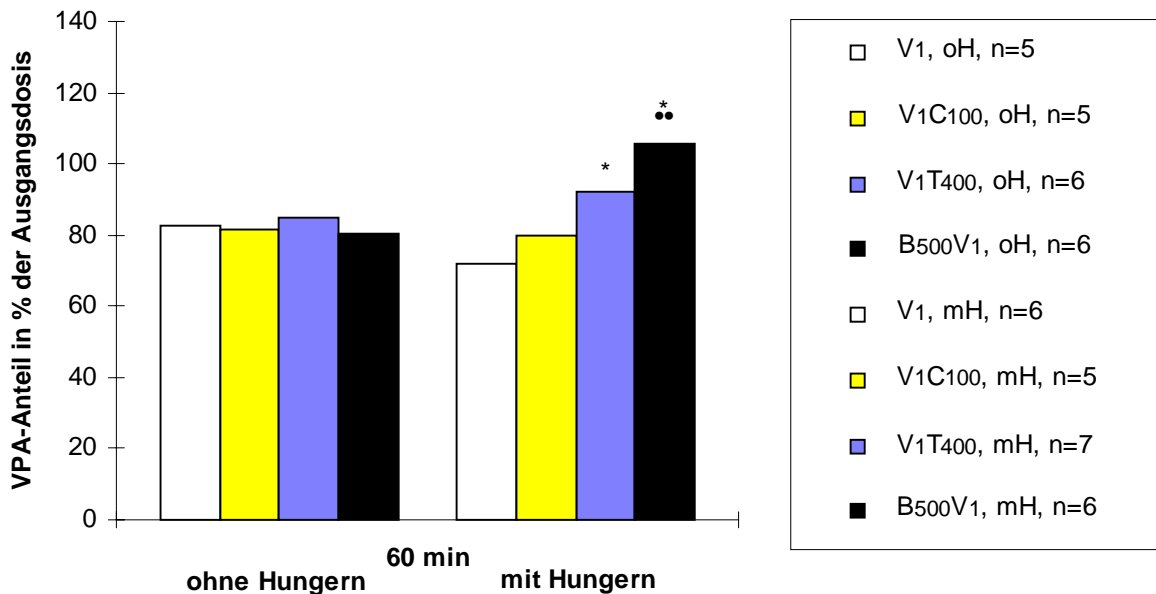


Abbildung 4.3-5: Anteil nicht metabolisierter VPA an der eingesetzten VPA-Menge nach 60 min Inkubation - Einfluß von unterschiedlichen Prooxidantien bei Kombination mit 1 mM VPA und des Ernährungszustandes

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min; Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min

* signifikanter Einfluß von Prooxidantien bei Kombination gegenüber VPA allein (* p<0,05)

** signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (** p<0,01)

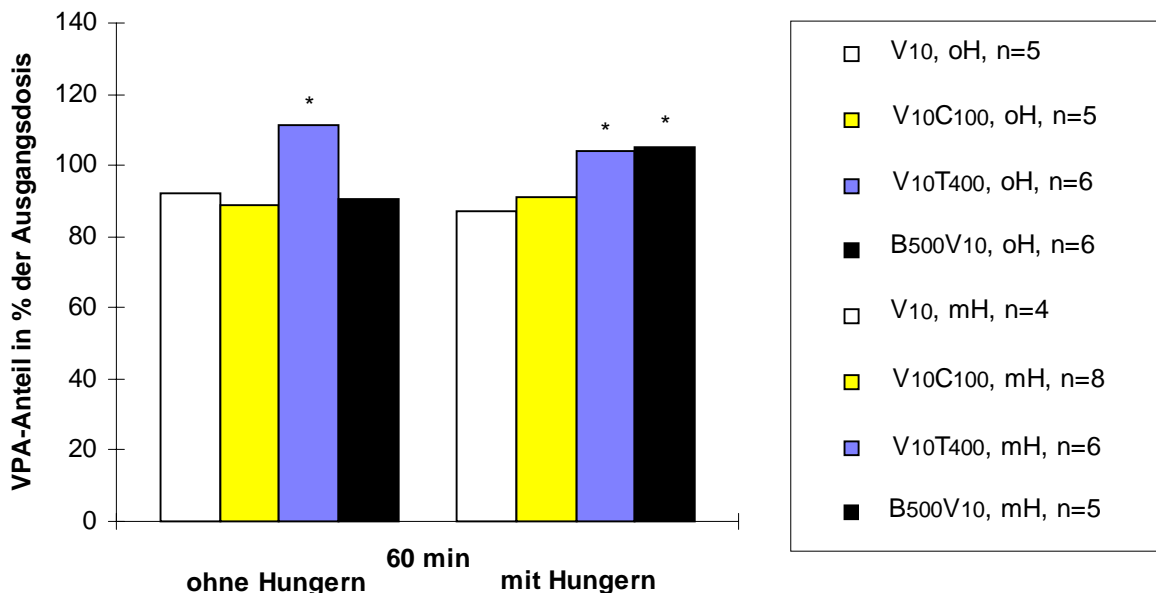


Abbildung 4.3-6: Anteil nicht metabolisierter VPA an der eingesetzten VPA-Menge nach 60 min Inkubation - Einfluß von unterschiedlichen Prooxidantien bei Kombination mit 10 mM VPA und des Ernährungszustandes

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min; Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min

* signifikanter Einfluß von Prooxidantien bei Kombination gegenüber VPA allein (* p<0,05)

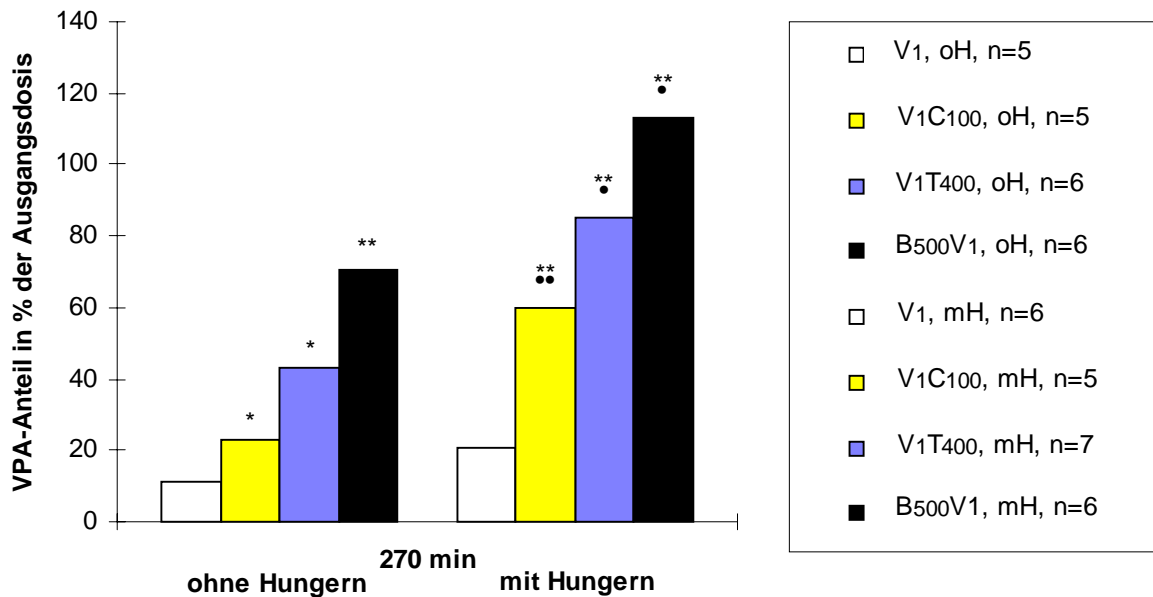


Abbildung 4.3-7: Anteil nicht metabolisierter VPA an der eingesetzten VPA-Menge nach 270 min Inkubation - Einfluß von unterschiedlichen Prooxidantien bei Kombination mit 1 mM VPA und des Ernährungszustandes

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min; Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min,

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. Hydroperoxid: nach dem Zeitpunkt 120 min

*, ** signifikanter Einfluß von Prooxidantien bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• $p < 0,05$, •• $p < 0,01$)

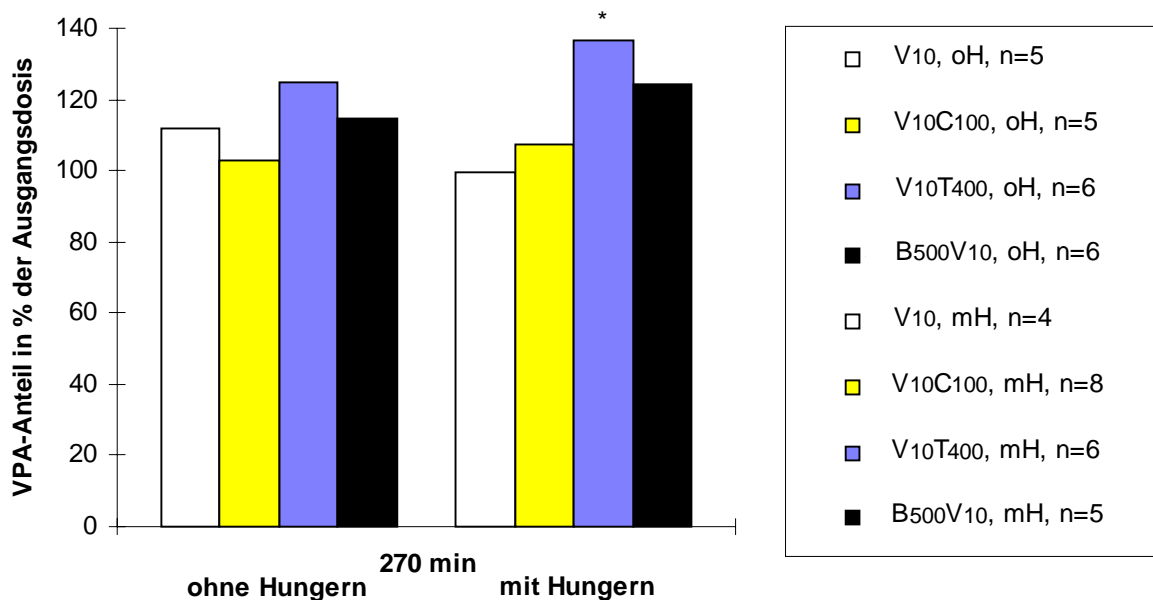


Abbildung 4.3-8: Anteil nicht metabolisierter VPA an der eingesetzten VPA-Menge nach 270 min Inkubation - Einfluß von unterschiedlichen Prooxidantien bei Kombination mit 10 mM VPA und des Ernährungszustandes

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min; Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min,

Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. Hydroperoxid: nach dem Zeitpunkt 120 min

* signifikanter Einfluß von Prooxidantien bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$)

4.3.2.2 Anteil bzw. Menge der detektierten Metaboliten

Nach 60 min Inkubation wurden ohne Hungern bei Behandlung mit 1 mM bzw. 10 mM VPA in den kombinierten Gruppen keine signifikanten Unterschiede der Gesamtmetabolitenanteile gegenüber der jeweiligen VPA-Behandlung allein ermittelt. In den Gruppen V1C100, V1T400, B500V1 waren ohne Hungern die Gesamtanteile der Metaboliten an der eingesetzten VPA-Menge und auch die absoluten VPA-Mengen mit den für die Gruppe V1 ermittelten vergleichbar. Mit Hungern traf dies auch für die Behandlungsgruppe V1C100 zu und sowohl ohne als auch mit Hungern für die Kombination V10C100. In der Tendenz wurde bei BrH-Vorbehandlung und mit Hungern in den Gruppen B500V1 und B500V10 eine Verminderung des Gesamtmetabolitenanteils und der Gesamtmetabolitenmenge im Vergleich zur jeweiligen VPA-Behandlung allein festgestellt (s. Tabellen 4.3-1 und 4.3-2). Die detektierten β - und ω -Oxidationsmetaboliten wurden ohne und mit Hungern dosisabhängig in variierenden Mengen gebildet (s. Tabellen 9-15 und 9-16). Es war kein bestimmter Metabolismusweg im Vergleich zu den Gruppen V1 bzw. V10 verändert.

Ein eindeutiger Einfluß des Ernährungszustandes konnte nach 60 min Inkubation ebenso wie mit VPA allein nicht ermittelt werden. Tendenziell wurde der Metabolismus in allen kombinierten Behandlungen durch Hungern gehemmt. Am ausgeprägtesten war dies in den Gruppen B500V1 und B500V10 der Fall.

Tabelle 4.3-1: Gesamtmetabolitenanteile nach 60 min Inkubation in Prozent zur Ausgangsdosis

	Krebs-Henseleit		100 μ M CuOOH		400 μ M t-BuOOH		500 μ M BrH	
	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
Hungern	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
1 mM VPA	2,18	3,64	4,84	4,00	2,54	1,04	2,08	0,82
10 mM VPA	0,56	0,21	0,74	0,46	0,22	0,33	0,22	0,03

Tabelle 4.3-2: Gesamtmetabolitenmengen nach 60 min Inkubation in μ g/ml

	Krebs-Henseleit		100 μ M CuOOH		400 μ M t-BuOOH		500 μ M BrH	
	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
Hungern	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
1 mM VPA	3,15	5,25	6,98	5,77	3,66	1,50	3,00	1,18
10 mM VPA	8,13	3,01	10,62	6,59	3,18	4,82	3,16	0,39

Am Inkubationsende konnte in den Gruppen V1C100, V1T400, B500V1 und V10C100, V10T400, B500V10 bei beiden Ernährungszuständen ein ähnliches Metabolitenmuster festgestellt werden. Dies stimmte auch mit dem in den Gruppen V1 und V10 ermittelten überein. Ebenso wie bei VPA-Behandlung allein wurden Unterschiede in den Gesamtmetabolitenanteilen zwischen den 1-mM- und 10-mM-VPA-Kombinationsgruppen bei beiden Ernährungszuständen

den ermittelt (s. Tabelle 4.3-3). Das spiegelt sich bei Kombinationsbehandlung auch in den Muttersubstanzbestimmungen wider (s. Abbildungen 4.3-7 und 4.3-8). Die absoluten Werte unterschieden sich in den mit 1 und 10 mM VPA kombinierten Gruppen bei beiden Ernährungszuständen nicht stark voneinander. Ebenso wie bei VPA-Behandlung allein wurde bei den Kombinationen V10C100, V10T400 und B500V10 ohne Hungern eine geringfügig höhere und mit Hungern in den Gruppen V10C100 und B500V10 eine niedrigere Gesamtmetabolitenmenge im Vergleich zu den gleichen Kombinationen mit 1 mM VPA festgestellt (s. Tabelle 4.3-4).

In Kombination mit 1 mM VPA wurde ein Prooxidantieneinfluß nur in Gruppen mit Lipidperoxidation ermittelt (s. Abschnitt 4.2.4.6). So waren die Gesamtmetabolitenmengen und -anteile ohne Hungern im Vergleich zur Gruppe V1 bei den Kombinationen V1C100 nicht verändert und bei den Gruppen V1T400 bzw. B500V1 unwesentlich verringert. Mit Hungern wurde eine merkliche Verringerung der Gesamtmetabolitenmengen und -anteile im Vergleich zur Gruppe V1 nur in den Gruppen V1T400 und B500V1 festgestellt. Nur in den Kombinationsbehandlungen V10C100 und B500V10 führten die Prooxidantien im Vergleich zu den Gruppen V10 bei beiden Ernährungszuständen zu einer Verminderung der Gesamtmetabolitenmengen- und anteile. Dies war in der Gruppe B500V10 mit Hungern am stärksten ausgeprägt. Eine Ausnahme davon stellte die Gruppe V10T400 dar. Hier war mit Hungern die Gesamtmetabolitenmenge und der -anteil erhöht (s. Tabellen 4.3-3 und 4.3-4).

Tabelle 4.3-3: Gesamtmetabolitenanteile nach 270 min Inkubation in Prozent zur Ausgangsdosis

	Krebs-Henseleit		100 µM CuOOH		400 µM t-BuOOH		500 µM BrH	
	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
Hungern								
1 mM VPA	14,06	12,49	14,15	10,27	10,18	4,35	10,69	4,90
10 mM VPA	1,78	1,00	1,75	0,71	1,41	1,28	1,17	0,15

Tabelle 4.3-4: Gesamtmetabolitenmengen nach 270 min Inkubation in µg/ml

	Krebs-Henseleit		100 µM CuOOH		400 µM t-BuOOH		500 µM BrH	
	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
Hungern								
1 mM VPA	20,28	18,01	20,40	14,82	14,67	6,28	15,42	7,05
10 mM VPA	25,63	14,40	25,21	10,19	20,35	18,41	16,94	2,10

Ohne Hungern wurden in den Gruppen V1C100, V1T400 bzw. B500V1 vor allem die detektierten ω - und ω_1 -Metaboliten im Vergleich zur Gruppe V1 in wenig geringeren Anteilen bzw. Mengen bestimmt. Fast immer signifikant war dieser Unterschied nur für die Metaboliten 4-OH-VPA und PGA. Die Metaboliten 3-keto-VPA und 5-OH-VPA wurden bei Kombinationsbehandlung mit Ausnahme der Gruppe V1C100 in geringeren Anteilen bzw. Mengen

gebildet. Der Metabolit 2-en-VPA entstand in der Gruppe V1T400 und B500V1 in leicht höheren Anteilen bzw. Mengen. Nur in den zuletzt genannten Gruppen wurde 2,3'-dien-VPA detektiert, bei BrH-Vorbehandlung war dieser Unterschied im Vergleich zur Gruppe V1 signifikant. Der Metabolit 4-keto-VPA wurde nur in der Gruppe V1 und in geringerer Menge in der Gruppe V1C100 gebildet. Der Metabolit 4-en-VPA wurde nur in den Gruppen V1C100 und V1T400 im Vergleich zur Gruppe V1 bestimmt. Das war bei Kombination mit t-BuOOH signifikant (s. Abbildung 4.3-9 und Tabelle 9-17). Ohne Hungern wurden in den Gruppen V10C100, V10T400 bzw. B500V10 fast alle detektierten Metaboliten - 3-keto-VPA, 4-OH-VPA, 5-OH-VPA - in zur Gruppe V10 vergleichbaren bzw. leicht geringeren Anteilen bzw. Mengen ermittelt, mit Ausnahme des Metaboliten 4-OH-VPA bei der Gruppe B500V10, der gegenüber VPA allein signifikant verringert war. Der Metabolit PGA wurde in allen kombinierten Gruppen signifikant weniger gebildet. Der Metabolit 4-en-VPA wurde in den Gruppen V10C100 und V10T400 in Spuren und in der Gruppe B500V10 nicht mehr detektiert. 2-en-VPA wurde nur bei BrH-Vorbehandlung signifikant nicht mehr gemessen. Der Metabolit 4-keto-VPA erschien weder mit VPA allein noch in Kombination mit Prooxidantien und der Metabolit 3-OH-VPA wurde nur mit VPA allein und in der Gruppe V10C100 nachgewiesen (s. Abbildung 4.3-10 und Tabelle 9-17).

Mit Hungern wurden in den Gruppen V1T400 bzw. B500V1 bei auftretender Lipidperoxidation (s. Abschnitt 4.2.4.6) signifikant größere Anteile bzw. Mengen 2-en-VPA im Vergleich zur Gruppe V1 ermittelt. Nur in diesen Gruppen konnte 4-en-VPA und 2,3'-dien-VPA bestimmt werden. Für 4-en-VPA war dieser Unterschied in beiden Gruppen und für 2,3'-dien-VPA nur in der BrH-Gruppe signifikant. Die Metaboliten 5-OH-VPA, PGA und 3-keto-VPA wurden darüber hinaus in diesen Gruppen in viel geringeren Anteilen bzw. Mengen ermittelt, wobei die Unterschiede für PGA in der t-BuOOH-Gruppe und für 3-keto-VPA in der BrH-Gruppe nicht signifikant waren. Das stimmt für die ω -Metaboliten mit den ermittelten VPA-Anteilen nach 270 min Inkubation überein (s. Abbildung 4.3-7). Der Metabolit 4-OH-VPA entstand in der Kombination V1T400 in leicht höheren Anteilen bzw. Mengen. Bei der Gruppe V1C100, bei der es zu keiner Veränderung der Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter kam, wurden im Unterschied zur Gruppe V1 tendenziell weniger Metaboliten der ω -Oxidationswege und vermehrt der β -Oxidationsmetabolit 3-keto-VPA gemessen, wobei die Veränderungen nur für PGA signifikant waren (s. Abbildung 4.3-11 und Tabelle 9-18). Mit Hungern konnten in den Gruppen V10C100, V10T400 bzw. B500V10 in Übereinstimmung mit den VPA-Muttersubstanzwerten am Inkubationsende keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Gruppe V10 nachgewiesen werden. Es fand, wie für 10 mM VPA allein beschrieben, kaum eine Metabolitenbildung statt, wobei diese VPA-dosisabhängige Hemmung der β - und ω -Oxidation in der Gruppe B500V10 durch BrH-Vorbehandlung besonders ausgeprägt war. In der Gruppe V10C100 wurden der β -Oxidationsmetabolit 3-keto-VPA und die ω -Oxidationsmetaboliten 4-OH-VPA und 5-OH-VPA in leicht niedrigeren und in der Gruppe V10T400 in - mit der Gruppe V10 - vergleichbaren bzw. leicht höheren Anteilen bzw. Mengen gebildet. In allen mit 10 mM VPA kombinierten Gruppen konnte wie mit 10 mM VPA allein weder 2-en-VPA (Ausnahme V10T400), 2,3'-dien-VPA, 3-OH-VPA, 4-keto-VPA noch 4-en-VPA detektiert werden (s. Abbildung 4.3-12 und Tabelle 9-18).

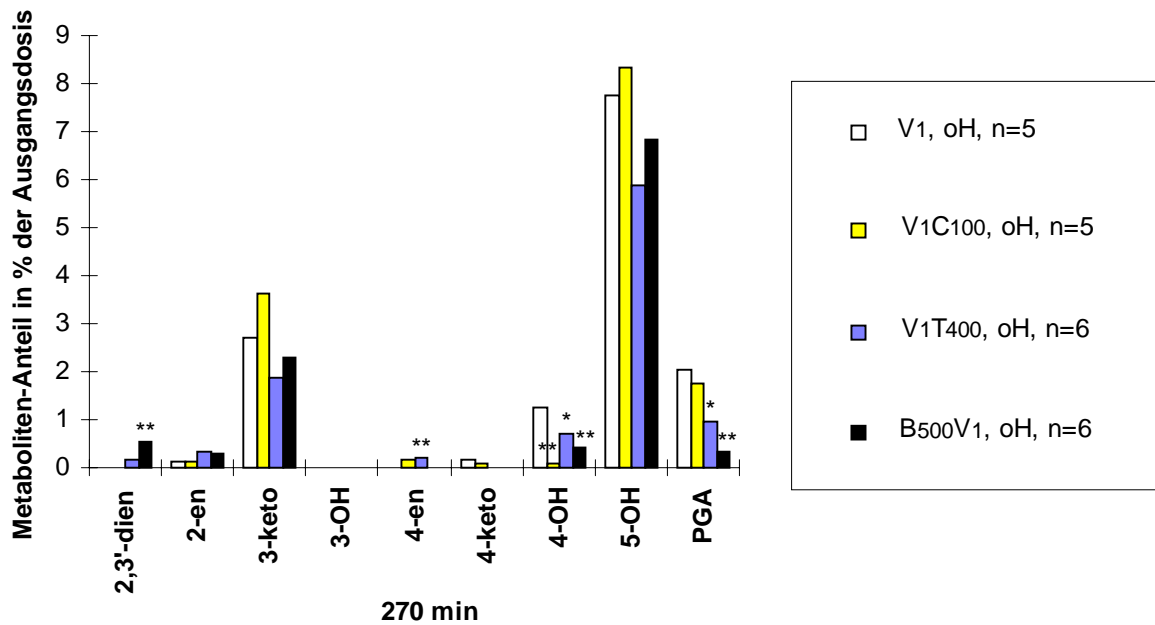


Abbildung 4.3-9: Anteil der VPA-Metaboliten an der eingesetzten VPA-Menge nach 270 min Inkubation - Einfluß von unterschiedlichen Prooxidantien bei Kombination mit 1 mM VPA beim Ernährungszustand ohne Hungern

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min; Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. Hydroperoxid: nach dem Zeitpunkt 120 min

*, ** signifikanter Einfluß von Prooxidantien bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

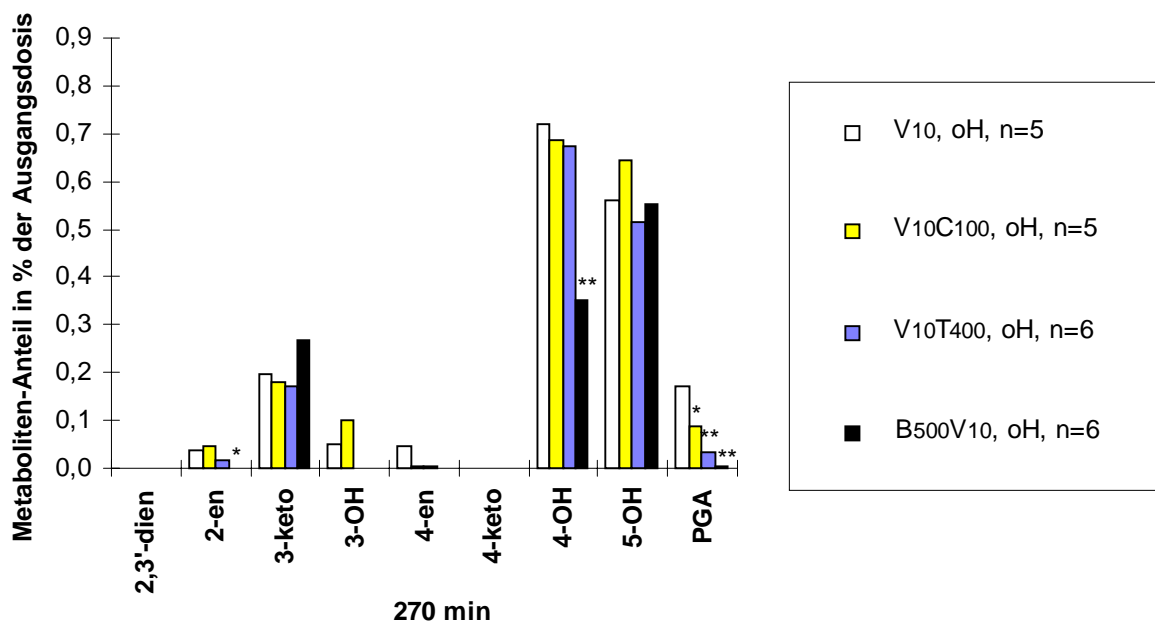


Abbildung 4.3-10: Anteil der VPA-Metaboliten an der eingesetzten VPA-Menge nach 270 min Inkubation - Einfluß von unterschiedlichen Prooxidantien bei Kombination mit 10 mM VPA beim Ernährungszustand ohne Hungern

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min; Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. Hydroperoxid: nach dem Zeitpunkt 120 min

*, ** signifikanter Einfluß von Prooxidantien bei Kombination gegenüber VPA allein (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

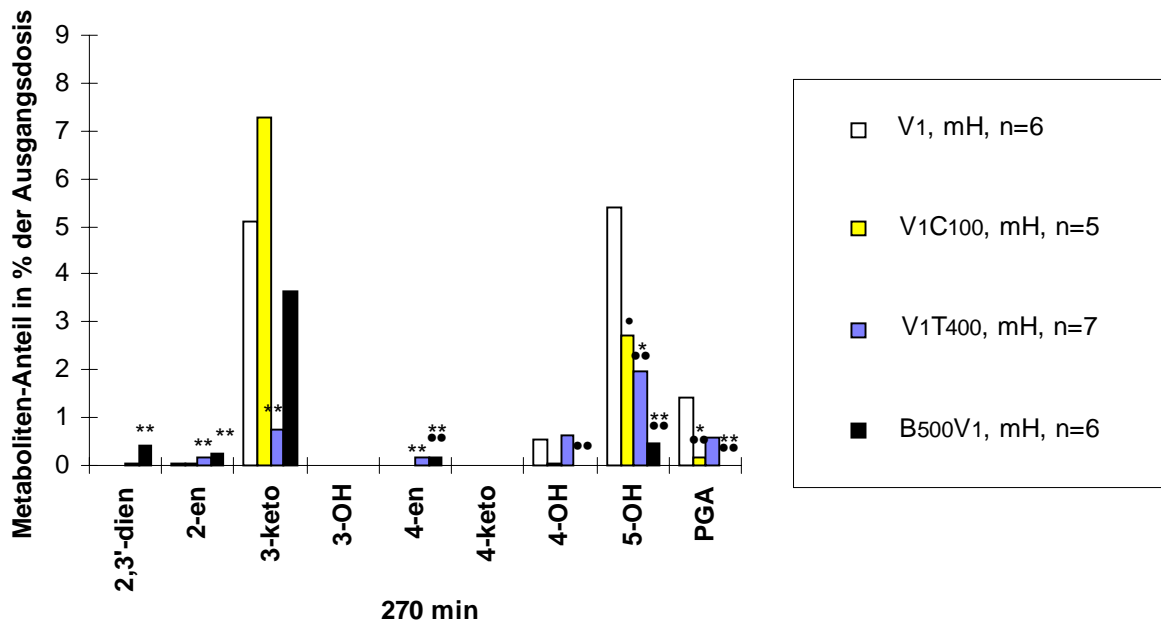


Abbildung 4.3-11: Anteil der VPA-Metaboliten an der eingesetzten VPA-Menge nach 270 min Inkubation - Einfluß von unterschiedlichen Prooxidantien bei Kombination mit 1 mM VPA beim Ernährungszustand Hungern und Einfluß des Ernährungszustandes

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min; Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. Hydroperoxid: nach dem Zeitpunkt 120 min

*, ** signifikanter Einfluß von Prooxidantien bei Kombination gegenüber VPA allein (* p<0,05, ** p<0,01)

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• p<0,05, •• p<0,01)

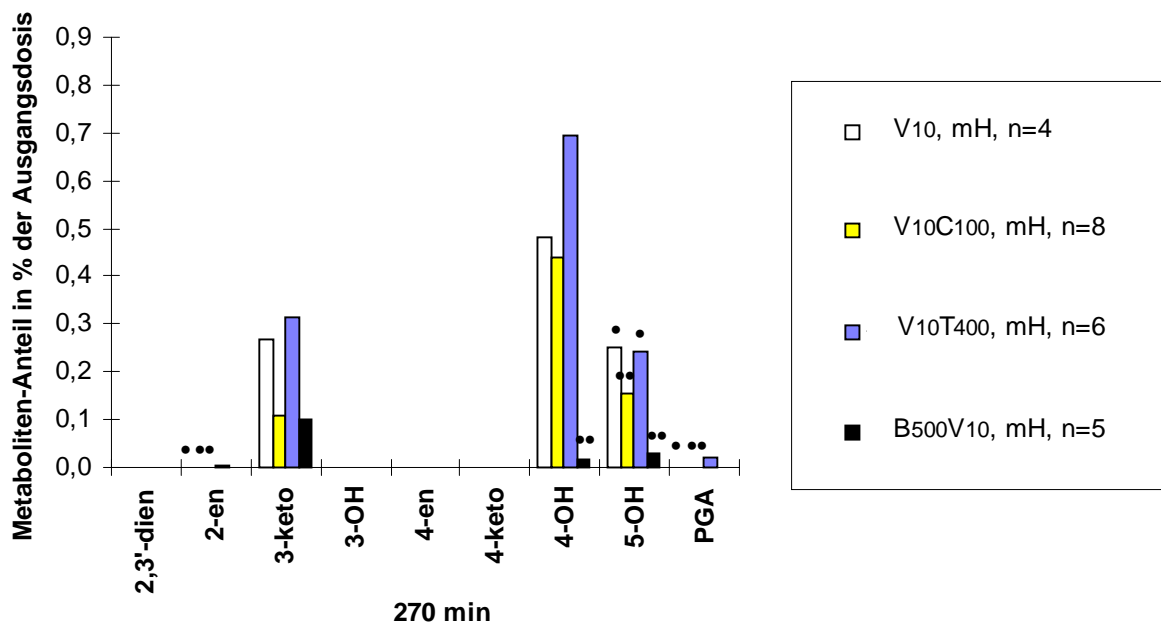


Abbildung 4.3-12: Anteil der VPA-Metaboliten an der eingesetzten VPA-Menge nach 270 min Inkubation - Einfluß von unterschiedlichen Prooxidantien bei Kombination mit 10 mM VPA beim Ernährungszustand Hungern und Einfluß des Ernährungszustandes

Es sind die arithmetischen Mittelwerte der Einzelgruppen in Prozent dargestellt.

Vorbehandlung mit BrH: 15 min vor dem Zeitpunkt 0 min; Zugabe von VPA: nach dem Zeitpunkt 0 min, Zugabe von Krebs-Henseleit bzw. Hydroperoxid: nach dem Zeitpunkt 120 min

•, •• signifikanter Einfluß des Ernährungszustandes bei gleicher Behandlung (• p<0,05, •• p<0,01)

Die Metaboliten 2,4-dien-VPA und 3-keto-4-en-VPA konnten in keinem Fall nachgewiesen werden.

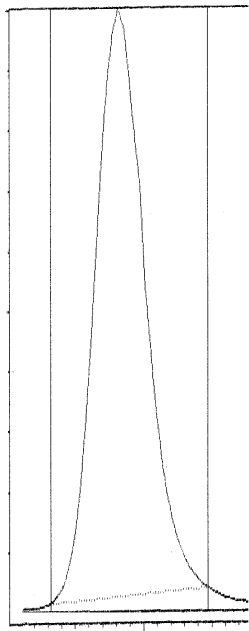
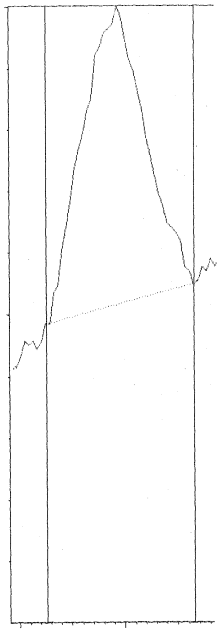
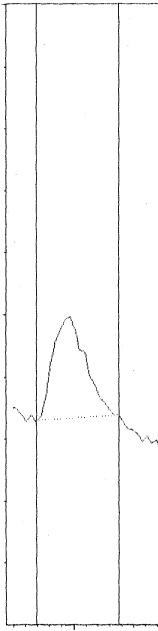
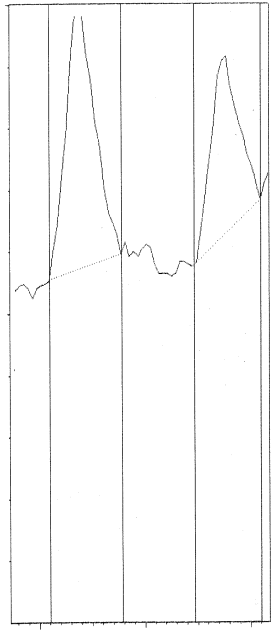
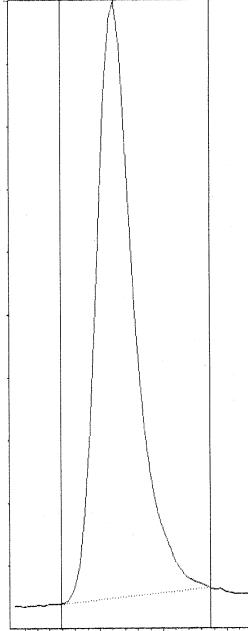
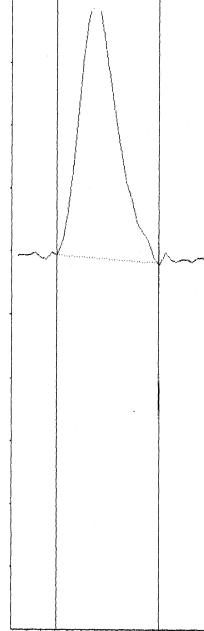
Hungern führte bei gleicher VPA-Prooxidantien-Behandlung im allgemeinen sowohl nach 60 als auch 270 min zu einer Verminderung des Metabolismus, wobei ähnliche Metabolitenmuster wie bei der Behandlung mit VPA allein vorlagen (s. Tabellen 9-15, 9-16, 9-17 und 9-18). Nach 60 min Inkubation konnten in der Tendenz ähnliche Veränderungen des Metabolismus in Abhängigkeit vom Ernährungszustand wie am Ende der Inkubation festgestellt werden. Durch Hungern waren in den Gruppen V1C100, V1T400 bzw. B500V1 in der Regel sowohl die β -Oxidation (Ausnahme 3-keto-VPA) als auch die ω -Oxidation von VPA vermindert. Signifikant waren die Unterschiede nur für die ω -Oxidation zu 5-OH-VPA und PGA, letzteres nicht in der Gruppe V1T400. Die β -Oxidationsmetaboliten 2-en-VPA und 2,3'-dien-VPA wurden tendenziell in geringeren Mengen gebildet. Der Metabolit 2,3'-dien-VPA wurde in der Gruppe V1C100 weder mit noch ohne Hungern bestimmt. Das β -Oxidationsprodukt 3-keto-VPA wurde mit Hungern in den Gruppen V1C100 und B500V1 vermehrt und in der Gruppe V1T400 vermindert detektiert. Der Metabolit 4-en-VPA wurde in der Gruppe V1C100 nur ohne Hungern nachgewiesen. Bei der Gruppe V1T400 war dieser Metabolit sowohl ohne als auch mit Hungern vorhanden, und in der Gruppe B500V1 wurde 4-en-VPA nur mit Hungern detektiert. Signifikant war der Unterschied im Vergleich zur gleichen Behandlung ohne Hungern nur für die Gruppe B500V1 (s. Abbildungen 4.3-9 und 4.3-11).

In den kombinierten Gruppen V10C100, V10T400 bzw. B500V10 wurde durch Hungern nur geringfügig die β -Oxidation vermindert, der ω -Oxidationsweg wurde jedoch in der Regel stark gehemmt. Nur die β -Oxidation zu 2-en-VPA war vermindert, signifikant nicht mehr detektiert wurde der Metabolit nur bei der Gruppe V10C100. 2,3'-dien-VPA wurde weder mit noch ohne Hungern nachgewiesen. Der Metabolit 3-keto-VPA war mit Hungern in den Gruppen V10C100 bzw. B500V10 in geringeren Anteilen bzw. Mengen und in der Gruppe V10T400 in höheren Anteilen bzw. Mengen vorhanden. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Die schon nach 60 min abzusehende Verminderung der ω -Oxidation durch Hungern wurde nach 270 min Inkubation mit Signifikanzen für den Metaboliten 4-OH-VPA in der Gruppe B500V10, für 5-OH-VPA in allen untersuchten Gruppen und für PGA bei der Kombination V10C100 ermittelt. Nur in der Gruppe V10T400 mit Hungern wurde der Metabolit 4-OH-VPA in leicht höheren Anteilen bzw. Mengen gebildet. Der Metabolit 4-en-VPA wurde nur ohne Hungern bei VPA-Behandlung allein sowie in den Kombinationen V10C100 und V10T400 bestimmt (s. Abbildungen 4.3-10 und 4.3-12 und Tabellen 9-17 und 9-18). Die Abbildungen 4.3-13 und 4.3-14 zeigen Beispielchromatogramme von VPA und den Metaboliten bei ausgewählten Behandlungen.

Abbildung 4.3-13: Chromatogramme der Gruppe V1T400 oH, nach 270 min von VPA, 2,3'-dien-VPA, 2-en-VPA, 3-keto-VPA und MEC und der Gruppe V10C50 oH, nach 60 min von 3-OH-VPA

MEC/Masse: 215	VPA/Masse: 201	2,3'-dien/Masse: 197	2-en/Masse: 199	3-keto/Masse: 287	3-OH/Masse: 205
Meßwert in µg/ml	98,952	1,314	0,837	0,457	2,519
Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC
14,065 58,2247	4,345 22,7365	0,159 0,105606	0,129 0,399635	0,085 0,176819	0,048 0,04571
t in min:s	t in min:s	t in min:s	t in min:s	t in min:s	t in min:s

Abbildung 4.3-14: Chromatogramme der Gruppe V5C100 oH von 4-en-VPA, der Gruppe V1 oH von 4-keto und der Gruppe V1T400 oH von 4-OH, 5-OH, PGA und MEC, alle nach 270 min (Der Metabolit 4-OH-VPA wird immer als Doppelpeak detektiert, der größte Peak wird verwendet.)

MEC/Masse: 215	4-en/Masse: 199	4-keto/Masse: 215	4-OH ^a /Masse: 199	5-OH/Masse: 289	PGA/Masse: 303
Meßwert in µg/ml	5,040	0,414	0,659	9,553	0,200
Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC	Intensität AUC
14,065 58,2247	0,044 0,145791	0,106 0,05363	0,078 0,1046	0,776 2,5649	0,085 0,113758
					
9:20	5:50	7:30	7:30 7:40	8:20 8:30	9:10
t in min:s	t in min:s	t in min:s	t in min:s	t in min:s	t in min:s

4.4 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden am Ende des Versuchszeitraumes durchgeführt. Es wurde stichprobenweise überprüft, ob in den Behandlungsgruppen mit Verschlechterung der Vitalität und auftretender Lipidperoxidation auch ultrastrukturelle Veränderungen der Leberzellen zu erkennen sind. Daher werden im folgenden vor allem Leberzellen von hungernden Ratten bei kombinierter Behandlung mit VPA und CuOOH/t-BuOOH bzw. BrH gezeigt, die sowohl den Kontrollbehandlungen als auch der Behandlung mit VPA bzw. Prooxidantien allein gegenübergestellt werden. Bei der kombinierten Behandlung der Leberzellen von nicht hungernden Tieren mit VPA und Prooxidantien wurden bei allen Vitalitäts- und Funktionalitätsparametern mit Ausnahme des intrazellulären GSH-Gehaltes keine entscheidenden Veränderungen festgestellt. Um den Einfluß des Ernährungszustandes auf die Ultrastruktur von Hepatozyten zu ermitteln, wurden stellvertretend die Behandlungsgruppe V10C100 und die Behandlungsgruppe V10 zum Vergleich untersucht.

4.4.1 Kontrollgruppen mit Hungern

Weder das Inkubationsmedium Krebs-Henseleit noch das Lösungsmittel DMFA für die Hydroperoxide und BrH, das in einer äquivalenten Menge zum jeweiligen Behandlungszeitpunkt zugegeben wurde, führten während der gesamten Inkubationszeit zu ultrastrukturellen Veränderungen der Hepatozyten von hungernden Ratten. Die Hepatozyten waren gut erhalten und enthielten viele Mitochondrien. Es war wenig, aber dicht gepacktes rauhes endoplasmatisches Retikulum vorhanden. Einschlüsse konnten nur sehr selten beobachtet werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Trypanblautests, der durchschnittlich 80 % vitale Leberzellen während der gesamten Inkubation anzeigte, wurden nur wenige lysierte Zellen elektronenmikroskopisch gefunden. Die Abbildung 4.4-1 zeigt stellvertretend für die Kontrollgruppen KV, KCT und KB die Morphologie eines typischen Hepatozyten nach 270 min Inkubation in Krebs-Henseleit-Puffer.

4.4.2 Einfluß von Prooxidantien mit Hungern

Die Behandlung der Leberzellen von hungernden Ratten mit 100 µM CuOOH (C100) allein führte zu keiner entscheidenden Veränderung der Innenstruktur der Zelle. Es waren überwiegend morphologisch intakte Zellen vorhanden. Die Mitochondrien besaßen Cristae und waren überwiegend gleichmäßig dicht. Nur selten wiesen die Mitochondrien eine unterschiedlich dichte, zum Teil hellere Matrix auf. Nach 180 min Inkubation wurde wenig rauhes, aber viel glattes endoplasmatisches Retikulum ermittelt. Am Inkubationsende waren das rauhe und

glatte endoplasmatische Retikulum unverändert. Die Plasmamembran zeigte Mikrovilli, und nur vereinzelt kam es zur Bildung von kleinen Blebs⁹.

Ähnliche Beobachtungen wurden nach Behandlung mit 400 μM t-BuOOH (T400) gemacht. Hier waren zusätzlich vereinzelt Zellen mit kleinvakuolig erweitertem rauhem endoplasmatischem Retikulum zu sehen. Vereinzelt traten Lysosomen auf (s. Abbildung 4.4-2).

Die Vorbehandlung mit 500 μM BrH (B500) beeinflusste ebenso wie CuOOH und t-BuOOH nicht die Innenstruktur der Leberzellen. Die Mitochondrien und das glatte und rauhe endoplasmatische Retikulum waren unverändert. Jedoch waren bereits nach 60 min Inkubation die Mikrovilli vermindert, und die Hepatozyten wiesen nach 270 min Inkubation eine zum Teil glatte Plasmamembran und wenige Mikrovilli auf. Am Inkubationsende kam es zur Bildung kleiner Blebs.

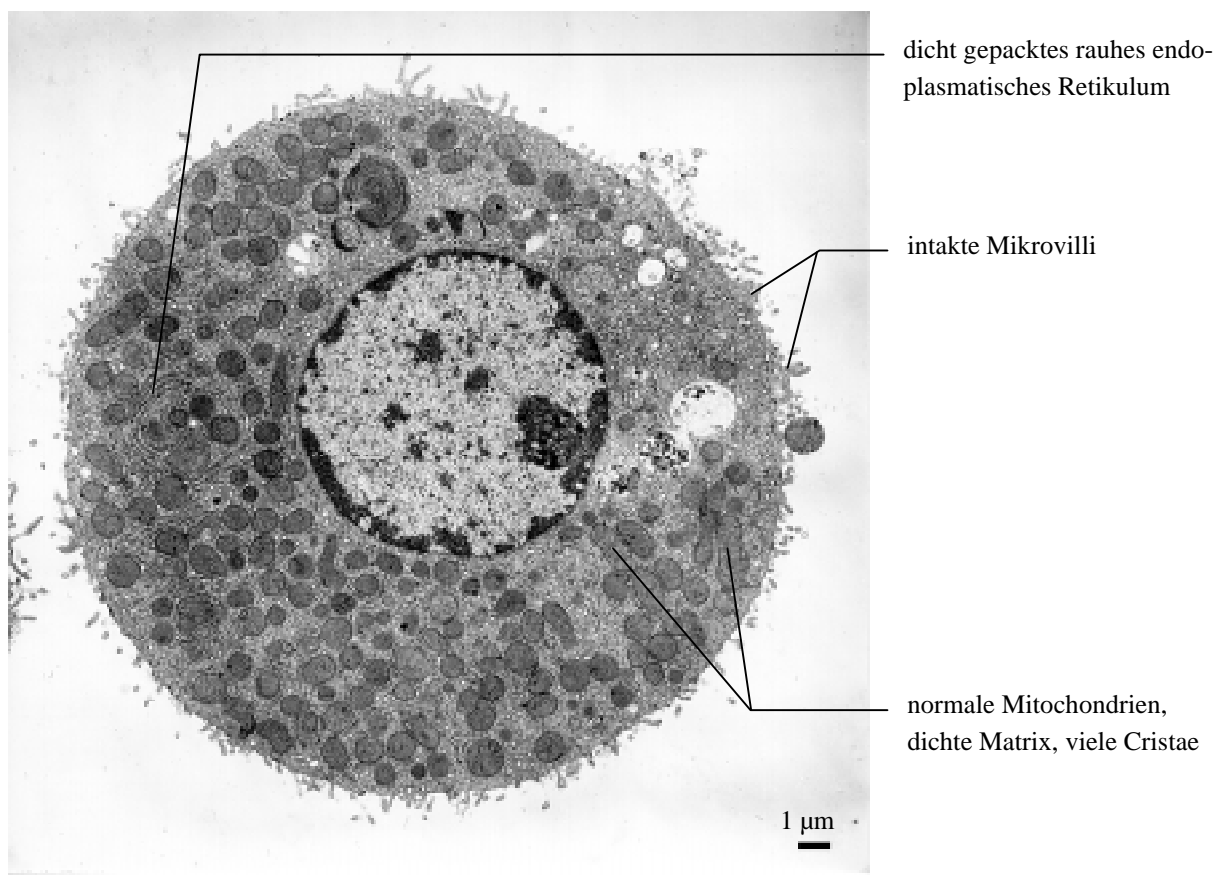


Abbildung 4.4-1: Hepatozyt nach 270 min Inkubation in Krebs-Henseleit-Puffer (KV) beim Ernährungszustand Hungern

Insgesamt wurden durch die Prooxidantien allein keine wesentlichen ultrastrukturellen Veränderungen während der Inkubation verursacht. Die meisten Zellen entsprachen in ihrem Erscheinungsbild den Kontrollzellen (s. Abbildung 4.4-1). Stellvertretend für alle Behandlungs-

⁹ Definition kleiner Bleb: Kleine Blebs sind membranumgebene Gebilde (morphologische Oberflächenprotrusionen), die sehr klein, leer und lichtmikroskopisch nicht erkennbar sind und von der Zellmembran, insbesondere von den Mikrovilli, abgeleitet sind.

gruppen mit Prooxidantien allein zeigt die Abbildung 4.4-2 eine Leberzelle der Behandlungsgruppe T400 mit Hungern am Inkubationsende.

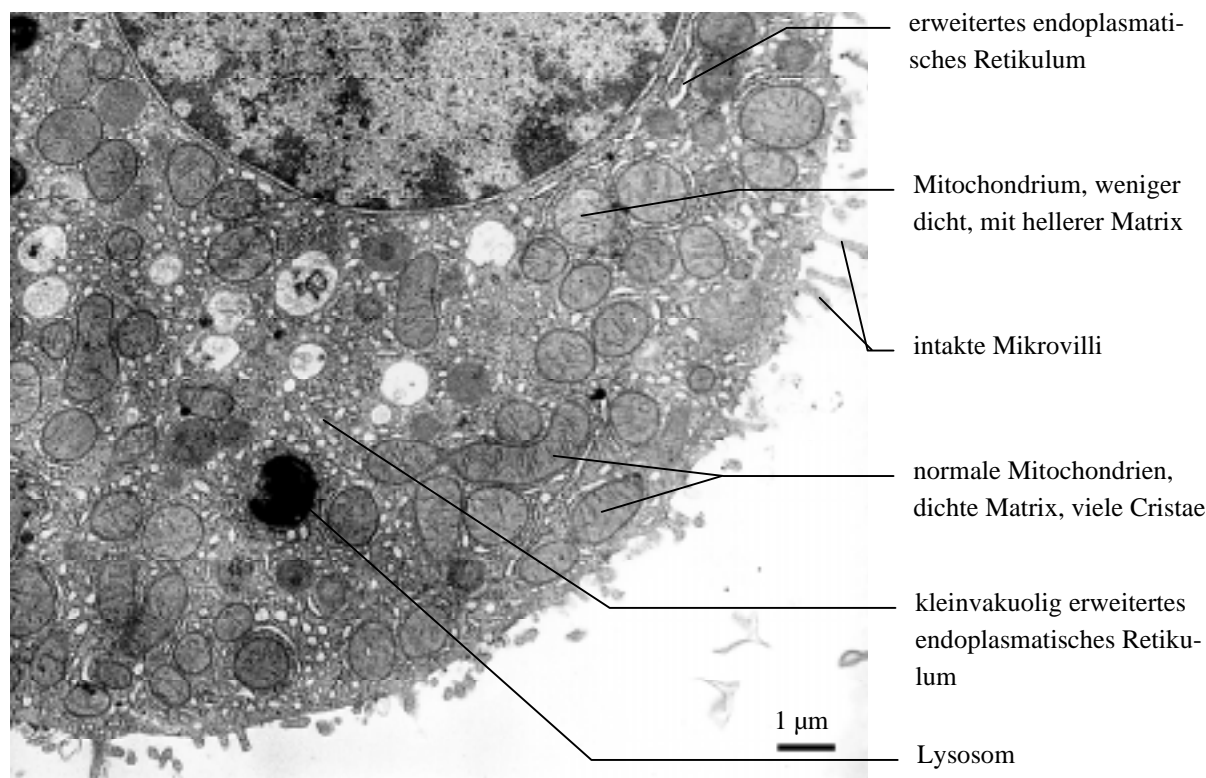


Abbildung 4.4-2: Hepatozyt nach 270 min Inkubation der Behandlungsgruppe T400 beim Ernährungszustand Hungern

4.4.3 Einfluß von VPA allein mit Hungern

Die Abbildung 4.4-3 zeigt, daß die Inkubation der Leberzellen von hungernden Ratten mit 10 mM VPA (V10) über 270 min keine wesentliche negative Wirkung auf die Zellstruktur hatte. Die Leberzellen waren zum größten Teil morphologisch unverändert. Die Mitochondrien entsprachen in ihrer Ultrastruktur denen der Kontrollgruppen (s. Abbildung 4.4-1). Nur einige wiesen eine weniger dichte, hellere Matrix auf. Die Leberzellen besaßen sowohl rauhes als auch glattes endoplasmatisches Retikulum. Die Plasmamembran zeigte weitgehend intakte Mikrovilli, und nur selten waren Leberzellen mit einer zum Teil glatten Plasmamembran zu beobachten. Es erschienen nur vereinzelt kleine Blebs. In der Abbildung 4.4-4 ist zu sehen, daß VPA allein in Kombination mit Hungern gelegentlich zur Bildung von Fetttropfen führte.

4.4.4 Einfluß der Kombination von Prooxidantien und VPA

In den Abbildungen 4.4-5, 4.4-6 und 4.4-7 ist der Prozeß der Veränderungen im Zytoplasma und an der Plasmamembran der Hepatozyten von hungernden Ratten als ein Ergebnis der kombinierten Behandlung mit 10 mM VPA und 100 µM CuOOH (V10C100) dargestellt. Nach 180 min Inkubation wurde eine Verminderung der Zahl der Mikrovilli festgestellt (s. Abbildung 4.4-5). Nach 270 min Inkubation fehlten sie ganz (s. Abbildung 4.4-6). Die Zellober-

fläche sah zum Teil sehr glatt aus, wies jedoch vor allem nach 180 min kleine und insbesondere nach 270 min große Blebs¹⁰ auf, letztere auch den Zellen als Kappe aufsitzend (s. Abbildungen 4.4-5 und 4.4-6). Die Mitochondrien waren unterschiedlich dicht, die mitochondriale Matrix war hell, und ihre Cristae befanden sich in Lyse (s. Abbildung 4.4-7). Die Veränderungen der mitochondrialen Matrix und der Cristae konnten in der Gruppe V10C100 bereits eine Stunde nach Zugabe von CuOOH zum Probenentnahmezeitpunkt 180 min beobachtet werden (s. Abbildung 4.4-5), wohingegen dies in der Gruppe V5C100 erst nach 270 min ausgebildet war (s. Abbildung 4.4-8). Die Cristolyse war am Ende der Inkubation sowohl in der Kombination V5C100 als auch V10C100 stark ausgeprägt (s. Abbildungen 4.4-8 und 4.4-7), die Mitochondrien waren geschwollen und erschienen fast leer. Stellvertretend für letzteres ist die Abbildung 4.4-8 (V5C100, nach 270 min) vorhanden. Außerdem wurden große Fettvakuolen und in der perinuklearen Region einige sekundäre Lysosomen festgestellt (s. Abbildung 4.4-5). Auffällig große Lipidvakuolen konnten bereits in Leberzellen der Behandlungsgruppe V5C100 beobachtet werden. Sowohl nach 180 min als auch nach 270 min Inkubation wurden vereinzelt Myelinkörper ermittelt. Neben normalem rauhem und glattem endoplasmatischem Retikulum wurde kleinvakuolig erweitertes und stark dilatiertes beobachtet (s. Abbildungen 4.4-7 und 4.4-8). Andere kleine Vakuolen im Zytoplasma kamen kaum vor.

An der Plasmamembran erschienen nach Behandlung mit einer 10fach niedrigeren VPA-Menge, 1 mM VPA, in Kombination mit 400 µM t-BuOOH (V1T400) und Hungern bereits innerhalb von 30-60 min nach t-BuOOH-Zugabe charakteristische große Blebs als ein frühes Merkmal für eine veränderte Oberflächenstruktur der Hepatozyten. Die Blebbildung war im Vergleich zu den Behandlungsgruppen V5C100 und V10C100 erhöht, und die Blebs waren bei Anwesenheit von t-BuOOH bereits lichtmikroskopisch zu erkennen (s. Abbildung 4.4-10). In der Gruppe V1T400 wurden zum Zeitpunkt 180 min analoge Veränderungen der Feinstruktur der Leberzellen zur Behandlungsgruppe V10C100 beobachtet. Diese waren allerdings in der Gruppe V1T400 noch nicht so ausgeprägt wie in der Behandlungsgruppe V10C100 zu diesem Zeitpunkt (s. Abbildungen 4.4-9 und 4.4-10, V1T400 und Abbildung 4.4-5, V10C100). Die Mitochondrien befanden sich in verschiedenen Stadien der Veränderung. Ungefähr die Hälfte war intakt und mit Cristae ausgestattet, und die andere Hälfte wies eine helle Matrix und eine beginnende Cristolyse auf.

¹⁰ Definition großer Bleb: Unter großen Blebs sind membranumgebene Gebilde (morphologische Oberflächenprotrusionen) mit lichtmikroskopischer Dimension bis Erythrozytengröße zu verstehen, gefüllt mit zytoplasmatischer Matrix, Ribosomen und sehr spärlichem endoplasmatischem Retikulum.

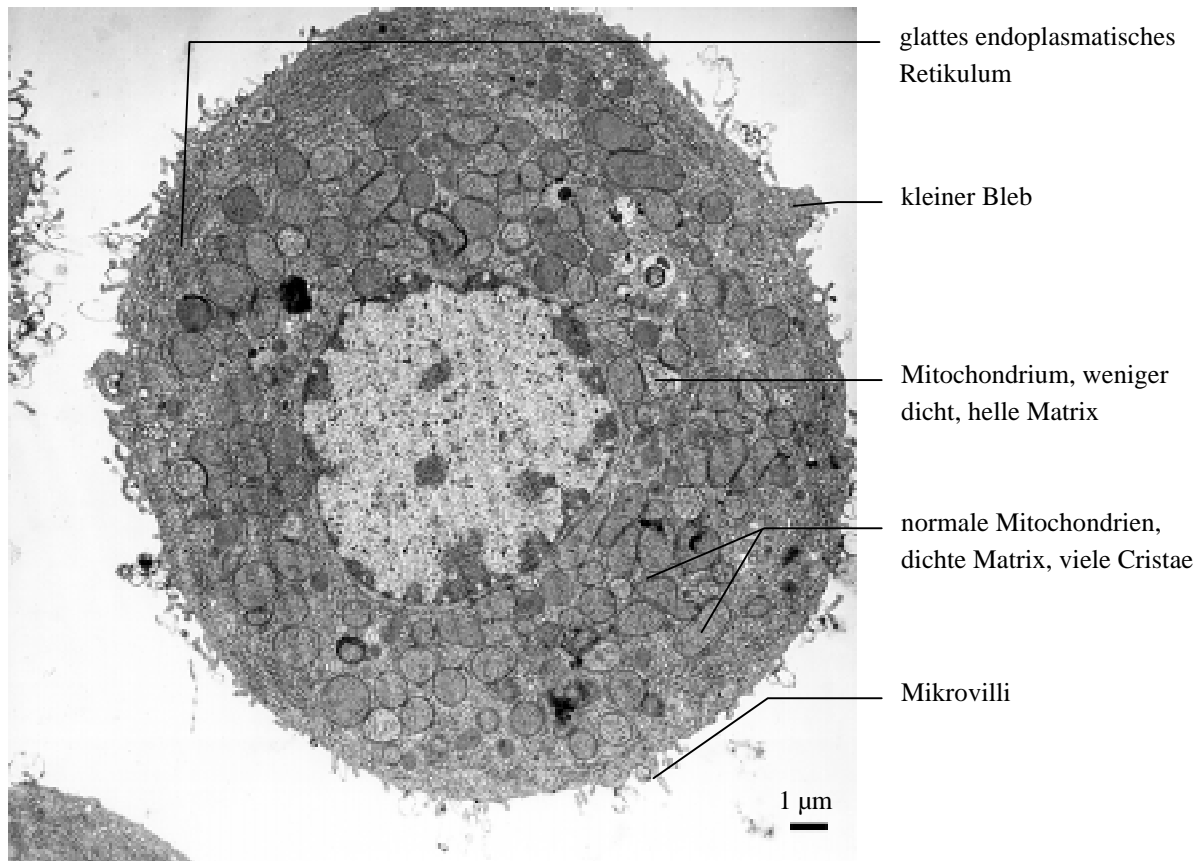


Abbildung 4.4-3: Hepatozyt nach 270 min Inkubation der Behandlungsgruppe V10 beim Ernährungszustand Hungern

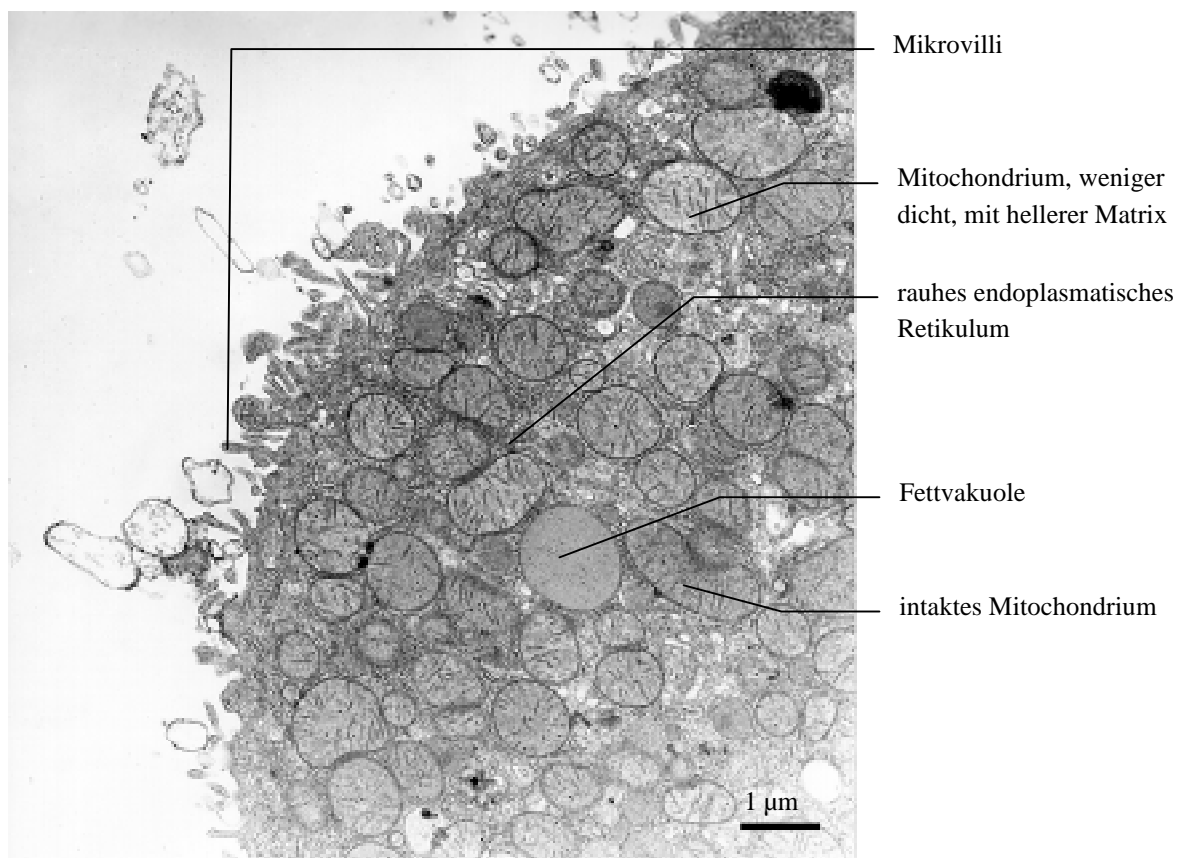


Abbildung 4.4-4: Hepatozyt nach 270 min Inkubation der Behandlungsgruppe V10 beim Ernährungszustand Hungern

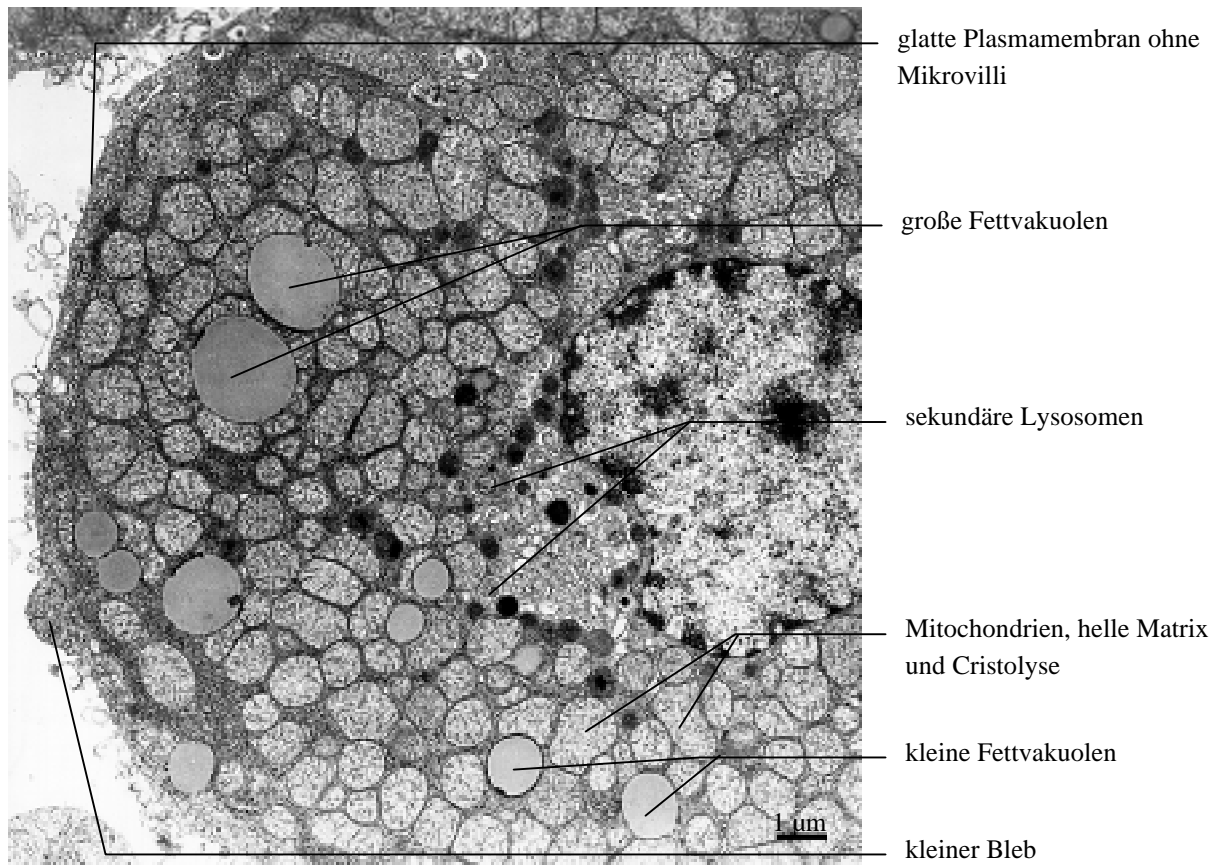


Abbildung 4.4-5: Hepatozyt nach 180 min Inkubation der Behandlungsgruppe V10C100 beim Ernährungszustand Hungern

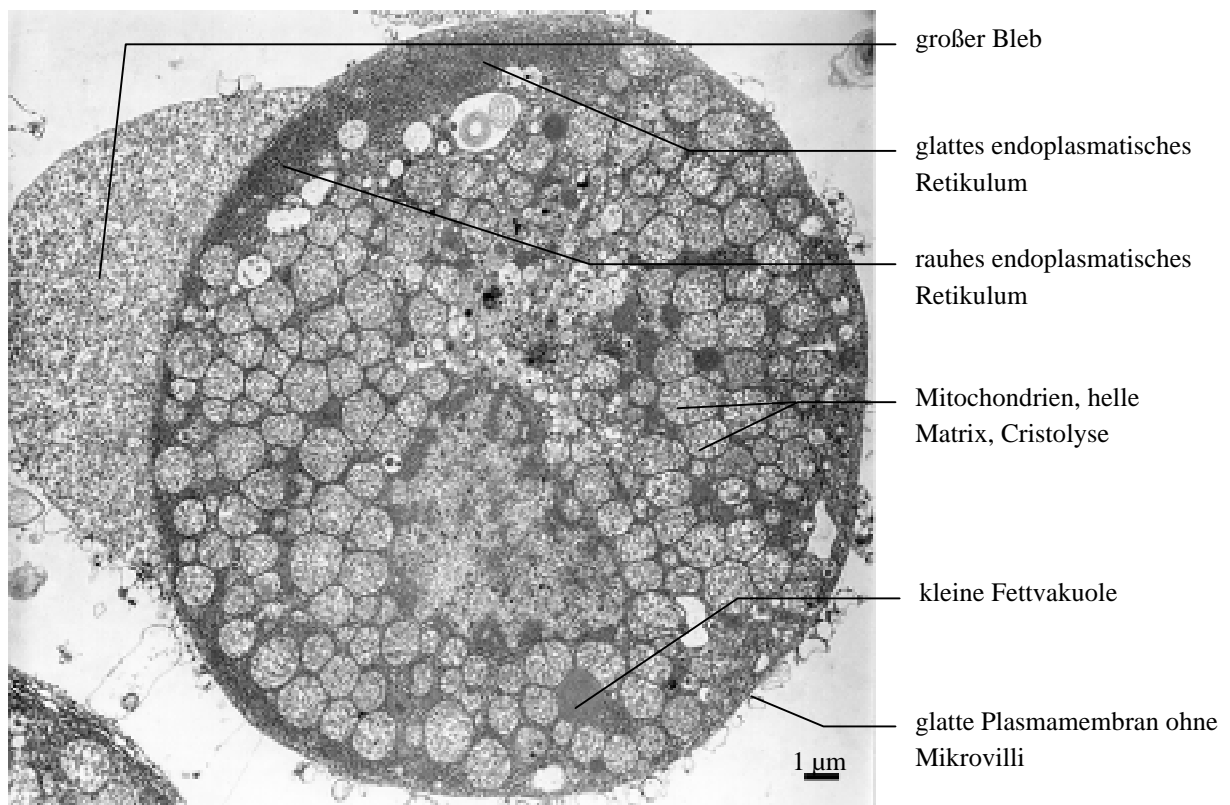


Abbildung 4.4-6: Hepatozyt nach 270 min Inkubation der Behandlungsgruppe V10C100 beim Ernährungszustand Hungern

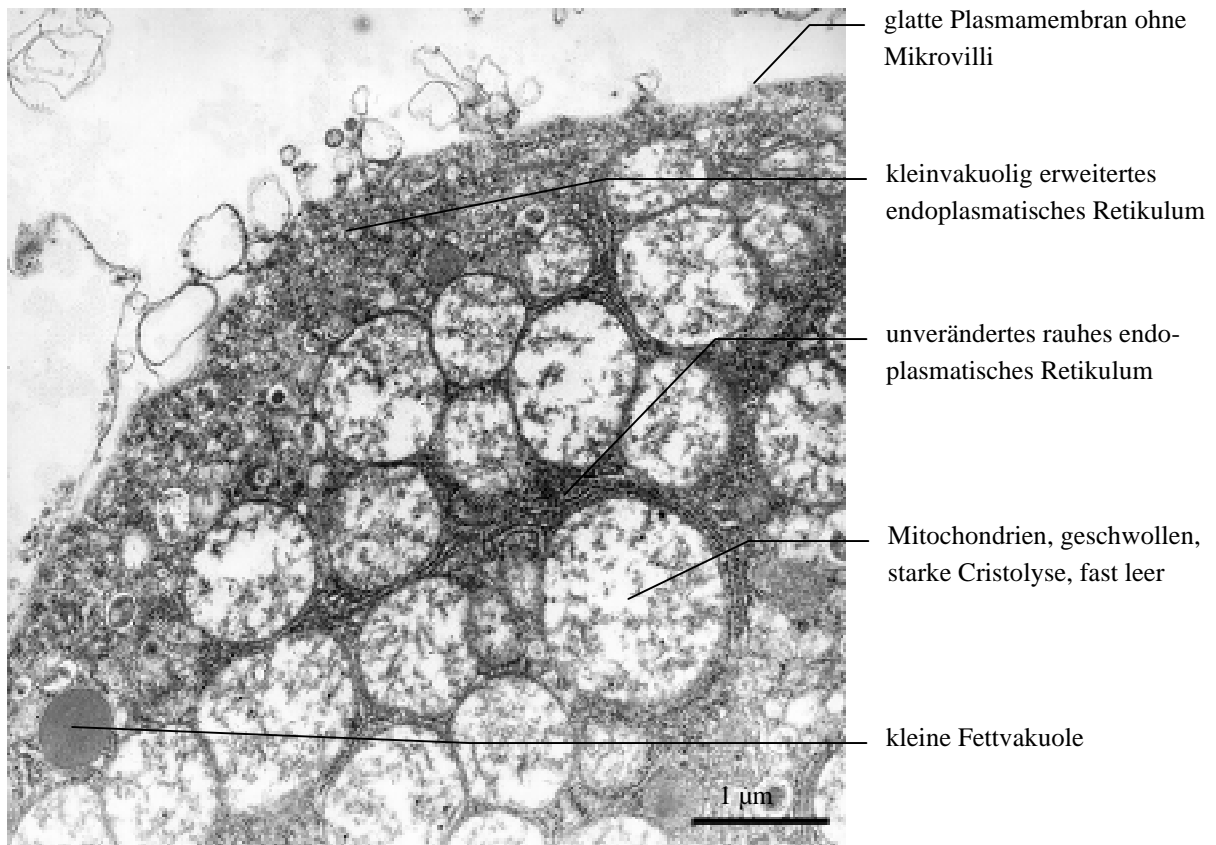


Abbildung 4.4-7: Hepatozyt nach 270 min Inkubation der Behandlungsgruppe V10C100 beim Ernährungszustand Hungern

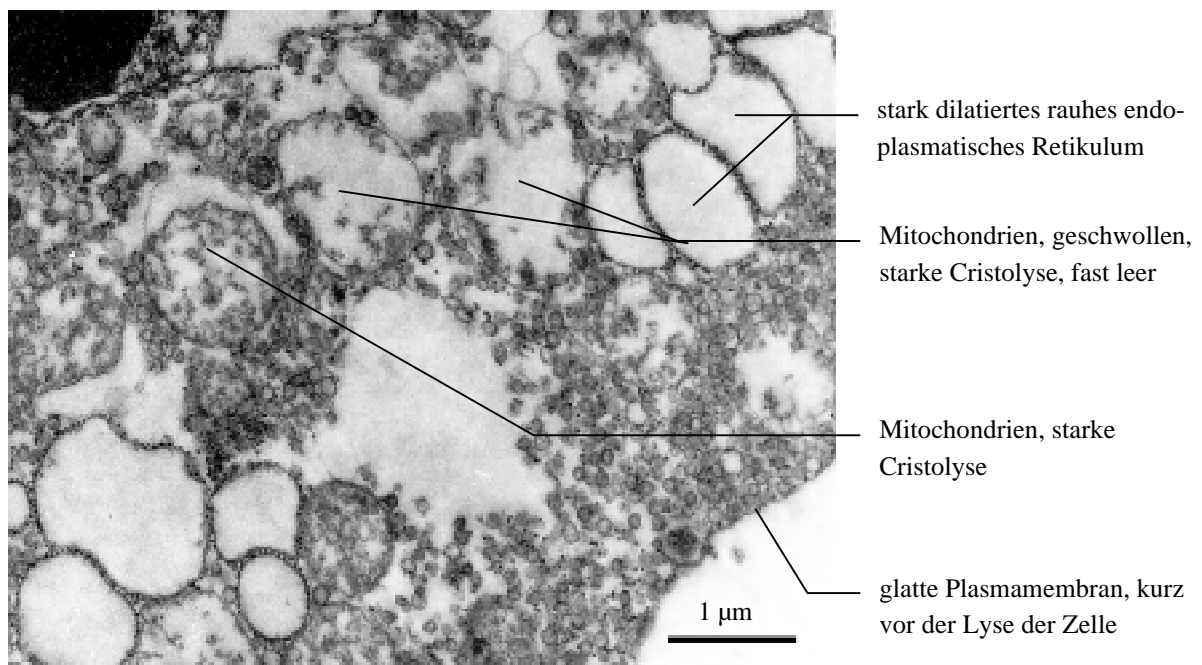


Abbildung 4.4-8: Hepatozyt nach 270 min Inkubation der Behandlungsgruppe V5C100 beim Ernährungszustand Hungern

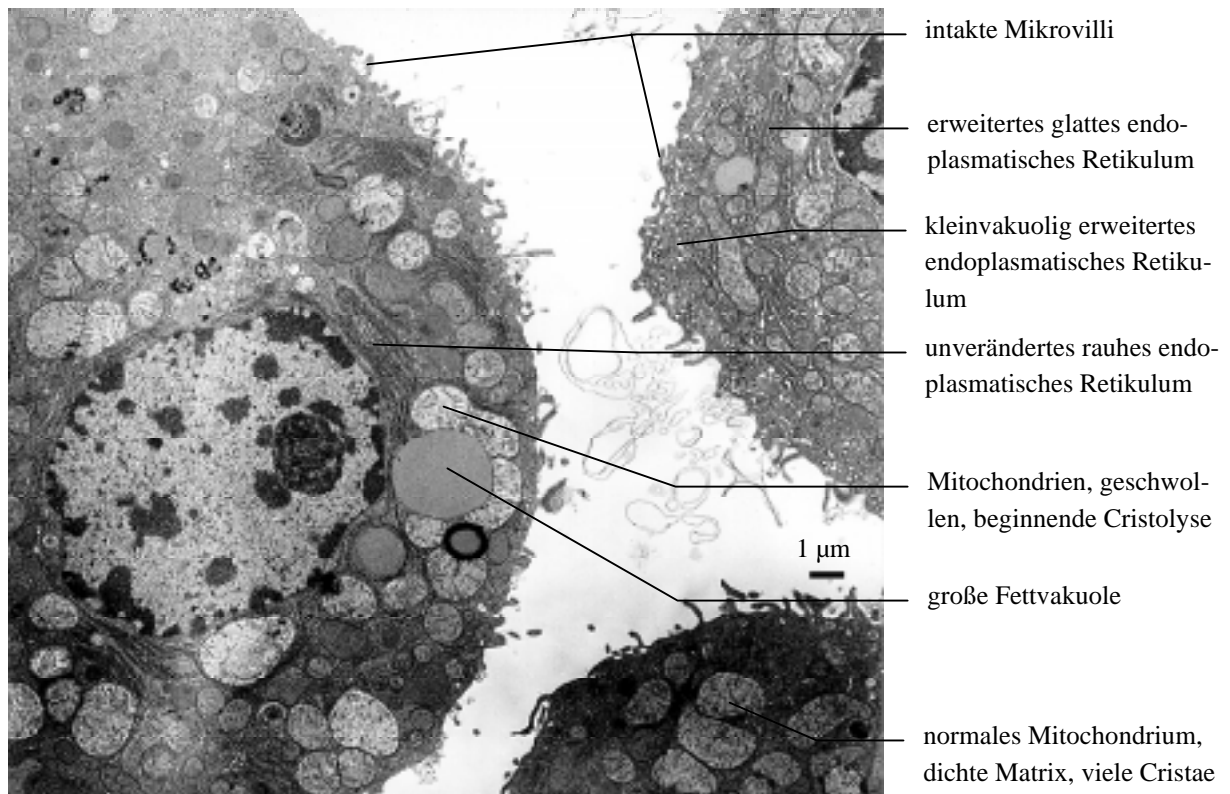


Abbildung 4.4-9: Hepatozyt nach 180 min Inkubation der Behandlungsgruppe V1T400 beim Ernährungszustand Hungern

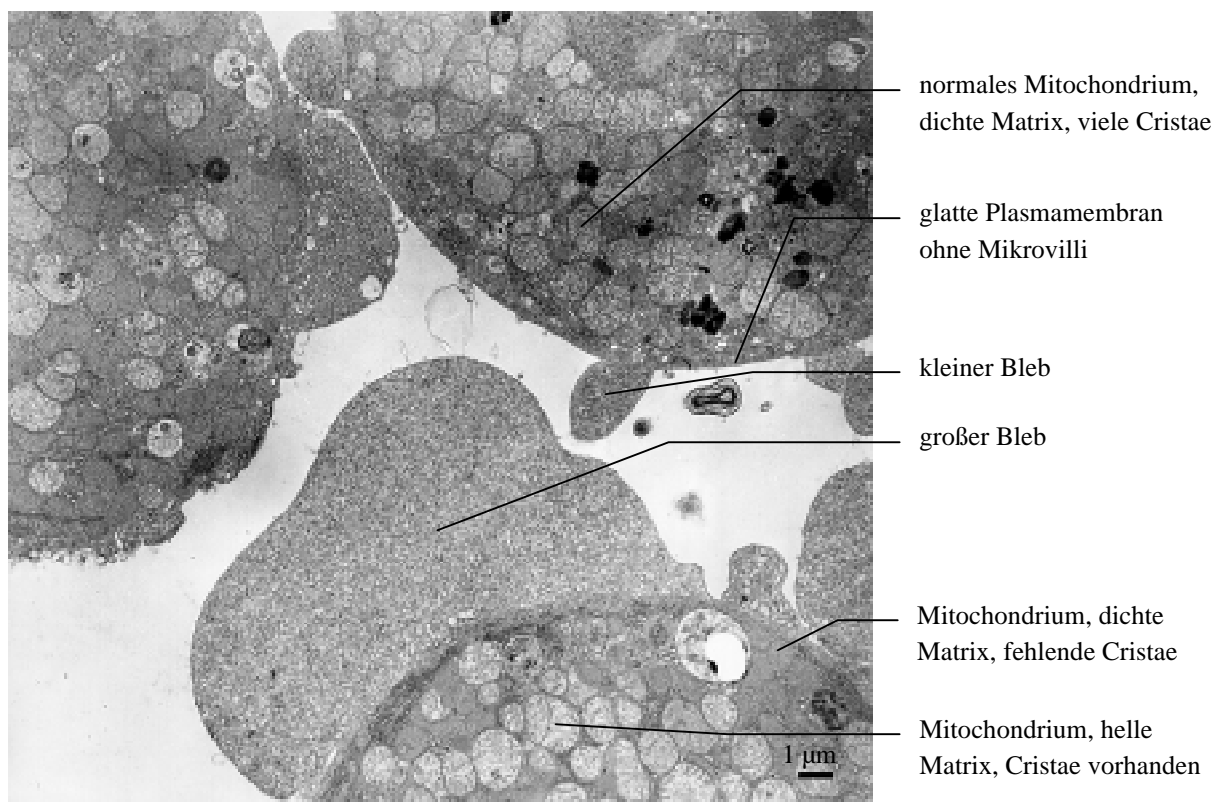


Abbildung 4.4-10: Hepatozyt nach 180 min Inkubation der Behandlungsgruppe V1T400 beim Ernährungszustand Hungern

Nach GSH-Verarmung von Leberzellen hungernder Tiere mit BrH und Behandlung mit 10 mM VPA (B500V10) war nach 180 min Inkubation die Feinstruktur der Leberzellen noch erhalten. Ihre Plasmamembran war jedoch glatt mit nur wenigen kleinen Mikrovilli (s. Abbildung 4.4-11). Nach 270 min Inkubation waren nur noch wenige intakte Hepatozyten vorhanden. Die Leberzellen waren rund, wiesen eine glatte Oberfläche auf, und es waren keine Mikrovilli mehr zu erkennen. Die meisten Zellen gingen, wie auch in Kombination mit den Hydroperoxiden, in Lyse und wiesen große Mitochondrien mit wenigen oder keinen Cristae auf. Das endoplasmatische Retikulum war kleinvakuolig erweitert (s. Abbildungen 4.4-7 und 4.4-8, V10C100 bzw. V5C100, mit Hungern).

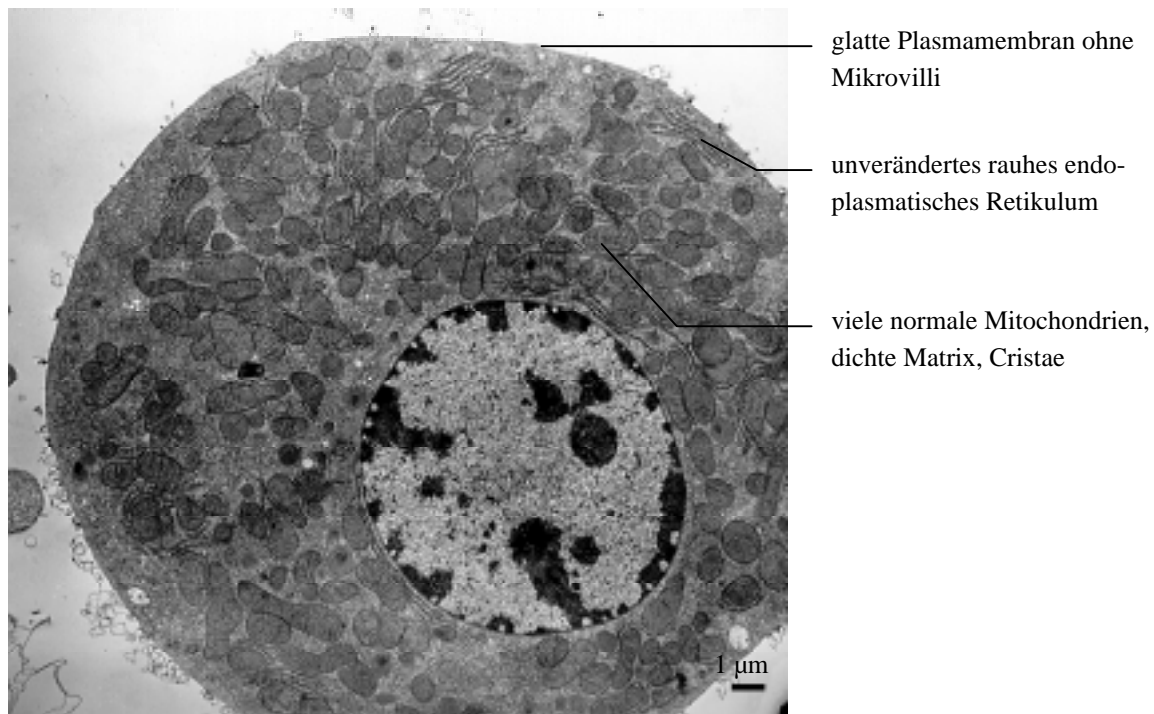


Abbildung 4.4-11: Hepatozyt nach 180 min Inkubation der Behandlungsgruppe B500V10 beim Ernährungszustand Hungern

VPA allein führte auch in hohen Dosen zu keiner Veränderung der Ultrastruktur der Leberzellen von nicht hungernden Ratten. Die Hepatozyten entsprachen in ihrem Aussehen den Kontrollhepatozyten (s. Abbildung 4.4-1, KV, nach 270 min). In der Behandlungsgruppe V10C100 konnte gezeigt werden, daß nach 270 min Inkubation die Feinstruktur der Hepatozyten trotz der starken Behandlung gut erhalten war. Insbesondere die Mitochondrien waren intakt und wiesen eine dichte Matrix und keine Lyse der Cristae auf. Nur selten wurden Mitochondrien mit weniger dichter Matrix, aber intakten Cristae beobachtet, ähnlich wie in der Abbildung 4.4-3 bei der Behandlungsgruppe V10. Lediglich die Plasmamembran wies Veränderungen auf. Sie war zum Teil glatt und nur stellenweise mit Mikrovilli versehen. Es kam zur Bildung von einigen kleinen Blebs. Das stimmte mit den bei anderen Behandlungen festgestellten Veränderungen überein (s. Abbildung 4.4-3, V10, mit Hungern, nach 270 min, Abbildung 4.4-11, B500V10, mit Hungern, nach 180 min).

5 Diskussion

5.1 Die Wahl des Modells

5.1.1 Modell und Inkubationsbedingungen

Nach BATT und FERRARI (1995), BERRY et al. (1992) und MOLDÉUS et al. (1978) sind frisch isolierte Hepatozyten als Zellmodell für Toxizitäts- und Metabolismusstudien geeignet, da sie einen hohen Gehalt an Cytochrom P450 besitzen und reich an reduziertem GSH sind. Isolierte Leberzellen bleiben in Suspensionskulturen über mehrere Stunden morphologisch intakt und verfügen in dieser Zeit über eine ausreichende metabolische Kapazität (BERRY et al., 1991). Deshalb werden sie immer häufiger für experimentelle Modelle zum Studium der Mechanismen der durch Xenobiotika induzierten Toxizität genutzt.

In Anlehnung an die Untersuchungen von KLEE (1992) im selben *in vitro*-Modell der isolierten Hepatozyten der Ratte erfolgte die Inkubation unter atmosphärischer Luft. KLEE (1992) konnte zeigen, daß die Zellen auch unter Luftbegasung über genügend Sauerstoff verfügen, um ihre vitalen Funktionen aufrechtzuerhalten. Dies wird durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt. Außerdem wurde in isolierten Hepatozyten mit Hilfe von Testsubstanzen nachgewiesen, daß der niedrigere Sauerstoffpartialdruck bei Luftbegasung im Vergleich zur Carbogenbegasung keinen Einfluß auf das Ausmaß des GSH-Verlustes hat (KLEE, 1992) und zum Auslösen der Lipidperoxidationskettenreaktion ausreichend ist bzw. sogar zu einer umfangreicheren Lipidperoxidation führt (STACEY et al., 1982, UNGEMACH, 1982).

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Ratten mit einem Gewicht von 250-300 g verwendet, da in *in vivo*-Untersuchungen mit VPA bei Ratten gezeigt wurde, daß junge Ratten (ca. 150 g) weniger empfindlich gegenüber einer chronischen VPA-Behandlung mit hoher VPA-Dosis sind als erwachsene Ratten (250 g) (KESTERSON et al., 1984, LÖSCHER et al., 1993a, LÖSCHER et al., 1992). Erst am Ende der eigenen Versuche wurden *in vitro*-Ergebnisse von FISHER et al. (1994) veröffentlicht, die zeigen konnten, daß Leberstücken von gerade abgesetzten Ratten (ca. 65 g) empfindlicher als die von einer adulten Ratte (300-350 g) gegenüber VPA, 4-en-VPA und 2-en-VPA reagieren.

5.1.2 Länge der Hungerperiode und der Einfluß von Hungern

Hungern wird, wie im Abschnitt 2.3.4 erläutert, als Risikofaktor für die VPA-Hepatotoxizität diskutiert. Die Hungerperiode über Nacht mit insgesamt 20 h wurde gewählt, da bekannt ist, daß Hungern über diesen Zeitraum den GSH-Gehalt der Leber um ein Drittel senkt (PRICE et al., 1987, TANG et al., 1995) und auch ein verlängertes Hungern über weitere 72-96 h den

GSH-Gehalt nicht unter ein Minimum zu senken vermag.¹ Außerdem ist bekannt, daß bereits nach 12 h Hungern alle Merkmale eines ketotischen Stadiums voll ausgeprägt sind, ein völliger Glykogenverlust der Leber in Ratten vorliegt (MCGARRY et al., 1973) und eine Erhöhung des Spiegels von endogenen Fettsäuren zu beobachten ist (FELIG, 1979). Ebenso ist die Hungerperiode ausreichend lang, um eine Induktion der Cytochrome P450 2B2, 2B1 und 2E1 zu erreichen (BROWN et al., 1995).

Zur Darstellung des Einflusses von Hungern wurden das Gewicht der Tiere und der Leber und der GSH-Status der isolierten Leberzellen bestimmt. In den vorliegenden Untersuchungen verursachte die Hungerperiode von 20 h eine mit Ergebnissen anderer Autoren vergleichbare signifikante Körpergewichtsverminderung der Ratten von 10 % (BROWN et al., 1995, MATSUZAWA und SAKAZUME, 1994). Hungern führte ebenfalls zu einem signifikanten Lebergewichtsverlust. Dieser betrug 24 % und liegt somit etwas unter der von BROWN et al. (1995) und RAKOTOAMBOA et al. (1994) festgestellten Verminderung. Die eigenen Ergebnisse und die im Literaturteil zusammengefaßten Daten zum GSH-Gehalt von Leberzellen (s. Tabelle 2.3-1) bestätigen, daß der GSH-Gehalt der Gewebe durch das Futter und den Ernährungsstatus beeinflusst wird. Hungern über 20 h senkte den GSH-Gehalt um ca. 40-50 %. TANG et al. (1995) und PRICE et al. (1987) stellten durch 24 h Hungern einen vergleichbar hohen GSH-Verlust von ca. 30 % in der gesamten Leber und JOCHMANN (1996) in isolierten Leberzellen der Ratte zu Versuchsbeginn fest. Aus den Ergebnissen von KLEE et al. (1994), KLEE (1992) und NÜRNBERGER (1995) läßt sich dagegen in isolierten Rattenhepatozyten nur ein durch ca. 20 h Hungern verursachter intrazellulärer GSH-Verlust von 5-10 % ermitteln.

Der bei gefütterten Ratten in den eigenen Untersuchungen festgestellte durchschnittliche intrazelluläre GSH-Gehalt aller zum Zeitpunkt 0 unbehandelten Gruppen betrug 8,2 mmol/l ZW mit einem Schwankungsbereich von 7,5-10,6 mmol/l ZW (s. Tabelle 9-11). Mit Hungern wurde in allen untersuchten Gruppen ein durchschnittlicher Gehalt von 5,1 mmol/l ZW mit einem Schwankungsbereich zwischen 4,2 und 6,4 mmol/l ZW festgestellt (s. Tabelle 9-12). Dies stimmt mit den in Tabelle 2.3-1 zusammengefaßten Ergebnissen anderer Autoren überein. Der dabei auffallende beträchtliche Schwankungsbereich der absoluten GSH-Gehalte bei gleichen Ernährungszuständen kann auch mit der zirkadianen Rhythmik zusammenhängen (ROMERO et al., 1984). JAESCHKE und WENDEL (1985) ermittelten ein GSH-Maximum zwischen 6.00 und 10.00 Uhr und ein Minimum gegen 18.00 Uhr, und es bestand eine Abhängigkeit vom Futterrhythmus.

In der vorliegenden Untersuchung wurde in den Kontrollgruppen im Inkubationsverlauf mit Hungern und ohne Hungern eine Zunahme des intrazellulären GSH festgestellt, diese betrug nach 120 min 1,6 mmol/l ZW bzw. 1,1 mmol/l ZW. Die isolierten Hepatozyten wiesen in diesen Experimenten unter Kontrollbedingungen unabhängig vom Ernährungszustand eine ausreichende metabolische Aktivität zur Neusynthese bzw. Regenerierung von GSH auf. Dies geschah höchstwahrscheinlich aus intrazellulären Aminosäuren, da dem Inkubationsmedium

¹ CHO et al. (1981), HAZELTON et al. (1986), JAESCHKE und WENDEL (1985), TATEISHI et al. (1977), TATEISHI et al. (1974), WILLIAMSON et al. (1982).

keine GSH-Vorstufen zugegeben wurden. JOCHMANN (1996) ermittelte in isolierten Hepatozyten bei beiden Ernährungszuständen in 120 min Inkubation eine vergleichbare GSH-Bildung, die mit Hungern zu einem GSH-Anstieg von ca. 2,0 mmol/l ZW und ohne Hungern von ca. 1,0 mmol/l ZW führte. Auch KLEE (1992), KLEE et al. (1994) und NÜRNBERGER (1995) beobachteten sowohl mit als auch ohne Hungern in dieser Zeit eine GSH-Bildung von 0,7 bzw. 3 mmol/l ZW.

5.1.3 Prooxidantienwahl und Einfluß von oxidativem Streß

Wie im Abschnitt 2.4 erwähnt, ist unter dem Begriff oxidativer Streß durch Prooxidantien eine Störung der Prooxidantien-Antioxidantien-Balance zu verstehen, die potentiell zu Schäden führen kann. Fälle von fataler Hepatotoxizität von VPA waren häufig mit viralen fieberhaften Erkrankungen verbunden (DREIFUSS et al., 1987, KÖNIG et al., 1994, SIEMES et al., 1992). Durch Entzündungen (DARGEL, 1992) und verschiedene Xenobiotika (NORDMANN, 1994) wird oxidativer Streß ausgelöst. Hydroperoxide sind geeignet, diese pathologischen Vorgänge im Modell zu simulieren.

Die beiden Hydroperoxide CuOOH bzw. *t*-BuOOH wurden verwendet, da sie als typische Modellsubstanzen zur Auslösung einer oxidativen Belastung in Zellen genutzt werden. Für beide Hydroperoxide bestehen zwei in Abschnitt 2.4 erläuterte dosisabhängige Abbauewege. Es kamen zwei Hydroperoxide mit gleichem Wirkungsmechanismus zum Einsatz, um auszuschließen, daß die Ergebnisse nur eine substratspezifische Reaktion zwischen einem Hydroperoxid und VPA widerspiegeln. Im vorliegenden Modell wurde eine maximale Konzentration gewählt, die allein mit großer Wahrscheinlichkeit zum Hydroperoxidabbau durch Reduktion ohne Freisetzung freier Radikale führt. Die Störung der Prooxidantien-Antioxidantien-Balance sollte von den Leberzellen noch kompensierbar sein. Es wurde darauf geachtet, daß nach Zugabe der Prooxidantien keine meßbaren Veränderungen des GSH-Gehaltes der Leberzellen und des MDA-Wertes im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten sind. Für CuOOH wurde in Konzentrationen bis zu einschließlich 100 µM CuOOH in isolierten Lebermitochondrien (GOGVADZE und ZHUKOVA, 1991) und von 225 µM in isolierten Leberzellen (HÖGBERG und KRISTOFERSON, 1977) keine Zytotoxizität und insbesondere keine MDA-Bildung beschrieben. Das wurde in den eigenen Untersuchungen mit 100 µM CuOOH bestätigt (s. Abschnitt 4.2.2). Der von HÖGBERG und KRISTOFERSON (1977) bei 225 µM CuOOH nach 15 min beobachtete GSH-Verlust um die Hälfte des Initialwertes konnte durch die GSH-Synthese kompensiert werden. Deshalb wurden die Konzentrationen 50 µM und 100 µM CuOOH verwendet. Die Angaben für *t*-BuOOH variieren in der Literatur stärker. So wurden nicht zytotoxische Konzentrationen bis 800 µM *t*-BuOOH in isolierten Hepatozyten der Ratte ermittelt (s. Abschnitt 2.4.1.1). Eigene Vorversuche zeigten, daß in diesem Modell Konzentrationen bis 600 µM *t*-BuOOH zu keiner Veränderung aller untersuchten Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter während der gesamten Inkubation führten (Ergebnisse nicht dargestellt). Deshalb kamen für *t*-BuOOH die Konzentrationen 200 µM und 400 µM zum Einsatz. Der bereits in Abschnitt 5.1.2 diskutierte Einfluß von Hungern auf den GSH-Status wurde auch in diesen Gruppen ermittelt. Wie in den Kontrollgruppen KV, KCT und KB lagen die GSH-Werte der Hydroperoxidgruppen mit Hungern während der gesamten Inkubation

signifikant unter denen der Leberzellen von nicht hungernden Tieren. Die Zellen waren nicht in der Lage, die durch Hungern entstandenen Defizite in der GSH-Menge durch Neusynthese bzw. Regeneration vollständig aufzufüllen (s. Abschnitt 4.2.2.5 und Abbildung 4.2-2).

Ein wertvolles experimentelles Modell zum Studium der Zytotoxizität stellen GSH-verarmte Zellen dar (ALBANO et al., 1985, JEVTOVI•-TODOROVI• und GUENTHNER, 1992, SANDY et al., 1986). Es wurde eine zweite Versuchsreihe mit BrH-Vorbehandlung durchgeführt, da bekannt ist, daß diese Substanz als Substrat der GSH-S-Transferase zu einer effektiven Verminderung der GSH-Speicher von Leberzellen führt. Außerdem wurde für BrH auch bei sehr hohen Konzentrationen von 2 mM in isolierten Hepatozyten keine Lipidperoxidation beobachtet (KHAN und O'BRIEN, 1991). Andere Substrate der GSH-S-Transferase wie DEM, Phoron, Dinitrofluorbenzen oder Acrolein verursachten dagegen schon bei einer leichten Konzentrationserhöhung eine Zytotoxizität durch Lipidperoxidation *in vivo* in Zellen und in Homogenaten (ANUNDI et al., 1979, MICCADEL et al., 1988, SILVA und O'BRIEN, 1989, YOUNES und SIEGERS, 1981). Hinzu kommt, daß z.B. DEM ein Hemmer des mikrosomalen Cytochroms P450 ist (ANDERS, 1978, SUAREZ et al., 1981) und selektiv nur den zytosolischen GSH-Pool durch einen direkten Fängermechanismus verarmt (MEREDITH und REED, 1982). Ebenfalls zur Diskussion standen die GSH-Verarmer BSO und BCNU. Die erste Substanz wirkt über eine spezifische Hemmung der γ -Glutamylcysteinsynthetase, blockiert somit die GSH-Biosynthese und führt zur GSH-Verarmung durch einen fortlaufenden GSH-Verbrauch (GRIFFITH, 1981). Die zweite Substanz hemmt die GSSG-Rd und unterbindet damit die Wiederherstellung von GSH aus GSSG (BABSON et al., 1981, EKLÖW et al., 1984). Eine Hemmung dieser Enzyme sollte jedoch vermieden werden, da diese auch im VPA-Metabolismus direkt oder indirekt eine Rolle spielen. Der Vorteil von BrH lag auf der Hand. Zum einen besitzen die GSH-entleerten Hepatozyten noch ein adäquates antioxidatives und enzymatisches System, um physiologischen oxidativen Streß bekämpfen zu können (KHAN und O'BRIEN, 1991). Zum anderen erlaubt die Nutzung einer Substanz, die nicht mit dem mischfunktionellen Oxidasesystem in Wechselwirkung tritt, eine eindeutige Schlußfolgerung hinsichtlich der Wirkung der GSH-Entleerung auf den Metabolismus und die Toxizität von Xenobiotika. BrH scheint also besonders geeignet zu sein, um die Rolle von GSH im Zytotoxizitätsmechanismus von VPA und zusätzlich auch die Rolle der Lipidperoxidation in der VPA-Hepatotoxizität während des Zustandes der GSH-Verarmung zu untersuchen. Vorversuche mit 125 μ M, 250 μ M (Ergebnisse nicht dargestellt) und 500 μ M BrH ergaben, daß 500 μ M BrH eine geeignete Konzentration ist, da ein starker GSH-Verlust, vergleichbar mit den Ergebnissen von KHAN und O'BRIEN (1991), verursacht wurde, der mit Hungern bis zum Inkubationsende aufrechterhalten werden konnte (s. Abschnitt 2.4.2 und 4.2.2.5, Abbildung 4.2-3 und Tabellen 9-11 und 9-12). So wurde in Leberzellen von hungernden Ratten zum Zeitpunkt 30 min, also 45 min nach BrH-Vorbehandlung mit 125 μ M BrH, zwar ein GSH-Verlust von 60 % erreicht (500 μ M BrH mH: 69 %, oH: 80 %), der GSH-Gehalt stieg jedoch ab 60 min Inkubation wieder an (500 μ M BrH mH: ab 180 min, oH: ab 150 min) und betrug am Inkubationsende nur noch 21 % gegenüber der DMFA-Kontrolle KB (500 μ M BrH mH: 64 %, oH: 50 %). Nur kurze Zeit nach Vorbehandlung mit 500 μ M BrH wurden unabhängig vom Ernährungszustand nur noch 20-30 % des normalerweise vorhandenen intrazellulären GSH-Gehaltes ermittelt, eine GSH-Konzentration, die nach MOLDÉUS und QUANGUAN (1987),

REED und FARISS (1984) und REED (1990a) zu einer Beeinträchtigung der Zellabwehr gegen toxische Wirkungen bis hin zum Zellschaden und Zelltod führen kann (s. Abschnitt 2.3.3.3). Veränderungen der Vitalitätsparameter und des MDA-Gehaltes traten bei Behandlung mit BrH allein jedoch weder mit noch ohne Hungern auf. Bemerkenswert ist, daß auch nach GSH-Entleerung ein signifikanter Einfluß von Hungern ermittelt werden konnte. Zu allen Zeitpunkten lagen die GSH-Werte mit Hungern unter denen ohne Hungern. Nur in Leberzellen von nicht hungernden Ratten setzte eine starke GSH-Neusynthese bzw. Regenerierung ein. Vergleichbare Literaturergebnisse fehlen.

5.1.4 Wahl der VPA-Dosis und Einfluß von VPA

Die Untersuchungen wurden mit 1 mM VPA aufgrund von Literaturergebnissen begonnen. MEIJER und HESSING-BRAND (1973) ermittelten beim Menschen, daß die VPA-Konzentration im Gehirn ca. 10 % der Serumkonzentration beträgt. LÖSCHER und NAU (1983) stellten bei der Ratte nach konstanter Applikationsrate von 225 mg/kg Körpergewicht über 1, 3 bzw. 14 Tage eine VPA-Gehirnkonzentration von 3,1-15 % der Plasmakonzentration fest. ALY und ABDEL-LATIF (1980) ermittelten 30 min nach i.p. VPA-Gabe einen VPA-Gehirnspiegel von ca. 26 % der in der Leber zu findenden Konzentration. Da der minimale effektive VPA-Blutspiegel der Ratte zwischen 224-512 µg/ml liegt (CHAPMAN et al., 1982), kann somit davon ausgegangen werden, daß bei einer derartigen Behandlung ca. 36 µg/ml im Gehirn und ca. 144 µg/ml in der Leber verteilt sind. Aufgrund des Molekulargewichts von VPA (144,21 g/l) entspricht dies einer Konzentration von ca. 1 mM VPA. Die höheren VPA-Mengen ergaben sich aufgrund von *in vitro*-Ergebnissen. ROGIERS et al. (1985) ermittelten in isolierten Hepatozyten der Ratte, daß VPA bis zu 20 mM nicht zytotoxisch ist. KELLER et al. (1992) zeigten in der isoliert perfundierten Leber der Ratte, daß VPA bis zu einer Konzentration von 40 mM nur schwach hepatotoxisch ist. Daher wurden für die hier vorliegenden Untersuchungen die weiteren Konzentrationen 2,5 mM, 5 mM und 10 mM VPA verwendet.

Übereinstimmend mit den *in vitro*-Arbeiten in isolierten Hepatozyten von ROGIERS et al. (1985) und KELLER et al. (1992) konnten hier ohne Hungern selbst bei der höchsten verwendeten VPA-Dosis keine Veränderungen der Vitalitätsparameter beobachtet werden. Eine höhere MDA-Bildung fand ebenfalls nicht statt (s. Abschnitt 4.2.3). Diese Aussage trifft auch auf die VPA-Behandlungen mit Hungern zu, mit der Ausnahme, daß mit 10 mM VPA am Inkubationsende der Anteil ungefärbter Hepatozyten gering und der intrazelluläre K⁺-Gehalt signifikant verringert war und kurz vor dem Inkubationsende ein signifikant erhöhter Na⁺-Gehalt ermittelt wurde (s. Abschnitt 4.2.3.3 und Abbildungen 4.2-5 und 4.2-6). Mögliche Erklärungen hierfür sind, daß eine mäßig erhöhte Durchlässigkeit der Plasmamembran nur zum Austritt bzw. Eintritt des im Vergleich zu LDH und Trypanblau kleinen K⁺- bzw. Na⁺-Moleküls führte bzw. daß ein unvollständiger Thiolschutz vorlag, der zu einer vorübergehend leicht eingeschränkten Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase aufgrund einer Hemmung von SH-Gruppen dieses Enzyms führte (UNGEMACH, 1982). Lipidperoxidation konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.2-8). Vergleichbare Ergebnisse lieferten auch *in vivo*-Studien. Nur chronisch verabreichte hohe VPA-Dosen von 750 mg/kg allein ohne und mit Hungern oder niedrigere VPA-Dosen (350 mg/kg VPA) in Kombination mit Phenobarbital

und ohne Hungern führten *in vivo* in adulten Ratten zu funktionellen und morphologischen Leberveränderungen. Es wurde vor allem eine mikrovesikuläre Steatose beobachtet, die mit Hungern in stärkerem Ausmaß auftrat.²

Die VPA-Behandlung führte ohne und vor allem mit Hungern zu einer dosisabhängigen Verminderung des intrazellulären GSH-Gehaltes der Leberzellen (s. Abschnitt 4.2.3.5, Abbildung 4.2-7). Dies bestätigt die Erkenntnisse von JURIMA-ROMET et al. (1996) *in vitro* und von COTARIU et al. (1990) und KASSAHUN et al. (1994) *in vivo* bei *ad libitum*-Fütterung (s. Abschnitt 2.3.3.3). Die durch 1 mM VPA (V1) verursachten GSH-Verluste konnten in den eigenen Untersuchungen durch GSH-Neubildung bzw. GSH-Regenerierung unabhängig vom Ernährungszustand kompensiert werden. Ein vergleichbares Ergebnis ermittelten COTARIU et al. (1990) mit 100 mg/kg VPA *in vivo*. Mit höheren VPA-Dosen stieg sowohl *in vivo* bei COTARIU et al. (1990) (300, 500, 750 mg/kg VPA) als auch *in vitro* bei JURIMA-ROMET et al. (1996) (2,5, 5, 10, 20, 40 mM) und in den eigenen Untersuchungen (V2,5, V5, V10) der GSH-Verlust (s. Abbildung 4.2-7). Durch den starken GSH-Verbrauch war die GSH-Bildung nicht mehr meßbar. Die Fähigkeit der Zellen zur Neusynthese von GSH war eingeschränkt bzw. die GSH-regenerierenden Prozesse, insbesondere die Reduktion von GSSG zu GSH war vermindert. Das ist der Beweis dafür, daß VPA allein in der Lage ist, den GSH-Gehalt und damit die antioxidative Kapazität der Leberzellen zu senken. COTARIU et al. (1990) konnten neben der Verminderung von GSH auch für alle untersuchten Dosierungen eine meist dosis- und zeitabhängige Verminderung des Pyridinnukleotidphosphatspiegels und eine Verminderung der Aktivität der GSSG-Rd, GSH-Px und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in der Leber feststellen. Diese Enzyme sind zur Aufrechterhaltung der reduzierenden Äquivalente erforderlich. Aufgrund der Übereinstimmung der Ergebnisse zum GSH-Gehalt zwischen COTARIU et al. (1990) und den eigenen Untersuchungen könnte auch im vorliegenden Modell eine Verminderung von NADPH und eine Aktivitätsverminderung dieser Enzyme stattgefunden haben. Die damit verbundene Beeinträchtigung des komplexen Verteidigungssystems zur Abwehr freier Radikale konnte wahrscheinlich bei VPA-Behandlung allein noch kompensiert werden und führte nur mit Hungern bei der höchsten VPA-Dosis aufgrund des hier schon sehr starken GSH-Verlust zu einer Vitalitätsverminderung (s. Tabelle 4.2-1). COTARIU et al. (1990) schrieben den GSH-Verlust der VPA-vermittelten Hemmung des GSH-Reduktase-Peroxidasesystems zu.

Es wurde in der Literatur immer wieder berichtet, daß kurz vor dem Leberversagen bei VPA-Therapie neben akuten fieberhaften Erkrankungen ein damit verbundener schlechter Ernährungszustand festgestellt wurde (DREIFUSS et al., 1987, KÖNIG et al., 1994, SIEMES et al., 1992). Aber weder eine VPA-Behandlung von hungernden Ratten (LÖSCHER et al., 1993b, KOCH et al., 1989a) noch von hungernden Menschen (KOCH et al., 1989b) führte zu einer erhöhten Hepatotoxizität. LÖSCHER et al. (1993b) konstatierten sogar einen protektiven Effekt von Hungern auf die Leber. Ein anderes Ergebnis ermittelten NDANGZIA et al. (1992). Bei ihnen führte die Verabreichung einer einmaligen hohen VPA-Dosis (1000 mg/kg VPA) an 24-

² KESTERSON et al. (1984), LEWIS et al. (1982), LÖSCHER et al. (1993a), LÖSCHER et al. (1992), SUGIMOTO et al. (1987b).

h-hungernde Ratten mit nachfolgender 24stündiger Hungerperiode zu Einzelzellnekrosen und perilobulärer Mikrovakuolation der Leber, die jedoch durch nachfolgende Fütterung regeneriert wurde (s. Abschnitt 2.1.5.2). Wie bereits erwähnt, konnte durch Hungern in den eigenen Untersuchungen eine Vitalitätsverminderung der Zellen nur bei der höchsten VPA-Dosis festgestellt werden. Allerdings wurde in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen ein erhöhter Fettanteil in den Leberzellen ermittelt (s. Abbildung 4.4-4).

Damit entsprechen die eigenen Ergebnisse weder denen von LÖSCHER und Mitarbeitern noch denen von NDANGZIA und Mitarbeitern. Neben den Erklärungsmöglichkeiten, die LÖSCHER für den protektiven Effekt von Hungern anbietet (s. Abschnitt 2.1.5.2), gibt es noch andere. Eine histopathologische Veränderung der Leber konnte in den *in vivo*-Versuchen von LÖSCHER et al. (1993b) vielleicht deshalb nicht stattfinden, da die hohe Dosis zwar über 7 Tage, aber nicht auf einmal, sondern dreimal täglich 250 mg/kg VPA appliziert wurde. So wurden vor allem eine einmalige tägliche VPA-Gabe (GRANNEMAN et al., 1991) und eine hohe VPA-Serumkonzentration (KONDO et al., 1992b) als Risikofaktoren für eine Hepatotoxizität identifiziert. Außerdem befanden sich bei NDANGZIA und Mitarbeitern die Tiere - vergleichbar mit dem eigenen *in vitro*-Modell - schon vor der Behandlung in einem Hungerzustand, wohingegen LÖSCHER et al. (1993b) die Tiere nur die letzten 25-40 h der Behandlung hungern ließ. Aus den Ergebnissen ist abzulesen, daß Hungern zwar ein wesentlicher Faktor der Hepatotoxizität ist, aber allein diese nicht erklären kann. Das bestätigt die Feststellung von KÖNIG et al. (1994), daß Fieber und Hungern große Einflußfaktoren sein könnten, da beide Faktoren eine Beeinträchtigung der Wege verursachen, über die auch VPA metabolisiert wird. Das wird auch dadurch unterstützt, daß virale fieberhafte Erkrankungen ebenso wie die fatale VPA-Hepatotoxizität durch eine mikrovesikuläre Steatose der Leber gekennzeichnet sind und zur Schädigung der Mitochondrien führen (VISENTIN et al., 1995). Außerdem wurde aufgrund des klinischen Bildes von Fällen fataler Hepatotoxizität und der Ergebnisse von Tierversuchen die Hypothese aufgestellt, daß eine starke Schwächung oder sogar ein Versagen des Abfangsystems für freie Radikale eine entscheidende Rolle in der Hepatotoxizität von VPA spielen könnte. Daher wurden in den weiteren Versuchen die zwei Einflußfaktoren Hungern und oxidativer Streß bei VPA-Behandlung gleichzeitig untersucht.

5.2 Diskussion der Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter bei kombinierter Behandlung

5.2.1 Einfluß von VPA und Hydroperoxiden

5.2.1.1 Ohne Hungern

In Leberzellen von nicht hungernden Ratten wurden keine wesentlichen Veränderungen der Vitalität bei kombinierter VPA-Hydroperoxid-Behandlung festgestellt (s. Abschnitt 4.2.4). Lediglich bei der Kombination der höchsten VPA-Dosen (V5C100, V10C100 und V10T400) wurden geringe Veränderungen einzelner Vitalitätsparameter und der MDA-Bildung beobachtet. Die Parameter LDH und Trypanblautest wiesen mit CuOOH geringe und mit *t*-BuOOH keine Veränderungen auf (s. Abschnitte 4.2.4.1 und 4.2.4.2). Bei den gewählten Konzentrationen wurde ein geringer Einfluß von VPA festgestellt, während die zusätzliche Belastung mit Hydroperoxiden nur in Einzelfällen Vitalitätsveränderungen verursachte. Nur mit *t*-BuOOH wurde eine geringgradige Verminderung des intrazellulären K⁺-Gehaltes ab 180 min Inkubation gegenüber der Behandlung mit 10 mM VPA allein festgestellt (s. Abschnitt 4.2.4.3). Signifikante Erhöhungen des Na⁺-Gehaltes wurden bei der Gruppe V10C100 und in stärkerem Maße bei der Gruppe V10T400 beobachtet (s. Abschnitt 4.2.4.4 und Abbildungen 4.2-25 und 4.2-27). Da nicht alle Vitalitätsparameter verändert waren, werden noch keine entscheidenden Veränderungen der Na⁺-K⁺-ATPase bzw. Schäden der Plasmamembran angenommen. Es ist bekannt, daß der K⁺-Gehalt ein sensibler Vitalitätsparameter ist (BAUR et al., 1975). In den eigenen Untersuchungen erwies sich der Parameter Na⁺-Gehalt sensibler als der K⁺-Gehalt und die anderen Vitalitätsparameter. Sowohl die Aufrechterhaltung der K⁺- als auch der Na⁺-Homöostase durch die Na⁺-K⁺-ATPase ist vom physikochemischen Zustand der Membran abhängig (GAZZOTTI und PETERSON, 1977). Prinzipiell kann eine frühere Veränderung des Na⁺-Wertes damit erklärt werden, daß unter physiologischen Bedingungen in der Zelle eine K⁺-Konzentration von 140 mM und eine Na⁺-Konzentration von 5-15 mM vorhanden ist (HORTON et al., 1993). Änderungen, die durch die Einschränkung der Funktion der Na⁺-K⁺-ATPase oder Membranschädigungen aufgrund spiegelbildlicher Konzentrationsverhältnisse im Medium im absolut gleichen Ausmaß zu erwarten sind, werden daher den intrazellulären Na⁺-Wert relativ stärker verändern.

Nur bei der Gruppe V10T400 wurde ab 150 min Inkubation eine geringgradig erhöhte MDA-Bildung festgestellt (s. Abschnitt 4.2.4.6 und Abbildung 4.2-41). Bei der Kombination V10C100 wurde dies nur zum letzten Zeitpunkt ermittelt (s. Abbildung 4.2-39). Bei allen kombinierten Behandlungen bewirkte VPA eine schon vor Zugabe der Hydroperoxide meist signifikante dosisabhängige Verminderung des GSH-Gehaltes. Bei gegebenen VPA-Mengen verursachte CuOOH kaum einen und *t*-BuOOH in Kombination mit 1 mM VPA einen geringen und nur mit 10 mM VPA einen ausgeprägteren zusätzlichen GSH-Verlust (s. Abschnitt 4.2.4.5, Abbildungen 4.2-29, 4.2-32 und Tabelle 4.2-1). Es kann also davon ausgegangen werden, daß nur in sehr geringem Umfang lipidperoxidative Vorgänge stattgefunden haben. Auf-

grund dieser Tatsache, der vernachlässigbaren Vitalitätsverschlechterung und da der GSH-Gehalt selbst bei den höchsten Konzentrationen in der Regel noch deutlich über 50 % des initialen Gehaltes lag, ist anzunehmen, daß die Leberzellen noch ein ausreichendes antioxidatives Potential besaßen (s. Tabelle 4.2-1). Nach Untersuchungen verschiedener Autoren beeinträchtigt erst ein Sinken des GSH-Spiegels unter 10-30 % des Initialwertes die Zellabwehr gegen toxische Wirkungen (s. Abschnitt 2.3.3.3).³ Vor allem die Verminderung des mitochondrialen GSH-Pools spielt eine kritische Rolle bei der Zellschädigung (MEREDITH und REED, 1982, OLAFSDOTTIR et al., 1988, SHAN et al., 1993, TANG et al., 1996). Es wird daher angenommen, daß bei den vorliegenden Versuchen noch keine Beeinträchtigung des mitochondrialen GSH-Pools erfolgte. Insgesamt läßt sich aus den kombinierten Behandlungen in Leberzellen von nicht hungernden Ratten schlußfolgern, daß schwerwiegende Zellschäden nicht aufgetreten sind oder nur in einem solchen Ausmaß, daß Reparaturen durch zelluläre Schutzsysteme wie GSH und Antioxidantien noch möglich waren. Einen ersten Hinweis dafür, daß GSH eine wichtige Rolle im Zytotoxizitätsmechanismus in diesem Modell spielt, liefert die Behandlungsgruppe V10T400, da die leicht erhöhte MDA-Bildung bei gleichzeitiger stärkster GSH-Verminderung als erhöhte Beanspruchung und/oder verringerte Leistungsfähigkeit des antioxidativen Systems interpretiert werden kann.

5.2.1.2 Mit Hungern

In Leberzellen von 20-h-hungernden Ratten wurden bei kombinierter VPA-Hydroperoxid-Behandlung starke Veränderungen der Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter ermittelt (s. Abschnitt 4.2.4). Insgesamt wurde sowohl eine VPA- als auch eine Hydroperoxid-Dosisabhängigkeit der Parameterveränderungen festgestellt. Bereits bei der Kombination V1T400 traten eine starke signifikante Abnahme der Vitalität und eine starke MDA-Bildung auf (s. Abbildungen 4.2-11, 4.2-16, 4.2-21, 4.2-26, 4.2-33 und 4.2-40). Bei Kombinationsbehandlungen mit CuOOH waren geringgradige Veränderungen der Vitalität und MDA-Bildung bei der Gruppe V2,5C100 festzustellen. Erst ab der Kombination V5C100 waren ausgeprägte Änderungen vorhanden (s. Abbildungen 4.2-9, 4.2-14, 4.2-19, 4.2-24, 4.2-30 und 4.2-38).

Eine signifikant erhöhte MDA-Bildung bereits 30 min nach Hydroperoxidzugabe wurde mit Hungern in allen getesteten VPA-t-BuOOH-Gruppen und bei den VPA-CuOOH-Gruppen V2,5C100, V5C100, V10C100 und V10C50 beobachtet (s. Abbildungen 4.2-38 und 4.2-40). Weitere 30 min verzögert war dies bei der Gruppe V5C50 der Fall. In fast allen CuOOH-Gruppen ging die MDA-Bildung der Vitalitätsverminderung voraus. Nur bei der stärksten Behandlung änderten sich die Vitalitätsparameter gleichzeitig. Die gleichzeitige Änderung der MDA-Werte und aller Vitalitätsparameter mit Ausnahme der LDH-Freisetzung wurde auch in den Gruppen V1T400 und V10T400 beobachtet. Die LDH-Freisetzung stieg in allen t-BuOOH-Gruppen erst 60 bis 90 min nach dem Anstieg der MDA-Bildung. Genauso verhielten sich bei der Gruppe V10T200 auch die anderen Vitalitätsparameter. Nach GUTTERIDGE (1995) kann nur

³ ANUNDI et al. (1979), CASINI et al. (1985), CHENERY et al. (1981), HÖGBERG und KRISTOFERSON (1977), MITCHELL et al. (1985), MOLDEÚS und QUANGUAN (1987), REED (1990a), REED und FARISS (1984), YOUNES und SIEGERS (1980), YOUNES und SIEGERS (1981).

von einer ursächlichen Schädigung durch Lipidperoxidation ausgegangen werden, wenn die Peroxidation dem Gewebeschaden vorangeht oder gleichzeitig auftritt, da die Membranlipide nach dem Zelltod empfindlicher gegenüber Peroxidation werden und eine erhöhte Peroxidation dann eher ein Marker bzw. die Folge als die Ursache des Zelltodes ist (KEHRER, 1993). Da diese Bedingung bei den beschriebenen Behandlungsgruppen erfüllt ist, könnte die Lipidperoxidation die Ursache der Zellschädigung sein. Es kann jedoch nicht geklärt werden, ob die Lipidperoxidation in hungrigen Zellen durch VPA, durch die Hydroperoxide oder die kombinierte Aktion von VPA und Prooxidanz verursacht wurde. Hypothesen für mögliche Mechanismen der Schädigung werden im Abschnitt 5.5 diskutiert.

Bei den gewählten Kombinationen wurde ein starker Einfluß von VPA auf die Vitalität festgestellt, während die Hydroperoxide geringere und zeitlich später Vitalitätsveränderungen verursachten. Das ist die Folge der bereits bei 10 mM VPA-Behandlung allein festgestellten Verminderung der Vitalität (s. Abschnitt 5.1.4). Für die MDA-Bildung wurde kein Unterschied zwischen VPA- und Hydroperoxideinfluß ermittelt.

Insgesamt ist für die Abnahme der Vitalität nach CuOOH-Behandlung festzustellen, daß im allgemeinen zuerst signifikante Veränderungen im Trypanblautest ermittelt wurden, gefolgt von der LDH-Freisetzung und schließlich der Verminderung des intrazellulären K^+ -Gehaltes. Eine ausgeprägte Verminderung der K^+ -Gehalte wurde nur bei hohen Konzentrationen eher bzw. zeitgleich mit dem Anstieg der LDH-Freisetzung beobachtet. In diesen Gruppen trat auch die stärkste MDA-Bildung nach Zugabe der Hydroperoxide auf. Anders bei den Untersuchungen mit t-BuOOH: Hier waren alle untersuchten Gruppen mit MDA-Bildung mit einer Verminderung des intrazellulären K^+ -Gehaltes vor der Erhöhung der LDH-Freisetzung verbunden. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von KLEE et al. (1994) überein, die feststellten, daß die Störung der K^+ -Homöostase unabhängig von schweren Plasmamembranschäden auftritt, da die K^+ -Abgabe der LDH-Abgabe wie in den vorliegenden Untersuchungen 60 min vorausging. Es kann davon ausgegangen werden, daß eine Veränderung des physikochemischen Zustandes der Membranlipide durch die Lipidperoxidation verursacht wurde und damit die Funktion der Na^+K^+ -ATPase, die in dieser Lipidphase eingebettet ist, einschränkte (GAZZOTTI und PETERSON, 1977). Eine andere mögliche Erklärung dafür ist die Bindung der vermehrt anfallenden Lipidperoxidationsprodukte bei hohen Behandlungsdosen an die Na^+K^+ -ATPase mit nachfolgendem Aktivitätsverlust (SIEMS et al., 1996). Letzteres würde auch erklären, warum in allen mit t-BuOOH kombinierten Gruppen eine Verminderung des intrazellulären K^+ -Gehaltes beobachtet wurde, da hier im Vergleich zu CuOOH eine stärkere MDA-Bildung festgestellt wurde.

Die Erklärung, warum bei den CuOOH-Gruppen mit niedrigeren VPA-Konzentrationen MDA-Bildung, Trypanblauaufnahme und LDH-Freisetzung stattfinden, ohne daß sie eine Verminderung des K^+ -Gehaltes aufweisen, fällt schwerer. Offenbar scheint die Aktivität der Na^+K^+ -ATPase trotz der angezeigten Schäden der Plasmamembran nicht verändert zu sein. Eine mögliche Ursache dafür ist, daß der passive K^+ -Austritt durch vereinzelte Löcher in der Zellmembran noch durch die Aktivität des Enzyms kompensiert werden kann. Bei stärkeren Membranschäden ist diese Kompensation nicht möglich. Das spricht jedoch gegen die oben

aufgeführte Theorie, daß die Lipidperoxidation sofort zur Beeinträchtigung der Funktion der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ führt. Auch UNGEMACH (1982) beobachtete bei intrazellulär wirksamen SH-Reagenzien bei starker Beeinträchtigung der Vitalität und GSH-Erniedrigung nur eine geringfügige Abnahme des K^+ -Gehaltes. Umgekehrt war dies für impermeable Thiolreagenzien. Eine selektive Beeinflussung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ muß also bei lipidperoxidativen Vorgängen einkalkuliert werden. Eine mögliche Erklärung wäre hier, daß bei kombinierter Behandlung CuOOH die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nicht beeinflußt hat und bei den Gruppen mit hoher VPA-Dosis die K^+ -Verminderung aufgrund der größeren Membranschäden durch die Lipidperoxidation verursacht wurde. Das andere Hydroperoxid scheint hingegen bei Kombination mit VPA zu einer Beeinträchtigung der Funktion der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ geführt zu haben.

Der Parameter intrazellulärer Na^+ -Gehalt verhielt sich auch mit Hungern bei VPA-Hydroperoxid-Kombinationsbehandlung sehr sensitiv (s. Abschnitt 4.2.4.4). Der Wert änderte sich vor oder zeitgleich mit der LDH-Freisetzung (s. Abbildungen 4.2-14, 4.2-16, 4.2-24 und 4.2-26). Schon bei niedrigen Konzentrationen der Kombinationsbehandlung und mit geringfügiger MDA-Bildung zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg des Wertes, wobei der K^+ -Gehalt in diesen Gruppen noch nicht verändert war (s. Abbildungen 4.2-38, 4.2-40, 4.2-19 und 4.2-21). Führt die Behandlung zu einem stärkeren Anstieg der MDA-Menge, stieg der intrazelluläre Na^+ -Gehalt dosisabhängig stark an. Der intrazelluläre K^+ -Gehalt veränderte sich in geringerem Maße. Das folgt aus den in Abschnitt 5.2.1.1 erläuterten unterschiedlichen physiologischen Na^+ - und K^+ -Konzentrationen. Bei starker MDA-Bildung fiel der Na^+ -Gehalt nach einem steilen Anstieg bis zum Inkubationsende ab, wobei er bei den Kombinationen V5C100 und V10C100 über den Ausgangswerten lag und bei der Gruppe V10T400 wieder die Ausgangswerte erreichte (s. Abbildungen 4.2-24, 4.2-26, 4.2-38 und 4.2-40). Das kann damit erklärt werden, daß eine starke Schädigung der Plasmamembran zum Austritt des Zytoplasmas führte. In diesem Zytoplasma befinden sich intrazelluläres Natrium und Kalium, welche nach der Entfernung des Mediums nicht mehr gemessen werden können.

Die Ergebnisse zur Veränderung des GSH-Gehaltes lassen die Schlußfolgerung zu, daß die starke Verminderung des GSH-Status durch 20 h Hungern und der zusätzliche Verlust von intrazellulärem GSH durch die kombinierte Behandlung mit hohen Konzentrationen von VPA und Hydroperoxiden zu der beobachteten Lipidperoxidation mit nachfolgender Zytotoxizität beigetragen hat. Sowohl Lipidperoxidation als auch der Verbrauch von reduziertem GSH stellen einen indirekten Hinweis auf entstandene Radikale dar (SLATER, 1984). Da beides mit Hungern und Kombinationsbehandlung in sehr starkem Umfang beobachtet wurde, liegt die Vermutung nahe, daß an diesem Prozeß freie Radikale beteiligt sind. Unterstützt wird das auch durch das Wissen um die Rolle von GSH beim Schutz vor Lipidperoxidation (JONES et al., 1995, MOLDEUS und QUANGUAN, 1987, REED, 1990a). GSH ist das Substrat in der GSH-Px-vermittelten Ausscheidung von toxischen Peroxiden und unterstützt indirekt die Reduktion freier Radikale und die die freien Radikalketten terminierenden Vitamine C und E, indem die Reduktion der oxidierten Form von Vitamin C zur funktionellen reduzierten Form stattfindet. Damit kann dann Vitamin C die Funktion von Vitamin E in seiner reduzierten funktionellen

Form aufrechterhalten. Außerdem dient GSH durch die GSH-S-Transferase zur Entgiftung von reaktiven Aldehyden, die während der Lipidperoxidation gebildet werden.

Bereits bei der Behandlungsgruppe V2,5C100 wurden mit Hungern übereinstimmend mit der MDA-Bildung ab 150 min Inkubation erste signifikante Abweichungen der GSH-Werte gegenüber der Hydroperoxidbehandlung allein ermittelt (s. Abbildungen 4.2-38 und 4.2-30). Da die MDA-Bildung in dieser Gruppe nur sehr allmählich stattfand, ist zu vermuten, daß hier noch eine Kompensation der drohenden Zellschädigung durch zelluläre Schutzsysteme wie GSH und Antioxidantien erfolgen konnte. Bei kombinierten Behandlungen konnten ebenso wie bei nicht hungernden Tieren eine ausgeprägte VPA-Dosisabhängigkeit und eine schwächere Hydroperoxid-Dosisabhängigkeit des GSH-Verlustes festgestellt werden (s. Abschnitt 5.2.1.1). Die stärkste Verminderung des GSH-Gehaltes auf 28% des Initialwertes am Inkubationsende wurde in der Behandlungsgruppe V10T400 beobachtet. Bei der Gruppe V10C100 waren noch 36 % und bei der Gruppe V10T200 38 % des Ausgangs-GSH-Gehaltes vorhanden (s. Tabelle 4.2-1). Damit wurden nur bei den höchsten Behandlungsmengen annähernd die in der Literatur als die Zellabwehr gegen toxische Wirkungen beeinträchtigend und damit möglicherweise zum Zellschaden und Zelltod führend beschriebenen nötigen intrazellulären GSH-Verluste bis zu 15-30 % des physiologischen Wertes erreicht (s. Abschnitte 2.3.3.3 und 5.2.1.1). Vergleicht man die bei Kombinationsbehandlung von hungernden Ratten gemessenen GSH-Verluste mit den Ausgangswerten der Gruppen von nicht hungernden Ratten, liegen die Verluste bei allen Behandlungsgruppen mit starken Vitalitätseinbußen in diesem kritischen Bereich (V10T400: 15 %, V10C100: 21 %, V10T200: 24 %). Außerdem bedeutet ein geringerer GSH-Verlust nicht, daß der Abwehrmechanismus funktionsfähig ist, da trotzdem selektiv der mitochondriale GSH-Pool, der 10-15 % des intrazellulären GSH enthält, unter die für ihn kritischen 50 % entleert sein könnte (REED, 1990a, TANG et al., 1996). Die Annahme, daß in den eigenen Untersuchungen der mitochondriale GSH-Gehalt eine wichtige Rolle im Zytotoxizitätsmechanismus spielt, wird im Zusammenhang mit den Metabolismusstudien im Abschnitt 5.5 diskutiert. Der besonders ausgeprägte GSH-Verlust, der in den ersten 30 min nach Hydroperoxidzugabe in allen Gruppen mit hoher VPA- und Prooxidanzmenge gleichzeitig mit starker Lipidperoxidation beobachtet wurde, weist ebenfalls auf die große Rolle des GSH im Zytotoxizitätsprozeß hin. Außerdem wurden Lipidperoxidation und Vitalitätsverlust nur in Leberzellen von hungernden Tieren ermittelt, die einen im Vergleich zu nicht hungernden Tieren zu allen Zeitpunkten signifikant niedrigeren GSH-Gehalt aufwiesen (s. Abbildungen 4.2-31 und 4.2-34 und Tabellen 9-11 und 9-12).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die mit Hungern und Kombinationsbehandlung beobachtete Lipidperoxidation die Ursache und nicht die Folge der Zytotoxizität im vorliegenden Modell zu sein scheint und daß der Verlust von GSH eine Schlüsselrolle im Zytotoxizitätsmechanismus spielen könnte, wenn die kritische GSH-Konzentration unterschritten wird.

5.2.2 Einfluß von BrH-Vorbehandlung und VPA

5.2.2.1 Ohne Hungern

Trotz des starken GSH-Verlustes von 80 % durch BrH-Vorbehandlung führte die Kombination B500V1 zu keiner und B500V10 nur zu einer Veränderung der Vitalitätsparameter Trypanblautest und Na⁺-Gehalt. Mit beiden VPA-Mengen konnte keine Lipidperoxidation nachgewiesen werden.

Der Trypanblautest zeigte für die mit 10 mM VPA kombinierte Behandlungsgruppe eine starke Verminderung der Vitalität der Zellen an (s. Abbildung 4.2-13). Diese konnte durch die LDH-Freisetzung oder eine Veränderung des K⁺-Wertes nicht bestätigt werden (s. Abbildungen 4.2-18 und 4.2-23). Es kam in dieser Gruppe lediglich zu einer ab 180 min signifikanten Erhöhung des intrazellulären Na⁺-Gehaltes (s. Abbildung 4.2-28). Die höhere Sensitivität des Parameters Natrium in den eigenen Untersuchungen im Vergleich zu Kalium und den anderen Vitalitätsparametern wurde bereits in den Abschnitten 5.2.1.1 und 5.2.1.2 erläutert. Für die starke Reaktion des Trypanblautests sind folgende Erklärungen möglich. Trypanblau wirkt auf ungeschädigte Zellen zytotoxisch (PAUL, 1975). Es wurde bei der Durchführung der Zellzählung beobachtet, daß zunächst ein Zellbild mit wenigen angefärbten Zellen zu sehen war, vergleichbar mit den mitgeführten Kontrollzellen. Erst während der Zellzählung, die bei Auszählung von 300 Zellen ca. 1-2 min dauerte, färbten sich immer mehr Zellen an. Das geschah um so schneller, je weiter die Inkubation fortgeschritten war. Möglicherweise erfolgte erst nach Zugabe von Trypanblau eine Veränderung der Zellmembran, und Trypanblau konnte eindringen. Des weiteren könnte die besondere Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Trypanblau auch mit dem stark verminderten GSH-Gehalt der Zellen nach BrH-VPA-Behandlung zu tun haben.

Durch die Zugabe von 1 bzw. 10 mM VPA zu durch BrH GSH-verarmten Zellen wurde eine dosisabhängige weitere Verminderung des GSH-Gehaltes erreicht. Die GSH-Neusynthese bzw. -Regenerierung wurde durch VPA-Behandlung stark unterdrückt oder durch einen höheren Verbrauch nicht mehr ermittelt (s. Abbildung 4.2-35). Obwohl der GSH-Gehalt bei der Gruppe B500V10 am Ende der Inkubation nur noch 20 % des initialen Wertes der DMFA-Kontrolle betrug (KB), konnte keine Lipidperoxidation nachgewiesen werden (s. Tabelle 4.2-1 und Abbildung 4.2-42). Es wird daher angenommen, daß der mitochondriale GSH-Pool nicht unter die von TANG et al. (1996) festgestellte Grenze vermindert wurde und demzufolge noch ausreichend mitochondriales GSH vorhanden war, um die Zelle vor Zytotoxizität zu schützen.

5.2.2.2 Mit Hungern

Bei GSH-Verarmung durch BrH in Leberzellen von hungrigen Ratten führte die Behandlung mit 10 mM VPA im Gegensatz zu der mit 1 mM VPA zu wesentlichen Veränderungen der Vitalitätsparameter. Die in der Gruppe B500V1 beobachtete starke Vitalitätsverminderung im Trypanblautest ab 120 min Inkubation war ähnlich ausgeprägt wie in der Behandlungsgruppe B500V10 in Leberzellen von nicht hungernden Tieren (s. Abbildung 4.2-13). Dieser zeitige

Vitalitätsverlust entsprach auch hier nicht den Ergebnissen der anderen Vitalitätsparameter. Lediglich am Ende der Inkubation konnte ab 240 min eine leicht erhöhte LDH-Freisetzung beobachtet werden (s. Abbildungen 4.2-18, 4.2-23 und 4.2-28). Die im Abschnitt 5.2.2.1 aufgestellten Vermutungen über die Ursache dieser Reaktion im Trypanblautest scheinen auch hier zuzutreffen. Eine Lipidperoxidation deutete sich bei BrH-Vorbehandlung zwar bei der Gruppe B500V1 an, konnte jedoch in großem Umfang nur bei der Gruppe B500V10 ab 180 min Inkubation festgestellt werden (s. Abbildung 4.2-42). Die MDA-Bildung ging der Verminderung der Vitalität mit Ausnahme des Parameters Trypanblautest meist 30 min voraus oder trat gleichzeitig mit dieser auf. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Behandlung und der Lipidperoxidation wird daher angenommen. Auch in der zweiten Versuchsreihe ging die Erhöhung des Na⁺-Gehaltes der K⁺-Verringerung und der LDH-Freisetzung voraus.

Bei BrH-VPA-Kombination wurde auch mit Hungern im Inkubationsverlauf eine dosisabhängige Verminderung des GSH-Gehaltes durch VPA festgestellt. Da in der Gruppe B500 nur mit Hungern die starke GSH-Verminderung von ca. 65 % während der gesamten Inkubation aufrechterhalten wurde (s. Abschnitt 4.2.2.5 und Abbildung 4.2-3), konnten signifikante Unterschiede durch VPA bei der Gruppe B500V1 erst ab 240 min und bei B500V10 ab 210 min festgestellt werden (s. Abbildung 4.2-36). Die für die Gruppen B500V1 und B500V10 berechneten prozentualen Werte von GSH am Inkubationsende im Vergleich zu den Ausgangswerten entsprechen den gleichbehandelten Gruppen ohne Hungern (s. Tabelle 4.2-1). Sowohl mit als auch ohne Hungern führte die Kombination B500V10 nach 270 min zu einem Absinken des GSH-Gehaltes auf 20 % gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe KB zu diesem Zeitpunkt, wobei nur mit Hungern eine ausgeprägte Lipidperoxidation nachgewiesen wurde. Hierbei muß betont werden, daß die absoluten Unterschiede im GSH-Gehalt bei unterschiedlichen Ernährungszuständen beträchtlich waren. Alle GSH-Werte in den Kombinationsgruppen mit Hungern lagen während der gesamten Inkubation ca. 30 % unter denen bei gleicher Behandlung ohne Hungern (s. Tabellen 9-11 und 9-12 und Abbildung 4.2-37). Vergleicht man die GSH-Gehalte am Inkubationsende mit den bei der Kontrollgruppe KB ohne Hungern am Inkubationsanfang gemessenen, so waren bei der Gruppe B500V1 ohne Hungern noch ca. 28 %, mit Hungern ca. 19 %, bei der Gruppe B500V10 ohne Hungern ca. 20 % und mit Hungern nur noch 14 % der intrazellulären GSH-Menge vorhanden (s. Tabelle 4.2-1). Der GSH-Gehalt erreichte damit die in der Literatur beschriebene kritische Grenze. Das ist die GSH-Menge, die unter physiologischen Bedingungen in den Mitochondrien vorhanden ist (siehe Abschnitt 2.3.3.3). Es ist zu erwarten, daß es zu einem Zellschaden kommt. Nicht nachgewiesen werden kann, ob der GSH-Gehalt in den Mitochondrien bereits um mindestens die Hälfte vermindert wurde, was von TANG et al. (1996) als Voraussetzung für toxische Konsequenzen angesehen wird. Im Unterschied zu Versuchen ohne Hungern trat hier Lipidperoxidation auf. Das könnte zum einen an der absolut viel niedrigeren GSH-Menge liegen und zum anderen durch eine stärkere Beeinträchtigung des kritischen mitochondrialen GSH-Pools bedingt sein. Die Ursache liegt vielleicht in den bei Hungern vermehrt in den Mitochondrien anfallenden toxischen Metaboliten, die nicht mehr in ausreichendem Maße entgiftet werden können (s. Abschnitt 5.5).

5.3 Diskussion des VPA-Metabolismus

5.3.1 VPA-Metabolismus im Vergleich zu anderen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen

Das Modell der isolierten Hepatozyten ist dazu geeignet, den Metabolismus von VPA zu untersuchen (ROGIERS et al., 1985, SHIRLEY et al., 1993). In den vorliegenden Untersuchungen wurde gezeigt, daß die fünf hauptsächlich für VPA bei Menschen und Ratten beschriebenen metabolischen Wege (PRICKETT und BAILLIE, 1984, ZACCARA et al., 1988) auch im *in vitro*-Modell der isolierten Leberzellen der Ratte stattfinden (s. Abschnitt 2.1.4, Tabelle 2.1-2 und Abbildung 2.1-1). Die Metaboliten 2-en-VPA, 3-keto-VPA, 2,3'-dien-VPA, 5-OH-VPA, PGA, 4-OH-VPA, 4-keto-VPA, 3-OH-VPA und 4-en-VPA wurden gemessen. Es fand die Glucuronidierung von VPA und Metaboliten statt (Ergebnisse nicht dargestellt). Das festgestellte Metabolitenprofil stimmt grundsätzlich mit dem von anderen Autoren in isolierten Hepatozyten (GOFFLOT et al., 1994, ROGIERS et al., 1988a, SHIRLEY et al., 1993) und mit dem *in vivo* in Ratten ermittelten überein (LÖSCHER et al., 1993b, LÖSCHER et al., 1992) (s. Tabellen 2.1.3 und 2.1.5). Das bestätigt die von NAU und LÖSCHER (1984) festgestellten geringen Unterschiede im Metabolitenprofil zwischen den Spezies.

Auch quantitativ sind die eigenen Ergebnisse denen aus der Literatur bekannten ähnlich. GOFFLOT et al. (1994) ermittelten in isolierten Hepatozyten der Ratte nach 240 min Inkubation mit 1 mM VPA im Vergleich zur eingesetzten VPA-Menge einen nicht metabolisierten unkonjugierten VPA-Anteil von 29 % und stellten ca. 2,2 % der eingesetzten VPA-Menge als unkonjugierte Metaboliten fest. Das entspricht für den nicht metabolisierten VPA-Anteil ungefähr den Ergebnissen der Gruppen V1 ohne bzw. mit Hungern nach 270 min (s. Abbildung 4.3-2), für den Gesamtmetabolitenanteil jedoch den Werten nach 60 min Inkubation (s. Tabelle 4.3-1). Vergleichbare Metabolitenanteile nach 270 min wurden bei der Gruppe V5 ohne bzw. mit Hungern festgestellt (s. Abschnitt 4.3.1.2). ROGIERS et al. (1988a) fanden mit 0,5 mM VPA im selben Modell nach 240 min Inkubation einen unkonjugierten Gesamtmetabolitenanteil von 18 %, der in seiner Größe ähnlich den eigenen Ergebnissen mit 1 mM VPA ohne und mit Hungern nach 270 min Inkubation ist. *In vitro* und *in vivo* bei Menschen und Ratten wurden vor allem die Metaboliten 2-en-VPA, 2,3'-dien-VPA (nur bei der Ratte), 3-keto-VPA, 4-OH-VPA, 5-OH-VPA und PGA gemessen.⁴ Zum Teil im Unterschied dazu, jedoch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von ROGIERS et al. (1988a) bei vergleichbaren Versuchsbedingungen, wurden hier die Metaboliten 2-en-VPA in geringeren Mengen, PGA in höheren Mengen und 2,3'-dien-VPA nicht bei VPA-Behandlung allein ermittelt. Der Metabolit 3-en-VPA konnte nicht detektiert werden, während LÖSCHER et al. (1993b) und LÖSCHER et al. (1992) ihn *in vivo* und ROGIERS et al. (1988a) und SHIRLEY et al. (1993) ihn in isolierten Hepatozyten der Ratte in geringen Mengen bestimmten. Der Metabolit 4-en-VPA wurde in den eigenen Untersuchungen mit 1 mM VPA ebenso wie in denen von GOFFLOT et

⁴ GOFFLOT et al. (1994), ROGIERS et al. (1988a), SHIRLEY et al. (1993), LÖSCHER et al. (1993b), LÖSCHER et al. (1992).

al. (1994) nicht nachgewiesen, wohingegen ihn ROGIERS et al. (1998a) *in vitro* in hungernden Ratten nur in konjugierter Form in Spuren fanden und LÖSCHER et al. (1992) und LÖSCHER et al. (1993b) *in vivo* nach chronischer VPA-Behandlung nur bei nicht hungernden Ratten in Spuren ermittelten. Das *in vivo*-Ergebnis ist in den vorliegenden Untersuchungen vergleichbar mit der Gruppe V10, in der 4-en-VPA auch nur ohne Hungern detektiert wurde. Der Metabolit 2,4-dien wurde hier - ebenso wie von ROGIERS et al. (1988a) und GOFFLOT et al. (1994) - nicht nachgewiesen, und nur LÖSCHER et al. (1992) fanden ihn ohne Hungern in geringen Mengen. Der Metabolit 3-keto-4-en wurde weder in den vorliegenden Untersuchungen noch in denen von GOFFLOT und Mitarbeitern bzw. von LÖSCHER und Mitarbeitern bei beiden Ernährungszuständen nachgewiesen (s. Abbildungen 4.3-3, 4.3-4, 4.3-9, 4.3-11 und Tabellen 9-17 und 9-18).

Die ermittelten Anteile der einzelnen Metabolismuswege unterscheiden sich zum Teil von denen in anderen *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen. So wird in der Literatur ein Anteil der β -Oxidation von 6,5-40 %, der ω -Oxidation von 6-15 % und der ω_1 -Oxidation von 1,5-10 % am VPA-Metabolismus aufgeführt (s. Abschnitt 2.1.4 und Tabelle 2.1-2). In den vorliegenden Untersuchungen wurde unabhängig von der eingesetzten VPA-Menge vor allem ohne Hungern, aber auch mit Hungern ein größerer Anteil der ω/ω_1 -Oxidation festgestellt (nach 270 min; V1 oH: β -Oxidation ca. 2,8 %, ω/ω_1 -Oxidation ca. 11,2 %; V1 mH: β -Oxidation ca. 5,1 %, ω/ω_1 -Oxidation ca. 7,3 %; s. Abbildungen 4.3-3 und 4.3-4 und Tabellen 9-17 und 9-18). Auch ROGIERS et al. (1988a) und GOFFLOT et al. (1994) ermittelten in isolierten Hepatozyten der Ratte einen geringeren β -Oxidationsanteil, während LÖSCHER et al. (1992) vor allem ohne Hungern aber auch mit 25 h Hungern *in vivo* einen höheren β -Oxidationsanteil und nur mit 40 h Hungern einen etwas geringeren Anteil der β - als der ω/ω_1 -Oxidation feststellten (s. Tabellen 2.1-3 und 2.1-5). Die eigenen Untersuchungen weisen darauf hin, daß mit steigender VPA-Menge offensichtlich der mikrosomale Metabolismus an Bedeutung gewinnt (Verhältnis $\beta:\omega/\omega_1$ -Oxidation nach 270 min; V1 oH: 1:4; V10 oH: 1:6; V1 mH: 1:1,4; V10 mH: 1:2,7; nur bei V10 oH: 4-en-VPA, s. Abbildungen 4.3-3, 4.3-4 und Tabellen 9-17, 9-18). Da die Hemmung der β -Oxidation durch hohe VPA-Mengen belegt ist, ist bei ansonsten intakten Zellen vielleicht ein Ausweichen auf den ω -Oxidationsweg möglich (s. Abschnitte 2.2.2 und 2.3.1.1). Auch die Literaturdaten bestätigen das: Bei Menschen, die eine Therapie mit hohen VPA-Dosen erhielten, war mit einer Plasmakonzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ VPA im Vergleich zu Standard-VPA-Dosen mit einer Plasmakonzentration von 84 $\mu\text{g/ml}$ die Menge der ω - und ω_1 -Oxidationsmetaboliten und die von 4-en-VPA ca. 4-5mal höher. Die Menge der β -Oxidationsmetaboliten war mit Ausnahme von 2-en-VPA, der vermehrt vorhanden war, nicht verändert (SUGIMOTO et al., 1996). Die Ermittlung der Anteile ergab einen höheren ω/ω_1 -Oxidationsanteil und einen geringeren β -Oxidationsanteil bei der hohen VPA-Dosis im Vergleich zur Standarddosis. In einem Fall von massiver Aufnahme von ungefähr 4000 mg VPA (412,4 mg/kg) durch ein 16 Monate altes Kind wurde eine Serumkonzentration von 1316,2 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Die Konzentration der β -Oxidationsmetaboliten im Urin war sehr gering, wohingegen die ω - und ω_1 -Metaboliten in hohen Konzentrationen vorhanden waren und 4-en-VPA detektiert wurde (ISHIKURA et al., 1996).

Ebenso wie in den genannten *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen gab es geringfügige individuelle Unterschiede. Trotz der gleichen Behandlung wurden mit Hungern die Metaboliten 4-keto-VPA, 4-OH-VPA, 5-OH-VPA und PGA und ohne Hungern 4-keto-VPA nicht in jedem Versuchsansatz gefunden (s. Tabelle 2.1-5).

5.3.2 VPA-Metabolismus bei unterschiedlichen VPA-Mengen

In allen 1-mM-VPA-Behandlungsgruppen einerseits und 5- bzw. 10-mM-VPA-Behandlungsgruppen andererseits wurden unabhängig vom Ernährungszustand gleiche Metabolitenmuster ermittelt. Der geringe Einfluß des Ernährungszustandes auf das Metabolitenprofil wurde auch *in vivo* in Ratten festgestellt (LÖSCHER et al., 1993b, LÖSCHER et al., 1992). Der Unterschied zwischen den Metabolitenmustern der Behandlungsgruppen V1 im Vergleich zu V5 bzw. V10 besteht darin, daß einige Metaboliten der schon bei der Gruppe V1 gering ausgeprägten Metabolismuswege mit höheren VPA-Mengen zum Teil nicht mehr detektiert werden konnten (s. Abbildungen 4.3-3 und 4.3-4).

Die quantitativen Ergebnisse der Gruppen V1, V5 bzw. V10 am Inkubationsende zeigen, daß mit höheren VPA-Mengen ein relativ geringerer Metabolismus als in den 1-mM-VPA-Behandlungsgruppen sowohl mit als auch ohne Hungern stattfand (s. Abbildung 4.3-2 und Tabelle 4.3-3). Das betraf sowohl die β - als auch ω -Oxidationswege und war mit Hungern ausgeprägter (s. Abschnitt 4.3.1.2 und Abbildungen 4.3-3 und 4.3-4). Zwischen den Gruppen V5 und V10 war dagegen kein großer Unterschied zu beobachten. Eine hohe VPA-Konzentration führte sowohl mit als auch ohne Hungern zu ähnlichen Metabolitenmengen gegenüber der Behandlung mit niedrigen VPA-Konzentrationen. So wurde nach 270 min Inkubation bei beiden Ernährungszuständen trotz einer 5-10fach höheren VPA-Menge keine entscheidend höhere Gesamtmetabolitenmenge gebildet. Mit Hungern war bei steigender VPA-Dosis die Gesamtmetabolitenmenge sogar verringert. Ohne Hungern wurde mit steigender VPA-Dosis nur eine minimale Zunahme der Gesamtmetabolitenmenge beobachtet (s. Abschnitt 4.3.1.2 und Tabelle 4.3-4). Das bedeutet, daß mit Hungern durch hohe VPA-Dosen eine Hemmung der Metabolitenbildung stattfand. Das kann eine Hemmung des VPA-Metabolismus durch VPA selbst bzw. eine Verdrängung von VPA durch die vermehrt anfallenden endogenen Fettsäuren bedeuten. Die nur leicht höhere Metabolitenmenge ohne Hungern spricht neben der Hemmung durch VPA selbst auch für das Erreichen der Kapazität für den VPA-Metabolismus. Die eigenen Ergebnisse ohne Hungern sind mit *in vivo*-Ergebnissen bei normalem Ernährungszustand vergleichbar (s. Tabellen 4.3-3 und 4.3-4). So wurden bei einer Therapie mit hohen VPA-Dosen von 75 mg/kg und d 13 % und bei einer niedrigen Standarddosis von 18 mg/kg und d 17 % der totalen VPA-Serumkonzentration als Metaboliten wiedergefunden. Absolut wurden bei der hohen VPA-Dosis mit ca. 20,1 $\mu\text{g/ml}$ nur wenig mehr Metaboliten als bei der niedrigen VPA-Dosis mit ca. 14,4 $\mu\text{g/ml}$ gebildet (SUGIMOTO et al., 1996).

Hungern führte unabhängig von der eingesetzten VPA-Dosis zu einer Verminderung des VPA-Metabolismus. Deutlich spiegelte sich das anhand der nicht metabolisierten VPA-Anteile bei der Gruppe V5 und der Gesamt- bzw. Einzelmetabolitenanteile bei den Gruppen V5 und

V10 wider, wohingegen bei der Gruppe V1 nur tendenziell weniger nicht metabolisierte VPA- bzw. Metabolitenanteile ermittelt wurden (s. Abbildung 4.3-1, 4.3-2 und 4.3-4, Tabelle 4.3-3). Das bestätigt die Ergebnisse aus *in vivo*-Untersuchungen, in denen Hungern den Metabolismus von chronisch mit hohen VPA-Mengen behandelten Ratten und Menschen hemmte. In Ratten wurde durch 25 und 40 h Hungern ebenfalls ein geringer, aber signifikanter Anstieg der totalen VPA-Plasmakonzentration um 15 % erreicht (LÖSCHER et al., 1993b). Bei Ratten und Menschen ermittelten KOCH et al. (1989a) und KOCH et al. (1989b) und beim Menschen BOWDLE et al. (1982) mit Hungern eine langsamere Ausscheidung von VPA. Die in den eigenen Untersuchungen festgestellten geringeren Gesamtmetabolitenanteile in Leberzellen von hungernden Ratten nach 270 min sind vergleichbar mit *in vivo*-Ergebnissen bei Ratten. So wurden in jungen Ratten, die dreimal täglich *i.p.* 250 mg/kg VPA über eine Woche erhielten, ohne Hungern ca. 8,5 %, mit 25 h Hungern ca. 5,8 % und mit 40 h Hungern ca. 2,7 % der totalen VPA-Plasmakonzentration als Metaboliten wiedergefunden (LÖSCHER et al., 1993b, LÖSCHER et al., 1992) (s. Tabelle 2.1-5).

Hungern hemmte bei 1 mM VPA tendenziell die ω -Oxidation zu 5-OH-VPA und PGA, die ω_1 -Oxidation zu 4-OH-VPA und die β -Oxidation zu 2-en-VPA (s. Abbildungen 4.3-3 und 4.3-4). Auch KOCH et al. (1989a), KOCH et al. (1989b) und LÖSCHER et al. (1993b) berichteten von einer durch Hungern reduzierten β -Oxidation zu 2-en-VPA und ω -Oxidation zu 5-OH-VPA bei Ratten und Menschen, die mit VPA allein behandelt wurden. Nicht bestätigt werden können die von LÖSCHER et al. (1993b) bei Ratten festgestellte Verringerung der β -Oxidation zu 3-keto-VPA und die erhöhte Bildung von 3-en-VPA sowie die nach 40 h Hungern festgestellte Hemmung der 2,3'-dien-VPA-Bildung. Der letztgenannte Metabolit konnte hier mit VPA allein nicht detektiert werden. Der Metabolit 4-en-VPA konnte in der eigenen Arbeit bei der Gruppe V1 weder mit noch ohne Hungern gemessen werden, wohingegen ihn LÖSCHER et al. (1992) und LÖSCHER et al. (1993b) *in vivo* nur bei hungernden Ratten nicht ermittelten. Der Metabolit 2,4-dien-VPA wurde hier mit und ohne Hungern nicht nachgewiesen, demgegenüber konnten ihn LÖSCHER et al. (1993b) *in vivo* mit Hungern im Vergleich zu ohne Hungern nicht mehr detektieren. Bei höheren VPA-Mengen (V5 und V10) gab es keine großen Unterschiede in der Hemmung des Metabolismus durch Hungern. Die Hemmung der ω -Oxidation zu 4-OH (V5) 5-OH-VPA und PGA (V10) und die der β -Oxidation zu 2-en-VPA (V5, V10) war signifikant. Außerdem wurde 4-en-VPA in der Gruppe V10 mit Hungern nicht mehr detektiert (s. Abbildung 4.3-4 und Tabellen 9-17 und 9-18). Dies ist vergleichbar mit dem *in vivo*-Ergebnis von LÖSCHER et al. (1993b).

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen ebenso wie die Literaturergebnisse, daß bei steigender VPA-Dosis der Anteil der Metaboliten sinkt und der Metabolismus von VPA durch Hungern gehemmt wird. Sie lassen in Übereinstimmung mit KOCH et al. (1989a), KOCH et al. (1989b) und KUHARA und MATSUMOTO (1974) die Schlußfolgerung zu, daß die durch Hungern steigende Menge an freien Fettsäuren mit VPA um die Oxidationswege konkurriert (s. Abschnitt 2.1.4.6).

5.3.3 Einfluß von Prooxidantien bei kombinierter Behandlung

Sowohl die Kombination von 1 mM als auch 10 mM VPA mit unterschiedlichen Prooxidantien führte gegenüber VPA allein bei beiden Ernährungszuständen nach 60 min ebenso wie nach 270 min zu keiner grundsätzlichen Veränderung des Metabolitenmusters. Ebenso wie bei VPA-Behandlung allein war bei 10facher Erhöhung der VPA-Menge auch bei Kombinationsbehandlung die Gesamtmetabolitenmenge mit Hungern vermindert (Ausnahme V10T400) und ohne Hungern war sie nur minimal erhöht, wobei die Gesamtmetabolitenanteile bei beiden Ernährungszuständen vermindert waren. Auch bei Kombinationsbehandlung wurde also eine Hemmung der VPA-Metabolitenbildung durch eine hohe VPA-Dosis nur mit Hungern im Vergleich zu Kombinationsbehandlungen mit niedrigerer VPA-Dosis festgestellt (s. Tabellen 4.3-3 und 4.3-4).

Bei Kombination mit 1 mM VPA wurden meßbare und signifikante Veränderungen des VPA-Metabolismus, die im Zusammenhang mit der Lipidperoxidation und Vitalitätseinschränkung stehen könnten, bei der Gruppe V1T400 und in geringem Maße auch bei der Gruppe B500V1 in Leberzellen von hungernden Ratten ermittelt. Mit t-BuOOH wurde eine relativ starke Lipidperoxidation ab 150 min Inkubation beobachtet, mit BrH nur am Ende der Inkubation. In den kombinierten Behandlungsgruppen mit 10 mM VPA konnten keine eindeutigen Abweichungen im VPA-Metabolismus festgestellt werden, die Hinweise über die Ursache der nur bei Hungern ausgeprägten Lipidperoxidation und Vitalitätsverminderung bzw. -verlust geben würden. Indirekte Schlüsse für einen solchen Zusammenhang sind für die Kombinationsgruppen mit 10 mM VPA möglich.

Bei 1 mM VPA wurden nur mit Hungern und nur in den Gruppen V1T400 und B500V1 mit Lipidperoxidation nach 270 min merklich verringerte Gesamtmetabolitenmengen und -anteile im Vergleich zu VPA allein festgestellt (s. Tabellen 4.3-3 und 4.3-4). Die Prooxidantien bewirkten bei Kombination mit 1 mM VPA insbesondere in den Gruppen V1T400 und B500V1 mit Hungern eine signifikante Hemmung des ω -Metabolismus (Ausnahme 4-OH-VPA bei V1T400) und des β -Metabolismus in bestimmten Stadien (s. Abbildungen 4.3-9 und 4.3-11). Bei hohen VPA-Mengen wurde meistens nur eine tendenzielle Verstärkung der Hemmung der ω -Oxidation und β -Oxidation ohne und vor allem mit Hungern in den Gruppen B500V10 und V10C100 durch Prooxidantien beobachtet (s. Abbildungen 4.3-10 und 4.3-12). Durch Hungern wurden weniger Metaboliten der β - (Ausnahme 3-keto-VPA) und ω -Oxidationswege (Ausnahme 4-OH-VPA bei V10T400) gemessen. Jedoch war dieser Unterschied mit 1 mM VPA nur bei den Kombinationsbehandlungen und nur für die ω -Oxidationswege und mit 10 mM VPA bei fast allen Behandlungen zum Teil signifikant. Bei 1 mM VPA spiegelte sich im Gegensatz zu 10 mM VPA die starke Hemmung des VPA-Metabolismus nach 270 min Inkubation durch alle Prooxidantien auch in den nicht metabolisierten VPA-Muttersubstanzmengen wider (s. Abschnitt 4.3.2.1 und Abbildungen 4.3-7 und 4.3-8). Die Ergebnisse der Kombinationen mit 1 mM VPA sind ein Hinweis dafür, daß die Hemmung der β -Oxidation und der ω -Oxidation eine Rolle bei der in den Gruppen V1T400 bzw. B500V1 mit Hungern ermittelten Zytotoxizität spielen könnte. Bei stärkerem Ausmaß der Lipidperoxidation wurde die β -Oxidation von VPA über 2-en-VPA zu 3-keto-VPA und bis zum

Krebs-Zyklus in einer früheren Phase gehemmt. So wurde mit Hungern bei der Gruppe V1C100 mehr 3-keto-VPA, aber nicht weniger 2-en-VPA als bei der Gruppe V1 am Inkubationsende ermittelt (s. Abbildung 4.3-11). Es ist anzunehmen, daß der Abbau von 3-keto-VPA leicht gehemmt war, obwohl noch keine meßbare Zellschädigung und Lipidperoxidation auftrat. Bei der Kombination B500V1 wurde im Vergleich dazu mehr 2-en-VPA und weniger 3-keto-VPA gemessen. Das läßt auf eine Hemmung der β -Oxidation von 2-en-VPA zu 3-keto schließen. Dies verstärkte sich bei der Kombination V1T400, bei der gleichzeitig die stärkste Lipidperoxidation auftrat. Bei dieser Kombination war die β -Oxidation von 2-en-VPA zu 3-keto-VPA deutlich gehemmt und es schien sogar bereits die β -Oxidation zu 2-en-VPA gehemmt zu sein. Jedoch kann nicht erklärt werden, warum der Metabolit 3-OH-VPA, obwohl im β -Oxidationsweg zwischen 2-en-VPA und 3-keto-VPA stehend, in keinem Fall detektiert werden konnte. Allerdings ermittelten auch GOFFLOT et al. (1994), ROGIERS et al. (1988a) und SHIRLEY et al. (1993) *in vitro* und LÖSCHER et al. (1992) und LÖSCHER et al. (1993b) *in vivo* 3-OH-VPA nur in geringen Mengen oder nicht. Außerdem wurde der hepatotoxische Metabolit 4-en-VPA in den Gruppen mit Lipidperoxidation detektiert. Nur bei der Gruppe V1T400 war das auch ohne Hungern der Fall, wohingegen bei der Gruppe B500V1 nur mit Hungern 4-en-VPA nachgewiesen wurde. Dies war sowohl gegenüber VPA allein bei diesem Ernährungszustand als auch gegenüber nicht Hungern signifikant. In der Gruppe V1C100 ohne Lipidperoxidation wurde 4-en-VPA nur ohne Hungern detektiert.

Während bei 1 mM VPA in Kombination mit Prooxidantien der Ernährungszustand einen signifikanten Einfluß auf den nicht metabolisierten Anteil von VPA hatte, war dies in Kombinationen mit 10 mM VPA nicht der Fall (s. Abschnitt 4.3.2.1 und Abbildungen 4.3-7 und 4.3-8). Trotzdem wurden durch Hungern bei den Gruppen V10C100, V10T400 bzw. B500V10 die gleichen Metabolismuswege, wie bei den Gruppen V1C100, V1T400 bzw. B500V1 beschrieben, zum Teil signifikant gehemmt. Im Unterschied zu Behandlungen mit 1 mM VPA wurde mit 10 mM VPA sowohl ohne als auch mit Prooxidantien eine Hemmung der β -Oxidation und der ω -Oxidation durch Hungern festgestellt (s. Abbildungen 4.3-11 und 4.3-12). Starke Lipidperoxidation wurde aber nur in Kombination mit Prooxidantien und Hungern ermittelt. Insbesondere wurde bei hoher VPA-Dosis nur ohne Hungern der hepatotoxische Metabolit 4-en-VPA sowohl mit VPA allein als auch bei Kombinationsbehandlung detektiert. Bei keiner Behandlung konnte der Metabolit 2,4-dien-VPA ermittelt werden, der sowohl das Folgeprodukt von 4-en-VPA als auch von 2-en-VPA ist. Ebenso konnte der potentiell hepatotoxische Metabolit 3-keto-4-en, Folgeprodukt von 4-en-VPA, nicht gemessen werden (s. Abschnitt 2.3.1.2 und Abbildungen 2.1-1 und 2.1-2). Mögliche Mechanismen für die Zytotoxizität bei Kombinationsbehandlung und im Zusammenhang mit den Metabolismusveränderungen werden im Abschnitt 5.5 diskutiert.

5.4 Diskussion der morphologischen Ergebnisse

Mit den elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß weder das Inkubationsmedium Krebs-Henseleit (KV), das Lösungsmittel DMFA (KCT, KB) noch Hungern einen Einfluß auf die Oberflächen- und Innenstruktur der isolierten Hepatozyten hatte. UNGEMACH (1982) zeigte rasterelektronenmikroskopisch, daß nach der Isolierung von Hepatozyten deren Zelloberfläche morphologisch unversehrt war, und WEISS et al. (1973) konnten bis 120 min Inkubation und FUJIMURA et al. (1995) bis 180 min Inkubation elektronenmikroskopisch keine Veränderung der Ultrastruktur isolierter Hepatozyten finden. Im eigenen Modell führte auch die Inkubation über 270 min zu keinen ultrastrukturellen Veränderungen (s. Abschnitt 4.4.1 und Abbildung 4.4-1).

Die Behandlung mit Hydroperoxiden und BrH allein in Kombination mit Hungern führte zu keiner Veränderung der Innenstruktur der Leberzellen (s. Abschnitt 4.4-2 und Abbildung 4.4-2). Im Unterschied zu den Kontrollhepatozyten wurden nach 270 min Inkubation vereinzelt Plasmamembranveränderungen in Form von morphologischen Oberflächenprotrusionen beobachtet, die als Blebs bezeichnet werden (REED et al., 1987). Blebbildung ist ein bekanntes Phänomen während toxischer, viraler und hypoxischer Schädigungen von Hepatozyten (GORES et al., 1990) und wurde zuerst von WEISS et al. (1973) beschrieben. In Anlehnung an GORES et al. (1990) werden drei Stadien der Blebbildung unterschieden. Das erste Stadium ist charakterisiert durch die Bildung kleiner Blebs, das zweite Stadium durch die Fusion dieser zu einigen großen Blebs, die weiter wachsen können. Das Stadium drei ist schließlich gekennzeichnet durch die Ruptur der Blebmembran und verbunden mit dem Verlust der Permeabilitätsbarriere und bedeutet damit den Zelltod. Bei geringem Ausmaß der Schädigung ist die Blebbildung reversibel (FARISS und REED, 1985). So waren Blebs der Stadien eins und zwei, die durch Anoxie (GORES et al., 1990) oder Tetrachlorkohlenstoff (BERGER et al., 1987) verursacht wurden, durch Reoxygenierung vollständig reversibel. Auch wenn die Blebbildung in isolierten Hepatozyten nicht notwendigerweise mit einer erhöhten Membranpermeabilität verbunden ist (GORES et al., 1990), stellt diese morphologische Veränderung trotzdem ein frühes Zeichen des Zellschadens dar (BELLOMO et al., 1982, GORES et al., 1990, JEWELL et al., 1982, REED, 1990a). Die Bildung von Plasmamembranblebs wurde von BELLOMO et al. (1982) und JEWELL et al. (1982) erst bei einer hohen Konzentration von 4 mM t-BuOOH 30 min nach Zugabe zu isolierten Hepatozyten beobachtet. Die von KASS et al. (1992) bereits mit 100 µM CuOOH bzw. 200 µM t-BuOOH ermittelte starke Blebbildung (75 %) 120 min bzw. 30 min nach Zugabe zu isolierten Hepatozyten, die der Verminderung der Zellvitalität vorausging, konnte durch die eigenen Ergebnisse nicht bestätigt werden. Die Blebbildung in den Gruppen mit Prooxidantien allein werden als unbedeutend angesehen, da nur vereinzelt kleine Blebs zu beobachten waren, die lediglich mit dem Elektronenmikroskop sichtbar wurden und damit dem ersten Stadium zuzuordnen sind (s. Abschnitt 4.4-2). Wie bereits im Abschnitt 5.1.3 für die Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter diskutiert, variieren auch aus morphologischer Sicht die toxischen Konzentrationen von Hydroperoxiden in in vitro-Modellen.

Auch die Behandlung mit einer hohen VPA-Dosis führte in Leberzellen von hungernden Ratten zu keiner Veränderung der Zellstruktur. Die bei Prooxidantienbehandlung festgestellte vereinzelte Blebbildung konnte auch hier in sehr geringem Umfang beobachtet werden (s. Abschnitt 4.4.3 und Abbildung 4.4-3). Zusätzlich kam es zur vereinzelten Bildung von Fetttropfen (s. Abbildung 4.4-4). Dies wurde auch nach *in vivo*-Untersuchungen ermittelt. Die einmalige VPA-Behandlung (1000 mg/kg VPA) von zuvor 24 h hungernden Ratten, die nach der Verabreichung weitere 24 h hungerten, führte zu Einzelzellnekrose und perilobulärer Mikrosteatose der Leber (NDANGZIA et al., 1992). Diese Veränderungen wurden aufgehoben, wenn die Ratten nach der Behandlung wieder gefüttert wurden. JEZEQUEL et al. (1984) konnten 24 h nach einer einmaligen Gabe von 200 mg/kg VPA an junge Ratten mit einer Hungerperiode von 10 h vor der VPA-Applikation keinen histologischen Nachweis einer Steatose erbringen. Die Innenstruktur der Hepatozyten war gut erhalten, und es kam nur zur temporären Akkumulation von Lipoproteinpartikeln, die die Golgi-Zisternen ausdehnten. LÖSCHER et al. (1993b) konnten in jungen Ratten, die dreimal täglich 250 mg/kg VPA über eine Woche erhielten und 25 bzw. 40 h am Ende der Behandlungsperiode hungerten, keine entscheidenden histologischen Veränderungen der Leber feststellen. Die histologischen Ergebnisse von NDANGZIA et al. (1992) und JEZEQUEL et al. (1984) nach einmaliger VPA-Gabe und von LÖSCHER et al. (1993b) nach mehrmaliger VPA-Gabe sind mit den vorliegenden vergleichbar. Die nahezu intakte Ultrastruktur nach VPA-Behandlung mit hoher Menge in Kombination mit Hungern in den vorliegenden Untersuchungen wird durch die Ergebnisse der Vitalitätsparameter bestätigt und unterstützt somit die These, daß Hungern allein nicht zu einer hepatotoxischen Wirkung von VPA führt. Hinzu kommt weiterhin, daß sowohl 4-en-VPA als auch 2,4-dien-VPA potente Induktoren der mikrovesikulären Steatose sind (GRANNEMAN et al., 1984a, KESTERSON et al., 1984), jedoch bei der Gruppe V10 4-en-VPA mit Hungern und 2,4-dien-VPA überhaupt nicht ermittelt wurden. Bezüglich des Einflusses von Hungern muß jedoch berücksichtigt werden, daß in Untersuchungen von JEZEQUEL et al. (1984) die einmalige Gabe von 600 mg/kg nach einer Hungerperiode von 10 h, nach 3 h zu einer Erhöhung des Lipidgehaltes der Leber um 20 % und einer Anhäufung von Zytolysosomen, die veränderte Mitochondrien enthielten, führte. Auch in den eigenen Untersuchungen wurden vereinzelt veränderte Mitochondrien ermittelt (s. Abbildung 4.4-3 und 4.4-4). Außerdem wurde eine mikrovesikuläre Steatose bei adulten Ratten in chronischen *in vivo*-Untersuchungen mit hohen VPA-Dosen ohne Hungern (LEWIS et al., 1982) und stärker mit Hungern (KESTERSON et al., 1984) ermittelt.

Die nur bei Kombinationsbehandlung und mit Hungern festgestellte dosisabhängige Lipidperoxidation und Verschlechterung der Vitalität bis hin zum völligen Zelltod konnte mit den elektronenmikroskopischen Ergebnissen bei den untersuchten Gruppen V1T400, V5C100, V10C100, V10T400 und B500V10 bestätigt werden (s. Abschnitt 4.4.4). In diesen Gruppen gingen der Veränderung der Innenstruktur der Hepatozyten, die mit dem Einsetzen der erhöhten MDA-Bildung zu beobachten war, der Verlust der Microvilli und die Veränderung der Plasmamembran voraus. Es wurden zunächst kleine Blebs beobachtet (s. Abbildung 4.4-5, 4.4-10). Diese entsprechen dem Stadium eins nach GORES et al. (1990). Mit zunehmender Verschlechterung der Vitalität der Zellen und steigenden MDA-Werten fusionierten die kleinen Blebs zu großen. Nach 270 min waren an den noch nicht lysierten Zellen vor allem große

Blebs des zweiten Stadiums zu finden. Je nach Ausprägung der Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter befanden sich die meisten Zellen bereits im dritten Stadium (s. Abbildung 4.4-6). Eine besonders starke Bildung von Blebs wurde bei den Gruppen V1T400 und V10T400 induziert, die hier bereits lichtmikroskopisch 30 bis 60 min nach t-BuOOH-Zugabe zu erkennen war (s. Abbildung 4.4-10). Für die Blebbildung gibt es verschiedene mögliche Ursachen (GORES et al., 1990). Toxine oder deren Metaboliten können direkt die Strukturen des Zytoskeletts z.B. durch kovalente Bindung angreifen. Hypoxie, Substratverlust und mitochondriale Toxine könnten indirekt durch ATP-Verlust die Blebbildung induzieren. GABBARRINI et al. (1992) zeigten, daß isolierte Rattenhepatozyten nach 24 h Hungern eine fast 50 % niedrigere intrazelluläre ATP-Konzentration im Vergleich zu gefütterten Ratten aufwiesen. Oxidativer Streß kann zum Thiolverlust und zu oxidativer Modifizierung der Zytoskelettproteine führen. Insbesondere wurde nachgewiesen, daß die Verarmung des intrazellulären GSH die Blebbildung verstärkt (MIRABELLI et al., 1988). Folgen sind die Bildung von Blebs und deren Größenzunahme, die Blebruptur und schließlich die Zellysis, die mit der Abgabe von zytoplasmatischen Bestandteilen ins Medium oder *in vivo* in die Zirkulation verbunden ist. Die festgestellte Blebbildung stützt auch die im Abschnitt 5.5 dargestellte Vermutung, daß in dem untersuchten Modell die Bildung von reaktiven Metaboliten bzw. freien Radikalen stattgefunden haben kann.

Die beobachteten Veränderungen der Innenstruktur, vor allem der Mitochondrien, stimmen mit denen überein, die in der Leber von Kindern mit VPA-bedingtem Leberschaden und irreversiblen Leberschaden ermittelt wurden.⁵ Die Veränderungen der Mitochondrien waren dosis- und zeitabhängig (s. Abschnitt 4.4.4 und Abbildungen 4.4-4, 4.4-5, 4.4-6, 4.4-7, 4.4-8, 4.4-9 und 4.4-10). VPA allein führte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer Modifizierung der strukturellen Organisation der innermitochondrialen Membran, vor allem der Proteinkonformation (RUMBACH et al., 1986). JEZEQUEL et al. (1984) beschrieben nach *in vivo*-Untersuchungen 3 bis 5 h nach einer einmaligen hohen VPA-Dosis an Ratten in Kombination mit Hungern eine dosisabhängige Veränderung der Mitochondrien und die Bildung autophagischer Vakuolen. Die in den eigenen Untersuchungen beobachtete Schwellung der Mitochondrien weist auf eine Hemmung der mitochondrialen Atmungskette hin, die durch BECKER und HARRIS (1983) *in vitro* in isolierten Hepatozyten ermittelt wurde. Das wird durch die in isolierten Rattenlebermitochondrien nach VPA-Behandlung beobachtete Hemmung bzw. Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, Hemmung der Cytochrom-c-Oxidase und Verminderung des Gehaltes an Cytochrom aa₃ bestätigt (HAAS et al., 1981, HAYASAKA et al., 1986, JIMENEZ-RODRIGUEZVILA et al., 1985, PONCHAUT et al., 1992a). Die Bedeutung der Schädigung der Mitochondrien als ein wesentlicher Faktor für die Entstehung der toxischen Wirkung von VPA wird mit den eigenen zytologischen Untersuchungen unterstrichen.

⁵ KEENE et al. (1982), MATHIS et al. (1979a), MATHIS et al. (1979b), SUGIMOTO et al. (1983), TRIPP et al. (1981).

5.5 Hypothesen für den Mechanismus der Zytotoxizität

Für viele Autoren ist 4-en-VPA an den hepatotoxischen Effekten beteiligt (s. Abschnitt 2.3.1.2). Die Ergebnisse zu Vitalitäts- und Funktionalitätsparametern, zum VPA-Metabolismus und zur Elektronenmikroskopie weisen in den mit 1 mM VPA kombinierten Gruppen mit Lipidperoxidation darauf hin, daß 4-en-VPA selbst oder dessen Folgeprodukte 2,4-dien-VPA und 3-keto-4-en-VPA zu einer reversiblen oder irreversiblen Hemmung der für die β -Oxidation von 2-en-VPA zu 3-keto-VPA und vor allem die β -Oxidation von 3-keto-VPA nötigen Enzyme geführt haben könnten. Dafür gibt es mehrere Möglichkeiten. So wurde nachgewiesen, daß sich 4-en-VPA, und schwächer auch VPA, in vivo und in vitro kovalent an zelluläre Proteine der Leber bindet (PORUBEK et al., 1989). Das Folgeprodukt 2,4-dien-VPA oder seine CoA-Ester können sich reversibel an die für den zweiten und dritten Schritt der mitochondrialen β -Oxidation verantwortliche α -Unterheit des trifunktionellen Proteins des β -Oxidationskomplexes binden (BALDWIN et al., 1996). Das Folgeprodukt von 2,4-dien-VPA, der Metabolit 3-keto-4-en-VPA, könnte durch Alkylierung zur irreversiblen Hemmung der Fettsäure- β -Oxidationsenzyme führen (BAILLIE, 1988, KASSAHUN et al., 1994). Die Mitochondrien sind der Bildungsort des 2,4-dien-CoA-Esters und der Angriffspunkt dieses Metaboliten (KASSAHUN et al., 1991). Durch die elektrophile Natur des Diens kann er an die nukleophile Seite der mitochondrialen Enzyme binden und führt damit zur potentiellen Hemmung der β -Oxidation. KESTERSON et al. (1984) konnten dies bei Ratten beobachten. Wahrscheinlich hemmt 4-en-VPA oder 2,4-dien-VPA, wie dies von dem strukturell ähnlichen 4-PA bekannt ist, die vermutlich für den 3-keto-VPA-Metabolismus verantwortliche 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (GERBER et al., 1979, KASSAHUN et al., 1991, PORUBEK et al., 1991, RETTENMEIER et al., 1985). Außerdem wurde auch bei fatalem Leberschaden durch VPA beim Menschen eine erhöhte 3-keto-VPA-Konzentration in Plasma und Urin ermittelt (GRANNEMAN et al., 1991, SIEMES et al., 1993).

Die Vermutung, daß bei der Bildung von „en“-Metaboliten freie Radikale eine Rolle spielen könnten, wurde schon von RETTIE et al. (1987) und PIPPENGER et al. (1991) vertreten. RETTIE et al. (1995) lieferten den Beweis dafür, daß bei der Cytochrom-P450-4B1- und -2B1-abhängigen Bildung von 4-en-VPA und 4-OH-VPA ein C-4-VPA-Radikal entsteht. In den vorliegenden Untersuchungen wurde vor allem in den mit 1 mM VPA kombinierten Gruppen mit Hungern und Lipidperoxidation 4-en-VPA gebildet, wohingegen in denen mit 10 mM VPA mit Hungern und Lipidperoxidation kein 4-en-VPA detektiert wurde (s. Abschnitt 5.3.3). In den mit 10 mM VPA kombinierten Gruppen wurde vor allem in der Gruppe V10T400 - aber nicht in der BrH-Gruppe B500V10 - eine relativ hohe 4-OH-VPA-Bildung festgestellt (s. Abbildung 4.3-12). Als Katalysator der 4-en-VPA-Bildung identifizierte BAILLIE (1988) das Cytochrom P450 2B1. Eine Induktion der Cytochrome P450 2B1 und 2B2 durch Phenobarbital ist seit langem bekannt (OMIECINSKI, 1986, PHILLIPS et al., 1981). So führte eine zusätzliche Behandlung mit Phenobarbital sowohl beim Menschen (KONDO et al., 1992b, LEVY et al., 1990, SIEMES et al., 1993) als auch bei Ratten (GRANNEMAN et al., 1984a, GRANNEMAN et al., 1984b, RETTIE et al., 1988, RETTIE et al., 1987) zu einer erhöhten 4-en-VPA-Bildung. Sowohl in Tiermodellen als auch beim Menschen wurde bei kombinierter Behandlung von VPA und Phenobarbital eine erhöhte Hepatotoxizität von VPA festgestellt (s.

Abschnitt 2.3.5). In neueren Untersuchungen zeigten ROGIERS et al. (1995) in isolierten Rattenhepatozyten eine Induktion der Cytochrome P450 2B1/2 durch VPA selbst und BROWN et al. (1995) durch 16 h Hungern (s. Abschnitt 2.1.5.1). KONDO et al. (1992b) betonten die Bedeutung einer hohen VPA-Serumkonzentration und eines schlechten Ernährungszustandes für die Hepatotoxizität. VPA war darüber hinaus bei Ratten *in vitro* im Vergleich zu *in vivo* sogar ein potenterer Induktor dieser Cytochrome als Phenobarbital (ROGIERS et al., 1995). ROGIERS et al. (1995) schlußfolgern aus ihren Untersuchungen, daß vor allem die Induktion der Cytochrom-P450-Subfamilie-2B durch VPA zu einer erhöhten Produktion der toxischen Metaboliten 4-en-VPA und 2,4-dien-VPA führen könnte und somit das Risiko für einen Leberschaden steigt. Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Bildung von 4-en-VPA mit unmittelbarer weiterer Metabolisierung im vorliegenden Modell als wahrscheinlich angesehen. Gründe für das Erscheinen von 4-en-VPA mit Lipidperoxidation (1 mM VPA) einerseits und die Abwesenheit von 4-en-VPA mit Lipidperoxidation (10 mM VPA) andererseits werden weiter unten aufgeführt.

TANG und ABBOTT (1996a) nehmen an, daß der Metabolismus von 4-en-VPA zu 2,4-dien-VPA essentiell für die VPA-vermittelte Hepatotoxizität ist. Eine toxische Manifestation des 2,4-dien-VPA sind mitochondriale Läsionen (KESTERSON et al., 1984). Im eigenen Modell wurden zwar starke Veränderungen der Mitochondrien bei Lipidperoxidation ermittelt (s. Abschnitt 5.4), jedoch konnte die Bildung von 2,4-dien-VPA und 3-keto-4-en-VPA nicht nachgewiesen werden. Es kann aber angenommen werden, daß nicht alle entstandenen Metaboliten gemessen wurden. Das hängt nicht mit Unzulänglichkeiten der angewandten Methode, sondern mit der Reaktivität der hepatotoxischen Metaboliten 2,4-dien-VPA und 3-keto-4-en-VPA zusammen. So konnte auch bei Fällen fataler Hepatotoxizität oder in anderen Tierexperimenten 4-en-VPA, 2,4-dien-VPA oder 3-keto-4-en-VPA nicht nachgewiesen werden (s. Abschnitt 2.3.1.2). Der Metabolit 3-keto-4-en-VPA konnte aufgrund seiner instabilen Natur noch gar nicht detektiert werden. Nur sein GSH-Konjugat in der Galle wurde identifiziert (GRANNEMAN et al., 1984b, KASSAHUN et al., 1994, RETTENMEIER et al., 1986, RETTENMEIER et al., 1985).

Die Abwesenheit von 4-en-VPA in den Kombinationsgruppen mit 10 mM VPA, die die stärkste Lipidperoxidation aufwiesen, kann mit der Bildung seiner reaktiven Folgeprodukte zusammenhängen, die jedoch aufgrund ihrer Reaktivität und durch den Mangel an mitochondrialem GSH mit Makromolekülen der Zelle reagiert haben könnten und dadurch mit der angewandten Methode nicht gemessen wurden. Das stützt sich auf die beobachteten ultrastrukturellen Veränderungen der Mitochondrien in diesen Gruppen (s. Abschnitt 5.4). Dafür spricht auch, daß in der Behandlungsgruppe mit 10 mM VPA ohne Hungern, bei der keine Lipidperoxidation stattfand, 4-en-VPA detektiert wurde. TANG et al. (1995) stellten die Hypothese auf, daß eine Verminderung des Serumspiegels von 4-en-VPA oder 2,4-dien-VPA mit einer schwereren toxischen Folge verbunden sein könnte, wenn das Angriffsziel dieser reaktiven Metaboliten wesentlich für die Entstehung der Toxizität ist. Wenn also die reaktiven Metaboliten von 4-en-VPA in den Mitochondrien gebildet werden, befinden sie sich bereits am Ort der potentiellen Schädigung. Erfolgt die Bildung von 2,4-dien-VPA jedoch aus 2-en-VPA in den Mikrosomen, ist nicht notwendigerweise eine toxische Folge zu erwarten. Auch

KASSAHUN et al. (1994) schlußfolgern, daß das mikrosomal aus 2-en-VPA gebildete 2,4-dien-VPA aufgrund seiner Lokalisation im zytosolischen Kompartiment einen geringen Anteil an der Hepatotoxizität haben könnte, da es mit GSH im Zytosol konjugiert und somit weniger verfügbar für intramitochondriale Enzyme wird (s. Abbildung 2.1-2 und Abschnitt 2.1.4.4). Das könnte auch erklären, warum die nach 2-en-VPA-Behandlung von LÖSCHER et al. (1993b) in Ratten festgestellte Menge 2,4-dien-VPA, obwohl in viel höheren Mengen vorhanden als nach VPA-Behandlung, eindeutig weniger hepatotoxisch war als die Behandlung mit VPA. In vivo und auch bei Untersuchungen in isolierten Leberzellen kann nicht entschieden werden, wo die Folgeprodukte von 4-en-VPA entstanden sind.

Gegen die These, daß eine Messung von 4-en-VPA auf eine ursächliche Beteiligung an der Hepatotoxizität in diesem Modell schließen läßt, spricht, daß ohne Hungern 4-en-VPA bei der Gruppe V1T400 gegenüber V1 signifikant erhöht war und in den Gruppen V1C100 und V10 ebenfalls erschien. Darüber hinaus bestand kein wesentlicher Unterschied im Ausmaß der 4-en-VPA-Bildung zwischen Hungern und nicht Hungern bei der Gruppe V1T400. Auch die β -Oxidation unterschied sich zwischen beiden Ernährungszuständen nicht signifikant.

Gegen die These, daß die Nichtmeßbarkeit von 4-en-VPA auf eine ursächliche Beteiligung an der Hepatotoxizität in diesem Modell hinweist, spricht zum Teil, daß auch in der Gruppe V1 ohne Hungern und in den Gruppen V1C100 und V10 mit Hungern kein 4-en-VPA detektiert wurde, jedoch in diesen Gruppen keine Lipidperoxidation nachgewiesen werden konnte. Lediglich bei der Gruppe V10 wurde ein geringer Vitalitätsverlust beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß noch ausreichend GSH zur Verfügung stand, um eventuell entstandene reaktive Metaboliten zu entgiften. So war in dieser Gruppe die Ultrastruktur der Mehrzahl der Mitochondrien unverändert (s. Abschnitt 5.4). Das gleiche Argument könnte auch für die mit 10 mM VPA kombinierten Behandlungsgruppen ohne Hungern gelten, bei denen 4-en-VPA nicht oder in Spuren gemessen wurde. Die festgestellten Veränderungen des VPA-Metabolismus mit eventuell steigendem 4-en-VPA-Metabolismus in den Mitochondrien scheint also nicht die einzige Ursache für die beobachtete Zytotoxizität zu sein. Aber es existieren Bedingungen, in denen solche Veränderungen zu einer Hepatotoxizität führen könnten.

In den vorliegenden Untersuchungen scheint eine Bedingung für die beobachtete Zytotoxizität die Verminderung des GSH-Gehaltes der Leberzellen und vor allem der Mitochondrien mit nachfolgendem Zusammenbruch der antioxidativen Kapazität zu sein. So könnte die starke Verminderung des GSH-Gehaltes durch kombinierte Behandlung mit Hungern im Vergleich zu ohne Hungern sowohl in Kombination mit Hydroperoxiden als auch mit dem GSH-Verarmer BrH dafür sprechen, daß vermehrt GSH-Konjugatmetaboliten aus den Folgeprodukten von 4-en-VPA, 2,4-dien-VPA und 3-keto-4-en-VPA in den Mitochondrien entstanden sind (JURIMA-ROMET et al., 1996, KASSAHUN et al., 1991, KASSAHUN et al., 1994, TANG et al., 1995, s. Abbildung 2.1-2). Auch diese Metaboliten sind mit der angewandten Methode nicht zu erfassen. Ein alternativer Mechanismus für die Hepatotoxizität des reaktiven 2,4-dien-VPA-CoA-Esters könnte daher neben der potentiellen Hemmung der Enzyme der β -Oxidation der lokale Verlust von GSH in den Mitochondrien sein. Die Folge wäre eine

Verminderung oder Entleerung des ohnehin kleinen mitochondrialen GSH-Pools unter den kritischen Wert, eine Situation, die zu oxidativem Streß mit nachfolgendem Zellschaden bis hin zur Zelllyse führt (REED, 1990a, SHAN et al., 1993, TANG et al., 1996). Für die wesentliche Rolle des GSH im Zytotoxizitätsmechanismus von VPA spricht, daß die Hydroperoxide, die in der ersten Versuchsreihe als weiterer zusätzlicher Faktor für die Zytotoxizität nötig waren, in isolierten Hepatozyten zu einem intrazellulären GSH-Verlust führten.⁶ OLAFSDOTTIR und REED (1988) beobachteten sogar eine drastische Verminderung des mitochondrialen GSH/GSSG-Verhältnisses. Eine bedeutende Rolle des mitochondrialen GSH kann angenommen werden. Die in Kombination mit den Hydroperoxiden noch höhere GSH-Menge am Ende der Inkubation ist vielleicht auf einen höheren zytosolischen Anteil zurückzuführen. Außerdem spricht dafür, daß Lipidperoxidation nur im Zusammenhang mit Hungern beobachtet wurde, ein Zustand, der zu einem signifikant niedrigeren GSH-Status der Leberzellen führte, der während der Inkubation aufrechterhalten wurde. Dafür sprechen ebenfalls die Ergebnisse mit dem GSH-Verärmer BrH. Gegen die These von der ursächlichen Bedeutung eines freien Radikalmechanismus, der bei Hepatotoxizität lediglich aufgrund der GSH-Entleerung ausgelöst wird, spricht die Untersuchung von SHAN et al. (1993), die herausfanden, daß die völlige Entleerung des GSH-Pools der Mitochondrien nicht mit einer Dysfunktion der Mitochondrien verbunden sein muß. Eine Beteiligung von reaktiven Metaboliten wird vor allem aufgrund der morphologischen Veränderungen der Mitochondrien für möglich gehalten.

Die Ergebnisse zum GSH-Gehalt und der MDA-Bildung der Kombinationsbehandlungen mit dem GSH-Verärmer BrH weisen darauf hin, daß der GSH-Pool der Mitochondrien die kritische Schwelle erreicht haben könnte. Das stützt sich auf Ergebnisse von JURIMA-ROMET et al. (1996), die Zytotoxizität durch 4-en-VPA in Hepatozytenkulturen feststellten, wenn der mitochondriale GSH-Pool durch BSO vermindert wurde. So verursachte der Metabolit 4-en-VPA in Mengen bis zu 20 mM mit und ohne Phenobarbital-Induktion keinen, nach Verminderung des GSH-Gehaltes durch BSO bereits mit 1 µM einen Vitalitätsverlust, der nach Phenobarbital-Vorbehandlung höher war. Aus dem Verhältnis der GSH-Konjugate und da die Zytotoxizität nach selektiver GSH-Verarmung im Zytosol mit DEM nicht beobachtet wurde, schlossen die Autoren, daß BSO den kritischen mitochondrialen GSH-Pool vermindert und 2,4-dien-VPA nicht mehr ausreichend mit GSH zur Entgiftung konjugieren kann. VPA verursachte dagegen sowohl ohne als auch mit BSO eine gleichermaßen ausgeprägte dosisabhängige LDH-Freisetzung, die bei Phenobarbitalvorbehandlung ebenso wie bei 4-en-VPA-Behandlung durch BSO erhöht wurde. In den vorliegenden Untersuchungen verursachte VPA allein bei hoher Dosis und mit Hungern nur einen geringen Vitalitätsverlust. Erst bei zusätzlicher GSH-Verarmung durch BrH trat eine starke Zytotoxizität auf. Da neben Phenobarbital (OMIECINSKI, 1986, PHILLIPS et al., 1981) auch VPA (ROGIERS et al., 1995) und Hungern (BROWN et al., 1995) die Cytochrome P450 2B1/2 induzieren und Cytochrom P450 2B1 für die Bildung von 4-en-VPA verantwortlich ist (BAILLIE, 1988), wird die Hypothese unterstützt, daß die VPA-Hepatotoxizität Metaboliten-vermittelt ist und der oxidative Cy-

⁶ ANARI et al. (1995), EKLÖW et al. (1984), HINO et al. (1987), HÖGBERG und KRISTOFERSON (1977), YUAN et al. (1991).

tochrom-P450-abhängige Metabolismus verantwortlich sein könnte. Der von JURIMA-ROMET et al. (1996) nicht beobachtete zytotoxische Effekt von VPA und 4-en-VPA nach DEM-GSH-Entleerung kann neben der von den Autoren diskutierten selektiven Wirkung auf den zytosolischen GSH-Pool auch an der für DEM beschriebenen Hemmung von Cytochrom-P450-Enzymen (ANDERS, 1978) gelegen haben.

SIEMES et al. (1992) stellten die These auf, daß VPA selbst das entscheidende Hepatotoxin ist und auf eine bisher unbekannte Weise wirkt. Dafür spricht in den eigenen Untersuchungen, daß bei den 1-mM-VPA-Behandlungsgruppen mit Lipidperoxidation am Ende der Inkubation eine hohe Menge nicht metabolisierter VPA gefunden wurde. Zusätzlich dazu wurde in den Behandlungsgruppen mit 10 mM VPA durch Hungern eine zum Teil signifikant verminderte Bildung der Metaboliten bestimmt. Damit ist aber nicht zu erklären, warum die Behandlung mit VPA allein bei Hungern nicht zur starken Zytotoxizität führte. Hungern scheint aufgrund der festgestellten Hemmung der Metabolismuswege und des damit vermehrten VPA-Anteils nur ein für die Zytotoxizität prädisponierender Faktor zu sein.

Da in der ersten Versuchsreihe erst die zusätzliche Behandlung mit Prooxidantien in diesem Modell zur Zytotoxizität führte, ergeben sich weitere Thesen. Es ist möglich, daß es sich um eine durch die Hydroperoxide potenzierte VPA-Zytotoxizität handelt, daß die Hydroperoxide selbst zur Zytotoxizität führten oder beides zur Leberzellschädigung beitrug.

Organische Hydroperoxide wie *t*-BuOOH und CuOOH können als Cytochrom-P450-Peroxygenase/Peroxidase-Cofaktoren deutlich den zellulären Metabolismus beeinflussen und die Zytotoxizität von verschiedenen Cytochrom-P450-abhängigen Substraten erhöhen, indem sie die Bildung reaktiver Metaboliten forcieren (ANARI et al., 1995) (s. Abschnitt 2.4.1.3). Außerdem verursachte das auch in den vorliegenden Versuchen verwendete Hydroperoxid *t*-BuOOH allein in einer Konzentration von 150 µM in frisch isolierten Hepatozyten der Ratte eine vorübergehende Oxidation von 90 % des Hepatozyten-GSH-Gehaltes zu GSSG, das allerdings innerhalb von 10 min wieder zu GSH reduziert wurde (ANARI et al., 1995). Dieser Prozeß könnte durchaus auch in den eigenen Untersuchungen abgelaufen sein, jedoch wurde er nicht ermittelt, da erst 30 min nach Hydroperoxidzugabe die nächste GSH-Messung erfolgte. Im Vergleich zu ohne Hungern war der GSH-Gehalt 30 min nach Zugabe des Hydroperoxids dosisabhängig stark vermindert. Es ist möglich, daß es innerhalb dieser 30 min durch den Einfluß der Hydroperoxide auf den Metabolismus zu einer erhöhten Bildung von reaktiven Cytochrom-P450-abhängigen VPA-Metaboliten kam, die aufgrund des gleichzeitigen starken GSH-Verbrauchs durch die Peroxide selbst nicht mit GSH konjugieren konnten. Dies würde die bereits zu diesem Zeitpunkt stark vorhandene MDA-Bildung erklären. Daß lipidperoxidative Vorgänge nur mit Hungern auftraten, könnte mit dem signifikant niedrigeren GSH-Gehalt zum Zeitpunkt der Hydroperoxidzugabe im Vergleich zu ohne Hungern und mit der bereits erwähnten Induktion von Cytochrom P450 2B1 durch VPA und Hungern zusammenhängen. Das würde jedoch voraussetzen, daß die Hydroperoxide durch das GSH-Px-GSSG-Rd-Transhydrogenasesystem ohne Bildung freier Radikale abgebaut wurden (s. Abschnitt 2.4.1.1). Das kann angenommen werden, da in allen Hydroperoxidgruppen noch eine ausreichende, an sich vor Zellschaden noch schützende intrazelluläre GSH-Menge zu

diesem Zeitpunkt vorhanden war (MEREDITH und REED, 1982, MEREDITH und REED, 1983, REED, 1990a).

Ebenso könnten die Hydroperoxide selbst zur Zytotoxizität geführt haben. Wie im Abschnitt 2.4.1.2 dargestellt, führt die Erschöpfung der Entgiftungskapazität für Hydroperoxide bzw. das Fehlen reduzierender Äquivalente für die Hydroperoxidreduktion (GOGVADZE und ZHUKOVA, 1991) zum Cytochrom-P450-vermittelten Hydroperoxidzerfall unter Freisetzung von freien Radikalen (BINDOLI et al., 1982, KENNEDY et al., 1986, NOVGORODOV et al., 1989b, WEISS und ESTABROOK, 1986). Dieser Mechanismus muß auch in den eigenen Untersuchungen in Erwägung gezogen werden. Dafür spricht, daß wesentliche Enzyme und Reduktionsäquivalente, die für den Hydroperoxidmetabolismus ohne Bildung von radikalischen Produkten erforderlich sind, durch VPA und Hungern gehemmt bzw. reduziert werden, was zur Verminderung der Kapazität der Leber zur Entgiftung von Peroxiden führen kann (COTARIU et al., 1992, COTARIU et al., 1990, TANG et al., 1995). Dagegen sprechen zum einen die noch relativ hohen GSH-Konzentrationen kurz vor der Hydroperoxidbehandlung, wobei keine Aussagen über den mitochondrialen GSH-Gehalt möglich sind. SHAN et al. (1993) stellten in isolierten Hepatozyten fest, daß t-BuOOH in einer Konzentration von 300 µM dann eine starke Vitalitätsverminderung verursachte, wenn der mitochondriale GSH-Pool vollständig entleert wurde und dort kein GSH mehr für den t-BuOOH-Metabolismus zur Verfügung stand. Bei Versuchen mit dem zytosolischen GSH-Verarmer DEM und t-BuOOH kam es zu keiner Verschlechterung der Vitalität der Hepatozyten. Zum anderen spricht auch die mit BrH-Vorbehandlung und VPA festgestellte Lipidperoxidation dagegen, da für BrH kein Cytochrom-P450-abhängiger Zerfall unter Bildung freier Radikale bekannt ist (KHAN und O'BRIEN, 1991).

Eigene nicht dargestellte Ergebnisse weisen auf ein Zusammenwirken der Potenzierung der VPA-Toxizität durch die Hydroperoxide und des Hydroperoxidzerfalls mit Freisetzung freier Radikale hin. So führte die Behandlung der Leberzellen von hungernden Tieren zum Zeitpunkt 0 min mit 100 µM CuOOH mit nachfolgender 10-mM-VPA-Behandlung zum Zeitpunkt 120 min der Inkubation zu keinerlei Veränderungen der Vitalität und zu keiner erhöhten MDA-Bildung. Es ist anzunehmen, daß am Anfang der Inkubation ausreichend GSH für die Reduktion des Hydroperoxids zum korrespondierenden Alkohol vorhanden war (BELLOMO et al., 1984b, CADENAS et al., 1981, JOCELYN und DICKSON, 1980, REED, 1990a). Der Abbau von Hydroperoxiden erfolgt nach ANARI et al. (1995) sehr schnell. Das heißt, bis zur Zugabe von VPA war CuOOH bereits abgebaut und der GSH-Gehalt der Leberzellen nur unwesentlich oder gar nicht vermindert bzw. wieder regeneriert, so daß eventuell mit VPA entstehende reaktive Metaboliten genügend GSH zur Konjugation zur Verfügung hatten. Ab 120 min wurde ein den VPA-Behandlungsgruppen allein vergleichbarer GSH-Verlust beobachtet. Für ein Zusammenwirken von VPA und Hydroperoxiden im Zytotoxizitätsmechanismus spricht außerdem, daß sowohl VPA (TROST und LEMASTERS, 1996), Hydroperoxide (IMBERTI et al., 1993, NIEMINEN et al., 1995) als auch freie endogene Fettsäuren (BROKEMEIER und PFEIFFER, 1995), die bei Hungern vermehrt anfallen (FELIG, 1979), die Permeabilität der Mitochondrienmembran erhöhen.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für die Thesen, daß die endogene β -Oxidation⁷ und ω -Oxidation (KUHARA und MATSUMOTO, 1974) von Fettsäuren am Metabolismus von VPA beteiligt sind (s. Abschnitt 2.1.4.6). Nach KOCH et al. (1989a) und KOCH et al. (1989b) konkurrieren die durch Hungern vermehrt anfallenden Fettsäuren (FELIG, 1979) mit VPA um die β -Oxidation. Ebenso haben einige Autoren festgestellt, daß VPA selbst und seine ungesättigten Metaboliten 4-en-VPA und 2,4-dien-VPA die β -Oxidation der Fettsäuren hemmen (s. Abschnitte 2.3.2.1 und 2.3.2.2).⁸ Bei Fällen fataler VPA-vermittelter Hepatotoxizität bei Kindern wurde neben einer eingeschränkten β -Oxidation von Fettsäuren und VPA eine erhöhte ω -Oxidation von Fettsäuren beobachtet (KOCHEN et al., 1983). WADA et al. (1971) ermittelten letzteres auch bei Hungern. Außerdem war bei fataler Hepatotoxizität der ω -Metabolismus zu 5-OH-VPA und PGA im Vergleich zu behandelten Kindern ohne Leberschaden vermindert (KOCHEN et al., 1983). In den eigenen Untersuchungen führte Hungern in allen Behandlungsgruppen zu einem geringeren Auftreten der über diese Wege gebildeten Metaboliten (mit Ausnahme von 3-keto-VPA in der Gruppe V1, in Kombinationen mit 1 mM VPA und in den Gruppen V10 und V10T400). Eine Bestimmung der β - und ω -Oxidation von endogenen Fettsäuren erfolgte nicht. Ebenso wie in der Literatur beschrieben, wurde unabhängig von oxidativem Streß eine Hemmung der β - und ω -Oxidation von VPA durch hohe VPA-Mengen in Kombination mit Hungern ermittelt. Die bei Verminderung der β -Oxidation der Fettsäuren durch VPA und durch Hungern vermehrt vorliegenden Fettsäuren laufen wahrscheinlich vor allem über die ω -Oxidation und können auch den ω -Metabolismus von VPA hemmen, da die Fettsäuren offensichtlich eher über diesen Weg abgebaut werden als VPA selbst. Das weist indirekt darauf hin, daß VPA in diesem Modell in der Lage ist, für seinen β - und ω -Oxidationsmetabolismus die Enzyme der endogenen Fettsäureoxidation zu nutzen. Da die β - und ω -Oxidationshemmung in allen mit hohen VPA-Dosen behandelten Leberzellen und Hungern beobachtet wurde - unabhängig von Hydroperoxiden und GSH-Verarmung - ist nicht davon auszugehen, daß diese Hemmung der β -Oxidation der Fettsäuren und die postulierte Hemmung der β - und ω -Oxidation von VPA die alleinigen Ursachen für die nur mit Kombinationsbehandlung und Hungern festgestellte Zytotoxizität in diesem in vitro-Modell sind.

5.6 Schlußbetrachtung

Es wurde ein in vitro-Modell vorgestellt, mit dem auf verschiedene Weise oxidativer Streß im Sinne einer Störung der Prooxidantien-Antioxidantien-Balance, die potentiell zu Schäden führen kann, ausgelöst wurde. Zum Einsatz kamen Faktoren, die allein entweder zu einer meßbaren Verminderung des GSH-Gehaltes der Leberzellen führten (Hungern und BrH) bzw. einen zwar nicht gemessenen, aber entsprechend den Literaturangaben anzunehmenden, kurzzeitigen, noch kompensierbaren GSH-Verbrauch verursachten (Hydroperoxide), und die

⁷ HEINEMEYER et al. (1983), KOCH et al. (1989a), KOCH et al. (1989b), MANNAERTS et al. (1979), MANNAERTS et al. (1978).

⁸ BECKER und HARRIS (1983), BJORGE und BAILLIE (1985), COUDÉ et al. (1983b), DRAYE und VAMECQ (1987), GRANNEMAN et al. (1984a), KESTERSON et al. (1984), THURSTON et al. (1983b), TURNBULL et al. (1983a).

in Kombination mit VPA einen weiteren meßbaren GSH-Verbrauch zur Folge hatten und zu einer Induktion und Hemmung verschiedener metabolischer Wege von VPA geführt haben könnten (Hungern, VPA, Prooxidantien).

Das vorliegende Modell der frisch isolierten Hepatozyten der Ratte stellte sich als zur Untersuchung der Toxizität und des Metabolismus von VPA geeignet heraus. Es wurden durch die Kombination von Hungern, VPA und verschiedener Prooxidantien in Leberzellen Situationen simuliert, wie sie in der Leber von Kindern, bei denen die VPA-Therapie zu einem fatalen Leberschaden führte, aufgetreten sein könnten.

Die eigenen Resultate erlauben unter Beachtung der zahlreichen älteren sowie neuesten Forschungsergebnisse bei Menschen und Tieren folgende generellen Schlußfolgerungen:

- Die VPA-Hepatotoxizität hat nicht nur eine einfache Ursache, sondern einen Ursachenkomplex, an dem mehrere Mechanismen beteiligt sind. Es existieren viele Einflußfaktoren, die in verschiedenen Kombinationen zur Hepatotoxizität führen.
- Hungern ist ein Risikofaktor, der zur Zytotoxizität von VPA beiträgt, allein jedoch nicht ausreicht, um einen hepatozellulären Schaden zu verursachen.
- Die Zytotoxizität ist abhängig von der VPA-Dosis.
- Der starke Verlust von intrazellulärem GSH durch mehrere Faktoren, wie Hungern, VPA und oxidativer Streß, spielt eine wesentliche Rolle im Zytotoxizitätsmechanismus.
- Die erhöhte Bildung von MDA in beiden Versuchsreihen weist auf eine Einbeziehung der Lipidperoxidation in den toxischen Mechanismus hin. Hierbei wird die Lipidperoxidation als Ursache und nicht als Folge der Zytotoxizität angesehen.
- Hungern hemmt den Metabolismus von VPA. Ein VPA-Metabolismus unter Beteiligung der endogenen β - bzw. ω -Oxidation von Fettsäuren ist deshalb wahrscheinlich.
- Die Veränderungen des VPA-Metabolismus spielen eine wesentliche Rolle in der Hepatotoxizität. Eine eindeutige Aussage, ob diese Veränderungen Ursache oder Wirkung der Zytotoxizität sind, ist nicht möglich. Es existiert kein eindeutiges Metabolitenprofil bei VPA-vermittelter Zytotoxizität.
- Die Veränderungen im VPA-Metabolismus sind vor allem von der VPA-Dosis abhängig. Insbesondere hohe VPA-Mengen in Kombination mit Hungern hemmen die β - und ω -Oxidation von VPA. Dabei scheint die Hemmung der β -Oxidation eine Voraussetzung für die Zytotoxizität zu sein. Allein ist sie jedoch nicht ausreichend für eine Schädigung der Leber.
- Die Hemmung des normalerweise stattfindenden VPA-Metabolismus zugunsten alternativer Wege mit erhöhter Bildung von reaktiven Metaboliten ist möglich.
- Sowohl die Ermittlung des hepatotoxischen Metaboliten 4-en-VPA als auch dessen Abwesenheit weisen nicht immer auf einen Leberschaden hin.

- Die Wirkung von Hungern und auch von VPA selbst scheint vor allem in einem Verlust von GSH und der Induktion bestimmter Wege des VPA-Metabolismus mit Bildung hepatotoxischer Metaboliten zu liegen. Alternativ ist auch möglich, daß nicht vermehrt hepatotoxische Metaboliten gebildet werden, aber die Entgiftung der auch unter normalen Bedingungen entstehenden reaktiven Metaboliten nicht mehr möglich ist. Auch die Kombination beider Varianten ist vorstellbar.
- Die ultrastrukturellen Veränderungen der Mitochondrien weisen darauf hin, daß die Mitochondrien das Ziel der Toxizität sind. Das unterstützt die These, daß toxische Metaboliten von 4-en-VPA eine Rolle spielen könnten, da sie mitochondrial gebildet werden. Dem mitochondrialen GSH-Pool muß damit eine besondere Bedeutung beigemessen werden.

Insgesamt muß berücksichtigt werden, daß mit diesem Tiermodell natürlich nur einige der bekannten Einflußfaktoren der VPA-Hepatotoxizität untersucht wurden. Zu beachten ist bei der Anwendung dieser Erkenntnisse auch, daß eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf die gleiche Versuchstierart oder andere Versuchstierarten nur unter Einschränkungen möglich ist. So wurden hinsichtlich der Empfindlichkeit der Leber gegenüber VPA bzw. verschiedener Metaboliten im gleichen *in vitro*-Modell tierartliche Unterschiede beschrieben (FISHER et al., 1994), und es wurden sowohl zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Modellen der Ratte als auch im gleichen *in vivo*-Rattenmodell altersabhängige Unterschiede ermittelt (FISHER et al., 1994, KESTERSON et al., 1984, LÖSCHER et al., 1993a, LÖSCHER et al., 1992). Ebenso können die Erkenntnisse aus Tierversuchen nicht vorbehaltlos auf den Menschen übertragen werden. Eine gewisse Vergleichbarkeit zwischen den Gegebenheiten bei Menschen und Tieren kann aufgrund des VPA-Metabolismus angenommen werden. Es wurden wenige tierartspezifische Unterschiede und ebenso wenige Unterschiede zwischen den *in vivo*- und *in vitro*-Tiermodellen, darunter auch unter Verwendung von Ratten, und den Untersuchungen beim Menschen gefunden. Dies trifft vor allem auf die festgestellten Metabolitenmuster zu.

6 Zusammenfassung

Eine seltene unerwünschte Nebenwirkung der Behandlung der Epilepsie mit VPA stellt das irreversible Leberversagen dar. Der bzw. die ursächlichen Mechanismen konnten jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Es wird angenommen, daß die Hepatotoxizität auf einem Zusammenspiel verschiedener Faktoren beruht.

Ziel der Arbeit war es, *in vitro* am Modell der isolierten Hepatozyten der Ratte den Einfluß mehrerer Faktoren auf die Hepatotoxizität von VPA zu testen. Es wurden die Hepatotoxizität und der Metabolismus von VPA untersucht, wenn neben dem Hungern noch ein zusätzlicher Faktor in Form von oxidativem Streß auf die Leberzellen wirkt. Als Prooxidantien wurden die Hydroperoxide CuOOH und t-BuOOH und der GSH-Verarmer BrH verwendet. Im Mittelpunkt des Interesses stand die Erforschung der Rolle von GSH, der Lipidperoxidation, von Veränderungen im VPA-Metabolismus und der Ultrastruktur der Leberzellen.

Die Hepatozyten wurden von adulten Wistar-Ratten männlichen Geschlechts isoliert, die entweder Wasser und Futter *ad libitum* erhielten oder denen 20 h vor Versuchsbeginn das Futter entzogen wurde. In einer ersten Versuchsreihe wurde der Einfluß von Hungern sowie der von VPA und Prooxidantien allein bei unterschiedlichen Ernährungszuständen auf die Vitalität (Trypanblautest, LDH-Abgabe, intrazellulärer K⁺- und Na⁺-Gehalt) und die antioxidative Kapazität (intrazellulärer GSH-Gehalt, MDA-Bildung) der Leberzellen untersucht. Bei VPA-Hydroperoxid-kombinierter Behandlung wurde der Einfluß von Hydroperoxiden, von VPA und der des Ernährungszustandes auf diese Parameter getestet. In einer zweiten Versuchsreihe diente die Kombinationsbehandlung mit BrH und VPA der Untersuchung des Einflusses der GSH-Verarmung durch BrH. Auch hier wurden die Einflüsse von VPA und der des Ernährungszustandes getestet. In beiden Versuchsreihen wurden verschiedene VPA- bzw. Prooxidantienkonzentrationen verwendet, um die Abhängigkeit der ermittelten Effekte von der Dosis festzustellen. Für ausgewählte Behandlungsgruppen erfolgten eine Bestimmung von VPA und deren Metaboliten mittels GC/MS und eine Untersuchung der Ultrastruktur der Hepatozyten mittels Elektronenmikroskopie.

Hungern führte zu einer Körper- und Lebergewichtsverminderung. Die Vitalität der Leberzellen wurde nicht beeinflusst, aber ihr GSH-Status wurde um ca. 40-50 % verringert. Eine GSH-Neubildung bzw. -Regenerierung fand statt. Erhöhte MDA-Bildung trat nicht auf.

Bei beiden Ernährungszuständen wurden keine Einflüsse auf die Vitalität der Leberzellen durch die verwendeten Prooxidantien ermittelt. VPA allein führte nur mit Hungern bei der höchsten VPA-Menge zu Vitalitätseinbußen bei den sensiblen Parametern Kalium und Natrium und im Trypanblautest. Erhöhte MDA-Bildung wurde in keinem Fall beobachtet. Hydroperoxide allein führten unabhängig vom Ernährungszustand zu keiner Veränderung des GSH-Gehaltes der Leberzellen. Die Vorbehandlung mit BrH bedingte eine GSH-Verarmung der Leberzellen um ca. 60-80 %. Nur mit Hungern wurde der starke GSH-Verlust bis zum Inkubationsende aufrechterhalten. Eine GSH-Neusynthese bzw. -Regenerierung wurde festgestellt. Bei beiden Ernährungszuständen wurde durch VPA der GSH-Gehalt dosis- und zeitabhängig vermindert. Mit steigender VPA-Dosis sank die Fähigkeit zur GSH-Neusynthese

bzw. -Regenerierung. Bei allen Monobehandlungen führte Hungern während der gesamten Inkubation zu signifikant niedrigeren GSH-Werten im Vergleich zu ohne Hungern.

Weder Prooxidantien noch VPA allein führten zu einer entscheidenden Veränderung der Ultrastruktur der Hepatozyten. Lediglich eine unbedeutende Blebbildung wurde verzeichnet. Nur mit der höchsten VPA-Menge wurden vereinzelte Fetttropfen ermittelt. Kein Faktor allein veränderte die Struktur der Mitochondrien.

Unabhängig von der eingesetzten VPA-Dosis wurde das gleiche Metabolitenmuster ermittelt. Insgesamt wurde ein höherer Anteil des ω -Oxidations- als des β -Oxidationsmetabolismus gefunden. Bei hoher VPA-Dosis sank der Gesamtmetabolitenanteil im Vergleich zu niedriger VPA-Dosis. Hungern veränderte nicht grundsätzlich das Metabolitenprofil, hemmte jedoch mit 1 mM VPA tendenziell und nur mit 10 mM VPA signifikant die Bildung der ω - und ω_1 -Oxidations- und des β -Oxidationsmetaboliten 2-en-VPA.

Die VPA-Hydroperoxid- bzw. BrH-VPA-Behandlung führte nur mit Hungern zu einer starken dosis- und zeitabhängigen Lipidperoxidation mit nachfolgender oder zeitgleich einsetzender, ebenfalls dosis- und zeitabhängiger Einschränkung der Vitalität der Leberzellen. Es wurde unabhängig vom Ernährungszustand eine von der Dosis und der Zeit abhängige GSH-Verminderung durch VPA und Hydroperoxide festgestellt. Der Einfluß von VPA war dabei ausgeprägter. Bei BrH-VPA-Behandlung war natürlich der BrH-Einfluß auf diesen Parameter höher. Bei allen Kombinationsbehandlungen führte Hungern während der gesamten Inkubation zu signifikant niedrigeren GSH-Werten im Vergleich zu ohne Hungern.

In allen ohne Hungern getesteten Kombinationsgruppen besaßen die Leberzellen noch ein ausreichendes antioxidatives Potential. Es traten keine schwerwiegenden Zellschäden auf, sondern nur Schäden in einem Ausmaß, so daß sie durch zelluläre Schutzsysteme wie GSH und Antioxidantien noch repariert werden konnten. Einen ersten Hinweis dafür, daß GSH und Lipidperoxidation eine bedeutende Rolle im VPA-Zytotoxizitätsmechanismus spielen, lieferte die Gruppe V10T400. Die mit Hungern bei geringen Konzentrationen der Kombinationspartner nur gering erhöhte Lipidperoxidation und Vitalitätsverschlechterung wird auf eine noch mögliche Kompensation der drohenden Zellschädigung durch die genannten zellulären Schutzsysteme zurückgeführt. Die mit Hungern bei hohen Konzentrationen der Substanzen starke Lipidperoxidation wird als Ursache der Zellschädigung angenommen.

Es kann nicht abschließend geklärt werden, ob bei VPA-Hydroperoxid-Kombination und Hungern die Lipidperoxidation durch VPA, durch die Hydroperoxide oder die kombinierte Aktion aller Faktoren verursacht wurde. Die Beteiligung aller Faktoren wird vermutet, wobei der Verminderung des GSH-Status durch Hungern und der zusätzlich durch VPA und Hydroperoxide bedingten dosis- und zeitabhängigen Verringerung des GSH-Gehaltes eine Schlüsselfunktion im Zytotoxizitätsmechanismus zugewiesen wird. Die Versuche zur GSH-Verarmung mit BrH beim Ernährungszustand Hungern weisen darauf hin, daß die Lipidperoxidation bei Vorliegen von mehreren ungünstigen Faktoren wie Hungern, GSH-Verarmung und hohen VPA-Dosen durch VPA induziert werden könnte. Durch die BrH-Versuche wird vor allem die Bedeutung von Hungern deutlich. Die ermittelten GSH-Werte am Inkubationsende lagen in allen Gruppen mit starker Lipidperoxidation bei 15-30 % des initialen Wertes der Gruppen ohne Hungern und erreichten damit den kritischen Bereich, der zu einer Beeinträch-

tigung der Zellabwehr gegen toxische Wirkungen bis hin zum Zellschaden und Zelltod führt. Eine kritische Rolle des mitochondrialen GSH-Pools wird vermutet.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, daß es bei den höchsten Konzentrationen der untersuchten VPA-CuOOH-Gruppe ohne Hungern lediglich zu einer unbedeutenden Blebbildung in einem noch reversiblen Stadium kam. Es wurde teilweise eine Verminderung der Mikrovilli beobachtet. Die Mitochondrien waren noch nicht verändert. Demgegenüber wurden dosis- und zeitabhängig bei allen Kombinationsbehandlungen mit Hungern und bei stark erhöhter MDA-Bildung ein Verlust der Mikrovilli und eine vermehrte Bildung von großen Blebs ermittelt. Eine starke Schädigung der Mitochondrien, einhergehend mit Schwellung, Matrixveränderungen, Cristolyse und Cristaeverlust, war zu beobachten. Es wurden auch Lipidvakuolen und dilatiertes endoplasmatisches Retikulum festgestellt.

Bei allen Kombinationen war ohne und mit Hungern das Metabolitenmuster nicht grundsätzlich verändert. VPA hemmte ebenso wie bei VPA-Behandlung allein nur bei der höchsten VPA-Menge und mit Hungern die VPA-Metabolitenbildung, wohingegen die Gesamtmetabolitenanteile bei beiden Ernährungszuständen verringert waren. Prooxidantien und Hungern bewirkten bei 1-mM-VPA-Kombinationsbehandlung in Abhängigkeit von der Art der Substanz eine signifikante Hemmung des Metabolismus von VPA. Es war insbesondere in den Gruppen V1T400 und B500V1 mit Hungern und MDA-Erhöhung eine signifikante Hemmung des ω/ω_1 -Metabolismus und des β -Metabolismus in bestimmten Stadien zu beobachten. Eine stärkere Lipidperoxidation ging mit einer Hemmung der β -Oxidation in einer früheren Phase einher. Außerdem wurde der hepatotoxische Metabolit 4-en-VPA in diesen Gruppen ermittelt. Keine eindeutigen Unterschiede im VPA-Metabolismus wurden mit Hungern zwischen den 10-mM-VPA-Kombinationen und 10-mM-VPA-Behandlung allein festgestellt, obwohl nur bei Kombinationsbehandlung starke Lipidperoxidation auftrat. Ebenso wie in der Gruppe V10 waren die ω -Oxidationswege und die β -Oxidation zu 2-en-VPA mit Hungern gehemmt. Der hepatotoxische Metabolit 4-en-VPA bzw. dessen Folgeprodukte wurden in keiner der 10-mM-VPA-Gruppen mit Hungern nachgewiesen. Mehrere Hypothesen für die Beteiligung eines veränderten Metabolismus an der VPA-Hepatotoxizität im Zusammenhang mit den Versuchsbedingungen, ermittelten Parametern und morphologischen Ergebnissen wurden diskutiert. Es wird angenommen, daß an diesem Prozeß freie Radikalmetaboliten oder die Bildung freier Radikale während des VPA-Metabolismus mitwirken, die durch den starken GSH-Verlust nicht mehr in ausreichendem Maße entgiftet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß nur unter dem gleichzeitigen Einfluß mehrerer ungünstiger Faktoren eine VPA-vermittelte Leberzellschädigung beobachtet wurde. Die vorliegende Arbeit unterstützt die Hypothese, daß ein Versagen des Abfangsystems für freie Radikale die Hepatotoxizität verursacht. Eine einfache Aussage, daß die Veränderungen im VPA-Metabolismus die Ursache oder die Auswirkung der Zytotoxizität sind, ist nicht möglich. Ein veränderter VPA-Metabolismus scheint jedoch eine Rolle zu spielen. Dieser kommt aber erst zum Tragen, wenn ungünstige Bedingungen zu einer Verminderung der antioxidativen Kapazität der Leberzellen führen. Entsprechend den Ergebnissen des *in vitro*-Modells ist das Zusammentreffen von Umständen wie Hungern, oxidativer Streß und eine hohe VPA-Dosis entscheidend für das Auftreten dieses fatalen Leberschadens.

7 Summary

Hepatotoxicity of Valproate in Isolated Rat Hepatocytes: Influence of Prooxidative Agents and Starving

The use of VPA in the treatment of epilepsy has, on rare occasions, been associated with irreversible hepatic failure. Several possible biochemical mechanisms responsible for the hepatotoxicity have been proposed, but the actual causes have not been conclusively determined. It is believed that the hepatotoxicity results from an interaction of different factors.

The aim of this study was to examine the impact of additional stress factors on an *in vitro*-model of freshly isolated hepatocytes of rats. The present experiments studied the effects of VPA in combination with starvation and with oxidative stress on hepatotoxicity and the metabolism. Prooxidative agents such as the hydroperoxides CuOOH and t-BuOOH and the GSH-depletor BrH were used. It was especially important to investigate the role of GSH, lipid peroxidation, alterations of VPA metabolism and the ultrastructure of the liver cells.

Hepatocytes were isolated from adult male Wistar rats. The rats received either tap water and food *ad libitum* or the food was withdrawn 20 hours before the beginning of the experiment. In the first series of experiments, the influence of starvation as well as VPA and prooxidative agents alone on viability (Trypan blue test, LDH release, intracellular potassium and sodium concentration) and antioxidant capacity (intracellular GSH concentration, MDA formation) was studied in liver cells. With combinations of VPA and hydroperoxides, the influence of hydroperoxides, VPA and nutritional status on these parameters was examined. In a second series of experiments, the combinations of BrH and VPA were used to investigate the influence of the GSH depletor BrH, VPA and the nutritional status on these parameters. Several concentrations of VPA and the prooxidative compounds were applied to test for dose dependency in both series. For selected groups, VPA and its metabolites were determined with GC/MS and the ultrastructure of the hepatocytes was studied with the electron microscope.

Starvation resulted in a reduction of body and liver weight. There was no influence on viability. The initial GSH content was decreased by 40-50 %. GSH synthesis or regeneration occurred. MDA formation was not increased.

Independent of the nutritional status, there were no alterations of the viability of liver cells caused by prooxidative agents alone. Only with starvation and the highest dose of VPA the treatment with VPA alone resulted in a decline of viability measured by the sensitive parameters potassium and sodium concentration and by the Trypan blue test. Increased MDA formation was never observed. With and without starvation, the hydroperoxides caused no changes in the GSH content of the liver cells. The pretreatment with BrH resulted in a GSH depletion of the liver cells by 60-80 % throughout the incubation period. Only with starvation were the losses of GSH maintained on this level. There was a GSH synthesis or regeneration. VPA led to a dose- and time-dependent reduction of GSH with and without starvation. Higher VPA

doses lowered the capability of GSH synthesis or regeneration. During the whole incubation period starvation resulted in significantly diminished GSH values.

Nether prooxidative agents nor VPA alone caused an major alteration of the hepatocellular ultrastructure. Only a minor bleb formation could be found. With the highest VPA concentration, lipid droplets were occasionally observed. The structure of the mitochondria was unaltered.

Independent of the VPA dose, the same metabolite pattern was found. Generally, the percentage of ω -metabolites was higher than the percentage of β -metabolites. With a high VPA dose the percentage of all metabolites was lower than with a low VPA dose. Starvation did not change the metabolite pattern in principle. But with 1 mM VPA the formation of metabolites was slightly inhibited and only with 10 mM VPA was there a significant inhibition of the formation of ω - and ω_1 -metabolites and of the β -metabolite 2-en-VPA.

The combination of VPA with hydroperoxides or BrH only in conjunction with starvation caused a strong dose- and time-dependent lipid peroxidation with a delayed or simultaneous dose- and time-dependent deterioration of the viability of the liver cells. The GSH content was decreased through VPA and hydroperoxides in a dose- and time-dependent manner independent of the nutritional status. The influence of VPA was more important. Naturally, with the combination of BrH and VPA, the effect of BrH on GSH was stronger. Starvation led to significantly decreased GSH values in all combinations.

The antioxidative capability of the liver cells was sufficient in all non-starvation tested combination groups. The damages in the liver cells were not serious and could be repaired by protective cellular systems like GSH or antioxidative agents. The results of the group V10T400 provide a first indication of the important role of GSH and lipid peroxidation in the mechanism of cytotoxicity of VPA. The only slightly increased lipid peroxidation and the deterioration of viability in the groups with starvation and low concentrations of the combined agents could be the result of the compensation for the threatening cellular damage through the above mentioned protective systems. It is assumed that the strong lipid peroxidation in groups with starvation and high concentrations of the various substances used in the experiments is the reason for cellular damage.

It is impossible to decide whether VPA, hydroperoxides or the combined action of these factors was the cause of lipid peroxidation in experiments with combinations of VPA, hydroperoxides and starvation. It must be supposed that all factors are involved. However, the starvation induced decrease of the GSH level and the additional dose- and time-dependent reduction of the GSH content by VPA and hydroperoxides play the key role in the mechanism of cytotoxicity. It is worth stating that the results of the experiments with the GSH depletor BrH indicate that VPA may induce lipid peroxidation if an unfortunate set of circumstances like starvation, GSH depletion and a high VPA dose occurs. Over and above that, these experiments underline the importance of starvation. In all groups with strong lipid peroxidation, the determined GSH values at the end of the incubation period were between 15-30 % of the initial values of groups without starvation. This implies a critical decrease of the GSH level and a resulting impairment of the cell's defense against toxic actions leading to cell injury and death. The mitochondrial GSH pool is assumed to play a critical role.

The electron microscopic studies showed that the combination of the highest concentrations of VPA and CuOOH without starvation only caused an unimportant bleb formation in a reversible stage. In a few cases there were less microvilli. The mitochondria remained unchanged. On the other hand, with combined treatments and starvation and heavily increased MDA formation, a loss of microvilli and more frequent appearance of large blebs occurred. Severely damaged mitochondria characterized by swelling, matrix alterations, cristolysis and loss of cristae were observed. Lipid vacuoles and dilated endoplasmatic reticulum were also found.

In all the combined groups with and without starvation there were no fundamental alterations of metabolite patterns. In the experiments with varying amounts of VPA with or without the combination of prooxidative agents, only the highest VPA dose in conjunction with starvation caused an inhibition of the formation of VPA metabolites. In contrast to this, with and without starvation, the percentage of all metabolites were reduced. In treatments with 1 mM VPA, prooxidative agents and starvation caused, dependent on the kind of substances, a significant reduction of metabolism of VPA. Especially in the groups V1T400 and B500V1 with starvation and increased MDA formation the ω/ω_1 -metabolism and the β -metabolism in certain stages were inhibited. In these combinations, a stronger lipid peroxidation was accompanied by an inhibition of β -oxidation at an earlier stage. In addition, the hepatotoxic metabolite 4-en-VPA was detected. There were no clear differences in VPA metabolism between 10 mM VPA combination groups and 10 mM VPA treatment alone, although strong lipid peroxidation was determined only in combined groups. As well as in the group V10, the ω -oxidations and the β -oxidation to 2-en-VPA were inhibited with starvation. With 10 mM VPA and starvation the hepatotoxic metabolite 4-en-VPA and the subsequent products could not be detected. Various hypotheses claiming the involvement of an altered metabolism in the hepatotoxicity of VPA were discussed in connection with the chosen conditions and the results of the investigation of the parameters and morphology. It is believed that free radical metabolites or free radicals generated during VPA metabolism contribute to this process, because the lack of GSH prevents their sufficient detoxification.

In conclusion it can be stated that only the simultaneous interaction of a combination of detrimental factors leads to VPA mediated damage of liver cells. This dissertation supports the hypothesis that hepatotoxicity is caused by a failure of the free radical scavenger system. A simple statement as to whether changes in VPA metabolism are the cause or result of cytotoxicity is impossible. These alterations of VPA metabolism seem to play a role but have only an effect after a diminution of the antioxidant capacity through negative circumstances. From the results of this *in vitro* model, it follows that the combination of starvation, oxidative stress and high VPA doses is necessary for fatal liver injury to occur.

8 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, F.S., J. KASSAM, J.M. ORR und K. FARRELL (1986): The Effect of Aspirin on Valproic Acid Metabolism, *Clin. Pharmacol. Ther.* **40**, 94-100.
- ACHEAMPONG, A., und F.S. ABBOTT (1985): Synthesis and Stereochemical Determination of Diunsaturated Valproic Acid Analogs Including Its Major Diunsaturated Metabolite, *J. Lipid. Res.* **26**, 1002-1008.
- ACHEAMPONG, A., F.S. ABBOTT und R. BURTON (1983): Identification of Valproic Acid Metabolites in Human Serum and Urine Using Hexadeuterated Valproic Acid and Gas Chromatographic Mass Spectrometric Analysis, *Biomed. Mass. Spectrom.* **10**, 586-595.
- ALBANO, E., M. RUNDGREN, P.J. HARVISON, S.D. NELSON und P. MOLDÉUS (1985): Mechanisms of N-Acetyl-p-Benzoquinone Imine Cytotoxicity, *Mol. Pharmacol.* **28**, 306-311.
- ALBANO, E., A. TOMASI, J.-O. PERSSON, Y. TERELIUS, L. GORIA-GATTI, M. INGELMAN-SUNDBERG und M.U. DIANZANI (1991): Cytochrome P450 2E1 Mediated Free Radical Activation of Aliphatic Alcohols, *Biochem. Pharmacol.* **41**, 1895-1903.
- ALY, M.I., und A.A. ABDEL-LATIF (1980): Studies on Distribution and Metabolism of Valproate in Rat Brain, Liver, and Kidney, *Neurochem. Res.* **5**, 1231-1242.
- ANARI, M.R., S. KHAN, Z.C. LIU und J. O'BRIEN (1995): Cytochrome P450 Peroxidase/Peroxygenase Mediated Xenobiotic Metabolic Activation and Cytotoxicity in Isolated Hepatocytes, *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 997-1004.
- ANDERS, M.W. (1978): Inhibition and Enhancement of Microsomal Drug Metabolism by Diethylmaleate, *Biochem. Pharmacol.* **27**, 1098-1101.
- ANDERSON, G.D., A.A. ACHEAMPONG und R.H. LEVY (1994): Interaction Between Valproate and Branched-Chain Amino Acid Metabolism, *Neurology* **44**, 742-744.
- ANDRES, J.M., R.W. HURD, H.A. VAN RINSVELT, P.A., SMALL, W. MAENHAUT und J. VANDENHAUTE (1987): PIXE Analysis of Trace Metals in Selenium and Copper Deficient Mice Exposed to Influenza Virus and Salicylate, *Nucl. Instr. Methods Phys. Res.* **B22**, 217-222.
- ANUNDI, I., J. HÖGBERG und A.H. STEAD (1979): Glutathione Depletion in Isolated Hepatocytes: Its Relation to Lipid Peroxidation and Cell Damage, *Acta Pharmacol. Toxicol.* **45**, 45-51.
- APPLETON, R.E. (1995): Treatment of Childhood Epilepsy, *Pharmacol. Ther.* **67**, 419-431.
- ASHLEY, P.L., und B.W. GRIFFIN (1981): Involvement of Radical Species in the Oxidation of Aminopyrine and 4-Aminopyrine by Cumene Hydroperoxide in Rat Liver, *Mol. Pharmacol.* **19**, 146-152.
- BABSON, J.R., N.S. ABELL und D.J. REED (1981): Protective Role of the Glutathione Redox Cycle against Adriamycin-Mediated Toxicity in Isolated Hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.* **30**, 2299-2304.
- BAGANZ, M.D., und P.E. DROSS (1994): Valproic Acid-Induced Hyperammonemic Encephalopathy: MR Appearance, *Amer. J. Neuroradiol.* **15**, 1779-1781.
- BAILLIE, T.A. (1984): Application of Stable Isotopes to Studies on the Formation of Reactive Drug Metabolites, *Proc. Jpn. Soc. Mass. Spectrom.* **9**, 15-29.
- BAILLIE, T.A. (1988): Metabolic Activation of Valproic Acid and Drug-Mediated Hepatotoxicity. Role of the Terminal Olefin, 2-n-Propyl-4-Pentenoic Acid, *Chem. Res. Toxicol.* **1**, 195-199.
- BAILLIE, T.A. (1992): Metabolism of Valproate to Hepatotoxic Intermediates, *Pharm. Weekbl. (Sci. Ed.)* **14**, 122-125.

- BAILLIE, T.A., und R.H. LEVY (1991): Metabolic Fate of Valproic Acid in Humans, In: LEVY, R.H., und J.K. PENRY (1991), 19-24.
- BAILLIE, T.A., und A.W. RETTENMEIER (1989): Valproate: Biotransformation, In: LEVY, R.H., R.H. MATTSON, B.S. MELDRUM und J.K. PENRY (Hrsg.): „Antiepileptic Drugs“, Raven Press, New York, 601-619.
- BALDWIN, G.S., F.S. ABBOTT und H. NAU (1996): Binding of Valproate Metabolite to the Trifunctional Protein of Fatty Acid Oxidation, *FEBS Lett.* **384**, 58-60.
- BALIGA, R., L.E. FLEISCHMANN, C.-H. CHANG, A.P. SARNAIK, A.K. BIDANI und E.L. ARCINUE (1979): Acute Renal Failure in Reye's Syndrome, *Am. J. Dis. Child.* **133**, 1009-1013.
- BATT, A.-M., und L. FERRARI (1995): Manifestations of Chemically Induced Liver Damage, *Clin. Chem.* **41**, 1882-1887.
- BAUR, H., S. KASPEREK und E. PFAFF (1975): Criteria of Viability of Isolated Liver Cells, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 827-838.
- BEATRICE, M.C., D.L. STIERS und D.R. PFEIFFER (1984): The Role of Glutathione in the Retention of Ca²⁺ by Liver Mitochondria, *J. Biol. Chem.* **259**, 1279-1287.
- BECKER, C.-M., und R.A. HARRIS (1983): Influence of Valproic Acid on Hepatic Carbohydrate and Lipid Metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.* **223**, 381-392.
- BEGHI, E., A. BIZZI, A.M. CODEGONI, D. TREVISAN, W. TORRI und Collaborative Group For the Study of Epilepsy (1990): Valproate, Carnitine Metabolism and Biochemical Indicators of Liver Function, *Epilepsia* **31**, 346-352.
- BELLOMO, G., S.A. JEWELL, H. THOR und S. ORRENIUS (1982): Regulation of Intracellular Calcium Compartmentation: Studies With Isolated Hepatocytes and t-Butyl Hydroperoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6842-6846.
- BELLOMO, G., A. MARTINO, P. RICHELMI, G.A. MOORE, S.A. JEWELL und S. ORRENIUS (1984a): Pyridine-Nucleotide Oxidation, Ca²⁺ Cycling and Membrane Damage During tert-Butyl-Hydroperoxide Metabolism by Rat-Liver Mitochondria, *Eur. J. Biochem.* **140**, 1-6.
- BELLOMO, G., und S. ORRENIUS (1985): Altered Thiol and Calcium Homeostasis in Oxidative Hepatocellular Injury, *Hepatology* **5**, 876-882.
- BELLOMO, G., H. THOR und S. ORRENIUS (1984b): Increase in Cytosolic Ca²⁺ Concentration During t-Butyl Hydroperoxide Metabolism by Isolated Hepatocytes Involves NADPH Oxidation and Mobilization of Intracellular Ca²⁺ Stores, *FEBS Lett.* **168**, 38-42.
- BELLRINGER, M.E., K. RAHMAN und R. COLEMAN (1988): Sodium Valproate Inhibits the Movement of Secretory Vesicles in Rat Hepatocytes, *Biochem. J.* **249**, 513-519.
- BENUCK, M., M. BANAY-SCHWARZ, T. DEGUZMAN und A. LAJTHA (1995): Effect of Food Deprivation on Glutathione and Amino Acid Levels in Brain and Liver of Young and Aged Rats, *Brain Res.* **678**, 259-264.
- BERGER, M.L., R.C. REYNOLDS und B. COMBES (1987): Carbon Tetrachloride-Induced Morphologic Alterations in Isolated Rat Hepatocytes, *Exp. Mol. Pathol.* **46**, 245-257.
- BERRY, M.N., A.M. EDWARDS und G.J. BARRITT (1991): Isolated Hepatocytes - Preparation, Properties and Applications, In: BURDON, R.H., und P.H. KNIPPENBERG (Hrsg.): „Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology“, Vol. 21, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- BERRY, M.N., H.J. HALLS und M.B. GRIVELL (1992): Techniques For Pharmacological and Toxicological Studies With Isolated Hepatocyte Suspensions, *Life Sci.* **51**, 1-16.

- BIDLACK, W.R. (1980): Microsomal Peroxidase Activities-Effect of Cumene Hydroperoxide on the Pyridine Nucleotide Reduced Cytochrome b₅ steady state, *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1605-1608.
- BIEBER, L.L., R. EMAUS, K. VALKNER und S. FARRELL (1982): Possible Functions of Short-Chain and Medium-Chain Carnitine Acyltransferases, *Fed. Proc.* **41**, 2858-2862.
- BINDOLI, A., L. CAVALLINI und P. JOCELYN (1982): Mitochondrial Lipid Peroxidation by Cumene Hydroperoxide and Its Prevention by Succinate, *Biochim. Biophys. Acta* **681**, 496-503.
- BINEK, J., A. HANY, B. EGLOFF und M. HEER (1991): Akute tödliche Leberinsuffizienz unter Valproinsäuretherapie, *Schweiz. Med. Wochenschr.* **121**, 228-233.
- BJORGE, S.M., und T. A. BAILLIE (1985): Inhibition of Medium-Chain Fatty Acid β -Oxidation *in vitro* by Valproic Acid and Its Unsaturated Metabolite, 2-n-Propyl-4-Pentenoic Acid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**, 245-252.
- BJORGE, S.M., und T.A. BAILLIE (1991): Studies on the β -Oxidation of Valproic Acid in Rat Liver Mitochondrial Preparations, *Drug Metab. Dispos.* **19**, 823-829.
- BJÖRKHEM, J. (1973): ω -Oxidation of Stearic Acid in the Normal, Starved and Diabetic Rat Liver, *Eur. J. Biochem.* **40**, 415-422.
- BOHAN, T.P., D.S. MILLINGTON, C.R. ROE, A.L. YERGEY und D.J. LIBERATO (1984): Valproylcarnitine: A Novel Metabolite of Valproic Acid, *Ann. Neurol.* **16**, 394.
- BOHAN, T.P., P. ROGERS und C.R. ROE (1992): Valproate and Carnitine, In: CARTER, A.L. (Hrsg.): „Current Concepts in Carnitine Research“, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, 19-26.
- BOHAN, T.P., M.B. TENNISON, A. RETTENMEIER und T.A. BAILLIE (1987): Valproic Acid (VPA) Metabolism in a Boy With Liver Failure, *Pharmacologist* **29**, 179.
- BÖHLES, H., K. RICHTER, K. WAGNER-THIESSEN und H. SCHÄFER (1982): Decreased Serum Carnitine in Valproate-Induced Reye Syndrome, *Eur. J. Paediatr.* **139**, 185-186.
- BOURGEAIS, B.F.D. (1994): Pharmacologic Intervention and Treatment of Childhood Seizure Disorders: Relative Efficacy and Safety of Antiepileptic Drugs, *Epilepsia* **35** (Suppl. 2), S18-S23.
- BOURGEAIS, B., A. BEAUMANOIR, B. BLAJEV, N. DE LA CRUZ, P.A., DESPLAND, M. EGLI, B. GEUDELIN, U. KASPAR, E. KETZ, C. KRONAUER, C. MEYER, G. SCOLLO-LAVIZZARI, C. TOSI, F. VASSELLA und S. ZAGURY (1987): Monotherapy With Valproate in Primary Generalized Epilepsies, *Epilepsia* **28** (Suppl. 2), S8-S11.
- BOWDLE, T.A., I.H. PATEL, R.H. LEVY und A.J. WILENSKY (1980): Valproic Acid Dosage and Plasma Protein Binding in the Uremic Condition, *Clin. Pharmacol. Ther.* **27**, 76-82.
- BOWDLE, T.A., I.H. PATEL, R.H. LEVY und A.J. WILENSKY (1982): The Influence of Free Fatty Acids on Valproic Acid During Fasting in Normal Humans, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **23**, 343-347.
- BRANDEN, C. VAN DEN, I. KERCKAERT und F. ROELS (1984): Peroxisomal β -Oxidation From Endogenous Substrates. Demonstration Through H₂O₂ Production in the Unanaesthetized Mouse, *Biochem. J.* **218**, 697-702.
- BRANDEN, C. VAN DEN, und F. ROELS (1985): Peroxisomal β -Oxidation and Sodium Valproate, *Biochem. Pharmacol.* **34**, 2147-2149.
- BRAY, T.M., und C.G. TAYLOR (1993): Tissue Glutathione, Nutrition, and Oxidative Stress, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **71**, 746-751.
- BRODERSEN, R., N. JØRGENSEN, H. VORUM und N. KRUKOW (1990): Valproate and Palmitate Binding to Human Serum Albumin: A Hypothesis on Obesity, *Mol. Pharmacol.* **37**, 704-709.

- BROKEMEIER, K.M., und D.R. PFEIFFER (1995): Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition by Cyclosporin A During Long Time Frame Experiments: Relationship Between Pore Opening and the Activity of Mitochondrial Phospholipases, *Biochemistry* **34**, 16440-16449.
- BROWN, B.L., J.W. ALLIS, J.E. SIMMONS und D.E. HOUSE (1995): Fasting For Less Than 24 h Induces Cytochrome P450 2E1 and 2B1/2 Activities in Rats, *Toxicol. Lett.* **81**, 39-44.
- BROWN, R.E., und D.T. FORMAN: (1982): The Biochemistry of Rey's Syndrome, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **17**, 247-297.
- BRYANT, A.E., und F.E. DREIFUSS (1996): Valproic Acid Hepatic Fatalities. III. U.S. Experience Since 1986, *Neurology* **46**, 465-469.
- BUCHI, K.N., P.D. GRAY, D.E. ROLLINS und K.G. TOLMAN (1984): Protection Against Sodium Valproate Injury in Isolated Hepatocytes by Alpha-Tocopherol and N,N'-Diphenyl-p-Phenylenediamine, *J. Clin. Pharmacol.* **24**, 148-154.
- BURK, R.F., K.E. HILL, J.A. AWAD, J.D. MORROW und P.R. LYONS (1995): Liver and Kidney Necrosis in Selenium-Deficient Rats Depleted of Glutathione, *Lab. Invest.* **723**, 723-730.
- CADENAS, E., und H. SIES (1982): Low Level Chemiluminescence of Liver Microsomal Fractions Initiated by tert-Butyl Hydroperoxide-Relation to Microsomal Hemoproteins, Oxygen Dependence, and Lipid Peroxidation, *Eur. J. Biochem.* **124**, 349-356.
- CADENAS, E., H. WEFERS und H. SIES (1981): Low-Level Chemiluminescence of Isolated Hepatocytes, *Eur. J. Biochem.* **119**, 531-536.
- CANTONI, O., D. MURRAY und R.E. MEYN (1987): Induction and Repair of DNA Single-Strand Breaks in EM9 Mutant CHO Cells Treated With Hydrogen Peroxide, *Chem. Biol. Interact.* **63**, 29-38.
- CAPARROS-LEFEBVRE, D., M. LECOMTE-HOUCKE, F.R. PRUVOT, N. DECLERCK, J.C. PARIS und H. PETIT (1993): Unusual Electronmicroscopic Changes in Valproate-Associated Liver Failure, *Lancet* (19. Jun.), 1604.
- CAPDEVILA, J., R.W. ESTABROOK und R.A. PROUGH (1980): Differences in the Mechanism of NADPH- and Cumene Hydroperoxide Supported Reactions of Cytochrome P450, *Arch. Biochem. Biophys.* **200**, 186-195.
- CARINI, R., A. COMOGLIO, E. ALBANO und G. POLI (1992): Lipid Peroxidation and Irreversible Damage in the Rat Hepatocyte Model, *Biochem. Pharmacol.* **43**, 2111-2115.
- CASINI, A.F., A. POMPELLA und M. COMPORTI (1985): Liver Glutathione Depletion Induced by Bromobenzene, Iodobenzene, and Diethylmaleate Poisoning and Its Relation to Lipid Peroxidation and Necrosis, *Amer. J. Pathol.* **118**, 225-237.
- CHADWICK, D. (1994): Valproate in the Treatment of Partial Epilepsies, *Epilepsia* **35** (Suppl. 5), S96-S98.
- CHALMERS, R.A., A.M. LAWSON, A. WHITELAW und P. PURKISS (1980): Two Siblings With a Reye's-Like Syndrome Associated With an Abnormal Organic Aciduria, Hyperglycaemia, Diarrhoe, and Vomiting With Close Similarities to Jamaican Sickness, *Pediatr. Res.* **14**, 1097-1103.
- CHANCE, B., A. BOVERIS, Y. NAKASE und H. SIES (1978): Hydroperoxide Metabolism: An Overview, In: SIES, H., und A. WENDEL (Hrsg.): „Function of Glutathione in Liver and Kidney“, Springer-Verlag, Berlin, 95-106.
- CHAPMAN, A., P.E. KEANE, B.S. MELDRUM, J. SIMIAND und J.C. VERNIERES (1982): Mechanism of Anticonvulsant Action of Valproate, *Prog. Neurobiol.* **19**, 315-359.
- CHAVES-CARBALLO, E., A.H. MENEZES, W.E. BELL und E.M. HENRIQUEZ (1979): Acute Pancreatitis as a Fatal Complication in Reye's Syndrome, *Pediatr. Res.* **13**, 523.

- CHEN, C., P.W. SLATTUM, K.L.R. BROUWER und G.M. POLLACK (1996): Influence of Age and Gender on Valproic Glucuronidation in Rats, *Drug Metab. Dispos.* **24**, 367-370.
- CHENERY, R., M. GEORGE und G. KRISHNA (1981): The Effect of Ionophore A23187 and Calcium on Carbon Tetrachloride-Induced Toxicity in Cultured Rat Hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **60**, 241-252.
- CHO, E.S., N. JOHNSON und B.C.F. SNIDER (1981): Tissue Glutathione As a Cyst(e)ine Reservoir During Cystine Depletion in Growing Rats, *J. Nutr.* **114**, 1853-1862.
- CLOYD, J.C., J.H. FISCHER, R.L. KRIEL und D.M. KRAUS (1993): Valproic Acid Pharmacokinetics in Children. IV. Effects of Age and Antiepileptic Drugs on Protein Binding and Intrinsic Clearance, *Clin. Pharmacol. Ther.* **53**, 22-30.
- COLEMAN, J.B., D. GILFOR und J.L. FARBER (1989): Dissociation of the Accumulation of Single-Strand Breaks in DNA From the Killing of Cultured Hepatocytes by an Oxidative Stress, *Mol. Pharmacol.* **36**, 193-200.
- COTARIU, D., S. EVANS, E. LAHAT, S. PELLER, T. BISTRITZER und J.L. ZAIDMAN (1994): Glutathione and Glutathione-Dependent Enzymes in Epileptic Children Treated With Anticonvulsant Drugs, *Med. Sci. Res.* **22**, 765-767.
- COTARIU, D., S. EVANS, E. LAHAT, J. THEITLER, T. BISTRITZER und J.L. ZAIDMAN (1992): Inhibition of Human Red Blood Cell Glutathione Reductase by Valproic Acid, *Biochem. Pharmacol.* **43**, 425-429.
- COTARIU, D., S. EVANS und J.L. ZAIDMAN (1985): Effect of Sodium Valproate on Subcellular Fraction Enzymes in Rat Liver, *Enzyme* **34**, 196-200.
- COTARIU, D., S. EVANS, J.L. ZAIDMAN und O. MARCUS (1990): Early Changes in Hepatic Redox Homeostasis Following Treatment With a Single Dose of Valproic Acid, *Biochem. Pharmacol.* **40**, 589-593.
- COTARIU, D., R. REIF, J.L. ZAIDMAN und S. EVANS (1987): Biochemical and Morphological Changes Induced by Sodium Valproate in Rat Liver, *Pharmacol. Toxicol.* **60**, 325-336.
- COTARIU, D., und J.L. ZAIDMAN (1988): Valproic Acid and the Liver, *Clin. Chem.* **34**, 890-897.
- COUDÉ, F.X., G. GRIMBER, P. PARVY, D. RABIER und F. PETIT (1983a): Inhibition of Ureagenesis by Valproate in Rat Hepatocytes, Role of N-Acetylglutamate and Acetyl-CoA, *Biochem. J.* **216**, 233-236.
- COUDÉ, F.X., G. GRIMBER, A. PELET und Y. BENOIT (1983b): Action of the Antiepileptic Drug, Valproic Acid, on Fatty Acid Oxidation in Isolated Rat Hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 730-736.
- COUDÉ, F.X., D. RABIER, L. CATHELINEAU, G. GRIMBER, P. PARVY und P.P. KAMOUN (1981): A Mechanism For Valproate-Induced Hyperammonemia, *Pediatr. Res.* **15**, 974-975.
- COULTER, D.L., und R.J. ALLEN (1981): Hyperammonemia With Valproic Acid Therapy, Brief Clinical and Laboratory Observations, *J. Pediatr.* **99**, 317-319.
- CRAMER, J.A., R.H. MATTSON, D.M. BENNETT und C.T. SWICK (1986): Variable Free and Total Valproic Acid Concentrations in Sole- and Multi-Drug- Therapy, *Ther. Drug Monit.* **8**, 411-415.
- DARGEL, R. (1992): Lipid Peroxidation - A Common Pathogenic Mechanism?, *Exp. Toxicol. Pathol.* **44**, 169-181.
- DAVIS, R., D.H. PETERS und D. MCTAVISH (1994): Valproic Acid. A Reappraisal of Its Pharmacological Properties and Clinical Efficacy in Epilepsy, *Drugs* **47**, 332-372.
- DICKINSON, R.G., M.L. BASSETT, J. SEARLE, J.H. TYRER und M.J. EADIE (1985): Valproate Hepatotoxicity: A Review and Report of Two Instances in Adults, *Clin. Exp. Neurol.* **21**, 79-91.

- DICKINSON, R.G., R.C. HARLAND, A.M. ILIAS, R.M. RODGERS, S.N. KAUFMAN, R.K. LYNN and N. GERBER (1979): Disposition of Valproic Acid in the Rat: Dose-Dependent Metabolism, Distribution, Enterohepatic Recirculation and Choleric Effect, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **21**, 583-595.
- DICKINSON, R.G., W.D. HOOPER, P.R. DUNSTAN and M.J. EADIE (1989): Urinary Excretion of Valproate and Some Metabolites in Chronically Treated Patients, *Ther. Drug Monit.* **11**, 127-133.
- DODSON, W.E., and V. TASCH (1981): Pharmacology of Valproic Acid in Children With Severe Epilepsy: Clearance and Hepatotoxicity, *Neurology* **31**, 1047-1050.
- DRAYE, J.P., and J. VAMECQ (1987): The Inhibition by Valproic Acid of the Mitochondrial Oxidation of Monocarboxylic and ω -Hydroxymonocarboxylic Acids: Possible Implications For the Metabolism of Gamma-Aminobutyric Acid, *J. Biochem.* **102**, 235-242.
- DREIFUSS, F.E. (1987): Fatal Liver Failure in Children on Valproate, *Lancet* (3. Jan.), 47-48.
- DREIFUSS, F.E. (1991): Hepatic Toxicity of Valproate, In: LEVY, R.H., and J.K. PENRY (1991), 9-12.
- DREIFUSS, F.E., and D.H. LANGER (1988): Side Effects of Valproate, *Am. J. Med.* **84**, 34-41.
- DREIFUSS, F.E., N. SANTILLI, D.H. LANGER, K.P. SWEENEY, K.A. MOLINE and K.B. MENANDER (1987): Valproic Acid Hepatic Fatalities: A Retrospective Review, *Neurology* **37**, 379-385.
- EADIE, M.J., W.D. HOOPER and R.G. DICKINSON (1988): Valproate-Associated Hepatotoxicity and Its Biochemical Mechanisms, *Medical Toxicology* **3**, 85-106.
- EADIE, M. J., G. E. MCKINNON, P. R. DUNSTAN, D. MACLAUGHLIN and R.G. DICKINSON (1990): Valproate Metabolism During Hepatotoxicity Associated With the Drug, *Q. J. Med.* **77**, 1229-1240.
- EADIE, M.J., and J.H. TYRER (1980): Anticonvulsant Therapy, 2. ed., Churchill Livingstone, Edinburgh.
- EKLÖW, L., P. MOLDEÚS and S. ORRENIUS (1984): Oxidation of Glutathione During Hydroperoxide Metabolism - A Study Using Isolated Hepatocytes and the Glutathione Reductase Inhibitor 1,3-Bis(Chloroethyl)-1-Nitrosourea, *Eur. J. Biochem.* **138**, 459-463.
- ELLIN, A., and S. ORRENIUS (1975): Hydroperoxide-Supported Cytochrome P450-Linked Fatty Acid Hydroxylation in Liver Microsomes, *FEBS Lett.* **50**, 378-381.
- EYMARD, P., J. SIMIAND, R. TEOULLE, M. POLVERELLI, J.P. WERBENEC and M. BROLL (1971): Etude de la Repartition et de la Resorption du Dipropylacetate de Sodium Marque au ^{14}C Chez le Rat, *J. Pharmacol.* **2**, 359-368.
- FABRE, G., C. BRIOT, E. MARTI, J.-P. MONTSENY, M. BOURRIE, D. MASSE, Y. BERGER and J.-P. CANO (1992): 2-Valproate Biotransformation Using Human Liver Microsomal Fractions, *Pharm. Weekbl. (Sci. Ed.)* **14**, 146-151.
- FARISS, M.W., and D.J. REED (1985): Mechanism of Chemical-Induced Toxicity. II. Role of Extracellular Calcium, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **79**, 296-306.
- FARRELL, K., and F.S. ABBOTT (1991): Role of N-Acetylcysteine in the Treatment of Valproate Hepatotoxicity, In: LEVY, R.H., and J.K. PENRY (1991), 149-153.
- FARRELL, K., F.S. ABBOTT, A.K. JUNKER, J.S. WADDELL and C.E. PIPPENGER (1989): Successful Treatment of Valproate Hepatotoxicity With N-Acetylcysteine, *Epilepsia* **30**, 700.
- FELIG, P. (1979): Starvation, *Endocrinology* **3**, 1927-1940.
- FERNANDES, E.R., F.D. CARVALHO, F.G. REMIAO, M. LOURDES BASTOS, M.M. PINTO and O. GOTTLIEB (1995): Hepatoprotective Activity of Xanthenes and Xanthonolignoids Against *tert*-Butylhydroperoxide-Induced Toxicity in Isolated Rat Hepatocytes Comparison With Silybin, *Pharm. Res.* **12**, 1756-1760.

- FEUERSTEIN, T.J., und I. JURNA (1996): „Antikonvulsiva, Konvulsiva“, In: FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL und K. STARKE (Hrsg.), „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 263-273.
- FISHER, E., H. SIEMES, R. PUND, W. WITTFOHT und H. NAU (1992a): Valproate Metabolites in Serum and Urine During Antiepileptic Therapy in Children With Infantile Spasms: Abnormal Metabolite Pattern Associated With Reversible Hepatotoxicity, *Epilepsia* **33**, 165-171.
- FISHER, E., W. WITTFOHT und H. NAU (1992b): Quantitative Determination of Valproic Acid and 14 Metabolites in Serum and Urine by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* **6**, 24-29.
- FISHER, J.E., H. NAU und W. LÖSCHER (1991): Alterations in Renal Excretion of Valproate and Its Metabolites After Chronic Treatment, *Epilepsia* **32**, 146-150.
- FISHER, R.L., J.T. SANUIK, H. NAU, A.J. GANDOLFI und K. BRENDEL (1994): Comparative Toxicity of Valproic Acid and Its Metabolites in Liver Slices From Adult Rats, Weanling Rats and Humans, *Toxicol. in vitro* **8**, 371-379.
- FRENCH, T.J., A.W. GOODE, P.S. SCHOFIELD und M.C. SUGDEN (1986): Effects of Surgical Stress on the Response of Hepatic Carnitine Metabolism to 48 h Starvation in the Rat, *Biochim. Biophys. Acta* **883**, 396-399.
- FROMENTY, B., und D. PESSAYRE (1995): Inhibition of Mitochondrial Beta-Oxidation as a Mechanism of Hepatotoxicity, *Pharmac. Ther.* **67**, 101-154.
- FUJIMURA, H., N. KAWASAKI, T. TANIMOTO, H. SASAKI und T. SUZUKI (1995): Effect of Acetaminophen on the Ultrastructure of Isolated Rat Hepatocytes, *Exp. Toxicol. Pathol.* **47**, 345-351.
- GASBARRINI, A., D.H. VAN THIEL, H. FARHALI, P. CARACENI, F. TREVISANI, G.F. STEFANINI, AL. GASBARRINI, M. BERNARDI und G. GASBARRINI (1992): Effect of Alcohol Administration on ATP, Cell Energy Potential, Oxygen Free Radical Formation and Cell Injury in Rat Hepatocytes, *Free. Rad. Res. Comm.* (Suppl. 1), **16**, 4.22.
- GAZZOTTI, P., und S.W. PETERSON (1977): Lipid Requirement of Membrane-Bound Enzymes, *J. Bioenerg. Biomembr.* **9**, 373-386.
- GERBER, N., R.G. DICKINSON, R.C. HARLAND, R.K. LYNN, D. HOUGHTON, J.I. ANTONIAS und J.C. SCHIM-SCHOCK (1979): Reye-Like Syndrome Associated With Valproic Acid Therapy, *J. Pediatr.* **95**, 142-144.
- GLASGOW, A.M., G. ENG und A.G. ENGEL (1980): Systemic Carnitin Deficiency Simulating Recurrent Reye Syndrome, *J. Pediatr.* **96**, 889-891.
- GOFFLOT, F., B. NIHOUL, G.VAN MAELE-FABRY, F. GOETHALS und J.J. PICARD (1994): Developmental Toxicity of Valproic Acid Assessed in a Sequential Culture of Hepatocytes and Embryos, *Toxicol. in vitro* **8**, 181-189.
- GOGVADZE, V., G.E.N. KASS, C.S. BOYER, A. ZHUKOVA, Y. KIM und S. ORRENIUS (1992): Butylated Hydroxytoluene Prevents Cumene Hydroperoxide-Induced Ca²⁺ Release From Liver Mitochondria by Inhibiting Pyridine Nucleotide Hydrolysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 698-704.
- GOGVADZE, V.G., und A.A. ZHUKOVA (1991): The Role of Lipid Peroxidation Products in Cumene Hydroperoxide-Induced Ca²⁺-Efflux From Mitochondria, *FEBS Lett.* **287**, 139-141.
- GOMPERTZ, D., P. TIPPETT, K. BARTLETT und T.A. BAILLIE (1977): Identification of Urinary Metabolites of Sodium Dipropylacetate in Man; Potential Sources of Interference in Organic Acid and Screening Procedures, *Clin. Chim. Acta* **74**, 153-160.
- GORES, G.J., B. HERMAN und J.J. LEMASTERS (1990): Plasma Membrane Bleb Formation and Rupture: A Common Feature of Hepatocellular Injury, *Hepatology* **11**, 690-698.

- GORNALL, A.G., C.J. BARDAWILL und M.M. DAVID (1949): Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction, *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.
- GRAF, R., R. GOSSRAU, H.-J. MERKER, R. SCHWABE, R. STAHLMANN und H. NAU (1985): Enzyme Cytochemistry Combined With Electron Microscopy, Pharmacokinetics, and Clinical Chemistry For the Evaluation of the Effects of steady-state Valproic Acid Concentrations on the Mouse, *Histochemistry* **83**, 347-358.
- GRAM, L., und K.D. BENTSEN (1985): Valproate: An Updated Review, *Acta Neurol. Scand.* **72**, 129-139.
- GRANNEMAN, G.R., S.I. WANG, W. KESTERSON und J.M. MACHINIST (1984a): The Hepatotoxicity of Valproic Acid and Its Metabolites in Rats. II. Intermediary and Valproic Acid Metabolism, *Hepatology* **4**, 1153-1158.
- GRANNEMAN, G.R., S.I. WANG, J.M. MACHINIST und J.W. KESTERSON (1984b): Aspects of the Metabolism of Valproic Acid, *Xenobiotica* **14**, 375-387.
- GRANNEMAN, G.R., S.I. WANG, J.M. MACHINIST und J.W. KESTERSON (1991): Utility of Metabolic Profiles in Assessing Valproate-Associated Hepatotoxicity, In: LEVY, R.H., und J.K. PENRY (1991), 59-64.
- GRAUPNER, W., S. WANG und W. BOTTJE (1993): Effect of 1-Bromoheptane (BH) on Hepatic Blood Flow (HBF), Glutathione (GSH) and Prostacyclin (PGI₂) in Female Rats, *Drug and Chemical Injury* **7**, A572.
- GRIFFITH, O.W. (1981): Depletion of Glutathione by Inhibition of Biosynthesis, *Methods Enzymol.* **77**, 59-64.
- GRIFFITH, O.W., und A. MEISTER (1979): Glutathione: Interorgan Translocation, Turnover and Metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5606-5610.
- GRIFFITH, O., und A. MEISTER (1985): Origin and Turnover of Mitochondrial Glutathione, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4668-4672.
- GUGLER, R., A. SCHELL, M. EICHELBAUM, W. FROSCHE und H.V. SCHULZ (1977): Disposition of Valproic Acid in Man, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **12**, 125-132.
- GUGLER, R., und G.E. VON UNRUH (1980): Clinical Pharmacokinetics of Valproic Acid, *Clin. Pharmacokinet.* **5**, 67-83.
- GUTTERIDGE, J.M.C. (1995): Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage, *Clin. Chem.* **41**, 1819-1828.
- HAAS, R., D.A. STUMPF, J.K. PARKS und L. EGUREN (1981): Inhibitory Effects of Sodium Valproate on Oxidative Phosphorylation, *Neurology* **31**, 1473-1476.
- HALL, K., N. OTTEN, B. JOHNSTON, J. IRVINE-MEEK, M. LEROUX, D. BUDNICK et al. (1985): A Multivariable Analysis of Factors Governing steady-state Pharmacokinetics of Valproic Acid in 52 Young Epileptics, *J. Clin. Pharmacol.* **25**, 261-268.
- HALLIWELL, B. (1987): Oxidants and Human Disease: Some New Concepts, *FASEB J.* **1**, 358-364.
- HALLIWELL, B. (1988): Oxygen Radicals und Tissue Injury, Proceedings of Brook Lodge Symposium, Augusta, Georgia, April 1987, The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan.
- HALLIWELL, B., und J.M.C. GUTTERIDGE (1989): Free Radicals in Biology and Medicine, 2. ed., Clarendon Press, Oxford.
- HARPEY, J.-P., C. CHARPENTIER und M. PATURNEAU-JOUAS (1990): Sudden Infant Death Syndrome and Inherited Disorders of Fatty Acid β -Oxidation, *Biol. Neonate* **58** (Suppl. 1), 70-80.
- HARRIS, C., K.L. STARK und M.R. JUCHAU (1988): Glutathione Status and the Incidence of Neural Tube Defects Elicited by Direct Acting Teratogens *in vitro*, *Teratology* **37**, 577-590.

- HAYASAKA, K., I. TAKAHASHI, Y. KOBAYASHI, K. IINUMA, K. NARISAWA und K. TADA (1986): Effects of Valproate on Biogenesis and Function of Liver Mitochondria, *Neurology* **36**, 351-356.
- HAZELTON, G.A., J.J. HJELLE und C.D. KLAASSEN (1986): Effects of Cysteine Pro-Drugs on Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **237**, 341-349.
- HEINEMEYER, G., H. NAU, I. ROOTS und A.G. HILDEBRANDT (1983): Specific Effect of Inducers of Microsomal and Peroxisomal Activity on the Metabolism of Valproic Acid in Male Rats, *Arch. Pharmac. Suppl.* **324**, R71.
- HINO, Y., S. ISHIO und S. MINAKAMI (1987): Glukose-6-Phosphatase Oxidation Pathway in Rat Liver Microsomal Vesicles, Stimulation under Oxidative Stress, *Eur. J. Biochem.* **165**, 195-199.
- HJELM, M., L.V.K. DE SILVA, J.W.T. SEAKINS und V.G. OBERHOLZER (1986): Evidence of Inherited Urea Cycle Defect in a Case of Fatal Valproate Toxicity, *Br. Med. J.* **292**, 23-24.
- HJELM, M., V.G. OBERHOLZER, J.W.T. SEAKINS, S. THOMAS und J.D.S. KAY (1987): Valproate Inhibition of Urea Synthesis, *Lancet* (18. Apr.), 923.
- HÖGBERG, J., und A. KRISTOFERSON (1977): A Correlation Between Glutathione Levels and Cellular Damage in Isolated Hepatocytes, *Eur. J. Biochem.* **74**, 77-82.
- HOLLAND, P.C., A.E. SENIOR und H.S.A. SHERRAT (1973): Biochemical Effects of the Hypoglycaemic Compound 4-Pentenoic Acid and Related Non-Hypoglycaemic Fatty Acids. Effects of Their CoA Esters on Enzymes of Fatty Acid Oxidation, *Biochem. J.* **136**, 173-184.
- HORTON, H.R., L.A. MORAN, R.S. OCHS, J.D. RAWN und K.G. SCRIMGEOUR (1993): Principles of Biochemistry, Neil Patterson Publishers, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- HRYCAY, E.G., J.A. GUSTAFSSON, M. INGELMAN-SUNDBERG und L. ERNSTER (1976): The Involvement of Cytochrome P450 in Hepatic Microsomal Steroid Hydroxylation Reactions Supported by Sodium Periodate, Sodium Chlorite, and Organic Hydroperoxide, *Eur. J. Biochem.* **61**, 43-52.
- HU, Y., M. INGELMAN-SUNDBERG und K.O. LINDROS (1995): Induction Mechanisms of Cytochrome P450 2E1 in Liver: Interplay Between Ethanol Treatment and Starvation, *Biochem. Pharmacol.* **50**, 155-161.
- HUG, G., C.A. MCGRAW, S.R. BATES und E.A. LANDRIGAN (1991): Reduction of Serum Carnitine Concentrations During Anticonvulsant Therapy With Phenobarbital, Valproic Acid, Phenytoin, and Carbamazepine in Children, *J. Pediatr.* **119**, 799-802.
- HURD, R.W., R.J. PERCHALSKI, B.J. WILDER, L.R. MCDOWELL und N.S. WILKINSON (1991): Enhanced Hepatotoxicity of Valproate in the Selenium-Deficient Rat, *Epilepsia* **32** (Suppl. 3), 9.
- HURD, R.W., H.A. VAN RINSVELT, B.J. WILDER, B. KARAS, W. MAENHAUT und L. DE REU (1984): Selenium, Zinc, and Copper Changes With Valproic Acid: Possible Relation to Drug Side Effects, *Neurology* **34**, 1393-1395.
- HURD, R.W., B.J. WILDER, J.J. STREET und B.L. SCISCENT (1981): Zinc Binding by Valproic Acid, *Soc. Neurosci. Abstr.* **7**, 813.
- HYSLOP, P.A., D.B. HINSHAW, I.U. SCHRAUFSTÄTTER, L.A. SKLAR, R.G. SPRAGG und C.G. COCHRANE (1986): Intracellular Calcium Homeostasis During Hydrogen Peroxide Injury to Cultured P388 D¹ Cells, *J. Cell. Physiol.* **129**, 356-366.
- IMBERTI, R., A.-L. NIEMINEN, B. HERMAN und J.J. LEMASTERS (1993): Mitochondrial and Glycolytic Dysfunction in Lethal Injury to Hepatocytes by *t*-Butylhydroperoxide: Protection by Fructose, Cyclosporin A and Trifluoperazine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**, 392-400.

- INGELMAN-SUNDBERG, M., I. JOHANSSON, G. EKSTRÖM, T. CHRONHOLM, C. NORSTEN, E. ELIASSON, Y. TERELIUS, N. TINDBERG, M.J.J. RONIS, J.A. HANDLER, R.G. THURMAN, A. JOHANSSON und A.-L. HAGBJÖRK (1989): Ethanol-Inducible Cytochrome P450 in Alcohol Mediated Toxicity, Proceedings of the 2nd International Meeting on Free Radicals and Liver Injury, Torino, Italy.
- INGELMAN-SUNDBERG, M., I. JOHANSSON, K.E. PENTTILÄ, H. GLAUMANN und K.O. LINDROS (1988): Centri-lobular Expression of Ethanol-Inducible Cytochrome P450 (IIE1) in Rat Liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 55-60.
- ISHIKURA, H., N. MATSUO, M. MATSUBARA, T. ISHIHARA, N. TAKEYAMA und T. TANAKA (1996): Valproic Overdose and L-Carnitine Therapy, *J. Anal. Toxicol.* **20**, 55-58.
- ITO, M., Y. IKEDA, J.G. ARNEZ, G. FINOCCHIARO und K. TANAKA (1990): The Enzymatic Basis For the Metabolism and Inhibitory Effects of Valproic Acid: Dehydrogenation of Valproyl-CoA by 2-Methyl-Branched-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta* **1034**, 213-218.
- JAEGER, R.J., R.B. CONOLLY und S.D. MURPHY (1974): Effect of 18 h Fast and Glutathione Depletion on 1,1-Dichloroethylene-Induced Hepatotoxicity and Lethality in Rats, *Exp. Mol. Pathol.* **20**, 187-198.
- JAESCHKE, H., und A. WENDEL (1985): Diurnal Fluctuation and Pharmacological Alteration of Mouse Organ Glutathione Content, *Biochem. Pharmacol.* **34**, 1029-1033.
- JAKOBS, C., und W. LÖSCHER (1978): Identification of Metabolites of Valproic Acid in Serum of Humans, Dog, Rat and Mouse, *Epilepsia* **19**, 591-602.
- JEAVONS, P.M. (1981): Monotherapy With Sodium Valproate, In: DAM, M., B. GRAM, B. PEDERSEN und H. ORUM (Hrsg.): „Valproate in the Treatment of Seizures“, Danish Epilepsy Society, Hvidovre Hospital, Hvidovre, 43-50.
- JEAVONS, P.M. (1984): Non-Dose-Related Side Effects of Valproate, *Epilepsia* **25** (Suppl. 1), S50-S55.
- JEVTOVIĆ-TODOROVIĆ, V., und T.M. GUENTHNER (1992): Depletion of a Discrete Nuclear Glutathione Pool by Oxidative Stress, But Not by Buthionine Sulfoximine, *Biochem. Pharmacol.* **44**, 1383-1393.
- JEWELL, S.A., G. BELLOMO, H. THOR und S. ORRENIUS (1982): Bleb Formation in Hepatocytes During Drug Metabolism Is Caused by Disturbances in Thiol and Calcium Ion Homeostasis, *Science* **217**, 1257-1259.
- JEZEQUEL, A.M., P. BONAZZI, G. NOVELLI, C. VENTURINI und F. ORLANDI (1984): Early Structural and Functional Changes in Liver of Rats Treated With a Single Dose of Valproic Acid, *Hepatology* **4**, 1159-1166.
- JIMENEZ-RODRIGUEZVILA, M., A. CARO-PATÓN, A. DUENAS-LAITA, M. CONDE, M.C. COCA, J.L. MARTIN-LORENTE, A. VELASCO und A. MARANON (1985): Histological, Ultrastructural and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Studies in Liver of Rats Chronically Treated With Oral Valproic Acid, *J. Hepatol.* **1**, 453-465.
- JOCELYN, P.C., und J. DICKSON (1980): Glutathione and the Mitochondrial Reduction of Hydroperoxides, *Biochim. Biophys. Acta* **590**, 1-12.
- JOCHMANN, C. (1996): Zur Pathobiochemie freier Radikale in isolierten Hepatozyten: Auswirkung von Trichlorbrommethan auf Thiolhomöostase, Purin(nukleotid)e, Tetrazoliumreduktion und Neutralrotaufnahme, unveröffentlichte Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.
- JOHANSSON, I., K.O. LINDROS, H. ERIKSSON und M. INGELMAN-SUNDBERG (1990): Transcriptional Control of Cyp2E1 in the Perivenous Liver Region and During Starvation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 331-338.
- JONES, D.P., V.E. KAGAN, S.D. AUST, D.J. REED und S.T. OMAYE (1995): Impact of Nutrients on Cellular Lipid Peroxidation and Antioxidant Defense System, *Fundam. Appl. Toxicol.* **26**, 1-7.

- JONES, D.P., H. THOR, M.T. SMITH, S.A. JEWELL und S. ORRENIUS (1983): Inhibition of ATP-Dependent Microsomal Ca^{2+} -Sequestration During Oxidative Stress and Its Prevention by Glutathione, *J. Biol. Chem.* **258**, 6390-6393.
- JURIMA-ROMET, M., F.S. ABBOTT, W. TANG, H.S. HUANG und L.W. WHITEHOUSE (1996): Cytotoxicity of Unsaturated Metabolites of Valproic Acid and Protection by Vitamins C and E in Glutathione-Depleted Rat Hepatocytes, *Toxicology* **112**, 69-85.
- KAKÁ•, B., und Z.J. VEJD•LEK (1974): Reaktion von Thiolen mit 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure), In: KAKÁ•, B., und Z.J. VEJD•LEK (Hrsg.): „Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen“, Verlag Chemie, Weinheim, 186-187.
- KAKKAR, P., S. MEHROTRA und P.N. VISWANATHAN (1992): Interrelation of Active Oxygen Species, Membrane Damage and Altered Calcium Functions, *Mol. Cell. Biochem.* **111**, 11-15.
- KAKKAR, P., S. MEHROTRA und P.N. VISWANATHAN (1996): *t*-BHP Induced *in vitro* Swelling of Rat Liver Mitochondria, *Mol. Cell. Biochem.* **154**, 39-45.
- KAPLOWITZ, N., T.Y. AW, F.R. SIMON und A. STOLZ (1986): Drug-Induced Hepatotoxicity, *Ann. Intern. Med.* **104**, 826-839.
- KASS, G.E.N., M.J. JUEDES und S. ORRENIUS (1992): Cyclosporin A Protects Hepatocytes Against Prooxidant-Induced Cell Killing, A Study on the Role of Mitochondrial Ca^{2+} Cycling in Cytotoxicity, *Biochem. Pharmacol.* **44**, 1995-2003.
- KASSAHUN, K., und F. ABBOTT (1993): *In vivo* Formation of the Thiol Conjugates of the Reactive Metabolites of 4-ene VPA and Its Analog 4-Pentenoic Acid, *Drug Metab. Dispos.* **21**, 1098-1106.
- KASSAHUN, K und T.A. BAILLIE (1993): Cytochrome P450-Mediated Dehydrogenation of 2-n-Propyl-2(E)-Pentenoic Acid, a Pharmacologically Active Metabolite of Valproic Acid, in Rat Liver Microsomal Preparations, *Drug Metab. Dispos.* **21**, 242-248.
- KASSAHUN, K., K. FARRELL und F. ABBOTT (1991): Identification and Characterisation of the Glutathione and N-Acetylcysteine Conjugates of (E)-2-Propyl-2,4-Pentadienoic Acid, A Toxic Metabolite of Valproic Acid, in Rats and Humans, *Drug Metab. Dispos.* **19**, 525-535.
- KASSAHUN, K., K. FARREL, J. ZHENG und F.S. ABBOTT (1990): Metabolic Profiling of Valproic Acid in Patients Using Negative-Ion-Chemical Ionization Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr.* **527**, 327-341.
- KASSAHUN, K., P. HU, M.P. GRILLO, M.R. DAVIS, L. JIN und T.A. BAILLIE (1994): Metabolic Activation of Unsaturated Derivatives of Valproic Acid. Identification of Novel Glutathione Adducts Formed Through Coenzyme A-Dependent and -Independent Processes, *Chem. Biol. Interact.* **90**, 253-275.
- KAY, J.D.S., D. HILTON-JONES und N. HYMAN (1986): Valproate Toxicity and Ornithine Carbamoyl Transferase Deficiency, *Lancet* (29. Nov.), 1283-1284.
- KEENE, D.L., P. HUMPHREYS, B. CARPENTER und J.P. FLETCHER (1982): Valproic Acid Producing a Reye-Like Syndrome, *Can. J. Neurol. Sci.* **9**, 435-437.
- KEHRER, J.P. (1993): Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease, *Crit. Rev. Toxicol.* **23**, 21-48.
- KELLER, B.J., H. YAMANAKA und R.G. THURMAN (1992): Inhibition of Mitochondrial Respiration and Oxygen-Dependent Hepatotoxicity by Six Structurally Dissimilar Peroxisomal Proliferating Agents, *Toxicology* **71**, 49-61.
- KENDLER, B.S. (1986): Carnitine: An Overview of Its Role in Preventive Medicine, *Prev. Med.* **15**, 373-390.
- KENNEDY, C.H., J.M. DYER, D.F. CHURCH, G.W. WINSTON und W.A. PRYOR (1989): Radical Production in Liver Mitochondria by Peroxidic Tumor Promoters, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**, 1067-1072.

- KENNEDY, C.H., W.A. PRYOR, G.W. WINSTON und D.F. CHURCH (1986): Hydroperoxide-Induced Radical Production in Liver Mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 1123-1129.
- KESTERSON, J.W., G.R. GRANNEMAN und J.M. MACHINIST (1984): The Hepatotoxicity of Valproic Acid and Its Metabolites in Rats. I. Toxicologic, Biochemical and Histopathologic Studies, *Hepatology* **4**, 1143-1152.
- KETTERER, B. und G.J. MULDER (1990): Glutathione Conjugation, In: MULDER, G.J. (Hrsg.): „Conjugation Reaction in Drug Metabolism. An Integrated Approach“, Taylor and Francis, London, 307-364.
- KEULEN, F.R., und W. KOCHEN (1985): Hepatotoxizität unter Valproinsäurebehandlung, *Klin. Pädiatr.* **197**, 431-436.
- KHAN, S., und P.J. O'BRIEN (1991): 1-Bromoalkanes as New Potent Nontoxic Glutathione Depletors in Isolated Rat Hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 436-441.
- KHAN, M.F., Y. OHNO und A. TAKANAKA (1992): Effect of Tetrakis- μ -3,5-Diisopropylsalicylatodiaquodocopper (II) on the Status of Reduced Glutathione in Freshly Isolated Hepatocytes, *Arch. Toxicol.* **66**, 587-591.
- KINGSLEY, E.D., P. GRAY, K.G. TOLMAN und R. TWEEDALE (1983): The Toxicity of Metabolites of Sodium Valproate in Cultured Hepatocytes, *J. Clin. Pharmacol.* **23**, 178-185.
- KINGSLEY, E.D., R. TWEEDALE, P. GRAY und K.G. TOLMAN (1980): The Role of Toxic Metabolites in the Hepatotoxicity of Valproic Acid, *Gastroenterology* **79**, 1031.
- KLEE, S. (1992): Untersuchungen zur präsystemischen Elimination und Toxizität im isoliert perfundierten Darm sowie in isolierten Darm- und Leberzellen, unveröffentlichte Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.
- KLEE, S., M.C. NÜRNBERGER und F.R. UNGEMACH (1994): The Consequences of Nitrofurantoin-Induced Oxidative Stress in Isolated Rat Hepatocytes: Evaluation of Pathobiochemical Alterations, *Chem. Biol. Interact.* **93**, 91-102.
- KLOTZ, U., und K.H. ANTONIN (1977): Pharmacokinetics and Bioavailability of Sodium Valproate, *Clin. Pharmacol. Ther.* **21**, 736-743.
- KOCH, K.M., K.S. PRICKETT, A.W. RETTENMEIER, T.A. BAILLIE und R.H. LEVY (1989a): β -Oxidation of Valproate. II. Effects of Fasting, Glucose, and Clofibrate in Rats, *Epilepsia* **30**, 790-796.
- KOCH, K.M., A.J. WILENSKY und R.H. LEVY (1989b): β -Oxidation of Valproate. I. Effects of Fasting and Glucose in Humans, *Epilepsia* **30**, 782-789.
- KOCHEN, W. (1984): Über lebertoxische Effekte von Valproat (VPA) in isolierten Hepatozyten der Ratte: Lipidperoxidation als neuer Aspekt der toxischen Wirkungsmechanismen, In: KRUSE, R. (Hrsg.): „Epilepsia 84“, Einhorn Presse Verlag, Reinbek, 365-378.
- KOCHEN, W., W. IMBECK und C. JAKOBS (1977): Untersuchungen über die Ausscheidung von Metaboliten der Valproinsäure im Urin der Ratte und des Menschen, *Arzneim. Forsch.* **27**, 1090-1099.
- KOCHEN, W., und H. SCHEFFNER (1980): On Unsaturated Metabolites of the Valproic Acid (VPA) in Serum of Epileptic Children, In: JOHANNESSEN, S.I., P.L. MORSELLI, C.E. PIPPIER, A. RICHENS, A. SCHMIDT und H. MEINARDI (Hrsg.): „Antiepileptic Therapy: Advances in Drug Monitoring“, Raven Press, New York, 111-120.
- KOCHEN, W., A. SCHNEIDER und A. RITZ (1983): Abnormal Metabolism of Valproic Acid in Fatal Hepatic Failure, *Eur. J. Pediatr.* **141**, 30-35.

- KOCHEN, W., H.P. SPRUNCK, B. TAUSCHER und M. KLEMENS (1984): Five Doubly Unsaturated Metabolites of Valproic Acid in Urine and Plasma of Patients on Valproic Acid Therapy, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **22**, 309-317.
- KONDO, T., M. ISHIDA, S. KANEKO, T. HIRANO, K. OTANI, Y. FUKUSHIMA, H. MURANAKA, N. KOIDE, M. YOKOYAMA, S. NAKATA und H. KUDO (1992a): Is 2-Propyl-4-Pentenoic Acid, a Hepatotoxic Metabolite of Valproate, Responsible For Valproate-Induced Hyperammonemia?, *Epilepsia* **33**, 550-554.
- KONDO, T., S. KANEKO, K. OTANI, M. ISHIDA, T. HIRANO, Y. FUKUSHIMA, H. MURANAKA, N. KOIDE und M. YOKOYAMA (1992b): Association Between Risk Factors For Valproate Hepatotoxicity and Altered Valproate Metabolism, *Epilepsia* **33**, 172-177.
- KONDO, T., K. OTANI, T. HIRANO, S. KANEKO und Y. FUKUSHIMA (1990): The Effects of Phenytoin and Carbamazepine on Serum Concentration of Mono-Unsaturated Metabolites of Valproic Acid, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **29**, 116-119.
- KÖNIG, S.A., H. SIEMES, F. BLÄKER, E. BOENIGK, G. GROß-SELBECK, F. HANEFELD, N. HAAS, B. KÖHLER, W. KOELFEN, R. KORINTHENBERG, E. KUREK, H.-G. LENARD, H. PENIN, J.M. PENZIEN, W. SCHÜNKE, C. SCHULTZE, U. STEPHANI, M. STUTE, M. TRAU, H.-M. WEINMANN und D. SCHEFFNER (1994): Severe Hepatotoxicity During Valproate Therapy: An Update and Report of Eight New Fatalities, *Epilepsia* **35**, 1005-1015.
- KOSOWER, N.S., und E.M. KOSOWER (1978): The Glutathion Status of Cells, *Int. Rev. Cytol.* **54**, 104-160.
- KOSOWER, N.S., und E.M. KOSOWER (1983): Glutathione and Cell Membrane Thiol Status, In: LARSSON, A., S. ORRENIUS, A. HOLMGREN und B. MANNERVIK (Hrsg.): „Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological, and Clinical Aspects“, Raven Press, New York, 307-315.
- KOSSAK, B.D., E. SCHMIDT-SOMMERFELD, J.H. TONGSARD und D. SCHOELLER (1991): Fatty Acid β -Oxidation During Valproic Acid Therapy and the Role of Carnitine, *Ann. Neurol.* **30**, 448-449.
- KRÄHENBÜHL, S., G. MANG, H. KUPFERSCHMIDT, P.J. MEIER und M. KRAUSE (1995): Plasma and Hepatic Carnitine and Coenzyme A Pools in a Patient With Fatal, Valproate Induced Hepatotoxicity, *GUT* **37**, 140-143.
- KUHARA, T., Y. HIROHATA, S. YAMADA und I. MATSUMOTO (1978): Metabolism of Sodium Dipropylacetate in Humans, *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* **3**, 171-177.
- KUHARA, T., Y. INOUE, M. MATSUMOTO, T. SHINKA, I. MATSUMOTO, N. KAWAHARA und N. SAKURA (1990): Markedly Increased β -Oxidation in Fulminant Hepatic Failure, *Epilepsia* **31**, 214-217.
- KUHARA, T., Y. INOUE, M. MATSUMOTO, T. SHINKA, I. MATSUMOTO, K. KITAMURA, H. FUJII und N. SAKURA (1985): Altered Metabolic Profiles of Valproic Acid in a Patient With Reye's Syndrome, *Clin. Chim. Acta* **145**, 135-142.
- KUHARA, T., und I. MATSUMOTO (1974): Metabolism of Branched Medium Chain Length Fatty Acid. I. ω -Oxidation of Sodium Dipropylacetate in Rats, *Biomed. Mass. Spectrom.* **1**, 291-294.
- KUPFERBERG, H.J. (1980): Sodium Valproate, In: GLASER, G.H., J.K. PENRY und D.M. WOODBURY (Hrsg.): „Antiepileptic Drugs: Mechanism of Action“, Raven Press, New York, 643-654.
- LANG, M. (1976): Depression of Drug Metabolism in Liver Microsomes After Treating Rats With Unsaturated Fatty Acids, *Gen. Pharmacol.* **7**, 415-419.
- LAUB, M.C., I. PAETZKE-BRUNNER und G. JAEGER (1986): Serum Carnitine During Valproic Acid Therapy, *Epilepsia* **27**, 559-562.
- LEÃO, M. (1995): Valproate as a Cause of Hyperammonemia in Heterozygotes With Ornithine-Transcarbamylase Deficiency, *Neurology* **45**, 593-594.

- LENOIR, G.R., und J.-I. PERIGNON (1981): Valproic Acid: A Possible Cause of Proximal Tubular Renal Syndrome, *J. Pediatr.* **99**, 503-504.
- LETTÉRON, P., B. FROMENTY, B. TERRIS, C. DEGOTT und D. PESSAYRE (1996): Acute and Chronic Hepatic Steatosis Leads to *in vivo* Lipid Peroxidation in Mice, *J. Hepatol.* **24**, 200-208.
- LEVY, R.H., und K.M. KOCH (1982): Drug Interactions With Valproic Acid, *Drugs* **24**, 543-556.
- LEVY, R.H., J.M.H. LIN, A.A. ACHAEMPONG und R.G. RUSSELL (1991): Dose Effect of L-Carnitine on 4-VPA-Associated Hepatotoxicity, In: LEVY, R.H., und J.K. PENRY (1991), 25-29.
- LEVY, R.H., und J.K. PENRY (Hrsg.) (1991): Idiosyncratic Reactions to Valproate Clinical Risk Patterns and Mechanisms of Toxicity, Raven Press, New York.
- LEVY, R.H., A.W. RETTENMEIER, G.D. ANDERSON, A.J. WILENSKY, P.N. FRIEL, T.A. BAILLIE, A.A. ACHEAMPONG, J. TOR, M. GUYOT und P. LOISEAU (1990): Effects of Polytherapy With Phenytoin, Carbamazepine, and Stiripentol on Formation of 4-ene-Valproate, A Hepatotoxic Metabolite of Valproic Acid, *Clin. Pharmacol. Ther.* **48**, 225-235.
- LEVY, R.H., und D.D. SHEN (1989): Valproate Absorption, Distribution and Excretion, In: LEVY, R., R. MATTSON, B. MELDRUM, J.K. PENRY und F.E. DREIFUSS (Hrsg.): „Antiepileptic Drugs“, 3. Ed., Raven Press, New York, 583-601.
- LEWIS, J.H., H.J. ZIMMERMAN, T. GARRETT und E. ROSENBERG (1982): Valproate-Induced Hepatic Steatogenesis in Rats, *Hepatology* **2**, 870-873.
- LI, J., D.L. NORWOOD, L.-F. MAO und H. SCHULZ (1991): Mitochondrial Metabolism of Valproic Acid, *Biochemistry* **30**, 388-394.
- LINDROS, K.O., C. YUAN und K.E. PENTTILÄ (1990): Role of Ethanol-Inducible Cytochrome P450 IIE1 in Carbon Tetrachloride-Induced Damage to Centrilobular Hepatocytes From Ethanol-Treated Rats, *Hepatology* **12**, 1092-1097.
- LIU, M.J., K.L.R. BROUWER und G.M. POLLACK (1992): Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Valproate Analogs in Rats III. Pharmacokinetics of Valproic Acid, Cyclohexane Carboxylic Acid, and 1-Methyl-1-Cyclohexane Carboxylic Acid in the Bile-Exteriorized Rat, *Drug Metab. Dispos.* **20**, 810-815.
- LÖSCHER, W. (1978): Serum Protein Binding and Pharmacokinetics of Valproate in Man, Dog, Rat and Mouse, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **204**, 255-261.
- LÖSCHER, W. (1981): Concentration of Metabolites of Valproic Acid in Plasma of Epileptic Patients, *Epilepsia* **22**, 169-178.
- LÖSCHER, W. (1985): Valproic Acid, In: FREY, H.-H., und D. JANZ (Hrsg.): „Antiepileptic Drugs, Handbook of Experimental Pharmacology“, Vol. 74, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, 507-536.
- LÖSCHER, W. (1993): Effects of the Antiepileptic Drug Valproate on Metabolism and Function of Inhibitory and Excitatory Amino Acids in the Brain, *Neurochem. Res.* **18**, 485-502.
- LÖSCHER, W., und H. ESENWEIN (1978): Pharmacokinetics of Sodium Valproate in Dog and Mouse, *Arzneim. Forsch.* **28**, 782-787.
- LÖSCHER, W., J.E. FISHER, H. NAU und D. HÖNACK (1988a): Marked Increase in Anticonvulsant Activity But Decrease in Wet-Dog Shake Behaviour During Short-Term Treatment of Amygdala-Kindled Rats With Valproic Acid, *Eur. J. Pharmacol.* **150**, 221-232.
- LÖSCHER, W., J.E. FISHER, H. NAU und D. HÖNACK (1989): Valproic Acid in Amygdala-Kindled Rats: Alterations in Anticonvulsant Efficacy, Adverse Effects and Drug and Metabolite Levels in Various Brain Regions During Chronic Treatment, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**, 1067-1078.

- LÖSCHER, W., und D. HÖNACK (1995): Comparison of Anticonvulsant Efficacy of Valproate During Prolonged Treatment With One and Three Daily Doses or Continuous („Controlled Release“) Administration in a Model of Generalized Seizures in Rats, *Epilepsia* **36**, 929-937.
- LÖSCHER, W., und H. NAU (1983): Distribution of Valproic Acid and Its Metabolites in Various Brain Areas of Dogs and Rats Following Acute and Prolonged Treatment, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**, 845-854.
- LÖSCHER, W., H. NAU und H. SIEMES (1988b): Penetration of Valproic Acid and Its Active Metabolites into Cerebrospinal Fluid of Children With Epilepsy, *Epilepsia* **29**, 311-316.
- LÖSCHER, W., H. NAU, U. WAHNSCHAFFE, D. HÖNACK, C. RUNDFELDT, W. WITTFOHT und U. BOJIC (1993a): Effects of Valproate and E-2-en-Valproate on Functional and Morphological Parameters of Rat Liver. II. Influence of Phenobarbital Comedication, *Epilepsy Res.* **15**, 113-131.
- LÖSCHER, W., U. WAHNSCHAFFE, D. HÖNACK, E. DREWS und H. NAU (1993b): Effects of Valproate and E-2-en-Valproate on Functional and Morphological Parameters of Rat Liver. III. Influence of Fasting, *Epilepsy Res.* **16**, 183-194.
- LÖSCHER, W., U. WAHNSCHAFFE, D. HÖNACK, W. WITTFOHT und H. NAU (1992): Effects of Valproate and E-2-en-Valproate on Functional and Morphological Parameters of Rat Liver I. Biochemical, Histopathological and Pharmacokinetic Studies, *Epilepsy Res.* **13**, 187-198.
- LOZÁN, J.L. (1992): *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler*, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- LUO, M.J., L.-F. MAO und H. SCHULZ (1995): Short-Chain 3-Hydroxy-2-Methylacyl-CoA Dehydrogenase From Rat Liver: Purification and Characterization of Novel Enzyme of Isoleucine Metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.* **321**, 214-220.
- MANNAERTS, G.P., L. DEBEER, J. THOMAS und P. DE SCHEPPER (1979): Mitochondrial and Peroxisomal Fatty Acid Oxidation in Liver Homogenates and Isolated Hepatocytes From Control and Clofibrate Treated Rats, *J. Biol. Chem.* **254**, 4585-4595.
- MANNAERTS, G.P., J. THOMAS, L. DEBEER, J. MCGARRY und D. FOSTER (1978): Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis After Clofibrate Treatment, *Biochem. Biophys. Acta* **529**, 201-211.
- MAO, L.F., D.S. MELLINGTON und H. SCHULZ (1992): Formation of Free Acyl-Adenylate During the Activation of 2-Propylpentanoic Acid. Valproyl-AMP: A Novel Cellular Metabolite of Valproic Acid, *J. Biol. Chem.* **267**, 3143-3146.
- MARCUS, C.B., M. MURRAY und C.F. WILKINSON (1985): Spectra and Inhibitory Interactions of Methylene-dioxyphenyl and Related Compounds With Purified Isozymes of Cytochrome P450, *Xenobiotica* **15**, 351-362.
- MARTENSSON, J., und A. MEISTER (1989): Mitochondrial Damage in Muscle Occurs After Marked Depletion of Glutathione Monoester, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 471-475.
- MASAKI, N., M.E. KYLE und J.L. FARBER (1989): *tert*-Butyl Hydroxyperoxide Kills Cultured Hepatocytes by Peroxidizing Membrane Lipids, *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 390-399.
- MATHIS, R.K., J.A. LINDHAL, D.K. FREESE und H.L. SHARP (1979a): Valproic Acid and Hepatocyte Failure in Children, *Pediatr. Res.* **13**, 527.
- MATHIS, R.K., R.K. SIBLEY und H.L. SHARP (1979b): Valproic Acid Liver Toxicity: Early Hepatocyte Morphologic Alterations, *Gastroenterology* **77**, A25.
- MATSUMOTO, I., T. KUHARA, Y. INOUE, M. MATSUMOTO und T. OHKURA (1986): Differential Diagnosis For Hepatopathy in Five Patients With Valproate Therapy, In: „Proceedings of the 34th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics“, Cincinnati, OH, 925-926.

- MATSUMOTO, I., T. KUHARA und M. YOSHINO (1976): Metabolism of Branched Medium Chain Length Fatty Acid II- β -Oxidation of Sodium Dipropylacetate in Rats, *Biomed. Mass. Spectrom.* **3**, 235-240.
- MATSUZAWA, T., und M. SAKAZUME (1994): Effects of Fasting on Haematology and Clinical Chemistry Values in the Rat and Dog, *Comp. Haematol. Int.* **4**, 152-156.
- MAY, T., und B. RAMBECK (1985): Serum Concentration of Valproic Acid: Influence of Dose and Comedication, *Ther. Drug Monit.* **7**, 387-390.
- MCGARRY, J.D. (1979): New Perspectives in the Regulation of Ketogenesis, *Diabetes* **28**, 517-523.
- MCGARRY, J.D., J.M. MEIER und D.W. FOSTER (1973): The Effects of Starvation and Refeeding on Carbohydrate and Lipid Metabolism *in vivo* and in the Perfused Rat Liver, The Relationship Between Fatty Acid Oxidation and Esterification in the Regulation of Ketogenesis, *J. Biol. Chem.* **248**, 270-278.
- MEAD, J.F. (1976): Free Radical Mechanisms of Lipid Damage and Consequences For Cellular Membranes, In: PRYOR, W.A. (Hrsg.): „Free Radicals in Biology“, Vol. I, Academic Press, New York, 51-68.
- MEHROTRA, S., P. KAKKAR und P.N VISWANATHAN (1991): Mitochondrial Damage by Active Oxygen Species *in vitro*, *Free Radic. Biol. Med.* **10**, 227-285.
- MEIJER, J.W.A., und L. HESSING-BRAND (1973): Determination of Lower Fatty Acids, Particularly the Antiepileptic Dipropyl-Acetic Acid, in Biological Materials by Means of Micro Diffusion and Gas Chromatography, *Clin. Chim. Acta* **43**, 215-222.
- MEISTER, A. (1983): Selective Modification of Glutathione Metabolism, *Science* **220**, 472-477.
- MEREDITH, M.J., und D.J. REED (1982): Status of Mitochondrial Pool of Glutathione in the Isolated Hepatocyte, *J. Biol. Chem.* **257**, 3747-3753.
- MEREDITH, M.J., und D.J. REED (1983): Depletion *in vitro* of Mitochondrial Glutathione in Rat Hepatocytes and Enhancement of Lipid Peroxidation by Adriamycin and 1,3-Bis(2-Chloroethyl)-1-Nitrosourea (BCNU), *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1383-1388.
- MERTENS, K., V. ROGIERS, M. CORNET, H. SOETAERT, C.F.A. VAN BEZOOIJEN und A. VERCRYUSSE (1991): Glutathione Dependent Detoxication in Liver Tissue of Aging Rats, In: WOODHOUSE, K. W., und M. S. O'MAHONY (Hrsg.): „Drug Metabolism, Liver Injury and Ageing“, Proceedings of the EURAGE Meeting of the Liver and Drugs Section, Cardiff, Wales, November 21-23, Leiden, 165-171.
- MESNIL, M., B. TESTA und P. JENNER (1988): *In vitro* Inhibition by Stiripentol of Rat Brain Cytochrome P450-Mediated Naphthalene Hydroxylation, *Xenobiotica* **18**, 1097-1106.
- MEUNIER, H., G. CARRAZ, P. MEUNIER, P. EYMARD und M. AIMARD (1963): Propriétés Pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacétique. 1er Memoire: Propriétés Antiépileptiques, *Therapie* **18**, 435-438.
- MICCADEL, S., M.E. KYLE, D. GILFOR und J.L. FARBER (1988): Toxic Consequence of the A abrupt Depletion of Glutathione in Cultured Rat Hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* **265**, 311-320.
- MILLER, L.L., C.G. BLY, M.L. WATSON und W.F. BALE (1951): The Dominant Role of the Liver in Plasma Protein Synthesis, *J. Exp. Med.* **94**, 431-453.
- MILLINGTON, D.S., T.P. BOHAN, C.R. ROE, A.L. YERGEY und D.J. LIBERATO (1985): Valproyl-Carnitine: A Novel Drug Metabolite Identified by Fast Atom Bombardment and Thermospray Liquid Chromatography-Mass-Spectrometry, *Clin. Chim. Acta* **145**, 69-76.
- MINASSIAN, C., und G. MITHIEUX (1994): Differential Time Course of Liver and Kidney Glucose-6 Phosphatase Activity During Fasting in Rats, *Comp. Biochem. Physiol.* **109B**, 99-104.

- MIRABELLI, F., A. SALIS, V. MARINONI, G. FINARDI, G. BELLOMO, H. THOR und S. ORRENIUS (1988): Mena-dione-Induced Bleb Formation in Hepatocytes is Associated With the Oxidation of Thiol Groups in Actin, *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 261-269.
- MITCHELL, D.B., D. ACOSTA und J.V. BRUCKNER (1985): Role of Glutathione Depletion in the Cytotoxicity of Acetaminophen in a Primary Culture System of Rat Hepatocytes, *Toxicology* **37**, 127-146.
- MITCHELL, J.B., und A. RUSSO (1987): The Role of Glutathione in Radiation and Drug Induced Toxicity, *Br. J. Cancer* **55**, 96-104.
- MITCHELL, J.R., C.V. SMITH, H. HUGHES, B.H. LAUTERBURG und M.G. HORNING (1981): Overview of Alkylation and Peroxidation Mechanisms in Acute Lethal Hepatocellular Injury by Chemically Reactive Metabolites, *Semin. Liver Dis.* **1**, 143-150.
- MOLDÉUS, P., J. HÖGBERG und S. ORRENIUS (1978): Isolation and Use of Liver Cells, *Methods Enzymol.* **L11**, 60-71.
- MOLDÉUS, P., und J. QUANGUAN (1987): Importance of the Glutathione Cycle in Drug Metabolism, *Pharmacol. Ther.* **33**, 37-40.
- MONKS, A., und A. RICHENS (1978): Plasma Protein Binding Interaction Between Valproic Acid and Palmitic Acid *in vitro*, *Ibid.* **6**, 448P.
- MOORE, G.A., S.A. JEWELL, G. BELLOMO und S. ORRENIUS (1983): On the Relationship Between Ca²⁺ Efflux and Membrane Damage During t-Butylhydroperoxide Metabolism by Liver Mitochondria, *FEBS Lett.* **153**, 289-292.
- MORTENSEN, P.B. (1980): Inhibition of Fatty Acid Oxidation by Valproate, *Lancet* (18. Okt.), 856-857.
- MORTENSEN, P.B., N. GREGERSEN, S. KOLVRAA und E. CHRISTENSEN (1980): The Occurrence of C₆-C₁₀-Dicarboxylic Acids in Urine From Patients and Rats Treated With Dipropylacetate, *Biochem. Med.* **24**, 153-161.
- MORTENSEN, P.B., S. KØLVRAA, N. GREGERSEN und K. RASMUSSEN (1982): Cyanide-Insensitive and Clofibrate Enhanced β-Oxidation of Dodecanedioic Acid in Rat Liver, An Indication of Peroxisomal β-Oxidation of N-Dicarboxylic Acids, *Biochim. Biophys. Acta* **713**, 393-397.
- MULDER, G.J., M.W.H. COUGHTRIE und B. BURCHELL (1990): Glucuronidation, In: MULDER, G.J. (Hrsg.): „Conjugation Reactions in Drug Metabolism“, Taylor and Francis, London, 52-105.
- MURAKAMI, K., T. SUGIMOTO, N. NISHIDA, Y. KOBAYASHI, T. KUHARA und I. MATSUMOTO (1992): Abnormal Metabolism of Carnitine and Valproate in a Case of Acute Encephalopathy During Chronic Valproate Therapy, *Brain Dev.* **14**, 178-181.
- MURPHY, J.V., K.M. MARQUARDT und A.L. SHUG (1985): Valproic Acid Associated Abnormalities of Carnitine Metabolism, *Lancet* (6. Apr.), 820-821.
- NAKAJIMA, T., R.-S. WANG, E. ELOVAARA, S.S. PARK, H.V. GELBOIN, E. HIETANEN und H. VAINIO (1991): Monoclonal Antibody-Directed Characterization of Cytochrome P450 Isozymes Responsible For Toluene Metabolism in Rat Liver, *Biochem. Pharmacol.* **41**, 395-404.
- NAU, H., und W. LÖSCHER (1984): Valproic Acid and Metabolites: Pharmacological and Toxicological Studies, *Epilepsia* **25** (Suppl. 1), S14-S22.
- NAU, H., und H. SIEMES (1992): Differentiation Between Valproate-Induced Anticonvulsant Effect, Teratogenicity and Hepatotoxicity. Aspects of Species Variation, Pharmacokinetics, Metabolism and Implications of Structural Specificity For the Development of Alternative Antiepileptic Agents Such as 2-en-VPA, *Pharm. Weekbl. (Sci. Ed.)* **14**, 101-107.

- NAU, H., H. SIEMES, E. FISHER, R. PUND, W. WITTFOHT und E. DREWS (1991): Valproic Acid Metabolite Patterns in 195 Children With Epilepsy: Effect of Age, Dose, Comedication, Duration of Treatment, and Clinical Factors, In: LEVY, R.H., und J.K. PENRY (1991), 65-74.
- NAU, H., W. WITTFOHT, H. SCHÄFER, C. JAKOBS, D. RATING und H. HELGE (1981): Valproic Acid and Several Metabolites: Quantitative Determination in Serum, Urine, Breast Milk and Tissues by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Using Selected Ion Monitoring, *J. Chromatogr.* **226**, 69-78.
- NDANGIZA, A., M. MASSON, B. PALATE und J. ROBA (1992): Effect of Fasting on the Liver Toxicity of a Single Oral Dose of Sodium Valproate, 4-en Valproic Acid, Pentenoic Acid, Pentanoic Acid and 2-n-Pentylaminoacetamide in the Rat, *Toxicol. Lett.* (Suppl.), 326.
- NICOTERA, P., P. HARTZELL, G. DAVIS und S. ORRENIUS (1986): The Formation of Plasma Membrane Blebs in Hepatocytes Exposed to Agents That Increase Cytosolic Ca^{2+} is Mediated by the Activation of a Non-Lysosomal Proteolytic System, *FEBS Lett.* **209**, 139-144.
- NICOTERA, P., M. MOORE, F. MIRABELLI, G. BELLOMO und S. ORRENIUS (1985): Inhibition of Hepatocyte Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase Activity by Menandione Metabolism and Its Restoration by Thiols, *FEBS Lett.* **181**, 149-153.
- NIEMINEN, A.-L., A.K. SAYLOR, S.A. TESFAI, B. HERMAN und J.J. LEMASTERS (1995): Contribution of the Mitochondrial Permeability Transition to Lethal Injury After Exposure of Hepatocytes to *t*-Butylhydroperoxide, *Biochem. J.* **307**, 99-106.
- NITSCHKE, V., und H. MASCHER (1982): Pharmacokinetics of Valproic Acid After Oral and Parenteral Administration in Healthy Volunteers, *Epilepsia* **23**, 153-162.
- NORDHOFF, A., R.H. SCHIRMER, E. MAYATEPEK und K. BECKER (1994): No Evidence For Inhibition of Human Glutathione Reductase by Valproic Acid, *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1453-1456.
- NORDMANN, R. (1994): Alcohol and Antioxidant System, *Alcohol* **29**, 513-522.
- NOVGORODOV, S.A., V.G. GOGVADZE, B.I. MEDVEDEV und V.P. ZINCHENKO (1989a): The Effect of Butylated Hydroxytoluene, an Inhibitor of Lipid Peroxidation, on the Calcium-Induced Uncoupling of Rat Liver Mitochondria, *FEBS Lett.* **248**, 179-181.
- NOVGORODOV, S.A., T.I. GUDZ, Y.E. KUSHNAREVA, V.A. ROGINSKY und Y.B. KUDRJASHOV (1991): Mechanism Accounting For the Induction of Nonspecific Permeability of the Inner Mitochondrial Membrane by Hydroperoxides, *Biochim. Biophys. Acta* **1058**, 242-248.
- NOVGORODOV, S.A., T.I. GUDZ, Y.E. MOHR, E.N. GONCHARENKO und L.S. YAGUZHINSKY (1989b): ATP-Synthase Complex: The Mechanism of Control of Ion Fluxes Induced by Cumene Hydroperoxide in Mitochondria, *FEBS Lett.* **247**, 255-258.
- NOVGORODOV, S.A., T.I. GUDZ, Y.E. MOHR, E.N. GONCHARENKO und L.S. YAGUZHINSKY (1989c): Cumene Hydroperoxide Changes the Type of Conductivity of the Mitochondrial Membrane For K^{+} , *Biokhimiia* **54**, 206-212.
- NURGE, M.E., C.R. ANDERSON und E. BATES (1991): Metabolic and Nutritional Implications of Valproic Acid, *Nutrition Res.* **11**, 949-960.
- NÜRNBERGER, M.C. (1995): Radikal-induzierte Toxizität in isolierten Rattenhepatozyten: Die Bedeutung erhöhter zytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen, unveröffentlichte Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.
- O'BRIEN, P.J. (1978): Hydroperoxides and Superoxides in Microsomal Oxidations, *Pharmacol. Ther.* **A 2**, 517-536.

- OHKAWA, H., N. OHISHI und K. YAGI (1979): Assay For Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction, *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
- OHTANI, Y., F. ENDO und I. MATSUDA (1982): Carnitine Deficiency and Hyperammonemia Associated With Valproic Acid Therapy, *J. Pediatr.* **101**, 782-785.
- OLAFSDOTTIR, K., G.A. PASCOE und D.J. REED (1988): Mitochondrial Glutathione Status During Ca²⁺ Ionophore-Induced Injury to Isolated Hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* **263**, 226-235.
- OLAFSDOTTIR, K., und D.J. REED (1988): Retention of Oxidized Glutathione by Isolated Rat Liver Mitochondria During Hydroperoxide Treatment, *Biochim. Biophys. Acta* **964**, 377-382.
- OLSON, M.J., J.A. HANDLER und R.G. THURMAN (1986): Mechanism of Zone-Specific Hepatic Steatosis Caused by Valproate: Inhibition of Ketogenesis in Periportal Regions of the Liver Lobule, *Mol. Pharmacol.* **30**, 520-525.
- OMIECINSKI, C.J. (1986): Tissue-Specific Expression of Rat mRNAs Homologous to Cytochromes P450b and P450e, *Nucleic Acids Res.* **14**, 1525-1539.
- PAGANINI, M., G. ZACCARA, F. MORONI, R. CAMPOSTRINI, L. BENDONI, G. ARNETOLI und R. ZAPPOLI (1987): Lack of Relationship Between Sodium Valproate-Induced Adverse Effects and the Plasma Concentration of Its Metabolite 2-Propylpenten-4-oic Acid, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **32**, 219-222.
- PAUL, J. (1975): Cell and Tissue Culture, Churchill-Livingstone, Edinburgh.
- PENRY, J.K. (1991): Overview: Significance of Valproate, In: LEVY, R.H., und J.K. PENRY (1991), 1-2.
- PERUCCA, E., A. HEDGES, K.A. MAKKI, M. RUPRAH, J.F. WILSON und A. RICHENS (1984): A Comparative Study of Anticonvulsant Drugs in Epileptic Patients, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **18**, 401-410.
- PESSAYRE, D., A. DOLDER, J.Y. ARTIGOU, J.C. WANDSCHEER, V. DESCATOIRE, C. DEGOTT und J.P. BENHAMOU (1979): Effect of Fasting on Metabolite-Mediated Hepatotoxicity in the Rat, *Gastroenterology* **77**, 264-271.
- PHILLIPS, I.R., E.A. SHEPHARD, F. MITANI und B.R. RABIN (1981): Induction by Phenobarbital of the mRNA For a Specific Variant of Rat Liver Microsomal Cytochrome P450, *Biochem. J.* **196**, 839-851.
- PINDER, R.M., R.N. BROGDEN, T.M. SPEIGHT und G.S. AVERY (1977): Sodium Valproate: A Review of Its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in Epilepsy, *Drugs* **13**, 81-123.
- PIPPENGER, C.E., X. MENG, A.D. ROTHNER, R.P. CRUSE, G. ERENBERG und R. SOLANO (1991): Free Radical Scavenging Enzyme Activity Profiles in Risk Assessment of Idiosyncratic Drug Reactions: Probable Mechanism For Valproate-Induced Acute Pancreatitis and Hepatotoxicity, In: LEVY, R.H., und J.K. PENRY (1991), 75-88.
- PIPPENGER, C.E., X. MENG und F. VAN LENTE (1989a): Alternate Approaches to the Prediction of Antiepileptic Idiosyncratic or Drug-Drug Interactions, In: PITLICK, W.H. (Hrsg.): „Antiepileptic Drug Interactions“, Demos Publications, New York, 293-307.
- PIPPENGER, C.E., X. MENG, F. VAN LENTE und A.D. ROTHNER (1989b): Valproate Therapy Depresses Free Radical Scavenging Enzyme Activity: A Probable Mechanism For Induction of Acute Pancreatitis or Hepatotoxicity, *Neurology* **39** (Suppl. 1), 214.
- PISANI, F. (1992): Influence of Co-Medication on the Metabolism of Valproate, *Pharm. Weekbl. (Sci. Ed.)* **14**, 108-113.
- POLHUIJS, M., G. LANKHAAR und G.J. MULDER (1992): Relationship Between Glutathione Content in Liver and Glutathione Conjugation Rate in the Rat *in vivo*, *Biochem. J.* **285**, 401-404.
- POLI, G., E. ALBANO und M.U. DIANZANI (1987): The Role of Lipid Peroxidation in Liver Damage, *Chem. Phys. Lipids* **45**, 117-142.

- POLLACK, G.M., und K.L.R. BROUWER (1991): Physiological and Metabolic Influence on Enterohepatic Recirculation: Stimulations Based upon the Disposition of Valproic Acid in the Rat, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **19**, 189-225.
- POLLACK, G.M., W.B. MCHUGH, F.M. GENGO, J.C. ERMER und D.D. SHEN (1986): Accumulation and Washout Kinetics of Valproic Acid and Its Active Metabolites, *J. Clin. Pharmacol.* **26**, 668-676.
- PONCHAUT, S., J.P. DRAYE, K. VEITCH und F. VAN HOOF (1991): Influence of Chronic Administration of Valproate on Ultrastructure and Enzyme Content of Peroxisomes in Rat Liver and Kidney. Oxidation of Valproate by Liver Peroxisomes, *Biochem. Pharmacol.* **41**, 1419-1428.
- PONCHAUT, S., F. VAN HOOF und K. VEITCH (1992a): Cytochrom aa3 Depletion is the Cause of the Deficient Mitochondrial Respiration Induced by Chronic Valproate Administration, *Biochem. Pharmacol.* **43**, 644-647.
- PONCHAUT, S., F. VAN HOOF und K. VEITCH (1992b): *In vitro* Effects of Valproate and Valproate Metabolites on Mitochondrial Oxidations, Relevance of CoA Sequestration to the Observed Inhibitions, *Biochem. Pharmacol.* **43**, 2435-2442.
- PONCHAUT, S., und K. VEITCH (1993): Valproate and Mitochondria, *Biochem. Pharmacol.* **46**, 199-204.
- PORTER, R.J. (1982): Efficacy of Antiepileptic Drugs, In: WARD, A.A., J.K. PENRY und D. PURPURA (Hrsg.): „Epilepsy“, Raven Press, New York, 225-237.
- PORUBEK, D.J., M.P. GRILLO und T.A. BAILLIE (1989): The Covalent Binding to Protein of Valproic Acid and Its Hepatotoxic Metabolite, 2-n-Propyl-4-Pentenoic Acid, in Rats and Isolated Rat Hepatocytes, *Drug Metab. Dispos.* **178**, 123-130.
- PORUBEK, D.J., M.G. GRILLO, R.K. OLSEN und T.A. BAILLIE (1991): Toxic Metabolites of Valproic Acid: Inhibition of Rat Liver Acetoacetyl-CoA Thiolase by 2-n-Propyl-4-Pentenoic Acid (4-VPA) and Related Branched-Chain Carboxylic Acids, In: LEVY, R.H., und J.K. PENRY (1991), 53-58.
- POWELL-JACKSON, P.R., J.M. TREDGER und R. WILLIAMS (1984): Hepatotoxicity to Sodium Valproate: A Review, *GUT* **25**, 673-681.
- PRICE, V.F., M.G. MILLER und D.J. JOLLOW (1987): Mechanisms of Fasting-Induced Potentiation of Acetaminophen Hepatotoxicity in the Rat, *Biochem. Pharmacol.* **36**, 427-433.
- PRICKETT, K.S., und T.A. BAILLIE (1984): Metabolism of Valproic Acid by Hepatic Microsomal Cytochrome P450, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 1166-1173.
- QURESHI, I.A., J. LETARTE, B. TUCHWEBER, I. YOUSEF und S.R. QURESHI (1985): Hepatotoxicity of Sodium Valproate in Ornithine Transcarbamylase-Deficient Mice, *Toxicol. Lett.* **25**, 297-306.
- RAHIMTULA, A.D., und P.J. O'BRIEN (1974): Hydroperoxide Catalyzed Liver Microsomal Aromatic Hydroxylation Reactions Involving Cytochrome P450, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 440-447.
- RAKOTOAMBOA, J.-L., M. MASSON, B. PALATE, J. CARLEER und J. ROBA (1994): Fasting For 24 h Reveals Liver Microsteatosis After Continuous i.v. Infusion of Milacemide in the Rat, *Arch. Toxicol.* **68**, 266-271.
- REED, D.J. (1990a): Glutathione: Toxicological Implications, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**, 603-631.
- REED, D.J. (1990b): Review of the Current Status of Calcium and Thiols in Cellular Injury, *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 495-502.
- REED, D.J., und M.W. FARISS (1984): Glutathione Depletion and Susceptibility, *Pharmacol. Rev.* **36**, 25S-33S.
- REED, D.J., G.A. PASCOE und K. OLAFSDOTTIR (1987): Some Aspects of Cell Defense Mechanisms of Glutathione and Vitamin E During Cell Injury, *Arch. Toxicol.* (Suppl. 11), 34-38.

- REINKE, L., S. BELINSKY, R. EVANS, F. KAUFFMAN und R. THURMAN (1981): Conjugation of p-Nitrophenol in the Perfused Rat Liver - The Effect of Substrate Concentration and Carbohydrate Reserves, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **217**, 863-870.
- RETTENMEIER, A.W., W.P. GORDON, H. BARNES und T.A. BAILLIE (1987): Studies on the Metabolic Fate of Valproic Acid in the Rat Using Stable Isotope Techniques, *Xenobiotica* **17**, 1147-1157.
- RETTENMEIER, A.W., W.P. GORDON, K.S. PRICKETT, R.H. LEVY und T.A. BAILLIE (1986): Biotransformation and Pharmacokinetics in the Rhesus Monkey of 2-n-Propyl-4-Pentenoic Acid, A Toxic Metabolite of Valproic Acid, *Drug Metab. Dispos.* **14**, 454-464.
- RETTENMEIER, A.W., W.N. HOWALD, R.H. LEVY, D.J. WITEK, W.P. GORDON, D.J. PORUBEK und T.A. BAILLIE, (1989): Quantitative Metabolic Profiling of Valproic Acid in Humans Using Automated Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Techniques, *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* **18**, 192-199.
- RETTENMEIER, A.W., K.S. PRICKETT, W.P. GORDON, S.M. BJORGE, S.L. CHANG, R.H. LEVY und T.A. BAILLIE (1985): Studies on the Biotransformation in the Perfused Rat Liver of 2-n-Propyl-4-Pentenoic Acid, A Metabolite of the Antiepileptic Drug Valproic Acid, *Drug Metab. Dispos.* **13**, 81-96.
- RETTIE, A.E., M. BOBERG, A.W. RETTENMEIER und T.A. BAILLIE (1988): Cytochrome P450-Catalyzed Desaturation of Valproic Acid *in vitro* Species Differences, Induction Effects, and Mechanistic Studies, *J. Biol. Chem.* **263**, 13733-13738.
- RETTIE, A.E., A.W. RETTENMEIER, B.K. BEYER, T.A. BAILLIE und M.R. JUCHAU (1986): Valproate Hydroxylation by Human Fetal Tissues and Embryotoxicity of Metabolites, *Clin. Pharmacol. Ther.* **40**, 172-177.
- RETTIE, A.E., A.W. RETTENMEIER, W.N. HOWALD und T.A. BAILLIE (1987): Cytochrome P450-Catalyzed Formation of Δ^4 -VPA, a Toxic Metabolite of Valproic Acid, *Science* **235**, 890-893.
- RETTIE, A.E., P.R. SHEFFELS, K.R. KORZEKWA, F.J. GONZALEZ, R.M. PHILPOT und T.A. BAILLIE (1995): Cyp4 Isozyme Specificity and the Relationship Between ω -Hydroxylation and Terminal Desaturation of Valproic Acid, *Biochemistry* **34**, 7889-7895.
- RICHTER, C., und B. FREI (1988): Ca^{2+} Release From Mitochondria Induced by Prooxidants, *Free Rad. Biol. Med.* **4**, 365-375.
- RICHTER, C. and G.E.N. KASS (1991): Oxidative Stress in Mitochondria: Its Relationship to Cellular Ca^{2+} Homeostasis, Cell Death, Proliferation, and Differentiation, *Chem. Biol. Interact.* **77**, 1-23.
- RICHTER, C., M. THEUS und J. SCHLEGEL (1990): Cyclosporine A Inhibits Mitochondrial Pyridine Nucleotide Hydrolysis and Calcium Release, *Biochem. Pharmacol.* **40**, 779-782.
- RIVA, R., F. ALBANI, G. GOBBI, M. SANTUCCI und A. BARUZZI (1993): Carnitine Disposition Before and During Valproate Therapy in Patients With Epilepsy, *Epilepsia* **34**, 184-187.
- RIZZUTO, R., G. PITTON und G.F. AZZONE (1987): Effect of Ca^{2+} , Peroxides, SH Reagents, Phosphate and Ageing on the Permeability of Mitochondrial Membranes, *Eur. J. Biochem.* **162**, 239-249.
- ROGIERS, V., M. AKRAWI, A. VERCRUYSE, I.R. PHILLIPS und E.A. SHEPHARD (1995): Effects of the Anticonvulsant, Valproate, on the Expression of Components of the Cytochrome-P450-Mediated Monooxygenase System and Glutathione S-Transferase, *Eur. J. Biochem.* **231**, 337-343.
- ROGIERS, V., A. CALLAERTS, W. SONCK und A. VERCRUYSE (1988a): Biotransformation of Sodium Valproate in Isolated Rat Hepatocytes, In: GUILLOUZO, A. (Hrsg.): „Liver Cells and Drugs“, Vol. 164, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., Paris, 329-333.
- ROGIERS, V., A. CALLAERTS, A. VERCRUYSE, M. AKRAWI, E. SHEPHARD und I. PHILLIPS (1992): Effects of Valproate on Xenobiotic Biotransformation in Rat Liver: *In vivo* and *in vitro* Experiments, *Pharm. Weekbl. (Sci. Ed.)* **14**, 127-131.

- ROGIERS, V., Y. VANDENBERGHE, A. CALLAERTS, W. SONCK, V. MASS und A. VERCRUYSSSE (1988b): The Induction and Inhibition Effects of Sodium Valproate *in vivo* on the Biotransformation System of Xenobiotics in Isolated Hepatocytes, *Xenobiotica* **18**, 665-673.
- ROGIERS, V., Y. VANDENBERGHE und A. VERCRUYSSSE (1985): Inhibition of Gluconeogenesis by Sodium Valproate and Its Metabolites in Isolated Rat Hepatocytes, *Xenobiotica* **15**, 759-765.
- ROMERO, F.J., S. SOBOLL und H. SIES (1984): Mitochondrial and Cytosolic Glutathione After Depletion by Phorone in Isolated Hepatocytes, *Experientia* **40**, 365-367.
- ROTRUCK, J.T., A.L. POPE, H.E. GANTHER, A.B. SWANSON, D.G. HAFEMAN und W.G. HOEKSTRA (1973): Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathion Peroxidase, *Science* **179**, 588-590.
- RUMBACH, L., C. MUTET, G. CREMEL, C.A. MARESCAUX, G. MICHELETTI, J.M. WARTER und A. WAKSMAN (1986): Effects of Sodium Valproate on Mitochondrial Membranes: Electron Paramagnetic Resonance and Transmembrane Protein Movement Studies, *Mol. Pharmacol.* **30**, 270-273.
- RUMBACH, L., J.M. WARTER, A. RENDON, C. MARESCAUX, G. MICHELETTI und A. WAKSMAN (1983): Inhibition of Oxidative Phosphorylation in Hepatic and Cerebral Mitochondria of Sodium Valproate-Treated Rats, *J. Neurol. Sci.* **61**, 417-423.
- RUNCI, F.M., L. MICHELI, A.J. FIASCHI und G. GIORGI (1990), *Pharmacol. Res.* **22**, 437-439. Zitiert nach COTARRIU, D., et al. (1994).
- SANDY, M.S., P. MOLDÉUS, D. ROSS und M.T. SMITH (1986): Role of Redox Cycling and Lipid Peroxidation in Bipyridyl Herbicide Cytotoxicity, *Biochem. Pharmacol.* **35**, 3095-3101.
- SANFREY, H., C.G. BULKEY und J.L. CAMERON (1984): The Role of Oxygen Derived Free Radicals in the Pathogenesis of Acute Pancreatitis, *Ann. Surg.* **200**, 405-413.
- SCHEFFNER, D. (1986): Fatal Liver Failure in Children on Valproate, *Lancet* (30. Aug.), 511.
- SCHEFFNER, D., S. KÖNIG, I. RAUTERBERG-RULAND, W. KOCHEN, W.J. HOFMAN und S. UNKELBACH (1988): Fatal Liver Failure in 16 Children With Valproate Therapy, *Epilepsia* **29**, 530-542.
- SCHMIDT-SOMMERFELD, E., D. PENN, P. RINALDO, B.D. KOSSAK, B.U.K. LI, Z.-H. HUANG und D.A. GAGE (1992): Urinary Medium-Chain Acylcarnitines in Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency, Medium-Chain Triglyceride Feeding and Valproic Acid Therapy: Sensitivity and Specificity of the Radioisotopic Exchange/High Performance Liquid Chromatography Method, *Pediatr. Res.* **31**, 545-551.
- SCHOBEN, A.F.A.M. (1979): Pharmacokinetics and Therapeutics in Epilepsy, unveröffentlichte Dissertation, Katholieke Universiteit te Nijmegen.
- SCHOBEN, F., E. VAN DER KLEIJN und F.J.M. GABREELS (1975): Pharmacokinetics of Di-n-Propylacetate in Epileptic Patients, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **8**, 97-105.
- SCHULZ, H. (1983): Metabolism of 4-Pentenoic Acid and Inhibition of Thiolase by Metabolites of 4-Pentenoic Acid, *Biochemistry* **22**, 1827-1832.
- SCHULZ, H. (1991): Inhibition of Fatty Acid Oxidation and Mitochondrial Metabolism of Valproic Acid *in vitro*, In: LEVY, R.H., und J.K. PENRY (1991), 47-52.
- SCOTT, D.A., C.F. GHOLSON, C.V. NETCHVOLODOFF, M. RAY, E. GONZALEZ und B.R. BACON (1991): Incidental Microvesicular Steatosis Due to Valproic Acid Anticonvulsant Therapy, *Am. J. Gastroenterol.* **86**, 500-502.
- SEMMES, R.L.O., und D.D. SHEN (1990): Nonlinear Binding of Valproic Acid (VPA) and E- Δ^2 -Valproic Acid to Rat Plasma Proteins, *Pharm. Res.* **7**, 461-467.

- SEMMES, R.L.O., und D.D. SHEN (1991): Comparative Pharmacodynamics and Brain Distribution of E- Δ^2 -Valproate in Rats, *Epilepsia* **32** (Suppl. 2), 232-241.
- SEWELL, A.C., H.-J. BÖHLES, J. HERWIG und M. DEMIRKOL (1995): Neurological Deterioration in Patients With Urea Cycle Disorders under Valproate Therapy - A Cause For Concern, *Eur. J. Pediatr.* **154**, 593-594.
- SHAN, X., D.P. JONES, M. HASHMI und M.W. ANDERS (1993): Selective Depletion of Mitochondrial Glutathione Concentrations by (R,S)-3-Hydroxy-4-Pentenoate Potentiates Oxidative Cell Death, *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 75-81.
- SHEN, D.D., G.A. OJEMANN, R.L. RAPPAPORT, R.L. DILLS, P.N. FRIEL et al. (1992): Low and Variable Presence of Valproic Acid in Human Brain, *Neurology* **42**, 582-585.
- SHERARD, E.S., G.S. STEIMAN und D. COURI (1980): Treatment of Childhood Epilepsy With Valproic Acid: Result of the First 100 Patients in a 6-Month Trial, *Neurology* **30**, 31-35.
- SHERLOCK, S. (1983): Acute Fatty Liver of Pregnancy and the Microvesicular Fat Diseases, *GUT* **24**, 265-269.
- SHERWIN, A. (1983): Absence Seizures, In: MORSELLI, P.L., C.E. PIPPENGER und J.K. PENRY (Hrsg.): „Anti-epileptic Drug Therapy in Pediatrics“, Raven Press, New York.
- SHIMIZU, M., und S. MORITA (1992): Effects of Feeding and Fasting on Hepatolobular Distribution of Glutathione and Cadmium-Induced Hepatotoxicity, *Toxicology* **75**, 97-107.
- SHIRLEY, M.A., P. HU und T.A. BAILLIE (1993): Stereochemical Studies on the β -Oxidation of Valproic Acid in Isolated Rat Hepatocytes, *Drug Metab. Dispos.* **21**, 580-586.
- SIEMES, H., und H. NAU (1991): Valproat-assoziierte Hepatotoxizität, Pathogenese, klinisches Spektrum, Therapie und Prognose, *Klin. Pädiatr.* **203**, 411-419.
- SIEMES, H., H. NAU, K. SCHULTZE, W. WITTFOHT, E. DREWS, J. PENZIEN und U. SEIDEL (1993): Valproate (VPA) Metabolites in Various Clinical Conditions of Probable VPA-Associated Hepatotoxicity, *Epilepsia* **34**, 332-346.
- SIEMES, H., H. NAU, U. SEIDEL und H.-J. GRAMM (1992): Irreversibles valproatassoziiertes Leberversagen, *Monatsschr. Kinderheilkd.* **140**, 869-875.
- SIEMS, W.G., S.J. HAPNER und F.J.G.M. VAN KUIJK (1996): 4-Hydroxynonenal Inhibits $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase, *Free Rad. Biol. Med.* **20**, 215-223.
- SIES, H. (1985): Oxidative Stress: Introductory Remarks, In: SIES, H. (Hrsg.): „Oxidative Stress“, Academic Press, New York, 1-8.
- SIES, H. (1991): Oxidative Stress: Introduction, In: SIES, H. (Hrsg.): „Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants“, Academic Press, San Diego, 15.
- SIES, H. und B. KETTERER (Hrsg.) (1988): Glutathione Conjugation. Mechanisms and Biological Significance, Academic Press, New York.
- SILVA, J.M., und P.J. O'BRIEN (1989): Allyl Alcohol- and Acrolein-Induced Toxicity in Isolated Rat Hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* **275**, 551-558.
- SIMON, D., und J.K. PENRY (1975): Sodium Di-N-Propylacetate (DPA) in the Treatment of Epilepsy, *Epilepsia* **16**, 549-573.
- SIMON, G., C. MOOG und G. OBERT (1994): Valproic Acid Reduces the Intracellular Level of Glutathione and Stimulates Human Immunodeficiency Virus, *Chem. Biol. Interact.* **91**, 111-121.
- SLATER, T.F. (1984): Free-Radical Mechanisms in Tissue Injury, *Biochem. J.* **222**, 1-15.

- SOHN, O.S., und E.S. FIALA (1995): Effects of Dietary Restriction and Fasting on Selected Rat Liver Enzymes of Xenobiotic Metabolism and on AOM-Induced DNA Guanine Methylation in Rat Liver and Colon, *Nutr. Cancer* **23**, 13-23.
- SONG, B.-J., H.V. GELBOIN, S.S. PARK, C.S. YAN und F.J. GONZALES (1986): Complementary DNA and Protein Sequences of Ethanol-Inducible Rat and Human Cytochrome P450s, *J. Biol. Chem.* **261**, 16689-16697.
- SORRENTINO, D., D.D. STUMP, S.-L. ZHOU, K. VAN NESS, L.M. ISOLA und P.D. BERK (1994): The Hepatocellular Uptake of Free Fatty Acids is Selectively Preserved During Starvation, *Gastroenterology* **107**, 1415-1424.
- SOUTHERN, P.A., und G. POWIS (1988): Free Radicals in Medicine II. Involvement in Human Disease, *Mayo Clin. Proc.* **63**, 390-408.
- SPIELBERG, S.P., G.B. GORDON, D.A. BLAKE, B.E. MELLITS und D.S. BROSS (1981): Anticonvulsant Toxicity *in vitro*: Possible Role of Arene Oxides, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **217**, 386-389.
- STACEY, N.H., H. OTTENWÄLDER und H. KAPPUS (1982): CCl₄-Induced Lipid Peroxidation in Isolated Rat Hepatocytes With Different Oxygen Concentrations, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **62**, 421-427.
- STANLEY, C.A., C.T. BERRY, M.J. BENNETT, S.M. WILLI, W.R. TREEM und D.E. HALE (1993): Renal Handling of Carnitine in Secondary Carnitine Deficiency Disorders, *Pediatr. Res.* **34**, 89-97.
- STARKE, P.E., und J.L. FARBER (1986): Calcium-dependent and Calcium-independent Mechanisms of Irreversible Cell Injury in Cultured Hepatocytes, *J. Biol. Chem.* **261**, 3006-3012.
- STEFEK, M., M. MASARYKOVA und L. BENES (1992): Inhibition of Cumene Hydroperoxide-Induced Lipid Peroxidation by a Novel Pyridoinole Antioxidant in Rat Liver Microsomes, *Pharmacol. Toxicol.* **70**, 407-411.
- STEPHENS, J.R., und R.H. LEVY (1992): Valproate Hepatotoxicity Syndrome: Hypothesis of Pathogenesis, *Pharm. Weekbl. (Sci. Ed.)* **14**, 118-121.
- STIO, M., T. IANTOMASI, F. FAVILLI, P. MARRACCINI, B. LUNGHI, M.T. VINCENZINI und C. TREVES (1994): Glutathione Metabolism in Heart and Liver of the Aging Rat, *Biochem. Cell Biol.* **72**, 58-61.
- STUMPF, D.A., W.D. PARKER und C. ANGELINI (1985): Carnitine Deficiency, Organic Acidemias, and Reye's Syndrome, *Neurology* **35**, 1041-1045.
- SUAREZ, K.A., K. GRIFFIN, R.P. KOPPLIN und P. BHONSLE (1981): Protective Effect of Diethylmaleate Pretreatment on Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **57**, 318-324.
- SUGIMOTO, T., A. ARAKI, N. NISHIDA, Y. SAKANE, M. WOO, T. TAKEUCHI und Y. KOBAYASHI (1987a): Hepatotoxicity in Rat Following Administration of Valproic Acid: Effect of L-Carnitine Supplementation, *Epilepsia* **28**, 373-377.
- SUGIMOTO, T., H. MURO, M. WOO, N. NISHIDA und K. MURAKAMI (1996): Metabolic Profiles in Patients on High-Dose Valproate Monotherapy, *Epilepsy Res.* **25**, 107-112.
- SUGIMOTO, T., N. NISHIDA, M. WOO, T. TAKEUCHI, A. YASUHARA, Y. KOBAYASHI und Y. SAKANE (1986): Serum and Urinary Carnitine and Organic Acids in Reye Syndrome and Reye-Like Syndrome, *Brain Dev.* **8**, 257-261.
- SUGIMOTO, T., N. NISHIDA, A. YASUHARA, Z. ONO, Y. SAKANE und T. MATSUMURA (1983): Reye-Like-Syndrome Associated With Valproic Acid, *Brain. Dev.* **5**, 334-337.
- SUGIMOTO, T., M. WOO, N. NISHIDA, T. TAKEUCHI, Y. SAKANE und Y. KOBAYASHI (1987b): Hepatotoxicity in Rat Following Administration of Valproic Acid, *Epilepsia* **28**, 142-146.

- SUSSMAN, N.M., and L.W. MCLAIN (1979): A Direct Hepatotoxic Effect of Valproic Acid, *J. Am. Med. Assoc.* **242**, 1173-1174.
- TAKEUCHI, T., T. SUGIMOTO, N. NISHIDA and Y. KOBAYASHI (1988): Protective Effect of D,L-Carnitine on Valproate-Induced Hyperammonemia and Hypoketonemia in Primary Cultured Rat Hepatocytes, *Biochem. Pharm.* **37**, 2255-2258.
- TANAKA, K. (1972): On the Mode of Action of Hypoglycin A. III. Isolation and Identification of Cis-4-Decene-1,10-Dioic, Cis-4-Octene-1,8-Dioic, Glutaric, and Adipic Acids, N-(Methylenecyclopropyl) Acetylglycine, and N-Isovaleryl-Glycine From Urine of Hypoglycin A Treated Rats, *J. Biol. Chem.* **247**, 7465-7478.
- TANG, W., and F.S. ABBOTT (1996a): Bioactivation of a Toxic Metabolite of Valproic Acid, (E)-2-Propyl-2,4-Pentadienoic Acid, Via Glucuronidation. LC/MS/MS Characterization of the GSH-Glucuronide Diconjugates, *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 517-526.
- TANG, W., and F.S. ABBOTT (1996b): Characterization of Thiol-Conjugated Metabolites of 2-Propylpent-4-Enoic Acid (4-ene-VPA), a Toxic Metabolite of Valproic Acid, by Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrom.* **31**, 926-936.
- TANG, W., A.G. BOREL and F.S. ABBOTT (1996): Conjugation of Glutathione With a Toxic Metabolite of Valproic Acid, (E)-2-Propyl-2,4-Pentadienoic Acid, Catalysed by Rat Hepatic Glutathion-S-Transferases, *Drug Metab. Dispos.* **24**, 436-446.
- TANG, W., A.G. BOREL, T. FUJIMIYA and F.S. ABBOTT (1995): Fluorinated Analogues as Mechanistic Probes in Valproic Acid Hepatotoxicity: Hepatic Microvesicular Steatosis and Glutathione Status, *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 671-682.
- TATEISHI, N., T. HIGASHI, A. NARUSE, K. NAKASHIMA, H. SHIOZAKI and Y. SAKAMOTO (1977): Rat Liver Glutathione: Possible Role as a Reservoir of Cysteine, *J. Nutr.* **107**, 51-60.
- TATEISHI, N., T. HIGASHI, S. SHINYA, A. NARUSE and Y. SAKAMOTO (1974): Studies on the Regulation of Glutathione Level in Rat Liver, *J. Biochem.* **75**, 93-103.
- TEIN, I., S. DIMAURO, Z.-W. XIE and D.C. DE VIVO (1993): Valproic Acid Impairs Carnitine Uptake in Cultured Human Skin Fibroblasts. An *in vitro* Model For the Pathogenesis of Valproic Acid-Associated Carnitine Deficiency, *Pediatr. Res.* **34**, 281-287.
- TENNISON, M.B., M.V. MILES, G.M. POLLACK, M.D. THORN and R.E. DUPUIS (1988): Valproate Metabolites and Hepatotoxicity in an Epileptic Population, *Epilepsia* **29**, 543-547.
- THOMPSON, J.A., and N.P. YUMIBE (1989): Mechanistic Aspects of Cytochrome P450-Hydroperoxide Interactions: Substituent Effects on Degradative Pathways, *Drug Metab. Rev.* **20**, 365-378.
- THURSTON, J.H., J.E. CARROLL, W.E. DODSON, R.E. HAUHART and V. TASCH (1983a): Chronic Valproate Administration Reduces Fasting Ketonemia in Children, *Neurology* **33**, 1348-1350.
- THURSTON, J.H., J.E. CARROLL, R.E. HAUHART and J.A. SCHIRO (1985): A Single Therapeutic Dose of Valproate Affects Liver Carbohydrate, Fat, Adenylate, Amino Acid, Coenzyme A, and Carnitine Metabolism in Infant Mice: Possible Clinical Significance, *Life Sci.* **36**, 1643-1651.
- THURSTON, J.H., J.E. CARROLL, B.J. NORRIS, R.E. HAUHART and J.A. SCHIRO (1983b): Acute *in vivo* and *in vitro* Inhibition of Palmitic Acid and Pyruvate Oxidation by Valproate and Valproyl-Coenzym A in Livers of Infant Mice, *Ann. Neurol.* **14**, 384-385.
- THURSTON, J.H., and R.E. HAUHART (1992): Amelioration of Adverse Effects of Valproic Acid on Ketogenesis and Liver Coenzym A Metabolism by Cotreatment With Pantothenate and Carnitine in Developing Mice: Possible Clinical Significance, *Pediatr. Res.* **31**, 419-423.

- THURSTON, J.H., R.E. HAUHART, D.W. SCHULZ, E.F. NACCARATO, W.E. DODSON und J.E. CARROLL (1981): Chronic Valproate Administration Produces Hepatic Dysfunction and May Delay Brain Maturation in Infant Mice, *Neurology* **31**, 1063-1069.
- TRIBBLE, D.L., T.Y. AW und D.P. JONES (1987): The Pathophysiological Significance of Lipid Peroxidation in Oxidative Cell Injury, *Hepatology* **7**, 377-387.
- TRIPP, J.H., T. HARGREAVES, P.P. ANTHONY, J.F. SEARLE, P. MILLER, J.V. LEONARD, A.D. PATRICK und V.G. OBERHOLZER (1981): Sodium Valproate and Ornithin Carbamoyl Transferase Deficiency, *Lancet* (23. Mai), 1165-1166.
- TROST, L.C., und J.J. LEMASTERS (1996): The Mitochondrial Permeability Transition: A New Pathophysiological Mechanism For Reye's Syndrome and Toxic Liver Injury, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 1000-1005.
- TURNBULL, D.M., A.J. BONE, K. BARTLETT, P.P. KOUNDAKJIAN und H.S.A. SHERRATT (1983a): The Effect of Valproate on Intermediary Metabolism in Isolated Rat Hepatocytes and Intact Rats, *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1887-1892.
- TURNBULL, D.M., M.D. RAWLINS, D. WEIGHTMAN und D.W. CHADWICK (1983b): Plasma Concentrations of Sodium Valproate: Their Clinical Value, *Ann. Neurol.* **14**, 38-42.
- UNGEMACH, F.R. (1982): Untersuchungen über die Schädigung der Plasmamembran von Hepatozyten nach Lipidperoxidation, unveröffentlichte Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- UNGEMACH, F.R. (1987): Pathobiochemical Mechanisms of Hepatocellular Damage Following Lipid Peroxidation, *Chem. Phys. Lipids* **45**, 171-205.
- VAMECQ, J., L. VALLEE, M. FONTAINE, D. LAMBERT, J. POUPAERT und J.-P. NUYTS (1993): CoA Esters of Valproic Acid and Related Metabolites are Oxidized in Peroxisomes Through a Pathway Distinct From Peroxisomal Fatty and Bile Acyl-CoA β -Oxidation, *FEBS Lett.* **322**, 95-101.
- VERITY, C.M., G. HOSKING und D.J. EASTER (1995): A Multicentre Comparative Trial of Sodium Valproate and Carbamazepine in Paediatric Epilepsy, *Dev. Med. Child Neurol.* **37**, 97-108.
- VISENTIN, M., M. SALMONA und M.T. TACCONI (1995): Reye's and Reye-Like Syndromes, Drug-Related Diseases? (Causative Agents, Etiology, Pathogenesis, and Therapeutic Approaches), *Drug Metab. Rev.* **27**, 517-539.
- DE VIVO, D.C., und I. TEIN (1990): Primary and Secondary Disorders of Carnitine Deficiency, *Int. Pediatr.* **5**, 134-141.
- WADA, F., M. USAMI, M. GOTO und Y. SAKAMOTO (1971), *Proc. Symp. Chem. Physiol. Pathol.* **11**. Zitiert nach KUHARA, T., und I. MATSUMOTO (1974).
- WAHLLÄNDER, A., S. SOBOLL, H. SIES, I. LINKE und M. MÜLLER (1979): Hepatic Mitochondrial and Cytosolic Glutathione Content and the Subcellular Distribution of GSH-S-Transferases, *FEBS Lett.* **97**, 138-140.
- WANDERS, R.J.A., C.W.T. VAN ROERMUND, R.B.H. SCHUTGENS, P.G. BARTH, H.S.A. HEYMANS, H. VAN DEN BOSCH und J.M. TAGER (1990): The Inborn Errors of Peroxisomal β -Oxidation. A Review, *J. Inherited Metab. Dis.* **13**, 4-36.
- WEIS, M., E.N. KASS, S. ORRENIUS und P. MOLDEÚS (1992): N-Acetyl-p-Benzoquinone Imine Induces Ca^{2+} Release From Mitochondria by Stimulating Pyridine Nucleotide Hydrolysis, *J. Biol. Chem.* **267**, 804-809.
- WEISS, R.H., und R.W. ESTABROOK (1986): The Mechanism of Cumene Hydroperoxide-Dependent Lipidperoxidation: The Significance of Oxygen Uptake, *Arch. Biochem. Biophys.* **251**, 336-347.
- WEISS, E., I. STERZ, M. FRIMMER und R. KROKER (1973): Electron Microscopy of Isolated Rat Hepatocytes Before and After Treatment With Phalloidin, *Beitr. Path.* **150**, 345-356.

- WILDER, B.J. (1987): Treatment Consideration in Anticonvulsant Monotherapy, *Epilepsia* **28** (Suppl. 2), S1-S7.
- WILDER, B.J. (1995): The Treatment of Epilepsy: An Overview of Clinical Practices, *Neurology* **45**, S7-S11.
- WILDER, B.J., und R.W. HURD (1991): Free Radical Scavenger Deficiency and Valproic Acid, In: LEVY, R.H., und J.K. PENRY (1991), 89-96.
- WILLIAMS, C.A., S. TIEFENBACH und J.W. MCREYNOLDS (1984): Valproic Acid-Induced Hyperammonemia in Mentally Retarded Adults, *Neurology* **34**, 550-553.
- WILLIAMSON, J.M., B. BOETTCHER und A. MEISTER (1982): Intracellular Cysteine Delivery System That Protects Against Toxicity by Promoting Glutathione Synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6246-6249.
- WILLMORE, L.J. (1991): Clinical Manifestations of Valproate Hepatotoxicity, In: LEVY, R.H., und J.K. PENRY (1991), 3-7.
- WILLMORE, L. J., B.J. WILDER, J. BRUNI und H.J. VILLARREAL (1978): Effect of Valproic acid on Hepatic Function, *Neurology* **28**, 961-964.
- WOUWE, J.P. VAN (1995): Carnitine Deficiency During Valproic Acid Treatment, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **65**, 211-214.
- YAO, K., A.M. FALICK, N. PATEL und M.A. CORREIA (1993): Cumene Hydroperoxide-Mediated Inactivation of Cytochrome P450 2B1, *J. Biol. Chem.* **268**, 59-65.
- YOUNES, M., und C.-P. SIEGERS (1980): Lipid Peroxidation as a Consequence of Glutathione Depletion in Rat and Mouse Liver, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **27**, 119-128.
- YOUNES, M., und C.-P. SIEGERS (1981): Mechanistic Aspects of Enhanced Lipid Peroxidation Following Glutathione Depletion *in vivo*, *Chem. Biol. Interact.* **34**, 257-266.
- YOUNG, S.K., I. BERGMAN, D.L. GANG und E.P. RICHARDSON (1980): Fatal Reye-Like Syndrome Associated With Valproic Acid, *Ann. Neurol.* **7**, 389.
- YU, H.-Y., und Y.-Z. SHEN (1992): Dose-Dependent Inhibition in Plasma Protein Binding of Valproic Acid During Continued Treatment in Guinea-Pigs, *J. Pharm. Pharmacol.* **44**, 408-412.
- YUAN, C., K.E. PENTTILÄ, G. ALFTHAN und K.O. LINDROS (1991): Role of Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase in Protecting against t-Butyl Hydroperoxide-Induced Damage in Hepatocytes, *Pharmacol. Toxicol.* **68**, 196-200.
- ZACCARA, G., A. MESSORI und F. MORONI (1988): Clinical Pharmacokinetic of Valproic Acid - 1988, *Clin. Pharmacokinet.* **15**, 367-389.
- ZAFRANI, E.S., und P. BERTHELOT (1982): Sodium Valproate in the Induction of Unusual Hepatotoxicity, *Hepatology* **2**, 648-649.
- ZARET, B.S., R.R. BECKNER, A.M. MARINI, W. WAGLE und C. PARSARELLI (1982): Valproate-Induced Hyperammonemia Without Clinical Hepatic Dysfunction, *Neurology* **32**, 206-208.
- ZIMMERMAN, C.L., I.H. PATEL, R.H. LEVY, D. EDWARDS, S.D. NELSON und M. HUTCHINSON (1981): Protein Binding of Valproic Acid in the Presence of Elevated Free Fatty Acids in Patient and Normal Human Serum, *Epilepsia* **22**, 11-17.
- ZIMMERMAN, H.J. (1991): Lesions of Drug-Induced Liver Disease and Valproate Toxicity, In: LEVY, R.H., und J.K. PENRY (1991), 31-45.
- ZIMMERMAN, H.J., und K.G. ISHAK (1982): Valproate-Induced Hepatic Injury: Analyses of 23 Fatal Cases, *Hepatology* **2**, 591-597.

9 Anhang: Tabellen der Vitalitäts- und Funktionalitätsparameter / VPA- und Metabolitenwerte

Tabelle 9-1: Behandlungs- und Kontrollgruppen der ersten Versuchsreihe

Gruppen	Substanzen zur Behandlung			Gruppengröße (Vitalitätsparameter)		Ansätze pro Gruppe (GC/MS)	
	VPA in mM	CuOOH in μ M	<i>t</i> -BuOOH in μ M	ohne Hungern	mit Hungern	ohne Hungern	mit Hungern
KV	Krebs	Krebs		6	9	-	-
KCT	Krebs	DMFA		6	8	-	-
C50	Krebs	50	-	6	6	-	-
C100	Krebs	100	-	5	9	-	-
T200	Krebs	-	200	1	5	-	-
T400	Krebs	-	400	6	7	-	-
V1	1	Krebs		6	8	5	6
V2,5	2,5	Krebs		-	6	-	-
V5	5	Krebs		6	7	6	5
V10	10	Krebs		7	8	5	4
V1C50	1	50	-	-	6	-	-
V1C100	1	100	-	6	7	5	5
V1T400	1	-	400	6	7	6	7
V2,5C50	2,5	50	-	-	5	-	-
V2,5C100	2,5	100	-	-	5	-	-
V5C50	5	50	-	5	6	-	-
V5C100	5	100	-	8	11	6	5
V10C50	10	50	-	8	9	5	5
V10C100	10	100	-	10	11	5	8
V10T200	10	-	200	6	6	5	5
V10T400	10	-	400	7	7	6	6

Tabelle 9-2: Behandlungs- und Kontrollgruppen der zweiten Versuchsreihe

Gruppen	Substanzen zur Behandlung		Gruppengröße (Vitalitätsparameter)		Ansätze pro Gruppe (GC/MS)	
	BrH in μ M	VPA in mM	ohne Hungern	mit Hungern	ohne Hungern	mit Hungern
KB	DMFA	Krebs	6	6	-	-
B500	500	-	6	6	-	-
B500V1	500	1	6	6	6	6
B500V10	500	10	6	5	6	5

Tabelle 9-3: Trypanblautest in % aller Behandlungsgruppen beim Ernährungszustand ohne Hungern

Zeit in min	0		30		60		120		150		180		210		240		270	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
KV, oH	81,85	3,66			82,63	4,64	79,27	3,29	80,62	3,00	79,02	3,52	77,28	4,71	77,33	3,25	77,82	1,97
KCT, oH	86,57	2,96			85,00	4,25	83,42	2,72	82,68	5,75	83,02	4,12	82,25	5,18	78,43	2,04	81,58	3,53
C50, oH	82,27	6,53			81,12	3,24	80,58	3,78	81,13	3,72	79,03	3,14	80,15	3,86	79,53	4,46	79,90	3,74
C100, oH	83,36	5,29			83,50	6,16	80,68	3,33	79,86	1,51	79,74	1,62	78,72	0,84	78,70	2,22	79,90	1,48
T200, oH	88,70				80,50		84,50		82,60		82,90		75,70		83,50		81,70	
T400, oH	85,53	4,81			82,90	2,83	80,37	2,10	81,18	2,11	81,23	4,45	82,48	2,24	82,63	2,25	82,80	1,79
V1, oH	83,48	4,89			82,95	2,60	82,38	2,55	82,18	4,29	81,28	3,10	81,82	3,25	81,53	3,95	80,25	5,07
V5, oH	82,78	5,24			81,78	3,87	79,90	3,61	79,15	2,96	77,82	1,86	77,62	2,25	77,43	2,63	77,93	3,37
V10, oH	82,56	4,69			81,63	3,64	79,96	2,42	77,34	4,42	78,17	2,76	76,99	4,71	77,26	5,16	76,31	2,93
V1C100, oH	82,62	4,67			80,97	4,22	81,15	4,40	80,65	4,86	80,37	4,40	79,23	3,91	80,08	3,90	78,33	4,35
V1T400, oH	82,78	4,22			81,23	2,09	81,73	1,46	81,48	2,80	82,58	2,96	81,55	3,06	81,20	2,31	80,43	3,66
V5C50, oH	82,12	3,81			83,12	3,35	79,44	3,61	78,04	3,69	76,84	7,05	77,86	4,30	75,22	9,11	76,14	6,11
V5C100, oH	81,76	2,01			79,43	4,51	77,36	3,74	73,79	4,12	75,54	4,66	75,51	4,56	75,36	6,02	73,55	4,24
V10C50, oH	82,81	3,07			82,20	3,32	78,91	4,27	76,71	4,50	76,14	4,52	76,39	2,70	74,44	6,43	76,50	3,29
V10C100, oH	82,02	3,74			79,31	3,64	78,63	4,11	74,48	4,58	74,25	4,78	74,52	4,44	74,98	4,09	74,66	4,36
V10T200, oH	80,75	2,18			79,02	2,16	80,18	2,27	78,53	1,75	76,05	3,75	76,45	3,32	78,63	3,83	78,48	3,82
V10T400, oH	82,16	3,94			80,89	3,20	80,64	3,64	77,96	3,17	76,13	3,77	76,13	4,47	76,67	6,18	76,71	6,89
KB, oH	87,38	3,69	84,32	2,87	84,35	2,75	81,50	2,31	81,17	2,63	81,60	3,06	81,12	1,57	83,73	3,51	84,05	5,14
B500, oH	83,12	4,15	82,43	2,02	80,97	1,42	80,98	0,99	81,45	2,96	79,53	1,09	77,35	2,56	78,28	1,39	78,53	2,33
B500V1, oH	82,72	4,38	84,40	3,13	80,43	4,41	70,88	1,88	69,55	3,55	70,67	5,92	70,48	2,61	76,18	5,45	77,67	4,28
B500V10, oH	81,93	4,56	80,97	4,08	78,73	3,38	57,58	12,44	49,30	10,29	42,17	10,38	39,65	9,28	24,10	15,79	16,30	16,45

Tabelle 9-4: Trypanblautest in % aller Behandlungsgruppen beim Ernährungszustand mit Hungern

Zeit in min	0		30		60		120		150		180		210		240		270	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
KV, mH	82,06	5,47			79,97	5,13	74,95	8,82	75,85	13,42	78,59	7,29	75,34	7,48	77,95	5,48	77,13	4,78
KCT, mH	82,79	5,75			80,38	6,95	78,17	5,41	80,47	5,04	77,55	4,51	76,78	4,16	77,12	5,61	76,25	6,51
C50, mH	82,55	3,46			77,63	6,44	77,72	7,39	75,35	4,06	76,05	5,87	76,56	6,91	74,27	6,47	77,94	8,73
C100, mH	83,34	3,76			81,43	3,22	81,98	3,51	80,44	3,24	76,25	4,33	77,23	7,95	74,45	6,20	77,76	10,36
T200, mH	78,32	2,50			78,74	2,17	77,44	2,09	77,74	1,95	77,12	1,59	77,28	1,55	80,08	2,53	79,26	3,46
T400, mH	81,16	2,41			78,80	1,24	78,51	1,67	79,39	2,87	78,44	1,12	77,40	2,05	78,47	3,09	79,71	3,08
V1, mH	83,04	3,15			79,35	3,12	79,13	3,05	80,18	4,51	80,80	4,66	79,38	5,39	80,49	3,80	80,33	3,55
V2,5, mH	85,00	2,13			81,05	5,06	81,08	4,69	80,33	5,15	81,22	4,34	81,28	5,62	78,62	6,70	81,25	5,67
V5, mH	84,66	2,00			83,77	5,10	82,39	5,46	81,79	5,61	81,19	5,62	80,87	7,49	84,74	4,77	81,01	5,18
V10, mH	81,96	3,83			79,18	1,77	77,02	4,73	78,20	3,37	75,68	6,10	71,52	12,00	72,28	6,43	70,89	5,20
V1C50, mH	82,75	2,55			79,60	1,56	79,73	2,27	78,72	1,97	78,00	2,98	78,83	5,90	79,57	5,94	75,80	5,39
V1C100, mH	80,22	3,79			79,60	2,24	78,20	3,87	77,13	3,37	76,31	2,85	74,29	2,94	76,27	10,48	76,71	7,16
V1T400, mH	79,49	1,64			78,37	0,92	76,67	1,45	69,76	3,54	66,77	4,81	66,76	0,98	64,10	5,39	60,73	4,82
V2,5C50, mH	79,62	1,33			83,50	7,16	81,32	6,51	80,06	6,82	78,70	7,44	79,30	6,45	77,94	7,44	78,90	6,89
V2,5C100, mH	78,16	1,90			77,96	2,63	77,78	2,79	74,34	5,45	74,52	5,91	74,26	6,55	71,62	4,10	71,82	3,55
V5C50, mH	81,92	2,90			79,70	7,60	79,57	6,14	76,93	6,25	76,35	7,77	74,93	6,34	71,72	9,43	62,99	10,38
V5C100, mH	82,16	3,19			79,05	3,24	78,20	2,48	73,05	6,06	63,52	16,97	61,27	20,42	56,43	24,69	47,92	25,70
V10C50, mH	79,19	2,97			76,53	3,71	71,90	6,37	62,51	16,92	53,74	20,48	51,39	21,07	32,18	19,89	26,88	17,89
V10C100, mH	82,48	4,60			79,12	5,74	74,30	11,21	45,38	26,87	27,70	27,31	15,89	24,90	16,51	26,66	14,33	23,64
V10T200, mH	79,30	1,43			78,63	0,72	77,33	0,87	74,40	3,84	68,63	4,33	64,63	6,30	63,32	11,57	61,87	5,40
V10T400, mH	80,76	1,78			77,30	2,31	76,11	2,40	71,11	3,72	65,40	8,20	46,13	24,81	16,83	13,39	5,51	5,37
KB, mH	82,47	2,09	80,80	3,55	79,70	2,17	80,88	3,29	80,67	2,58	79,77	1,82	78,98	3,68	76,10	3,04	77,02	3,95
B500, mH	78,17	4,47	78,45	2,52	79,02	1,66	78,28	3,42	77,18	2,51	73,60	3,00	75,20	2,01	73,27	2,79	74,43	3,37
B500V1, mH	78,63	2,85	74,42	5,63	74,05	5,74	65,70	5,51	51,48	8,58	51,10	7,65	48,83	7,76	18,38	14,74	13,45	14,97
B500V10, mH	76,74	1,49	72,68	2,28	68,84	4,69	42,90	19,18	24,98	14,27	4,10	9,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 9-5: LDH in mU/mg Zellen aller Behandlungsgruppen beim Ernährungszustand ohne Hungern

Zeit in min	0		30		60		120		150		180		210		240		270	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
KV, oH	44,05	13,78			45,32	13,52	46,73	13,15	46,87	13,87	48,07	12,84	51,46	15,05	54,19	17,29	55,17	14,20
KCT, oH	36,19	4,39			34,29	3,77	37,32	7,25	34,52	4,83	37,58	6,14	37,80	5,65	39,33	6,75	43,37	9,75
C50, oH	38,45	10,30			40,45	9,58	41,00	8,18	40,20	8,12	38,24	8,63	41,95	9,80	42,93	8,66	46,10	11,23
C100, oH	37,64	3,02			38,81	4,64	39,59	5,03	42,87	4,79	43,39	4,76	47,33	3,69	47,06	3,81	46,28	4,44
T200, oH	26,55				33,10		36,34		41,30		41,95		42,61		38,67		43,92	
T400, oH	28,62	3,77			32,81	11,25	34,29	7,79	32,63	6,96	34,67	8,89	34,27	8,01	37,11	9,37	37,87	12,12
V1, oH	39,24	11,60			41,21	11,89	41,21	14,64	40,20	15,71	41,62	14,48	43,04	16,10	41,95	13,97	44,90	14,35
V5, oH	43,09	11,78			43,70	16,18	46,73	16,56	48,62	12,20	48,62	12,98	52,99	14,16	53,97	17,34	60,74	21,34
V10, oH	40,89	12,63			42,15	12,28	45,62	13,41	46,17	12,89	46,54	13,52	49,54	17,74	52,81	18,51	55,90	15,83
V1C100, oH	44,64	9,76			43,37	12,49	44,67	13,93	46,76	14,96	46,21	12,54	47,96	13,55	49,27	12,41	52,11	13,89
V1T400, oH	26,19	3,58			29,82	7,04	27,15	4,62	31,43	4,41	30,15	3,26	32,08	4,45	31,54	4,34	35,40	6,02
V5C50, oH	39,25	12,50			41,41	10,94	41,80	9,62	43,66	9,11	45,36	11,17	46,28	11,51	45,36	9,05	47,98	11,27
V5C100, oH	42,97	10,94			46,81	12,39	47,62	11,83	50,14	13,20	51,87	10,80	52,03	9,48	54,82	11,36	62,07	14,47
V10C50, oH	36,48	2,08			41,78	5,53	42,02	4,98	44,66	4,40	47,93	5,51	50,47	5,35	52,03	8,35	54,90	7,35
V10C100, oH	43,73	14,24			48,16	15,08	51,27	12,94	54,54	14,65	56,57	14,11	60,96	13,71	61,42	12,43	67,06	16,01
V10T200, oH	28,81	2,46			34,83	7,26	35,26	9,26	39,66	7,00	39,44	8,96	42,83	8,77	42,61	8,66	46,21	9,55
V10T400, oH	27,48	3,26			33,07	7,99	34,46	9,39	37,24	7,47	39,80	9,93	40,86	7,48	43,61	12,11	50,32	12,82
KB, oH	27,68	7,16	26,47	7,60	28,51	6,76	28,51	5,91	29,75	4,51	34,41	8,26	27,64	8,63	34,05	7,14	34,92	5,79
B500, oH	28,17	3,57	30,70	5,92	33,94	7,09	37,95	5,36	40,09	7,65	41,62	7,17	40,42	7,37	41,51	10,51	44,61	4,60
B500V1, oH	31,62	6,62	35,80	6,80	35,69	8,28	37,40	10,81	42,97	7,38	40,79	10,91	44,17	8,57	45,27	10,25	46,50	9,51
B500V10, oH	34,16	4,63	33,94	7,51	38,75	4,63	39,73	1,90	45,63	5,82	49,89	7,24	51,46	7,53	52,99	7,51	57,36	8,12

Tabelle 9-6: LDH in mU/mg Zellen aller Behandlungsgruppen beim Ernährungszustand mit Hungern

Zeit in min	0		30		60		120		150		180		210		240		270	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
KV, mH	37,24	10,59			45,12	14,32	47,23	15,44	49,13	18,08	45,65	10,73	48,34	14,04	48,81	12,36	51,66	13,70
KCT, mH	36,70	9,83			40,85	12,72	45,97	16,31	44,94	15,84	47,17	13,93	47,11	14,27	47,88	18,33	51,82	20,33
C50, mH	36,44	9,05			39,70	9,40	41,54	7,17	41,59	8,54	43,68	11,17	45,11	11,25	47,42	16,15	52,23	14,11
C100, mH	34,22	8,32			38,88	10,66	41,49	13,73	38,48	14,06	42,86	10,88	47,59	15,42	47,10	15,81	48,30	17,65
T200, mH	31,27	6,92			39,33	7,85	35,82	13,00	41,34	8,69	41,07	4,12	42,52	8,08	45,28	10,44	49,87	8,09
T400, mH	30,68	8,33			37,27	9,81	39,50	9,09	38,86	9,77	41,11	10,45	43,08	9,53	44,01	8,85	47,29	10,28
V1, mH	29,94	4,81			30,72	7,27	33,59	7,12	33,24	7,97	36,63	7,20	35,12	8,33	37,36	9,59	40,37	15,25
V2,5, mH	43,30	13,97			45,14	13,38	44,89	14,96	48,29	18,38	50,14	16,33	51,35	16,53	52,00	16,50	52,91	18,44
V5, mH	35,01	10,63			37,02	10,10	39,68	8,68	41,80	10,49	42,48	11,08	43,54	11,86	49,57	14,63	52,06	14,80
V10, mH	34,96	11,58			43,73	15,03	45,93	15,52	47,21	14,57	48,44	11,95	50,10	14,52	52,19	22,77	52,62	20,85
V1C50, mH	32,38	5,95			36,45	7,40	41,00	8,42	38,78	8,17	42,13	5,80	44,76	11,15	48,94	14,67	49,89	15,48
V1C100, mH	34,63	7,88			36,22	7,23	39,00	6,39	40,07	7,57	41,99	9,92	44,46	12,87	44,14	10,90	48,72	13,25
V1T400, mH	43,41	7,25			44,97	6,64	47,19	9,57	49,91	10,54	51,97	7,45	61,52	13,50	69,48	15,82	92,94	25,70
V2,5C50, mH	31,03	2,38			34,92	7,35	38,03	8,23	40,77	10,85	41,43	11,35	41,74	7,94	45,36	9,85	56,11	20,09
V2,5C100, mH	33,85	4,20			37,95	8,75	41,15	8,76	43,00	9,75	45,52	12,00	49,82	11,86	51,78	11,97	67,78	21,31
V5C50, mH	37,09	4,26			37,32	6,11	40,24	6,02	40,97	5,96	44,90	8,74	46,21	7,01	53,31	8,95	61,62	9,78
V5C100, mH	41,96	9,81			42,36	12,21	45,31	13,66	50,17	11,18	70,69	49,97	92,60	62,21	103,78	58,14	118,29	63,85
V10C50, mH	44,25	10,84			46,66	9,56	52,06	12,11	53,31	12,08	54,84	13,45	60,01	13,00	66,57	16,44	72,79	19,55
V10C100, mH	36,81	9,40			46,01	12,13	51,01	13,87	82,56	59,77	137,02	54,17	152,28	49,35	161,60	54,00	170,89	51,53
V10T200, mH	38,65	9,76			46,73	9,70	46,84	15,44	46,65	14,60	53,26	16,41	53,26	12,50	72,32	25,28	95,26	50,57
V10T400, mH	34,14	9,64			38,48	9,47	43,39	8,56	43,82	8,60	51,64	11,40	90,83	52,03	158,25	63,34	235,46	26,11
KB, mH	38,73	5,79	42,06	2,79	42,83	6,87	47,30	5,49	46,21	7,64	46,54	4,45	48,51	5,98	47,63	5,78	50,69	3,18
B500, mH	35,65	5,32	42,72	8,27	45,78	8,47	50,04	7,66	48,62	10,40	49,27	7,96	52,22	4,05	52,55	6,49	53,31	7,46
B500V1, mH	41,22	7,95	45,99	6,33	48,62	7,39	53,20	4,61	54,73	9,11	53,86	6,07	63,80	9,04	63,58	12,56	68,72	10,85
B500V10, mH	37,30	9,98	47,06	9,56	49,03	5,29	56,77	11,15	58,77	7,10	62,05	8,67	75,56	10,04	92,09	13,33	120,83	19,03

Tabelle 9-7: Intrazellulärer K⁺-Gehalt in mmol/l ZW aller Behandlungsgruppen beim Ernährungszustand ohne Hungern

Zeit in min	0		30		60		120		150		180		210		240		270	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
KV, oH	85,52	7,48			88,42	6,73	89,79	5,85	91,44	7,68	90,81	6,01	94,25	8,45	89,94	12,19	97,28	7,38
KCT, oH	81,96	10,51			84,26	11,05	84,31	3,84	89,32	9,32	87,21	4,03	89,74	7,28	91,12	9,65	90,27	11,31
C50, oH	85,85	9,74			93,32	11,78	94,69	12,84	92,74	9,29	95,92	9,75	94,67	11,95	95,30	14,62	94,91	14,62
C100, oH	90,14	5,60			88,79	8,78	91,33	3,85	90,43	5,58	90,89	1,82	92,86	3,74	89,84	3,90	91,89	5,47
T200, oH	91,90				86,00		86,31		90,88		103,50		115,52		91,67		90,92	
T400, oH	90,27	6,77			82,12	7,59	94,35	17,12	95,31	5,66	90,74	4,94	91,49	6,25	92,87	3,10	89,97	4,35
V1, oH	97,42	9,39			91,43	11,62	86,15	4,52	87,65	7,56	89,92	7,21	89,73	4,31	85,04	4,83	88,27	5,20
V5, oH	93,52	4,05			95,84	6,89	96,26	7,38	94,29	8,96	96,77	11,59	92,56	10,35	92,82	10,47	97,40	11,37
V10, oH	94,75	8,60			102,22	9,08	97,54	9,84	98,43	10,51	98,43	10,87	97,35	10,51	95,27	9,18	98,79	10,98
V1C100, oH	89,63	5,98			93,65	12,34	89,44	7,91	90,45	7,66	89,24	6,85	90,36	8,93	93,27	4,03	88,72	8,72
V1T400, oH	84,91	10,58			81,09	9,27	84,39	9,24	95,78	6,50	91,83	5,99	91,36	8,88	87,55	8,66	89,35	14,17
V5C50, oH	91,39	10,34			88,15	12,47	83,20	8,74	81,46	5,94	81,21	8,18	85,85	14,19	86,65	13,59	86,22	13,75
V5C100, oH	92,01	11,53			95,67	9,06	93,71	8,17	94,62	4,34	91,82	8,64	89,37	6,15	89,22	5,89	87,22	8,73
V10C50, oH	93,32	15,01			95,44	11,69	96,12	10,65	95,46	9,37	94,36	9,86	94,50	9,26	91,20	8,81	92,80	9,71
V10C100, oH	98,27	6,79			108,18	17,61	99,62	6,90	96,75	6,71	93,92	3,31	96,17	9,41	92,50	4,61	93,99	6,37
V10T200, oH	86,74	11,67			85,85	6,12	92,31	8,81	93,20	8,77	92,51	9,43	93,89	12,67	90,23	9,51	93,97	8,48
V10T400, oH	85,57	7,34			84,27	6,22	89,49	8,98	84,56	13,01	79,43	11,79	77,72	14,67	75,35	17,45	69,82	18,35
KB, oH	94,12	11,12	96,93	16,18	91,63	9,58	93,10	10,20	95,37	8,90	96,35	5,30	96,39	12,91	95,74	10,00	95,03	6,18
B500, oH	95,48	13,57	96,70	12,46	92,91	14,52	88,41	9,40	94,62	12,23	90,21	15,42	93,43	11,14	95,46	10,00	96,34	10,31
B500V1, oH	96,17	11,52	96,53	12,17	94,67	13,30	91,93	10,35	87,05	13,62	90,93	17,94	91,87	4,78	90,30	6,33	94,55	9,71
B500V10, oH	91,00	14,11	93,60	9,18	91,71	7,69	91,93	5,73	87,07	6,76	87,89	7,33	86,45	5,19	87,91	6,52	89,55	7,18

Tabelle 9-8: Intrazellulärer K⁺-Gehalt in mmol/l ZW aller Behandlungsgruppen beim Ernährungszustand mit Hungern

Zeit in min	0		30		60		120		150		180		210		240		270	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
KV, mH	74,18	13,90			79,61	15,58	87,37	21,64	85,90	15,23	79,23	14,94	86,12	14,76	85,40	9,80	90,11	9,69
KCT, mH	71,99	18,23			76,92	16,28	86,69	17,95	78,52	14,64	80,64	17,55	79,79	11,25	81,70	4,13	83,94	5,77
C50, mH	82,80	7,76			88,85	9,30	95,36	16,43	94,61	9,86	91,42	11,37	90,28	8,36	100,38	6,77	102,33	7,50
C100, mH	80,25	21,10			91,17	14,09	82,75	10,84	86,87	21,85	88,11	22,98	79,26	11,97	79,61	7,72	85,96	14,14
T200, mH	74,36	7,64			84,31	12,41	83,19	11,21	83,13	11,52	79,46	13,30	85,12	8,50	86,21	9,70	90,72	14,52
T400, mH	73,84	9,22			83,57	10,75	79,01	9,96	75,67	9,96	79,91	9,44	79,07	11,91	79,14	8,95	84,15	10,66
V1, mH	79,29	14,86			88,18	10,14	85,70	12,76	87,71	10,56	85,87	14,95	87,45	15,93	83,56	15,40	87,59	13,79
V2,5, mH	76,95	10,33			83,45	6,73	86,89	4,77	84,27	8,24	85,33	13,66	86,89	11,83	86,34	11,45	86,34	11,52
V5, mH	88,52	13,36			92,96	7,06	90,54	8,19	95,45	8,50	95,25	9,79	95,02	9,29	92,52	9,15	93,72	10,04
V10, mH	75,00	17,01			87,10	15,35	77,85	18,85	88,51	10,83	90,21	16,17	90,18	20,31	85,52	7,51	81,08	5,80
V1C50, mH	89,25	13,42			90,94	11,19	88,58	15,34	93,75	12,15	89,41	13,13	91,10	18,50	88,24	11,07	90,23	14,66
V1C100, mH	70,60	13,24			82,90	19,24	88,44	5,04	89,51	7,94	94,27	8,77	91,85	10,27	94,60	9,80	93,54	9,97
V1T400, mH	75,94	11,66			76,71	8,94	74,35	9,60	63,30	10,60	59,67	10,09	56,42	12,65	51,32	13,98	46,12	16,38
V2,5C50, mH	86,36	8,63			94,83	11,49	92,14	6,55	100,45	5,48	98,11	5,09	98,29	6,29	94,82	4,49	96,66	10,89
V2,5C100, mH	88,02	8,54			94,87	5,71	89,29	6,72	96,26	4,48	92,31	6,19	93,78	4,05	93,60	7,68	90,00	6,84
V5C50, mH	82,53	9,40			96,00	7,15	95,44	7,34	97,93	10,73	92,83	4,19	91,81	5,66	91,61	4,88	85,58	5,54
V5C100, mH	91,99	14,28			99,17	11,63	97,72	4,45	84,85	15,80	81,04	26,26	72,92	26,85	76,94	29,70	68,35	28,49
V10C50, mH	89,20	10,91			105,31	13,32	102,20	18,04	92,69	14,76	98,43	15,59	82,92	13,25	82,29	11,94	83,55	16,48
V10C100, mH	82,40	12,80			91,99	15,16	86,00	13,47	49,12	24,49	41,82	28,06	27,48	21,86	39,99	29,24	25,14	21,65
V10T200, mH	70,39	12,99			80,66	12,07	85,22	10,66	75,82	15,79	69,03	9,67	61,88	15,25	56,77	14,37	46,46	15,28
V10T400, mH	69,97	6,99			81,27	11,38	83,34	13,01	61,57	7,15	46,24	13,92	23,99	6,93	18,12	7,65	17,23	8,38
KB, mH	72,37	7,45	76,08	7,05	81,57	4,60	85,04	7,45	85,33	4,32	86,53	3,27	93,16	9,78	91,52	8,34	82,90	13,62
B500, mH	82,48	7,55	81,13	8,67	84,96	7,07	81,67	7,75	83,42	6,17	83,17	2,61	86,11	10,68	84,40	3,71	89,79	5,80
B500V1, mH	81,23	6,53	85,89	6,55	87,85	4,27	83,45	3,69	84,96	6,37	83,62	3,82	84,06	4,99	83,82	2,49	83,99	4,42
B500V10, mH	80,43	3,54	86,41	5,10	80,10	10,57	85,66	6,30	83,89	7,44	81,04	5,23	73,95	6,66	68,10	6,40	53,60	7,72

Tabelle 9-9: Intrazellulärer Na⁺-Gehalt in mmol/l ZW aller Behandlungsgruppen beim Ernährungszustand ohne Hungern

Zeit in min	0		30		60		120		150		180		210		240		270	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
KV, oH	17,43	4,12			14,28	2,11	14,15	3,03	14,11	2,81	14,43	2,39	16,01	6,38	14,37	4,42	15,50	4,74
KCT, oH	16,94	3,62			15,19	2,84	15,24	2,78	15,56	3,31	14,72	2,41	14,77	2,76	14,76	1,18	16,33	1,21
C50, oH	19,52	4,71			14,52	4,63	14,82	5,35	13,15	4,42	15,65	4,85	13,84	4,94	15,21	6,80	16,53	3,55
C100, oH	17,70	2,91			15,43	1,98	16,42	2,28	14,97	2,08	14,35	3,37	15,78	3,75	15,25	4,20	17,36	4,39
T200, oH	24,65				11,23		14,71		10,54		10,56		19,04		14,59		9,65	
T400, oH	19,47	4,27			16,07	3,90	17,14	3,61	16,07	1,42	14,37	1,62	13,78	2,99	14,33	2,13	13,64	3,61
V1, oH	21,55	8,62			12,86	3,79	13,97	4,35	13,66	3,86	14,00	4,06	13,20	4,59	12,75	5,31	14,57	4,12
V5, oH	16,01	3,37			14,92	3,68	15,33	4,40	14,42	2,02	15,50	3,84	15,02	2,92	14,37	3,78	18,15	5,02
V10, oH	16,91	7,25			18,67	8,25	18,59	4,04	17,15	5,98	16,48	5,46	17,49	6,08	17,96	6,17	18,33	5,27
V1C100, oH	21,98	5,81			15,84	2,26	13,78	3,35	14,53	1,73	15,44	2,95	14,45	2,40	16,99	3,74	15,94	3,28
V1T400, oH	18,78	1,07			16,16	6,40	15,83	2,55	16,89	4,52	15,95	3,67	18,16	6,19	16,21	5,36	16,38	7,36
V5C50, oH	21,08	9,68			13,79	5,19	12,44	5,69	13,58	5,55	12,21	4,77	16,11	7,14	16,72	8,06	15,69	8,07
V5C100, oH	15,37	3,96			14,30	4,74	14,27	4,96	15,40	5,03	15,43	5,75	15,40	5,63	16,90	4,47	18,92	5,58
V10C50, oH	15,02	2,79			15,28	3,93	15,23	4,76	17,84	3,86	19,81	5,07	19,56	4,00	21,85	3,71	22,30	3,74
V10C100, oH	16,45	3,27			20,23	5,04	21,50	5,86	24,23	5,90	24,44	5,84	27,64	6,37	27,09	6,03	29,63	7,13
V10T200, oH	21,01	4,83			19,99	4,29	18,57	2,36	20,63	2,80	23,30	2,81	25,16	6,10	22,93	3,77	26,74	6,32
V10T400, oH	20,53	4,65			17,97	6,06	18,37	2,24	23,12	5,39	32,77	8,32	37,75	10,31	45,31	15,84	49,25	20,49
KB, oH	19,66	3,84	14,80	1,96	17,46	6,58	14,94	3,95	16,24	3,15	18,18	6,42	15,53	2,28	17,41	2,13	16,26	2,71
B500, oH	16,97	5,96	16,09	3,82	18,43	2,95	17,98	9,22	18,43	8,73	13,89	5,03	13,06	4,57	16,23	4,10	13,99	1,77
B500V1, oH	16,72	2,93	13,73	4,47	18,30	4,34	20,27	8,08	21,68	7,08	20,88	8,24	19,78	9,54	22,26	5,07	18,58	6,12
B500V10, oH	15,77	5,97	19,10	5,76	21,01	4,83	27,39	10,85	31,13	8,33	32,33	6,55	35,78	12,25	39,97	10,32	39,19	14,46

Tabelle 9-10: Intrazellulärer Na⁺-Gehalt in mmol/l ZW aller Behandlungsgruppen beim Ernährungszustand mit Hungern

Zeit in min	0		30		60		120		150		180		210		240		270	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
KV, mH	23,48	11,91			18,87	11,48	19,20	14,29	19,42	14,74	14,85	6,92	16,24	6,93	16,38	6,97	18,16	6,62
KCT, mH	25,40	10,86			18,32	9,68	18,98	8,56	18,18	12,58	19,43	12,30	18,95	9,87	17,60	9,19	16,66	7,62
C50, mH	21,94	3,95			18,47	4,89	19,03	4,55	17,78	5,28	18,08	6,42	16,63	5,96	20,82	8,06	19,65	4,00
C100, mH	24,98	14,69			18,39	8,36	17,29	10,68	17,49	8,41	22,88	16,81	18,93	11,18	15,71	8,28	14,92	6,85
T200, mH	22,11	5,81			14,06	4,39	13,44	3,59	12,12	4,32	12,21	4,54	12,51	4,53	14,83	5,14	16,12	9,89
T400, mH	19,31	6,63			12,19	3,82	11,46	3,68	12,45	3,61	13,53	4,93	16,75	3,19	17,28	5,29	19,15	5,90
V1, mH	17,58	3,16			19,24	6,45	19,12	6,11	18,60	7,75	16,75	5,28	18,18	6,07	17,79	5,94	19,75	5,67
V2,5, mH	14,86	4,85			13,87	6,48	14,26	7,62	14,13	6,33	15,09	6,63	15,80	3,73	15,06	3,31	15,42	3,15
V5, mH	17,82	4,00			17,02	5,03	19,55	6,60	20,11	6,49	21,30	7,95	20,02	4,86	20,43	3,85	20,91	4,60
V10, mH	25,15	10,28			23,14	13,93	23,55	14,47	25,23	11,30	28,74	19,07	31,31	23,42	24,06	9,96	24,39	8,51
V1C50, mH	15,97	9,68			15,09	9,44	14,97	7,92	14,49	8,88	12,96	7,89	13,79	5,58	14,68	8,15	18,42	7,48
V1C100, mH	18,94	5,84			15,87	3,85	22,52	12,04	14,84	5,68	16,29	6,55	18,08	4,88	18,60	4,83	17,88	5,93
V1T400, mH	20,80	5,04			21,11	6,18	18,51	2,45	20,90	2,28	32,88	8,85	43,06	16,29	46,35	16,24	54,18	10,91
V2,5C50, mH	16,06	2,03			12,26	4,65	12,16	3,14	13,98	5,92	13,40	3,33	15,64	6,43	17,65	4,70	18,07	4,79
V2,5C100, mH	15,94	2,29			12,52	2,51	13,51	3,61	16,41	4,49	16,76	2,99	18,79	10,25	23,82	8,87	22,64	8,56
V5C50, mH	21,99	8,68			18,02	10,06	16,14	8,86	19,74	9,06	22,81	12,59	25,53	10,81	27,31	9,96	29,78	8,59
V5C100, mH	19,70	6,82			16,10	5,48	16,92	5,07	32,17	26,86	28,57	12,33	32,57	15,55	32,81	9,02	32,49	9,90
V10C50, mH	25,27	3,66			25,99	4,77	29,37	5,99	34,97	7,83	40,93	9,21	49,57	4,73	51,25	4,79	60,46	8,33
V10C100, mH	24,55	10,77			21,15	11,34	22,66	10,56	46,69	31,19	37,02	19,46	34,88	12,65	35,03	9,89	36,66	11,84
V10T200, mH	24,94	7,27			19,75	6,91	18,37	3,66	22,18	5,30	32,70	8,04	45,10	16,96	57,99	16,62	58,23	15,52
V10T400, mH	21,84	3,32			18,79	6,28	17,74	5,52	37,99	12,79	56,47	13,58	57,89	24,62	34,10	13,20	23,43	9,92
KB, mH	17,33	2,33	16,12	1,04	14,64	2,49	15,66	1,82	15,71	1,63	16,45	1,06	16,96	1,75	17,70	3,13	15,33	3,05
B500, mH	19,49	5,47	17,95	5,40	19,83	4,97	22,68	6,00	24,22	5,50	26,05	7,98	25,61	4,95	23,10	4,56	24,60	6,04
B500V1, mH	17,90	5,46	15,21	4,71	18,11	5,48	20,62	3,86	22,04	5,03	22,61	4,26	25,04	5,65	26,71	4,36	26,43	5,20
B500V10, mH	22,48	4,74	21,36	6,14	22,56	8,91	27,67	8,68	32,53	8,42	40,12	11,84	40,82	6,21	44,57	6,20	45,11	5,49

Tabelle 9-11: Intrazellulärer GSH-Gehalt in mmol/l ZW aller Behandlungsgruppen beim Ernährungszustand ohne Hungern

Zeit in min	0		30		60		120		150		180		210		240		270	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
KV, oH	7,54	0,78			7,57	1,07	8,60	0,81	8,94	0,96	9,33	1,08	9,83	1,12	9,66	1,25	9,88	0,98
KCT, oH	7,57	0,43			7,95	0,69	8,67	1,17	9,45	1,01	9,68	1,48	9,62	1,27	9,39	1,00	9,44	0,79
C50, oH	8,21	0,89			8,73	0,94	9,31	0,93	9,37	0,55	10,32	1,28	9,65	0,74	9,67	0,97	9,74	0,88
C100, oH	7,61	0,42			7,80	1,22	9,11	1,23	9,07	1,10	9,31	1,12	9,41	0,93	9,24	0,87	9,08	0,40
T200, oH	7,76				6,60		7,52		7,81		10,03		11,73		9,06		9,81	
T400, oH	8,79	1,26			6,98	0,83	8,39	1,30	8,03	0,54	8,20	0,68	9,00	0,78	9,38	0,76	9,51	0,84
V1, oH	10,63	2,65			9,88	2,11	8,22	1,49	7,97	1,57	8,04	1,29	8,12	0,93	7,89	0,87	8,18	1,18
V5, oH	7,76	0,68			7,62	0,76	7,00	0,65	6,82	0,56	6,68	0,71	6,35	0,72	6,14	0,48	6,10	0,68
V10, oH	8,05	1,07			7,78	1,31	7,05	0,84	6,74	0,66	6,43	0,66	6,28	0,74	5,93	0,51	5,75	0,83
V1C100, oH	8,22	0,90			7,56	0,56	7,20	0,71	7,08	0,73	6,97	0,64	6,97	0,53	6,90	0,46	6,58	0,63
V1T400, oH	8,68	0,94			7,18	0,79	6,85	0,89	6,25	0,91	5,99	0,68	6,24	1,50	6,20	1,23	6,14	1,15
V5C50, oH	8,56	1,19			7,21	1,17	6,69	0,91	6,16	0,81	5,79	0,74	5,94	1,20	5,96	1,18	5,97	1,12
V5C100, oH	7,52	0,75			7,38	0,87	6,89	0,73	6,53	0,55	6,17	0,62	5,97	0,68	5,60	0,48	5,31	0,60
V10C50, oH	7,71	0,87			7,24	0,93	6,64	0,52	6,13	0,54	5,79	0,48	5,54	0,62	5,23	0,32	5,13	0,62
V10C100, oH	7,61	0,73			7,75	1,34	6,55	0,43	6,19	0,46	5,59	0,57	5,73	0,68	5,39	0,71	4,98	0,54
V10T200, oH	8,84	0,71			6,89	1,09	6,41	0,51	5,07	0,43	5,00	0,37	4,85	0,31	5,27	0,93	4,69	0,35
V10T400, oH	8,42	0,81			6,72	1,43	6,27	0,87	4,73	0,92	4,25	0,70	4,14	0,70	4,46	1,13	4,03	0,51
KB, oH	8,99	0,89	9,03	0,80	8,49	1,00	9,58	1,09	9,54	1,08	9,98	1,70	9,76	1,31	9,43	1,23	9,32	1,08
B500, oH	2,09	0,33	1,85	0,24	1,90	0,18	1,84	0,13	2,17	0,31	2,51	0,76	3,15	0,76	3,80	0,76	4,64	0,94
B500V1, oH	2,10	0,27	1,56	0,23	1,52	0,10	1,64	0,17	1,60	0,28	1,75	0,40	1,97	0,34	2,06	0,21	2,50	0,34
B500V10, oH	1,96	0,30	1,55	0,26	1,49	0,18	1,49	0,15	1,45	0,11	1,67	0,29	1,64	0,17	1,61	0,16	1,82	0,20

Tabelle 9-12: Intrazellulärer GSH-Gehalt in mmol/l ZW aller Behandlungsgruppen beim Ernährungszustand mit Hungern

Zeit in min	0		30		60		120		150		180		210		240		270	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
KV, mH	4,16	0,80			4,34	0,98	5,42	1,44	5,36	1,56	5,93	1,07	6,48	1,70	6,39	1,11	6,54	1,53
KCT, mH	4,15	1,02			4,70	0,76	6,00	0,98	6,13	1,29	6,28	0,97	6,30	1,22	6,40	1,04	6,60	1,21
C50, mH	4,95	0,61			5,82	0,96	6,75	0,84	6,90	0,76	6,97	0,97	6,80	0,97	6,95	0,92	7,51	1,74
C100, mH	4,89	0,90			5,38	0,94	5,97	0,76	6,28	1,33	6,70	1,15	6,64	1,12	6,86	1,18	6,78	1,23
T200, mH	5,15	0,67			5,07	0,67	5,66	1,24	6,09	1,23	6,51	1,40	6,93	1,03	7,01	1,22	7,09	1,19
T400, mH	4,94	0,56			5,03	0,65	5,74	1,29	5,12	1,02	5,92	1,64	6,14	1,78	6,21	1,82	6,21	1,96
V1, mH	6,34	2,11			6,08	1,95	5,77	1,61	6,14	1,12	6,20	1,22	6,33	0,83	6,13	0,80	6,39	0,67
V2,5, mH	6,26	1,59			5,67	1,75	5,53	1,31	5,36	1,14	5,50	1,17	5,56	0,80	5,68	0,69	5,45	0,40
V5, mH	6,14	1,46			5,62	1,37	5,27	1,35	5,37	1,33	5,17	1,10	5,16	1,21	5,03	1,13	4,96	1,41
V10, mH	4,56	0,58			3,83	0,68	3,53	0,94	3,33	0,56	3,38	0,83	3,11	0,50	2,98	0,49	2,77	0,35
V1C50, mH	6,43	2,12			6,19	1,91	6,23	1,78	6,45	0,97	6,33	0,88	6,37	1,19	6,15	0,95	5,84	0,91
V1C100, mH	4,94	1,12			4,68	0,93	5,18	0,73	5,42	0,85	5,87	0,92	5,65	0,80	5,91	0,62	5,78	0,66
V1T400, mH	5,13	0,27			4,57	0,82	4,89	0,45	3,76	0,80	3,60	0,69	3,63	0,88	3,08	0,94	3,07	0,99
V2,5C50, mH	4,66	1,03			4,91	0,54	5,42	0,58	5,82	0,98	5,78	1,22	5,91	1,41	5,52	1,34	5,66	1,15
V2,5C100, mH	5,09	0,59			4,87	0,60	4,79	0,70	4,80	0,66	5,04	0,95	5,03	0,92	4,82	0,94	4,64	1,03
V5C50, mH	4,78	0,81			4,96	0,68	4,62	1,12	4,71	1,50	4,34	1,08	4,38	1,19	4,01	0,78	3,60	0,96
V5C100, mH	5,28	1,30			4,86	1,04	4,49	1,03	3,79	1,17	3,61	1,41	3,24	1,38	3,32	1,46	2,98	1,25
V10C50, mH	5,27	1,17			4,55	0,81	4,12	0,96	3,28	0,77	2,82	0,65	2,51	0,62	2,43	0,45	2,41	0,81
V10C100, mH	4,84	0,80			3,93	0,50	3,56	0,93	2,12	0,38	1,87	0,37	1,74	0,36	1,92	0,49	1,75	0,27
V10T200, mH	5,19	0,70			4,14	1,24	3,80	0,77	2,82	0,87	2,48	0,52	2,41	0,60	2,16	0,49	1,98	0,59
V10T400, mH	4,51	0,32			4,01	0,89	3,88	0,46	2,20	0,36	1,91	0,48	1,62	0,51	1,31	0,17	1,26	0,13
KB, mH	4,25	0,84	4,51	0,84	4,78	0,87	5,72	0,93	6,03	1,04	6,57	1,38	6,65	0,76	6,95	0,91	6,62	1,23
B500, mH	1,57	0,19	1,38	0,15	1,35	0,19	1,31	0,25	1,38	0,32	1,43	0,19	1,63	0,16	1,95	0,10	2,37	0,25
B500V1, mH	1,47	0,14	1,50	0,23	1,34	0,12	1,29	0,12	1,28	0,19	1,29	0,16	1,50	0,37	1,60	0,15	1,73	0,17
B500V10, mH	1,42	0,14	1,31	0,19	1,24	0,12	1,27	0,12	1,16	0,13	1,19	0,14	1,17	0,11	1,20	0,23	1,28	0,24

Tabelle 9-13: MDA-Bildung in nmol/mg Zellen aller Behandlungsgruppen beim Ernährungszustand ohne Hungern

Zeit in min	0		30		60		120		150		180		210		240		270	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
KV, oH	0,067	0,014			0,084	0,015	0,106	0,020	0,103	0,018	0,094	0,023	0,095	0,032	0,101	0,019	0,103	0,030
KCT, oH	0,089	0,010			0,103	0,024	0,103	0,010	0,100	0,011	0,103	0,015	0,109	0,013	0,109	0,014	0,117	0,009
C50, oH	0,090	0,025			0,096	0,018	0,104	0,023	0,119	0,012	0,116	0,019	0,116	0,024	0,117	0,026	0,123	0,026
C100, oH	0,079	0,007			0,092	0,011	0,123	0,007	0,123	0,012	0,117	0,015	0,124	0,011	0,119	0,011	0,117	0,012
T200, oH	0,070				0,090		0,094		0,106		0,104		0,112		0,123		0,099	
T400, oH	0,069	0,008			0,072	0,014	0,085	0,016	0,093	0,017	0,099	0,018	0,106	0,020	0,109	0,017	0,114	0,020
V1, oH	0,087	0,012			0,088	0,019	0,102	0,019	0,102	0,023	0,109	0,031	0,111	0,026	0,114	0,031	0,117	0,034
V5, oH	0,073	0,006			0,102	0,023	0,134	0,032	0,122	0,020	0,120	0,023	0,123	0,024	0,124	0,025	0,131	0,023
V10, oH	0,081	0,023			0,096	0,016	0,114	0,018	0,115	0,015	0,119	0,022	0,119	0,018	0,123	0,017	0,132	0,018
V1C100, oH	0,088	0,014			0,092	0,018	0,101	0,014	0,105	0,010	0,110	0,011	0,120	0,026	0,120	0,020	0,126	0,021
V1T400, oH	0,065	0,009			0,073	0,012	0,079	0,020	0,094	0,013	0,099	0,015	0,102	0,014	0,107	0,009	0,106	0,010
V5C50, oH	0,097	0,044			0,095	0,015	0,106	0,016	0,114	0,023	0,116	0,018	0,116	0,027	0,120	0,023	0,128	0,029
V5C100, oH	0,096	0,042			0,102	0,020	0,106	0,020	0,111	0,020	0,114	0,026	0,119	0,027	0,123	0,026	0,135	0,037
V10C50, oH	0,096	0,037			0,115	0,021	0,118	0,016	0,108	0,018	0,112	0,021	0,117	0,021	0,117	0,022	0,120	0,020
V10C100, oH	0,088	0,022			0,106	0,018	0,117	0,021	0,116	0,018	0,116	0,016	0,125	0,022	0,128	0,018	0,158	0,024
V10T200, oH	0,076	0,022			0,094	0,020	0,084	0,012	0,092	0,010	0,100	0,013	0,094	0,008	0,106	0,010	0,112	0,012
V10T400, oH	0,084	0,022			0,075	0,013	0,087	0,016	0,124	0,012	0,129	0,016	0,140	0,020	0,150	0,029	0,156	0,029
KB, oH	0,061	0,007	0,072	0,010	0,077	0,006	0,081	0,008	0,087	0,007	0,094	0,013	0,093	0,015	0,104	0,014	0,101	0,019
B500, oH	0,063	0,007	0,078	0,006	0,086	0,011	0,092	0,012	0,099	0,016	0,096	0,015	0,107	0,015	0,108	0,015	0,104	0,020
B500V1, oH	0,069	0,010	0,077	0,014	0,086	0,024	0,088	0,019	0,096	0,021	0,097	0,024	0,103	0,020	0,105	0,023	0,108	0,019
B500V10, oH	0,067	0,005	0,072	0,012	0,078	0,012	0,083	0,013	0,090	0,015	0,099	0,019	0,098	0,018	0,105	0,013	0,106	0,012

Tabelle 9-14: MDA-Bildung in nmol/mg Zellen aller Behandlungsgruppen beim Ernährungszustand mit Hungern

Zeit in min	0		30		60		120		150		180		210		240		270	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
KV, mH	0,090	0,025			0,101	0,021	0,091	0,031	0,086	0,032	0,091	0,036	0,093	0,028	0,098	0,041	0,099	0,046
KCT, mH	0,072	0,014			0,074	0,009	0,077	0,011	0,071	0,004	0,075	0,009	0,075	0,024	0,072	0,014	0,074	0,012
C50, mH	0,095	0,022			0,091	0,021	0,093	0,021	0,089	0,020	0,085	0,017	0,085	0,020	0,087	0,018	0,089	0,022
C100, mH	0,081	0,019			0,088	0,023	0,086	0,026	0,097	0,030	0,097	0,028	0,108	0,026	0,121	0,018	0,119	0,034
T200, mH	0,056	0,013			0,075	0,014	0,075	0,014	0,082	0,018	0,082	0,008	0,082	0,010	0,088	0,011	0,096	0,016
T400, mH	0,064	0,009			0,070	0,009	0,073	0,011	0,092	0,013	0,096	0,011	0,101	0,012	0,095	0,010	0,102	0,020
V1, mH	0,106	0,029			0,099	0,018	0,100	0,017	0,102	0,026	0,100	0,022	0,101	0,029	0,104	0,029	0,103	0,030
V2,5, mH	0,088	0,024			0,091	0,023	0,094	0,022	0,100	0,023	0,101	0,022	0,099	0,020	0,109	0,023	0,117	0,017
V5, mH	0,105	0,023			0,101	0,019	0,104	0,024	0,106	0,016	0,113	0,019	0,112	0,018	0,116	0,020	0,113	0,018
V10, mH	0,078	0,025			0,079	0,017	0,079	0,019	0,094	0,027	0,078	0,025	0,077	0,025	0,088	0,012	0,091	0,004
V1C50, mH	0,101	0,029			0,107	0,026	0,115	0,030	0,124	0,038	0,126	0,033	0,127	0,038	0,138	0,045	0,137	0,038
V1C100, mH	0,099	0,020			0,087	0,013	0,090	0,016	0,120	0,032	0,123	0,033	0,131	0,040	0,133	0,048	0,135	0,049
V1T400, mH	0,080	0,013			0,071	0,010	0,078	0,005	0,160	0,014	0,205	0,050	0,245	0,090	0,263	0,099	0,285	0,122
V2,5C50, mH	0,095	0,015			0,106	0,020	0,095	0,009	0,100	0,007	0,094	0,006	0,095	0,007	0,102	0,004	0,102	0,008
V2,5C100, mH	0,097	0,017			0,105	0,022	0,103	0,014	0,130	0,009	0,140	0,019	0,139	0,021	0,155	0,026	0,167	0,029
V5C50, mH	0,107	0,021			0,109	0,013	0,105	0,005	0,100	0,008	0,100	0,006	0,105	0,008	0,108	0,006	0,119	0,015
V5C100, mH	0,105	0,022			0,110	0,029	0,101	0,018	0,215	0,115	0,257	0,146	0,297	0,168	0,328	0,188	0,361	0,216
V10C50, mH	0,112	0,030			0,093	0,023	0,090	0,021	0,116	0,021	0,127	0,027	0,138	0,037	0,146	0,044	0,154	0,044
V10C100, mH	0,097	0,030			0,082	0,016	0,090	0,027	0,297	0,155	0,398	0,140	0,444	0,142	0,454	0,138	0,482	0,132
V10T200, mH	0,080	0,016			0,065	0,017	0,077	0,014	0,126	0,013	0,156	0,040	0,177	0,071	0,204	0,100	0,242	0,133
V10T400, mH	0,062	0,011			0,063	0,010	0,071	0,014	0,157	0,017	0,257	0,032	0,395	0,023	0,527	0,061	0,602	0,096
KB, mH	0,078	0,016	0,083	0,013	0,088	0,012	0,088	0,011	0,089	0,015	0,091	0,014	0,091	0,015	0,093	0,013	0,095	0,016
B500, mH	0,081	0,007	0,082	0,011	0,083	0,009	0,091	0,011	0,094	0,008	0,093	0,008	0,099	0,012	0,103	0,014	0,103	0,010
B500V1, mH	0,082	0,009	0,086	0,009	0,087	0,009	0,095	0,010	0,102	0,009	0,099	0,004	0,105	0,007	0,107	0,006	0,133	0,044
B500V10, mH	0,074	0,008	0,078	0,009	0,079	0,007	0,091	0,017	0,111	0,026	0,142	0,035	0,198	0,049	0,276	0,076	0,365	0,117

Tabelle 9-15: Unkonjugierte VPA- und Metabolitenanteile in % der Ausgangsdosis ausgewählter Behandlungsgruppen nach 60 min Inkubation ohne Hungern*

60 min	VPA		2,3'-dien-VPA		2-en-VPA		3-keto-VPA		3-OH-VPA		4-en-VPA		4-keto-VPA		4-OH-VPA		5-OH-VPA		PGA-VPA	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
V1, oH	82,58	23,82	-	-	0,132	0,091	0,358	0,393	-	-	-	-	0,047	0,105	0,075	0,167	1,409	1,174	0,162	0,198
V5, oH	85,77	8,54	-	-	0,020	0,022	0,028	0,037	-	-	-	-	-	-	0,311	0,174	0,359	0,221	0,072	0,042
V10, oH	92,44	9,05	-	-	0,005	0,012	0,018	0,016	-	-	0,010	0,016	-	-	0,277	0,045	0,237	0,032	0,016	0,015
V1C100, oH	81,45	25,33	0,151	0,338	0,159	0,140	0,904	0,713	-	-	-	-	0,020	0,044	0,020	0,044	3,122	1,812	0,463	0,483
V1T400, oH	84,77	6,17	-	-	0,196	0,033	0,329	0,349	-	-	0,051	0,050	-	-	0,225	0,164	1,564	1,281	0,177	0,143
V5C100, oH	101,98	15,32	-	-	0,014	0,023	0,114	0,112	-	-	0,010	0,024	-	-	0,403	0,102	0,536	0,361	0,077	0,046
V10C50, oH	90,25	15,82	-	-	0,002	0,004	0,025	0,024	0,061	0,085	0,007	0,012	-	-	0,294	0,070	0,186	0,058	0,028	0,015
V10C100, oH	89,03	11,93	-	-	0,008	0,014	0,003	0,007	0,056	0,126	0,002	0,005	-	-	0,370	0,036	0,262	0,040	0,034	0,016
V10T200, oH	97,69	9,16	-	-	-	-	-	0,001	-	-	-	-	-	-	0,079	0,070	0,035	0,030	0,009	0,012
V10T400, oH	111,24	9,76	-	-	-	-	0,015	0,019	-	-	-	-	-	-	0,118	0,090	0,082	0,067	0,005	0,005
B500V1, oH	80,29	9,34	0,115	0,132	0,092	0,053	0,202	0,203	-	-	-	-	-	-	-	-	1,643	0,230	0,028	0,050
B500V10, oH	90,31	10,75	-	-	-	-	0,048	0,051	-	-	-	-	-	-	0,063	0,055	0,108	0,027	-	-

* Messungen, in denen einzelne Metaboliten nicht detektiert wurden, gingen mit Null in die Berechnung ein. Nur in den Fällen, in denen aufgrund bekannter starker Schwankungen in den ermittelten Metabolitenwerten die Standardabweichung (s) wesentlich größer als der Mittelwert (\bar{x}) war, ergab die Berechnung des Medians erwartungsgemäß meist den Wert Null bzw. einen niedrigeren Wert als den Mittelwert. Die Angabe des Mittelwertes anstelle des Medians veränderte die Erkenntnisse aus den VPA-Metabolitenstudien nicht.

Tabelle 9-16: Unkonjugierte VPA- und Metabolitenanteile in % der Ausgangsdosis ausgewählter Behandlungsgruppen nach 60 min Inkubation mit Hungern*

60 min	VPA		2,3'-dien-VPA		2-en-VPA		3-keto-VPA		3-OH-VPA		4-en-VPA		4-keto-VPA		4-OH-VPA		5-OH-VPA		PGA-VPA	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
V1, mH	72,06	18,16	-	-	0,036	0,061	1,199	1,042	-	-	-	-	-	-	0,084	0,141	2,130	2,282	0,194	0,261
V5, mH	99,79	9,02	-	-	-	-	0,261	0,228	-	-	-	-	-	-	0,151	0,292	0,235	0,286	0,080	0,132
V10, mH	86,96	9,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,209	0,417	-	-	-	-	-	-
V1C100, mH	80,04	6,20	-	-	0,102	0,074	1,923	0,710	-	-	-	-	0,610	1,364	0,073	0,121	1,216	0,519	0,080	0,091
V1T400, mH	92,37	8,33	-	-	0,112	0,049	0,078	0,081	-	-	0,019	0,034	-	-	0,202	0,114	0,583	0,613	0,049	0,045
V5C100, mH	73,74	9,51	0,005	0,011	0,002	0,005	0,141	0,107	-	-	-	-	0,004	0,009	0,189	0,143	0,135	0,090	0,013	0,015
V10C50, mH	88,69	9,78	-	-	-	-	0,020	0,031	-	-	-	-	-	-	0,140	0,221	0,071	0,114	-	-
V10C100, mH	91,34	8,52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,178	0,338	0,242	0,243	0,036	0,103	-	-
V10T200, mH	96,69	14,69	-	-	-	-	0,026	0,055	-	-	-	-	-	-	0,116	0,111	0,048	0,041	0,010	0,010
V10T400, mH	104,25	12,40	-	-	-	-	0,118	0,151	-	-	-	-	-	-	0,163	0,150	0,050	0,045	0,003	0,006
B500V1, mH	105,81	17,36	0,171	0,155	0,153	0,058	0,415	0,367	-	-	0,048	0,055	-	-	-	-	0,030	0,015	-	-
B500V10, mH	105,03	11,79	-	-	-	-	0,023	0,033	-	-	-	-	-	-	-	-	0,004	0,006	-	-

* Messungen, in denen einzelne Metaboliten nicht detektiert wurden, gingen mit Null in die Berechnung ein. Nur in den Fällen, in denen aufgrund bekannter starker Schwankungen in den ermittelten Metabolitenwerten die Standardabweichung (s) wesentlich größer als der Mittelwert (\bar{x}) war, ergab die Berechnung des Medians erwartungsgemäß meist den Wert Null bzw. einen niedrigeren Wert als den Mittelwert. Die Angabe des Mittelwertes anstelle des Medians veränderte die Erkenntnisse aus den VPA-Metabolitenstudien nicht.

Tabelle 9-17: Unkonjugierte VPA- und Metabolitenanteile in % der Ausgangsdosis ausgewählter Behandlungsgruppen nach 270 min Inkubation ohne Hungern*

270 min	VPA		2,3'-dien-VPA		2-en-VPA		3-keto-VPA		3-OH-VPA		4-en-VPA		4-keto-VPA		4-OH-VPA		5-OH-VPA		PGA-VPA	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
V1, oH	11,01	8,11	-	-	0,116	0,076	2,698	1,259	-	-	-	-	0,175	0,243	1,241	0,464	7,771	2,025	2,060	0,480
V5, oH	88,07	10,87	-	-	0,111	0,060	0,432	0,162	-	-	0,013	0,031	-	-	0,827	0,182	1,065	0,433	0,475	0,161
V10, oH	111,86	18,37	-	-	0,037	0,030	0,196	0,040	0,049	0,109	0,044	0,074	-	-	0,719	0,127	0,560	0,052	0,171	0,060
V1C100, oH	22,95	7,22	-	-	0,133	0,116	3,627	3,322	-	-	0,153	0,342	0,075	0,077	0,075	0,077	8,352	4,267	1,732	1,314
V1T400, oH	43,19	26,61	0,170	0,382	0,329	0,216	1,888	1,698	-	-	0,229	0,116	0,017	0,026	0,709	0,243	5,871	2,020	0,963	0,692
V5C100, oH	109,55	14,31	0,010	0,024	0,116	0,057	0,406	0,201	-	-	0,027	0,044	-	-	0,600	0,184	0,811	0,294	0,192	0,088
V10C50, oH	102,74	17,71	-	-	0,052	0,016	0,153	0,057	0,070	0,097	0,031	0,029	-	-	0,590	0,131	0,491	0,209	0,080	0,052
V10C100, oH	102,68	14,31	-	-	0,046	0,030	0,180	0,095	0,102	0,228	0,004	0,009	-	-	0,685	0,174	0,645	0,126	0,086	0,039
V10T200, oH	98,95	19,33	-	-	0,017	0,014	0,055	0,096	-	-	-	-	-	-	0,584	0,237	0,373	0,169	0,009	0,007
V10T400, oH	124,71	13,77	-	-	0,015	0,013	0,172	0,141	-	-	0,004	0,011	-	-	0,674	0,075	0,513	0,206	0,032	0,023
B500V1, oH	70,38	13,52	0,535	0,292	0,293	0,147	2,292	2,137	-	-	-	-	-	-	0,397	0,152	6,848	0,384	0,331	0,128
B500V10, oH	114,71	12,35	-	-	-	-	0,269	0,224	-	-	-	-	-	-	0,350	0,108	0,553	0,126	0,003	0,004

* Messungen, in denen einzelne Metaboliten nicht detektiert wurden, gingen mit Null in die Berechnung ein. Nur in den Fällen, in denen aufgrund bekannter starker Schwankungen in den ermittelten Metabolitenwerten die Standardabweichung (s) wesentlich größer als der Mittelwert (\bar{x}) war, ergab die Berechnung des Medians erwartungsgemäß meist den Wert Null bzw. einen niedrigeren Wert als den Mittelwert. Die Angabe des Mittelwertes anstelle des Medians veränderte die Erkenntnisse aus den VPA-Metabolitenstudien nicht.

Tabelle 9-18: Unkonjugierte VPA- und Metabolitenanteile in % der Ausgangsdosis ausgewählter Behandlungsgruppen nach 270 min Inkubation mit Hungern*

270 min	VPA		2,3'-dien-VPA		2-en-VPA		3-keto-VPA		3-OH-VPA		4-en-VPA		4-keto-VPA		4-OH-VPA		5-OH-VPA		PGA-VPA	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
V1, mH	20,87	18,59	-	-	0,030	0,047	5,105	2,712	-	-	-	-	-	-	0,553	0,749	5,397	2,429	1,403	1,091
V5, mH	108,38	16,33	-	-	0,005	0,012	0,841	0,677	-	-	-	-	-	-	0,463	0,281	0,878	0,718	0,259	0,253
V10, mH	99,48	11,02	-	-	-	-	0,267	0,241	-	-	-	-	-	-	0,480	0,349	0,251	0,193	-	-
V1C100, mH	59,89	10,19	-	-	0,062	0,066	7,266	3,193	-	-	-	-	-	-	0,022	0,049	2,741	1,167	0,182	0,173
V1T400, mH	84,92	16,89	0,059	0,157	0,173	0,066	0,749	0,609	-	-	0,174	0,070	-	-	0,637	0,096	1,986	1,696	0,576	0,461
V5C100, mH	90,51	21,89	-	-	0,009	0,017	0,896	0,587	-	-	-	-	-	-	0,383	0,336	0,296	0,265	0,032	0,028
V10C50, mH	98,12	4,07	-	-	-	-	0,160	0,094	1,069	2,389	-	-	-	-	0,417	0,558	0,213	0,336	-	-
V10C100, mH	107,16	16,60	-	-	-	-	0,110	0,155	-	-	-	-	-	-	0,441	0,240	0,155	0,219	-	-
V10T200, mH	121,50	7,97	-	-	0,001	0,003	0,177	0,219	-	-	-	-	-	-	0,418	0,229	0,138	0,122	0,011	0,012
V10T400, mH	136,80	15,77	-	-	0,003	0,004	0,313	0,344	-	-	-	-	-	-	0,695	0,152	0,245	0,152	0,021	0,028
B500V1, mH	113,32	29,47	0,430	0,040	0,250	0,032	3,621	2,689	-	-	0,148	0,046	-	-	-	-	0,441	0,279	-	-
B500V10, mH	124,17	14,65	-	-	-	-	0,099	0,128	-	-	-	-	-	-	0,018	0,017	0,030	0,009	-	-

* Messungen, in denen einzelne Metaboliten nicht detektiert wurden, gingen mit Null in die Berechnung ein. Nur in den Fällen, in denen aufgrund bekannter starker Schwankungen in den ermittelten Metabolitenwerten die Standardabweichung (s) wesentlich größer als der Mittelwert (\bar{x}) war, ergab die Berechnung des Medians erwartungsgemäß meist den Wert Null bzw. einen niedrigeren Wert als den Mittelwert. Die Angabe des Mittelwertes anstelle des Medians veränderte die Erkenntnisse aus den VPA-Metabolitenstudien nicht.

Lebenslauf

Grit Barthel geb. Sawatzki

Adresse	Schenkendorfer Flur 40, D-15711 Königs Wusterhausen	
Geburtstag und -ort	2.1.1967	in Räckelwitz
Familienstand	seit dem 12. August 1989 verheiratet mit Jens Barthel, Diplom-Volkswirt, Wiss. Mitarbeiter im Institut für Finanzwissenschaft der Wirtschaftswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin	
Schulbesuch	1973-1978	Polytechnische Oberschule „Dr. Theodor Neubauer“ Schwedt/Oder
	1978-1983	3. Polytechnische Oberschule „Robert Biehl“ Königs Wusterhausen
	1983-1985	Erweiterte Oberschule „W.I. Lenin“ Königs Wusterhausen, Abitur mit „Auszeichnung“
Berufsausbildung	1985-1986	VEG(T) Birkholz, Facharbeiter für Rinderproduktion mit „Sehr gut“
Studium	1986-1992	Fakultät Veterinärmedizin, Humboldt-Universität zu Berlin, Abschluß mit „Sehr gut“, Approbation als Tierärztin erteilt am 24.4.1992
Berufliche Tätigkeit	6/1992-8/96	befristete Anstellung als wissenschaftliche Angestellte für das Fachgebiet „Zentrale Steuerung der Zulassung, Aufbereitung, Nachzulassung“ im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin
	seit 8/1996	unbefristete Anstellung als wissenschaftliche Angestellte für das Fachgebiet „Antimikrobiell, hormonell und zentralwirksame Tierarzneimittel, Umweltverträglichkeit“ im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin
Promotion	seit 25.7.1993	Betreuer: Prof. Dr. R. Kroker, (BgVV und Freie Universität Berlin)

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Königs Wusterhausen, 1. August 1997