

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität München

Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. med. P. Eyer

**Entwicklung eines dynamischen Modells zum Studium der Schutzeffekte  
reversibler Acetylcholinesterase-Hemmstoffe vor der irreversiblen  
Hemmung durch hochtoxische Organophosphate**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Saskia Tracy Eckert

aus München

2006

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Eyer  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Drasch  
  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W. Machleidt  
Prof. Dr. med. M. Thiel  
  
Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt  
  
Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2006

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. P. Eyer möchte ich ganz herzlich für das mir entgegengebrachte Vertrauen in der Bearbeitung des Themas und vor allem für seine endlose Geduld und Ausdauer beim Beantworten unzähliger Fragen danken. Seine Tür stand mir zu jeder Zeit offen und seine unerschöpflichen Ideen, „Tipps und Tricks“ erleichterten es, so manche Hürden in der Welt der experimentellen Forschung zu überwinden.

Ich möchte Herrn PD Dr. F. Worek für seinen geistigen Input und die grundlegenden Ideen danken, ohne die die experimentelle Durchführung des „dynamischen Modells“ wohl nicht in dieser Art und Weise hätte stattfinden können.

Bei Herrn PD Dr. Dr. H. Mückter bedanke ich mich dafür, dass er mir mit Rat und Tat bei der Formatierung dieser Arbeit zur Seite stand. Danke auch für die wiederholte, aufmerksame Lektüre der jährlichen Zwischenberichte, deren Inhalte einen erheblichen Anteil an der vorliegenden Dissertation stellen.

Dank an Herrn Prof. Dr. B. Fichtl für die Bereitstellung der Software Maple. Die komplizierten Rechenoperationen zur Simulation verschiedener Prophylaxe- und Vergiftungs-Szenarien wären ohne diese kaum möglich gewesen.

Herrn Mann aus der feinmechanischen Werkstatt des Instituts möchte ich für die prompten Ausführungen einiger Spezialaufträge danken. Ohne seine maßgeschneiderten Anfertigungen hätte der „Enzymreaktor des dynamischen Modells“ wahrscheinlich keinen „Halt“ gefunden.

Besonderer Dank geht an die Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eyer für die unendliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Laboralltag.

Die teilweise unvergesslichen Geschichten und Geschichtchen der „Kaffeerunde“ erheiterten meine Arbeitstage und sorgten für willkommene geistige Entspannung.

Frau Dressnandt danke ich für die netten, allmorgendlichen Gespräche zum Start in den Tag und für ihre sorgfältige Anfertigung unzähliger Kopien.

Ich danke meiner Familie dafür, dass sie immer an mich geglaubt hat. Ganz lieben Dank auch meinem Freund Berni, der auch die schwierigsten Zeiten mit mir gemeinsam durchgestanden hat und mich immer wieder von der Welt der Wissenschaft ablenken konnte.



Meinen Eltern und meinem Bruder



# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	1
2	MATERIALIEN und METHODEN .....	10
2.1	Materialien .....	10
2.1.1	Chemikalien .....	10
2.1.2	Pufferlösungen .....	10
2.1.3	Humanerythrozyten .....	10
2.1.4	Reagenzien für Versuche mit Enzymreaktor .....	11
2.1.5	Reagenzien zur Bestimmung der AChE-Aktivität und des Hämoglobingehaltes.....	12
2.1.6	Geräte, Labormaterialien und Hilfsmittel .....	13
2.2	Methoden.....	14
2.2.1	Aufbau der Anlage .....	14
2.2.2	Überprüfen der Gerätespezifikationen .....	15
2.2.2.1	Linearität des Detektors/Prüfen der Zumischgenauigkeit der Gradientenformer .....	15
2.2.2.2	Hysterese der Gleichgewichtseinstellung.....	15
2.2.3	Lagerstabilität von Humanerythrozyten.....	15
2.2.3.1	Bestimmung des Hämoglobingehaltes .....	16
2.2.3.2	Bestimmung der AChE-Aktivität.....	16
2.2.4	Experimente im dynamischen System mit Enzymreaktor .....	17
2.2.4.1	Vorbereitung des Enzymreaktors .....	17
2.2.4.2	Durchführung eines Experiments.....	17
2.2.4.3	Programmierung der Pumpen.....	17
	Allgemeines Pumpenprogramm.....	17
	Methode A: Bestimmung der Stabilität der AChE-Aktivität im Enzymreaktor und Bestimmung des Reagenzienblindwertes (s. Anhang 8.2.1).....	18
	Methode B: Hemmung mit Paraoxon (zur Bestimmung von Hemmkinetik und Grad der Hemmung) (s. Anhang 8.2.2).....	19
	Methode C: Hemmung mit Paraoxon und Reaktivierung mit Obidoxim (s. Anhang 8.2.3).....	19
	Methode D: Hemmung mit reversiblen Acetylcholinesterasehemmstoffen (Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon, Huperzin A) (s. Anhang 8.2.4).....	19
	Methode E: Hemmung mit reversiblen Acetylcholinesterasehemmstoffen (Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon, Huperzin A) und Paraoxon gleichzeitig (s. Anhang 8.2.5) .....	20
	Methode F: Farbttest zur Simulation einer Hemmung bei exponentiell abnehmender Konzentration des Hemmstoffes (s. Anhang 8.2.6) ....	22
3	AUSWERTUNG.....	23
3.1	Lagerstabilität von Humanerythrozyten.....	23
3.1.1	Berechnung des Hämoglobingehalts.....	23
3.1.2	Berechnung der AChE-Aktivität.....	23
3.2	Stabilität der AChE im Enzymreaktor .....	24
3.3	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Acylierung der Acetylcholinesterase in Anwesenheit von Substrat .....	24
3.4	Berechnung der kinetischen Konstanten bei der Hemmung mit Paraoxon bzw. reversiblen Hemmstoffen ( $k_{i, \text{obs}}$ ) .....	26

3.4.1	Hemmung mit Paraoxon, Physostigmin, Pyridostigmin .....	26
3.4.2	Hemmung mit Huperzin A .....	27
3.5	Berechnung der Spontanreaktivierung reversibel gehemmter AChE ( $k_{s, obs}$ ) und der Reaktivierung Paraoxon-gehemmter AChE mit Obidoxim ( $k_{r, obs}$ ).....	27
3.6	Reaktivierbarkeit Paraoxon-gehemmter Ery-AChE durch Obidoxim .....	28
3.7	Hemmung der Ery-AChE mit Paraoxon nach Prophylaxe mit reversiblen Hemmstoffen .....	28
3.7.1	Grad der Hemmung .....	28
3.7.2	Reaktivierbarkeit der Ery-AChE (Spontanreaktivierung) nach gleichzeitiger Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen und Paraoxon.....	29
3.8	Kinetisches Modell zur Berechnung der simultan ablaufenden Reaktionen von Carbamoylierung, Decarbamoylierung und Phosphylierung (siehe auch Anhang 8.5) .....	29
4	ERGEBNISSE.....	31
4.1	Überprüfen der Gerätespezifikationen .....	31
4.1.1	Photometrische Stabilität.....	31
4.1.2	Photometrische Linearität .....	31
4.1.3	Flussgenauigkeit der Pumpen.....	31
4.1.4	Förderkonstanz und Mischungspräzision der Anlage .....	31
4.1.5	Wechselseitige Kontamination der Kanäle .....	33
4.1.6	Hysterese der Gleichgewichtseinstellung.....	34
4.1.7	Farbtest zur Simulation einer Hemmung bei exponentiell abnehmender Konzentration des Hemmstoffes („dynamisch“)......	36
4.2	Stabilität des Enzymreaktors .....	37
4.2.1	Trägerfilter und Enzymquelle .....	37
4.2.2	Lagerstabilität von Humanerythrozyten .....	38
4.2.3	Stabilität der AChE im Enzymreaktor .....	39
4.2.4	Stabilität der Basislinie.....	42
4.2.5	Stabilität des Blindwertes – DTNB, ASCh, G-PP .....	42
4.2.5.1	Blindwert in Abwesenheit von Erythrozyten .....	42
4.2.5.2	Blindwert nach Anwesenheit von Erythrozyten bei Einsatz des Enzymreaktors.....	44
4.2.5.3	Korrektur des Blindwertes (zur genauen Berechnung der Restaktivität nach Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen und Paraoxon und für die Bestimmung des Grades der Hemmung durch Paraoxon) .....	45
4.3	Hemmung der AChE.....	46
4.3.1	Hemmung mit Paraoxon bei konstanter Giftkonzentration.....	48
4.3.2	Reaktivierung Paraoxon-gehemmter Erythrozyten-AChE mit Obidoxim.....	49
4.3.3	Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen und Spontanreaktivierung .....	52
4.3.3.1	Physostigmin .....	52
4.3.3.2	Pyridostigmin .....	56
4.3.3.3	Methyl-Paraoxon.....	58
4.3.3.4	Huperzin A .....	59
4.3.4	Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Ery-AChE-Hemmung durch Physostigmin und Pyridostigmin von der Konzentration des Hemm- stoffes .....	62
4.3.4.1	Physostigmin .....	63
4.3.4.2	Pyridostigmin .....	63
4.3.5	Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Ery-AChE-Hemmung durch Huperzin A von der Konzentration des Hemmstoffes .....	63

4.4	Einfluß der Prophylaxe mit reversiblen Hemmstoffen auf die Restaktivität nach Paraoxon-Einwirkung und auf das Ausmaß der Spontanreaktivierung .....	64
4.4.1	Versuche ohne Prophylaxe .....	64
4.4.2	Versuche mit Prophylaxe .....	66
4.4.2.1	Hemmung mit Physostigmin und Paraoxon.....	68
4.4.2.2	Hemmung mit Pyridostigmin und Paraoxon.....	69
4.4.2.3	Hemmung mit Methyl-Paraoxon und Paraoxon.....	70
4.4.2.4	Hemmung mit Huperzin A und Paraoxon.....	71
5	DISKUSSION .....	75
5.1	Technische Aspekte.....	75
5.1.1	Geräteperformance .....	75
5.1.2	Enzymreaktor .....	76
5.1.3	Reagenzienblindwert .....	77
5.2	Enzymkinetische Aspekte .....	78
5.2.1	Hemmung humaner Acetylcholinesterase mit reversiblen Hemmstoffen und anschließender Spontanreaktivierung .....	79
5.2.2	Hemmung mit Paraoxon nach Prophylaxe mit reversiblen Hemmstoffen.....	82
5.2.3	Berechnung der simultan ablaufenden Reaktionen von Carbamoylierung, Decarbamoylierung und Phosphilyerung .....	83
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	90
7	LITERATUR.....	92
8	ANHANG.....	99
8.1	Überprüfen der Gerätespezifikationen .....	99
8.1.1	Methode: Farbstofftest Gradient .....	99
8.1.2	Photometrische Linearität .....	100
8.1.3	Hysteresis der Gleichgewichtseinstellung.....	102
8.1.3.1	Versuche mit Filter.....	102
8.1.3.2	Versuche ohne Filter .....	104
8.2	Experimente im dynamischen System mit Enzymreaktor .....	105
8.2.1	Methode A: Bestimmung der Stabilität der AChE-Aktivität im Enzymreaktor und Bestimmung des Reagenzienblindwertes.....	105
8.2.2	Methode B: Hemmung mit Paraoxon (zur Bestimmung von Hemmkinetik und Grad der Hemmung).....	106
8.2.3	Methode C: Hemmung mit Paraoxon und Reaktivierung mit Obidoxim .....	107
8.2.4	Methode D: Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen (Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon, Huperzin A) .....	108
8.2.5	Methode E: Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen (Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon, Huperzin A und Ethyl-Paraoxon gleichzeitig .....	109
8.2.6	Methode F: Farbtest zur Simulation einer Hemmung bei exponentiell abnehmender Konzentration des Hemmstoffes („dynamisch“).....	111
8.3	Lagerstabilität von Humanerythrozyten .....	113
8.4	Stabilität der AChE-Aktivität im Enzymreaktor .....	114
8.5	Berechnung der simultan ablaufenden Reaktionen von reversibler Hemmung, Spontanreaktivierung und Phosphilyerung .....	115

## LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AChE	Acetylcholinesterase
ASCh	Acetylthiocholin
AUC	Area under curve
BChE	Butyrylcholinesterase
BW <sub>DAG</sub>	Reagenzienblindwert von DTNB, ASCh und G-PP
BW <sub>DAG+Obi</sub>	Reagenzienblindwert von Obidoxim, DTNB, ASCh und G-PP
BW <sub>DAG+Px</sub>	Reagenzienblindwert von Paraoxon, DTNB, ASCh und G-PP
BW <sub>G-PP</sub>	Reagenzienblindwert von G-PP
Carb.	Carbamat
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
E	Extinktionseinheit
Ery-AChE	Acetylcholinesterase von (humanen) Erythrozyten
G-PP	Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4) mit 0,2% Gelatine
Hb	Hämoglobin
Hup A	Huperzin A
KFZ-PP	Lösung von K <sub>3</sub> Fe[(CN) <sub>6</sub> ] in Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4)
Obi	Obidoxim
PHY, Physo	Physostigmin
PP	Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4)
PYR, Pyrido	Pyridostigmin
Px	Paraoxon
Methyl-Px	Methyl-Paraoxon

# 1 EINLEITUNG

Die vermutlich ersten Aufzeichnungen des Gebrauchs einer Substanz, die wie Nervenkampfstoffe durch Hemmung der Acetylcholinesterase wirkt, stammen aus der Zeit der Kolonialisierung Afrikas. Es wurde von Stammesbrüdern in Westafrika berichtet, die die Kalabарbohne als „Gottesurteilsdroge“ bei Hexenprozessen anwendeten (Kuhr und Dorough 1976; Sidell 1997). Ein Extrakt, das „Elixir der Kalabарbohne“, wurde medizinisch angewandt, und 1864 isolierten Jobst und Hesse die wirksame Komponente und nannten sie Physostigmin (Koelle 1963). Der erste phosphororganische Cholinesterase-Inhibitor war vermutlich Tetraethylpyrophosphat, von Wurtz synthetisiert und 1854 von Clermont ohne jegliche Nebenwirkung verkostet (Sidell 1997). Während der nächsten 80 Jahre machten Chemiker unzählige Fortschritte in der Organophosphat-Chemie. Sie waren sich jedoch der Toxizität der entwickelten Substanzen nicht bewusst. Die stürmische Entwicklung des Wissens und der Technik in der Chemie während des 19. und 20. Jahrhunderts mehrte, mitunter durch schwere Unfälle, das Wissen über neue hochtoxische Verbindungen und ihre Produktion im technischen Maßstab. 1932 berichteten Lange und Krueger über die drastische Wirkung phosphororganischer Verbindungen, nachdem sie die Wirkung der Dämpfe von Dimethyl- und Diethylphosphorfluoridat am eigenen Leib erfahren hatten.

1936 synthetisierte Gerhard Schrader, der die Entwicklung phosphororganischer Verbindungen zum Einsatz als Insektizide bei der I. G. Farbenindustrie vorantrieb, eine Substanz, die heute als Tabun bekannt ist. Auch er bemerkte die toxische Wirkung an sich selbst. Ein Jahr später stellte er eine weitere Verbindung her und nannte sie zu Ehren der fundamental an der Entwicklung und Produktion beitragenden Mitarbeiter Schrader, Ambros, Rudriger und van der Linde, Sarin. Zu den derzeit relevanten Nervenkampfstoffen zählen neben Tabun und Sarin, auch Cyclosarin, Soman und VX (militärische Bezeichnungen: GA, GB, GF, GD und VX).

Die Nervenkampfstoffe der G-Serie erhielten die Abkürzung G (German) nach ihrem Herstellungsland Deutschland, die V-Stoffe (v = venomous) wurden während der 50iger Jahre des 20. Jahrhunderts in Großbritannien entwickelt und den USA zur militärischen Entwicklung übergeben. Etwa 10.000 bis 30.000 Tonnen Tabun und kleinere Mengen an Sarin wurden während des 2. Weltkrieges produziert und munitioniert, kamen aber nie zum Einsatz (Sidell 1997). Der Einsatz chemischer Kampfstoffe während des I. Golfkrieges (1980-1988) durch irakische Streitkräfte gegen den Iran (Tabun) und die kurdische Bevölkerung im eigenen Land (Sarin) sind die letzten Beispiele militärischer Verwendung chemischer Waffen (Marshall 1984; MacIlwain 1993). Der II. Golfkrieg (1991) war der letzte Konflikt mit hoher Bedrohung durch chemische Kampfstoffe, der zu extensiven Schutzmaßnahmen führte, einschließlich der Anwendung der Pyridostigmin-Vorbehandlung durch alliierte Streitkräfte

(Szinicz und Baskin 1999). 1994 ließen Mitglieder der japanischen Aum-Sekte in einem Apartment-Komplex in Matsumoto Sarin ausströmen und 1995 wurden in der Tokioter U-Bahn Sarin und Cyanid freigesetzt. Diese Anschläge in Japan zeigen darüber hinaus, dass nicht-staatliche Gruppierungen ebenso in der Lage sind, hochtoxische Chemikalien in ausreichenden Mengen zu produzieren, um Massenvergiftungen verursachen zu können (Nozaki et al. 1995; Suzuki et al. 1995; Woodall 1997). Die Kenntnisse über Risiken durch chemische Kampfstoffe, die Schutzmaßnahmen und Therapie erscheinen daher nicht nur aus militärischen Gesichtspunkten notwendig.

Nervenkampfstoffe sind bei Raumtemperatur flüssige und sehr lipophile Verbindungen, Kontakt mit ihnen verursacht zunächst lokale Wirkungen, die rasch in systemische übergehen können. Nach lokaler Einwirkung sehr geringer Mengen können örtliche Symptome überwiegen (z. B. Augen, Lunge, Haut oder Magen-Darm-Trakt). Nervenkampfstoffe wirken in deutlich kleineren Dosen und schneller als die verwandten phosphororganischen Pestizide, die tödliche Dosis wird beim Erwachsenen auf 1 – 10 mg resorbierten Gifts geschätzt (Klimmek et al. 1983; Thiermann et al. 1995). Eine In-vitro-Studie mit humaner Erythrozyten-, ZNS- und Muskel-Cholinesterase beispielsweise zeigte, dass Sarin die 10-fache inhibitorische Aktivität von Tetraethylpyrophosphat, die 30-fache von Neostigmin, die 100-fache von Diisopropylfluorophosphat und die 1000-fache von Parathion besitzt (Grob und Harvey 1958).

Nervenkampfstoffe hemmen, ebenso wie die strukturverwandten Pestizide, die Acetylcholinesterase (AChE). Bei Inhalation von Dämpfen der Nervenkampfstoffe wird die Acetylcholinesterase im Blut schneller gehemmt als nach dermale Kontakt, toxische Wirkungen entwickeln sich rascher (Sidell 1997). Durch den verminderten Abbau von Acetylcholin kommt es zu einer Anhäufung dieses Neurotransmitters im Bereich cholinerg Synapsen mit unkontrollierter Steigerung der Aktivität cholinerg innervierter Organe und Gewebe bis zum Funktionsverlust. Dies kann zum Tod des Gesamtorganismus führen. Der Mechanismus der Hemmung besteht in der irreversiblen Phosphorylierung der Hydroxyl-Gruppe des Serins im esteratischen Teil des aktiven Zentrums der Acetylcholinesterase.

Das klinische Erscheinungsbild wird beherrscht von der peripheren muscarinergen Überaktivität exokriner Drüsen (Nasenlaufen, Speichelfluß, Tränenfluß, Schweißausbruch) und glatter Muskulatur (Miosis, Akkommodationsstörung, erhöhter Atemwiderstand, Abdominalkrämpfe) sowie der nicotinergen Funktionsstörung quergestreifter Muskulatur (Hemmung neuromuskulärer Übertragung) und der Ganglien. Der Tod tritt meist durch Ersticken ein, verursacht durch Bronchokonstriktion, Bronchorrhoe sowie zentrale und/oder periphere Atemlähmung (Szinicz 1994).

Die Basis der Antidottherapie stellen Anticholinergika (Atropin), Oxime und Antikonvulsiva dar. Atropin ist ein kompetitiver Antagonist des Acetylcholins an Muscarin-empfindlichen Rezeptoren. Zentrale Atemdepression, Hypersekretion, erhöhte Aktivität glatter Muskeln, Bradykardie und andere muscarinerge Symptome werden durch Atropin gemildert. Nicotinerge Symptome, wie Faszikulationen der Skelettmuskulatur und neuromuskulärer Block sprechen nicht an. Hier versucht man durch Therapie mit kausal wirkenden Oximen die Hemmung der Acetylcholinesterase aufzuheben.

Oxime sind nucleophile Substanzen und wirken durch Bindung an den Phosphylrest des Giftes, das an das Enzym gebunden ist. Der entstehende Phosphyl-Enzym-Oxim-Komplex wird zum freien Enzym und einem Phosphyloxim gespalten. Obidoxim und einige Salze des Pralidoxims sind als Arzneimittel für die Behandlung von Vergiftungen mit phosphororganischen Verbindungen in den meisten Ländern zugelassen. Beide Substanzen sind sehr effektiv wirksam bei einer Vergiftung mit Organophosphat-Pestiziden (Worek et al. 1996; Tuovinen et al. 1999), sind jedoch bei der Nervenkampfstoffvergiftung (v. a. bei Soman) nur begrenzt wirksam (Inns und Leadbeater 1983). Die Wirksamkeit von Oximen wird limitiert durch die sogenannte Alterung des Acetylcholinesterase-Giftkomplexes, die erneute Hemmung des Enzyms durch persistierendes Gift sowie durch das entstehende Phosphyloxim. Bei der Alterung wird vom Phosphyl-Enzym-Komplex eine Alkylgruppe abgespalten, die Phosphylierung wird somit irreversibel und das Enzym kann auch durch Oxime nicht mehr reaktiviert werden. Die Halbwertszeit der Alterung gehemmter menschlicher Acetylcholinesterase liegt bei Dimethylphosphoryl-Verbindungen beispielsweise bei etwa 4 Stunden (Worek et al. 1999b), bei Diethylphosphoryl-Verbindungen bei etwa 30-40 Stunden (Mast 1997; Worek et al. 1997). Bei den Nervenkampfstoffen (Phosphonsäureester) „altert“ das Soman-gehemmte menschliche Enzym mit einer Halbwertszeit von nur ca. 2 min am schnellsten, die Halbwertszeiten für durch Sarin, Tabun und VX gehemmtes Enzym liegen bei etwa 5, 13 und 48 Stunden (Sidell und Groff 1974; Dunn et al. 1997; Szinicz und Baskin 1999). Vor allem die sehr rasche Alterung Soman-gehemmter AChE lässt nur einen geringen zeitlichen Spielraum für eine effektive Therapie zu, so kommt der Einsatz von reaktivierenden Oximen oftmals zu spät.

Auf der Suche nach anderen möglichen Schutzmaßnahmen scheint die Carbamat-Prophylaxe eine wichtige Rolle zu spielen. Schon 1946 konnte in Tierexperimenten gezeigt werden (Koster 1946), dass mit Physostigmin vorbehandelte Katzen häufiger eine Diisopropylfluorophosphat-Vergiftung überlebten und sich anschließend schneller wieder erholten, als Tiere ohne Prophylaxe. In-vitro-Untersuchungen bestätigten den Schutzeffekt von Physostigmin vor der irreversiblen Hemmung der AChE und zeigten, dass die Schutzwirkung in Abhängigkeit von der Physostigminkonzentration zunahm (Koelle 1946). Bei einer Reihe von Spezies

hat sich die Vorbehandlung mit einem Carbamat und die unterstützende Therapie mit einem Anticholinergikum als die effektivste Behandlung der Somanvergiftung dargestellt (Berry und Davies 1970; Gordon et al. 1978; Dirnhuber et al. 1979; Inns und Leadbeater 1983; Wetherell et al. 2002).

Carbamate, wie z.B. Pyridostigmin und Physostigmin sind ebenso wie phosphororganische Verbindungen in der Lage, die AChE zu hemmen. Carbamate binden wie Organophosphate an die Hydroxyl-Gruppe des Serins im aktiven Zentrum des Enzyms. Der Alkoholrest des Carbamats wird abgespalten und hinterlässt ein im esteratischen Teil carbamoyliertes Enzym. Im Gegensatz zur schnellen Hydrolyse des acetylierten Enzyms (ms), erfolgt hier die Hydrolyse erst Minuten bis Stunden später, die Halbwertszeit der Decarbamoylierung humaner Erythrozyten-AChE liegt beispielsweise für das Physostigmin-gehemmte Enzym bei 10-20 min (pH 7,4; 37 °C) (Wetherell und French 1991; Irmhoff-Britt 1993). Die hydrolytische Spaltung des Phosphatrestes vom Enzym erfolgt bei Dimethylphosphoryl-AChE mit einer Halbwertszeit von 0,7 h (Worek et al. 1999b), bei Diethylphosphoryl-AChE mit einer Halbwertszeit von etwa 30 h (Worek et al. 1997) und kann bei Verbindungen mit größeren Alkylresten ganz ausbleiben. So zeigt Soman-gehemmtes Enzym keinerlei Spontanreaktivierung (Sidell 1997), die enzymatische Aktivität steigt erst mit der langsamen Neusynthese des Enzyms wieder an.

Es erscheint auf den ersten Blick paradox, dass Carbamate gegen eine Vergiftung mit Nervenkampfstoffen helfen sollen, aber zwei charakteristische Merkmale der Carbamat-Enzym-Bindung können die Wirksamkeit der Carbamate möglicherweise erklären. Zum einen ist die Carbamoylierung, die Reaktion des Carbamates mit dem aktiven Zentrum der AChE, im Gegensatz zur irreversiblen Inhibierung durch Nervenkampfstoffe zu jeder Zeit reversibel. Es bedarf keiner reaktivierenden Oxime zur Dissoziation des Carbamates vom Enzym (Decarbamoylierung), und der Carbamat-Enzym-Komplex unterliegt nicht dem Prozess der Alterung. Zum anderen ist das carbamoylierte Enzym vor einem Angriff durch Nervenkampfstoffe vollständig geschützt, da die Hydroxyl-Gruppe des Serins zur Bindung irreversibler Hemmstoffe nicht zugänglich ist (Dunn et al. 1997). Nach schneller Eliminierung des Organophosphats wird das Enzym spontan decarbamoyliert und damit frei für seine physiologische Funktion, ausreichend um ein Überleben zu ermöglichen (Berry und Davies 1970; Gordon et al. 1978; Dirnhuber et al. 1979). Die beschriebene Vorstellung kann zwar erklären, warum Tiere, die nach Carbamat-Prophylaxe eine Organophosphat-Vergiftung überlebt haben, sich nach der Organophosphat-Elimination schneller erholen als überlebende Tiere ohne Carbamat-Prophylaxe. Es ist aber nicht klar, wie die akute Phase während gleichzeitiger Anwesenheit von Carbamat und Organophosphat bzw. Nervenkampfstoff überlebt wird, da man annehmen würde, dass das Enzym zu dieser Zeit vollständig gehemmt vorliegt, entweder

durch Carbamoylierung oder durch Phosphorylierung. Diese Einschätzung wurde auch von Berry und Davies in ihrer viel zitierten Publikation formuliert (Berry und Davies 1970): „If this is the mechanism of the protective action, there is obviously a period during which a great proportion of the enzyme would be inactivated, both reversibly and irreversibly. During this critical period a lethal accumulation of acetylcholine could occur at the nerve endings.“

Es stellt sich die Frage, ob die Restaktivität der Acetylcholinesterase bei gleichzeitiger Anwesenheit von Carbamat und Organophosphat tatsächlich höher ist, als in Abwesenheit des Carbamats. Oder gibt es andere Faktoren der Prophylaxe, die ein Überleben ermöglichen?

Albert Green gelang mithilfe eines theoretischen kinetischen Modells zu dem verblüffenden Ergebnis, dass die Fraktion an aktivem Enzym nach Vorhemmung durch ein Carbamat nach einer Vergiftung durch ein irreversibel hemmendes Organophosphat zu allen Zeiten höher sein kann, als bei einer Organophosphat-Vergiftung ohne Carbamat-Prophylaxe. Voraussetzungen dafür sind eine sehr geringe LD<sub>50</sub> (was bei hochpotenten Nervenkampfstoffen zutrifft) und eine hohe Eliminationsgeschwindigkeit des Organophosphats (was vor allem für Soman zutrifft) (Green 1983).

Es gibt kaum experimentelle Arbeiten, die sich mit dem AChE-Status bei Carbamat-vorbehandelten Tieren nach einer Vergiftung mit Nervenkampfstoffen befassen. Koplovitz et al. beobachteten bei VX-vergifteten Meerschweinchen, dass bei den Carbamat-vorbehandelten Tieren unter Atropinschutz die minimale Cholinesterase-Aktivität des Vollblutes nicht unter 5% des Ausgangswertes abfiel, während ohne Carbamat-Prophylaxe die Aktivität über 1 ½ Stunden praktisch nicht messbar war (Koplovitz et al. 1992). In dieser Arbeit wird allerdings nicht angegeben, wie die Spontandecarbamoylierung ex vivo während des radiometrischen Tests (10 min) verhindert wurde. Insofern ist die Aussagekraft der Untersuchung eingeschränkt. Bereits Aldridge und Reiner (1972) haben darauf hingewiesen, dass die Bestimmungen der Hemm- und Reaktivierungskonstanten für Carbamate häufig mit erheblichen Fehlern behaftet sind, da während der Messzeiten der im allgemeinen verdünnten Lösung bereits eine störende Spontanreaktivierung einsetzt. Das stört wenig bei nur geringgradiger Hemmung, jedoch erheblich bei stark ausgeprägter Hemmung (Aldridge und Reiner 1972). Schließlich waren in der offenen Literatur auch keine In-vitro-Untersuchungen zu finden, welche die interessante Hypothese von Albert Green belegen und eine geringere Hemmung der AChE-Aktivität nach Carbamat-Vorbehandlung und anschließender Organophosphat-Exposition zeigen.

Als quaternäre Verbindung liegt Pyridostigmin ionisiert vor, penetriert nur sehr schlecht ins zentrale Nervensystem (ZNS), wirkt damit hauptsächlich peripher und kann eine Verbesserung der neuromuskulären Übertragung bewirken. Es wird seit vielen Jahren zur Therapie der

Myasthenia gravis, einer Störung der neuromuskulären Transmission eingesetzt. Pyridostigmin ist seit 1955 von der amerikanischen FDA (Food and Drug Administration) zu diesem Zweck zugelassen. Fehlende experimentelle Belege haben wohl auch die FDA zunächst zögern lassen, einer Indikationserweiterung des im Handel befindlichen Pyridostigmin zum Zweck einer Vorbehandlung bei drohender Organophosphat-Vergiftung zuzustimmen. Die Pyridostigminvorbehandlung wird vor allem bei Vergiftungen mit Nervenkampfstoffen empfohlen, bei denen Oxime eine geringe Wirkung zeigen, wie Soman und Tabun. Eine zusätzliche, nachfolgende Behandlung mit Atropin und Oximen, gegebenenfalls auch mit Antikonvulsiva bleibt auch nach Prophylaxe mit Carbamaten bei einer Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen notwendig (Lallement et al. 2002b). Bei Vergiftungen mit voller Oximwirksamkeit, wie bei Sarin und VX, konnte keine Verbesserung des therapeutischen Erfolges durch Pyridostigminvorbehandlung gezeigt werden (Inns und Leadbeater 1983; Koplovitz et al. 1992). In Abwesenheit von Oxim ist die Kombination von Carbamat und Anticholinergikum gegen Sarin allerdings effektiver als gegen Soman (Leadbeater et al. 1985).

Zur Zeit des Golfkrieges war Pyridostigminbromid (PB) zum Schutz der Soldaten bei einem Angriff mit Nervenkampfstoffen noch nicht zugelassen, die FDA gestattete dem Militär jedoch während dieser Zeit, PB unter dem Aspekt einer „investigational new drug“ (IND) zu verteilen. Eine Hemmung der Erythrozyten-Acetylcholinesterase um etwa 20-30% wird für die prophylaktische Behandlung von Menschen als ausreichend verträglich erachtet (Lallement et al. 2002b). Es wird angenommen, dass in den Synapsen genügend überschüssige AChE-Aktivität vorhanden ist, dass eine 20-40%ige Hemmung des Enzyms durch Pyridostigmin keine Verminderung der Neurotransmission hervorruft. Bei der empfohlenen Dosis von 30 mg PB (1 Tablette) alle 8 Stunden konnten keine signifikanten Beeinträchtigungen, weder mentale noch physische, bei den Soldaten beobachtet werden (Dunn et al. 1997). Am 5. Februar 2003 sprach die FDA schließlich die Zulassung von Pyridostigminbromid als Prophylaxemittel zum Schutz gegen eine Vergiftung mit Soman für den Feldeinsatz US-amerikanischer Truppen aus. Pyridostigminbromid war somit das erste Arzneimittel, das unter einer kürzlich verabschiedeten (Juni 2002) „FDA rule“ (häufig auch als „animal efficacy rule“ bezeichnet), zugelassen wurde. Diese erlaubt es, Daten aus Tierversuchen als Beweis der Wirksamkeit eines Medikaments heranzuziehen, wenn Untersuchungen an Menschen aus ethischen Gründen nicht möglich sind. Die Abschätzung der Sicherheit beruhte auf der langjährigen Erfahrung in der Anwendung bei der Myasthenia gravis, bei der höhere Dosen verwendet werden als beim Einsatz gegen Soman. Nach einer Exposition gegenüber Soman sollte das als Prophylaxe eingenommene PB abgesetzt werden, da sich zunehmend Nebenwirkungen bemerkbar machen könnten. Untersuchungen (an Ratten) zeigten schließ-

lich, dass eine Belastung mit Soman die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für Pyridostigmin fördert (Dunn et al. 1997).

Physostigmin, ein zentral wirksamer Hemmstoff der Acetylcholinesterase, ist nach derzeitigen Befunden (Berry und Davies 1970; Leadbeater et al. 1985; Miller et al. 1993; Szinicz und Baskin 1999; Wetherell et al. 2002) wirksamer als Pyridostigmin, die Einschränkung der Handlungsfähigkeit nach Vergiftung mit einer Reihe von Nervenkampfstoffen zu vermindern. Als Grund hierfür wird im Allgemeinen angegeben, dass Physostigmin als tertiäre Verbindung die Blut-Hirn-Schranke überwinden und auch dort die AChE schützen kann (Grunwald et al. 1994). Möglicherweise trägt die Fähigkeit des Physostigmins, Ionenkanäle zu blockieren, zur Wirksamkeit zusätzlich bei, der Einschränkung der Handlungsfähigkeit durch Nervenkampfstoffe entgegenzuwirken (Albuquerque et al. 1988). Physostigmin carbamoyliert die ZNS-ChE und schützt die Versuchstiere effektiver vor einer Belastung mit Nervenkampfstoffen als Pyridostigmin. Die Hemmung der ZNS-AChE ruft jedoch Bedenken möglicher Nebenwirkungen hervor. So kam es bei Behandlung gesunder Probanden zu Störungen der Psyche und Auffälligkeiten im Verhaltensmuster. Physostigmin wird deshalb meist in Kombination mit einem Cholinolytikum wie Scopolamin oder Aprophen verwendet (Leadbeater et al. 1985), um zentrale Nebenwirkungen des Carbamats zu verhindern. Diese blockieren allerdings auch die muscarinerge Funktion der Sekretion und verhindern zum Nachteil der Betroffenen z. B. das Schwitzen, was bei warmen klimatischen Bedingungen zum Risiko einer Überhitzung führen kann (Matthew 1991; Sidell 1997).

Andere Substanzen, die die Acetylcholinesterase reversibel hemmen, werden zunehmend als mögliche Prophylaxemittel diskutiert. Huperzin A, ein Alkaloid das aus *Huperzia serrata*, dem chinesischen Fichtenbärlapp isoliert werden kann, ist ein reversibler, nicht acylierender Hemmstoff der Acetylcholinesterase und wird derzeit bei der Therapie der Alzheimer Krankheit angewandt. Es wird in klinischen Studien zur Therapie der Myasthenia gravis untersucht und wird zur unterstützenden Behandlung bei der Behebung von Gedächtnisstörungen (Lallement et al. 2002a; Lallement et al. 2002b) eingesetzt. Huperzin A penetriert im Gegensatz zu Pyridostigmin ins Gehirn und kann dort auf die ZNS-AChE wirken (Ashani et al. 1992). Ein weiterer Vorteil ist, dass es spezifisch die Erythrozyten-AChE hemmt, während Physostigmin und Pyridostigmin auch die Plasma Butyrylcholinesterase (BChE) hemmen (Lallement et al. 2001a). Diese hohe Selektivität erhält die scavenger-Funktion der Plasma-BChE aufrecht und ermöglicht das Abfangen und „Entschärfen“ phosphororganischer Verbindungen in der Blutbahn, schon bevor die kritischen Ziele (periphere und zentrale AChE) erreicht werden (Broomfield et al. 1991). In hohen Dosen schützt Huperzin A behandelte Tiere (Meerschweinchen und Affen) vor Krämpfen und anderen zentralen Wirkungen einer Somanvergiftung besser als Pyridostigmin (Lallement et al. 2001b; Lallement et

al. 2002a). Es ist bekannt dass die biologische Halbwertszeit von Huperzin A länger ist als die von Physostigmin und Pyridostigmin. Somit kann die Schutzwirkung möglicherweise ausgedehnt werden, was einen erheblichen Vorteil für die prophylaktische Anwendung gegen Organophosphatvergiftungen bringen würde (Grunwald et al. 1994). Huperzin A scheint deshalb ein viel versprechender Kandidat als alternatives Prophylaxemittel zu sein (Lallement et al. 2002b).

Fragestellungen:

Alle Versuche, reversible Hemmstoffe der AChE zum Schutz vor irreversibler Phosphorylierung einzusetzen, gehen immer noch von der Prämisse aus, dass in der Akutphase ein höherer Anteil der AChE funktionsfähig ist als ohne Prophylaxe. Diese Vorstellung konnte bisher aber experimentell nicht sauber belegt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, ein experimentelles System zu entwickeln, bei dem die Enzymaktivität im Fließgleichgewicht von reversibler und irreversibler Hemmung kontinuierlich verfolgt werden kann. Bei diesem Verfahren musste jedoch verhindert werden, dass sich reaktive Produkte, wie die gefürchteten Phosphoryloxime, anhäufen. Das wird üblicherweise durch Herausverdünnen der Probe vor der Messung versucht, ein Verfahren, bei dem aber schon beträchtliche Spontanreaktivierung auftritt. Zur Lösung des Problems bot sich ein dynamisches Verfahren an, bei dem ein stationärer Enzymreaktor mit einem Medium kontinuierlich perfundiert wird, das alle Komponenten in gewünschter Konzentration zuführt und alle Reaktionsprodukte entfernt. Gleichzeitig muss die Enzymaktivität in Echtzeit verfolgt werden können. Schließlich war von dem Modell gefordert, dass die Enzymaktivität reproduzierbar und ausreichend lang stabil blieb (einige Stunden). So wurde ein Durchflussmodell gewählt, in dem die Acetylcholinesterase-Aktivität einer fixierten Enzymquelle nach einer modifizierten Ellman-Methode (Ellman et al. 1961; Worek et al. 1999a) kontinuierlich gemessen werden kann, während programmiert unterschiedliche Konzentrations-Zeit-Profile ablaufen. Als Enzymquelle sollten bevorzugt humane Erythrozyten verwendet werden, da die Erythrozyten-AChE einen sehr guten Surrogatparameter für die Funktion der Endplatten-AChE und der neuromuskulären Transmission darstellt (Ballantyne und Marrs 1992; Eyer et al. 2000). Erythrozyten-AChE und Muskel-AChE werden nur von einem Gen kodiert und sind im globulären Anteil des katalytisch kompetenten Enzymabschnitts identisch (Taylor 1996). Die Erythrozyten sollten parallel mit Substraten, Giften, Oximen, dem Indikatorfarbstoff Ellmans Reagenz und Puffer durchströmt werden, ohne dass sich störende Reaktionsprodukte anhäufen können.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war - nach Etablierung dieses Durchflussmodells - kinetische Konstanten von Hemmung und Reaktivierung der Acetylcholinesterase mit verschiedenen reversiblen und irreversiblen Hemmstoffen im „dynamischen System“ zu ermitteln. Die

Schutzwirkungen verschiedener reversibler Hemmstoffe vor irreversibler Hemmung sollten geprüft werden. Gibt es Unterschiede in der Wirksamkeit?

Die Restaktivitäten nach Hemmung mit Organophosphaten und nach gleichzeitiger Behandlung mit reversiblen Hemmstoffen und Organophosphaten sollten verglichen werden.

Kann die theoretische Hypothese von Albert Green mit dem „dynamischen Modell“ praktisch bestätigt werden? Wie gut können Ergebnisse aus den existierenden Tierexperimenten auf den Menschen übertragen werden? Liefern die „dynamischen“ In-vitro-Untersuchungen an humanen Erythrozyten mit den Tierexperimenten vergleichbare Ergebnisse?

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Acetonitril LiChrosolv: E. Merck (Darmstadt, Deutschland). Acetylthiocholin Iodid: Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Aktivkohle Norit A: Serva (Heidelberg, Deutschland). Decon 90 Konzentrat: Zinsser Analytic GmbH (Frankfurt, Deutschland). 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure): Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Ethanol absolut: E. Merck (Darmstadt, Deutschland). Ethopropazin: Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Gelatine (Fluka Best.-Nr. 48719): Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland). HCl Konz.: E. Merck (Darmstadt, Deutschland). (-)-Huperzin A: Calbiochem®-Merck (Darmstadt, Deutschland). KCN,  $K_3[Fe(CN)_6]$ ,  $KH_2PO_4$ : E. Merck (Darmstadt, Deutschland). Methyl-Paraoxon: Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Deutschland).  $Na_2HPO_4$ ,  $NaHCO_3$ : E. Merck (Darmstadt, Deutschland). Obidoxim Dichlorid Monohydrat: Duphar (Amsterdam, Holland). Paraoxon-ethyl: Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Physostigmin (Eserin Hemisulfat): Sigma (Taufkirchen, Deutschland). 2-Propanol: E. Merck (Darmstadt, Deutschland). Pyridostigmin Bromid: Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS): E. Merck (Darmstadt, Deutschland). Triton X-100: Sigma (Deisenhofen, Deutschland).

#### 2.1.2 Pufferlösungen

0,1 M Phosphatpuffer (PP)

Stammlösung 1:  $Na_2HPO_4$  wasserfrei; MG 141,96 (28,4 g in 2000 mL Aq. bidest.)

Stammlösung 2:  $KH_2PO_4$ , MG 136,1 (6,8 g in 500 mL Aq. bidest.)

Lösung 1 wurde vorgelegt und mit Lösung 2 am pH-Meter auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer filtriert (Filter: Millipore, Typ HA, Porengröße 0,45  $\mu m$ ).

0,2%iger Gelatine-Phosphatpuffer (G-PP)

In 500 mL PP wurde unter Erwärmen 1 g Gelatine gelöst, anschließend filtriert (Filter: Millipore, Typ HA, Porengröße 0,45  $\mu m$ ).

#### 2.1.3 Humanerythrozyten

Zur Herstellung von Erythrozyten-Suspensionen wurde heparinisieretes Venenblut bei 3000 U/min 15 min zentrifugiert. Überstehendes Plasma wurde abpipettiert und tiefgefroren (-20 °C) aufbewahrt. Die Erythrozyten wurden 5mal mit dem dreifachen Volumen an 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen (3000 U/min; 10 min). Die Suspension wurde mit PP auf 5 g/dL Hämoglobin (Hb) eingestellt und auf Eis gekühlt im Kühlraum bei 4-5 °C aufbewahrt.

Verdünnte Humanerythrozyten zur Herstellung des Enzymreaktors:

80  $\mu\text{L}$  der auf 5 g/dL eingestellten Erythrozyten wurden mit 0,1 M Phosphatpuffer auf 5 mL verdünnt.

### **2.1.4 Reagenzien für Versuche mit Enzymreaktor**

Acetylthiocholin Iodid (ASCh); MG 289,2

520,6 mg ASCh wurden in 100 mL Aq. bidest gelöst und portioniert bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Konzentration der Lösung betrug 18 mM (für Versuche mit 0,45 mM Endkonzentration).

104,12 mg ASCh wurden in 100 mL Aq. bidest gelöst und portioniert bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Konzentration der Lösung betrug 3,6 mM (für Versuche mit 0,09 mM Endkonzentration).

Ellman's Reagenz, 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB); MG 396,4

Zur Herstellung einer Stammlösung wurden 475,56 mg in 100 mL Phosphatpuffer (PP) gelöst. Die Lösung wurde gekühlt ( $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) im Dunkeln aufbewahrt. Zur Durchführung wurde diese Stammlösung täglich frisch 1:10 mit PP verdünnt. Die Konzentration der Gebrauchslösung betrug 1,2 mM.

(-)-Huperzin A; MG 242,3 (Reinheit: 95%)

250  $\mu\text{g}$  wurden in 200  $\mu\text{L}$  Acetonitril LiChrosolv gelöst und mit Aq. bidest. auf 25 mL verdünnt. Die Lösung wurde portioniert bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Konzentration der Stammlösung betrug 40  $\mu\text{M}$ . Zur Durchführung wurde die Stammlösung täglich frisch mit G-PP verdünnt.

Methyl-Paraoxon; MG 247,14 (Reinheit: 95%)

23,13 mg wurden in 200  $\mu\text{L}$  Ethanol gelöst und mit Aq. bidest. im Messkolben auf 10 mL aufgefüllt. Die Konzentration der Stammlösung betrug 8,89 mM. Zur Durchführung wurde täglich frisch mit G-PP verdünnt.

Obidoxim Dichlorid Monohydrat (Obi), 99%, 1,1'-Oxybis(methylen) bis[4-(hydroxyimino)-methyl-]pyridinium-dichlorid-monohydrat; MG 377,2

Zur Herstellung einer Stammlösung wurden 377,2 mg in 50 mL Aq. bidest. gelöst und portionsweise bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Konzentration betrug 20 mM. Zur Durchführung wurde die Stammlösung täglich frisch mit G-PP verdünnt. Die Konzentration der Gebrauchslösung betrug 44,4  $\mu\text{M}$ . (Aufbewahrung der Obidoximlösung im Kunststoffgefäß, um Adsorption des Wirkstoffs an Glas zu verhindern.)

Paraoxon-ethyl (Px), O,O-Diethyl-O-4-nitrophenylphosphat; MG 275,2

Stammlösungen in Isopropanol bzw. wäßrige Lösungen nach Reinigung: Zur Entfernung des

störenden Anteils an p-Nitrophenol in Paraoxon-ethyl wurden 14,6 mL einer 5 mM wässrigen Suspension von Paraoxon-ethyl mit 19,5 mg Aktivkohle (Norit A) und 14  $\mu$ L konz. HCl versetzt, gerührt, geschüttelt und anschließend bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein Faltenfilter filtriert, der pH-Wert des Filtrats mit 1 M Tris auf pH 5 eingestellt und die Konzentration photometrisch bestimmt ( $\epsilon_{274\text{nm}} = 8.903 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Merck-Index 1989). Die gereinigte Lösung wurde portionsweise bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Konzentration der Stammlösung betrug 3,4 mM. Zur Durchführung wurde täglich frisch mit G-PP verdünnt.

Physostigmin (Eserin Hemisulfat); MG 324,4

In 250 mL Aq. bidest wurden 7,21 mg gelöst und portionsweise bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Die Konzentration der Stammlösung betrug 88,89  $\mu$ M. Zur Durchführung wurde täglich frisch mit G-PP verdünnt.

Pyridostigmin Bromid; MG 261,1

In 250 mL Aq. bidest. wurden 14,5 mg gelöst und portionsweise bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Die Konzentration der Stammlösung betrug 222,1  $\mu$ M. Zur Durchführung wurde täglich frisch mit G-PP verdünnt.

### **2.1.5 Reagenzien zur Bestimmung der AChE-Aktivität und des Hämoglobingehaltes**

Ellman's Reagenz, 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB); MG:396,3

396,3 mg DTNB wurden in 100 mL PP gelöst und portionsweise tiefgefroren ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) aufbewahrt. Die Konzentration betrug 10 mM.

Endkonzentration in der Küvette: 0,3 mM

Acetylthiocholin Iodid (ASCh); MG 289,2

41,12 g ASCh wurden in 5,0 mL Aq. dest. gelöst und portionsweise tiefgefroren ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) aufbewahrt. Die Konzentration betrug 28,4 mM.

Endkonzentration in der Küvette: 0,450 mM

Ethopropazin (Etho); MG 348,94

20,94 mg Ethopropazin wurden in 10 mL 12 mM HCl unter Erwärmung und Rühren gelöst und portioniert bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Konzentration betrug 6 mM.

Endkonzentration in der Küvette: 0,019 mM

Verdünnungsreagenz

100  $\mu$ L Triton X-100 wurden unter Rühren in 100 mL PP gelöst.

Endkonzentration Triton X-100: 0,1%

### Transformationslösung

200 mg Kaliumhexacyanoferrat ( $K_3[Fe(CN)_6]$ , MG 329,2), 50 mg Kaliumcyanid (KCN, MG 65,1), 1000 mg Natriumbicarbonat ( $NaHCO_3$ , MG 84,0) wurden in 1000 mL Aq. bidest. gelöst. Es wurden 0,5 mL Triton X-100 zugegeben und gut vermischt.

### **2.1.6 Geräte, Labormaterialien und Hilfsmittel**

Abimed-Pipetten (Gilson; Langenfeld, Deutschland)

Digital pH-Meter Knick Typ 647 (über Bachofer; Reutlingen, Deutschland), pH-Elektrode Inlab®423 (Mettler Toledo; Deutschland)

Einhängethermostat C10 (Thermo Haake; Karlsruhe, Deutschland)

Einwegspritzen 10 ml Discardit II (Becton Dickinson; Heidelberg, Deutschland)

Filter Type HA, 0,45  $\mu m$  Porengröße; Filter Millex®-GS, 0,22  $\mu m$  Porengröße,  $\varnothing$  33 mm (Millipore; Eschborn, Deutschland)

Filter Minisart®, 0,20  $\mu m$  Porengröße (Sartorius AG; Göttingen, Deutschland)

Photometer 1101M, Registrieradapter 6441, Kompensationsschreiber 6511 (Eppendorf; Hamburg, Deutschland), Thermostat und Wasserbad Julabo Typ MP-5 (Julabo Labortechnik GmbH; Seelbach, Deutschland)

Polystyrol-Einmalküvetten 1 cm Schichtdicke (Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland)

Reaktionsgefäße (Eppendorfcups) 1,5 – 2,0 ml (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg, Deutschland)

Schlauchpumpe 2120 Varioperpex® II Pumpe (LKB; Bromma, Schweden)

UV-VIS Photometer (UV-265) (Shimadzu; Duisburg, Deutschland)

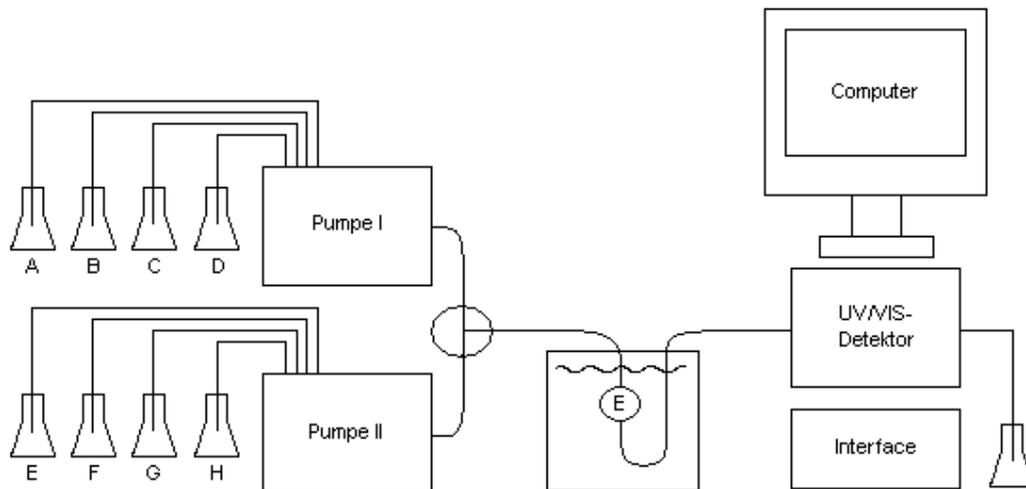
LaChrom®HPLC System: L-7100 HPLC-Pumpe, L-7420 UV/VIS-Detektor, D-7000

Interface, D-7000 HPLC-System-Manager Vers. 4.1 (Merck-Hitachi; Darmstadt, Deutschland)

Berechnungen und Kurvenanpassungen erfolgten an einem PC mit Hilfe der Programme GraphPad Prism™ Vers. 3.0 (San Diego, USA) und Maple 9.0 (v19) (Maplesoft 2003; Waterloo Maple Inc.).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Aufbau der Anlage



**Abb. 2-1:** Schematischer Aufbau des Durchflussmodells mit Enzymreaktor „E“.

Wie in dem Schema der Anlage gezeigt, wurden die durch zwei Pumpen (I und II; LaChrom L-7100; Vierfach-Niederdruck-Gradientenformer) bereitgestellten 8 Eluenten (A-H) über ein T-Stück zusammengemischt und durch eine Restriktionskapillare (um den Vordruck auf ca. 5 bar zu erhöhen) über den Enzymreaktor (E) geleitet. Restriktionskapillare und Enzymreaktor wurden in ein Wasserbad getaucht, das über einen Einhängethermostat auf 37 °C temperiert wurde. Als fixierte Enzymquelle wurden Erythrozyten verwendet, die in dünner Schicht auf ein Membranfilter aufgebracht wurden. Durch dieses Filter wurden Pufferlösung, Acetylthiocholin (ASCh) als Substrat und DTNB als Chromogen perfundiert. Das Eluat passierte ein Durchflussphotometer (LaChrom L-7420; UV-VIS Detektor), wobei das photometrische Signal bei konstantem Fluss der Enzymaktivität im Enzymreaktor direkt proportional war.

Die Datenaufnahme erfolgte automatisch mit Hilfe des D-7000 HPLC-System-Managers. Extinktionswerte wurden im Abstand von 1,6 s aufgenommen und in eine ASCII-Datei geschrieben, die mit der Kalkulationssoftware Microsoft Excel XP aufbereitet und zur Kurvenanpassung mit dem Programm GraphPad Prism Vers. 3.0 bearbeitet wurde.

## **2.2.2 Überprüfen der Gerätespezifikationen**

### **2.2.2.1 Linearität des Detektors/Prüfen der Zumischgenauigkeit der Gradientenformer**

Die Linearität des Detektors wurde bei 420 nm mittels eines Farbstofftests überprüft. Mit Hilfe eines Gradientenprogramms (Methode siehe Anhang 8.1.1) wurde Phosphatpuffer (PP) stufenweise mit einer 0,06%igen  $K_3Fe[(CN)_6]$ -Lösung in 0,1 M PP, pH 7,4 (KFZ-PP) vermischt. Am Auslauf des Detektors wurden einzelne Fraktionen der gemischten Farblösungen aufgefangen und die dazugehörigen Absorptionssignale des Detektors mitprotokolliert. Die Fraktionen wurden zusätzlich an einem anderen Photometer (UV-265; Shimadzu) gegen PP gemessen und die Absorptionswerte mit denen des Detektors verglichen. Die erhaltenen Stufenhöhen wurden ausgemessen und bezogen auf den Maximalwert von 100% berechnet.

### **2.2.2.2 Hysterese der Gleichgewichtseinstellung**

Mit Hilfe dieses Tests (Methode siehe Anhang 8.1.3) sollten die Geschwindigkeit und der zeitliche Verlauf der Gleichgewichtseinstellung des Absorptionssignals bestimmt werden. Die Versuche wurden mit 2 Pumpen, die mit dem gleichen Zeitablauf programmiert wurden, durchgeführt. Die Schläuche der Pumpen wurden mit Alufolie ummantelt, um einen Einfluss von Licht ( $K_3Fe[(CN)_6]$ ) auszuschließen.

Nach Vorspülen des Systems mit Wasser und Puffer wurde zunächst mit einem Kanal 100% PP gefördert, nach Einstellung einer stabilen Basislinie (ca. 2 min) wurde zu 100% auf einen zweiten Kanal mit 0,04%iger KFZ-PP Lösung umgestellt. Nach Erreichen des maximalen Signals (nach ca. 60 min) wurde bis zum Erreichen des Ausgangswertes mit PP nachgespült (ca. 60 min). Die Kanalbelegung wurde variiert, gemessen wurden Kanäle A gg. D, D gg. A, B gg. C und C gg. B. In den jeweils „ruhenden“ Kanälen stand entweder PP oder KFZ-PP an, um zu prüfen, ob eine mögliche Diffusion Einfluss auf die Gleichgewichtseinstellung hat. Es wurden Versuche jeweils mit und ohne Filter durchgeführt und die resultierenden Ergebnisse verglichen.

## **2.2.3 Lagerstabilität von Humanerythrozyten**

Zur Prüfung der Stabilität der Erythrozyten mit zunehmender Lagerdauer wurden die Bestimmungen der AChE-Aktivität und des Hämoglobingehaltes nach konventionellen Methoden in regelmäßigen Abständen wiederholt. Dazu wurden die auf 5 g/dL eingestellten Erythrozyten mit dem Verdünnungsreagenz 1:30 verdünnt.

### 2.2.3.1 Bestimmung des Hämoglobingehaltes

1,5 mL der Erythrozyten-Verdünnung (1:30) wurden in einer Einwegküvette (Polystyrol, 1 cm Schichtdicke) mit 1,5 mL der Transformationslösung vermischt. Nach 10 min wurde die Extinktion der Probenküvette gegen eine Referenzküvette mit Transformationslösung im Photometer (Shimadzu) bei einer Wellenlänge von 546 nm abgelesen.

### 2.2.3.2 Bestimmung der AChE-Aktivität

Die Aktivität der Erythrozyten-AChE wurde kolorimetrisch nach der modifizierten Methode von Ellman (Ellman et al. 1961; Worek et al. 1999a) im Photometer bei 436 nm, pH 7,4 und 37 °C bestimmt. Als Substrat wurde Acetylthiocholin (0,45 mM) verwendet. Die Acetylcholinesterase spaltet das Substrat in Thiocholin und Essigsäure. Thiocholin reagiert mit dem Ellman Reagenz (DTNB; 0,3 mM) unter Bildung eines gelben, mesomeriestabilisierten Anions (TNB<sup>-</sup>). Gemessen wurde die Initialgeschwindigkeit der Spaltung von DTNB zu TNB<sup>-</sup> in der Küvette. Der Zusatz von Ethopropazin diente der spezifischen Hemmung von BChE in nicht vollständig ausgewaschenem Plasma (Worek et al. 1999a).

#### Ansatz:

In Einwegküvetten (Polystyrol, 1 cm Schichtdicke) wurden folgende Volumina pipettiert:

**Tab. 2-1:** Ansätze zur Bestimmung der AChE-Aktivität von Humanerythrozyten

Endkonzentration in der Küvette	Erythrozyten-AChE	Blindwert
PP (0,1 M; pH 7,4)	2,400 mL	3,000 mL
DTNB (0,3 mM)	0,100 mL	0,100 mL
Ethopropazin (0,019 mM)	0,010 mL	0,010 mL
Erythrozyten-Verdünnung	0,600 mL	-
ASCh (0,45 mM)	0,050 mL	0,050 mL
Gesamtvolumen	3,160 mL	3,160 mL

PP, DTNB und Ethopropazin wurden vorgelegt und mit Erythrozyten-Verdünnung gemischt, anschließend bei 37 °C für 10 min (zur Abreaktion der erythrozytären SH-Gruppen) inkubiert, bevor die Enzymreaktion durch Zugabe von Substrat (ASCh) gestartet wurde. Die Bestimmung des Blindwertes (Spontanhydrolyse) erfolgte unter Abwesenheit der Enzymquelle, das Volumen wurde mit PP ergänzt. Die Absorptionzunahme wurde bei 436 nm aufgenommen.

## **2.2.4 Experimente im dynamischen System mit Enzymreaktor**

### **2.2.4.1 Vorbereitung des Enzymreaktors**

Membranfilter (Millex®-GS) wurden mit Hilfe einer 10 mL Einwegspritze mit Phosphatpuffer vorgespült. (Um Lufteinschlüsse zu vermeiden, wurden die Filter zunächst gegenläufig mit Puffer durchspült, bevor das männliche Luer-Anschlussstück einer Schlauchpumpe aufgesetzt wurde.)

Es wurden 80 µL Erythrozytensuspension (5,0 g/dL Hb) mit Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4) auf 5 mL verdünnt. 3,2 mL dieser Verdünnung wurden mit Hilfe einer Schlauchpumpe (2120 Varioperpex® II Pumpe) langsam (0,32 mL/min) bei Raumtemperatur auf das Membranfilter aufgegeben. Das Filter wurde bis zur Verwendung als Enzymreaktor etwa 5-10 min mit PP nachgespült, um ein Austrocknen oder die Bildung von Luftblasen zu vermeiden.

### **2.2.4.2 Durchführung eines Experiments**

Zu Beginn des Versuchs wurde ein unbeladenes Filter, das nur mit Aq. bidest vorgespült war, perfundiert. Nach Start des jeweilig verwendeten Pumpenprogramms wurde das unbeladene Filter durch einen mit Erythrozytensuspension beladenen Enzymreaktor ersetzt. Kapillare und Filter wurden während des Experiments in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad eingehängt. Nach Einbringen des Enzymreaktors wurde 5 min mit PP zur Stabilisierung der Basislinie, anschließend 5 min mit Wasser zur vollständigen Hämolyse der Erythrozyten perfundiert, bevor die Maximalaktivität der AChE durch Zugabe von Substrat (ASCh) und Chromogen (DTNB) erfasst wurde.

Je nach Experiment und Methode wurden verschiedene Hemm- und Reaktivierungsschritte mit unterschiedlichen Zeitintervallen durchgeführt.

Bei den aufgeführten Versuchen wurde der Gesamtfluss konstant bei 0,5 mL/min gehalten. Routinemäßig wurde bei 470 nm detektiert.

### **2.2.4.3 Programmierung der Pumpen**

#### **Allgemeines Pumpenprogramm**

Pumpe I:	Flussrate 0,25 mL/min
Eluent A	0,2% Gelatine-PP (G-PP)
Eluent B	18 mM ASCh (bei 0,45 mM Endkonzentration); (auf Eis gekühlt) 3,6 mM ASCh (bei 0,09 mM Endkonzentration); (auf Eis gekühlt)
Eluent C	Aq. bidest.
Eluent D	1,2 mM DTNB (bei 0,3 mM Endkonz.); (in brauner Glasflasche)

Pumpe II: Flussrate 0,25 mL/min  
 Eluent A 0,2% Gelatine-PP (G-PP)  
 Eluenten B, C und D je nach Methode variierend;

**Tab. 2-2:** Allgemeines Pumpenprogramm

Pumpe I: 0,25 mL/min					Pumpe II: 0,25 mL/min				
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]
0,0	100	-	-	-	0,0	100	-	-	-
4,9	100	-	-	-	4,9	100	-	-	-
5,0	-	-	100	-	5,0	-	-	100	-
9,9	-	-	100	-	9,9	-	-	100	-
10,0	100	-	-	-	10,0	100	-	-	-
14,9	100	-	-	-	14,9	100	-	-	-
15,0	45	5	-	50	15,0	100	-	-	-
Je nach Methode wurde das Programm ab min 15 variiert.									

Die zeitlichen Abläufe der Methoden A-F sowie die Kanalbelegungen werden detailliert im Anhang angegeben.

**Methode A:** Bestimmung der Stabilität der AChE-Aktivität im Enzymreaktor und Bestimmung des Reagenzienblindwertes (s. Anhang 8.2.1)

Die Stabilität der AChE-Aktivität wurde von der 15. bis zur 180. min durch Perfusion mit DTNB, ASCh und G-PP erfasst, anschließend der Enzymreaktor zur Bestimmung der Reagenzienblindwerte  $BW_{DAG}$  (DTNB, ASCh, G-PP) und  $BW_{G-PP}$  entfernt und gegen ein unbeladenes Filter (mit G-PP vorgespült) ausgetauscht.

Methode A wurde auch zur Bestimmung der Stabilität des Reagenzienblindwertes angewandt, wobei statt des mit Erythrozyten beladenen Enzymreaktors ein mit Aq. bidest. gespültes Filter eingesetzt wurde.

### Methode B: Hemmung mit Paraoxon (zur Bestimmung von Hemmkinetik und Grad der Hemmung) (s. Anhang 8.2.2)

Nach einer Äquilibrierphase ( $AChE_{max}$ ) von der 15. bis 30. min (DTNB, ASCh, G-PP) wurde mit Paraoxon (Endkonzentration  $1 \mu M$ ) bis zur 65. min gehemmt, anschließend der Enzymreaktor entfernt und die Reagenzienblindwerte  $BW_{DAG+Px}$  und  $BW_{DAG}$  (DTNB, ASCh, G-PP) bestimmt. Aus dem Verlauf der Hemmung konnte durch Kurvenanpassung die Hemmkonstante ( $k_{i, obs}$ ) berechnet werden. Durch Berechnung der Differenz der maximalen AChE-Aktivität und der Aktivität im Fließgleichgewicht der Hemmung wurde der Grad der Hemmung ermittelt.

### Methode C: Hemmung mit Paraoxon und Reaktivierung mit Obidoxim (s. Anhang 8.2.3)

Nach einer Äquilibrierphase ( $AChE_{max}$ ) von der 15. bis 30. min wurde mit Paraoxon (Endkonzentration 1 oder  $0,2 \mu M$ ) bis zur 65. min gehemmt und anschließend mit Obidoxim (Endkonzentration  $10 \mu M$ ) perfundiert. Nach 170 min wurde der Enzymreaktor zur Bestimmung der Reagenzienblindwerte  $BW_{Obi+DAG}$  (DTNB, ASCh, G-PP und Obidoxim) bzw.  $BW_{DAG}$  (DTNB, ASCh, G-PP) und  $BW_{G-PP}$  entfernt. Aus dem Verlauf von Hemmung und Reaktivierung konnten durch Kurvenanpassung die Hemm- und Reaktivierungskonstanten berechnet werden. Durch Berechnung der Differenz der maximalen AChE-Aktivität und der Aktivität im Fließgleichgewicht der Hemmung bzw. nach Reaktivierung wurden der Grad der Hemmung sowie der Anteil an reaktivierbarem Enzym ermittelt.

### Methode D: Hemmung mit reversiblen Acetylcholinesterasehemmstoffen (Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon, Huperzin A) (s. Anhang 8.2.4)

#### *D-1: Versuche mit zwei verschiedenen Konzentrationen an reversiblen Hemmstoffen*

Nach der Äquilibrierphase von der 15. bis zur 30. min wurde zunächst kurz mit einer konzentrierten Lösung an reversiblen Hemmstoff („Puls“) und dann bis zum Erreichen eines Fließgleichgewichts mit der verdünnten Lösung gehemmt. Hier galt es, die Länge des „Pulses“ für die nachfolgenden Prophylaxe-Versuche zu optimieren, um dort eine möglichst schnelle Gleichgewichtseinstellung zu erreichen. Nach der 90. min wurde der reversible Hemmstoff abgesetzt und bis zum erneuten Erreichen der maximalen AChE-Aktivität nach Spontanreaktivierung mit DTNB, ASCh und G-PP perfundiert. Nach 180 min wurden der Enzymreaktor entfernt und die Reagenzienblindwerte  $BW_{DAG}$  (DTNB, ASCh, G-PP) und  $BW_{G-PP}$  bestimmt. Da bei den Versuchen, bei denen die Verwendung mehrerer Gift-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen notwendig war, das Kanalangebot nicht ausreichte, wurde die Hämolyse der

Erythrozyten im Enzymreaktor mit Wasser nur mit einer Pumpe (I) bei einem Fluss von 0,5 mL/min durchgeführt, während der Fluss der zweiten Pumpe (II) auf 0,0 mL/min gestoppt wurde.

*D-2: Versuche mit einer konstanten Konzentration an reversiblen Hemmstoff*

Alternativ wurde bei höheren Konzentrationen nach der Äquilibrierphase ( $AChE_{max.}$ ) von der 15. bis zur 30. min je nach Konzentration des jeweiligen Hemmstoffes (mit einer konstanten Konzentration) unterschiedlich lang (in den meisten Fällen 60 min) bis zum Erreichen eines Fließgleichgewichts gehemmt, anschließend der reversible Hemmstoff abgesetzt und bis zum erneuten Erreichen der maximalen AChE-Aktivität nach Spontanreaktivierung mit DTNB, ASCh und G-PP perfundiert. Nach 180 min wurden der Enzymreaktor entfernt und die Reagenzienblindwerte  $BW_{DAG}$  (DTNB, ASCh, G-PP) und  $BW_{G-PP}$  bestimmt.

**Methode E:** Hemmung mit reversiblen Acetylcholinesterasehemmstoffen (Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon, Huperzin A) und Paraoxon gleichzeitig (s. Anhang 8.2.5)

Die Endkonzentration an Paraoxon betrug bei allen Hemmversuchen 1  $\mu$ M.

*E.1: Versuche mit einer konstanten Konzentration an reversiblen Hemmstoff*

Physostigmin:	1 $\mu$ M; 500 nM; 250 nM
Pyridostigmin:	10 $\mu$ M; 5 $\mu$ M
Huperzin A:	1 $\mu$ M; 500 nM; 375 nM; 250 nM; 100 nM; 50 nM; 25 nM; 10 nM

Nach der Äquilibrierphase ( $AChE_{max.}$ ) von der 15. bis zur 30. min wurde 30 min lang bis zum Erreichen eines Fließgleichgewichts mit reversiblen Hemmstoff gehemmt, anschließend 30 min lang mit reversiblen Hemmstoff und Paraoxon gleichzeitig. Nach der gleichzeitigen Perfusion wurde zunächst Paraoxon abgesetzt und noch weitere 10 min mit dem reversiblen Hemmstoff perfundiert. Danach (ab der 100. min) wurde auch der reversible Hemmstoff abgesetzt und bis zum erneuten Erreichen der maximalen AChE-Aktivität nach Spontanreaktivierung mit DTNB, ASCh und G-PP perfundiert. Nach 180 min wurden der Enzymreaktor entfernt und die Reagenzienblindwerte  $BW_{DAG}$  (DTNB, ASCh, G-PP) und  $BW_{G-PP}$  bestimmt.

*E.2: Versuche mit zwei verschiedenen Konzentrationen an reversiblen Hemmstoffen*

Bei Versuchen mit folgenden Konzentrationen wurde die Hemmung durch einen kurzen „Puls“ mit einer konzentrierten Gift-Lösung beschleunigt, um innerhalb von 30 min eine Gleichgewichtseinstellung zu erreichen. Die Dauer des Pulses wurde konzentrationsabhängig zeitlich variiert, um eine möglichst schnelle Gleichgewichtseinstellung zu erreichen.

**Tab. 2-3:** Gleichgewichtseinstellung mit reversiblen Hemmstoffen

Hemmstoff	Konzentration „Puls“ [ $\mu\text{M}$ ]	Dauer des Pulses [min]	Konzentration zur Gleichgewichtseinstellung [ $\mu\text{M}$ ]
Physostigmin	0,5	0,4	0,01
		0,9	0,025
		1,7	0,050
		2,5	0,1
Pyridostigmin	5	1,3-1,5	0,1
		2,0	0,25
		2,8	0,5
		5,1	1
		6,1-6,2	1,75
		7,0-7,1	2,5
		8,0-8,2	3,75
Methyl-Paraoxon	4	0,5	0,025
		0,7-1,1	0,1
		1,4	0,2
		1,9	0,25
		3,1	0,4
		3,9	0,5
		5,0	1

Nach der Äquilibrierphase von der 15. bis zur 30. min wurde zunächst kurz mit einer konzentrierten Lösung an reversiblen Hemmstoff („Puls“) und dann bis zum Erreichen eines Fließgleichgewichts mit der verdünnten Lösung gehemmt, anschließend 30 min lang mit reversiblen Hemmstoff und Paraoxon gleichzeitig. Nach der gleichzeitigen Perfusion wurde zunächst Paraoxon abgesetzt und noch weitere 10 min mit reversiblen Hemmstoff perfundiert. Danach (ab der 100. min) wurde auch der reversible Hemmstoff abgesetzt und bis zum erneuten Erreichen der maximalen AChE-Aktivität nach Spontanreaktivierung mit DTNB, ASCh und G-PP perfundiert. Nach 180 min wurden der Enzymreaktor entfernt und die Reagenzienblindwerte  $BW_{\text{DAG}}$  (DTNB, ASCh, G-PP) und  $BW_{\text{G-PP}}$  bestimmt.

Methode F: Farbttest zur Simulation einer Hemmung bei exponentiell abnehmender Konzentration des Hemmstoffes (s. Anhang 8.2.6)

Zunächst wurde bei eingesetztem Filter (mit Wasser vorgespült) 30 min lang mit Phosphatpuffer (PP) (Pumpe I und II Kanäle A bei je 100% und 0,25 mL/min) perfundiert. Ab der 30. min (30. min entspricht  $t=0$  in Abb. 4-5) wurde Pumpe II auf je 50% PP (Kanal A) und 50% KFZ-PP (0,1%) (Kanal B) umprogrammiert und im weiteren Verlauf die Farbstoffkonzentration nach einer Kinetik 1. Ordnung reduziert (programmierte Halbwertszeit  $t_{1/2} = 3$  min). Anschließend wurde noch etwa 25 min nur mit PP nachgespült, um die Basislinie wieder zu erreichen.

### 3 AUSWERTUNG

#### 3.1 Lagerstabilität von Humanerythrozyten

##### 3.1.1 Berechnung des Hämoglobingehalts

Der Hämoglobingehalt der Probe errechnet sich nach:

$$(Gl. 3-1) \quad Hb [mM] = \text{Extinktion [mE]} \cdot 30 \cdot 2 / (10,8 \cdot 1000)$$

wobei Extinktionskoeffizient =  $10,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Worek et al. 1999a)

Verdünnungsfaktoren: 30 (Erythrozyten Verdünnung)  
2 (Verdünnung in der Küvette)

Umrechnung des Hb-Gehaltes der Probe auf die Konzentration in der Küvette zur anschließenden Berechnung der spezifischen AChE-Aktivität:

$$(Gl. 3-2) \quad Hb' [\mu M] = Hb [mM] \cdot 1000 \cdot 600 / (30 \cdot 3160)$$

Verdünnungsfaktoren: 600 (Volumen an Erythrozyten-Verdünnung in der Küvette)  
30 (Erythrozyten-Verdünnung)  
3160 (Gesamtvolumen in der Küvette)

##### 3.1.2 Berechnung der AChE-Aktivität

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte aus der Absorptionzunahme über die Zeit (mE/min). Anschließend wurde der Substrat-Blindwert (BW) abgezogen und die Differenz durch den Extinktionskoeffizienten ( $11,28 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Eyer et al. 2003) geteilt.

$$(Gl. 3-3) \quad \mu M/\text{min} = [ \text{mE}/\text{min} (\text{Probe}) - \text{mE}/\text{min} (\text{BW}) ] / 11,28$$

Der erhaltene Wert wird auf den Hämoglobingehalt der Probe bezogen.

$$(Gl. 3-4) \quad \text{mU}/\mu\text{mol Hb} = (\text{AChE-Aktivität} [\text{nmol}/\text{mL}/\text{min}] \cdot 1000) / Hb' [\text{nmol}/\text{mL}]$$

### 3.2 Stabilität der AChE im Enzymreaktor

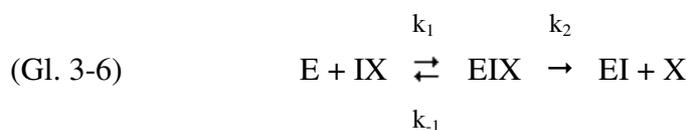
Die Stabilität der AChE wurde über die Abnahme der Aktivität von  $AChE_{\max}$  auf  $AChE_{\text{Restakt}}$  im Zeitraum von etwa 2-4 Stunden berechnet, wobei der Reagenzienblindwert  $BW_{\text{DAG}}$  berücksichtigt wurde.

Berechnung der Aktivitätsabnahme nach Gleichung:

$$(Gl. 3-5) \quad \% \text{ Restakt.} = 100 \cdot (AChE_{\text{Restakt}} - BW_{\text{DAG}}) / (AChE_{\max} - BW_{\text{DAG}})$$

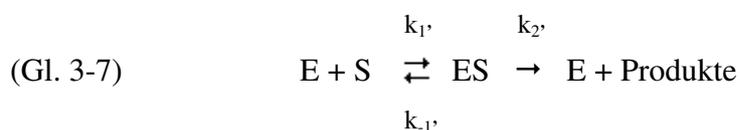
### 3.3 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Acylierung der Acetylcholinesterase in Anwesenheit von Substrat

Bei Acylierungsreaktionen der Acetylcholinesterase mit Organophosphaten und Carbamaten wird zunächst ein reversibler Enzym-Inhibitor-Komplex (Aldridge 1950) gebildet, anschließend erfolgt kovalente Acylierung. Diese Reaktionen können wie folgt beschrieben werden:



wobei E das freie Enzym, IX die acylierende Komponente mit der Abgangsgruppe X, EIX den reversiblen Komplex, und EI das kovalent acylierte Enzym darstellen.

Die Reaktionsschritte verlaufen analog der Michaelis-Menten Theorie



wobei S das Substrat und ES den reversiblen Enzym-Substrat-Komplex darstellen.

Die Gleichungen verdeutlichen, dass diese Acylierungsreaktionen (wie z. B. die Reaktion von Cholinestern mit Acetylcholinesterase) von kompetitivem Charakter sind, wenn sie simultan ablaufen (Aldridge und Reiner 1972).

Die experimentellen Probleme, die sich bei der Bestimmung kinetischer Konstanten wie  $K_d = k_{-1}/k_1$  und  $k_2$  darstellten, konnten durch die Methode von Hart und O'Brien (1973) teilweise gelöst werden (Hart und O'Brien 1973), wo Hemmungsreaktionen in Anwesenheit eines chromogenen Substrates in schnell ansprechenden Photometern (Forsberg und Puu 1984) durchgeführt wurden oder stopped-flow Techniken angewandt wurden (Gray und Dawson 1987).

Bei diesen Methoden wurde der fortschreitend abnehmende Substratumsatz, z. B. von p-Nitrophenylacetat beobachtet, an die Reaktionskurven wurden (per Hand) Tangenten angelegt und deren Steigungen bestimmt. Diese wurden semilogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen, um die Reaktionskonstante 1. Ordnung  $k_{obs} = \frac{\Delta \ln v}{\Delta t}$  zu erhalten.

Die auf diese Art bestimmten Steigungen wurden desweiteren nach der doppelt reziproken Methode analysiert, wobei man die von Hart und O'Brien generierte Gleichung

$$(Gl. 3-8) \quad \frac{1}{k_{obs}} = \frac{K_d}{k_2} \cdot \frac{1}{[IX] \cdot \left(1 - \frac{[S]}{K_m + [S]}\right)} + \frac{1}{k_2}$$

nutzte. Wurde  $1/k_{obs}$  gegen  $\frac{1}{[IX] \cdot \left(1 - \frac{[S]}{K_m + [S]}\right)}$  aufgetragen, so konnte man  $k_2$  als reziproken

Wert des Schnittpunktes mit der Ordinate (Ordinatenabschnitt) und  $K_d$  als den negativen reziproken Schnittpunkt mit der Abszisse ablesen (Forsberg und Puu 1984). Werte für  $K_m$  wurden nach konventionellen Methoden bei einer bestimmten vorgegebenen Substrat-Konzentration  $[S]$  ermittelt.

Mit den heutigen Möglichkeiten der Datenaufzeichnung und der Vielzahl an Verarbeitungsprogrammen können digitalisierte Photometersignale leicht bearbeitet und zur Kurvenanalyse genutzt werden. Somit konnte auf die lineare Transformation von nicht-linearen Funktionen verzichtet werden.

Die oben genannte Lineweaver-Burk Funktion (Gl. 3-8) kann in die rechtwinklige Hyperbel-Funktion

$$(Gl. 3-9) \quad k_{obs} = \frac{k_2 \cdot [IX]}{\frac{K_d}{\left(1 - \frac{[S]}{K_m + [S]}\right)} + [IX]}$$

umgewandelt werden. Dies gestattet die nicht-lineare Analyse der Daten, wenn  $k_{obs}$  gegen die Konzentration des Inhibitors  $[IX]$  aufgetragen werden und es resultieren Werte für  $k_2$  und  $\frac{K_d}{\left(1 - \frac{[S]}{K_m + [S]}\right)}$ . Ebenso wurden Werte für  $k_{obs}$  durch nicht-lineare Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die photometrischen Signale, aufgetragen gegen die Zeit, erhalten

( $k_{i, \text{obs}}$ ; siehe auch 3.4). Eine genauere Betrachtung der Gleichung 3-9 zeigt, dass unterschiedliche Substratkonzentrationen  $[S]$  nur  $K_d$  beeinflussen.  $k_2$  wird nicht beeinflusst, was mit dem kompetitiven Charakter der beiden Prozesse (1) und (2), der sich nur auf  $k_1$  und  $k_1'$  bezieht, übereinstimmt. Somit ergibt sich:

$$(Gl. 3-10) \quad K_{d, \text{obs}} = \frac{K_d}{1 - \frac{[S]}{K_m + [S]}}$$

Alle Versuche wurden mit humaner Erythrozyten-AChE in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, mit 0,2% Gelatine bei 37 °C durchgeführt. Die auf ein Membranfilter aufgebrachtten Erythrozyten wurden bei einer konstanten Flussrate von 0,5 mL/min in Anwesenheit von 0,45 mM Acetylthiocholin und 0,3 mM DTNB perfundiert. Unter diesen genannten Bedingungen ergab sich in unabhängigen Untersuchungen für Acetylthiocholin ein Wert für  $K_m$  von 0,09 mM (Mast 1997), in vorliegendem Modell war  $[S]$  somit  $5 \cdot K_m$  und  $K_d = 1/6 \cdot K_{d, \text{obs}}$ . Aus  $k_2/K_d$  ergibt sich formal eine Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung, die die „inhibitorische Effizienz“ ausdrückt. Diese „bimolekulare Reaktionskonstante“ wird von einer Dissoziationskonstante im Gleichgewicht und einem Geschwindigkeitsparameter abgeleitet und hat nicht die gleiche Bedeutung wie eine bimolekulare Geschwindigkeitskonstante (Hart und O'Brien 1973).

### 3.4 Berechnung der kinetischen Konstanten bei der Hemmung mit Paraoxon bzw. reversiblen Hemmstoffen ( $k_{i, \text{obs}}$ )

#### 3.4.1 Hemmung mit Paraoxon, Physostigmin, Pyridostigmin

Der bei den Hemmversuchen erhaltene Kurvenverlauf zeigt die Abnahme der AChE-Aktivität mit der Zeit an. (Das Zeitintervall begann 6-7 min (Paraoxon, Physostigmin) bzw. 10 min (Pyridostigmin) nach Absetzen der Hemmstoffe.) An die erhaltenen Daten wurde mittels nicht-linearer Regressionsanalyse eine monoexponentielle Funktion (one phase exponential decay) angepasst.

$$(Gl. 3-11) \quad Y = Y_{\text{max}} \cdot e^{(-k \cdot t)} + \text{Plateau}$$

Der Wert des Plateaus wurde bei der Hemmung mit Paraoxon als Konstante eingesetzt, er entspricht dem Reagenzienblindwert ( $BW_{\text{DAG}}$ ) der einzelnen Experimente, bei der Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen wurde das Plateau durch das Programm berechnet. Die Parameter  $Y_{\text{max}}$  und  $k$  ( $= k_{i, \text{obs}}$ ) berechnete ebenfalls das Programm. Die so für  $k_{i, \text{obs}}$  berechneten Werte wurden anschließend nach 3.3 weiterbearbeitet.

### 3.4.2 Hemmung mit Huperzin A

Die Acetylcholinesterase wird von Huperzin A nach folgendem Schema gehemmt:



Das Verhältnis  $k_{off}/k_{on}$  entspricht der Dissoziationskonstanten  $K_i$  des Enzym-Huperzin A-Komplexes (Ashani et al. 1992; Grunwald et al. 1994).

Die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante  $k_{on}$  wurde aus der Steigung der linearen Regressionsgeraden ermittelt, die durch Auftragen der Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung  $k_{i, obs}$  gegen die Huperzin A-Konzentration ermittelt wurde. Die Berechnung der Hemmkonstanten  $k_{i, obs}$  für Huperzin A wurde mittels folgender Gleichung, die durch Umformung (Gleichung A2.17 nach (Aldridge und Reiner 1972)) erhalten wurde, durchgeführt.

Berechnung von  $k_{i, obs}$  nach Gleichung:

$$(Gl. 3-13) \quad k_{i, obs} = \frac{k_{s, obs} \cdot (AChE_{max} - AChE_{Plateau})}{AChE_{Plateau} - BW_{DAG}}$$

Der Wert für  $k_{s, obs}$  (=  $k_{off}$ ) ergibt sich aus der Berechnung der Spontanreaktivierung (siehe auch 3.5), d. h. aus dem Kurvenverlauf der Zunahme der AChE-Aktivität nach Absetzen des Huperzin A.  $AChE_{max}$ ,  $AChE_{Plateau}$  (Fließgleichgewicht) und  $BW_{DAG}$  (Reagenzienblindwert) wurden direkt aus der ASCII-Tabelle entnommen ( $t_{1/2}$  errechnet sich aus  $\ln 2/k_{s, obs}$ ). Aus dem Verhältnis  $k_{off}/k_{on}$  lässt sich die Dissoziationskonstante  $K_i$  berechnen.

### 3.5 Berechnung der Spontanreaktivierung reversibel gehemmter AChE ( $k_{s, obs}$ ) und der Reaktivierung Paraoxon-gehemmter AChE mit Obidoxim ( $k_{r, obs}$ )

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktivierung ( $k_{r, obs}$ ) bzw. der Spontanreaktivierung ( $k_{s, obs}$ ) wurden die Kurven der Zunahme der AChE-Aktivität nach Zugabe von Obidoxim bzw. nach Absetzen der Hemmstoffe analysiert. (Es wurde ein Zeitintervall gewählt, das – soweit nicht anders vermerkt – etwa 10 bis 20 min nach Absetzen der Hemmstoffe begann.) An die erhaltenen Daten wurde mittels nicht-linearer Regressionsanalyse eine

monoexponentielle Funktion (one phase exponential association) angepasst. Die Parameter  $Y_{\max}$  und  $k$  ( $k_{s, \text{obs}}$ ;  $k_{r, \text{obs}}$ ) berechnete das Programm.

$$(Gl. 3-14) \quad Y = Y_{\max} \cdot [1 - e^{(-k \cdot t)}]$$

### 3.6 Reaktivierbarkeit Paraoxon-gehemmter Ery-AChE durch Obidoxim

Zur Berechnung der Reaktivierbarkeit des Paraoxon-gehemmten Enzyms wurden der maximale Wert der AChE-Aktivität ( $AChE_{\max}$ ) vor Hemmung mit Paraoxon und der, nach Reaktivierung mit Obidoxim maximal wieder erreichte Wert ( $AChE_{\text{Reakt}}$ ) herangezogen. Die Reagenzienblindwerte  $BW_{DAG+Obi}$  und  $BW_{DAG}$  wurden berücksichtigt.

Berechnung der Reaktivierbarkeit nach:

$$(Gl. 3-15) \quad \%_{\text{Reakt.}} = 100 \cdot (AChE_{\text{Reakt}} - BW_{DAG+Obi}) / (AChE_{\max} - BW_{DAG})$$

### 3.7 Hemmung der Ery-AChE mit Paraoxon nach Prophylaxe mit reversiblen Hemmstoffen

#### 3.7.1 Grad der Hemmung

Der Grad der Hemmung wurde aus dem maximalen Wert der AChE-Aktivität ( $AChE_{\max}$ ) und dem nach Hemmung mit Paraoxon bzw. reversiblen Hemmstoffen oder nach gleichzeitiger Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen und Paraoxon erreichten Fließgleichgewicht ( $AChE_{\text{Plateau}}$  (Plateau = Paraoxon/reversibler Hemmstoff oder reversibler Hemmstoff + Paraoxon)) berechnet.

Berechnung des Grades der Hemmung nach:

$$(Gl. 3-16) \quad \%_{\text{gehemmt}} = 100 - [100 \cdot (AChE_{\text{Plateau}} - BW_{DAG}) / (AChE_{\max} - BW_{DAG})]$$

### 3.7.2 Reaktivierbarkeit der Ery-AChE (Spontanreaktivierung) nach gleichzeitiger Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen und Paraoxon

Zur Berechnung wurden der maximale Wert der AChE-Aktivität ( $AChE_{max}$ ) vor Hemmung und der nach Absetzen von Paraoxon und reversiblen Hemmstoff wieder erreichte Wert ( $AChE_{Reakt}$ ) herangezogen.

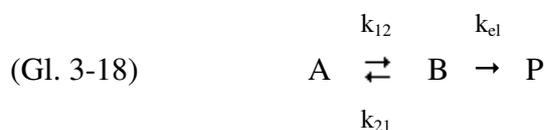
Berechnung der Reaktivierbarkeit nach Gleichung:

$$(Gl. 3-17) \quad \%_{Reakt.} = 100 \cdot (AChE_{Reakt} - BW_{DAG}) / (AChE_{max} - BW_{DAG})$$

Diese Gleichung gilt auch zur Berechnung der Reaktivierbarkeit nach Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen.

### 3.8 Kinetisches Modell zur Berechnung der simultan ablaufenden Reaktionen von Carbamoylierung, Decarbamoylierung und Phosphorylierung (siehe auch Anhang 8.5)

Die simultan ablaufenden Reaktionen lassen sich mit einem generalisierten Zwei-Kompartiment Modell für Verteilung und Elimination vergleichen (Riggs 1963). Dabei wird angenommen, dass sich ein Pharmakon aus dem zentralen Kompartiment A in ein tiefes Kompartiment B verteilt, in dem das Produkt P gebildet wird. Das Schema zeigt diese Reaktionen mit den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten.



Dieses Schema lässt sich adaptieren, wenn man annimmt, dass A das carbamoylierte Enzym EC, B das freie Enzym E und P das phosphorylierte Enzym EP darstellen. Für die Geschwindigkeitskonstanten ergeben sich dann

$$k_{12} \rightarrow k_d; k_{21} \rightarrow k_c; k_{el} \rightarrow k_i$$

wobei  $k_i = k_p \cdot [\text{OP}]$  die Phosphorylierungskonstante pseudo-erster Ordnung für  $[\text{OP}] \gg E$  darstellt,  $k_c$  die Carbamoylierungskonstante mit

$$(Gl. 3-19) \quad k_c = \frac{k_2}{1 + \frac{K_d}{[\text{Carb.}]}}$$

und  $k_d$  die Geschwindigkeitskonstante der Decarbamoylierung ( $= k_{s, \text{obs}}$ ) bedeutet.

Die zeitlichen Änderungen der Anteile an freiem Enzym und an carbamoyliertem Enzym lassen sich mit folgenden Differentialgleichungen darstellen:

$$(Gl. 3-20) \quad \frac{dE}{dt} = -k_c \cdot E + k_d \cdot EC \quad (\text{für } t < t_0) \text{ und}$$

$$(Gl. 3-21) \quad \frac{dE}{dt} = -k_i \cdot E - k_c \cdot E + k_d \cdot EC \quad (\text{für } t > t_0) \text{ und}$$

$$(Gl. 3-22) \quad \frac{dEC}{dt} = -k_d \cdot EC + k_c \cdot E$$

Hierbei wurde als  $t_0$  der Zeitpunkt der Zugabe des Organophosphats verstanden.

Die Differentialgleichungen wurden numerisch mit dem Programm Maple 9.0 gelöst und der Grad der Carbamoylierung/Vorhemmung für die 60. min (bzw. 120. min) und die Restaktivität für die 90. min (bzw. 150. min) berechnet. Diese Daten wurden dann graphisch mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism 3.0 dargestellt.

Alle Mittelwerte ( $n \geq 3$ ) wurden mit der Standardabweichung SD angegeben.

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Überprüfen der Gerätespezifikationen**

#### **4.1.1 Photometrische Stabilität**

Beim Durchpumpen von Puffer ergab sich für das Grundrauschen (noise) ein durchschnittlicher Wert von  $< 0,8 \cdot 10^{-5}$  E. Die Drift lag im Schnitt bei  $< 2 \cdot 10^{-4}$  E in 10h.

#### **4.1.2 Photometrische Linearität**

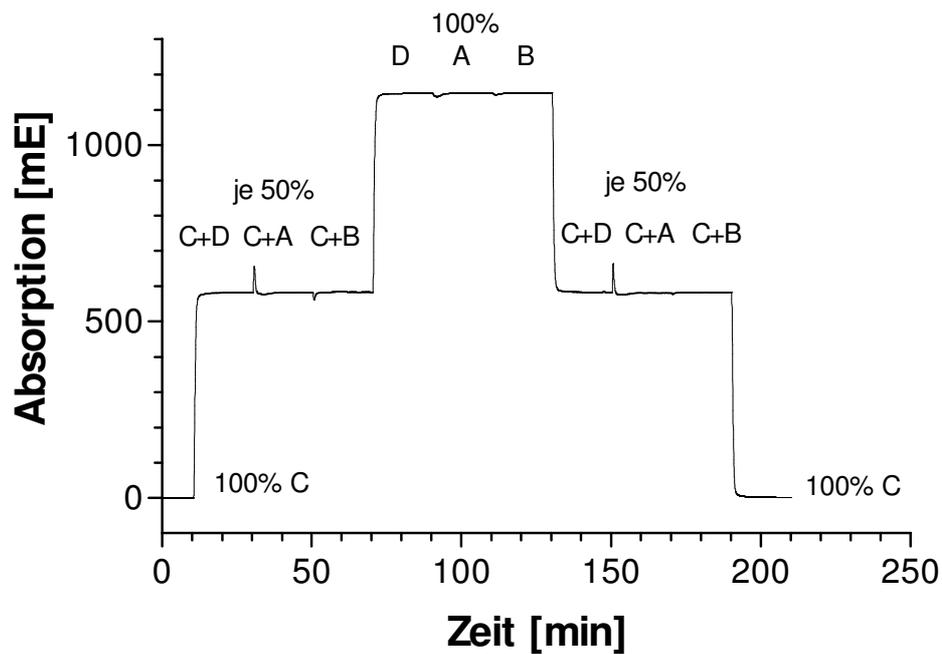
Beim Durchpumpen unterschiedlich konzentrierter Lösungen von  $\text{K}_3\text{Fe}[(\text{CN})_6]$  wurden die im Anhang in den Tabellen 8-2 bis 8-5 (Anhang 8.1.2) gezeigten Extinktionen erhalten und mit den gemessenen Extinktionen in einem registrierenden Spektralphotometer (jeweils 420 nm) verglichen. Dabei wurde photometrische Linearität bis zu 1,7 E gefunden und festgestellt, dass die effektive Schichtdicke im Durchflussphotometer nur  $0,899 \pm 0,002$  cm aufwies (Herstellerangabe 1,0 cm).

#### **4.1.3 Flussgenauigkeit der Pumpen**

Die Flussgenauigkeit der Pumpen wurde volumetrisch über einen Beobachtungszeitraum von 30 min ermittelt. Bei einem eingestellten Gesamtfluss von 0,250 ml/min wurden Fördervolumina von  $0,255 \pm 0,001$  (n= 4) bei beiden Pumpen gefunden.

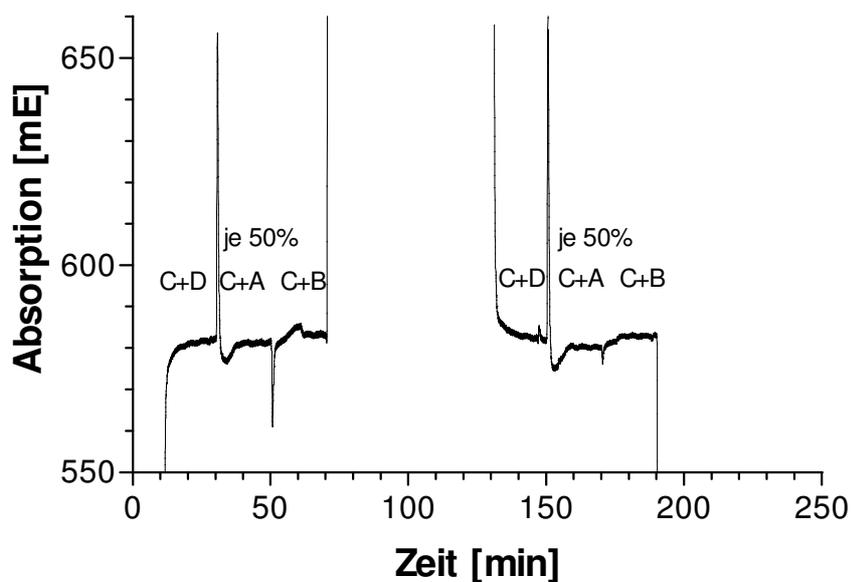
#### **4.1.4 Förderkonstanz und Mischungspräzision der Anlage**

Die Förderkonstanz wurde jeweils nur mit einer Pumpe und dem zugehörigen quaternären Gradientenformer ermittelt. Hierbei wurden drei Kanäle mit einer Farblösung identischer Zusammensetzung belegt, der vierte Kanal wurde mit Puffer gespeist. Die Zumischgenauigkeit und die Effekte beim Kanalwechsel wurden photometrisch im Durchflussphotometer verfolgt. Während die Zumischgenauigkeit beim Durchwechseln der Kanalsequenzen durchweg befriedigte, traten kurzfristige und Kanal-abhängige Störungen im Mischungsverhältnis von Puffer und Farblösung auf, die photometrisch als Spikes erschienen. Die Abb. 4-1 und 4-2 geben hiervon einen Eindruck.



**Abb. 4-1:** Zeitlicher Verlauf des Zumischversuches zur Überprüfung der Förderkonstanz und der Mischpräzision der Anlage.

Zunächst wurden 100% PP (Kanal C) gepumpt (Basislinie), anschließend wurde in 20 min-Abständen auf 50% KFZ-PP (Kanäle A, B, bzw. D) und 50% PP umgestellt. Danach wurde PP abgesetzt und auf 100% KFZ-PP (20 min je Kanal A, B und D) programmiert. Von 100% wurde wiederum auf 50/50 KFZ-PP/PP reduziert, zuletzt mit 100% PP die Basislinie wieder erreicht.



**Abb. 4-2:** Vergrößerte Darstellung von Abb. 4-1 im Bereich der Absorption der 50/50 Signale

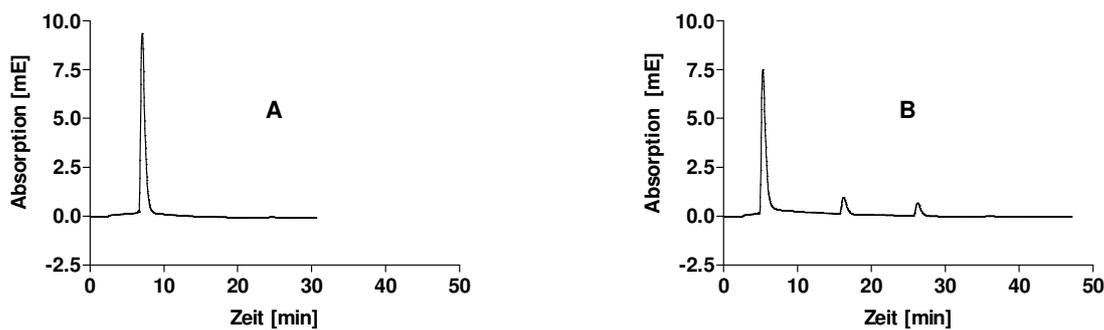
Bei beiden Pumpen fiel auf, dass bei Zuschalten von Kanal A ein besonders hoher positiver Spike auftrat, der im Maximum eine um etwa 13% höhere Absorption als die Absorption im Gleichgewicht aufwies. Die aufgefangenen und photometrisch vermessenen Fraktionen der Spikes bestätigten die Absorptionserhöhung. Wurde die elektrische Ansteuerung von Kanal A und B vertauscht, verursachte jetzt Zuschalten von Kanal B diesen positiven Ausschlag. Somit muss der Fehler in einer elektronischen, kurzfristigen Übersteuerung von Kanal A liegen, der sich allerdings nicht in der Förderleistung (Gravimetrie von 30 s-Fraktionen), sondern im Mischungsverhältnis äußerte. Der vergleichsweise geringe Abfall der Absorption beim Umschalten auf die anderen Kanäle konnte nicht befriedigend geklärt werden. Er wäre zu deuten, wenn man annimmt, dass sich die in Fritten, Schläuchen und Ventilköpfen ruhende Lösung von  $K_3Fe[(CN)_6]$  chemisch verändert, so dass die Absorption bei 420 nm abnimmt.

Die bekannten photolytischen Reaktionen kommen wohl nicht in Betracht, nachdem die Effekte auch im dunklen Raum beobachtet wurden, wenn alle Schläuche mit Alufolie umwickelt waren. Nachdem diese Störeffekte nur kurzfristig und gering ( $< 1\%$ ) waren, wurde ihnen nicht weiter Beachtung geschenkt. Die fehlerhafte Ansteuerung der Kanäle A spielte in den Versuchen keine Rolle, weil die Kanäle A mit Puffer belegt wurden und permanent förderten (Ausnahme Hämolyse).

Die Präzision der Zumischung wurde durch Vergleich der Werte 0% Farbstoff und 100% Farbstoff, sowie Werte bei Mischung von 50% Farbstoff und 50% Puffer bestimmt. Es ergaben sich bei 50/50% bei Pumpe I  $50,6 \pm 0,1 \%$  ( $n=5$ ) und bei Pumpe II  $50,5 \pm 0,2\%$  ( $n=7$ ).

#### **4.1.5 Wechselseitige Kontamination der Kanäle**

Nachdem im verwendeten Niederdruck-Gradientenformer baubedingt die vier Eluenten in den Kapillaren zwischen den Ventilen und dem Pumpeneingang anstehen, ist eine allmähliche Diffusion zwischen den Kanälen zu erwarten. Es ist daher wichtig, dass sich die Dichten der verwendeten Eluenten möglichst nicht unterscheiden. Wurde nach Befüllen der einzelnen Kanäle das System mit Puffer durchgespült, waren die Kontaminationseffekte nur marginal ( $< 0,1\%$ ) (vgl. Abb. 4-3). Nachdem die vollständige Durchmischung im System einige Minuten in Anspruch nimmt, dürfte die „Cross-Contamination“ bei Einhaltung des Spülprotokolls (farbige oder giftige Reagenzien immer zuerst in das System einbringen, danach die Kanäle mit Wasser oder Puffer spülen, wobei eventuelle Kontaminanten wieder ausgespült werden) bedeutungslos sein.



**Abb. 4-3:** Kontamination der PP-Kanäle nach Befüllen eines Kanals mit KFZ-PP

Alle Kanäle und das System wurden zunächst mit PP vorgespült. Etwa 5 min nach Start der Datenaufnahme und Förderung von 100 % PP wurde jeweils ein Kanal mit KFZ-PP-Lösung gespült, die restlichen drei jeweils mit PP. Anschließend wurde in 5-10 min Intervallen jeweils 100 % PP gefördert.

A Nach Befüllung des KFZ-PP-Kanals wurden alle mit PP gefüllten Kanäle mit PP nachgespült.  
→ keine Kontamination der nachgespülten Kanäle.

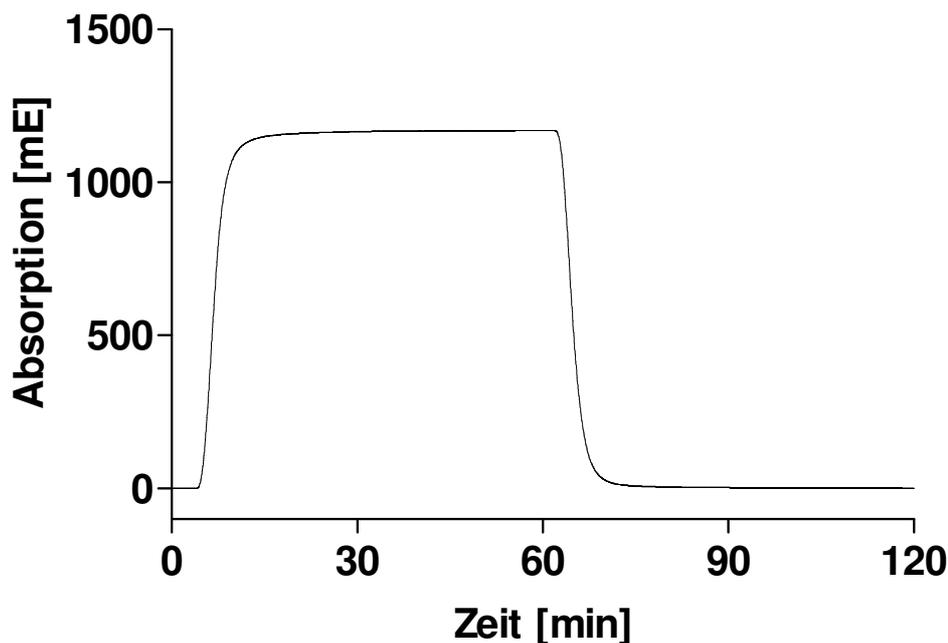
B Nach Befüllung des KFZ-PP-Kanals wurde nur ein Kanal mit PP nachgespült.  
→ Kontamination der Kanäle, die nicht nachgespült wurden.

(Der in beiden Versuchen auftretende Peak zu Beginn wurde durch das Stoppen und erneute Starten der Pumpe verursacht.)

#### 4.1.6 Hysterese der Gleichgewichtseinstellung

Die Komponenten der gesamten Anlage zum Betrieb des Dynamischen Modells weisen eine Vielzahl von Toträumen auf, in denen unterschiedliche Durchmischungsprofile auftreten können (laminar, turbulent). Dementsprechend wurde mit erheblicher Hysterese bis zur vollständigen Gleichgewichtseinstellung gerechnet. Für praktische Zwecke wird als Kenngröße üblicherweise die Zeit bis zur Einstellung auf 90% des Endwertes verwendet. Für die hier vorgesehenen Untersuchungen war dieses Maß zu grob. Hier wurden strengere Kriterien angesetzt und erst eine Erzielung von > 99% des Endwertes als ausreichend für die Beschreibung des Gleichgewichts erachtet.

Die Überprüfung erfolgt abermals mit einem Farbttest (siehe Anhang 8.1.3) unter Bedingungen, die auch bei Einsatz des Enzymreaktors vorgesehen waren (2 Pumpen mit je 0,25 ml Gesamtfördervolumen/min). Abb. 4-4 zeigt den Verlauf der Absorptionskurve nach Zuschalten des Farbstoffs zum Zeitpunkt  $t=2$  und nach Abschalten bei  $t=60$  min.



**Abb. 4-4:** Zeitlicher Verlauf der Absorptionskurve nach Zuschalten des Farbstoffs (KFZ-PP) zum Zeitpunkt  $t=2$  und nach Abschalten bei  $t=60$ . (Förderung von jeweils 100% PP bzw. 100% KFZ-PP je Pumpe mit einer Flussrate von je 0,25 mL/min)

Nach einer Verzögerungsphase von ca. 4 min nimmt die Absorption kurzfristig exponentiell zu, um dann asymptotisch den Endwert zu erreichen. Der Kurvenverlauf der zweiten Phase (nach Erreichen der halbmaximalen Absorption) ließ sich nicht mit einer einfachen monoexponentiellen Assoziationsfunktion beschreiben, sondern setzte sich aus zwei Exponentialtermen zusammen ( $Y=Y_{\max 1} \cdot (1 - e^{(-k_1 \cdot t)}) + Y_{\max 2} \cdot (1 - e^{(-k_2 \cdot t)})$ ). Gleiches war beim Abschalten des Farbstoffs zu beobachten.

Die Halbwertszeit der schnellen Phase beim Absorptionsanstieg (ca. 98% der Gesamtreaktion) betrug 1 min, die der langsamen Reaktion ca. 8 min. Beim Abfall der Absorption lag die Halbwertszeit der schnellen Phase (> 99%) ebenfalls bei 1 min, die der langsamen Phase bei ca. 11 min. Die Art der anstehenden Lösung (Puffer oder Farbstoff) in den ruhenden Kanälen hatte keinen Einfluss auf die Gleichgewichtseinstellung.

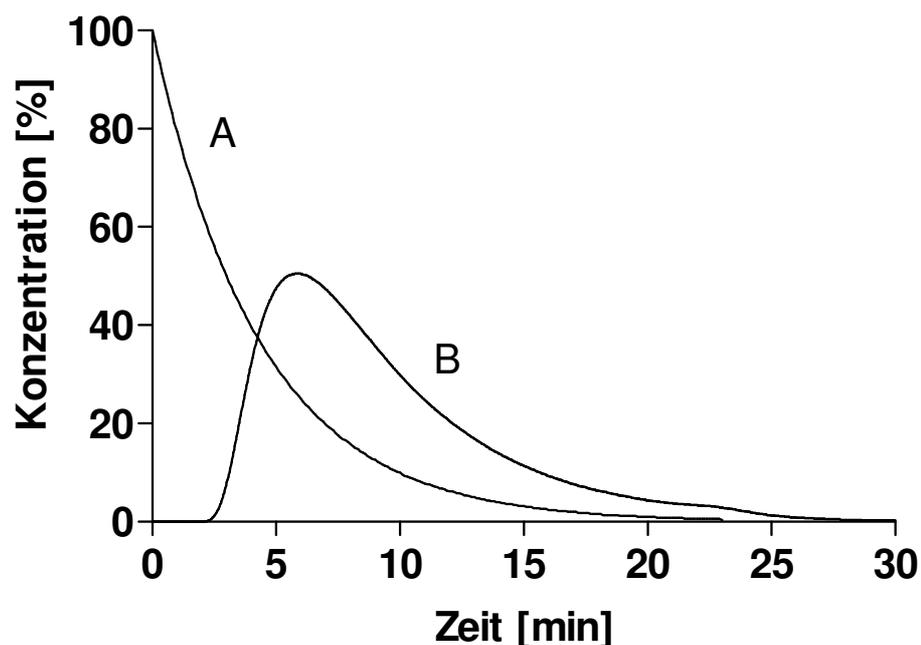
Nach Zuschalten des Farbstoffs wurden nach insgesamt 18 min 99,1% des Endwertes erreicht, nach Abschalten des Farbstoffs nach 15 min 99,3% des Endwertes. Ohne das eingebaute Millex®-GS-Filter verkürzen sich die Zeiten um etwa 3 min (siehe Tabellen 8-7 und 8-10 im Anhang 8.1.3). Damit war klar, dass präzise Endwerte nur bei entsprechend langsamen Reaktionen erfasst werden konnten.

#### 4.1.7 Farbtest zur Simulation einer Hemmung bei exponentiell abnehmender Konzentration des Hemmstoffes („dynamisch“)

Bei folgendem Versuch sollte geprüft werden, ob es mit dem vorliegenden System möglich ist, nicht nur Hemmreaktionen mit einer konstanten Konzentration durchzuführen, sondern ob auch Konzentrations-Zeit-Profile programmiert werden können (siehe Anhang 8.2.6), um die dynamischen Verhältnisse, wie sie in vivo bei kurzen Expositionszeiten auftreten, widerzuspiegeln.

##### Verlauf der Konzentration im System

Abb. 4-5 zeigt den mittels des Farbtests untersuchten zeitlichen Verlauf der Konzentration, während der programmiert - nach einer Kinetik 1. Ordnung - ablaufenden Abnahme der Konzentration.



**Abb. 4-5:** Zeitlicher Verlauf der Farbstoffkonzentration im System („dynamisches“ Programm)

- A Theoretischer Verlauf nach programmierter Abnahme der Konzentration nach einer Kinetik 1. Ordnung:  $t_{1/2} = 3$  min; Anfangskonzentration 100%  
AUC = 100%
- B Tatsächlicher Verlauf der Konzentration (bei Verwendung des Gradientenprogramms mit  $t_{1/2} = 3$  min)  
AUC = 97,6% (Flächenberechnung erfolgte durch Auswiegen)

Die Pumpen wurden so programmiert (Methode F), dass die Ausgangskonzentration mit einer Halbwertszeit von 3 min exponentiell abnahm. (Der korrekte Ablauf des Programms wurde überprüft, die resultierende Kurve wurde analysiert, die errechnete Halbwertszeit betrug 3,3 min.)

Die tatsächlich im System vorliegende Konzentration unterscheidet sich also von der nach Gradientenprogramm erwarteten. Dies verwundert jedoch nicht, da die verzögerte Einspülung und Durchmischung im System nicht mit der sehr schnellen Abfolge der Gradientenstufen (0,1 min Abstände) mithalten kann. Die maximale Konzentration kann deshalb im vorgegebenen Zeitraum nicht erreicht werden. Beim Vergleich der AUC's fällt jedoch auf, dass die Flächen äquivalent sind. Die gesamte geförderte Farbstoffmenge entsprach den Vorgaben. Dies sollte auch bei der Anwendung verschiedener Hemmstoffe gelten, soweit keine störenden Effekte, wie z. B. Filtereffekte, auftreten.

Mit diesem Versuch konnte somit gezeigt werden, dass es mit dem „dynamischen Modell“ möglich ist, auch Konzentrations-Zeit-Profile mit exponentiell abnehmender Konzentration, wie sie in vivo auftreten, zu imitieren.

## 4.2 Stabilität des Enzymreaktors

### 4.2.1 Trägerfilter und Enzymquelle

Das Konzept des Dynamischen Modells sah vor, dass humane AChE in annähernd gleichbleibender Aktivität über 3-4 Stunden in einem Durchflussreaktor gehalten werden kann. Als Enzymquelle boten sich Humanerythrozyten an, als Träger biokompatible hydrophile Filter, wie sie in der Sterilfiltration Verwendung finden. Ein Einsatz intakter Humanerythrozyten setzte entweder Hämolysfestigkeit gegenüber den verwendeten Eluenten voraus oder zwang zur Detektion bei Wellenlängen geringer Hämoglobinabsorption. Alternativ kamen gewaschene, hämoglobinfreie Erythrozytenmembranen als Enzymquelle in Frage, die sowohl auf der Membran fixiert bleiben mussten als auch keine Stabilitätseinbußen im geplanten Beobachtungszeitraum erleiden durften. Schließlich musste beim Arbeiten mit Erythrozytenmembranen (Ghosts) eine feindisperse Suspension geschaffen und die Bildung von Aggregaten (Nestern) auf der Membranunterlage verhindert werden. Zuletzt musste ein Ausbluten der Enzymaktivität durch Abscheren des Glykolipidankers bei der Perfusion ausgeschlossen werden.

Vorversuche zeigten bald, dass die Beladung der Filter zweckmäßigerweise mit den hochfluiden Erythrozyten durchgeführt wird, wobei die gleichmäßige Einschwemmung und Verteilung unmittelbar mit dem Auge verfolgt werden konnte. Durch die langsame, konstante Auftragggeschwindigkeit der Schlauchpumpe ( $3,2 \pm 0,1$  mL/10 min; n=10) konnte eine gleichmäßige Verteilung der Erythrozyten auf dem Filter erreicht werden. Die Bildung von Luftbläschen, die bei manuellem Auftragen der Erythrozyten mittels einer Einwegspritze auftra-

ten, wurde weitgehend verhindert. Es zeigte sich, dass die Enzymaktivität auf den Millex-Filtern (Millex®-GS, 0,22 µm Porengröße) retiniert wurde, während bei den Filtern scheinbar gleicher Spezifikation der Fa. Sartorius (Minisart®, 0,20 µm Porengröße) ein Teil der Aktivität durchbrach (und auf nachgeschalteten Millex-Filtern retiniert werden konnte). Die auf Millex®-GS-Filtern aufgebrauchten Erythrozyten wurden anschließend noch bis zum Einsatz des Enzymreaktors in das System (ca. 5 min) mit Phosphatpuffer perfundiert. Dieser Reaktor wurde dann an das System angeschlossen und in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad eingehängt. Zunächst wurde mit Phosphatpuffer, dem zur Enzymstabilisierung als Schutzkolloid 0,2% Gelatine zugesetzt war, perfundiert. Die Erythrozyten wurden durch einen Puls mit dest. Wasser (5 min) hämolysiert, wodurch sie sich gleichmäßig entfärbten, anschließend der Reaktor zur Stabilisierung der Basislinie erneut mit Gelatine-Puffer perfundiert. Danach wurde das System mit Chromogen und Substrat perfundiert und die Bildung des Farbstoffs aus der Ellman-Reaktion über die Zeit verfolgt und die Absorptionssignale im 1,6 -sec Abstand digital gespeichert.

Aufgetragene Enzymaktivität, Substratkonzentration und Durchflussgeschwindigkeit wurden so auf einander abgestimmt, dass eine Absorptionsänderung bei 470 nm von ca. 0,5 E resultierte. Diese Wellenlänge bei einem relativen Absorptionsminimum von Oxyhämoglobin wurde gewählt, um hämoglobin-bedingte Störungen weiter zu minimieren.

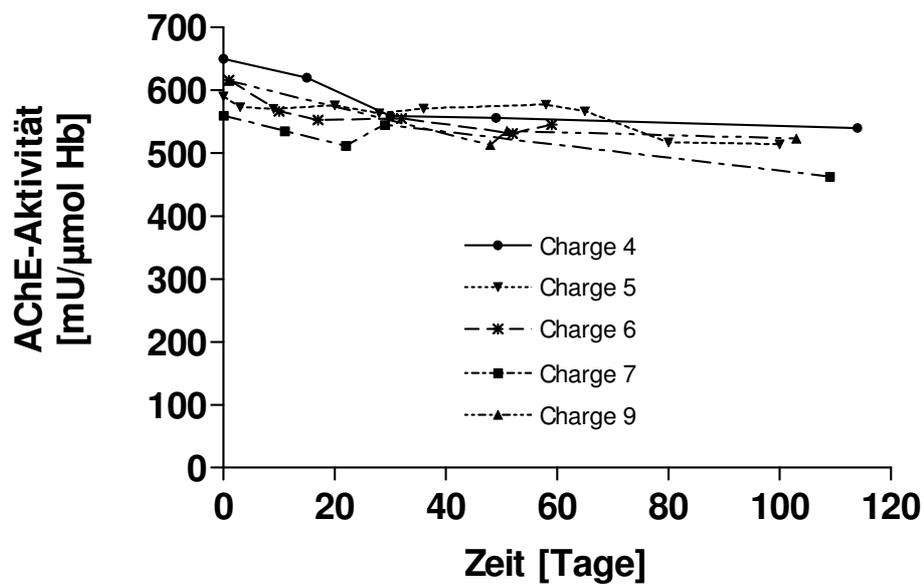
#### **4.2.2 Lagerstabilität von Humanerythrozyten**

##### **Hämoglobingehalt und Ery-AChE-Aktivität:**

Bei der wiederholten Bestimmung des Hämoglobingehaltes wurde festgestellt, dass mit zunehmender Lagerdauer der Erythrozyten der Gehalt an Hämoglobin scheinbar anstieg. Dieser Anstieg konnte jedoch nach Bestimmung des Hämoglobingehaltes in filtriertem Hämolysat auf eine mit zunehmender Lagerdauer der Erythrozyten auftretende Trübung, die eine Erhöhung der Extinktion verursachte, zurückgeführt werden.

Die Berechnung der AChE-Aktivität erfolgte unter der Vorgabe, dass der Hb-Gehalt der Erythrozyten konstant bleibt.

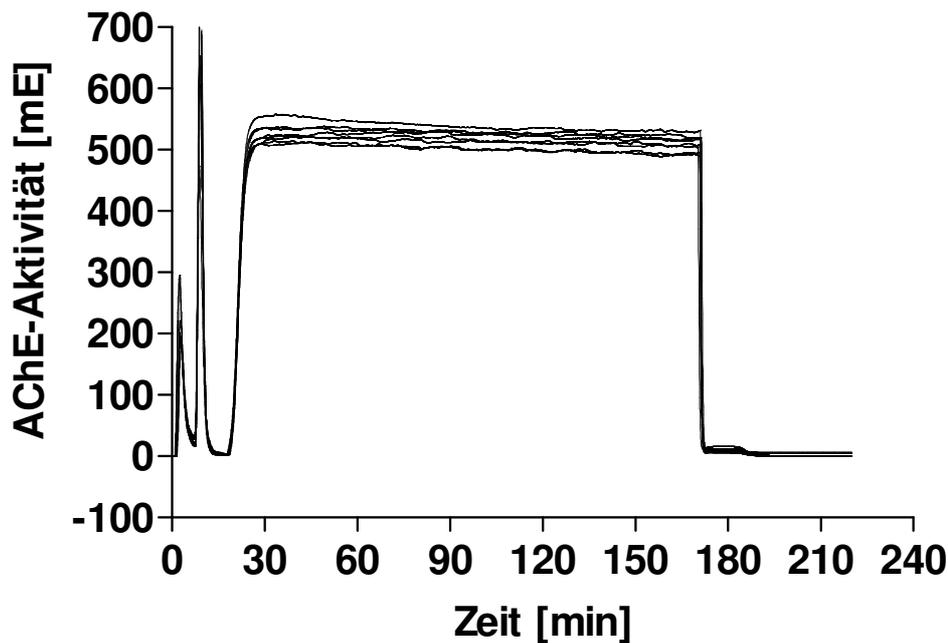
In Abb. 4-6 sind die Ery-AChE-Aktivitäten verschiedener Erythrozyten-Chargen (gleicher Spender), wie sie im statischen System nach Ellman bestimmt wurden, in Abhängigkeit von der Lagerdauer dargestellt (siehe auch Tab. 8-18 im Anhang 8.3).



**Abb. 4-6:** Abhängigkeit der Erythrozyten-AChE-Aktivität (Bestimmung im stationären System) von der Lagerdauer der humanen Erythrozyten bei 0 °C (verschiedene Chargen des gleichen Spenders)

### 4.2.3 Stabilität der AChE im Enzymreaktor

Die Stabilität einer aufgebrauchten Suspension gewaschener Erythrozyten (Charge 9: 1,5 bis 2 Monate nach Blutabnahme in Eis aufbewahrt) im Enzymreaktor wurde über 2-4 Stunden verfolgt. Dabei nahm die Aktivität auf  $96,6 \pm 1,1\%$  ( $n=10$ ) ab. Einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Enzymstabilität leistete der Zusatz von 0,2 % Gelatine zum Phosphatpuffer. In Abwesenheit von Gelatine betrug der Aktivitätsverlust im gleichen Zeitraum etwa  $18,4 \pm 1\%$  ( $n=2$ ). Die Reproduzierbarkeit der Aktivität des Reaktors (Reproduzierbarkeit der Beladung) war ebenfalls sehr gut. Es ergaben sich Absorptionsänderungen von  $523,9 \pm 17,5$  mE (Charge 9:  $n=10$ ; CV 3,3%; Abb. 4-7 und Anhang 8.4 Tab. 8-19). Mit diesem System war es somit möglich, die AChE-Aktivität reproduzierbar über einen Zeitraum von 2–4 h zu verfolgen.



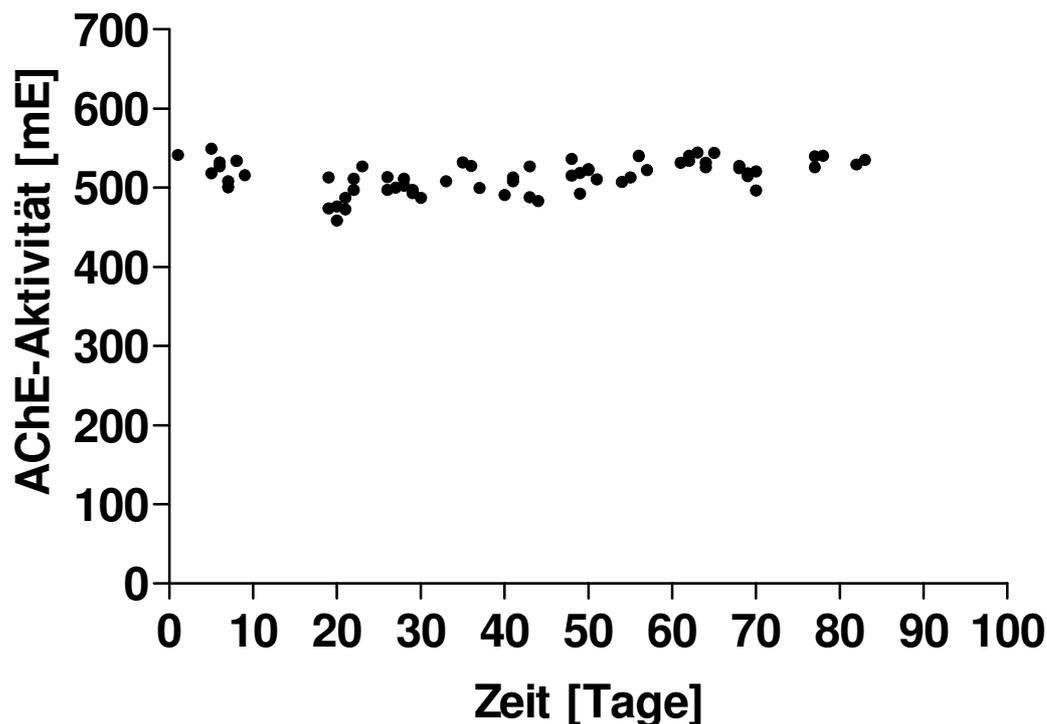
**Abb. 4-7:** Zeitlicher Verlauf der Erythrozyten-AChE-Aktivität zur Bestimmung der AChE-Stabilität im Enzymreaktor und der Reproduzierbarkeit der Aktivität des Enzymreaktors (0,45 mM Substrat); Absorptionsänderungen an verschiedenen Tagen mit derselben Charge:  $523,9 \pm 17,5$  mE ( $n=10$ ; CV 3,3%)

Die maximalen AChE-Aktivitäten im Enzymreaktor weiterer Erythrozyten-Chargen bei den verschiedenen Versuchsdurchführungen, deren Aktivitäten als 100%-Werte (ca. 15 min nach Zugabe des Substrates) vor den jeweiligen Hemmungs- und Reaktivierungsreaktionen herangezogen wurden, können die gute Reproduzierbarkeit noch weiter verdeutlichen.

**Tab. 4-1:** Maximale AChE-Aktivitäten im Enzymreaktor nach Perfusion mit ASCh (0,45 mM) und Ellman's Reagenz (0,3 mM)

Erythrozyten-Charge	AChE-Aktivität (Mittelwert) [mE]	CV [%]
6	$526 \pm 29$ ( $n=17$ )	5,5
7	$519 \pm 18$ ( $n=18$ )	3,5
10	$515 \pm 20$ ( $n=67$ )	3,9
11	$516 \pm 25$ ( $n=15$ )	4,8

Eine längerfristige Verwendung der gleichen Erythrozyten-Charge (ca. 3 Monate) war möglich, da keine Abnahme der Aktivität im Enzymreaktor durch zunehmende Lagerdauer beobachtet wurde (Abb. 4-8).



**Abb. 4-8:** Abhängigkeit der maximalen AChE-Aktivität im Enzymreaktor von der Lagerdauer der Erythrozyten (0,45 mM Substrat)

Legt man für den Chromophor TNB<sup>-</sup> bei 37 °C und 470 nm einen Extinktionskoeffizienten von  $4,36 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Eyer et al. 2003) zugrunde, dann entspricht ein mittleres Signal von 530 mE bei einer scheinbaren Schichtdicke von 0,90 cm einer Enzymaktivität von 67,5 mU. Die aufgetragene Aktivitätsmenge betrug ca. 90 mU, wie sie im stationären System gemessen wurde. Ein Vergleich der Aktivitätsbestimmung der in den Reaktor nominell eingebrachten Enzymmenge im dynamischen System ergab eine Aktivitätsminderung um ca. 25%, verglichen mit der konventionellen Aktivitätsbestimmung. Die Ursachen für diese Minderung konnten nicht abschließend geklärt werden. Denkbar ist ein Verlust löslicher oder besonders labiler AChE während der Phase der Erythrozytenbeladung, des Nachspülprozesses und der Hämolyse bis zum Start mit Substrat und Chromogen. Denkbar wäre aber auch ein Einfluß der kurzen Kontaktzeit beim Durchtritt durch die dünne Enzymschicht, bei der ein geringerer Substratumsatz stattfindet als in einer homogenen Suspension.

#### **4.2.4 Stabilität der Basislinie**

Da die geplante Untersuchung geringe Restaktivitäten nach Behandlung mit reversiblen Hemmstoffen und Organophosphat erfassen musste, war eine klare Abgrenzung vorhandener Aktivität von dem Reagenzienblindwert über die Zeit unabdingbar. Hier mussten eine Reihe von Problemen gemeistert werden: Es musste dafür gesorgt werden, dass während der Versuchsdauer von 3-4 h keine spontane Substrathydrolyse auftrat oder wenn, dann in einem sehr reproduzierbaren Maße. Zu diesem Zweck wurde Acetylthiocholin in Wasser und nicht in Puffer gelöst und die Lösung im Eisbad gehalten. Um die Störung von verminderter Ionenstärke und Temperatur gering zu halten, wurde der Volumenanteil des Substrats auf 2,5% von insgesamt 0,5 ml/min reduziert. Ferner war darauf zu achten, dass der Substratkanal nur mit Wasser und nicht mit Puffer gespült wurde (auch nach Befüllen des Systems!), da Kontakt des Substrats mit G-PP zur Abnahme dessen Stabilität durch Erhöhung des pH-Wertes führte. Ein weiterer, zunächst unerwarteter Störeffekt war auf ein „Fowling“ der gepufferten Gelatine-Lösung im flüssigkeitsführenden System zurückzuführen. Obwohl alle Lösungen tagfrisch steril-filtriert wurden, war innerhalb einer Woche ein Anstieg der Basislinie (auch ohne Substrat und Chromogen) festzustellen, der nach Behandlung der Anlage mit einem Detergens wieder verschwand. Dieses Problem wurde schließlich folgendermaßen gelöst: Nach jedem Arbeitstag erfolgte Spülung der gesamten Anlage mit dest. Wasser und anschließender „Übernachtung“ in 70%igem Isopropanol. Einmal pro Woche (freitags) wurde das System mit 3%igem Decon 90<sup>TM</sup> für ca. 90 min gereinigt, anschließend mit dest. Wasser gespült und in 70%igem Isopropanol konserviert. (Es versteht sich von selbst, dass bei diesen Spülprozessen das Millex-Filter ausgebaut war; es wurde für jeden Versuch ein neues Filter verwendet).

#### **4.2.5 Stabilität des Blindwertes – DTNB, ASCh, G-PP**

##### **4.2.5.1 Blindwert in Abwesenheit von Erythrozyten**

Im gereinigten und stabilisierten System wurden wiederholt Versuche zur Stabilität des Blindwertes von DTNB, ASCh und G-PP nach Methode A durchgeführt, hier jeweils mit einem frischen unbeladenen mit Aq. bidest. gespülten Filter (Tab. 4-2). Um den Ablauf eines Experiments mit Enzymreaktor zu simulieren, wurden Kapillare und Filter während des Experiments in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad eingehängt. Die Substratkonzentration betrug 0,45 mM. Abb. 4-9 zeigt den Verlauf eines Versuches zur Bestimmung des Reagenzienblindwertes.

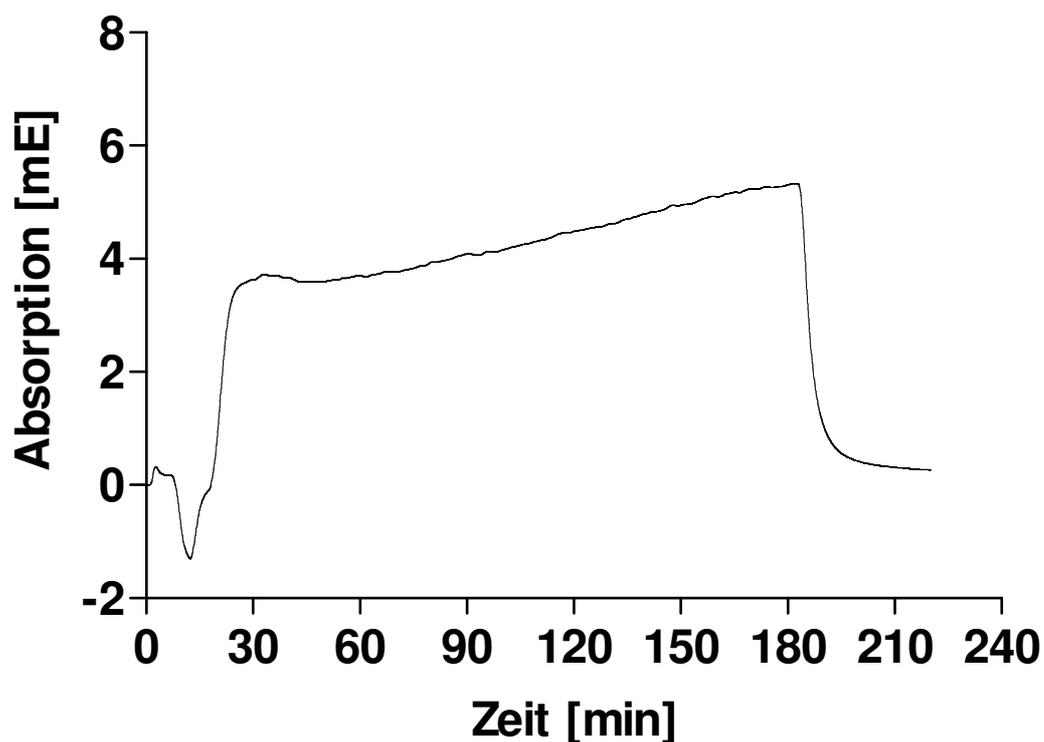
**Tab. 4-2:** Stabilität des Reagenzienblindwertes (BW) - Perfusion eines unbeladenen Filters mit Chromogen (0,3 mM) und Substrat (0,45 mM)

Versuch	BW <sub>G-PP</sub> * 0. min [mE]	BW <sub>DAG</sub> * 30. min [mE]	BW <sub>DAG</sub> 180. min [mE]	BW <sub>G-PP</sub> 220. min [mE]	$\Delta$ BW 30. min [mE]	$\Delta$ BW 180. min [mE]
BW 1	-0,1	3,7	5,9	0,2	3,5	5,7
BW 2	0,0	3,6	5,6	0,2	3,4	5,4
BW 3	0,0	3,6	5,3	0,3	3,3	5,0
BW 4	0,0	5,8	7,0	0,4	5,4	6,6
Mittelwert (n=4)		4,2	6,0	0,3	3,9	5,7

\*Abkürzungen:

BW<sub>DAG</sub> = Reagenzienblindwert von DTNB, Acetylthiocholin und Gelatine-Phosphatpuffer (0,2%)

BW<sub>G-PP</sub> = Reagenzienblindwert von Gelatine-Phosphatpuffer (0,2%)



**Abb. 4-9:** Zeitlicher Verlauf des Reagenzienblindwertes im Durchflussmodell

Nach Einbringen des Filters wurde 5 min mit G-PP, 5 min mit Wasser und wiederum 5 min mit G-PP perfundiert, bevor der Reagenzienblindwert durch Perfusion mit Substrat (0,45 mM) und Chromogen (0,3 mM) bis zur 180. min erfasst wurde. Nach 180 min wurde nur noch mit G-PP perfundiert, um den Ausgangswert wieder zu erreichen.

Bei der Perfusion unbelasteter Filter mit DTNB, ASCh und G-PP ergab sich eine unmittelbare Signalerhöhung (nach Equilibrierung) um ca. 4,2 mE. Nach 180 min lag das Signal bei ca. 6 mE. Ein Blindwert von durchschnittlich ca. 5,7 mE (nach ca. 180 min) entspricht in etwa 1% des Maximalwertes, der bei der Bestimmung der AChE-Aktivität erreicht wurde (ca. 530 mE). Beim Nachspülen des Filters mit G-PP sanken die Signale auf den Ausgangswert (Abweichung < 0,5 mE).

#### 4.2.5.2 Blindwert nach Anwesenheit von Erythrozyten bei Einsatz des Enzymreaktors

Im Vergleich wurde die Reproduzierbarkeit der Blindwerte und deren Stabilität, sowohl für den Blindwert nach Entfernung des Enzymreaktors (nach ca. 180 min; in Gegenwart von DTNB, ASCh und G-PP), als auch für die erreichbaren Endwerte durch Nachspülen mit G-PP (nach ca. 220 min; nach Absetzen von DTNB und ASCh) überprüft. Es wurden die Blindwerte von verschiedenen Versuchen z. B. zur Bestimmung der Stabilität der AChE, Hemmversuche mit reversiblen Hemmstoffen oder Paraoxon oder Versuche zur Prophylaxe bei gleichzeitiger Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen und Paraoxon nach Entfernung der jeweiligen Enzymreaktoren verglichen.

Als Beispiel (Tab. 4-3) wurden hier die Ergebnisse von Versuchen angegeben, die mit Erythrozyten dreier Chargen durchgeführt wurden. (Der Enzymreaktor wurde jeweils nach 180 min Perfusion entfernt.)

**Tab. 4-3:** Blindwerte nach Entfernung des mit Erythrozyten beladenen Enzymreaktors und Austausch gegen ein unbelastetes Filter bei Perfusion mit Chromogen (0,3 mM) und Substrat (0,45 mM) bzw. Spülen mit G-PP

Charge	BW <sub>DAG</sub> * [mE]	BW <sub>G-PP</sub> * [mE]	$\Delta$ BW [mE]
9	6,3 ± 1,0 (n=8)	0,24 ± 0,07 (n=10)	<b>5,9 ± 1,0 (n=10)</b>
10	5,9 ± 0,7 (n=67)	0,30 ± 0,09 (n=66)	<b>5,6 ± 0,6 (n=66)</b>
11	6,6 ± 0,4 (n=10)	0,29 ± 0,10 (n=10)	<b>6,3 ± 0,3 (n=10)</b>

\*Abkürzungen:

BW<sub>DAG</sub> = Reagenzienblindwert von DTNB, Acetylthiocholin und Gelatine-Phosphatpuffer (0,2%)

BW<sub>G-PP</sub> = Reagenzienblindwert von Gelatine-Phosphatpuffer (0,2%)

Mit dem stabilisierten System können somit reproduzierbar Blindwerte gemessen werden (vgl. Blindwert in Abwesenheit von Erythrozyten), die Abnahme der Absorption auf die Ausgangswerte des G-PP wird (nach ca. 220 min) bis auf geringe Abweichungen (< 0,5 mE) erreicht. Eine Erhöhung der Blindwerte war ein sicherer Hinweis auf eine zunehmende Konta-

mination des Systems durch den Gelatine-Puffer und deutete die Notwendigkeit einer gründlichen Reinigung an (zusätzlich zur routinemäßigen Reinigung).

#### 4.2.5.3 Korrektur des Blindwertes (zur genauen Berechnung der Restaktivität nach Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen und Paraoxon und für die Bestimmung des Grades der Hemmung durch Paraoxon)

Da eine sehr genaue und reproduzierbare Bestimmung des Blindwertes möglich war, konnte die geringe Zunahme des Blindwertes (durch Hydrolyse des Substrates) vom Zeitpunkt der Maximalaktivität (ca. 30. min), über die Zeitpunkte der Aktivitätsminima nach Hemmung mit reversiblen Hemmstoff (62. min) und gleichzeitiger Hemmung mit reversiblen Hemmstoff und Paraoxon (93. min) bis zum Zeitpunkt der Entfernung des Enzymreaktors (180. min) bei den Prophylaxe-Versuchen (Methode E), berücksichtigt werden. Bei der Berechnung des Grades der Hemmung bei Hemmversuchen mit Paraoxon nach Methode C (mit anschließender Reaktivierung durch Obidoxim) wurde die Zunahme des Reagenzienblindwertes vom Aktivitätsminimum (68. min) bis zum Zeitpunkt der Entfernung des Enzymreaktors (180. min) berücksichtigt (Tab. 4-4).

**Tab. 4-4:** Zunahme des Reagenzien-BW ( $BW_{DAG}$ ) vom Zeitpunkt des Aktivitätsmaximums (30. min) über die Aktivitätsminima nach Hemmung (62., 68. und 93. min) bis zum Zeitpunkt der Entfernung des Enzymreaktors (180. min)

Versuch	$BW_{DAG}^*$ 30. min [mE]	$BW_{DAG}$ 62. min [mE]	$BW_{DAG}$ 68. min [mE]	$BW_{DAG}$ 93. min [mE]	$BW_{DAG}$ 180. min [mE]	$\Delta BW$ (30. bis 180. min) [mE]	$\Delta BW$ (62. bis 180. min) [mE]	$\Delta BW$ (68. bis 180. min) [mE]	$\Delta BW$ (93. bis 180. min) [mE]
BW 1	3,7	3,9	4,0	4,3	5,9	2,2	2,0	1,9	1,6
BW 2	3,6	3,8	3,9	4,3	5,6	2,0	1,8	1,7	1,3
BW 3	3,6	3,7	5,3	4,1	5,3	1,7	1,6	1,5	1,2
BW 4	5,8	5,8	5,9	6,2	7,0	1,2	1,2	1,1	0,8
					<b>Mittelwert (n=4)</b>	<b>1,8</b>	<b>1,7</b>	<b>1,6</b>	<b>1,2</b>

\*Abkürzung:

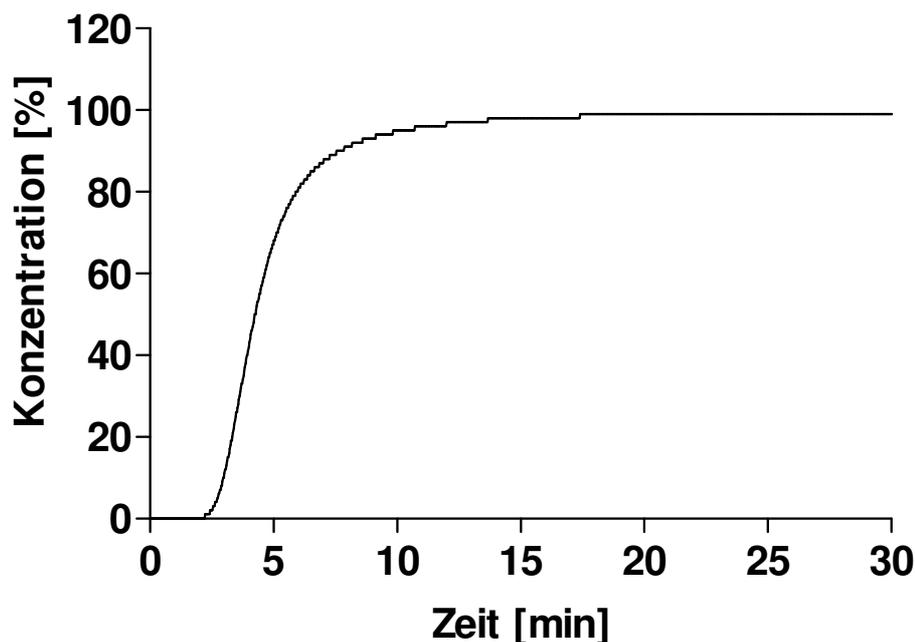
$BW_{DAG}$  = Reagenzienblindwert von DTNB, Acetylthiocholin und Gelatine-Phosphatpuffer (0,2%)

Bei der Berechnung der Restaktivitäten nach Prophylaxe mit reversiblen Hemmstoffen und dem Grad der Vorhemmung, sowie der AChE-Aktivität nach Spontanreaktivierung (wurden die korrigierten Werte für  $BW_{DAG}$  ( $BW_{DAG} - \Delta BW$ ) für die jeweiligen Zeitpunkte in die Berechnungsformeln eingesetzt.

### 4.3 Hemmung der AChE

Zur Ermittlung kinetischer Konstanten bei raschen Änderungen der Enzymaktivität müssen sich rasch neue Gleichgewichte in der Zusammensetzung der Perfusionskomponenten einstellen. Für die gewählten Untersuchungen wurden die Reaktionen so gesteuert, dass die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten mit hoher Genauigkeit ermittelt werden konnten.

Der pro Zeiteinheit geförderte Anteil an Hemmstoff betrug bei folgenden Hemmversuchen 45% von insgesamt 200% (2 Pumpen mit je 100 %). Bei der Betrachtung folgender Ergebnisse muss die verzögerte Gleichgewichtseinstellung und somit das verzögerte Erreichen der maximalen Giftkonzentration nach Zuschalten des Giftes berücksichtigt werden. Noch während die Konzentration auf einen konstanten Wert anstieg, setzte bereits die Hemmung der AChE ein. Abb. 4-10a zeigt (anhand eines Farbtests, bei dem zum Zeitpunkt  $t=0$  ausgehend von 200% PP, 45% eines Farbstoffes und 155% PP gefördert werden), welcher zeitliche Konzentrationsverlauf im System vorliegt.

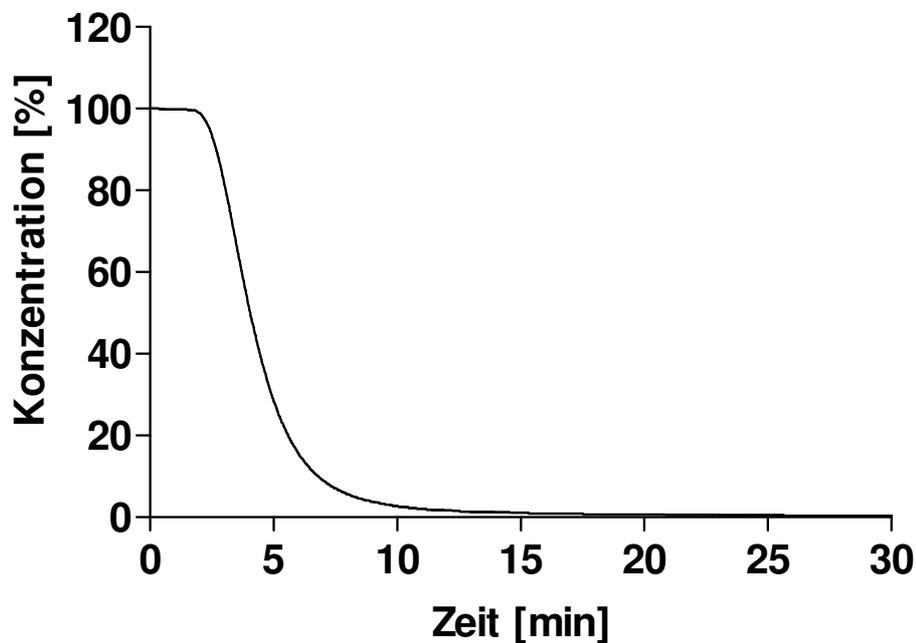


**Abb. 4-10a:** Zeitlicher Verlauf der Farbstoff-Konzentration im System nach Zugabe des Farbstoffes zum Zeitpunkt  $t=0$  bei konstanter Farbstoffkonzentration (45% von insgesamt 200% Fördervolumen (= 0,5 mL/min)); (Endkonzentration = 100%)

Erst nach ca. 18 min werden etwa 99% der Maximalkonzentration erreicht. Es ist deshalb schwierig, bei schnellen Hemmreaktionen mit hohen Giftkonzentrationen die kinetischen Konstanten exakt zu bestimmen, da der Einfluss der Verzögerung eine große Rolle spielt. Bei

langsamerer Hemmung kann das Intervall zur Berechnung der kinetischen Konstanten besser in den Bereich gewählt werden, in dem homogene Durchmischung und eine konstante Giftkonzentration vorliegen.

Auch die verzögerte Gleichgewichtseinstellung nach Absetzen der Hemmstoffe spielt eine Rolle. Abb 4-10b zeigt (wieder anhand eines Farbttests bei dem ausgehend von 45% Farbstoff und 155% PP bei  $t = 0$  auf 200% PP umgeschaltet wurde) den Konzentrationsverlauf und das verzögerte Ausspülen einer Substanz nach Abschalten.



**Abb. 4-10b:** Zeitlicher Verlauf der Farbstoff-Konzentration im System nach Absetzen des Farbstoffes zum Zeitpunkt  $t=0$ ; (Ausgangskonzentration = 100%)

Erst nach ca. 15 min sind etwa 99% des Hemmstoffes ausgespült (vgl. 4.1.6). Bei der Berechnung der Spontanreaktivierung sollte deshalb das Intervall soweit möglich erst 15 min nach Absetzen des Hemmstoffes beginnen. Bei schnellen Reaktionen mit niedrigen Konzentrationen kann bereits nach 10 min begonnen werden.

### 4.3.1 Hemmung mit Paraoxon bei konstanter Giftkonzentration

#### Hemmkinetik:

Die Hemmkinetik wurde über den in der Tabelle angegebenen Zeitraum (Beginn des Intervalls 6 min nach Zugabe des Paraoxon) ausgewertet. Für die Hemmung der Ery-AChE durch Paraoxon wurden nach Kurvenanpassung folgende Geschwindigkeitskonstanten  $k_{i, \text{obs}}$  und Halbwertszeiten erhalten:

**Tab. 4-5:** Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Hemmung von Ery-AChE durch Paraoxon (1  $\mu\text{M}$ ) bei einer ASCh-Konzentration von 0,45 mM

Versuch	Intervall* [min]	$k_{i, \text{obs}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [min]	Plateau [mE]	$R^2$
1	29	<b>0,297</b>	<b>2,34</b>	7,2	0,9993
2	29	<b>0,310</b>	<b>2,24</b>	11,0	0,9994
3	29	<b>0,294</b>	<b>2,36</b>	6,8	0,9994
4	29	<b>0,291</b>	<b>2,38</b>	12,0	0,9994
5	28	<b>0,280</b>	<b>2,48</b>	10,8	0,9996
6	28	<b>0,270</b>	<b>2,57</b>	8,4	0,9997
7	28	<b>0,258</b>	<b>2,69</b>	10,7	0,9994
8	28	<b>0,275</b>	<b>2,52</b>	5,6	0,9997
9	28	<b>0,270</b>	<b>2,57</b>	5,5	0,9998
10	27	<b>0,296</b>	<b>2,34</b>	5,4	0,9997
11	27	<b>0,273</b>	<b>2,54</b>	8,1	0,9997
12	27	<b>0,245</b>	<b>2,83</b>	5,2	0,9999
13	27	<b>0,273</b>	<b>2,54</b>	7,1	0,9999
<b>Mittelwert (n=13)</b>		<b>0,279</b>	<b>2,49</b>		
<b>SD</b>		<b>0,018</b>	<b>0,16</b>		

\*Zeitdauer für Kurvenanpassung zur Berechnung von  $k_{i, \text{obs}}$

Zur Anpassung einer monoexponentiellen Funktion wurde der Reagenzienblindwert als Plateau (Konstante) eingegeben.  $R^2$  gibt die Güte der Anpassung an.

**Tab. 4-6:** Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Hemmung von Ery-AChE durch Paraoxon (1  $\mu\text{M}$ ) bei einer ASCh-Konzentration von 0,09 mM

Versuch	Intervall* [min]	$k_{i, \text{obs}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [min]	Plateau [mE]	$R^2$
1	26	<b>0,421</b>	<b>1,65</b>	3,1	0,9983
2	24	<b>0,481</b>	<b>1,44</b>	2,9	0,9988
3	24	<b>0,466</b>	<b>1,49</b>	2,6	0,9983
4	24	<b>0,476</b>	<b>1,46</b>	2,9	0,9983
5	24	<b>0,452</b>	<b>1,53</b>	2,8	0,9989
<b>Mittelwert (n=5)</b>		<b>0,459</b>	<b>1,51</b>		
<b>SD</b>		<b>0,024</b>	<b>0,08</b>		

\*Legende siehe Tab. 4-5

**Tab. 4-7:** Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Hemmung von Ery-AChE durch Paraoxon (0,2  $\mu\text{M}$ ) bei einer ASCh-Konzentration von 0,45 mM

Versuch	Intervall* [min]	$k_{i, \text{obs}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [min]	Plateau [mE]	$R^2$
1	56	<b>0,0695</b>	<b>9,972</b>	5,5	0,9999
2	56	<b>0,0716</b>	<b>9,658</b>	7,0	0,9999
3	56	<b>0,0699</b>	<b>9,921</b>	6,5	0,9999
4	56	<b>0,0709</b>	<b>9,771</b>	8,0	0,9999
<b>Mittelwert (n=4)</b>		<b>0,0705</b>	<b>9,831</b>		
<b>SD</b>		<b>0,001</b>	<b>0,143</b>		

\*Legende siehe Tab. 4-5

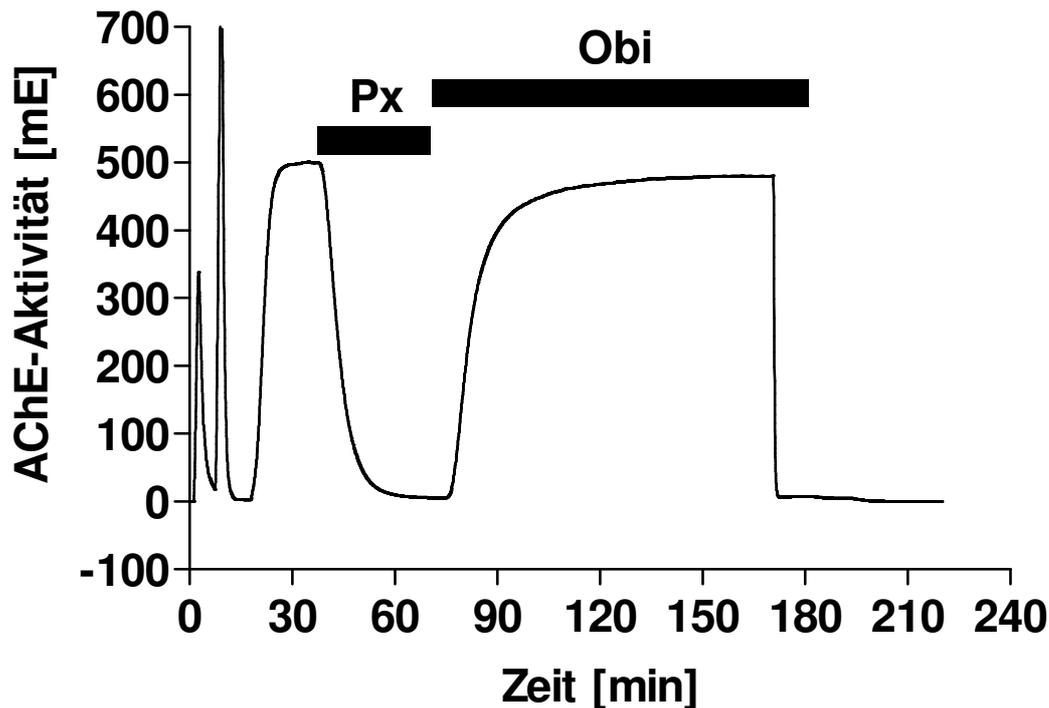
Bei der Hemmung mit 1  $\mu\text{M}$  Paraoxon wurden nach etwa 30 min  $99,7 \pm 0,1\%$  (n=13) der Enzymaktivität gehemmt (vgl. 4.3.6.1), mit 0,2  $\mu\text{M}$  Paraoxon betrug die Hemmung nach etwa 60 min  $98,0 \pm 0,2\%$  (n= 4).

### 4.3.2 Reaktivierung Paraoxon-gehemmter Erythrozyten-AChE mit Obidoxim

Nach Hemmung mit Paraoxon wurde die AChE durch Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Obidoxim (ASCh 0,45 mM) reaktiviert. Nach Reaktivierung der Paraoxon-gehemmten AChE mit Obidoxim erreichte die AChE-Aktivität  $91,0 \pm 2,5\%$  (n=8) (1  $\mu\text{M}$  Paraoxon) und  $91,0 \pm 0,6\%$  (n=4) (0,2  $\mu\text{M}$  Paraoxon) der Ausgangsaktivität. Unter Berücksichtigung der Aktivitätsverluste

während der Dauer des Experiments (Die AChE-Aktivität nahm innerhalb des Zeitraums der Hemm- und Reaktivierungsphase (ca. 180 min) um etwa 3,4% ab; siehe auch Tab. 8-19) betrug die Reaktivierbarkeit ca. 94%.

Abb. 4-11 zeigt den zeitlichen Verlauf des Hemm- und Reaktivierungsversuches (1  $\mu\text{M}$  Paraoxon; 10  $\mu\text{M}$  Obidoxim) bei einer Substratkonzentration von 0,45 mM.



**Abb. 4-11:** Zeitlicher Verlauf der Erythrozyten-AChE-Aktivität nach Hemmung mit Paraoxon (1  $\mu\text{M}$ ) und Reaktivierung mit Obidoxim (10  $\mu\text{M}$ )

Nach Einbringen des Enzymreaktors wurde 5 min mit G-PP zur Stabilisierung der Basislinie und 5 min mit Wasser zur vollständigen Hämolyse perfundiert, bevor die Maximalaktivität mit Substrat (0,45 mM) und Chromogen (0,3 mM) erfasst wurde. Nach der Äquilibrierphase wurde 35 min mit Paraoxon gehemmt, anschließend wurde Paraoxon abgesetzt und zur Reaktivierung mit 10  $\mu\text{M}$  Obidoxim perfundiert. Nach 170 min wurden der Enzymreaktor entfernt und die Reagenzienblindwerte  $BW_{\text{DAG+Obi}}$  (DTNB, ASCh, Obi, G-PP),  $BW_{\text{DAG}}$  (DTNB, ASCh, G-PP) und  $BW_{\text{G-PP}}$  bestimmt.

#### **Kinetische Konstante der Reaktivierung:**

Die Reaktivierungskinetik wurde über den in den Tabellen angegebenen Zeitraum ausgewertet. Für die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{r, \text{obs}}$  und Halbwertszeiten der einzelnen Experimente ergaben sich nach Kurvenanpassung folgende Werte:

**Tab. 4-8:** Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Reaktivierung von Paraoxon-gehemmter (1  $\mu\text{M}$ ) Ery-AChE durch Obidoxim (10  $\mu\text{M}$ ) bei einer ASCh-Konzentration von 0,45 mM

Versuch	Intervall* [min]	$k_{r, \text{obs}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [min]	$R^2$
1	25	<b>0,164</b>	<b>4,24</b>	0,9994
2	25	<b>0,159</b>	<b>4,35</b>	0,9995
3	25	<b>0,175</b>	<b>3,97</b>	0,9990
4	25	<b>0,182</b>	<b>3,82</b>	0,9995
5	25	<b>0,175</b>	<b>3,96</b>	0,9996
6	25	<b>0,168</b>	<b>4,13</b>	0,9980
7	25	<b>0,174</b>	<b>3,98</b>	0,9991
8**	25	<b>0,182</b>	<b>3,82</b>	0,9978
<b>Mittelwert (n=8)</b>		<b>0,172</b>	<b>4,03</b>	
<b>SD</b>		<b>0,008</b>	<b>0,19</b>	

\*Zeitdauer für Kurvenanpassung zur Berechnung von  $k_{r, \text{obs}}$

\*\*Änderung der Versuchsbedingungen: Bei Versuch 8 wurde zunächst Paraoxon abgesetzt (60. min), anschließend 10 min nur mit DTNB, Acetylthiocholin und Gelatine-Phosphatpuffer (0,2%) gespült, bevor mit Obidoxim (ab der 70. min) reaktiviert wurde.

Bei Versuch 8 wurde zunächst Paraoxon abgesetzt (60. min), anschließend 10 min nur mit DTNB, ASCh und G-PP gespült, bevor mit Obidoxim (ab der 70. min) reaktiviert wurde. Es sollte geprüft werden, ob sich das Ausspülen von Paraoxon auf die Reaktivierung auswirkt. Die Reaktivierungsgeschwindigkeit wurde dadurch nicht sicher beeinflusst.

Bei den folgenden Versuchen mit 0,2  $\mu\text{M}$  Paraoxon wurde die Phase des Ausspülens in der Methode beibehalten.

**Tab. 4-9:** Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Reaktivierung von Paraoxon-gehemmter (0,2  $\mu\text{M}$ ) Ery-AChE durch Obidoxim (10  $\mu\text{M}$ ) bei einer ASCh-Konzentration von 0,45 mM

Versuch	Intervall [min]	$k_{r, \text{obs}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [min]	$R^2$
1	54	<b>0,2016</b>	<b>3,437</b>	0,9996
2	49	<b>0,2016</b>	<b>3,437</b>	0,9996
3	44	<b>0,2044</b>	<b>3,391</b>	0,9996
4	54	<b>0,2065</b>	<b>3,356</b>	0,9998
<b>Mittelwert (n=4)</b>		<b>0,2035</b>	<b>3,405</b>	
<b>SD</b>		<b>0,0024</b>	<b>0,039</b>	

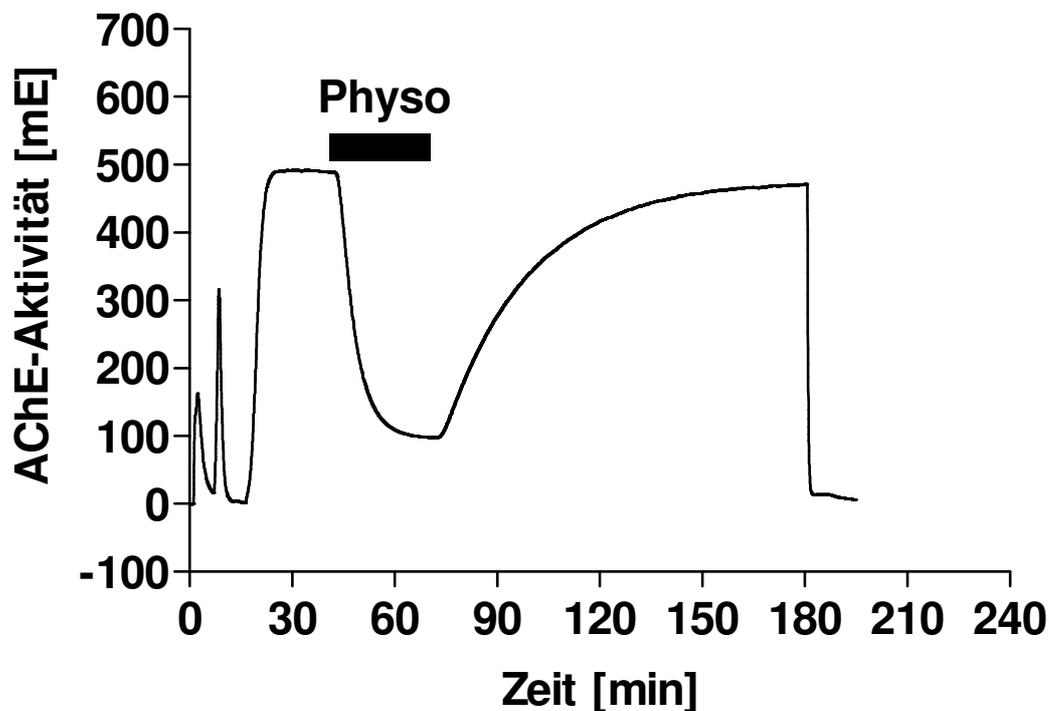
\*Zeitdauer für Kurvenanpassung zur Berechnung von  $k_{r, \text{obs}}$

### 4.3.3 Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen und Spontanreaktivierung

Je nach Konzentration des reversiblen Hemmstoffes wurden die Phase der Hemmung und der Spontanreaktivierung zeitlich variiert. Die Hemm- und Reaktivierungskinetiken wurden über den in folgenden Tabellen angegebenen Zeitraum ausgewertet.

#### 4.3.3.1 Physostigmin

Abb. 4-12 zeigt als Beispiel den zeitlichen Ablauf einer Hemmung mit Physostigmin (250 nM) und die anschließende Spontanreaktivierung nach Absetzen des Physostigmins bei einer Substratkonzentration von 0,45 mM.



**Abb. 4-12:** Zeitlicher Verlauf der Erythrozyten-AChE-Aktivität nach Hemmung mit Physostigmin (250 nM) mit anschließender Spontanreaktivierung

Nach Einbringen des Enzymreaktors wurde 5 min mit G-PP zur Stabilisierung der Basislinie und 5 min mit Wasser zur vollständigen Hämolyse perfundiert, bevor die Maximalaktivität mit Substrat (0,45 mM) und Chromogen (0,3 mM) erfasst wurde. Nach der Äquilibrierphase wurde 30 min mit Physostigmin (250 nM) gehemmt, anschließend wurde Physostigmin abgesetzt und bis zum erneuten Erreichen der maximalen AChE-Aktivität nach Spontanreaktivierung mit DTNB und ASCh perfundiert. Nach 180 min wurden der Enzymreaktor entfernt und die Reagenzienblindwerte  $BW_{DAG}$  (DTNB, ASCh, G-PP) und  $BW_{G-PP}$  bestimmt.

Die Konzentrationen an Physostigmin betragen zwischen 25 nM und 5  $\mu$ M. Nach Spontanreaktivierung des mit Physostigmin gehemmten Enzyms erreichte die AChE-Aktivität  $94,6 \pm 2,8\%$  (n=20) (ASCh 0,45 mM) bzw.  $97,4 \pm 1,3\%$  (n=4) (ASCh 0,09 mM) der Ausgangsaktivität.

### **Spontanreaktivierung der Ery-AChE nach Hemmung mit Physostigmin**

Für die Geschwindigkeit der Spontanreaktivierung ergaben sich folgende Werte ( $k_{s, \text{obs}}$ ; Tab. 4-10) (Beginn des Zeitintervall zur Berechnung etwa 20 min nach Absetzen des Physostigmins.).

#### *Einfluß von Obidoxim auf die Spontanreaktivierung*

Um den Einfluß von Obidoxim auf die Geschwindigkeit der Spontanreaktivierung zu prüfen, wurde die AChE nach Hemmung mit 250 nM Physostigmin mit 10  $\mu$ M Obidoxim (ASCh 0,45 mM) reaktiviert.

Die Zugabe von Obidoxim zeigte keinen Einfluss auf die Spontanreaktivierung. Die Reaktivierungshalbwertszeit betrug 16,2 min. Für die Spontanreaktivierung des Physostigmin-gehemmten Enzyms (Versuche 25-500 nM) ergab sich eine mittlere Halbwertszeit von  $16,9 \pm 0,3$  min (vgl. Tab. 4-10).

**Tab. 4-10:** Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Spontanreaktivierung nach Hemmung mit Physostigmin

Versuch	Physostigmin [nM]	Intervall* [min]	$k_{s, obs}$ [min <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]	R <sup>2</sup>
<b>Substratkonzentration: ASCh 0,45 mM</b>					
1	5000	115	0,0333	20,80	1,000
2	5000	115	0,0333	20,79	0,9999
3	5000	150	0,0311	22,32	0,9998
4	2000	115	0,0373	18,60	1,000
5	2000	120	0,0382	18,15	1,000
6	2000	100	0,0372	18,63	0,9998
7	1000	110	0,0385	17,98	1,000
8	1000	115	0,0398	17,41	0,9999
9	1000	115	0,0399	17,39	0,9999
10	1000	100	0,0385	18,03	0,9997
11	500	95	0,0417	16,62	1,000
12	500	95	0,0406	17,07	1,000
13	500	100	0,0416	16,67	1,000
14	500	100	0,0409	16,94	1,000
15	500	98	0,0402	17,25	1,000
16	250	95	0,0416	16,68	0,9999
17	250	95	0,0402	17,27	1,000
18	250	95	0,0405	17,11	1,000
19	100	70	0,0415	16,69	0,9999
20	100	100	0,0415	16,70	0,9999
21	100	130	0,0398	17,42	0,9996
22	50	100	0,0413	16,79	0,9998
23	50	100	0,0420	16,51	0,9997
24	25	75	0,0420	16,52	0,9993
25	25	70	0,0406	17,08	0,9998
26	25	72	0,0421	16,45	0,9996
27	25	80	0,0411	16,85	0,9997
<b>Substratkonzentration ASCh 0,09 mM</b>					
1	500	70	0,04986	13,90	0,9995
2	500	60	0,04636	14,95	0,9997
3	250	60	0,04940	14,03	0,9995
4	250	60	0,05119	13,53	0,9995

\*Zeitdauer für Kurvenanpassung zur Berechnung von  $k_{s, obs}$

### Hemmung der Ery-AChE durch Physostigmin

Das gewählte Zeitintervall zur Berechnung begann jeweils 6 min nach Zugabe des Physostigmins. Nach Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die Hemmkurven konnten folgende Werte  $k_{i, \text{obs}}$  für die Hemmggeschwindigkeit berechnet werden.

**Tab. 4-11:** Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{i, \text{obs}}$  der Hemmung mit Physostigmin

Versuch	Physostigmin [nM]	Intervall* [min]	$k_{i, \text{obs}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]	R <sup>2</sup>
<b>Substratkonzentration ASCh 0,45 mM</b>					
1	5000	16	1,176	0,5892	0,9992
2	5000	11	1,133	0,6119	0,9991
3	5000	25	1,088	0,6369	0,9995
4	2000	9	0,9477	0,7314	0,9999
5	2000	9	0,9904	0,6999	0,9999
6	2000	23	0,9304	0,7450	0,9996
7	1000	19	0,6427	1,079	0,9999
8	1000	14	0,6488	1,068	1,000
9	1000	14	0,6227	1,113	0,9999
10	1000	23	0,6562	1,056	0,9995
11	500	16	0,3546	1,955	0,9999
12	500	17	0,3666	1,891	0,9999
13	500	24	0,3776	1,836	1,000
14	500	24	0,3811	1,819	1,000
15	500	24	0,3792	1,828	0,9999
16	250	26	0,2166	3,200	1,000
17	250	26	0,2211	3,136	1,000
18	250	26	0,2064	3,358	0,9999
19	100	54	0,1138	6,089	0,9999
20	100	54	0,1168	5,936	1,000
21	100	104	0,1148	6,039	0,9996
22	50	114	0,08074	8,585	0,9998
23	50	74	0,07425	9,336	0,9998
<b>Substratkonzentration ASCh 0,09 mM</b>					
1	500	19	0,7813	0,8872	0,9999
2	500	19	0,7575	0,9150	0,9998
3	250	19	0,4972	1,394	0,9999
4	250	19	0,4871	1,423	0,9998

\*Zeitdauer für Kurvenanpassung zur Berechnung von  $k_{i, \text{obs}}$

### 4.3.3.2 Pyridostigmin

Bei den Hemmversuchen mit Pyridostigmin betragen die Konzentrationen zwischen 250 nM und 5  $\mu$ M. Nach Spontanreaktivierung des mit Pyridostigmin gehemmten Enzyms erreichte die AChE-Aktivität  $91,3 \pm 1,7\%$  (n=9) der Ausgangsaktivität. (Bei den Versuchen mit Pyridostigmin ist aufgrund der längeren Spontanreaktivierungshalbwertszeit (im Vergleich zu Physostigmin) die Reaktivierung im untersuchten Zeitraum noch nicht abgeschlossen, die erreichten Werte entsprechen deshalb nicht dem maximal erreichbaren Endwert.)

#### Spontanreaktivierung der Ery-AChE nach Hemmung mit Pyridostigmin

**Tab. 4-12:** Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Spontanreaktivierung nach Hemmung mit Pyridostigmin bei einer ASCh-Konzentration von 0,45 mM

Versuch	Pyridostigmin [nM]	Intervall* [min]	$k_{s, \text{obs}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]	R <sup>2</sup>
1	5000	170	0,02566	27,01	0,9999
2	2000	130	0,02529	27,41	0,9999
3	1000	70	0,02652	26,14	0,9998
4	1000	70	0,02573	26,94	0,9994
5	1000	130	0,02548	27,20	0,9998
6	500	70	0,02704	25,63	0,9984
7	500	150	0,02486	27,89	0,9993
8	250	70	0,02471	28,05	0,9973
9	250	100	0,02578	26,89	0,9991

\*Zeitdauer für Kurvenanpassung zur Berechnung von  $k_{s, \text{obs}}$

### Hemmung der Ery-AChE durch Pyridostigmin

Das gewählte Zeitintervall zur Berechnung begann jeweils 10 min nach Zugabe des Pyridostigmins. Nach Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die Hemmkurven konnten folgende Werte  $k_{i, \text{obs}}$  für die Hemmggeschwindigkeit berechnet werden.

**Tab. 4-13:** Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{i, \text{obs}}$  der Hemmung mit Pyridostigmin bei einer ASCh-Konzentration von 0,45 mM

Versuch	Pyridostigmin [nM]	Intervall* [min]	$k_{i, \text{obs}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]	R <sup>2</sup>
1	5000	60	0,1982	3,498	0,9997
2	2000	100	0,09519	7,282	0,9994
3	1000	53	0,06004	11,54	1,000
4	1000	100	0,06209	11,16	0,9996
5	1000	100	0,06086	11,39	0,9998
6	500	53	0,03909	17,73	0,9999
7	500	110	0,04113	16,85	0,9997
8	250	-	-	-	-
9	250	130	0,02989	23,19	0,9999

\*Zeitdauer für Kurvenanpassung zur Berechnung von  $k_{i, \text{obs}}$

### 4.3.3.3 Methyl-Paraoxon

Mit Methyl-Paraoxon, einem reversibel hemmenden Organophosphat (Alterungshalbwertszeit etwa 4 h) wurden zum Test jeweils nur ein Versuch mit hoher Konzentration (4  $\mu\text{M}$ ) und einer mit niedriger Konzentration (100 nM) durchgeführt.

Mit 4  $\mu\text{M}$  Methyl-Paraoxon konnte mit einer Halbwertszeit von ca. 2 min ( $k_{i, \text{obs}} = 0,343 \text{ min}^{-1}$ ;  $R^2 = 0,998$ ) innerhalb von 60 min auf eine Restaktivität von 97,6% gehemmt werden. Mit 100 nM konnte mit einer Halbwertszeit von ca. 33 min ( $k_{i, \text{obs}} = 0,021 \text{ min}^{-1}$ ;  $R^2 = 0,9999$ ) nach 60 min eine Hemmung von ca. 38% erreicht werden, das Gleichgewicht zwischen Spontanreaktivierung und Hemmung konnte sich in diesem Zeitraum jedoch nicht einstellen. (Bei niedrigen Konzentrationen muss daher zur schnellen Gleichgewichtseinstellung bei den folgenden Prophylaxe-Versuchen mit Methyl-Px mit einer „Puls“-Konzentration vorgehemmt werden.) Die Reaktivierbarkeit wurde durch die während der Hemmung eintretende Alterung des Enzyms ( $t_{1/2} = 3,7 \text{ h}$  in Abwesenheit und  $t_{1/2} = 4,2 \text{ h}$  in Anwesenheit von Inhibitor (Worek et al. 1999b)) verschlechtert. Nach Spontanreaktivierung erreichte man 75,7% der Ausgangsaktivität. Für die Reaktivierungsgeschwindigkeiten ergaben sich folgende Werte:

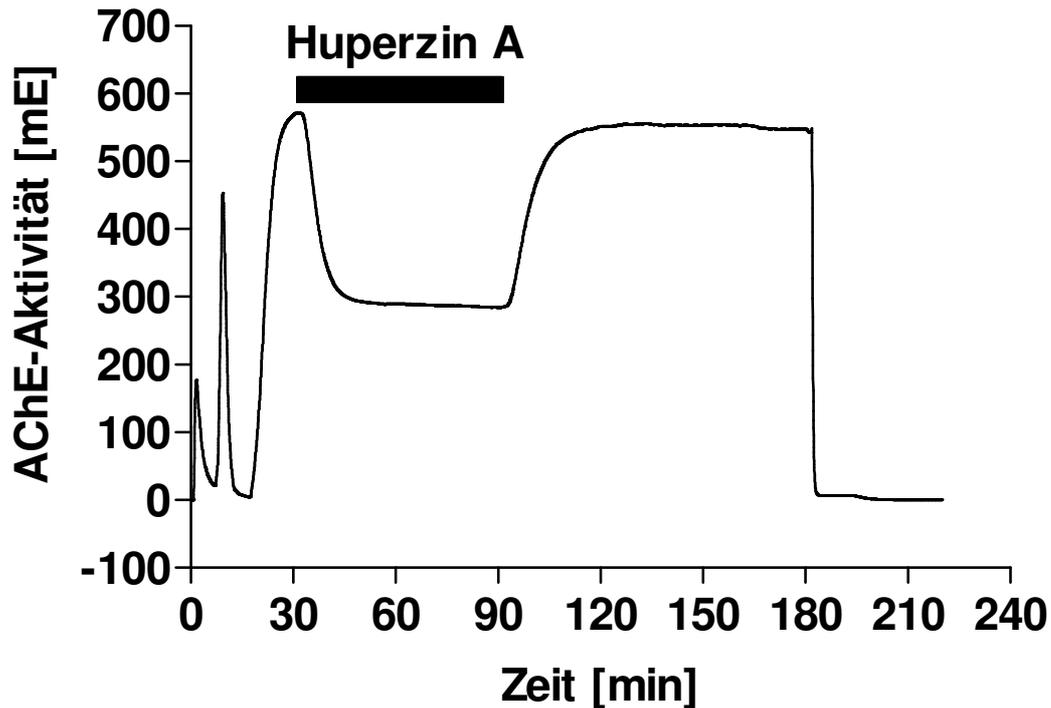
**Tab. 4-14:** Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Spontanreaktivierung nach Hemmung mit Methyl-Paraoxon bei einer ASCh-Konzentration von 0,45 mM

Versuch	Methyl-Px [nM]	Intervall* [min]	$k_{s, \text{obs}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [min]	$R^2$
1	<b>4000</b>	70	<b>0,0198</b>	<b>35,0</b>	0,9999
2	<b>100</b>	70	<b>0,0245</b>	<b>28,3</b>	0,9998

\*Zeitdauer für Kurvenanpassung zur Berechnung von  $k_{s, \text{obs}}$

#### 4.3.3.4 Huperzin A

Abb. 4-13 zeigt den zeitlichen Verlauf einer Hemmung mit Huperzin A (50 nM) und die anschließende Spontanreaktivierung bei einer Substratkonzentration von 0,45 mM. Nach Spontanreaktivierung des mit Huperzin A gehemmten Enzyms erreichte die AChE-Aktivität  $96,5 \pm 1,1\%$  (n=10) der Ausgangsaktivität.



**Abb. 4-13:** Zeitlicher Verlauf der Erythrozyten-AChE-Aktivität nach Hemmung mit Huperzin A (50 nM) mit anschließender Spontanreaktivierung

Nach Einbringen des Enzymreaktors wurde 5 min mit G-PP zur Stabilisierung der Basislinie und 5 min mit Wasser zur vollständigen Hämolyse perfundiert, bevor die Maximalaktivität mit Substrat (0,45 mM) und Chromogen (0,3 mM) erfasst wurde. Nach der Äquilibrierphase wurde 60 min mit Huperzin A (50 nM) gehemmt, anschließend wurde Huperzin A abgesetzt und bis zum erneuten Erreichen der maximalen AChE-Aktivität nach Spontanreaktivierung mit DTNB und ASCh perfundiert. Nach 180 min wurden der Enzymreaktor entfernt und die Reagenzienblindwerte  $BW_{DAG}$  (DTNB, ASCh, G-PP) und  $BW_{G-PP}$  bestimmt.

## Spontanreaktivierung der Ery-AChE nach Hemmung mit Huperzin A

**Tab. 4-15:** Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Spontanreaktivierung nach Hemmung mit Huperzin A bei einer ASCh-Konzentration von 0,45 mM

Versuch	Huperzin A [nM]	Intervall* [min]	$k_{s, \text{obs}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]	R <sup>2</sup>
1	1000	20	0,0763	9,082	0,9997
2	500	20	0,1134	6,110	0,9999
3	250	30	0,1290	5,375	0,9999
4	100	30	0,1431	4,842	0,9998
5	100	30	0,1444	4,799	0,9998
6	50	29	0,1414	4,901	0,9991
7	50	30	0,1472	4,710	0,9991
8	25	30	0,1589	4,362	0,9995
9	25	30	0,1542	4,496	0,9991
10	10	27	0,1532	4,525	0,9957

\*Zeitdauer für Kurvenanpassung zur Berechnung von  $k_{s, \text{obs}}$

Auffällig ist hier die Abnahme der Geschwindigkeit der Spontanreaktivierung mit steigender Huperzin A-Konzentration. Im Konzentrationsbereich von 10 nM bis 100 nM Huperzin A wurden die durchschnittlichen Geschwindigkeiten der Spontanreaktivierung berechnet. Es ergab sich für  $k_{\text{off}}$   $0,149 \pm 0,007 \text{ min}^{-1}$  (n=7). Das entspricht einer Halbwertszeit von etwa 4,6 min. Das Zeitintervall zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten begann bei Versuchen mit 10 nM - 250 nM 10 min nach Absetzen des Huperzin A, bei den Versuchen mit höheren Konzentrationen waren es 20 min (500 nM) bzw. 25 min (1  $\mu\text{M}$ ).

### Hemmung der Ery-AChE durch Huperzin A

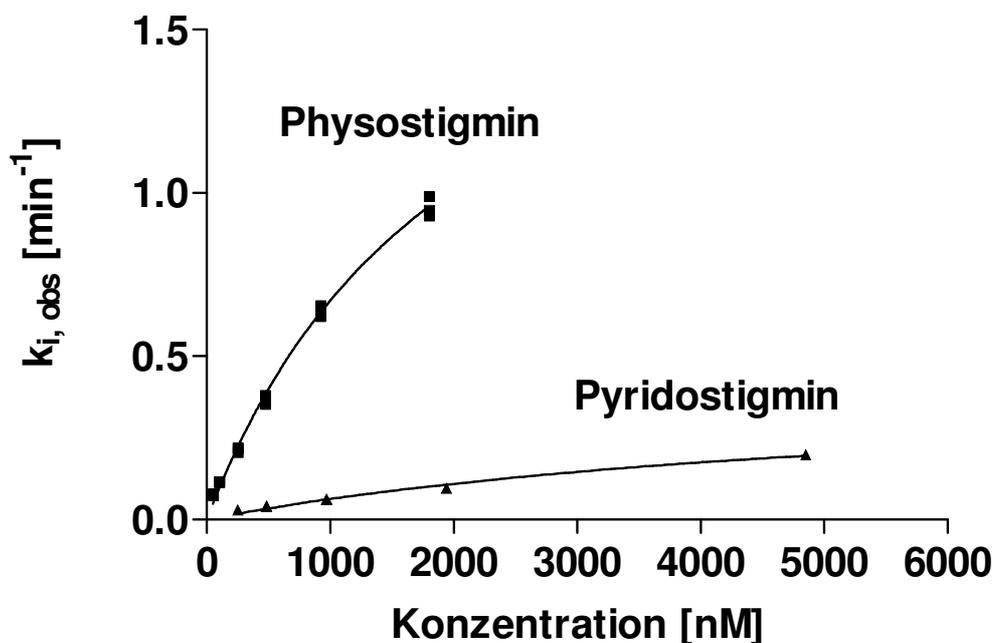
Nach Auswertung der Geschwindigkeitskonstanten der Spontanreaktivierung  $k_{s, \text{obs}}$  ( $= k_{\text{off}}$ ) konnten die Werte für  $k_{i, \text{obs}}$  für die Hemmggeschwindigkeit berechnet werden (nach 3.4.2).

**Tab. 4-16:** Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{i, \text{obs}}$  der Hemmung mit Huperzin A (Berechnung nach Aldridge) bei einer ASCh-Konzentration von 0,45 mM

Versuch	HupA [nM]	AChE <sub>max</sub> [mE]	AChE <sub>plateau</sub> [mE]	BW <sub>DAG</sub> [mE]	$k_{s, \text{obs}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$k_{i, \text{obs}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]
1	<b>1000</b>	521,5	24,9	6,1	<b>0,07632</b>	<b>2,016</b>	<b>0,344</b>
2	<b>500</b>	541,4	46,3	6,9	<b>0,1134</b>	<b>1,425</b>	<b>0,486</b>
3	<b>250</b>	538,2	78,2	7,2	<b>0,1290</b>	<b>0,8358</b>	<b>0,829</b>
4	<b>100</b>	564,4	168,8	8,0	<b>0,1431</b>	<b>0,3521</b>	<b>1,968</b>
5	<b>100</b>	547,4	159,6	8,1	<b>0,1444</b>	<b>0,3696</b>	<b>1,875</b>
6	<b>50</b>	533,1	221,6	7,6	<b>0,1414</b>	<b>0,2058</b>	<b>3,367</b>
7	<b>50</b>	489,8	204,7	7,1	<b>0,1472</b>	<b>0,2124</b>	<b>3,263</b>
8	<b>25</b>	531,6	314,8	6,5	<b>0,1589</b>	<b>0,1117</b>	<b>6,204</b>
9	<b>25</b>	602,0	367,2	6,9	<b>0,1542</b>	<b>0,1005</b>	<b>6,896</b>
10	<b>10</b>	464,0	361,5	6,1	<b>0,1532</b>	<b>0,0442</b>	<b>15,679</b>

#### 4.3.4 Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Ery-AChE-Hemmung durch Physostigmin und Pyridostigmin von der Konzentration des Hemmstoffes

In Abb. 4-14a wurden die Werte der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{i, \text{obs}}$  von Physostigmin und Pyridostigmin gegen die Konzentrationen der Carbamate aufgetragen. (Bei Versuchen mit hohen Konzentrationen (500 nM bis 5  $\mu\text{M}$ ) wurde die Abweichung der tatsächlich vorliegenden von der nominell angegebenen Konzentration im Bereich des zur Berechnung verwendeten Zeitabschnitts (vgl. Abb. 4-10a) berücksichtigt.) Nach Anpassung der Hyperbelfunktion (siehe auch 3.3) erhält man Werte für  $K_{d, \text{obs}}$  und  $k_2$ . Nach Berücksichtigung des Korrekturfaktors ( $K_{d, \text{obs}} = K_d \cdot 6$  bzw.  $\cdot 2$ ) für den Einfluss des anwesenden Substrates (0,45 mM = 5  $\cdot K_m$ ; 0,09 mM = 1  $\cdot K_m$ ) ergibt sich  $K_d$ . Aus diesen Daten lässt sich die „inhibitorische Effizienz“ aus  $k_2/K_d$  ableiten.



**Abb. 4-14a:** Abhängigkeit der Hemmkonstanten  $k_{i, \text{obs}}$  von der Carbamat-Konzentration (0,45 mM Substrat); ■—■ Physostigmin; ▲—▲ Pyridostigmin

#### 4.3.4.1 Physostigmin

Die in Tab. 4-11 angegebenen Werte für die Versuche mit 5  $\mu\text{M}$  Physostigmin wurden von der weiteren Berechnung ausgenommen, da hier die genaue Bestimmung der Hemmggeschwindigkeit nicht mehr gewährleistet werden kann. Hier werden die apparativen Grenzen des Systems (zu langsame Gleichgewichtseinstellung) erreicht, da die Hemmung für das System zu schnell verläuft.

Der Enzymreaktor wurde mit Physostigmin mit Endkonzentrationen zwischen 50 und 2000 nM perfundiert (Korrekturen für Abweichungen der tatsächlichen Konzentration von der angegebenen: 2000 nM  $\rightarrow$  1800 nM; 1000 nM  $\rightarrow$  920 nM; 500 nM  $\rightarrow$  475 nM).

Nach Auftragen der berechneten Werte  $k_{i, \text{obs}}$  gegen die Konzentration konnte an die Daten eine Hyperbelfunktion ( $R^2 = 0,996$ ) angepasst werden. Es ergab sich bei einer Substratkonzentration von 0,45 mM  $k_2 = 2,08 \text{ min}^{-1}$  (1,86 – 2,29  $\text{min}^{-1}$ ) und  $K_{d, \text{obs}} = 2,10 \mu\text{M}$  (1,76 – 2,44  $\mu\text{M}$ ) und bei 0,09 mM Substrat  $k_2 = 2,06 \text{ min}^{-1}$  (1,09 – 3,024  $\text{min}^{-1}$ ) und  $K_{d, \text{obs}} = 0,795 \mu\text{M}$  (0,235 – 1,354  $\mu\text{M}$ ). Die Korrektur für das Substrat mit  $[S] = 5 \cdot K_m$  bzw.  $1 \cdot K_m$  ergibt Werte für  $K_d = 0,350 \mu\text{M}$  bzw.  $0,398 \mu\text{M}$ . Diese Werte ergeben für  $k_2/K_d$   $5,94 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  (0,45 mM ASCh) bzw.  $5,17 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  (0,09 mM ASCh).

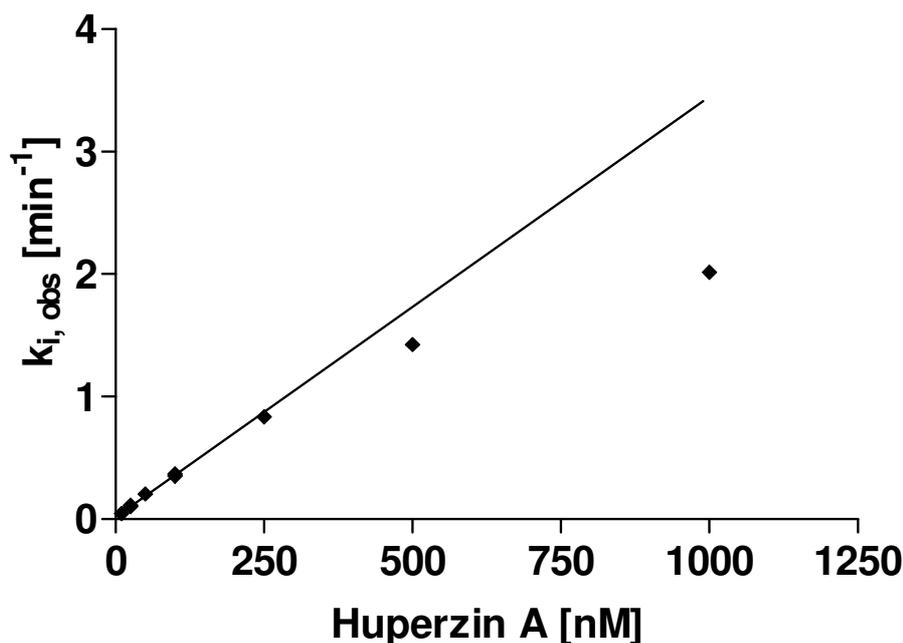
#### 4.3.4.2 Pyridostigmin

Der Enzymreaktor wurde mit Pyridostigmin mit Endkonzentrationen zwischen 250 nM und 5  $\mu\text{M}$  perfundiert (Korrekturen für Abweichungen der tatsächlichen Konzentration von der angegebenen: 5000 nM  $\rightarrow$  4850 nM; 2000 nM  $\rightarrow$  1940 nM; 1000 nM  $\rightarrow$  970 nM; 500 nM  $\rightarrow$  485 nM).

Die berechneten Werte  $k_{\text{obs}}$  wurden gegen die Konzentration aufgetragen. Für die an die Daten angepasste Hyperbelfunktion ( $r^2 = 0,980$ ) ergab sich  $k_2 = 0,431 \text{ min}^{-1}$  (0,262 – 0,601  $\text{min}^{-1}$ ) und  $K_{d, \text{obs}} = 5,876 \mu\text{M}$  (2,43 – 9,32  $\mu\text{M}$ ). Die Korrektur für das Substrat mit  $[S] = 5 \cdot K_m$  ergibt einen Wert für  $K_d = 0,979 \mu\text{M}$ . Daraus lässt sich  $k_2/K_d = 0,441 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  als Ausdruck der „inhibitorischen Effizienz“ berechnen.

### **4.3.5 Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Ery-AChE-Hemmung durch Huperzin A von der Konzentration des Hemmstoffes**

Abb. 4-14b zeigt die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{i, \text{obs}}$  aufgetragen gegen die Huperzin A-Konzentration.



**Abb. 4-14b:** Abhängigkeit der Hemmkonstanten  $k_{i, \text{obs}}$  von der Huperzin A-Konzentration (0,45 mM Substrat)

Die Acetylcholinesterase wurde mit Huperzin A mit Konzentrationen zwischen 10 nM und 1  $\mu\text{M}$  gehemmt. Die Werte von 10 nM bis 100 nM konnten mittels linearer Regression analysiert werden. Aus der Steigung der Geraden ergab sich  $k_{\text{on}}$  mit  $3,45 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Die Ergebnisse für  $k_{i, \text{obs}}$  der Versuche 250 nM bis 1  $\mu\text{M}$  weichen mit steigender Konzentration zunehmend von der berechneten Geraden ab. Aus  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}} (= k_{s, \text{obs}})$  lässt sich die Dissoziationskonstante  $K_i$  berechnen. Nach Berücksichtigung der Substratkonzentration (siehe auch 3.3) von 0,45 mM ASCh ( $= 5 \cdot K_m$ ) beträgt diese 7,2 nM.

## 4.4 Einfluß der Prophylaxe mit reversiblen Hemmstoffen auf die Restaktivität nach Paraoxon-Einwirkung und auf das Ausmaß der Spontanreaktivierung

### 4.4.1 Versuche ohne Prophylaxe

#### Grad der Hemmung

Der Grad der Hemmung (nach 1  $\mu\text{M}$  Paraoxon) wurde aus dem maximalen Wert der AChE-Aktivität ( $\text{AChE}_{\text{max}}$ ) und dem nach Hemmung erreichten Wert ( $\text{AChE}_{\text{min}}$ ) berechnet. (Zum direkten Vergleich der Restaktivität ohne Vorbehandlung mit den Versuchen mit Prophylaxe wurde zur Berechnung der Wert 33 min nach Paraoxonzugabe herangezogen.)

**Tab. 4-17:** Grad der Hemmung von Ery-AChE durch Paraoxon (1  $\mu$ M) bei einer ASCh-Konzentration von 0,45 mM

Versuch	AChE <sub>max</sub> [mE]	AChE <sub>min</sub> (63. min) [mE]	BW <sub>DAG</sub> (72. min) [mE]	Hemmung [%]
1	522,7	9,4	7,2	<b>99,57</b>
2	477,5	12,0	11,0	<b>99,79</b>
3	474,5	8,7	6,8	<b>99,59</b>
4	510,8	13,1	12,0	<b>99,78</b>
5	503,5	12,1	10,8	<b>99,74</b>
6	547,4	9,9	8,4	<b>99,72</b>
7	531,1	13,6	10,7	<b>99,44</b>
<b>Mittelwert (n=7)</b>				<b>99,66</b>
<b>SD</b>				<b>0,13</b>

Die Einwirkzeit von Paraoxon (1  $\mu$ M) betrug 30 min.

**Tab. 4-18:** Grad der Hemmung von Ery-AChE durch Paraoxon (1  $\mu$ M) bei einer ASCh-Konzentration von 0,09 mM

Versuch	AChE <sub>max</sub> [mE]	AChE <sub>min</sub> (60. min) [mE]	BW <sub>DAG</sub> (72. min) [mE]	Hemmung [%]
1	232,5	3,7	3,1	<b>99,74</b>
2	208,4	3,3	2,9	<b>99,81</b>
3	209,1	3,6	2,6	<b>99,52</b>
4	209,1	3,5	2,9	<b>99,71</b>
5	207,7	3,3	2,8	<b>99,76</b>
<b>Mittelwert (n=5)</b>				<b>99,71</b>
<b>SD</b>				<b>0,11</b>

Die Einwirkzeit von Paraoxon (1  $\mu$ M) betrug 30 min.

Da die Versuche, die in Tab. 4-17 und 4-18 zur Berechnung des Grades der Hemmung angegeben wurden, vor Klärung des Problems mit den erhöhten Reagenzienblindwerten durchgeführt (Methode B) wurden, wurden als Vergleich Versuche nach Stabilisierung des Blindwertes (nach Methode C) ausgewertet. Da mittlerweile eine sehr genaue und reproduzierbare Bestimmung des Blindwertes gelang (siehe 4.2.5), konnte eine geringe Zunahme des Blindwertes (durch Hydrolyse des Substrates) von durchschnittlich 1,6 mE (n=4), vom Zeitpunkt der

Aktivitätsminima nach Hemmung (63. bzw. 68. min) bis zum Zeitpunkt der Entfernung des Enzymreaktors (nach 180 min) bei aktuelleren Versuchen, berücksichtigt werden (Tab. 4-4).

**Tab. 4-19:** Grad der Hemmung der AChE nach Hemmung mit 1  $\mu$ M Paraoxon (nach Methode C) bei einer ASCh-Konzentration von 0,45 mM nach Berücksichtigung der Zunahme des Blindwertes vom Zeitpunkt der Aktivitätsminima nach Hemmung bis zum Zeitpunkt der Entfernung des Enzymreaktors

Versuch	AChE <sub>max.</sub> [mE]	BW <sub>DAG</sub> [mE]	(BW <sub>DAG</sub> -1,8 mE) [mE]	AChE <sub>min</sub> [mE]	(BW <sub>DAG</sub> -1,6 mE) [mE]	Hemmung [%]
8	512,7	5,6	3,8	5,4	4,0	<b>99,72</b>
9	518,4	5,5	3,7	5,3	3,9	<b>99,73</b>
10	541,8	5,4	3,6	5,2	3,8	<b>99,74</b>
11	518,3	8,1	6,3	7,6	6,5	<b>99,79</b>
12	500,3	5,2	3,4	6,2	3,6	<b>99,48</b>
13	528,0	7,1	5,3	6,7	5,5	<b>99,77</b>
<b>Mittelwert (n=6)</b>						<b>99,70</b>
<b>SD</b>						<b>0,11</b>

Die Einwirkzeit von Paraoxon (1  $\mu$ M) betrug 30 min.

Diese gegenüber früheren Versuchen deutlich geringeren Blindwertanstiege hatten aber keinen Einfluss auf die Berechnung des Hemmungsgrades der AChE durch Paraoxon (vgl. Tab. 4-17 und 4-19). Der Grad der Hemmung durch 1  $\mu$ M Paraoxon ohne Prophylaxe (AChE<sub>Px</sub>) lag bei  $99,7 \pm 0,1\%$  (n=13) bei einer Substratkonzentration von 0,45 mM. Bei einer Konzentration von 0,09 mM ASCh ergab sich das gleiche Ergebnis (Tab. 4-18; n=5).

#### 4.4.2 Versuche mit Prophylaxe

Mit Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon und Huperzin A ließ sich konzentrationsabhängig ein Fließgleichgewicht von Hemmung und Spontanreaktivierung einstellen. Wurde dann Paraoxon (1  $\mu$ M) dazu perfundiert, verblieb eine höhere Restaktivität als in Abwesenheit der reversiblen Hemmstoffe (vgl. Tab. 4-20 bis 4-23).

Das zeitliche Intervall der Prophylaxe wurde bei allen Hemmversuchen (Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon und Huperzin A) konstant bei 30 min gehalten, unabhängig von den jeweiligen Konzentrationen. Es wurde lediglich die Dauer des Pulses mit einer konzentrierten Lösung der reversiblen Hemmstoffe zur schnelleren Einstellung des Gleichgewichts variiert. Zur Berechnung der Restaktivität nach Hemmung mit Prophylaxe wurde das Minimum der Absorption, das nach 30 min gleichzeitiger Perfusion mit reversiblen Hemm-

stoff und Paraoxon erreicht wurde (das entspricht unter Berücksichtigung von ca. 3 min Verzögerung durch Totvolumina dem Wert 33 min nach Paraoxonzugabe), herangezogen.

Die Tabellen 4-20 bis 4-23 fassen die Auswertungen der Versuche bei gleichzeitiger Hemmung mit Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon bzw. Huperzin A und Paraoxon zusammen. Der Grad der Hemmung durch die reversiblen Hemmstoffe, der Grad der Hemmung nach gleichzeitiger Hemmung mit den reversiblen Hemmstoffen und Paraoxon bzw. die verbleibende Restaktivität, sowie die maximal wieder erreichbare AChE-Aktivität nach Spontanreaktivierung nach Absetzen der Hemmstoffe, wurden angegeben.

#### 4.4.2.1 Hemmung mit Physostigmin und Paraoxon

**Tab. 4-20:** Grad der Hemmung der AChE durch Physostigmin, und nach gleichzeitiger Hemmung durch Physostigmin und Paraoxon; Restaktivitäten nach Prophylaxe; Reaktivierbarkeit durch Spontanreaktivierung nach Absetzen von Paraoxon und Physostigmin (0,45 mM ASCh)

Versuch	Konz. Physostigmin [nM]	AChE <sub>gehemmt</sub> Physostigmin [%]	AChE <sub>gehemmt</sub> Physostigmin + Px [%]	AChE- Restaktivität [%]	AChE-Aktivität nach Spontanreakt. [%]
1	1000	<b>94,3</b>	96,9	<b>3,1</b>	42,3
2	1000	<b>94,7</b>	97,3	<b>2,7</b>	42,2
3	500	<b>89,0</b>	96,5	<b>3,5</b>	35,8
4	500	<b>90,3</b>	96,6	<b>3,4</b>	35,0
5	250	<b>79,7</b>	96,3	<b>3,7</b>	27,9
6	250	<b>80,0</b>	96,4	<b>3,6</b>	28,3
7	250	<b>80,2</b>	96,3	<b>3,7</b>	29,6
8	250	<b>80,4</b>	96,3	<b>3,7</b>	28,9
9	100	<b>62,2</b>	96,7	<b>3,3</b>	20,0
10	100	<b>62,4</b>	97,0	<b>3,0</b>	19,9
11	100	<b>62,4</b>	96,7	<b>3,3</b>	20,5
12	100	<b>63,5</b>	96,8	<b>3,2</b>	20,3
13	100	<b>64,3</b>	96,9	<b>3,1</b>	19,3
14	50	<b>50,2</b>	96,9	<b>3,1</b>	14,1
15	50	<b>49,6</b>	97,2	<b>2,8</b>	13,9
16	50	<b>49,9</b>	97,4	<b>2,6</b>	13,7
17	25	<b>30,3</b>	98,1	<b>1,9</b>	10,6
18	25	<b>31,4</b>	98,2	<b>1,8</b>	10,3
19	25	<b>30,8</b>	98,1	<b>1,9</b>	10,5
20	25	<b>31,5</b>	98,1	<b>1,9</b>	11,5
21	25	<b>31,9</b>	98,3	<b>1,7</b>	10,4
22	10	<b>20,0</b>	98,5	<b>1,5</b>	5,8
23	10	<b>17,2</b>	98,7	<b>1,3</b>	6,0

Die Einwirkzeit von Paraoxon (1 µM) betrug 30 min.

#### 4.4.2.2 Hemmung mit Pyridostigmin und Paraoxon

**Tab. 4-21:** Grad der Hemmung der AChE durch Pyridostigmin, und nach gleichzeitiger Hemmung durch Pyridostigmin und Paraoxon; Restaktivitäten nach Prophylaxe; Reaktivierbarkeit durch Spontanreaktivierung nach Absetzen von Paraoxon und Pyridostigmin (0,45 mM ASCh)

Versuch	Konz. Pyridostigmin [ $\mu$ M]	AChE <sub>gehemmt</sub> <b>Pyridostigmin</b> [%]	AChE <sub>gehemmt</sub> Pyridostigmin + Px [%]	<b>AChE- Restaktivität</b> [%]	AChE-Aktivität nach Spontanreakt. [%]
1	10	<b>92,4</b>	96,5	<b>3,5</b>	31,2
2	10	<b>92,9</b>	97,1	<b>2,9</b>	39,8
3	5	<b>85,9</b>	96,8	<b>3,2</b>	35,2
4	5	<b>86,9</b>	96,6	<b>3,4</b>	31,3
5	3,75	<b>83,9</b>	97,3	<b>2,7</b>	33,3
6	3,75	<b>83,2</b>	96,8	<b>3,2</b>	34,0
7	3,75	<b>83,5</b>	97,0	<b>3,0</b>	33,0
8	2,5	<b>76,6</b>	97,1	<b>2,9</b>	31,4
9	2,5	<b>77,3</b>	97,2	<b>2,8</b>	30,2
10	2,5	<b>78,1</b>	97,4	<b>2,6</b>	29,5
11	1,75	<b>70,4</b>	97,0	<b>3,0</b>	27,3
12	1,75	<b>71,7</b>	97,3	<b>2,7</b>	25,9
13	1	<b>55,8</b>	97,4	<b>2,6</b>	21,3
14	1	<b>56,7</b>	97,2	<b>2,8</b>	21,2
15	1	<b>57,1</b>	97,3	<b>2,7</b>	20,9
16	1	<b>61,0</b>	97,5	<b>2,5</b>	23,3
17	1	<b>59,2</b>	97,4	<b>2,6</b>	23,1
18	0,5	<b>46,0</b>	97,5	<b>2,2</b>	-
19	0,5	<b>40,2</b>	97,9	<b>2,1</b>	15,7
20	0,5	<b>39,7</b>	98,0	<b>2,0</b>	15,4
21	0,5	<b>41,9</b>	98,1	<b>1,9</b>	15,7
22	0,25	<b>28,0</b>	98,5	<b>1,5</b>	12,0
23	0,25	<b>28,2</b>	98,4	<b>1,6</b>	11,5
24	0,25	<b>28,0</b>	98,4	<b>1,6</b>	11,6
25	0,25	<b>27,0</b>	98,5	<b>1,5</b>	12,9
26	0,1	<b>21,4</b>	99,4	<b>0,6</b>	8,3
27	0,1	<b>21,2</b>	99,2	<b>0,8</b>	9,7

Die Einwirkzeit von Paraoxon (1  $\mu$ M) betrug 30 min.

#### 4.4.2.3 Hemmung mit Methyl-Paraoxon und Paraoxon

**Tab. 4-22:** Grad der Hemmung der AChE durch Methyl-Paraoxon, und nach gleichzeitiger Hemmung durch Methyl-Paraoxon und Paraoxon; Restaktivitäten nach Prophylaxe; Reaktivierbarkeit durch Spontanreaktivierung nach Absetzen von Paraoxon und Methyl-Paraoxon (0,45 mM ASCh)

Versuch	Konz. Methyl-Px [nM]	AChE <sub>gehemmt</sub> Methyl-Px [%]	AChE <sub>gehemmt</sub> Methyl-Px + Px [%]	AChE- Restaktivität [%]	AChE-Aktivität nach Spontanreakt. [%]
1	1000	<b>88,3</b>	98,2	<b>1,8</b>	21,0
2	1000	<b>90,6</b>	98,1	<b>1,9</b>	21,1
3	500	<b>84,9</b>	97,9	<b>2,1</b>	-
4	500	<b>82,4</b>	98,2	<b>1,8</b>	18,7
5	500	<b>82,4</b>	98,1	<b>1,9</b>	19,0
6	500	<b>82,1</b>	97,9	<b>2,1</b>	18,8
7	400	<b>75,4</b>	97,9	<b>2,1</b>	19,8
8	400	<b>78,9</b>	98,2	<b>1,8</b>	19,5
9	400	<b>78,2</b>	98,0	<b>2,0</b>	18,5
10	400	<b>78,7</b>	98,2	<b>1,8</b>	18,5
11	250	<b>64,7</b>	98,0	<b>2,0</b>	18,1
12	250	<b>67,7</b>	98,0	<b>2,0</b>	17,9
13	250	<b>68,8</b>	98,1	<b>1,9</b>	17,2
14	200	<b>58,8</b>	98,1	<b>1,9</b>	16,1
15	200	<b>59,9</b>	98,1	<b>1,9</b>	16,0
16	100	<b>41,6</b>	98,8	<b>1,2</b>	12,5
17	100	<b>41,5</b>	98,7	<b>1,3</b>	12,0
18	100	<b>45,7</b>	98,7	<b>1,3</b>	12,9
19	25	<b>23,5</b>	98,9	<b>1,1</b>	8,8
20	25	<b>24,2</b>	99,1	<b>0,9</b>	7,8
21	25	<b>20,2</b>	99,1	<b>0,9</b>	7,5

Die Einwirkzeit von Paraoxon (1  $\mu$ M) betrug 30 min.

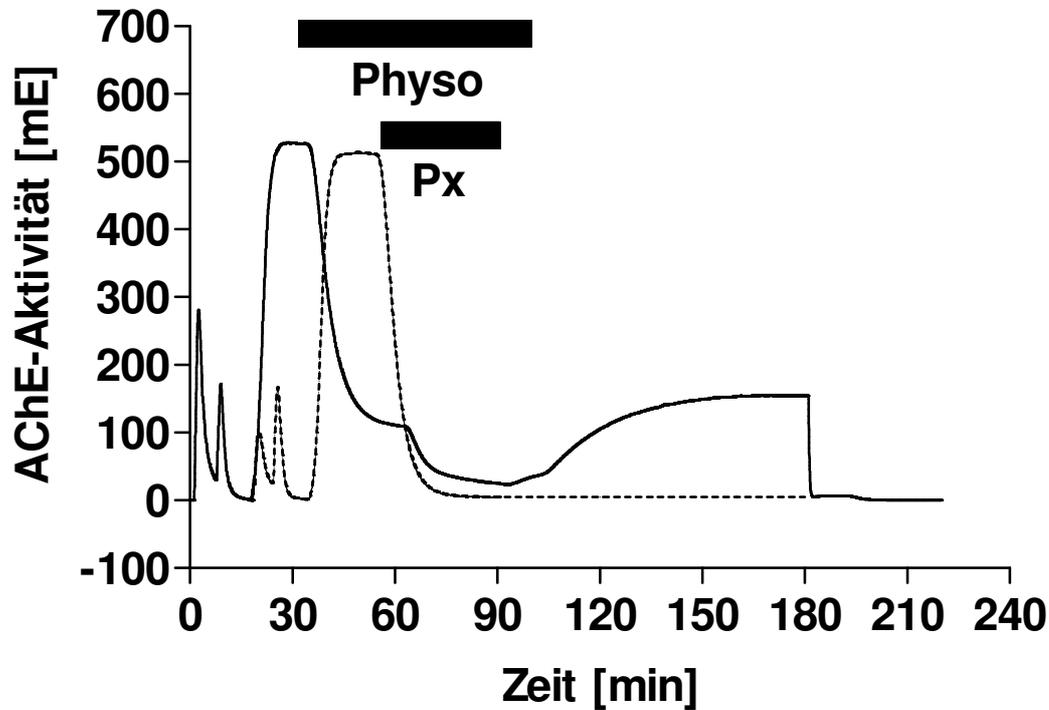
#### 4.4.2.4 Hemmung mit Huperzin A und Paraoxon

**Tab. 4-23:** Grad der Hemmung der AChE durch Huperzin A, und nach gleichzeitiger Hemmung durch Huperzin A und Paraoxon; Restaktivitäten nach Prophylaxe; Reaktivierbarkeit durch Spontanreaktivierung nach Absetzen von Paraoxon und Huperzin A (0,45 mM ASCh)

Versuch	Konz. Huperzin A [nM]	AChE <sub>gehemmt</sub> <b>Huperzin A</b> [%]	AChE <sub>gehemmt</sub> Huperzin A + Px [%]	<b>AChE- Restaktivität</b> [%]	AChE-Aktivität nach Spontanreakt. [%]
1	1000	<b>96,5</b>	97,9	<b>2,1</b>	50,8
2	500	<b>93,0</b>	96,9	<b>3,1</b>	37,2
3	500	<b>92,6</b>	96,4	<b>3,6</b>	37,7
4	500	<b>92,4</b>	96,3	<b>3,7</b>	38,7
5	500	<b>92,7</b>	96,4	<b>3,6</b>	39,2
6	250	<b>85,8</b>	95,7	<b>4,3</b>	25,5
7	250	<b>87,4</b>	96,3	<b>3,7</b>	23,7
8	250	<b>85,8</b>	95,8	<b>4,2</b>	25,5
9	100	<b>72,1</b>	96,5	<b>3,5</b>	11,4
10	100	<b>71,5</b>	96,4	<b>3,6</b>	10,7
11	50	<b>56,5</b>	97,5	<b>2,5</b>	5,5
12	50	<b>57,5</b>	97,3	<b>2,7</b>	5,4
13	25	<b>40,6</b>	98,4	<b>1,6</b>	3,8
14	25	<b>41,9</b>	98,3	<b>1,7</b>	3,7
15	10	<b>22,2</b>	99,2	<b>0,8</b>	2,6
16	10	<b>22,6</b>	99,3	<b>0,7</b>	2,5

Die Einwirkzeit von Paraoxon (1  $\mu$ M) betrug 30 min.

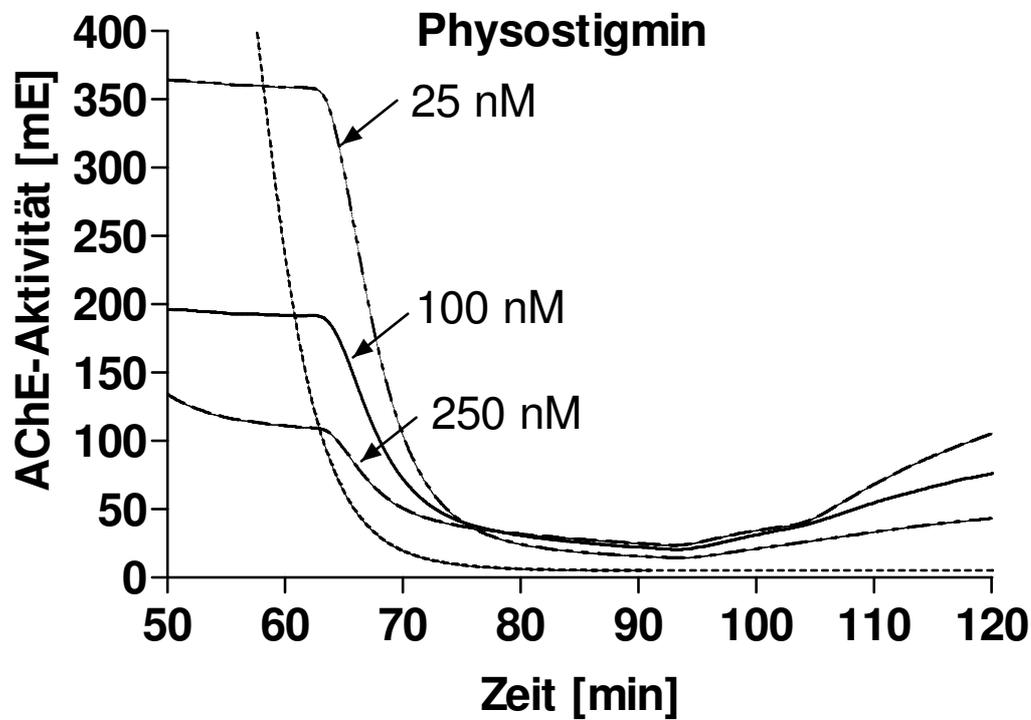
Abb. 4-15 zeigt als Beispiel den Verlauf der Ery-AChE-Aktivität nach gleichzeitiger Einwirkung von Carbamat (Physostigmin (250 nM)) und Paraoxon (1  $\mu$ M) nach vorheriger Carbamatprophylaxe im Vergleich zur Hemmung mit Paraoxon (1  $\mu$ M) allein.



**Abb. 4-15:** Zeitlicher Verlauf der Ery-AChE-Aktivität nach Hemmung mit Physostigmin (250 nM) und gleichzeitiger Hemmung mit Physostigmin und Paraoxon (1  $\mu$ M) mit anschließender Spontanreaktivierung (durchgezogene Linie) im Vergleich zur Hemmung mit Paraoxon (1  $\mu$ M) allein (gestrichelte Linie).

Nach Einbringen des Enzymreaktors wurde 5 min mit G-PP zur Stabilisierung der Basislinie und 5 min mit Wasser zur vollständigen Hämolyse perfundiert, bevor die Maximalaktivität mit Substrat (0,45 mM) und Chromogen erfasst wurde. Nach einer Äquilibrierphase von der 15. bis zur 30. min wurde 30 min mit Physostigmin (250 nM) gehemmt, anschließend 30 min lang mit Physostigmin und Paraoxon gleichzeitig. Nach der gleichzeitigen Perfusion wurde zunächst Paraoxon abgesetzt und noch weitere 10 min mit Physostigmin perfundiert. Ab der 100. min wurde auch Physostigmin abgesetzt und bis zum erneuten Erreichen der maximalen AChE-Aktivität nach Spontanreaktivierung mit DTNB und ASCh perfundiert. Nach 180 min wurden der Enzymreaktor entfernt und die Reagenzienblindwerte  $BW_{DAG}$  (DTNB, ASCh, G-PP) und  $BW_{G-PP}$  bestimmt.

In Abb. 4-16 wurde Abb. 4-15 vergrößert dargestellt und die Daten zweier weiterer Prophylaxe-Versuche (mit 25 und 100 nM Physostigmin) eingefügt.

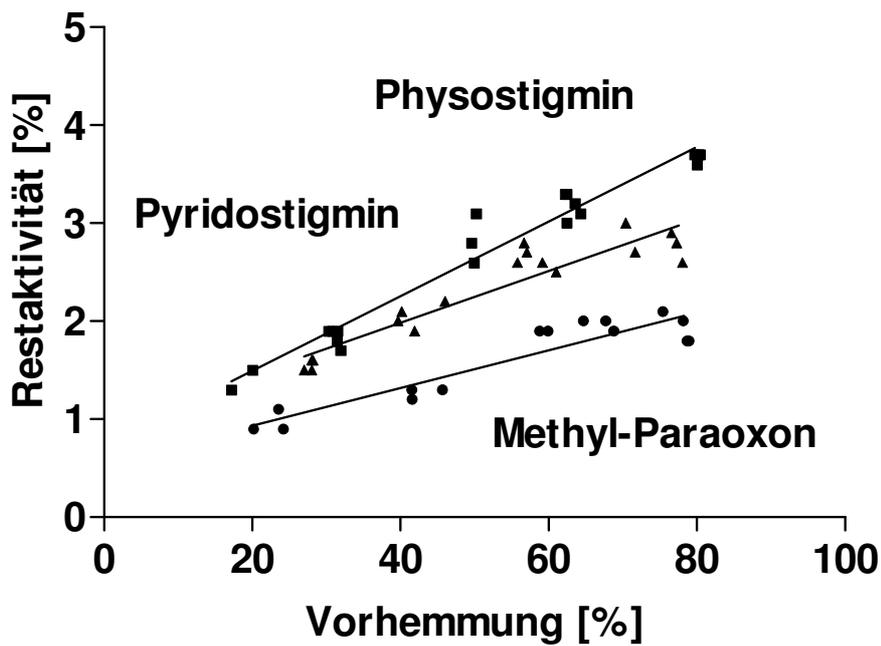


**Abb. 4-16:** Zeitlicher Verlauf der Ery-AChE-Aktivität nach Hemmung mit Physostigmin (25, 100 und 250 nM wie dargestellt) und gleichzeitiger Hemmung mit Physostigmin und Paraoxon (1  $\mu$ M) mit anschließender Spontanreaktivierung im Vergleich zur Hemmung mit Paraoxon (1  $\mu$ M) allein (gestrichelte Linie).

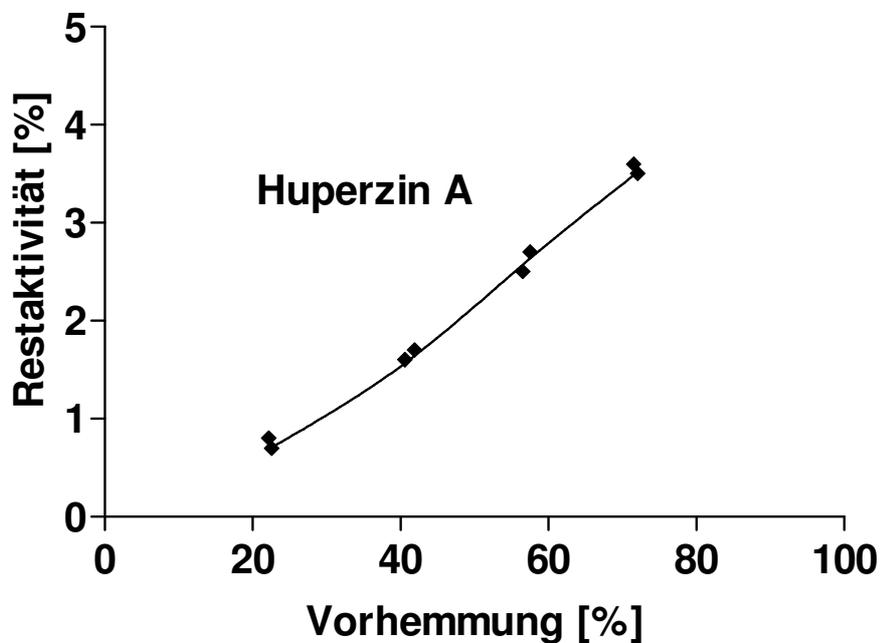
Man kann deutlich erkennen, dass die verbleibende Restaktivität in Abhängigkeit vom Grad der Vorhemmung zunimmt.

Abb. 4-17 und Abb. 4-18 (vgl. Tab 4-20 bis 4-23) zeigen die Restaktivitäten nach gleichzeitiger Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen und Paraoxon in Abhängigkeit vom Grad der Vorhemmung durch die Prophylaxe mit den reversiblen Hemmstoffen.

Physostigmin und Pyridostigmin zeigen in etwa die gleiche Schutzwirkung, Methyl-Paraoxon scheint weniger geeignet. Bei Huperzin A verläuft die Kurve im Bereich zwischen 40 und 75% Vorhemmung deutlich steiler, als bei den anderen reversiblen Hemmstoffen. Auffällig ist hier jedoch, dass im Bereich von 20-25% Vorhemmung nur noch eine sehr geringe Schutzwirkung erkennbar ist.



**Abb. 4-17:** Abhängigkeit der Restaktivität nach gleichzeitiger Perfusion mit reversiblen Hemmstoffen (■—■ Physostigmin, ▲—▲ Pyridostigmin, ●—● Methyl-Paraoxon) und Paraoxon vom Grad der Vorhemmung durch die Prophylaxe



**Abb. 4-18:** Abhängigkeit der Restaktivität nach gleichzeitiger Perfusion mit Huperzin A (◆—◆) und Paraoxon vom Grad der Vorhemmung durch die Prophylaxe

## 5 DISKUSSION

Die Entwicklung eines dynamischen Modells wurde erleichtert durch kommerzielle HPLC-Pumpen mit quaternären Niederdruck-Gradientenformern, die auch bei sehr geringen Flüssen eine hohe Flusskonstanz ermöglichen. Solche Pumpen lassen sich heutzutage per Computer ansteuern und erlauben die Modellierung beliebiger Elutionsprofile. Die Anforderungen an eine HPLC-Elution werden durch ternäre und quaternäre Komponenten-Mischungen in der Regel befriedigt, so dass die Ansteuerung nur eines Systems ausreicht. So war es nicht verwunderlich, dass eine simultane Steuerung von zwei HPLC-Anlagen üblicherweise nicht vorgesehen ist und bei der neuesten Programmversion kommerziell nicht erhältlich war.

Glücklicherweise war das inzwischen überholte System der Fa. Merck-Hitachi noch in der Lage, zwei Anlagen simultan anzusteuern und ließ damit die Wahl auf ein HPLC-basiertes Perfusionssystem fallen.

### 5.1 Technische Aspekte

#### 5.1.1 Geräteperformance

Die Funktionsprüfung und Ermittlung der Leistungsdaten erstreckte sich auf die photometrische Stabilität sowie Linearität, die Flussgenauigkeit und die Förderkonstanz der Pumpen, die Mischpräzision der Anlage, die wechselseitige Kontamination der Kanäle und die Hysterese der Gleichgewichtseinstellung. Diese Prüfung lieferte durchwegs befriedigende Ergebnisse.

Während die Zumischgenauigkeit beim Durchwechseln der Kanalsequenzen einwandfrei war, traten kurzfristige Kanal-abhängige (Kanäle A) Störungen im Mischungsverhältnis auf, was auf einen Fehler in der elektronischen Ansteuerung der Kanäle A zurückgeführt wurde. Die im Farbttest festgestellte Übersteuerung der Kanäle A führte zu einer Umbelegung der Kanäle in den Versuchen mit Enzymreaktor. Die Kanäle A wurden mit Gelatine-Puffer belegt, der an beiden Pumpen dazu diente, das geförderte Gesamtvolumen auf 100% zu ergänzen. Kleine Abweichungen beim Fördern des Mediums sollten keinen Einfluss auf die durchzuführenden Experimente haben.

Wegen der Vielzahl von Toträumen im System wurde mit einer erheblichen Hysterese bis zur vollständigen Gleichgewichtseinstellung gerechnet. Für die vorgesehenen Untersuchungen wurde eine Erzielung von > 99% des Endwertes als ausreichend für die Beschreibung des Gleichgewichts erachtet. Sie wurde nach Zuschalten des Farbstoffs nach ca. 18 min, nach Abschalten des Farbstoffs ca. nach 15 min erreicht. Warum die Gleichgewichtseinstellung nach Zuschalten des Farbstoffs ca. 3 min länger dauerte als beim Abschalten des Farbstoffs, konnte nicht befriedigend geklärt werden. Die Art der in den ruhenden Kanälen anstehenden Lösung

(Puffer oder Farbstoff) hatte keinen Einfluss auf die Gleichgewichtseinstellung. Damit war klar, dass präzise Endwerte nur bei entsprechend langsamen Reaktionen erfasst werden konnten. Gleiches gilt auch, wenn die Konzentrationen der Reaktionspartner rasch verändert werden sollen. Hier weist das System gewisse Schwächen auf.

### **5.1.2 Enzymreaktor**

Die geplanten Untersuchungen sollten vorzugsweise an strukturgebundener menschlicher Acetylcholinesterase (AChE) durchgeführt werden. Hierfür boten sich menschliche Erythrozyten an, deren AChE in ihrem katalytischen Eiweißteil identisch mit der synaptischen AChE ist. Es war geplant, Erythrozyten – wenn möglich – auf ein Membranfilter zu fixieren und mit dem Reagenziencocktail zu perfundieren. Tatsächlich wurde die Enzymaktivität auf Celluloseacetat-Filtern weitgehend retiniert, wobei das Filter Millex®-GS, 0,22 µm, im Vergleich zum Sartoriusfilter Minisart®, 0,2 µm, besseres Retentionsverhalten aufwies. Dabei wurde die interessante Feststellung gemacht, dass der bei Minisart® durchbrechende Aktivitätsanteil von Millex®-GS retiniert wurde. Entweder wurde ein Teil löslicher AChE nur auf Millex®-GS nicht aber auf Minisart®-Filtern retiniert oder es handelte sich um sehr kleine Membranfetzen, die an den Filtermaterialien unterschiedlich gebunden wurden. Wichtig war, dass die Enzymaktivität auch unabhängig vom Hämolyseverhalten der Erythrozyten im Enzymreaktor über den geplanten Beobachtungszeitraum von einigen Stunden stabil blieb.

Um ein möglichst rasches Ansprechen des Enzymreaktors auf Änderungen des Perfusionsmediums zu erreichen, waren eine gleichmäßige Verteilung der Erythrozyten und Durchströmung mit Verhinderung von „Nestern“ unabdingbar. Dies ließ sich durch Verwendung intakter Erythrozyten anhand der gleichmäßigen Einfärbung unmittelbar verfolgen. Die Beladung per Hand mittels Spritze erwies sich dabei als ungünstig. Die besten Ergebnisse wurden beim Aufpumpen einer verdünnten Suspension mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe erzielt. Um Lufteinschlüsse zu vermeiden, wurde das Filter zunächst gegenläufig mit Puffer durchspült, bevor das männliche Luer-Anschlußstück aufgesetzt wurde. Auf diese Weise konnten Enzymreaktoren in weitgehend gleichbleibender Qualität hergestellt werden (Ausschuss < 5%). Als Detektionswellenlänge erwies sich 470 nm als besonders günstig, da hier Oxyhämoglobin und Methämoglobin ähnlich stark absorbieren (Imai 1982) und die vergleichsweise geringe Absorption der Hämoproteine ein gutes Signal-/Rauschverhältnis ermöglicht.

Um störende Hämolyse während des Versuchs zu verhindern, wurden die Erythrozyten auf dem Filter mit einem Wasserpuls lysiert, bevor Substrat und Chromogen zugepumpt wurden.

Die Enzymaktivität der Erythrozytenmembranen konnte durch Zusatz eines Schutzkolloids weitgehend erhalten werden. Hierzu wurde die billige Gelatine in 0,2%iger Lösung dem Per-

fusionspuffer zugesetzt. Dieses Kolloid zeigte wegen fehlender Cysteinreste keine Farb-reaktion. Das Konzept eines Enzymreaktors (Millex®-GS, 0,22 µm Porengröße) mit humanen Erythrozyten ließ sich realisieren und erlaubte reproduzierbares Arbeiten mit der Enzymquelle über 3-4 Stunden. In Gegenwart von 0,3 mM DTNB und 0,45 mM Acetylthiocholin in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, mit 0,2% Gelatine wurde durch Erythrozyten-AChE mit einem Hämoglobingehalt von ca. 3 mg bei einem Gesamtfluss von 0,5 mL/min bei 470 nm eine konstante Extinktion von ca. 0,5 E erhalten. Die Tag-zu-Tag-Variation lag bei einem VK von 3,3%, die Aktivität nahm über einen Zeitraum von 4 Stunden um etwa 3,4% ab (VK 1%). Unklar ist hier, ob dieser Abfall auf ein „Ausbluten“ des Enzyms vom Filter oder auf eine Inaktivierung zurückzuführen ist. Die Aktivität im Eluat war nicht mehr messbar, was auf Grund der Verdünnung (Fluss 0,5 mL/min) nicht verwunderlich ist. Aktivitätsschwankungen der Maximalaktivität im Enzymreaktor könnten durch inhomogene Mischung alter, mittelalter und junger Erythrozyten hervorgerufen werden (Prall et al. 1998).

Die verwendeten, gewaschenen Erythrozyten (Gelatine-frei) wurden in Eis-Wasser-Mischungen im Kühlraum aufbewahrt ohne in ihrer Aktivität innerhalb mehrerer Wochen nennenswert abzunehmen, obwohl der Hämolysegrad zunahm. (In den ersten 10 Tagen konnte der größte Aktivitätsverlust beobachtet werden, danach stabilisierte sich die Enzymquelle und die Abnahme der Aktivität pro Zeiteinheit verringerte sich.) So konnte lange Zeit (ca. 3 Monate) auf dieselbe Erythrozyten-Charge zurückgegriffen werden.

### **5.1.3 Reagenzienblindwert**

Der Reagenzienblindwert, der sich aus der Eigenfarbe des Chromogens, dem im Acetylthiocholin-Präparat vorliegenden freien Thiol und der Spontanhydrolyse des Substrats zusammensetzt, lag nach 180 min Perfusion bei etwa 6 mE und damit bei ca. 1% des maximalen Signals. Der Anteil, der auf Spontanhydrolyse zurückzuführen ist, war dabei mit ca. 2 mE marginal, was durch die Eiskühlung der Substratlösung erzielt wurde.

Die Blindwerte, nach Entfernung des mit Erythrozyten beladenen Enzymreaktors (im Austausch gegen ein unbeladenes Filter) bei Perfusion mit Chromogen und Substrat bzw. Spülen mit Gelatine-Puffer, lagen ebenfalls bei ca. 6 mE ( $BW_{DAG}$ ) bzw. 0,3 mE ( $BW_{G-PP}$ ).

Es musste darauf geachtet werden, dass der Substratkanal nur mit Wasser und nicht wie die restlichen Kanäle mit Puffer gespült wurde, um eine Abnahme der Stabilität des Acetylthiocholins durch Erhöhung des pH-Wertes zu verhindern. Ein weiterer, zunächst unerwarteter Störeffekt war auf ein „Fowling“ der gepufferten Gelatine-Lösung im flüssigkeitsführenden System zurückzuführen. Die kumulative Ablagerung von Gelatine im System (Kapillaren, Filter, Durchflusszelle) führte im Laufe der Zeit zu ansteigenden Drücken im System

(„normal“: 4-6 bar), in einigen Fällen (< 5%) kam es sogar zum Platzen des Enzymreaktors (bei Druck > 20 bar). Dieses Problem konnte durch regelmäßige Reinigung (1mal/Woche) mit einem Detergens und Aq. bidest. behoben werden. Zusätzlich erfolgte nach jedem Arbeitstag eine Spülung der gesamten Anlage mit Aq. bidest mit anschließender „Übernachtung“ in 70%igem Isopropanol. Mit dem „stabilisierten“ System konnten somit reproduzierbar Blindwerte gemessen werden und auch geringe Anstiege des Reagenzienblindwertes während des Versuchsverlaufs bei den Untersuchungen mit Hemmstoffen bei der Auswertung berücksichtigt werden.

## 5.2 Enzymkinetische Aspekte

Im Gegensatz zu den konventionellen statischen Systemen zur Aktivitätsbestimmung kann im dynamischen System unter konstanten Substrat-Konzentrationen gearbeitet werden, ohne dass sich Produkte anhäufen. Zur unmittelbaren Aktivitätsmessung muss allerdings permanent Substrat anwesend sein, das die Kinetik der Enzymhemmung beeinflusst (Aldridge und Reiner 1972). So muss davon ausgegangen werden, dass nur freie AChE phosphoryliert oder carbamoyliert werden kann, jedoch nicht die acetylierte Form, die beim Substratumsatz intermediär vorliegt. Daneben dürfte auch das lose assoziierte Substrat den Zutritt von Inhibitor zur AChE behindern. Insofern überraschte die langsamere Enzymhemmung durch 1  $\mu\text{M}$  Paraoxon im dynamischen System nicht (Substratkonzentration 0,45 mM). Die Hemmkonstante pseudo-erster Ordnung  $k_{i, \text{obs}}$  lag mit  $0,279 \text{ min}^{-1}$  deutlich unter den  $2,2 \text{ min}^{-1}$ , die im statischen System ermittelt wurden (Worek et al. 1997). Die Hemmkonstante konnte mit guter Reproduzierbarkeit bestimmt werden,  $0,279 \pm 0,018 \text{ min}^{-1}$  ( $n=13$ ; CV 6,5%). Bei geringerer Substratkonzentration (0,09 mM ASCh) wurde  $k_{i, \text{obs}}$  mit  $0,459 \text{ min}^{-1}$  bestimmt.

Der Grad der Hemmung durch 1  $\mu\text{M}$  Paraoxon, der sich im Gleichgewicht einstellte (nach ca. 30 min) lag mit 99,7% im erwarteten Bereich. Legt man die Spontanreaktivierung mit einer Halbwertszeit von 31 h zugrunde (Worek et al. 1997) wäre rechnerisch eine Hemmung von 99,87% zu erwarten gewesen.

Die Reaktivierung durch ein Oxim sollte durch anwesendes Substrat nicht beeinflusst werden. Tatsächlich ergab sich eine Reaktivierungshalbwertszeit Paraoxon-gehemmter (1  $\mu\text{M}$ ) AChE durch 10  $\mu\text{M}$  Obidoxim von  $4,03 \pm 0,19 \text{ min}$  ( $n=8$ ), ein Wert, der in etwa auch im statischen System beobachtet wurde (Worek et al. 1997). Nach Hemmung mit 0,2  $\mu\text{M}$  Paraoxon betrug die Reaktivierungshalbwertszeit nur etwa 3,4 min.

Es hat den Anschein, dass eine verzögerte Ausspülung von Paraoxon durch Adsorption an das Filtermaterial stattfindet. Die dadurch mögliche Reinhinderung könnte einen geringen Einfluss auf die Reaktivierungsgeschwindigkeit ausüben, der mit abnehmender Giftkonzentration

kleiner wird. Bei Versuchen mit 0,2  $\mu\text{M}$  Paraoxon wurde nach Absetzen des Giftes 10 min nachgespült, bevor mit Obidoxim perfundiert wurde, um diesen Einfluss zu minimieren.

Das Paraoxon-gehemmte Enzym konnte auf 91% (nach Hemmung mit 1 bzw. 0,2  $\mu\text{M}$  Paraoxon) seiner Maximalaktivität reaktiviert werden. Dieser Wert ist befriedigend, berücksichtigt man den Aktivitätsverlust von 3,4% bei den Kontrollen.

### **5.2.1 Hemmung humaner Acetylcholinesterase mit reversiblen Hemmstoffen und anschließender Spontanreaktivierung**

Die Spontanreaktivierung des mit Physostigmin gehemmten Enzyms erfolgte mit einer Halbwertszeit von ca. 17 min und erreichte ca. 95% der Maximalaktivität. Wetherell und French fanden im statischen System eine Reaktivierungshalbwertszeit von 14,8 min (Bereich 10,0-17,9 min; pH 7,4, 37 °C) (Wetherell und French 1991), eine Halbwertszeit von 16 min (0,1 M Phosphatpuffer; pH 7,4; 37 °C) wird bei Irmhoff-Britt angegeben (Irmhoff-Britt 1993).

Im dynamischen Modell nahm die Geschwindigkeit der Spontanreaktivierung mit steigender Physostigmin-Konzentration (1-5  $\mu\text{M}$ ) scheinbar ab, die Halbwertszeiten lagen dort bei etwa 18-22 min.

Ein Einfluß von Obidoxim (10  $\mu\text{M}$ ) auf die Spontanreaktivierung konnte nicht festgestellt werden. Auch Dawson fand 1994, dass die Decarbamoylierung Physostigmin-gehemmter membrangebundener Rindererythrozyten-AChE durch Toxogonin® (Obidoxim) nicht beeinflusst wurde (Dawson 1994).

Pyridostigmin-gehemmtes Enzym reaktivierte im dynamischen Modell mit einer Halbwertszeit von etwa 27 min spontan, es wurden ca. 91% der Ausgangsaktivität erreicht. Ellin und Kaminskis fanden im statischen System eine vergleichbare Reaktivierungshalbwertszeit von 30,9 min (0,067 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 37 °C) (Ellin und Kaminskis 1989) und Irmhoff-Britt bestimmte eine Halbwertszeit der Spontandecarbamoylierung von ca. 28 min (0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 37 °C) (Irmhoff-Britt 1993). Eine Abnahme der Reaktivierungsgeschwindigkeit mit steigender Pyridostigmin-Konzentration wurde nicht festgestellt.

Verglichen mit unzähligen Literaturstellen über die Berechnung bimolekularer Geschwindigkeitskonstanten der Hemmung von Acetylcholinesterase durch Carbamate, sind nur wenige Berichte über die Untersuchung von  $K_d$  und  $k_2$  bekannt. Forsberg und Puu (1984) lieferten Daten zur Hemmung von Zitteraal-AChE bei pH 6,9 und 22 °C und verwendeten p-Nitrophenylacetat als Substrat. Folgende Werte wurden für Physostigmin bestimmt:  $k_2 = 19,2 \text{ min}^{-1}$ ;  $K_d = 17 \text{ } \mu\text{M}$  mit  $k_2/K_d = 1,13 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  (Forsberg und Puu 1984). Gray und

Dawson (1987) arbeiteten mit Acetylthiocholin (2 mM) und DTNB (0,1 mM) in 0,067 M Phosphatpuffer bei pH 7,0 und 25 °C und fanden für Zitteraal-AChE:  $k_2 = 35,4 \text{ min}^{-1}$ ;  $K_d = 7 \text{ }\mu\text{M}$  mit  $k_2/K_d = 5,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ , für AChE aus dem Kaninchenhirn wurden  $k_2 = 11,4 \text{ min}^{-1}$ ;  $K_d = 2,7 \text{ }\mu\text{M}$  mit  $k_2/K_d = 4,22 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  angegeben (Gray und Dawson 1987).

Im dynamischen Modell konnten folgende Werte für die Hemmung mit Carbamaten ermittelt werden:

**Tab. 5-1:** Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$ ,  $K_d$  und  $k_2/K_d$  der carbamoylierten AChE

Carbamat	Substrat [mM]	$k_2$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$K_d$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_2/K_d$ [ $\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ ]
Physostigmin	ASCh; 0,45	2,08	0,350	$5,94 \cdot 10^6$
	ASCh; 0,09	2,06	0,398	$5,17 \cdot 10^6$
Pyridostigmin	ASCh; 0,45	0,431	0,979	$0,44 \cdot 10^6$

\* $k_2/K_d$  ist Ausdruck der „inhibitorischen Effizienz“

Die durch Huperzin A gehemmte AChE reaktivierte mit einer Halbwertszeit von etwa 4,6 min ( $k_{\text{off}} = 0,15 \text{ min}^{-1}$ ).

Für die Dissoziationskonstante  $K_i = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  ergab sich unter Berücksichtigung der Substratkonzentration ein Wert von etwa 7 nM (gilt nur für Hemmversuche mit Konzentrationen zwischen 10 nM und 100 nM). McKinney et al. bestimmten einen  $K_i$ -Wert von 8 nM für die Hemmung von AChE aus der Rattengroßhirnrinde (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,2% Triton X-100; 37 °C) durch (-)-Huperzin A und  $K_i = 14 \text{ nM}$  für das Racemat ( $\pm$ )-Huperzin A (McKinney et al. 1991). Ashani et al. bestimmten in Untersuchungen mit humaner AChE  $K_i = 40,5 \pm 0,9 \text{ nM}$  (50 mM Phosphatpuffer, pH 8,0,  $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), der Wert gilt allerdings für racemisches Huperzin A (Ashani et al. 1992).

Bei der Auswertung der Versuche mit hohen Konzentrationen (250 nM – 1  $\mu\text{M}$ ) an Huperzin A fiel auf, dass die Zunahme der beobachteten Hemmgeschwindigkeit ( $k_{i, \text{obs}}$ ) nicht mehr in linearer Abhängigkeit zur Konzentration stand. Es fiel auf, dass die Abweichung von der Geraden, die im Bereich zwischen 10 nM und 100 nM angepasst werden konnte, durch die mit zunehmender Konzentration scheinbar kleiner werdende Konstante der Spontanreaktivierung hervorgerufen wurde. Wurde die Berechnung der Hemmkonstanten  $k_{i, \text{obs}}$  nach Aldridge (siehe 3.4.2) für die Versuche mit 250 nM bis 1  $\mu\text{M}$  erneut durchgeführt, wobei für  $k_{s, \text{obs}}$  der Mittelwert, der sich aus den Werten der Spontanreaktivierung der Versuche 10 nM bis 100 nM errechnete ( $k_{s, \text{obs}} = 0,149 \text{ min}^{-1}$ ) eingesetzt wurde, konnte keine Abweichung mehr

festgestellt werden. Unter der Annahme dass die Geschwindigkeit der Spontanreaktivierung konstant bleibt, wäre somit die lineare Abhängigkeit auch bei hoher Konzentration gegeben.

Es stellt sich deshalb die Frage, wie es zur Abnahme der Reaktivierungsgeschwindigkeit mit zunehmender Konzentration an Hemmstoff kommen kann. Auch bei der Spontanreaktivierung Physostigmin-gehemmter AChE konnte diese Beobachtung schon gemacht werden.

Es könnte sein, dass apparativ bedingt die Ausspülung des Hemmstoffes zum Zeitpunkt der Berechnung (Beginn des Intervalls, z. B. 10 min nach Absetzen des Hemmstoffes) noch nicht abgeschlossen ist und die verweilende restliche Menge an Hemmstoff ausreicht, um einen Effekt zu erzielen ohne dass Adsorption an das Filtermaterial stattfindet. Dieser Effekt sollte bei abnehmenden Konzentrationen eine immer kleinere Rolle spielen, da zum gleichen Zeitpunkt im Versuchsablauf geringere absolute Giftmengen vorliegen.

Eine Adsorption von Hemmstoffen an die verwendete Filtermembran scheint im dynamischen Modell auch eine gewisse Rolle spielen zu können (vgl. Adsorption von Paraoxon). Es wäre möglich, dass dieser Effekt, ebenso wie eine verzögerte Ausspülung der Hemmstoffe bei der Reaktivierung mit höheren Geschwindigkeiten (Reaktivierung mit Obidoxim; Spontanreaktivierung nach Absetzen von Huperzin A) eine größere Rolle spielt, als bei langsameren Reaktionen (Spontanreaktivierung nach Hemmung mit Physostigmin, Pyridostigmin).

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass Wechselwirkungen der Hemmstoffe mit einer peripheren Bindungsstelle Einflüsse auf deren Reaktionen mit dem Enzym ausüben. Folgende Beobachtung wurde von Gray und Dawson beschrieben (Gray und Dawson 1987): Es sind einige allosterische Effektoren bekannt, die durch Bindung an eine vom aktiven Zentrum entfernte periphere Bindungsstelle die katalytische Aktivität der AChE beeinflussen (Tomlinson et al. 1980). Folgende Eigenschaften der AChE sind von einer Besetzung einer allosterischen Bindungsstelle betroffen: die Geschwindigkeitskonstanten der Carbamoylierung und Decarbamoylierung, die Alterung Organophosphat-gehemmter AChE sowie die Substrathydrolyse (Dawson et al. 1981). Es sind, besonders bei physiologischer Ionenstärke, relativ hohe Konzentrationen an allosterischem Effektor notwendig, um in vitro nachweisbare Wirkungen auszulösen. Dadurch könnten also sowohl Hemmung als auch Spontanreaktivierung verlangsamt werden, bei hohen Konzentrationen fiel dieser Einfluss mehr ins Gewicht als bei niedrigen Konzentrationen.

Letztlich sind diese verschiedenen Denkmodelle experimentell noch nicht untermauert. Dem Phänomen sollte weitere Beachtung geschenkt werden.

### **5.2.2 Hemmung mit Paraoxon nach Prophylaxe mit reversiblen Hemmstoffen**

Bei der Hemmung der AChE mit den reversiblen Hemmstoffen Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon und Huperzin A ließ sich konzentrationsabhängig ein Gleichgewicht von Hemmung und Spontanreaktivierung (zwischen 20 und 95% Hemmung) einstellen. Im dynamischen System lag der Grad der Hemmung beispielsweise mit 100 nM Physostigmin bei ca.  $63,0 \pm 0,9\%$  (n=5). Wetherell und French bestimmten im statischen System für die Hemmung mit 100 nM Physostigmin Werte von  $65,9 \pm 0,9\%$  (n=11; 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 37 °C) (Wetherell und French 1991).

Wurde nach Vorhemmung mit den reversiblen Hemmstoffen Paraoxon (1 µM) dazu perfundiert, verblieb bei gleichzeitiger Anwesenheit von reversiblen Hemmstoff und Paraoxon eine höhere Restaktivität als in Abwesenheit der reversiblen Hemmstoffe. Die AChE-Aktivität erreichte nach Spontanreaktivierung je nach Grad der Vorhemmung zwischen 3 und 51% der Ausgangsaktivität.

Die verbleibende Restaktivität stieg mit zunehmendem Grad der Vorhemmung an. Es zeigte sich jedoch, dass für alle Substanzen bei einer Vorhemmung im Bereich von etwa 80-85% ein Maximum an verbleibender Restaktivität erreicht wurde. Bei höhergradiger Vorhemmung ergab sich keine weitere Erhöhung der Restaktivität. Das Maximum lag bei Physostigmin und Huperzin A mit etwa 3,5% am höchsten. Nach Vorhemmung der Acetylcholinesterase um ca. 20-30% zeigten Physostigmin und Pyridostigmin im dynamischen Modell eine ähnliche Schutzwirkung, mit Restaktivitäten zwischen 1 und 2%. Erst im Bereich von ca. 50-70% Vorhemmung schien Physostigmin etwas besser als Pyridostigmin zu wirken. Methyl-Paraoxon dagegen eignete sich weniger zur Prophylaxe. Bei dem reversibel hemmenden Organophosphat könnte dabei die Alterung ( $t_{1/2}$ = ca. 4 h) (Worek et al. 1999b) des gehemmten Enzyms eine zusätzliche Rolle spielen.

Es drängte sich die Frage auf ob es möglich sei, dass die Wirksamkeit mit der Geschwindigkeit der Spontanreaktivierung korreliert? Die Geschwindigkeiten der Spontanreaktivierung nahmen im dynamischen System in der Reihenfolge Physostigmin > Pyridostigmin > Methyl-Paraoxon ab. Es wäre möglich, dass bei schneller Spontanreaktivierung zum gleichen Zeitpunkt im Versuchsablauf schon mehr zuvor carbamoyliertes (geschütztes) Enzym wieder in der aktiven Form vorliegt als bei langsamer Reaktivierung und so die Menge an aktivem Enzym im Gleichgewicht höher ist. Dem widerspricht allerdings die Tatsache, dass das zuvor geschützte Enzym bei schneller Decarbamoylierung schneller der Gefahr der erneuten Reaktivierung durch weiterhin anwesendes Organophosphat ausgesetzt wird. Weiterhin können die Versuche mit Huperzin A (Reaktivierungshalbwertszeit 4,6 min) diesen gedanklichen Ansatz

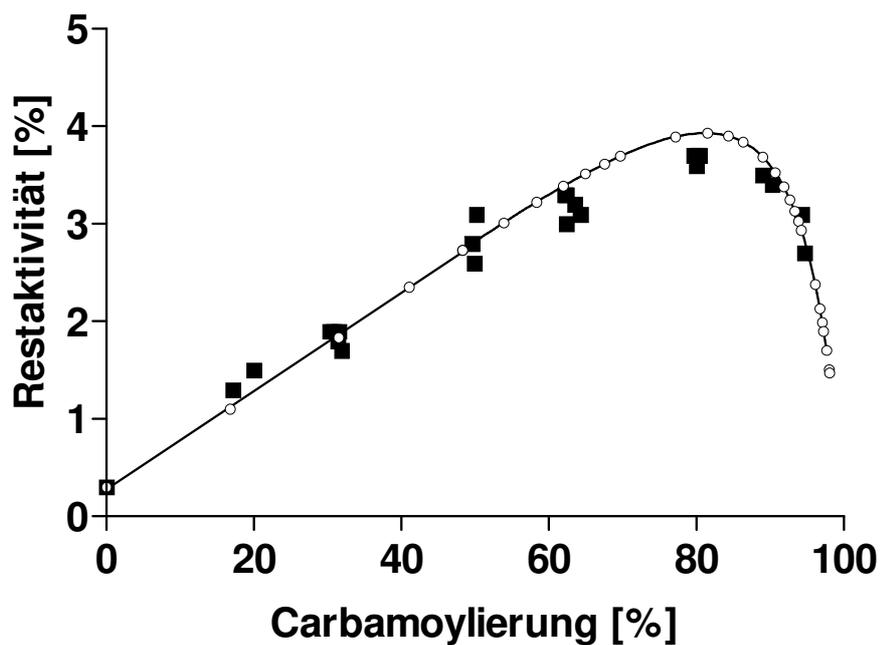
nicht bestätigen, da man hier eine noch höhere Wirksamkeit als bei Physostigmin erwarten würde.

Bei den Prophylaxe-Versuchen mit Huperzin A fiel auf, dass die Kurve der verbleibenden Restaktivität im Bereich von etwa 40 bis 70% Vorhemmung deutlich steiler verlief als bei den anderen drei Substanzen, die absoluten Restaktivitäten (bis etwa 60% Vorhemmung) aber deutlich niedriger lagen als bei Physostigmin und Pyridostigmin. Erst ab einer Vorhemmung von etwa 70% wurden für Huperzin A ähnliche Restaktivitäten bestimmt. Bei einer Vorhemmung von nur etwa 20-30% der AChE-Aktivität konnte hingegen nur eine geringfügige Schutzwirkung von Huperzin A festgestellt werden. Lallement et al. fanden, dass die Dosis an Huperzin A, die nötig ist, um die Toxizität einer Soman-Vergiftung herabzusetzen, zu einer Hemmung der Blut- und ZNS-Cholinesterasen um etwa 50-70% führt. Eine Hemmung dieses Ausmaßes kann jedoch bei gesunden Probanden nicht umgesetzt werden (Lallement et al. 2001a), beim Menschen wird eine Hemmung der AChE um etwa 20-30% durch die Prophylaxe angestrebt (Lallement et al. 2002b).

### **5.2.3 Berechnung der simultan ablaufenden Reaktionen von Carbamoylierung, Decarbamoylierung und Phosphorylierung**

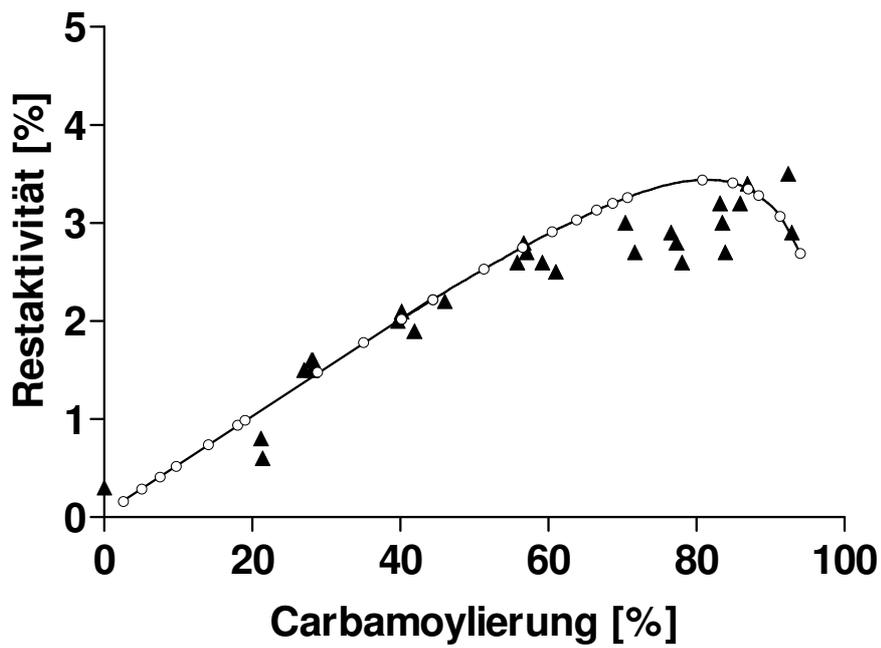
Mit Hilfe der in Tabelle 5-1 gezeigten Daten ließ sich die Hemmkonstante  $k_{c, \text{obs}}$  für Physostigmin und Pyridostigmin berechnen, für Huperzin A gilt  $k_{c, \text{obs}} = k_{i, \text{obs}}$ . Die Phosphorylierungskonstante  $k_i$  wurde für 1  $\mu\text{M}$  Paraoxon aus den experimentellen Daten gemittelt (Tabelle 4-5) und die Zerfallskonstante  $k_d (= k_{s, \text{obs}})$  für die Dissoziation reversibler Enzymkomplexe variiert. Alle Konstanten wurden verwendet, wie sie in Gegenwart von 0,45 mM Acetylthiocholin ermittelt wurden. Daraus wurde der Anteil an freiem Enzym zum Zeitpunkt  $t$  nach Gl. 3-20 bis 3-22 berechnet.

Abb. 5-1 zeigt die gemessene Restaktivität nach Vorhemmung mit verschiedenen Konzentrationen von Physostigmin, wie sie 30 min nach zusätzlicher Einwirkung von 1  $\mu\text{M}$  Paraoxon gemessen wurde (geschlossene Quadrate). Die darüber gelegte Kurve wurde rechnerisch mit Hilfe der ermittelten Reaktionskonstanten für diskrete Vorhemmung bestimmt und die berechneten Punkte (offene Kreise) mit einer Glättungskurve (cubic spline) verbunden.

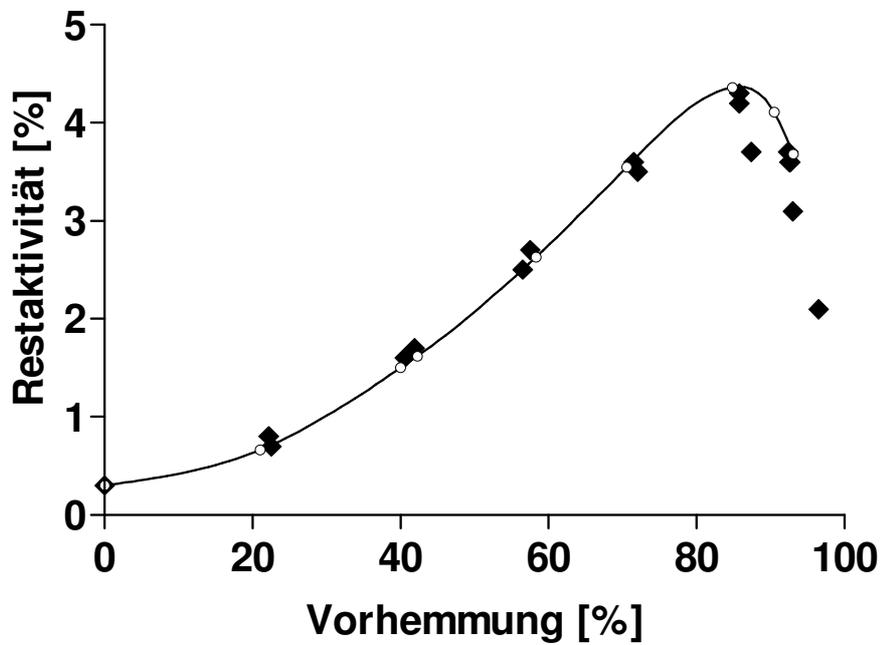


**Abb. 5-1:** Abhängigkeit der Restaktivität nach gleichzeitiger Perfusion mit Physostigmin und Paraoxon vom Grad der Vorhemmung durch die Prophylaxe; ■—■ Experimentelle Daten; ○—○ Berechnete Daten (Maple 9.0)

Man sieht, dass die Rechenoperation den Messdaten entspricht. Abb. 5-2 zeigt die gleichen Verhältnisse im Falle der Vorhemmung mit Pyridostigmin, Abb. 5-3 die für Huperzin A. Die berechnete Kurve für Huperzin A hat zwar eine andere Form, verbindet aber gut die Messdaten. (Die nach Maple 9.0 berechneten Werte befinden sich im Anhang 8.5 Tab. 8-20 bis 8-22.)



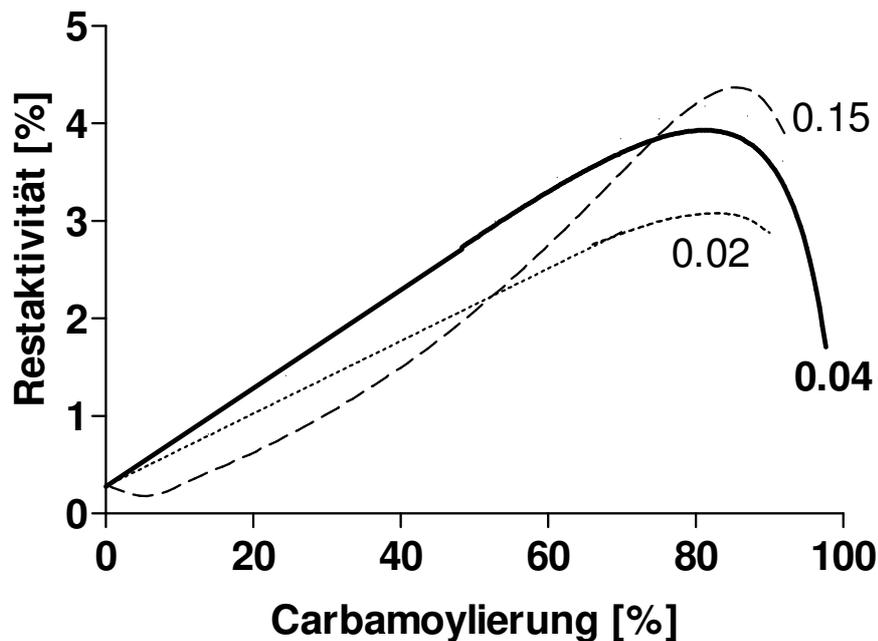
**Abb. 5-2:** Abhängigkeit der Restaktivität nach gleichzeitiger Perfusion mit Pyridostigmin und Paraoxon vom Grad der Vorhemmung durch die Prophylaxe; ▲—▲ Experimentelle Daten; ○—○ Berechnete Daten (Maple 9.0)



**Abb. 5-3:** Abhängigkeit der Restaktivität nach gleichzeitiger Perfusion mit Huperzin A und Paraoxon vom Grad der Vorhemmung durch die Prophylaxe; ◆—◆ Experimentelle Daten; ○—○ Berechnete Daten (Maple 9.0)

Es bot sich an, die Rechenoperationen für verschiedene Szenarien durchzuführen, um Einflüsse der verschiedenen Parameter auf die Restaktivität kennen zu lernen.

Abb. 5-4 zeigt die rechnerisch ermittelte Restaktivität nach 30 min Einwirkung von Paraoxon ( $1 \mu\text{M}$ ) für verschiedene Grade der Vorhemmung und verschiedene Decarbamoylierungs-konstanten.

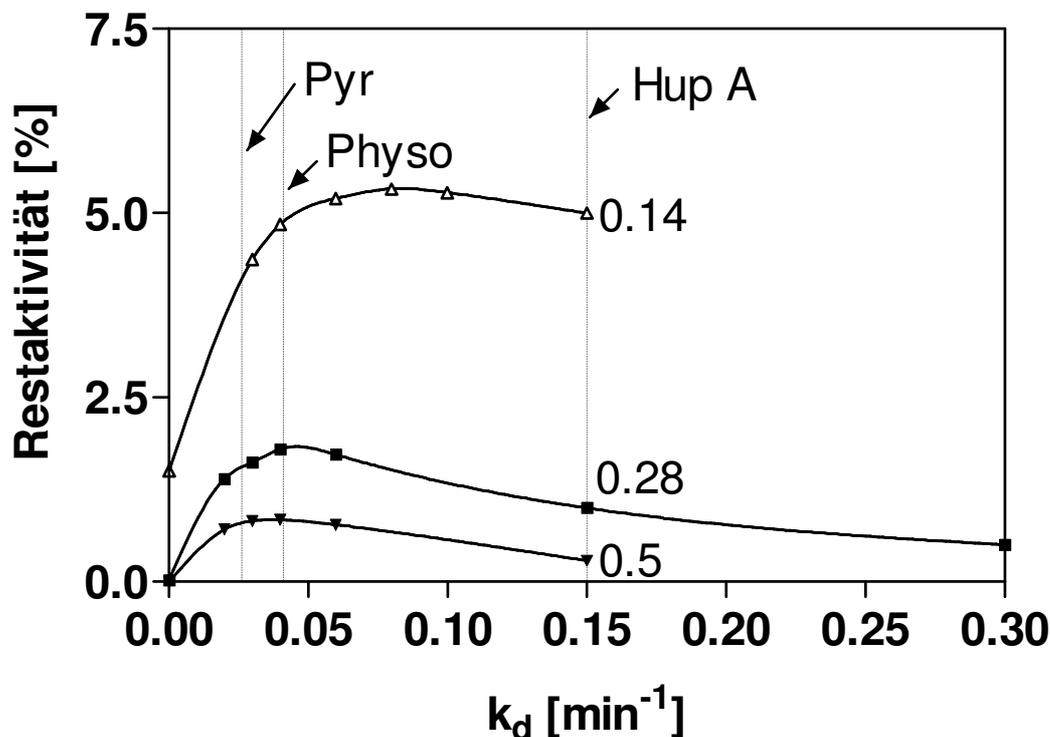


**Abb. 5-4:** Rechnerisch ermittelte Restaktivität nach 30 min Einwirkung von Paraoxon ( $k_i = 0,279 \text{ min}^{-1}$ ) für verschiedene Grade der AChE-Vorhemmung und verschiedene Decarbamoylierungs-konstanten  $k_d$  ( $\text{min}^{-1}$ ) (Maple 9.0)

Es fällt auf, dass alle Kurven ein Maximum bei ca. 80% Vorhemmung durchlaufen und die Restaktivität bei höherer Vorhemmung wieder abnimmt. Dieses Phänomen lässt sich wohl damit erklären, dass bei sehr hohem Vorhemmungsgrad der Anteil an Restaktivität durch die Carbamoylierung bereits stark vermindert ist.

Schließlich fällt auf, dass bei schneller Reaktivierung (z. B.  $k_d = 0,15 \text{ min}^{-1}$ ) die nach 30 min bestimmte Restaktivität im Bereich geringer Vorhemmung, z. B. 20%, deutlich niedriger liegt als bei langsamer Reaktivierung (z. B.  $k_d = 0,04 \text{ min}^{-1}$ ). Bei hoher  $k_d$  wird schnell freies Enzym aus EC generiert, so dass die Phosphorylierung schneller erfolgen kann als bei langsamer Reaktivierung. In diesem Fall verlief die Kinetik der Aktivitätsabnahme auch deutlich biphasisch, weil nach der raschen Phosphorylierung des freien Enzyms die langsame Nachlieferung an freiem Enzym aus EC limitierend wird.

Die Simulation in Abb. 5-5 zeigt schließlich, dass die Restaktivität bei 30% Vorhemmung bei variierter Phosphorylierungskonstante ( $0,14 - 0,5 \text{ min}^{-1}$ ) in unterschiedlicher Weise von der Reaktivierungskonstante abhängt. Bei schneller Phosphorylierung ist eine hohe  $k_d$  nachteilig, bei langsamer Phosphorylierung spielt die  $k_d$  eine geringere Rolle.



**Abb. 5-5:** Simulation der Abhängigkeit der Restaktivität bei 30% Vorhemmung von der Reaktivierungskonstanten  $k_d$ , bei variierter Phosphorylierungskonstante ( $k_i = 0,14 - 0,5 \text{ min}^{-1}$  (Maple 9.0)); die vertikalen Linien markieren  $k_d$ -Werte, die für Physostigmin ( $0,041 \text{ min}^{-1}$ ), Pyridostigmin ( $0,026 \text{ min}^{-1}$ ) und Huperzin A ( $0,15 \text{ min}^{-1}$ ) experimentell ermittelt wurden.

Die vertikalen Linien markieren die  $k_d$ -Werte, wie sie für Physostigmin, Pyridostigmin und Huperzin A im dynamischen System bestimmt wurden. Man erkennt, dass eine Reaktivierungskonstante von etwa  $0,05 \text{ min}^{-1}$  für alle drei Phosphorylierungsszenarien ideal wäre. Diesem Ideal kommt Physostigmin am nächsten, Pyridostigmin schneidet etwas schlechter ab, während Huperzin A vor allem bei schneller Phosphorylierung deutlich schlechter ist.

Es muss allerdings einschränkend gesagt werden, dass diese Berechnungen für den Zeitpunkt 30 min nach Einwirkung des Organophosphats durchgeführt wurden. Bei sehr viel kürzeren Einwirkzeiten, z. B. 5 min, verschiebt sich das Bild etwas; hier ist eine hohe Reaktivierungskonstante vorteilhafter, da eine schnelle Enzymnachlieferung sich zu noch nicht phosphoryliertem Enzym addiert.

Natürlich stellt sich die Frage: Welche Bedeutung hat die Erhöhung der Restaktivität durch reversible Hemmstoffe bei einer Vergiftung?

Ist die nachgewiesene Erhöhung der Restaktivität nach Prophylaxe im Vergleich zur Belastung mit Organophosphat ohne Prophylaxe ausreichend, um die in Tierexperimenten beobachtete reduzierte Mortalität zu erklären?

Die experimentellen Ergebnisse und die Simulationsberechnung haben gezeigt, dass bei 30%iger Vorhemmung des Enzyms nur dann eine nennenswerte Restaktivität zu erzielen ist, wenn die Geschwindigkeit der Phosphorylierung nicht zu schnell ist. Das gelingt z. B. bei einer Phosphorylierungshalbwertszeit von ca. 5 min ( $k_i = 0,14 \text{ min}^{-1}$ ; Abb. 5-5). Hier lassen sich mit den reversiblen Hemmstoffen Restaktivitäten von ca. 5% erzielen, während ohne Vorbehandlung nur noch 1,5% vorhanden wären (mögliche Spontanreaktivierung oder Alterung des phosphorylierten Enzyms nicht berücksichtigt). Eine Restaktivität von 5% könnte für eine *vita minima* ausreichend sein. Tatsächlich fand sich bei Organophosphat-vergifteten Patienten bei 5% Restaktivität der Ery-AChE noch eine neuromuskuläre Transmission (20 Hz Stimulation) im Bereich von 70% der Norm (Thiermann et al. 2005). Dieser Bereich wird als Grenze für eine normale Kraftentwicklung der Skelettmuskulatur angesehen (Alberts 1990). Untersuchungen am Zwerchfell der Maus geben Hinweise darauf, dass sich erst AChE-Aktivitäten  $< 7\%$  in einer deutlichen Hemmung der Muskelkraft äußern (Thiermann et al. 2005). Sidell berichtete: „...one individual severely exposed to sarin was alert and functioning reasonably well for several days while ChE activity in his blood was undetectable. This case study and other data suggest that tissue function is restored at least partially when ChE activity is still quite low.” (Sidell 1974; Sidell 1997)

Es ist also durchaus denkbar, dass eine Vorhemmung des Enzyms nach Einwirken eines irreversiblen Hemmstoffs für eine gewisse Zeit genügend funktionsfähiges Enzym nachliefert, das eine ausreichende cholinerge Funktion gewährleistet. Voraussetzung für einen durchgreifenden Erfolg ist allerdings eine schnelle Elimination des Gifts und keine wesentliche Nachresorption.

Diese Schlüsse hat bereits Albert Green 1983 gezogen, zu einer Zeit, als eine Reihe der kinetischen Daten noch nicht zur Verfügung standen und geschätzt werden mussten, und zu einer Zeit, in der numerische Berechnung mehrerer Differentialgleichungen die Rechenkapazitäten verfügbarer Computer meistens überforderten. Das mag der Grund gewesen sein, warum die prophetische Arbeit von Green so wenig zitiert wird. Die meisten Zeitgenossen haben sie wohl mit Skepsis gelesen und die wahre Bedeutung verkannt.

Diese Untersuchungen und Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass eine Vorhemmung der Acetylcholinesterase mit den verschiedensten reversiblen Hemmstoffen gegenüber einer Organophosphat-Vergiftung tatsächlich einen gewissen Schutzeffekt ausübt, und bestätigen damit die von Green geäußerte Theorie.

Trotz dieser Beobachtungen kann die Bedeutung der einzelnen Hemmstoffe zur prophylaktischen Anwendung beim Menschen derzeit nicht abschließend beurteilt werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen einen positiven Ausblick auf die in naher Zukunft geplanten Untersuchungen mit Nervenkampfstoffen im dynamischen System bringen. Kann die durch Prophylaxe erreichte erhöhte Restaktivität auch nach Nervenkampfstoffbelastung beobachtet werden?

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die therapeutische Wirksamkeit der Carbamat-Prophylaxe bei der Organophosphatvergiftung, die sich in Tierexperimenten bewährt hat, ist in ihrem Mechanismus noch nicht vollständig geklärt. Insbesondere ist unklar, ob die Acetylcholinesterase-Aktivität (AChE) in der Anfangsphase, d.h. bei gleichzeitiger Anwesenheit von Carbamat und Organophosphat, durch die Prophylaxe erhöht ist und so das Überleben erklären kann. Diese Frage sollte mit Hilfe eines dynamisch arbeitenden In-Vitro-Modells geklärt werden. Die AChE-Aktivität einer fixierten humanen Enzymquelle kann kontinuierlich im Durchfluss nach einer modifizierten Ellman Methode gemessen werden, während die Konzentrationen an reversiblen Hemmstoffen und Organophosphat gezielt verändert werden, so dass Einflüsse der beteiligten Komponenten auf die Enzymaktivität im Fließgleichgewicht studiert werden können. Mögliche Schutzwirkungen der Carbamate Physostigmin und Pyridostigmin, sowie weiterer reversibler AChE-Hemmstoffe (Methyl-Paraoxon, Huperzin A) sollten geprüft werden.

In Gegenwart von 0,3 mM DTNB (Ellman's Reagenz) und 0,45 mM Acetylthiocholin (Substrat) sowie 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, mit 0,2% Gelatine wurde durch Erythrozyten-AChE mit einem Hämoglobingehalt von 3 mg bei einem Fluss von 0,5 mL/min und einer Temperatur von 37 °C eine konstante Extinktion von ca. 0,5 E bei 470 nm erhalten. Zugabe von 1 µM Paraoxon hemmte die Enzymaktivität auf eine Restaktivität von ca. 0,3%. Mit Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon und Huperzin A ließ sich konzentrationsabhängig ein Gleichgewicht von Hemmung und Spontanreaktivierung einstellen. Wurde dann 1 µM Paraoxon dazu perfundiert, verblieb eine höhere Restaktivität (1-4%) als in Abwesenheit der reversiblen Hemmstoffe (0,3%). Nach Absetzen des Paraoxons, aber in Gegenwart der reversiblen Hemmstoffe, nahm die Aktivität wieder zu. Wurden dann die reversiblen Hemmstoffe abgesetzt, erreichte die AChE-Aktivität nach Spontanreaktivierung in Abhängigkeit vom Grad der Vorhemmung zwischen 3 und 50% der Ausgangsaktivität.

Die Ergebnisse haben somit gezeigt, dass gehemmte AChE vor der Phosphylierung geschützt ist und dass reversibel gehemmte AChE ein Depot darstellt, aus der aktives Enzym auch bei Einwirkung eines irreversiblen Hemmstoffs bereitgestellt werden kann. Dadurch kann sich ein Fließgleichgewicht für aktives Enzym einstellen, wenn Spontanreaktivierung und irreversible Phosphylierung gleich schnell ablaufen. Auf welchem Niveau sich dieses Fließgleichgewicht einstellt, hängt von den Geschwindigkeitskonstanten der Spontanreaktivierung und irreversiblen Hemmung ab. Diese Modellvorstellung läßt sich in Differentialgleichungen darstellen und numerisch berechnen. Tatsächlich folgen die experimentell ermittelten Ergebnisse den berechneten Werten. Damit werden rechnerische Simulationen möglich, die für verschiedene Szenarien durchgespielt werden können. Die für menschliche AChE unter physiologischen Bedingungen ermittelten Ergebnisse zeigen bei 30%iger Vorhemmung, dass eine rele-

vante Restaktivität ( $\geq 5\%$ ) nach 30 min Einwirkung eines irreversiblen Hemmstoffs nur dann gehalten werden kann, wenn die Halbwertszeit der Hemmung 5 min nicht unterschreitet. Bei Verdoppelung der Hemmgeschwindigkeit beträgt die Restaktivität unter sonst gleichen Bedingungen nur mehr 1,8%. In diesem Szenario sind reversible Hemmstoffe mit einer Spontanreaktivierungshalbwertszeit von etwa 14 min optimal; deutlich längere oder kürzere Halbwertszeiten sind ungünstiger. Diesem Optimum kommt Physostigmin ( $t_{1/2} = 17$  min) sehr nahe, Pyridostigmin ( $t_{1/2} = 27$  min) ist etwas, Huperzin A ( $t_{1/2} = 4,6$  min) und Methyl-Paraoxon ( $t_{1/2}$  30-40 min) sind deutlich ungünstiger, was auch experimentell gezeigt wurde. Es wird interessant sein zu sehen, wie sich verändernde Giftkonzentrationen, etwa im Sinne einer Bateman-Funktion, experimentell und im Rechenmodell auswirken. In jedem Fall sollte die Rechner-gestützte Simulation bereits wichtige Vorstellungen der Abläufe geben, die dann nur mehr punktuell experimentell überprüft werden müssen. Es ist zu erwarten, dass auch bei Einwirkung von Nervenkampfstoffen keine grundsätzlich anderen Zusammenhänge aufgedeckt werden, da in dem hier durchgespielten Szenario von einer irreversiblen Enzymhemmung ausgingen und eine Reaktivierbarkeit durch Oxime nicht berücksichtigt wurde.

## 7 LITERATUR

Alberts, P. (1990). "A new H-oxime restores rat diaphragm contractility after esterase inhibition in vitro." European Journal of Pharmacology 184: 191-194.

Albuquerque, E. X., Aracava, Y., Cintra, W. M., Brossi, A., Schonenberger, B. and Deshpande, S. S. (1988). "Structure-activity relationship of reversible cholinesterase inhibitors: activation, channel blockade and stereospecificity of the nicotinic acetylcholine receptor-ion channel complex." Braz J Med Biol Res 21: 1173-96.

Aldridge, W. N. (1950). "Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues." J Biochem (Tokyo) 46: 451-60.

Aldridge, W. N. and Reiner, E. (1972). Enzyme inhibitors as substrates - Interactions of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids. Amsterdam, London, North-Holland Publishing Company.

Ashani, Y., Peggins, J. O. and Doctor, B. P. (1992). "Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A." Biochem Biophys Res Commun 184: 719-26.

Ballantyne, B. and Marrs, T. C. (1992). Overview of the biological and clinical aspects of organophosphates and carbamates. Clinical & Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates. B. Ballantyne and T. C. Marrs. Oxford, Butterworth-Heinemann Ltd.: 3-14.

Berry, W. K. and Davies, D. R. (1970). "The use of carbamates and atropine in the protection of animals against poisoning by 1,2,2-trimethylpropyl methylphosphonofluoridate." Biochem Pharmacol 19: 927-34.

Broomfield, C. A., Maxwell, D. M., Solana, R. P., Castro, C. A., Finger, A. V. and Lenz, D. E. (1991). "Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates." J Pharmacol Exp Ther 259: 633-8.

Dawson, R. M. (1994). "Rate constants of carbamylation and decarbamylation of acetylcholinesterase for physostigmine and carbaryl in the presence of an oxime." Neurochem Int 24: 173-82.

- Dirnhuber, P., French, M. C., Green, D. M., Leadbeater, L. and Stratton, J. A. (1979). "The protection of primates against soman poisoning by pretreatment with pyridostigmine." J Pharm Pharmacol 31: 295-9.
- Dunn, M. A., Hackley, B. E. and Sidell, F. R. (1997). Pretreatment for nerve agent exposure. Medical aspects of chemical and biological warfare. F. R. Sidell, E. T. Takafuji and D. R. Franz. Washington, DC, Office of the Surgeon General at TMM Publications; Borden Institute; Walter Reed Army Medical Center.
- Ellin, R. I. and Kaminskis, A. (1989). "Carbamoylated enzyme reversal as a means of predicting pyridostigmine protection against soman." J Pharm Pharmacol 41: 633-6.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr. and Feather-Stone, R. M. (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." Biochem Pharmacol 7: 88-95.
- Eyer, P., Eyer, F., Felgenhauer, N., Haberkorn, M., Meischner, V., Thiermann, H., Worek, F. und Zilker, T. (2000). "Intensiviertes Monitoring des Cholinesterase-Status bei organophosphatvergifteten Patienten." Zbl Arbeitsmed 50: 433.
- Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V. and Reiner, E. (2003). "Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment." Anal Biochem 312: 224-7.
- Forsberg, A. and Puu, G. (1984). "Kinetics for the inhibition of acetylcholinesterase from the electric eel by some organophosphates and carbamates." Eur J Biochem 140: 153-6.
- Gordon, J. J., Leadbeater, L. and Maidment, M. P. (1978). "The protection of animals against organophosphate poisoning by pretreatment with a carbamate." Toxicol Appl Pharmacol 43: 207-16.
- Gray, P. J. and Dawson, R. M. (1987). "Kinetic constants for the inhibition of eel and rabbit brain acetylcholinesterase by some organophosphates and carbamates of military significance." Toxicol Appl Pharmacol 91: 140-4.
- Green, A. L. (1983). "A theoretical kinetic analysis of the protective action exerted by eserine and other carbamate anticholinesterases against poisoning by organophosphorus compounds." Biochem Pharmacol 32: 1717-22.

Grob, D. and Harvey, J. C. (1958). "Effects in man of the anticholinesterase compound sarin (isopropyl methyl phosphonofluoridate)." J Clin Invest 37: 350-68.

Grunwald, J., Raveh, L., Doctor, B. P. and Ashani, Y. (1994). "Huperzine A as a pretreatment candidate drug against nerve agent toxicity." Life Sci 54: 991-7.

Hart, G. J. and O'Brien, R. D. (1973). "Recording spectrophotometric method for determination of dissociation and phosphorylation constants for the inhibition of acetylcholinesterase by organophosphates in the presence of substrate." Biochemistry 12: 2940-5.

Imai, K. (1982). Allosteric effects in haemoglobin. Cambridge. Cambridge University Press.

Inns, R. H. and Leadbeater, L. (1983). "The efficacy of bispyridinium derivatives in the treatment of organophosphonate poisoning in the guinea-pig." J Pharm Pharmacol 35: 427-33.

Irmhoff-Britt, S. (1993). Wirkungen und Wechselwirkungen von Carbamaten, Oximen und Paraoxon an der Acetylcholinesterase menschlicher Erythrozyten. Medizinische Fakultät. München, Ludwig-Maximilians-Universität.

Klimmek, R., Szinicz, L. und Weger, N. (1983). Chemische Gifte und Kampfstoffe. Stuttgart, Hippokrates Verlag.

Koelle, G. B. (1946). "Protection of cholinesterase against irreversible inactivation by di-isopropyl fluorophosphate in vitro." J Pharmacol Exp Ther 88: 232-237.

Koelle, G. B. (1963). Cholinesterases and anticholinesterase agents. Handbuch der experimentellen Pharmakologie - Ergänzungswerk. E. O. and F. O. Berlin; Göttingen; Heidelberg, Springer-Verlag.

Koplovitz, I., Harris, L. W., Anderson, D. R., Lennox, W. J. and Stewart, J. R. (1992). "Reduction by pyridostigmine pretreatment of the efficacy of atropine and 2-PAM treatment of sarin and VX poisoning in rodents." Fundam Appl Toxicol 18: 102-6.

Koster, R. (1946). "Synergisms and antagonisms between physostigmine and di-isopropyl fluorophosphate in cats." J Pharmacol Exp Ther 88: 39-46.

Kuhr, R. J. and Dorrough, H. W. (1976). *Carbamate Insecticides: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*. Cleveland, Ohio, CRC Press, Inc.

Lallement, G., Baille, V., Baubichon, D., Carpentier, P., Collombet, J. M., Filliat, P., Foquin, A., Four, E., Masqueliez, C., Testylier, G., Tonduli, L. and Dorandeu, F. (2002b). "Review of the value of huperzine as pretreatment of organophosphate poisoning." Neurotoxicology 23: 1-5.

Lallement, G., Demoncheaux, J. P., Foquin, A., Baubichon, D., Galonnier, M., Clarencon, D. and Dorandeu, F. (2002a). "Subchronic administration of pyridostigmine or huperzine to primates: compared efficacy against soman toxicity." Drug Chem Toxicol 25: 309-20.

Lallement, G., Foquin, A., Dorandeu, F., Baubichon, D., Aubriot, S. and Carpentier, P. (2001b). "Subchronic administration of various pretreatments of nerve agent poisoning. I. Protection of blood and central cholinesterases, innocuousness towards blood-brain barrier permeability." Drug Chem Toxicol 24: 151-64.

Lallement, G., Foquin, A., Dorandeu, F., Baubichon, D. and Carpentier, P. (2001a). "Subchronic administration of various pretreatments of nerve agent poisoning. II. Compared efficacy against soman toxicity." Drug Chem Toxicol 24: 165-80.

Leadbeater, L., Inns, R. H. and Rylands, J. M. (1985). "Treatment of poisoning by soman." Fundam Appl Toxicol 5: S225-31.

MacIlwain, C. (1993). "Study proves Iraq used nerve gas." Nature 363: 3.

Marshall, E. (1984). "Iraq's chemical warfare: Case proved." Science 224: 130-132.

Mast, U. (1997). *Reaktivierung der Erythrozyten-Acetylcholinesterase durch Oxime. Ermittlung enzymkinetischer Konstanten und ihre Bedeutung für die Therapie einer Organophosphat-Vergiftung*. Medizinische Fakultät. München, Ludwig-Maximilians-Universität.

Matthew, C. B. (1991). "Anticholinergics: effects on thermoregulation and performance in rats." Neurosci Biobehav Rev 15: 141-6.

- McKinney, M., Miller, J. H., Yamada, F., Tuckmantel, W. and Kozikowski, A. P. (1991). "Potencies and stereoselectivities of enantiomers of huperzine A for inhibition of rat cortical acetylcholinesterase." Eur J Pharmacol 203: 303-5.
- Merck-Index (1989). An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 11th edition. Rahway, N. J., U.S.A., Merck & Co. Inc.
- Miller, S. A., Blick, D. W., Kerenyi, S. Z. and Murphy, M. R. (1993). "Efficacy of physostigmine as a pretreatment for organophosphate poisoning." Pharmacol Biochem Behav 44: 343-7.
- Nozaki, H., Aikawa, N., Shinozawa, Y., Hori, S., Fujishima, S., Takuma, K. and Sagoh, M. (1995). "Sarin poisoning in Tokyo subway." Lancet 345: 980-981.
- Prall, Y. G., Gambhir, K. K. and Ampy, F. R. (1998). "Acetylcholinesterase: an enzymatic marker of human red blood cell aging." Life Sci 63: 177-84.
- Riggs, D. S. (1963). The Mathematical Approach to Physiological Problems. Baltimore, The Williams & Wilkins Company.
- Sidell, F. R. (1974). "Soman and sarin: clinical manifestations and treatment of accidental poisoning by organophosphates." Clin Toxicol 7: 1-17.
- Sidell, F. R. (1997). Nerve agents. Medical aspects of chemical and biological warfare. F. R. Sidell, E. T. Takafuji and D. R. Franz. Washington, DC, Office of the Surgeon General at TMM Publications; Borden Institute; Walter Reed Army Medical Center.
- Sidell, F. R. and Groff, W. A. (1974). "The reactivability of cholinesterase inhibited by VX and sarin in man." Toxicol Appl Pharmacol 27: 241-52.
- Suzuki, T., Morita, H., Ono, K., Maekawa, K., Nagai, R. and Yazaki, Y. (1995). "Sarin poisoning in Tokyo subway." Lancet 345: 980.
- Szinicz, L. (1994). Chemische Kampfstoffe. In: Lehrbuch der Toxikologie. H. Marquardt and S. G. Schäfer, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim: 571-588.
- Szinicz, L. and Baskin, S. I. (1999). Chemische und biologische Kampfstoffe. In: Lehrbuch der Toxikologie. W. V. mbH. Stuttgart: 865-895.

Taylor, P. (1996). Anticholinesterase agents. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th edition, McGraw Hill: 161-176.

Thiermann, H., Seidl, S. und Eyer, P. (1995). "Stand der Entwicklung neuer Autoinjektoren zur Behandlung der Nervenkampfstoff-Vergiftung." Wehrmed. Mschr. 39: 189-192.

Thiermann, H., Worek, F., Szinicz, L., Eyer, P., Eyer, F., Felgenhauer, N., Haberkorn, M. and Zilker, T. (2005). "Monitoring of red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular function in organophosphate pesticide-poisoned patients"- Manuskript in Vorbereitung.

Tomlinson, G., Mutus, B. and McLennan, I. (1980). "Modulation of acetylcholinesterase activity by peripheral site ligands." Mol Pharmacol 18: 33-9.

Tuovinen, K., Kaliste-Korhonen, E., Raushel, F. M. and Hanninen, O. (1999). "Success of pyridostigmine, physostigmine, eptastigmine and phosphotriesterase treatments in acute sarin intoxication." Toxicology 134: 169-78.

Wetherell, J., Hall, T. and Passingham, S. (2002). "Physostigmine and hyoscine improves protection against the lethal and incapacitating effects of nerve agent poisoning in the guinea-pig." Neurotoxicology 23: 341-9.

Wetherell, J. R. and French, M. C. (1991). "A comparison of the decarbamylation rates of physostigmine-inhibited plasma and red cell cholinesterases of man with other species." Biochem Pharmacol 42: 515-20.

Woodall, J. (1997). "Tokyo subway gas attack." Lancet 350(9073): 296.

Worek, F., Bäcker, M., Thiermann, H., Szinicz, L., Mast, U., Klimmek, R. and Eyer, P. (1997). "Reappraisal of indications and limitations of oxime therapy in organophosphate poisoning." Hum Exp Toxicol 16: 466-72.

Worek, F., Diepold, C. and Eyer, P. (1999b). "Dimethylphosphoryl-inhibited human cholinesterases: inhibition, reactivation, and aging kinetics." Arch Toxicol 73: 7-14.

Worek, F., Kirchner, T., Bäcker, M. and Szinicz, L. (1996). "Reactivation by various oximes of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by different organophosphorus compounds." Arch Toxicol 70: 497-503.

Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C. and Eyer, P. (1999a). "Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood." Clin Chim Acta 288: 73-90.

## 8 ANHANG

### 8.1 Überprüfen der Gerätespezifikationen

#### 8.1.1 Methode: Farbstofftest Gradient

Beide Pumpen wurden einzeln überprüft, wobei jeweils die Kanäle A (KFZ-PP) gegen D (PP), sowie Kanäle B (KFZ-PP) gegen C (PP) getestet wurden.

Flussrate: 1,0 mL/min

Messwellenlänge: 420 nm

**Tab 8-1:** Farbstofftest „Gradient“

Zeit [min]	Eluent A bzw. B [%]	Eluent C bzw. D [%]
0,0	100	-
9,9	100	-
10,0	90	10
19,9	90	10
20,0	75	25
29,9	75	25
30,0	50	50
39,9	50	50
40,0	-	100
49,9	-	100
50,0	50	50
59,9	50	50
60,0	75	25
69,9	75	25
70,0	90	10
79,9	90	10
80,0	100	-
90,0	100	-

### 8.1.2 Photometrische Linearität

**Tab. 8-2:** Vergleich der Signale von Detektor und Photometer des Farbstofftests mit KFZ-PP bei 420 nm bei Verwendung der Kanäle A und D von Pumpe I

Stufenhöhe Soll [%]	Signal Detektor [E]	Stufenhöhe Ist [%]	Signal Photometer [E]	Stufenhöhe Ist [%]
0	-0,0005	<b>0</b>	0,002	<b>0,1</b>
10	0,1701	<b>10,0</b>	0,186	<b>9,9</b>
25	0,4330	<b>25,5</b>	0,474	<b>25,1</b>
50	0,8705	<b>51,2</b>	0,953	<b>50,5</b>
100	1,6995	<b>100</b>	1,887	<b>100</b>
50	0,8731	<b>51,4</b>	0,957	<b>50,7</b>
25	0,4355	<b>25,6</b>	0,477	<b>25,3</b>
10	0,1692	<b>10,0</b>	0,185	<b>9,8</b>
0	-0,0001	<b>0</b>	0,001	<b>0,05</b>

**Tab. 8-3:** Vergleich der Signale von Detektor und Photometer des Farbstofftests mit KFZ-PP bei 420 nm bei Verwendung der Kanäle B und C von Pumpe I

Stufenhöhe Soll [%]	Signal Detektor [E]	Stufenhöhe Ist [%]	Signal Photometer [E]	Stufenhöhe Ist [%]
0	-0,0004	<b>0</b>	0,004	<b>0,2</b>
10	0,1775	<b>10,4</b>	0,194	<b>10,3</b>
25	0,4406	<b>25,9</b>	0,481	<b>25,5</b>
50	0,8760	<b>51,5</b>	0,961	<b>50,9</b>
100	1,7001	<b>100</b>	1,888	<b>100</b>
50	0,8782	<b>51,7</b>	0,959	<b>50,8</b>
25	0,4424	<b>26,0</b>	0,480	<b>25,4</b>
10	0,1774	<b>10,4</b>	0,191	<b>10,1</b>
0	0,0003	<b>0</b>	-0,001	<b>0</b>

**Tab. 8-4:** Vergleich der Signale von Detektor und Photometer des Farbstofftests mit KFZ-PP bei 420 nm bei Verwendung der Kanäle A und D von Pumpe II

Stufenhöhe Soll [%]	Signal Detektor [E]	Stufenhöhe Ist [%]	Signal Photometer [E]	Stufenhöhe Ist [%]
0	-0,0008	<b>0</b>	0,000	<b>0</b>
10	0,1427	<b>8,4</b>	0,153	<b>8,1</b>
25	0,4061	<b>23,9</b>	0,443	<b>23,5</b>
50	0,8578	<b>50,5</b>	0,937	<b>49,6</b>
100	1,6982	<b>100</b>	1,889	<b>100</b>
50	0,8623	<b>50,8</b>	0,944	<b>50,0</b>
25	0,4095	<b>24,1</b>	0,448	<b>23,7</b>
10	0,1458	<b>8,6</b>	0,158	<b>8,4</b>
0	-0,0001	<b>0</b>	0,000	<b>0</b>

**Tab. 8-5:** Vergleich der Signale von Detektor und Photometer des Farbstofftests mit KFZ-PP bei 420 nm bei Verwendung der Kanäle B und C von Pumpe II

Stufenhöhe Soll [%]	Signal Detektor [E]	Stufenhöhe Ist [%]	Signal Photometer [E]	Stufenhöhe Ist [%]
0	-0,0007	<b>0</b>	-0,001	<b>0</b>
10	0,1670	<b>9,8</b>	0,181	<b>9,6</b>
25	0,4267	<b>25,1</b>	0,467	<b>24,6</b>
50	0,8750	<b>51,5</b>	0,958	<b>50,6</b>
100	1,6982	<b>100</b>	1,895	<b>100</b>
50	0,8780	<b>51,7</b>	0,961	<b>50,7</b>
25	0,4292	<b>25,3</b>	0,467	<b>24,6</b>
10	0,1680	<b>9,9</b>	0,187	<b>9,9</b>
0	0,0001	<b>0</b>	0,000	<b>0</b>

→ Photometrische Linearität bis 1,7 E

→ Effektive Schichtdicke im Durchflussphotometer: 0,8991 cm ( $\pm 0,0018$ ;  $R^2= 0,9999$ )

### 8.1.3 Hysterese der Gleichgewichtseinstellung

Methode:

Flussrate: je 0,25 mL/min

Eluent 1: Phosphat-Puffer (PP)

Eluent 2: KFZ-PP (0,04%)

Messwellenlänge: 420 nm

**Tab. 8-6:** Farbstofftest „Gleichgewichtseinstellung“

Zeit [min]	Eluent 1 PP [%]	Eluent 2 KFZ-PP [%]	Pumpe I [mL/min]	Pumpe II [mL/min]
0,0	100	-	konstant je 0,25	
1,9	100	-		
2,0	-	100		
59,9	-	100		
60,0	100	-		
120,0	100	-		

#### 8.1.3.1 Versuche mit Filter

**Tab. 8-7:** Gleichgewichtseinstellung nach Zu- und Abschalten des Farbstoffes

Versuch	100% nach 60 min	Werte 18 min nach Zuschalten von KFZ-PP		Werte 15 min nach Umschalten auf PP		
		[mE]	[mE]	[%]	[mE]	[%]
KFZ-PP steht an	[mE]	[mE]	[mE]	[%]	[mE]	[%]
D → A	1164,4	1157,0		<b>99,4</b>	6,79	<b>99,4</b>
B → C	1160,5	1152,8		<b>99,3</b>	7,02	<b>99,4</b>
C → B	1168,4	1160,2		<b>99,3</b>	7,03	<b>99,4</b>
PP steht an						
A → D	1169,8	1159,4		<b>99,1</b>	7,62	<b>99,3</b>
D → A	1169,7	1159,5		<b>99,1</b>	7,22	<b>99,4</b>
B → C	1165,0	1156,1		<b>99,2</b>	6,79	<b>99,4</b>
C → B	1170,5	1162,0		<b>99,3</b>	6,88	<b>99,4</b>

### Kinetik des Absorptionsanstiegs

Der Kurvenverlauf der zweiten Phase (nach Erreichen der halbmaximalen Absorption) ließ sich durch eine biphasische Exponentialfunktion ( $Y = Y_{\max 1} \cdot (1 - e^{(-k_1 \cdot t)}) + Y_{\max 2} \cdot (1 - e^{(-k_2 \cdot t)})$ ) beschreiben.

**Tab. 8-8:** Halbwertszeiten (Absorptionsanstieg)

Versuch	$Y_{\max 1}$	$Y_{\max 2}$	$t_{1/2 1}$ [min]	$t_{1/2 2}$ [min]	$R^2$
KFZ-PP steht in nichtfördernden Kanälen an					
D → A	26,84	540,3	7,268	1,05	0,9995
B → C	32,78	530,9	6,687	1,011	0,9996
C → B	22,48	529,5	9,576	1,000	0,9996
PP steht in nichtfördernden Kanälen an					
A → D	40,69	519,7	6,674	1,003	0,9997
D → A	29,66	543,9	8,763	1,070	0,9996
B → C	48,06	520,3	5,782	1,036	0,9996
C → B	24,54	539,5	8,904	1,042	0,9995
<b>Mittelwert (n=7)</b>			<b>7,7</b>	<b>1,03</b>	
<b>SD</b>			<b>1,4</b>	<b>0,03</b>	

Die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  ergeben sich aus  $0,693/k_1$  und  $0,693/k_2$ .

### Kinetik nach Abschalten des Farbstoffes

Der Kurvenverlauf der zweiten Phase (nach Erreichen der halbmaximalen Absorption) ließ sich wiederum durch eine biphasische Exponentialfunktion ( $Y = Y_{\max 1} \cdot (e^{(-k_1 \cdot t)}) + Y_{\max 2} \cdot (e^{(-k_2 \cdot t)}) + \text{Plateau}$ ) beschreiben.

**Tab. 8-9:** Halbwertszeiten (Absorptionsabfall)

Versuch	$Y_{\max 1}$	$Y_{\max 2}$	$t_{1/2 1}$ [min]	$t_{1/2 2}$ [min]	$R^2$
KFZ-PP steht in nichtfördernden Kanälen an					
D → A	4,506	628,9	(21,37)	1,136	0,9991
B → C	10,39	587,3	9,173	1,046	0,9997
C → B	9,819	593,2	10,79	1,022	0,9997
PP steht in nichtfördernden Kanälen an					
A → D	11,05	601,9	9,107	1,059	0,9997
D → A	7,279	602,4	13,67	1,127	0,9995
B → C	8,617	600,8	10,52	1,096	0,9997
C → B	9,874	590,8	10,24	1,040	0,9996
<b>Mittelwert</b>			<b>10,6</b> (n=6)	<b>1,08</b> (n=7)	
<b>SD</b>			<b>1,7</b>	<b>0,05</b>	

Die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  ergeben sich aus  $0,693/k_1$  und  $0,693/k_2$ .

### 8.1.3.2 Versuche ohne Filter

**Tab. 8-10:** Gleichgewichtseinstellung nach Zu- und Abschalten des Farbstoffes

Versuch	100% nach 60 min	Werte 15 min nach Zuschalten von KFZ-PP		Werte 12 min nach Umschalten auf PP	
		[mE]	[mE]	[%]	[mE]
KFZ-PP steht an	[mE]	[mE]			
A → D	1107,0	1096,5	<b>99,1</b>	6,7	<b>99,4</b>
D → A	1109,0	1101,3	<b>99,3</b>	7,09	<b>99,4</b>
B → C	1103,7	1094,8	<b>99,2</b>	6,19	<b>99,4</b>
C → B	1110,1	1100,8	<b>99,2</b>	6,63	<b>99,4</b>
PP steht an					
A → D	1258,1	1248,1	<b>99,2</b>	8,46	<b>99,3</b>
D → A	1261,7	1249,8	<b>99,1</b>	8,46	<b>99,3</b>
B → C	1107,0	1097,8	<b>99,2</b>	6,90	<b>99,4</b>
C → B	1111,0	1102,7	<b>99,3</b>	7,00	<b>99,4</b>

## 8.2 Experimente im dynamischen System mit Enzymreaktor

### 8.2.1 Methode A: Bestimmung der Stabilität der AChE-Aktivität im Enzymreaktor und Bestimmung des Reagenzienblindwertes

Pumpe II:

Eluent C                      Aq. bidest.

Eluenten B und D        PP

**Tab. 8-11:** Methode A

Pumpe I : 0,25 mL/min					Pumpe II : 0,25 mL/min				
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]
189,9	45	5	-	50	189,9	100	-	-	-
190,0	100	-	-	-	190,0	100	-	-	-
220,0	100	-	-	-	220,0	100	-	-	-

### 8.2.2 Methode B: Hemmung mit Paraoxon (zur Bestimmung von Hemmkinetik und Grad der Hemmung)

Pumpe II:

Eluenten A und D 0,2% Gelatine-PP

Eluent B Paraoxon (Endkonz. 1  $\mu$ M)

Eluent C Aq. bidest.

**Tab. 8-12:** Methode B

Pumpe I: 0,25 mL/min					Pumpe II: 0,25 mL/min				
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]
0,0	100	-	-	-	0,0	100	-	-	-
4,9	100	-	-	-	4,9	100	-	-	-
5,0	-	-	100	-	5,0	-	-	100	-
9,9	-	-	100	-	9,9	-	-	100	-
10,0	100	-	-	-	10,0	100	-	-	-
14,9	100	-	-	-	14,9	100	-	-	-
15,0	45	5	-	50	15,0	100	-	-	-
					29,9	100	-	-	-
					30,0	55	45	-	-
					69,9	55	45	-	-
70,0	45	5	-	50	70,0	100	-	-	-
75,0	100	-	-	-	75,0	100	-	-	-

### 8.2.3 Methode C: Hemmung mit Paraoxon und Reaktivierung mit Obidoxim

Pumpe II:

Eluent A	0,2% Gelatine-PP
Eluent B	Paraoxon (Endkonz. 1 µM)
Eluent C	Aq. bidest.
Eluent D	Obidoxim (Endkonz. 10µM)

Tab. 8-13: Methode C

Pumpe I: 0,25 mL/min					Pumpe II: 0,25 mL/min				
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]
0,0	100	-	-	-	0,0	100	-	-	-
4,9	100	-	-	-	4,9	100	-	-	-
5,0	-	-	100	-	5,0	-	-	100	-
9,9	-	-	100	-	9,9	-	-	100	-
10,0	100	-	-	-	10,0	100	-	-	-
14,9	100	-	-	-	14,9	100	-	-	-
15,0	45	5	-	50	15,0	100	-	-	-
					30,0	55	45		
					64,9	55	45	-	-
					65,0	55	-	-	45
					179,9	55	-	-	45
					180,0	100	-	-	-
189,9	45	5	-	50	189,9	100	-	-	-
190,0	100	-	-	-	190,0	100	-	-	-
220,0	100	-	-	-	220,0	100	-	-	-

### 8.2.4 Methode D: Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen (Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon, Huperzin A)

Pumpe II:

Eluent A 0,2% Gelatine-PP

Eluent B PP

Eluent C reversibler Hemmstoff: Konzentration „Puls“ (D-1) bzw. Aq. bidest (D-2)

Eluent D reversibler Hemmstoff: Konzentration zur Gleichgewichtseinstellung

**Tab. 8-14:** Methode D-1 und D-2

Pumpe I: 0,25 mL/min od. 0,5 mL/min					Pumpe II: 0,25 mL/min od. 0,0 mL/min				
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]
0,0	100	-	-	-	0,0	100	-	-	-
4,9	100	-	-	-	4,9	100	-	-	-
5,0	-	-	100	-	5,0	-	-	100/-	-
9,9	-	-	100	-	9,9	-	-	100/-	-
10,0	100	-	-	-	10,0	100	-	-	-
14,9	100	-	-	-	14,9	100	-	-	-
15,0	45	5	-	50	15,0	100	-	-	-
					29,9	100	-	-	-
					30,0	55	-	45	-
					variabel	55	-	45	-
					variabel	55	-	-	45
					89,9	55	-	-	45
					90,0	100	-	-	-
189,9	45	5	-	50	189,9	100	-	-	-
190,0	100	-	-	-	190,0	100	-	-	-
220,0	100	-	-	-	220,0	100	-	-	-

Bei Versuchen, die ohne „Puls“ durchgeführt wurden, wurde (in den meisten Fällen) von der 30. bis zur 90. min mit dem jeweiligen reversiblen Hemmstoff (Kanal II D) gehemmt, in Einzelfällen wurde das Intervall, wenn möglich kürzer, wenn nötig länger gewählt. Die Hämolyse der Erythrozyten wurde hier mit beiden Pumpen (jeweils 100% Kanal C, bei je 0,25 mL/min) durchgeführt.

### 8.2.5 Methode E: Hemmung mit reversiblen Hemmstoffen (Physostigmin, Pyridostigmin, Methyl-Paraoxon, Huperzin A und Ethyl-Paraoxon gleichzeitig)

E-1: Versuche mit einer konstanten Konzentration an reversiblen Hemmstoffen

Pumpe II:

Eluent A                    0,2% Gelatine-PP  
 Eluent B                    Paraoxon (Endkonz. 1 µM)  
 Eluent C                    Aq. Bidest  
 Eluent D                    reversibler Hemmstoff

Tab. 8-15: Methode E-1

Pumpe I: 0,25 mL/min					Pumpe II: 0,25 mL/min				
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]
0,0	100	-	-	-	0,0	100	-	-	-
4,9	100	-	-	-	4,9	100	-	-	-
5,0	-	-	100	-	5,0	-	-	100	-
9,9	-	-	100	-	9,9	-	-	100	-
10,0	100	-	-	-	10,0	100	-	-	-
14,9	100	-	-	-	14,9	100	-	-	-
15,0	45	5	-	50	15,0	100	-	-	-
					29,9	100	-	-	-
					30,0	55	-	-	45
					59,9	55	-	-	45
					60,0	10	45	-	45
					89,9	10	45	-	45
					90,0	55	-	-	45
					99,9	55	-	-	45
					100,0	100	-	-	-
189,9	45	5	-	50	189,9	100	-	-	-
190,0	100	-	-	-	190,0	100	-	-	-
220,0	100	-	-	-	220,0	100	-	-	-

*E-2: Versuche mit zwei verschiedenen Konzentrationen an reversiblen Hemmstoffen*

Pumpe II:

Eluent A 0,2% Gelatine-PP

Eluent B Paraoxon (Endkonz. 1  $\mu$ M)

Eluent C reversibler Hemmstoff : Konzentration „Puls“

Eluent D reversibler Hemmstoff : Konzentration zur Gleichgewichtseinstellung

**Tab. 8-16:** Methode E-2

Pumpe I: 0,25 mL/min od. 0,5 mL/min					Pumpe II: 0,25 mL/min od. 0,0 mL/min				
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]
0,0	100	-	-	-	0,0	100	-	-	-
4,9	100	-	-	-	4,9	100	-	-	-
5,0	-	-	100	-	5,0	-	-	-	-
9,9	-	-	100	-	9,9	-	-	-	-
10,0	100	-	-	-	10,0	100	-	-	-
14,9	100	-	-	-	14,9	100	-	-	-
15,0	45	5	-	50	15,0	100	-	-	-
					29,9	100	-	-	-
					30,0	55	-	45	-
					variabel	55	-	45	-
					variabel	55	-	-	45
					59,9	55	-	-	45
					60,0	10	45	-	45
					89,9	10	45	-	45
					90,0	55	-	-	45
					99,9	55	-	-	45
					100,0	100	-	-	-
189,9	45	5	-	50	189,9	100	-	-	-
190,0	100	-	-	-	190,0	100	-	-	-
220,0	100	-	-	-	220,0	100	-	-	-

### 8.2.6 Methode F: Farbtest zur Simulation einer Hemmung bei exponentiell abnehmender Konzentration des Hemmstoffes („dynamisch“)

Pumpe I:

Eluenten A, B, C, D PP

Pumpe II:

Eluenten A, C, D PP

Eluent B 0,1% KFZ-PP

**Tab. 8-17:** Farbtest „dynamisch“

Pumpe I: 0,25 mL/min					Pumpe II: 0,25 mL/min				
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]
0,0	100	-	-	-	0,0	100	-	-	-
					29,9	100	-	-	-
					30,0	50	50	-	-
					30,1	51	49	-	-
					30,2	52	48	-	-
					30,3	53	47	-	-
					30,4	54	46	-	-
					30,5	55	45	-	-
					30,6	56	44	-	-
					30,7	57	43	-	-
					30,8	58	42	-	-
					30,9	59	41	-	-
					31,0	60	40	-	-
					31,1	61	39	-	-
					31,2	62	38	-	-
					31,3	63	37	-	-
					31,4	64	36	-	-
					31,7	66	34	-	-
					31,8	67	33	-	-
					32,1	69	31	-	-
					32,2	70	30	-	-
					32,5	72	28	-	-

**Tab. 8-17 ff:** Farbtest „dynamisch“

Pumpe I: 0,25 mL/min					Pumpe II: 0,25 mL/min				
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Eluent D [%]
					32,7	73	27	-	-
					32,8	74	26	-	-
					33,0	75	25	-	-
					34,0	80	20	-	-
					35,0	84	16	-	-
					35,5	86	14	-	-
					36,5	89	11	-	-
					37,0	90	10	-	-
					37,5	91	9	-	-
					38,0	92	8	-	-
					40,0	95	5	-	-
					41,0	96	4	-	-
					42,2	97	3	-	-
					43,9	98	2	-	-
					46,9	99	1	-	-
					49,9	99	1	-	-
					50,0	100	-	-	-
75,0	100	-	-	-	75,0	100	-	-	-

## 8.3 Lagerstabilität von Humanerythrozyten

Hämoglobingehalt und Ery-AChE-Aktivität

**Tab. 8-18:** Hämoglobingehalt und AChE-Aktivität von Humanerythrozyten (Spender STE)

Erythrozyten-Charge Hb-Gehalt	Lagerdauer der Erythrozyten [Tage]	AChE-Aktivität [mU/ $\mu$ mol Hb]
STE <sub>4</sub> 3,17 mM Hb	0	650
	15	620
	30	559
	49	556
	114	540
STE <sub>5</sub> 3,12 mM Hb	0	590
	3	573
	9	570
	20	576
	28	563
	36	571
	58	577
	65	567
	80	517
	100	514
STE <sub>6</sub> 3,19 mM Hb	1	616
	10	567
	17	553
	32	555
	52	531
	59	545
STE <sub>7</sub> 3,16 mM Hb	0	560
	11	535
	22	512
	29	545
	109	463
STE <sub>9</sub> 3,11 mM Hb	1	615
	48	513
	51	535
	106	523

## 8.4 Stabilität der AChE-Aktivität im Enzymreaktor

Tab. 8-19: Abnahme der AChE-Aktivität im Enzymreaktor nach 2-4 Stunden

Versuch	*	AChEmax. [mE]	AChERestakt. [mE]	BWDAG [mE]	BWG-PP [mE]	Restaktivität [%]	Abnahme der Aktivität [%]
1	47	500,5	490,7 nach 125 min	6,4	0,3	98,0	2,0
2	48	505,2	488,2 nach 245 min	7,3	0,2	96,6	3,4
3	49	528,2	519,5 nach 120 min	11,3	0,3	98,3	1,7
4	49	536,4	517,1 nach 140 min	15,4	0,3	96,3	3,7
5	50	536,9	518,1 nach 136 min	5,7	0,2	96,5	3,5
6	50	508,8	494,4 nach 135 min	8,1	0,3	97,1	2,9
7	55	514,5	491,5 nach 137 min	5,4	0,1	95,5	4,5
8	56	524,9	503,9 nach 136 min	9,8	5,7	95,9	4,1
9	56	524,7	506,8 nach 133 min	11,4	5,0	96,5	3,5
10	64	558,4	529,7 nach 137 min	6,2	0,2	94,8	5,2
<b>Mittelwert (n=10)</b>		<b>523,9</b>				<b>96,6</b>	<b>3,4</b>
<b>SD</b>		<b>17,5</b>				<b>1,1</b>	

\*Tage nach Blutabnahme (Charge: STE<sub>9</sub>)

## 8.5 Berechnung der simultan ablaufenden Reaktionen von reversibler Hemmung, Spontanreaktivierung und Phosphorylierung

Für Physostigmin und Pyridostigmin gilt:

$$k_c = \frac{k_2}{1 + \frac{K_{d,obs}}{[Carb.]}}$$

### Physostigmin

$$k_2 = 2,08 \text{ min}^{-1}$$

$$K_{d,obs} = 2,10 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$k_d = 0,041 \text{ min}^{-1}$$

$$k_i = 0,279 \text{ min}^{-1}$$

### Pyridostigmin

$$k_2 = 0,431 \text{ min}^{-1}$$

$$K_{d,obs} = 5,876 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$k_d = 0,026 \text{ min}^{-1}$$

$$k_i = 0,279 \text{ min}^{-1}$$

**Tab. 8-20:** Berechnung des Grades der Vorhemmung mit Physostigmin und der Restaktivitäten nach gleichzeitiger Hemmung mit Physostigmin und Paraoxon (1  $\mu\text{M}$ ) unter Berücksichtigung der simultan ablaufenden Reaktionen von Carbamoylierung, Decarbamoylierung und Phosphylierung (Maple 9.0)

Physostigmin [ $\mu\text{M}$ ]	$k_c$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	Vorhemmung PHY [%] t= 60	Restakt. PHY+Px [%] t=90
0,01	0,00986	16,8000	1,1000
0,02	0,01962	31,5150	1,8350
0,03	0,02930	41,0700	2,3540
0,04	0,03888	48,2800	2,7320
0,05	0,04837	53,8900	3,0120
0,06	0,05778	58,3500	3,2250
0,07	0,06710	61,9800	3,3880
0,08	0,07633	64,9900	3,5150
0,09	0,08548	67,5600	3,6160
0,1	0,09455	69,7200	3,6940
0,15	0,13867	77,1800	3,8950
0,2	0,18087	81,5200	3,9320
0,25	0,22128	84,3700	3,9000
0,3	0,26000	86,3800	3,8390
0,4	0,33280	89,0400	3,6840
0,5	0,40000	90,7000	3,5270
0,6	0,46222	91,8490	3,3810
0,7	0,52000	92,6920	3,2490
0,8	0,57379	93,3770	3,1320
0,9	0,62400	93,8350	3,0280
1	0,67097	94,2420	2,9360
2	1,01463	96,1160	2,3830
3	1,22353	96,7580	2,1330
4	1,36393	97,0820	1,9910
5	1,46479	97,2770	1,8990
10	1,71901	97,6710	1,7020
100	2,03722	98,0270	1,5060

**Tab. 8-21:** Berechnung des Grades der Vorhemmung mit Pyridostigmin und der Restaktivitäten nach gleichzeitiger Hemmung mit Pyridostigmin und Paraoxon (1  $\mu\text{M}$ ) unter Berücksichtigung der simultan ablaufenden Reaktionen von Carbamoylierung, Decarbamoylierung und Phosphylierung (Maple 9.0)

Pyridostigmin [ $\mu\text{M}$ ]	$k_c$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	Vorhemmung PYR [%] t= 120	Restakt. PYR+Px [%] t=150
0,01	0,00073	2,6	0,16
0,02	0,00146	5,1	0,29
0,03	0,00219	7,5	0,41
0,04	0,00291	9,75	0,52
0,05	0,00364	-	-
0,06	0,00436	14,1	0,74
0,07	0,00507	-	-
0,08	0,00579	18,0	0,94
0,09	0,00650	-	-
0,1	0,00721	19,00	0,990
0,15	0,01073	28,80	1,480
0,2	0,01419	35,00	1,780
0,25	0,01759	40,20	2,020
0,3	0,02094	44,40	2,220
0,4	0,02747	51,30	2,530
0,5	0,03380	56,50	2,750
0,6	0,03993	60,50	2,910
0,7	0,04588	63,80	3,030
0,8	0,05165	66,50	3,130
0,9	0,05725	68,70	3,200
1	0,06268	70,70	3,260
2	0,10945	80,80	3,440
3	0,14567	84,90	3,410
4	0,17456	87,00	3,350
5	0,19814	88,40	3,280
10	0,27148	91,30	3,070
100	0,40708	94,00	2,690

**Huperzin A**

$$k_c = k_{i, \text{obs}}$$

$$k_d = k_{\text{off}} = 0,15 \text{ min}^{-1}$$

$$k_i = 0,279 \text{ min}^{-1}$$

**Tab. 8-22:** Berechnung des Grades der Vorhemmung mit Huperzin A und der Restaktivitäten nach gleichzeitiger Hemmung mit Huperzin A und Paraoxon (1  $\mu\text{M}$ ) unter Berücksichtigung der simultan ablaufenden Reaktionen von reversibler Hemmung, spontaner Reaktivierung und Phosphylierung (Maple 9.0)

Huperzin A [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{i, \text{obs}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	Vorhemmung HupA [%] t= 60	Restakt. HupA+Px [%] t=90
0,01	0,04	21,05	0,664
0,025	0,10	40,00	1,50
0,025	0,11	42,30	1,62
0,05	0,21	58,30	2,63
0,1	0,36	70,59	3,55
0,25	0,84	84,85	4,36
0,5	1,43	90,51	4,11
1	2,02	93,09	3,68

# LEBENS LAUF

Saskia Tracy Eckert, geboren am 08.01.1976 in München  
als Tochter von Helmut G. Eckert und Elaine J. Eckert, geb. Underwood.

## Schul Ausbildung:

1982-1986     Grundschule am Kirchplatz in Ismaning  
1986-1995     Werner-Heisenberg-Gymnasium in Garching  
1995            Abitur

## Hochschul Ausbildung:

1995-1996     Studium der Amerikanistik an der Ludwig-Maximilians-Universität in  
                  München  
1996-1997     Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in  
                  München  
1997-2000     Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen Universität München  
                  (Garching)  
1998            Lebensmittelchemische Vorprüfung  
  
10/2000        Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker  
  
02/01-07/01   1. Hälfte der praktischen Ausbildung für staatlich geprüfte  
                  Lebensmittelchemiker am Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der  
                  Bundeswehr in München  
  
08/01-01/02   2. Hälfte der praktischen Ausbildung für staatlich geprüfte  
                  Lebensmittelchemiker am Landesuntersuchungsamt für das Gesund-  
                  heitswesen Südbayern in Oberschleißheim  
  
2002            Zweite Staatsprüfung für staatlich geprüfte Lebensmittelchemiker (gemäß  
                  Ausbildungs- und Prüfungsordnung)

Seit 16.09.02 arbeite ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Walther-Straub-Institut für  
Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der  
Leitung von Prof. Dr. P. Eyer an der vorliegenden Dissertation.