

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

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

**Kinetische Untersuchungen der Acetylcholinesteraseaktivität im Blut und
im Muskel von Mäusen in vitro** bei Hemmung der Enzymaktivität durch
Paraoxonethyl, Reaktivierung durch Obidoxim, sowie Bestimmung der
Aktivitäten von Paraoxonase und Arylesterase im Mausplasma

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Gundruna Flux (geb. Németh)

aus
Budapest (Ungarn)

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Franz Worek

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Kai Kehe

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

30.11.2022

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Franz Worek möchte ich in besonderem Maße für das entgegengebrachte Vertrauen und die zu jeder Zeit exzellente Betreuung danken. Seine engagierte Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas hat mir Fähigkeiten zu systematischem, wissenschaftlichem Denken und Arbeiten vermittelt und hat mein Interesse an der Pharmakologie und Toxikologie bestärkt. Ich bedanke mich insbesondere für die stets prompte Beantwortung meiner Fragen – gerade zu den notwendigen Grundlagen.

Ich danke Prof. Dr. med. Horst Thiermann, dem damaligen Leiter des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr in München, dass ich meine Doktorarbeit am Institut machen durfte.

Auch den Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr möchte ich danken, die mir bei meinen ersten Schritten im Labor geduldig geholfen haben und bei allen Problemen und Fragen zur Seite standen – hier insbesondere Frau Hannig, die mir grundlegende Fertigkeiten beibrachte, bevor ich mit den eigentlichen Untersuchungen begann und Frau Herkert, die mir das dynamische Modell detailliert erklärte.

Zudem danke ich Frau Jana Weber für die Einblicke in die Grundlagen der Chemie und den geistigen Austausch.

Dank gebührt auch meinem Ehemann Alexander, der mir jederzeit zur Seite stand, mir die Zeit ermöglichte, damit ich an der Doktorarbeit weiterschreiben konnte und immer dazu bereit war, mir bei den technischen Details – insbesondere im Umgang mit Word und Excel – beratend zur Seite zu stehen. Meinen Söhnen danke ich in diesem Zusammenhang für ihre Geduld.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, die es mir ermöglicht haben da zu stehen, wo ich jetzt bin und die mich in jeder Situation uneingeschränkt unterstützen und bestärken.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Organophosphate.....	1
1.2 Wirkung von Organophosphaten	2
1.3 Therapie von Vergiftungen mit Organophosphaten.....	4
1.4 Probleme der Therapie	6
1.5 Arylesterase und Paraoxonase.....	7
1.6 Speziesunterschiede	8
2. Fragestellung	9
3. Materialien und Methoden	10
3.1 Materialien.....	10
3.1.1 Verwendete Geräte und Labormaterialien	10
3.1.1.1 Allgemeine Geräte und Labormaterialien	10
3.1.1.2 Photometer.....	10
3.1.1.3 Dynamisches Modell mit photometrischer Bestimmung der Aktivitäten ...	11
3.1.2 Pufferlösungen, Reagenzien, Enzympräparate.....	12
3.1.2.1 Pufferlösungen	12
3.1.2.2 Reagenzien.....	13
3.1.2.3 Enzympräparate	14
3.1.2.4 Sonstige.....	15
3.2 Methoden.....	15
3.2.1 Herstellung der Enzympräparate	15
3.2.1.1 Herstellung membrangebundener AChE aus Maus-Erythrozyten	15
3.2.1.2 Herstellung von verdünnten Maus-Erythrozyten.....	16
3.2.1.3 Aufbereitung Intercostalmuskulatur Maus	16
3.2.2 Kolorimetrische Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität.....	16
3.2.2.1 Acetylcholinesterase - Aktivität aus Ghosts	16
3.2.2.2 Butyrylcholinesterase - Aktivität aus Plasma	17
3.2.2.3 Acetylcholinesterase - Aktivität aus Erythrozyten-Verdünnung	17
3.2.3 Michaelis-Menten-Kinetik mit Maus-Erythrozyten-AChE	17

4.2.4.3 Arylesterase- und Paraoxonase-Aktivität.....	38
4.2.5 Dynamisches Modell	38
4.2.5.1 Versuche mit Maus-Erythrozyten-AChE.....	38
4.2.5.1.1 Stabilität der Maus-AChE (AChE-Max).....	38
4.2.5.1.2 Hemmung der Maus-AChE mit 2µM PXE (Hemmung-PXE)	39
4.2.5.1.3 Hemmung und Reaktivierung der Maus-AChE mit 2 µM PXE und 10 µM Obidoxim (Ery-AChE-PXE-Obi)	40
4.2.5.2 Versuche mit Maus-Muskel-AChE.....	42
4.2.5.2.1 Stabilität der Maus-Muskel-AChE (Muskel-AChE).....	43
4.2.5.2.2 Hemmung der Maus-Muskel-AChE mit 2µM PXE (Muskel-PXE)	43
4.2.5.2.3 Hemmung und Reaktivierung der Maus-Muskel-AChE mit 2 µM PXE und 10 µM Obidoxim (Muskel-AChE-PXE-Obi)	45
5. Diskussion	47
5.1 Substrataffinität zu ASCh	47
5.2 Versuche zur Hemmung.....	48
5.3 Untersuchungen am Mausplasma	50
5.4 Alterung und Spontanreaktivierung	52
5.5 Versuche zur Oxim-induzierten Reaktivierung	53
6. Zusammenfassung.....	57
7. Abkürzungsverzeichnis	60
8. Literatur	61

1. Einleitung

1.1 Organophosphate

Phosphororganische Verbindungen (Organophosphate) sind – neben chlorierten Kohlenwasserstoffen, Carbamaten und anderen Verbindungen – eine Gruppe von modernen, synthetischen Stoffen, die als Pestizide weltweit verwendet werden. (Atkins und Beran, 1998) Über vier Millionen Tonnen Pestizide werden hauptsächlich in der Landwirtschaft pro Jahr weltweit eingesetzt. (Pestizid-Atlas, 2022)

Häufig verwendete Organophosphate sind beispielsweise Parathion (E 605) und seine Methyl- und Ethyl-Derivate; Phoxim, Dichlorvos (DDVP), Fenthion, Chlorpyrifos sowie Tetraethylpyrophosphat (Bladan). (Stark, 1984)

Paraoxon (E 600) ist das aktive Metabolit des Insektizides Parathion (E 605) [Abb.1] und eines der potentesten Acetylcholinesterase-inhibierenden Insektizide mit etwa 70 % Potenz von Sarin. Es ist eine rötlich gelbe, ölige Flüssigkeit mit leicht fruchtigem Geruch, welches in Äther und anderen organischen Lösungsmitteln gut löslich ist und als Kontaktgift leicht über die Haut aufgenommen wird, jedoch auch über die Lunge und den Magen-Darm-Trakt. (National Center for Biotechnology Information, 2004) (CAMEO Chemicals, 1992) (Sax und Lewis, 1987) (Merck Co., 1983)

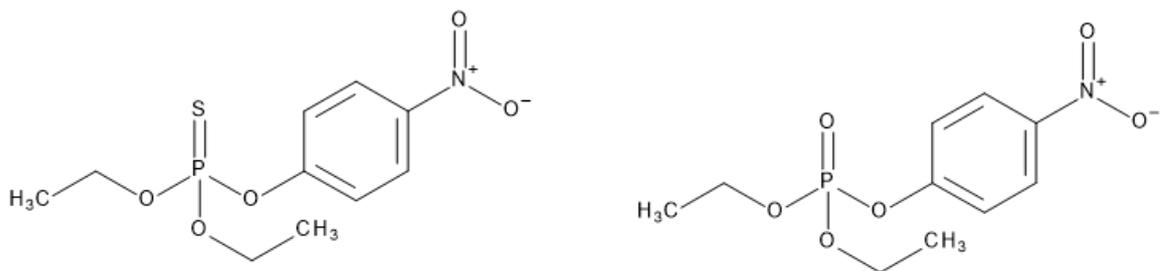


Abb.1 Aus Parathion entsteht durch Desulfurierung Paraoxon

Zwar ist in der Europäischen Union Parathion seit 2003 nicht mehr verkehrsfähig, da es als „möglicherweise krebserzeugend“ (Gruppe 2B) eingestuft wurde, dennoch wird es in anderen Ländern - u.a. in Asien, Afrika, Südamerika und den USA - häufig eingesetzt, da es zu einem relativ günstigen Preis erhältlich ist. (IARC – WHO, 2015) (Balali-Mood, 2012) (Wille *et al.*, 2011)

Die Zahl der Vergiftungen durch Organophosphate liegt zwischen 750 000 und mehr als 3 Millionen pro Jahr, darunter gibt es etwa 20 000 bis 200 000 Tote. (Forget, 1991) (Thiermann, 1999) (Kwong, 2002) (WHO, 2019) (Zilker und Hibler, 1996) Schätzungsweise betreffen 99 % der Todesfälle unter den Vergiftungen Personen in Entwicklungsländern. Ursachen hierfür sind die enge räumlichen Nähe von Anwendungsgebiet und Siedlungen sowie nicht sachgemäße Lagerung der Pestizide. Auch Auswirkungen chronischer Exposition sind noch nicht ausreichend untersucht. (De Silva, 2006)

Neben akzidentellen Vergiftungen durch die Anwender in der Landwirtschaft gibt es vor allem absichtliche Vergiftungen im Rahmen von Suizidversuchen. Beispielsweise waren 2003 6 von 7 gemeldeten Todesfällen durch Phosphorsäureester, welche als Insektizide erworben worden waren, Suizide. (Hahn *et al.*, 2009)

Weltweit sind Pestizide für mindestens 1 von 7 Suiziden verantwortlich, wobei ein erheblicher Unterschied in der Verteilung der Häufigkeiten zwischen West-Pazifik-Region mit 48,3 % aller Suizide und 0,9 % in Europäischen Ländern jeweils mit geringem bis mittlerem Einkommen besteht. (Eddleston *et al.*, 2017)

Hinzu kommt die Gefahr, dass auch potentiell große Teile der Bevölkerung Ziel von Vergiftungen durch terroristische Anschläge, bei denen Organophosphatverbindungen eingesetzt werden, sein können. Beispielsweise durch Tabun/Sarin/VX jedoch auch durch Paraoxon, welches durch Project Coast während der Apartheid in Südafrika 1989 als Kampfstoff eingesetzt wurde. (Gould und Folb, 2002)

1.2 Wirkung von Organophosphaten

Im Organismus ist Acetylcholin als Neurotransmitter an der motorischen Endplatte und in vegetativen Neuronen fast ausschließlich exzitatorisch wirksam. Acetylcholin bindet dabei an den Rezeptor der postsynaptischen Nervenzelle, mit dem Rezeptor verbundene Natriumkanäle werden geöffnet und durch den Natriumeinstrom in die Zelle kommt es zu einer Depolarisation und Auslösung eines Aktionspotenziales. Im parasympathischen Nervensystem gibt es an den Erfolgsorganen cholinerge Muscarin-Rezeptoren, an der motorischen Endplatte der Skelettmuskulatur und in vegetativen Ganglien gibt es cholinerge Nikotin-Rezeptoren. (Trepel, 2004)

Nach der Signalübertragung katalysiert das Enzym Acetylcholinesterase die Hydrolyse von Acetylcholin zu Acetat und Cholin [Abb.2], wobei es eine esteratische und eine anionische Bindungsstelle (für Cholin) gibt. Hierbei wird zunächst Cholin freigesetzt, von der präsynaptischen Nervenzelle wiederaufgenommen und zu Acetylcholin umgebaut, Acetat diffundiert nach der langsameren Freisetzung über den postsynaptischen Spalt. (Bieg und Maelicke, ohne Datum)

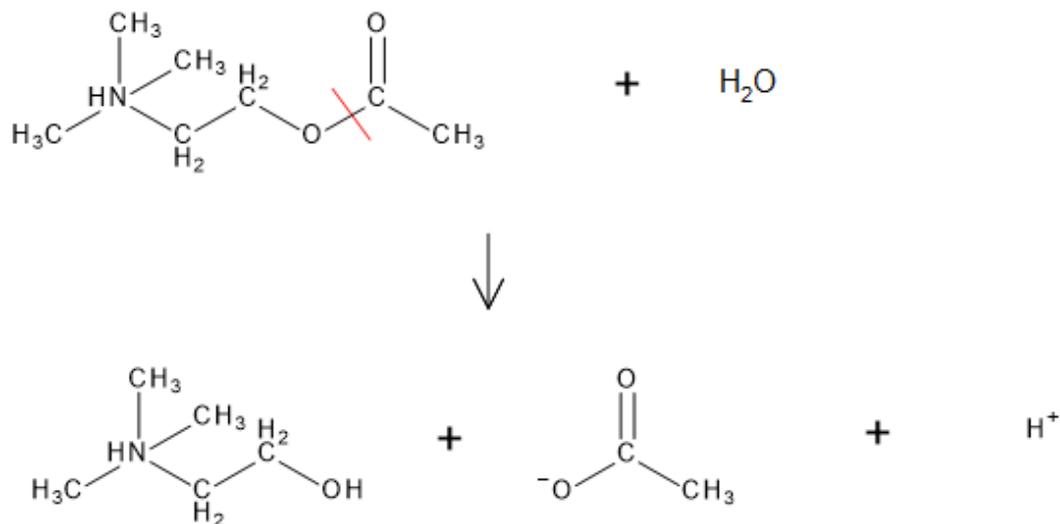


Abb.2 Hydrolyse von Acetylcholin zu Acetat und Cholin

Bei einer Vergiftung durch Organophosphate wird die Acetylcholinesterase irreversibel gehemmt, dadurch findet kein Abbau von Acetylcholin im synaptischen Spalt statt, was zu einer Dauererregung mit der Folge einer cholinergen Krise führt. Symptome einer Vergiftung mit Organophosphaten sind demnach zunächst Miosis, Kopfschmerzen, Augenschmerzen, Schweißausbrüche, Hypersalivation, vermehrte Tränensekretion, Diarrhoe, Erbrechen, Muskelzuckungen und schmerzhafte Muskelkrämpfe. Die Herz-Kreislauffunktion kann durch Bradykardie und Blutdruckabfall gestört sein. Im Verlauf kommt es ohne Therapie bei schweren Vergiftungen zum Tod durch Atemversagen auf 3 Ebenen: zentrale Atemlähmung, periphere Lähmung der Atemmuskulatur, periphere Bronchokonstriktion und Bronchorrhoe. (Masuhr und Neumann, 2007)

Auch Langzeitfolgen nach Vergiftungen mit Organophosphaten in Form von psychiatrischen Auffälligkeiten – Depressionen, Störungen aus dem schizophrenen Formenkreis, neurokognitive Störungen und Exazerbation bei vorbestehenden psychiatrischen Erkrankungen – wurden vorbeschrieben. (Ballantyne und Marrs, 1992)

Die **Butyrylcholinesterase** (auch Pseudocholinesterase genannt) kommt im Blutplasma und in vielen Geweben, u.a. in der Leber, der Darmschleimhaut und dem Pankreas, vor und kann neben Acetylcholin verschiedene Ester spalten. (Darvesh *et al.*, 2003). Sie wird zwar in der Regel durch Organophosphate gehemmt, jedoch ohne offensichtlichen wesentlichen Funktionsverlust, kann sich schneller regenerieren als die AChE und wird von manchen Giften nicht so stark gehemmt wie die AChE. (Jeyaratnam und Maroni, 1994). Allerdings wird die Aktivität der Butyrylcholinesterase häufig bestimmt, obwohl sie in der Regel nicht zur Abschätzung der Schwere der Vergiftung und damit zur Prognose verwendet werden kann, um im Verlauf bei Wiederanstieg der BChE-Aktivität einen Hinweis darauf zu erhalten, wann das Gift eliminiert ist. (Eddleston, Buckley *et al.*, 2008) (Eddleston, Eyer, *et al.*, 2008) (Aurbek *et al.*, 2009)

1.3 Therapie von Vergiftungen mit Organophosphaten

Die Standardtherapie erfolgt mit Atropin 2 mg iv, initial sollten alle 5 Minuten die Vitalparameter (Blutdruck, Puls) gemessen, die Pupillenweite, das Ausmaß des Schwitzens und der Auskultationsbefund der Lunge erhoben werden. Bei ausbleibender Besserung sollte die Atropindosis alle 5–10 min verdoppelt werden, bis klinische Zeichen einer Atropinisierung festzustellen sind, i.e. Tachykardie, Flush, Mydriasis, Blutdruckanstieg. Im weiteren Verlauf sollten 10–20 % der benötigten Dosis pro Stunde gegeben werden. (Eddleston, Buckley *et al.*, 2008)

Parallel sollte ein Oxim verabreicht werden – beispielsweise Obidoxim 250 mg iv als Bolusgabe und anschließend kontinuierlich 750 mg/24 h. (Thiermann *et al.*, 1999)

Je nach klinischem Bild kann auch eine intensivmedizinische Behandlung mit Beatmung notwendig werden und ist in der Regel bei schweren Vergiftungen aufgrund der Atemdepression zwingend erforderlich. Die zusätzliche Gabe eines Benzodiazepins ist sinnvoll zur Krampfprophylaxe und aufgrund der sedierenden Wirkung.

Atropin bindet reversibel an die meisten peripheren und teilweise auch an zentrale muskarinische ACh-Rezeptoren, ohne ein Aktionspotenzial auszulösen, ist jedoch unwirksam an nikotinischen ACh-Rezeptoren.

Hierzu wurde seit den 1950er Jahren nach spezifischen Gegenmitteln gesucht und Oxime als wirksame Antidote entwickelt und untersucht. Diese führen durch Reaktivierung des Enzyms Acetylcholinesterase dazu, dass die Signalübertragung auch an nikotinischen Synapsen wiederhergestellt werden kann.

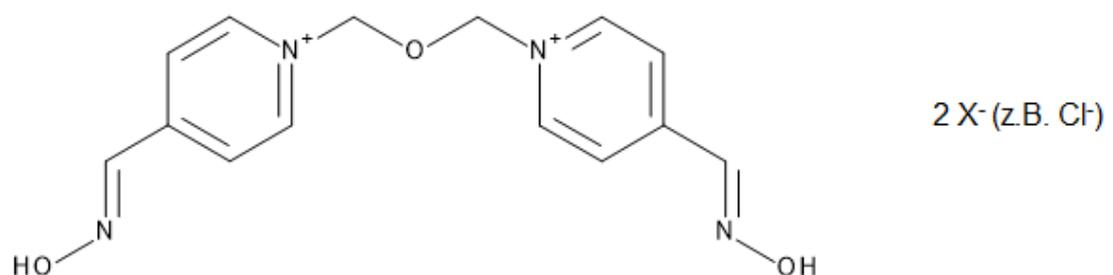


Abb.3 Obidoxim

Obidoxim [Abb.3] wurde durch Lüttringhaus und Hagedorn in den 60er Jahren hergestellt und durch Erdmann und von Clarmann untersucht. Es ist eines der aktivsten Reaktivatoren bei Vergiftungen mit Organophosphat-Insektiziden. (Lüttringhaus und Hagedorn, 1964) (Erdmann und von Clarmann, 1963)

Die Oxim-induzierte Reaktivierung ist in Abb.4 schematisch dargestellt, hierbei ist das Oxyanion-„Loch“, das zur Polarisierung des Phosphonyl-Sauerstoffes in der Übergangsphase führt, von Bedeutung für eine gute Reaktivierbarkeit. Durch sterische Behinderungen laufen die Reaktionen mit Oximen bedingt durch die Struktur der aktiven Stelle der Acetylcholinesterase langsam ab. Bei einer Vergiftung durch Paraoxon scheint es auch zu Strukturveränderungen der Acyl-Bindungsstelle mit zusätzlicher Verengung der aktiven Stelle und Behinderung der Reaktivierung zu kommen. (Franklin *et al.*, 2016)

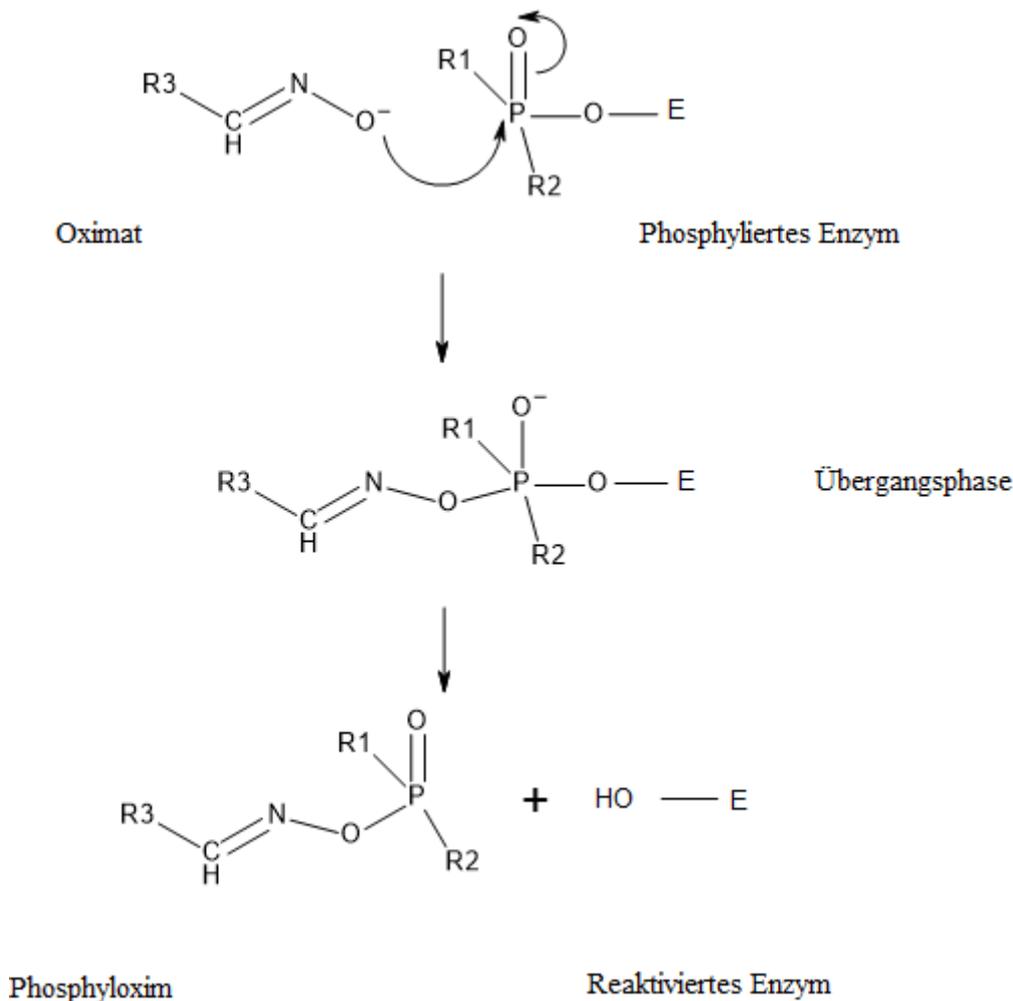


Abb.4 Schematische Darstellung der Oxim-induzierten Reaktivierung – Zunächst erfolgt bei der Reaktivierung ein nukleophiler Angriff des Oximates auf Phosphor, es bildet sich in der Übergangsphase ein Komplex mit 5 Bindungen, bevor die Spaltung in das reaktivierte Enzym und das Phosphoryloxim erfolgt. (Abb. analog zu Eyer und Worek, 2007)

Ein guter Zugang zur Acyl-Bindungsstelle ist wichtig für die Effektivität von Oximen wobei es Unterschiede bei verschiedenen Spezies gibt. Daher sind durch unterschiedliche Seitenketten an der aktiven Stelle große Unterschiede in der Reaktivität vorhanden. (Eyer und Worek, 2007)

Aufgrund verschiedener Probleme der Oximtherapie – unter anderem deren eigener Toxizität und da nicht jedes Oxim gegen jedes Gift gut wirkt – wird neben Kombinationstherapien (Bohnert *et al.*, 2020) auch an Alternativen geforscht.

Bezüglich neuer Therapiemethoden scheinen sog. „Bioscavenger“, die Organophosphate bereits vor Erreichen der Acetylcholinesterase „abfangen“ und hydrolysieren – beispielsweise die Butyrylcholinesterase (Pseudocholinesterase), Abwandlungen von Paraoxonasen sowie Phosphotriesterasen wie Opda (Masson, 2015) – vielversprechend bei der Entgiftung zu sein. Opda ist *in vitro* als sehr effektiv bei der Hydrolyse von Pestiziden, aber auch einigen Nervenkampfstoffen getestet worden. Zudem wurden bereits Studien an Tiermodellen *in vivo* (Ratte, Minipig, Affen) durchgeführt. (Eddleston *et al.*, 2020) (Wille *et al.*, 2012) (Bird *et al.*, 2008) (Jackson *et al.*, 2014) (Stigler *et al.*, 2021) (Escher, 2021)

Bezüglich der Behandlung von Vergiftungen wurden zudem diverse Studien durchgeführt, wobei unter anderem ein Hinweis auf eine geringere Mortalität bei zusätzlicher Behandlung mit hohen Dosen Magnesium (bis zu 16 g/d) gefunden wurde, sowie ein positiver Effekt von Salbutamol-Gabe inhalativ zur unterstützenden Behandlung der pulmonalen Effekte vermutet wird. (Eddleston und Chowdhury, 2016)

1.4 Probleme der Therapie

Zu beachten ist, dass die Oximgabe möglichst bald nach der Exposition zum Gift erfolgen sollte, da eine Reaktivierung nach abgelaufener Alterung, d.h. irreversibler Hemmung der AChE durch Abspaltung des Alkyl-Restes bei Hydrolyse der Alkyl-Ester-Verbindung, nicht möglich ist. Die Halbwertszeit für die Alterung von AChE bei Hemmung durch Paraoxon beim Menschen liegt bei 31 Stunden. (Worek *et al.*, 1997)

Auch darf die Therapiedauer nicht zu kurz sein – hier ist die kurze Halbwertszeit der Oxime zu berücksichtigen, welche bei Obidoxim beispielsweise 1,5 – 2,5 Stunden beträgt. Deshalb sind – wie oben beschrieben – eine kontinuierliche Gabe nach initialer Bolusgabe oder – falls dies nicht möglich sein sollte – wiederholte Gaben anzustreben. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Reaktivierung auch noch bis zu 7 Tage nach einer Vergiftung möglich ist, wobei klinische Zeichen für eine Vergiftung bereits bei Erreichen einer Aktivität von 20 % der normalen AChE-Aktivität nicht mehr zu beobachten waren. (Thiermann *et al.*, 1999)

Klinisch zu berücksichtigen sind auch die Nebenwirkungen der Oximgabe selbst – Hypästhesien, Parästhesien, Mundtrockenheit, Anstieg von Blutdruck und Puls und in seltenen Fällen kardiale Nebenwirkungen wie AV-Block II° und VHF. (Eyer und Worek, 2007) Hohe Dosen von Obidoxim (> 8 mg/kg initial und 2 mg/kg/h im Verlauf) sollten aufgrund der möglichen Hepatotoxizität vermieden werden. (Balali-Mood und Shariat, 1998)

In in-vitro-Untersuchungen wurde außerdem beobachtet, dass es durch die Bildung von Phosphoryloximen (POX) im Rahmen der Therapie durch deren eigene Hemmwirkung auf die AChE zu Verschlechterung nach initialer Verbesserung kommen kann. Dieser Effekt ist jedoch in vivo bislang nicht nachgewiesen worden. (Wille, Thiermann und Worek, 2011)

In vitro fanden Kiderlen et al. (2005) eine sehr hohe inhibitorische Potenz von DEP-Obidoxim (Diethylphosphoryl-Obidoxim), welches im Rahmen der Reaktivierung entsteht, die bei etwa $7,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei 37°C zu liegen scheint und somit deutlich höher ist als die inhibitorische Potenz von Paraoxon selbst, die beim Menschen mit $2,26 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ vorbeschrieben ist. (Mast, 1997) Der Therapieerfolg scheint ferner abhängig von der POX-Hydrolase-Aktivität zu sein. (Kiderlen, Eyer und Worek, 2005) Diesbezüglich sind auch die Enzyme Paraoxonase und Arylesterase von Relevanz.

1.5 Arylesterase und Paraoxonase

Arylesterase und Paraoxonase sind Enzyme, die zu den sog. „A-Esterasen“ gehören, welche Organophosphate hydrolysieren können [Abb.5] und dadurch in vivo schützend gegen Vergiftungen wirken. (Eto, 1974) Die Arylesterasen kommen im endoplasmatischen Retikulum in der Leber und anderen Geweben vor und sind im Blut in der Regel an HDL-Cholesterin gebunden. Je höher die Aktivität der Paraoxonase und Arylesterase, desto weniger Gift kommt in Blut und damit im Gehirn an. (Ballantyne und Marrs, 1992) Die genaue Rolle dieser Enzyme ist eigentlich unklar und Gegenstand verschiedenster Forschungsarbeiten. Sie haben scheinbar anti-entzündliche, anti-oxidative, anti-atherogene und organophosphat-hydrolysierende Eigenschaften. Es existieren unter anderem Studien zu ischämischem Schlaganfall, Bluthochdruck, kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes, Krebs, dermatologischen Erkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen, Depressionen. Beim Menschen sind bis jetzt drei Formen der Paraoxonase (PON) identifiziert worden, die in unterschiedlichen Geweben vorkommen und auch unterschiedliche Substrate haben. Dabei sind für PON1 vor allem die Paraoxonase- und die Arylesteraseaktivität charakteristisch. (Hülsmann, 2009)

Paraoxonase und Arylesterase können unter anderem auch die Hydrolyse von DEP (Diethylphosphoryl)-Obidoxim – welches bei der Reaktion von Obidoxim mit Paraxonethyl-gehemmter AChE entsteht – zu Diethyl-Phosphorsäure und Obidoxim katalysieren. (Kiderlen, Eyer und Worek, 2005) (Luo *et al.*, 1999)

Interessant ist dabei auch, dass es beim Menschen einen genetischen Polymorphismus gibt. Je nachdem, ob sich an Stelle 192 Glutamin (Q) oder Arginin (R) befindet, wurden unterschiedlich hohe Aktivitäten gesehen. Bei „RR“ geht man von einer 8 – 9 fach höheren Aktivität als bei „QQ“ aus, heterozygote Träger liegen dazwischen. (Burns *et al.*, 2013)

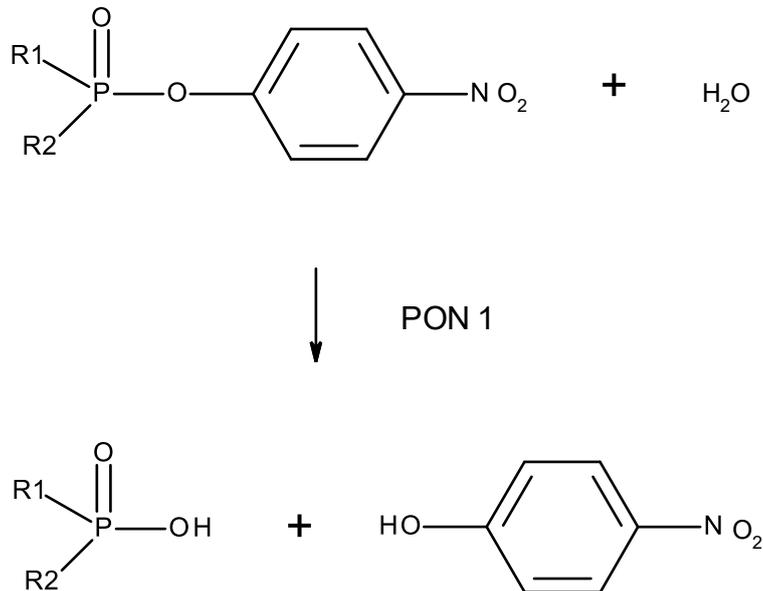


Abb.5 Hydrolysereaktion

1.6 Speziesunterschiede

Insgesamt gibt es auch deutliche Unterschiede der inhibitorischen Potenz von Organophosphaten, (Worek, 2004) bezüglich der Affinität der AChE zu den verschiedenen Oximen und somit auch der Reaktivität, so, wie es auch Unterschiede des strukturellen Aufbaus der Acetylcholinesterase zwischen verschiedenen Spezies, welche dazu führen, dass Reaktionen unterschiedlich schnell ablaufen. (Worek *et al.*, 2002) (Worek, 2004) (Worek, Diepold und Eyer, 1999) (Herkert *et al.*, 2010) (Herkert *et al.*, 2009) (Worek *et al.*, 2011) (Aurbek *et al.*, 2006)

Dawson (1994) verglich anhand diverser in-vivo-Studien, in welchen als Versuchstiere fast ausschließlich Nagetiere verwendet wurden, die Effektivität verschiedener Oxime mit und ohne kombinierter Gabe von Atropin (und Diazepam) bei Vergiftung mit Nervenkampfstoffen und Reaktivierung mit verschiedenen Oximen. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede je nach verwendetem Gift und Oxim, aber auch bei den verschiedenen Spezies.

Auch Carboxylesterasen, die eine Rolle bei der Entgiftung spielen, kommen beispielsweise in Nagetieren – also auch bei der Maus – in deutlich höherer Konzentration vor, als beim Menschen. (Hatfield *et al.*, 2016)

2. Fragestellung

Für die enzymkinetischen Untersuchungen wurden Mausblut und Mausmuskel-Präparate verwendet, um zu untersuchen, ob eine Vergleichbarkeit von erythrozytärer und muskulärer AChE bei der Maus und eine Vergleichbarkeit zum Menschen vorliegt und ob daher die Maus geeignet ist, um Versuche zur Therapieoptimierung und Entwicklung neuer Oxime durchzuführen, da diese aus ethischen Gründen nicht an Menschen vorgenommen werden können. Ausgangspunkt der Versuche war die Frage, ob zwischen humaner und Maus-AChE Unterschiede bezüglich Hemmung, spontaner und Oxim-induzierter Reaktivierung und Alterung bestehen.

Auch in der Vergangenheit wurden Versuche an Tiermodellen vorgenommen. Hierzu wurde der Vergleich kinetischer Konstanten genutzt, die für die verschiedenen, teils gleichzeitig ablaufenden Reaktionen, bestimmt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit erythrozytärer AChE aus Mausblut folgende kinetische Reaktionen untersucht und die entsprechenden Konstanten berechnet:

1. **Hemmung** von AChE durch Paraoxonethyl (k_i)
2. **Reaktivierung** von Paraoxonethyl-gehemmter AChE durch Obidoxim (k_r, K_D)
3. **Spontanreaktivierung** von Paraoxonethyl-gehemmter AChE mit H_2O (k_s)
4. **Alterung**: irreversible Hemmung Paraoxonethyl-gehemmter AChE (k_a)

Zudem wurden am **dynamischen Modell** (s. Punkt 3.1.1.3) jeweils für erythrozytäre und muskuläre AChE der Maus die Hemmung mit Paraoxonethyl und die Reaktivierung mit Obidoxim untersucht, um lebensnähere Bedingungen zu simulieren und zu untersuchen, ob eine Vergleichbarkeit zwischen der erythrozytären und muskulären Maus-AChE besteht.

Zusätzlich wurden Aktivitäten von **Arylesterase** und **Paraoxonase** im Mausplasma untersucht, da diese Enzyme u.a. auch eine Rolle bei der Verstoffwechslung von Paraoxonethyl (und anderen Organophosphaten) spielen.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Geräte und Labormaterialien

3.1.1.1 Allgemeine Geräte und Labormaterialien

- Eppendorfcups 0,5 und 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zur Aufbewahrung der Enzympräparate
- Luftpolsterpipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für verschiedene Volumina
- Verdrängungspipetten (Gilson, Villieres-le-Bel, Frankreich) für verschiedene Volumina
- Küvetten – Polystyrol (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
und Quarz (Hellma, Freiburg, Deutschland)
- Bechergläser, Messzylinder, braune Glasflaschen (Lichtschutz)
- Dialyseschläuche Visking 8/32, 6 mm (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Sonoplus HD 2070 Ultraschall-Homogenisator (Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland)
- Ultrazentrifuge Optima XL-90 (Beckman, Palo Alto, USA)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)
- BP310S Analysenwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Dispergiergerät Ultra Turrax ® (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
- pH-Meter MP230 mit InLab pH-Stäben (Mettler Toledo, Urdorf, Schweiz)
- Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Magnetrührer (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Absaugpumpe
- Woulff'sche Flasche (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Potterrohr (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Pottergefäß (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)

3.1.1.2 Photometer

Cary 50: UV-VIS-Spektralphotometer der Firma Varian, 190 – 1100 nm mit temperierbarem Küvettenwechsler.

3.1.1.3 Dynamisches Modell mit photometrischer Bestimmung der Aktivitäten (Eckert *et al.*, 2006)

Für die Simulation dynamischer, kinetischer Prozesse wurden Untersuchungen mit erythrozytärer und muskulärer Maus-AChE auch am „Dynamischen Modell“ durchgeführt. Dieses ist ein System, welches aus zwei HPLC Pumpen besteht (LaChrom L-7100 ausgestattet mit quartärem Niederdruckmischer; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), die über ein T-Stück mit einer rostfreien gewundenen Stahl-Kapillare (0,2 mm i.d.; 100 cm) verbunden sind.

Diese Kapillare wurde in ein Wasserbad (37°C) getaucht um die geförderte Flüssigkeit bei konstanter Temperatur zu halten. An die Kapillare wurde ein Partikelfilter (Millex® –GS, 0.22µm, Millex® –GV; Millipore, Eschborn, Deutschland/ Minisart®, 0.2µm; Sartorius AG; Göttingen, Deutschland) angeschlossen und mit Maus-Erythrozyten bzw. Muskelhomogenat beladen [Abb. 6: „E“]. Das nachgeschaltete Photometer (LaChrom L-7420 UV-VIS detector; E. Merck; Darmstadt, Deutschland) war mit einem Computer zur Steuerung und Auswertung der Daten verbunden. Hierzu wurde die HPLC-System-Manager Software D-7000, Version 4.1 von E. Merck benutzt. Die Daten wurden in Microsoft Excel exportiert und mit Hilfe von Prism Version 3.0 (GraphPad Software; San Diego, CA, USA) berechnet.

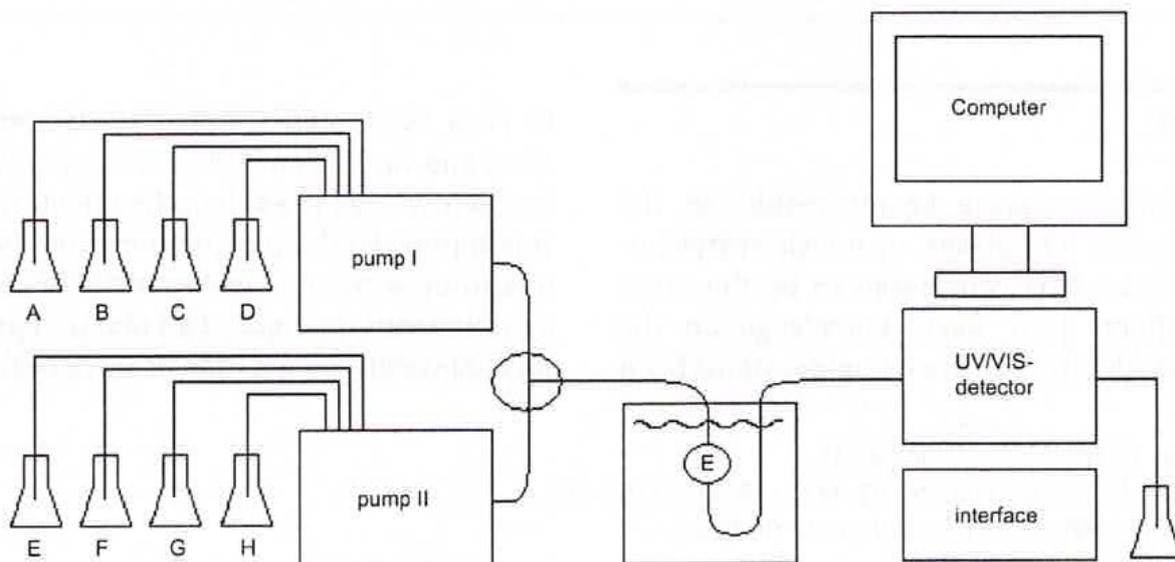


Abb.6 Skizze aus der Studie zur Entwicklung des dynamischen Modells zur Verdeutlichung des Aufbaus. (Eckert *et al.*, 2006)

3.1.2 Pufferlösungen, Reagenzien, Enzympräparate**3.1.2.1 Pufferlösungen**

Wenn nicht anders vermerkt wurden die Laborchemikalien von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

0.1 M Phosphatpuffer pH 7,4 (0.1 M PP)

Mischung aus 2 Stammlösungen: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und KH_2PO_4 .

1: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: MG: 177,9; 17,79 g in 1000 ml Aqua bidest. lösen

2: KH_2PO_4 : MG: 136,1; 13,6 g in 1000 ml Aqua bidest. lösen.

Stammlösung 1 vorlegen und mit Stammlösung 2 auf pH 7,4 einstellen, anschließend die Lösung partikelfrei filtrieren unter Unterdruck unter Verwendung einer Woulff'schen Flasche und eines $0,45 \mu\text{m}$ -Filters (Millipore, Eschborn, Deutschland). Aufbewahrung bei 4°C , 30 min bei Raumtemperatur vor Nutzung.

PP wurde arbeitstäglich partikelfrei filtriert und entgast für die Experimente mit Maus-Muskel-AChE.

Phosphatpuffer 20 mOsmol/kg pH 7,4 \cong 0,0067 M PP (PO)

Sog. „hyposmolarer Puffer“, Verwendung für die Herstellung von Erythrozyten-Ghosts (hämoglobinfreie Erythrozytenmembranen)

1 Teil 0.1 M PP mit pH 7.4 mit 14 Teilen H_2O (reinst) mischen mit Magnetrührer (knapp unter 300 rpm), pH mit 1 M NaOH auf 7.4 einstellen; Aufbewahrung in Glasflaschen bei 4°C , Verwendung ebenfalls kühl.

Dialysepuffer

Endkonzentrationen: 10 mM Phosphatpuffer, 154 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 ; 7.4 pH

Zunächst 100 ml 0,1 M PP (pH 7,4) und 9,0 g NaCl, sowie 500 ml Aqua bidest zusammengenben, dann 147 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ zufügen; schließlich mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen; mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen. Aufbewahrung bei 4°C , 30 min bei Raumtemperatur vor Verwendung.

Für die Versuche am dynamischen Modell:

Gelatinephosphatpuffer

Gelatinephosphatpuffer (GPP) 0,2 % entsprechend 100 mM Endkonzentration wurde arbeitstäglich hergestellt: 400 ml PP auf den Heizrührer bei 40°C ; 0,8 g pulverisiertes Gelatin aus Schweinehaut darin Auflösen in etwa 10 Minuten, anschließend die Lösung partikelfrei filtrieren unter Unterdruck unter Verwendung einer Woulff'schen Flasche und eines $0,45 \mu\text{m}$ -Filters (Millipore, Eschborn, Deutschland).

Für die Versuche zur Arylesterase/Paraoxonase:

0.1 M Tris-Acetat-Puffer

6,05 g Tris [Tris(hydroxymethyl)aminomethan] – MG: 121,1 – in 500 ml Aqua bidest lösen und 44,1 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – MG: 147 ($\cong 0,6 \text{ mM}$) hinzufügen.
Bei 37°C mit konzentrierter Essigsäure auf pH 7,4 einstellen.
Lagerung bei 4°C.

0.2 M Tris-HCl/2 mM CaCl_2

12,1 g Tris in 500 ml Aqua bidest lösen und 147 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ hinzufügen.
Bei 37°C mit HCl auf pH 8,5 einstellen. Lagerung bei 4°C.

0.2 M Tris-HCl/2 mM CaCl_2 /2 M NaCl

12,1 g Tris in 500 ml Aqua bidest lösen und 147 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ hinzufügen.
58,5 g NaCl dazugeben.
Bei 37°C mit HCl auf pH 8.5 einstellen. Lagerung bei 4°C.

3.1.2.2 Reagenzien

Acetylthiocholin-Iodid (ASCh) 63 mM Stammlösung in verschiedenen Konzentrationen, wenn nicht anders angegeben 28,4 mM; MG: 289,2; für die 28,4 mM Lösung wurden 41,12 mg ASCh in 5,0 ml H_2O gelöst.

Für die Versuche am dynamischen Modell:

2.603 g Acetylthiocholin-Iodid + H_2O reinst ad 500 ml (18 mM), Endkonzentration 0.45 mM
Die Aufbewahrung erfolgte bei - 20°C.

Butyrylthiocholin-Iodid (BSCh) 63,2 mM; MG: 317,2; für die 63,2 mM Lösung wurden 200,47 mg BSCh in 10,0 ml H_2O gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei - 20°C.

5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) 10 mM; MG: 396,4 von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland); für die 10 mM Lösung wurden 39,6 mg DTNB in 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer (7,4 pH) gelöst.

Für die Versuche am dynamischen Modell:

475,6 mg DTNB ad 100 ml PP ergaben die 12 mM Stammlösung; arbeitstäglich wurden 10 ml von 12 mM DTNB und 90 ml PP gemischt und zum Entgasen in ein Ultraschallbad gestellt, Endkonzentration 0,3 mM.

Die Aufbewahrung erfolgte in einer braunen Flasche, zur Verhinderung von Photodegradation bei - 20 °C.

O,O-Diethyl-O-4-nitrophenylphosphat (Paraoxonethyl); MG: 275,2;

51,3 mM Stammlösung (Labor Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland), aus welcher, jeweils arbeitstäglich verschiedene Verdünnungen mit Isopropanol hergestellt wurden.

Für die Versuche am dynamischen Modell:

Paraoxonethyl 2 μ M Endkonzentration wurde arbeitstäglich aus einer 3,6 mM Stammlösung hergestellt: 555,6 μ l PXE ad 100 ml H₂O, bis zur Verwendung wurde die wässrige Lösung auf Eis aufbewahrt.

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

94,3 mg Obidoxim wurden in 5 ml Aqua bidest gelöst für die 50 mM Stammlösung, welche bei -60°C aufbewahrt wurde. Aus dieser Stammlösung wurden arbeitstäglich verschiedene Verdünnungen, jeweils mit Aqua bidest hergestellt.

Für die Versuche am dynamischen Modell:

Arbeitstägliche Herstellung von Obidoxim 44,4 μ M aus Stammlösung 20 mM: 111 μ l ad 50,0 ml Aqua bidest; entsprechend einer finalen Konzentration in den Versuchen am dynamischen Modell von 10 μ M.

Soman 5,49 mM; MG: 182,2; zunächst wurde eine 1 mM Lösung aus der Stammlösung hergestellt aus 91,1 μ l Soman (5,49 mM) und 408,9 μ l Aqua bidest; diese wurde dann weiter verdünnt, um eine 10 μ M (100 nM i.A.) wässrige Lösung zu erhalten.

Phenylacetat 8 mM; MG: 136,2; wurde verwendet als Substrat für Arylesterase-Aktivität:

0,1 ml Phenylacetat + 97,5 ml Aqua bidest, lange mischen, Aufbewahrung bei 4°C max. 1 Woche.

3.1.2.3 Enzympräparate

Für die Versuche wurde einerseits von Charles River bezogenes heparinisieretes Mausblut (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet, andererseits selbst gewonnenes Blut und Intercostalmuskulatur von 48 NMRI-Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland).

Es erfolgte zuerst eine Anästhesie der Lebendmäuse mit NO, dann die Gewinnung von Blut aus dem Herzen, um eine möglichst große Menge zu gewinnen, als Gerinnungshemmer wurde Heparin verwendet.

Anschließend wurden Thoraxwandstücke ohne Sternum präpariert, zunächst wurden diese eingefroren und bei -60°C gelagert, später aufbereitet, um diese für Untersuchungen der muskulären AChE am dynamischen Modell zu verwenden.

3.1.2.4 Sonstige

- Dekontaminations-Lösungen:
 - NaOH 5 %: 9 Liter Leitungswasser wurden vorgelegt und unter Rühren mit 1 Liter 50%-iger NaOH-Lösung (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt.
 - NaOCl 12 %: (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) Die gebrauchsfertige Lösung wurde mit Leitungswasser 1:1 verdünnt.
- Isopropanol
- Aqua bidest (eigene Herstellung)

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der Enzympräparate

3.2.1.1 Herstellung membrangebundener AChE aus Maus-Erythrozyten

Etwa 20 ml Mausblut (Charles River) wurden für 10 min bei 4000 rpm (RT) zentrifugiert, das Plasma abpipettiert. Es erfolgte die Messung der BChE-Aktivität (s. 3.2.2.2).

Das Restblut wurde mit PP (0.1 M; 7.4 pH) aufgefüllt und weitere 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt (1. Waschgang).

Im Anschluss erfolgte eine erneute Zugabe von 3,5 ml PP, es wurde 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert und ein weiteres Mal abgesaugt (2. Waschgang); das Ergebnis hiernach waren sogenannte „gepackte Erys“. An dieser Stelle wurde die AChE-Aktivität der Erythrozyten-Verdünnung bestimmt (s. 3.2.2.3).

Diese „gepackten Erys“ wurden 1:20 mit hypoosmolarem Phosphatpuffer (PO) verdünnt und im Magnetrührer 15 – 20 min gemischt, danach auf Ultrazentrifugenröhrchen aufgeteilt und insgesamt 4 Mal bei 31200 rpm (50.000 x g), 4°C für 15 min zentrifugiert, zwischen den Läufen wurde jeweils dekantiert und mit PO aufgefüllt.

Zuletzt wurde mit PP (0.1 M, 7.4 pH) statt mit PO aufgefüllt und zentrifugiert (31200 rpm, 4°C, 15 min), dekantiert, auf dem Vortex® gemischt und die Hämoglobin-freien Erythrozytenmembranen („Ghosts“) in einem Becherglas auf einem Magnetrührer vereinigt und aliquotiert, die Aufbewahrung erfolgte bei - 60°C.

Vor dem Einfrieren erfolgte die Bestimmung der AChE-Aktivität aus Ghosts (s. 3.2.2.1).

Die Materialgewinnung und Verarbeitung – insbesondere der muskulären AChE – war aufgrund der Physiognomie der Mäuse erschwert, was zu Schwierigkeiten in der Versuchsdurchführung mit der Notwendigkeit der Anpassung von Methoden (Hemmung – s. Punkt 3.2.6) führte.

3.2.1.2 Herstellung von verdünnten Maus-Erythrozyten

Selbst gewonnenes Mausblut wurde für 10 min bei 4000 rpm (RT) zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und 2 Mal mit dem doppelten Volumen Phosphatpuffer (0.1 M; 7.4 pH) gewaschen. Anschließend wurden die „gepackten Erythrozyten“ auf 5 g/dl Hb-Gehalt eingestellt, aliquotiert und eingefroren, die Aufbewahrung erfolgte bei - 60°C.

3.2.1.3 Aufbereitung Intercostalmuskulatur Maus

Etwa 3 g Muskel mit Rippen wurden in einem Reagenzglas auf Eis mit 3 ml PP (0,1 M; 7,4 pH) gemischt und für 4 x 10 s im Dispergiergerät (Ultra Turrax ®) zerkleinert und vermischt. Hierbei wurden nach dem 3. und 4. Mal jeweils erneut 3 ml PP hinzugefügt und das Gemisch auf 2 Potterröhrchen aufgeteilt. Diese wurden jeweils 6 x 10 s bei 1100 rpm verarbeitet und auf 50 ml PP aufgefüllt. Die Aufbewahrung erfolgte bei - 60°C.

3.2.2 Kolorimetrische Bestimmung der Cholinesterase - Aktivität

Die im Folgenden detailliert aufgeführten Aktivitätsmessungen wurden nach der modifizierten kolorimetrischen Methode (modifizierte Ellman Methode) durchgeführt.

Als Substrate für die Cholinesterasen wurden für die Bestimmungen Acetylthiocholin respektive Butyrylthiocholin verwendet. Nach der Aufspaltung reagiert Thiocholin mit der als Indikator verwendeten 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB). Hierbei dient die Bildung von 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB-) als gelbem Farbstoff der quantitativen Bestimmung der Cholinesteraseaktivität. (Worek *et al.*, 1999b) (Ellman *et al.*, 1961) (Eyer *et al.*, 2003)

3.2.2.1 Acetylcholinesterase - Aktivität aus Ghosts

Aufgetaute Maus-Erythrozyten-Ghosts wurden zunächst homogenisiert, dann auf Eis gelagert. Ansatz in Polystyrolküvetten:

- 3000µl PP (0,1 M; 7,4 pH)
- 100µl DTNB
- 10µl Ghosts dann
- 50µl ASCh zugeben

Messung der AChE-Aktivität bei 412 nm und 37°C für 1 min.

3.2.2.2 Butyrylcholinesterase - Aktivität aus Plasma

Ansatz in Polystyrolküvetten:

- 3000µl PP (0,1 M; 7,4 pH)
- 100µl DTNB
- 10µl Plasma dann
- 50µl BSCh zugeben

Messung der BChE-Aktivität bei 412 nm und 37°C für 1 min.

3.2.2.3 Acetylcholinesterase - Aktivität aus Erythrozyten-Verdünnung

Erythrozyten in 1:100 Verdünnung, 3960µl ad + 40µl „gepackte Erys“, 5 min bei RT

Ansatz in Polystyrolküvetten:

- 2000µl PP (0,1 M; 7,4 pH)
- 100µl DTNB (10 mM)
- 1000µl Ery-Verdünnung
- nach 10 min 50µl ASCh (28,4 mM)

Messung bei 436 nm, 2 min, 37°C.

3.2.3 Michaelis-Menten-Kinetik mit Maus-Erythrozyten-AChE

Aus der 63 mM Acetylthiocholin-Iodid-Stammlösung (entsprechend 2 mM im Ansatz) wurden verschiedene ASCh-Konzentrationen hergestellt: 0,0025 mM; 0,005 mM; 0,01 mM; 0,014 mM; 0,018 mM; 0,02 mM; 0,03 mM; 0,04 mM; 0,05 mM; 0,075 mM; 0,1 mM; 0,3 mM; 0,4 mM; 0,6 mM; 0,8 mM; 1 mM; 1,5 mM; 2 mM.

Je Konzentration wurden 2 Messreihen durchgeführt.

- 3000µl PP (0.1 M: 7.4 pH)
- 100µl DTNB
- 50µl Maus-Ghosts
- 50µl ASCh

Messung bei 412 nm, 1 min, 37°C.

3.2.4 Herstellung verschiedener Konzentrationen von Paraoxonethyl

Zunächst wurde eine 1 %-ige Verdünnung von Paraoxonethyl mit Isopropanol hergestellt und die Konzentration dieser bestimmt.

Hierzu wurde der Gehalt photometrisch bei einer Wellenlänge von 273 nm bestimmt (Cary 50; Programm „scan“, 200 - 400 nm), wobei eine Referenzküvette mit 3 ml PP und 30 µl Isopropanol und eine Küvette mit 3 ml PP und 30 µl der Probe (1:100 Verdünnung von PXE) verwendet wurden. Unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von Paraoxonethyl ($\epsilon_{274\text{nm}} = 9.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Merck-Index 1989) wurde die Konzentration der Paraoxon-Lösung bestimmt.

Aus dieser Stammlösung wurden arbeitstäglich jeweils weitere Verdünnungen für die Versuche (Vergiftung und Hemmkinetiken) hergestellt. Die Lagerung erfolgte in einem lichtgeschützten Glasgefäß mit Deckel, welches neben der Beschriftung mit einem Giftwarnzeichen versehen war, dieses Glasgefäß wurde in einem verschließbaren Plastikbehälter in Aktivkohle aufbewahrt, welches ebenfalls mit Giftwarnzeichen gekennzeichnet war.

3.2.5 Hemmkinetik von PXE mit Maus-AChE (Ghosts)

Es wurden kinetische Untersuchungen zur Bestimmung der Hemmkonstanten mit erythrozytärer Maus-AChE bei Hemmung durch PXE mit jeweils 8 Konzentrationen durchgeführt (2 Messreihen im Konzentrationsbereich 500 nM – 1500 nM, 3 Messreihen im Bereich 700 nM – 1400 nM). Zunächst erfolgte die Bestimmung der Aktivität der AChE wie unter Punkt 3.2.2.1 beschrieben (2 Messungen) jedoch mit der Abwandlung, dass 50 µl Probe verwendet wurden, da die Aktivität der AChE in Maus-Ghosts insgesamt sehr gering war. Für die Hemmkinetiken wurden analog ebenfalls 50 µl Probe verwendet.

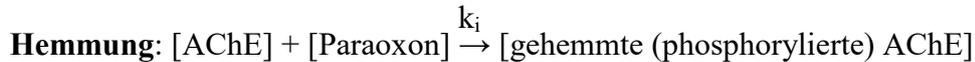
Somit ergab sich folgender Ansatz in den Küvetten:

- 3000µl PP (0.1 M; 7.4 pH)
 - 100µl DTNB
- nach 10 min bei 37°C
- 50µl Probe (AChE)
 - 50µl ASCh (28,4 mM)
 - 5µl PXE

Die Messung der AChE-Aktivität erfolgte über 30 min bei 412 nm und 37°C mit simultan 4 Küvetten.

Mit Hilfe von Microsoft Excel und Prism erfolgte die Berechnung von k_i nach Forsberg + Puu (Forsberg, Puu, 1984) mittels non-linearer Regressionsanalyse ausgehend davon, dass bei dem vorliegenden Substratüberschuss eine Reaktion Pseudo 1. Ordnung angenommen werden kann.

k_i ist die sogenannte bimolekulare Reaktionskonstante, welche für folgende Reaktion angegeben werden kann:



Zur Berechnung von k_i wurden die Steigungen der Tangenten (k_1) zu den jeweiligen Kurven der Hemmkinetiken der einzelnen PXE-Konzentrationen berechnet. $1/k_1$ wurde gegen $1/[IX](1-\alpha)$ aufgetragen.

Hierbei ist $[IX]$ die jeweilige PXE-Konzentration und α entspricht $[S]/(K_m + [S])$.

$[S]$ ist die Substratkonzentration und K_m die in der Michaelis-Menten-Kinetik ermittelte Konstante für die Substrataffinität zu AChE. Die Steigung der entstandenen Gerade entspricht der Hemmkonstante k_i .

Zu Grunde liegt der Berechnung $k_i = k_2/K_d$:

$$\frac{\Delta t}{\Delta \ln v} = \frac{K_d}{k_2} \times \frac{1}{[IX](1-\alpha)} + \frac{1}{k_2}$$

Hierbei ist K_d die Dissoziationskonstante und k_2 die Konstante für die unimolekulare Phosphorylierungskonstante. (Aurbek et al., 2006)

3.2.6 Hemmung von Maus-Ery-AChE mit PXE

500 μ l Maus-Ery-Ghosts wurden mit 5 μ l einer 20 μ M-PXE-Lösung (200 nM im Ansatz) für 30 min bei 37°C inkubiert.

Als Kontrolle wurden 100 μ l Maus-Ery-Ghosts analog behandelt (ohne PXE).

Nach 30 min erfolgte die Bestimmung der Restaktivität wie in 3.2.2.1 beschrieben.

Um überschüssiges PXE zu entfernen wurde die Probe mit doppelter Menge PP (0.1 M; pH 7.4) aufgefüllt, anschließend in der Ultrazentrifuge mit 18000 rpm für 8 min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, im Anschluss erfolgten zwei weitere Waschgänge durch auffüllen mit der doppelten Menge PP und Zentrifugieren in der Ultrazentrifuge mit 18000 rpm für jeweils 5 min.

Nach den drei Waschgängen erfolgten eine Resuspension, Mischen auf dem Vortex®, Homogenisieren über 5 s mittels Ultraschallhomogenisator und im Anschluss erneutes Mischen mittels Vortex®. Zuletzt wurden die Aktivitäten der vergifteten AChE und der Kontrollprobe gemessen und so der Hemmwert bestimmt.

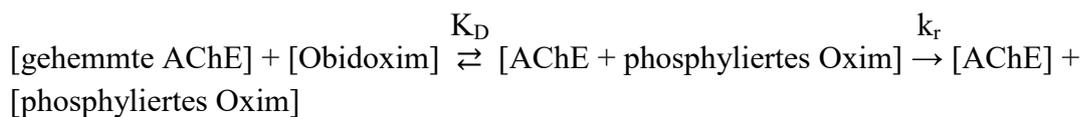
3.2.7 Reaktivierungskinetik PXE-gehemmter Maus-AChE mit Obidoxim nach der kontinuierlichen Methode (Kitz, Ginsburg und Wilson, 1965)

Für die Bestimmung der Reaktivierungskinetik wurden für 2 Messreihen jeweils 6 Obidoximkonzentrationen (Konzentrationsbereich 0,5 μM – 15 μM) hergestellt und für jede Obidoximkonzentration 2 Polystyrolküvetten verwendet, 1 als Referenz und 1 als Probe:

- 3000 μl PP (0,1 M; 7,4 pH)
 - 100 μl DTNB (10 mM)
- nach 10 min bei 37°C
- 3,2 μl Oxim
 - 30 μl PXE-gehemmte AChE (nicht in Referenzküvette)
 - 50 μl ASCh (28,4 mM)

Die Messung der AChE-Aktivität erfolgte über 10 min bei 412 nm und 37°C.

Der Oxim-induzierten Reaktivierung liegt schematisch dargestellt folgende Reaktion zu Grunde:



Hierbei zeigt die Dissoziationskonstante K_D an, wie gut das Oxim an das gehemmte Enzym bindet (Affinität), k_r wie schnell das Oxim den Organophosphatrest vom Enzym löst (Reaktivitätskonstante).

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel und Graph Pad Prism durch Ermittlung von k_{obs} (scheinbare Reaktivierungskonstante), Auftragen von k_{obs} gegen die Oximkonzentrationen und anschließende non-lineare Regressionsanalyse zur Bestimmung von K_D und k_r .

Hierbei gilt:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_r \times [\text{Oxim}]}{K_D + [\text{Oxim}]}$$

Wobei $[\text{Oxim}]$ der Oximkonzentration entspricht, K_D der Dissoziationskonstante und k_r der unimolekularen Reaktivierungskonstante.

Die bimolekulare Reaktivierungskonstante k_{r2} wurde anhand folgender Gleichung ermittelt:

$$k_{r2} = \frac{k_r}{K_D}$$

3.2.8 Versuche zur Alterung und Spontanreaktivierung

3.2.8.1 Herstellung von GD-Plasma (Soman-gehemmtes Mausplasma)

Für die Versuche zur Alterung und Spontanreaktivierung wurde Soman-gehemmtes Mausplasma zur Stabilisierung bei der anzunehmenden langen Versuchsdauer hergestellt, um dies gemeinsam mit der Maus-AChE als Probe zu verwenden.

Ziel war es, eine annähernd komplette Hemmung der BChE im Plasma zu erreichen, damit diese nicht interferiert, wenn sie für die Alterung und Spontanreaktivierung mit PXE-vergifteter Maus-AChE vermischt und gemessen wird.

Mausplasma wurde 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und abpipettiert, für die Herstellung von GD-Plasma wurden 2000µl Mausplasma verwendet, 500µl dienten als Kontrolle.

Die BChE-Aktivität im Plasma wurde wie unter 3.2.2.2 gemessen.

Aus der 5,49 mM Stammlösung wurde 10 µM (\cong 100 nM i.A.) GD hergestellt und hiervon jeweils 20µl zu den 2000µl Mausplasma hinzugefügt und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dann erfolgte die Messung der BChE-Aktivität. Der Vorgang wurde bis zum Erreichen einer annähernd kompletten Hemmung wiederholt.

Im Anschluss erfolgte über Nacht eine Dialyse in PP (0,1 M; 7,4 pH), hiernach die Restgiftbestimmung aus 15µl Kontroll-Plasma und 15µl GD-Plasma. Die Lagerung erfolgte bei - 60°C.

3.2.8.2 Alterung und Spontanreaktivierung

Spontanreaktivierung und Alterung wurden parallel aus demselben Probenansatz bestimmt. Es wurden jeweils 2 Messreihen durchgeführt.

GD-Plasma wurde nach dem Auftauen 4min bei 4000 rpm zentrifugiert, die BChE-Aktivität wurde bestimmt wie unter 3.2.2.2 beschrieben.

PXE-gehemmte Maus-AChE (Ghosts) wurde für 5 s homogenisiert und die AChE-Aktivität gemessen wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

GD-Plasma und PXE-gehemmte Maus-AChE wurden zu gleichen Teilen vereinigt und für 5min auf dem Thermoschüttler bei 37°C gemischt. Dies ergab den Probenansatz.

Als Kontrolle wurden GD-Plasma und (nicht gehemmte) Maus-AChE analog behandelt.

Für die Spontanreaktivierung:

Ansatz in Polystyrolküvetten:

- 3000µl PP (0,1 M; 7,4 pH)
- 100µl DTNB

Unmittelbar vor jeder Messung

- 60µl Probe (\cong 30µl PXE-gehemmte Maus-AChE + 30µl GD-Plasma)
- 50µl ASCh

Die Messungen erfolgten jeweils über 1 min bei 412 nm und 37°C.

Die Messungen der Spontanreaktivierung erfolgten bei t (min) = 0, 120, 180, 240, 300 und 360, wobei zum Zeitpunkt $t = 120$ entschieden wurde, die Messintervalle auf die gewählten Werte zu verkürzen, da bereits eine hohe Aktivität festgestellt wurde.

Für die Alterung:

70µl Probe (\cong 35µl PXE-gehemmte Maus-AChE + 35µl GD-Plasma) wurden mit 1,4µl Obidoxim (5 mM) für 30 min bei 37°C auf dem Thermoschüttler gemischt und inkubiert.

Ansatz in Polystyrolküvetten:

- 3000µl PP (0,1 M; 7,4 pH)
- 100µl DTNB

nach 30 min bei 37°C

- 60µl Probe
- 50µl ASCh

Die Messungen erfolgten jeweils über 1 min bei 412 nm und 37°C.

Die Messungen zur Alterung wurden bei t (min) = 30, 150, 210, 270, 330, 390 durchgeführt.

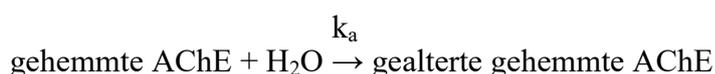
Die Kontrollmessungen mit GD-Plasma und nicht gehemmter Maus-AChE (je 30µl) wurden parallel zu den Messungen der Spontanreaktivierung vorgenommen.

Auswertung:

Bei der **Spontanreaktivierung** der Acetylcholinesterase mit H₂O wird durch Hydrolyse von Phosphylenzym-Serin-Esterbindung die Funktion des Enzyms wieder hergestellt:



Die **Alterung** führt hingegen zu einer irreversiblen Hemmung der AChE, da durch spontane Hydrolyse der Alkyl-Ester-Verbindung der Alkyl-Rest abgespalten wird, durch den resultierenden negativ geladenen Phosphonatrest ist kein nukleophiler Angriff und damit auch keine Reaktivierung durch ein Oxim möglich. Die entstandene Verbindung hat eine hohe Stabilität. (Shafferman *et al.*, 1997) (Shafferman *et al.*, 1996) (Worek, 2004) (Eto, 1974)



Die Bestimmung der Konstanten k_a – für die Alterung - und k_s – für die Spontanreaktivierung erfolgte aus den Mittelwerten von je 2 Messreihen.

Hierbei wurde für die Berechnungen als Hemmwert die Aktivität zum Zeitpunkt $t_s = 0$ min (A_{ts0}) in der Messung der Spontanreaktivierung verwendet.

Die Alterung wurde indirekt aus der Abnahme der Reaktivierbarkeit bestimmt, ausgehend davon, dass bei $t_a = 30$ min (A_{ta0}) die maximale Reaktivierbarkeit vorliegt.

Spontanreaktivierung:

$$\frac{A_{tx} - A_{ts0}}{A_{ta0} - A_{ts0}} \times 100$$

Alterung:

$$\frac{A_{tx} \times 1,02 - A_{ts0}}{A_{ta0} \times 1,02 - A_{ts0}} \times 100$$

A_{ts0} entspricht dem Hemmwert

A_{tx} dem jeweils erhobenen Wert zu den o.g. Messzeitpunkten

A_{ta0} steht für den Mittelwert der maximalen Reaktivierbarkeit

Zur Berechnung der Alterung wurden A_{tx} und A_{ta0} jeweils mit 1,02 multipliziert, dies ist der Korrekturfaktor für die Verdünnung durch Zugabe von Oxim in die Probe.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SD (in %) gegen die Zeit (in Stunden) aufgetragen, die Analyse mittels non-linearer Regressionsanalyse unter Verwendung des Programmes Graph Pad Prism Version 3 ergab die Konstanten k_a und k_s . (Skrinjaric-Spoljar *et al.*, 1973) (Mast, 1997) (Worek *et al.*, 1998, 1999a).

Aus k_s und k_a wurden die HWZ berechnet unter Verwendung der Formel $t_{1/2} = \ln(2)/k$.

3.2.9 Arylesterase und Paraoxonase

3.2.9.1 Arylesterase-Aktivität im Mausplasma

Da Arylesterasen unter anderem auch die Reaktion Phenylacetat + $H_2O \rightarrow$ Phenol + Acetat katalysieren, wurde diese Reaktion zur Bestimmung der Arylesterase-Aktivität im Mausplasma herangezogen. Als Probe wurde eine 1:10-Verdünnung von Mausplasma mit Aqua bidest verwendet. Insgesamt erfolgten 22 Messreihen.

Ansatz in Quarzküvetten:

- 1500µl 0,1 M Tris-Acetat/0,6 mM CaCl₂

- 1500µl Phenylacetat 8 mM

nach 5 min bei 37°C

Messung bei 270 nm und 37°C über 10 min zur Bestimmung des Blank-Wertes, dann

- 10µl Probe

Messung bei 270 nm und 37°C über 2 min.

Berechnungen:

$$A = \frac{A_{tx} \times v (\text{Küvette})}{v (\text{Probe}) \times \varepsilon}$$

A entspricht der Aktivität

A_{tx} steht für den jeweiligen Messwert – Blankwert

v entspricht dem Volumen

ε ist der molare Extinktionskoeffizient mit $\varepsilon_{270\text{nm}} = 1,45 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Kiderlen, Eyer und Worek, 2005)

3.2.9.2 Paraoxonase-Aktivität im Mausplasma

Paraoxonethyl als Substrat zur Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität wurde aufgereinigt, um den hohen Anteil an p-Nitrophenol zu entfernen. Hierzu wurden 14,6 ml einer 5 mM wässrigen Suspension von Paraoxonethyl mit 19,5 mg Aktivkohle und 14 µl konzentrierter HCl gemischt, gerührt und geschüttelt, sowie danach bei 3000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand filtriert, der pH-Wert wurde mit 1 M Tris auf pH 5 eingestellt.

Die Konzentration wurde photometrisch unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von Paraoxonethyl ($\varepsilon_{274\text{nm}}$ in H₂O = $9,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Merck-Index 1989) analog zum Vorgehen wie unter Punkt 3.2.4 beschrieben – bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Für die Paraoxonase-Aktivitätsbestimmungen wurden die Puffer in doppelter Konzentration hergestellt (s. Punkt 3.1.2.1), weil je 1500µl PXE und 1500µl Puffer in der Küvette vereinigt wurden.

Es erfolgten je 10 Messreihen mit und ohne NaCl, da Aktivitätsunterschiede der Paraoxonase je nach Anwesenheit bzw. Abwesenheit von NaCl (ausgedrückt durch den sog. „NaCl-Faktor“) bei verschiedenen Spezies vorbeschrieben sind. (Kiderlen, Eyer und Worek, 2005) Als Probe wurde unverdünntes Mausplasma verwendet.

Paraoxonase-Aktivität ohne NaCl:

Ansatz in Küvetten:

- 1500µl 0,2 M Tris-HCl/2 mM CaCl₂ pH 8,5

- 1500µl PXE 2,67 mM

nach 5 min bei 37°C

Messung bei 405 nm und 37°C über 10 min zur Bestimmung des Blank-Wertes, dann

- 10µl Probe

Messung bei 405 nm und 37°C über 2 min.

Paraoxonase-Aktivität mit NaCl:

Ansatz in Küvetten:

- 1500µl 0,2 M Tris-HCl/2 mM CaCl₂/2 M NaCl pH 8,5

- 1500µl PXE 2,67 mM

nach 5 min bei 37°C

Messung bei 405 nm und 37°C über 10 min zur Bestimmung des Blank-Wertes, dann

- 10µl Probe

Messung bei 405 nm und 37°C über 2 min.

Es erfolgte ein Kontrollversuch mit neu hergestellten Pufferlösungen analog zu den bereits beschriebenen Untersuchungen mit jeweils 5 Messreihen mit und 5 Messreihen ohne NaCl, hierfür wurden Mikroküvetten verwendet und entsprechend der Ansatz in den Küvetten angepasst, auch hier wurde als Probe 10µl unverdünntes Mausplasma verwendet:

-300µl Puffer

-300µl PXE 2,67 mM

Zusätzlich wurde eine Kontrolle mit humanem Plasma mit je 1500µl Puffer und 1500µl PXE 2,67 mM durchgeführt.

Berechnungen:

$$A = \frac{A_{tx} \times v (\text{Küvette})}{v (\text{Probe}) \times \varepsilon}$$

A entspricht der Aktivität

A_{tx} steht für den jeweiligen Messwert – Blankwert

v entspricht dem Volumen

ε ist der molare Extinktionskoeffizient mit $\varepsilon_{405\text{nm}} = 16 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

Paraoxonase-Aktivität mit NaCl/ Paraoxonase-Aktivität ohne NaCl ergibt den NaCl-Faktor.

3.2.10 Das Dynamische Modell (Eckert *et al.*, 2006a, 2006b, 2007, 2008a, 2008b) (Herkert *et al.*, 2008, 2009, 2010, 2012)

s.a. 3.1.1.3

3.2.10.1 Vorbereitungen

Vor Verwendung des Systems wurde dieses mit H₂O über eine Stunde durchgespült.

Parallel erfolgte die Vorbereitung der notwendigen Reagenzien:

- Gelatinephosphatpuffer (GPP) 0,2 % (s. Punkt 3.1.2.1 „Pufferlösungen“)
- ASCh 18 mM, Endkonzentration 0.45 mM
- DTNB: Endkonzentration 0,3 mM

Je nach Versuchsmodus:

- Obidoxim: Endkonzentration 10 µM
- Paraoxonethyl: Endkonzentration 2µM.

Je Versuch Vorbereitung von 2 Filtern: Millex®-GS particle filter, 0.22 µM, d: 33mm

1. Proben: Der Filter wurde retrograd mit einer peristaltischer Pumpe (Varioperpex ® II; LKB; Bromma, Schweden) mit PP gespült, um die Luft zu entfernen, dabei verbliebene Luftbläschen wurden abpipettiert.

Im Anschluss wurde der Filter für die Versuche mit erythrozytärer AChE genau 10 Minuten orthograd mit der Ery-Verdünnung (80µl Erys + 4920µl PP) perfundiert, danach 5 min mit PP. Für die Versuche mit muskulärer AChE erfolgte eine orthograde Perfusion mit einer Verdünnung von 200µl Muskelhomogenisat + 4800µl PP über 14 Minuten, gefolgt von 2 min mit PP.

2. Blank (Spülfilter): Der Filter wurde orthograd mit H₂O durchgespült.

3.2.10.2 Durchführung eines Versuches

Über die Software wurde bereits bei den Vorbereitungen die gewünschte Methode ausgewählt [Tbl.1]:

Programme für erythrozytäre AChE	Programme für muskuläre AChE
AChE-Max	Muskel-AChE
Hemmung-PXE	Muskel-PXE
Ery-AChE-PXE-Obi	Muskel-AChE-PXE-Obi

Tbl. 1 zeigt die verwendeten Programme am dynamischen Modell

Alle Messungen wurden bei 412 nm und 37° C durchgeführt. Die photometrischen Messungen der Absorption erfolgten alle 1,6 s.

Bei ausgeschalteten Pumpen, damit keine Luft ins System gelangt, wurden die Pumpenausgänge, in die Lösungen verteilt. Hiernach wurden die Kanäle einzeln jeweils genau 1 Minute lang gepurget, damit in den Schläuchen nicht H₂O vom Durchspülen, sondern die jeweilige Lösung ist.

Die Fließgeschwindigkeit betrug bei beiden Pumpen 0,250 ml/min, somit ergab sich insgesamt eine Perfusion von 0,500 ml/min. Zunächst wurde der Spülfilter mit H₂O eingesetzt und gewartet, bis auf dem Display eine stabile Linie erkennbar war, zur Überprüfung wurde dann der „noise Test“ durchgeführt, erst wenn sich hierbei zeigte, dass von einer stabilen Baseline ausgegangen werden konnte (Noise und Drift < 30) wurde der Versuch gestartet. Nach Starten des Versuches über das Interface wurde möglichst zügig der Spülfilter gegen den Proben-Filter getauscht, die Luftblasen entfernt und der Filter in das Wasserbad (37°C) gelegt.

Während des Versuches wurden zu definierten Zeitpunkten Absorptions-Werte notiert und anhand dieser und der aufgezeichneten Kurven die Berechnungen für die Konstanten mit Hilfe der Programme Microsoft Excel und Graph Pad Prism 3.0 durchgeführt. 40 Minuten vor Ende des jeweiligen Programmes wurde der Proben-Filter zum Spülfilter gewechselt. Zusätzlich wurden Blank-Läufe ohne Probenfilter zur Bestimmung der Blindwerte, d.h. Absorption ohne Reaktion mit einer Probe, und der Zunahme der Absorption über die Zeit, gefahren, um dies in den Berechnungen berücksichtigen zu können.

3.2.10.2.1 Stabilität der Maus-AChE (AChE-Max/Muskel-AChE)

Die Stabilität der AChE-Aktivität wurde unter kontinuierlicher Perfusion mit den Reagenzien bestimmt in je 2 Messreihen mit Ery- und Muskel-AChE. Die Versuchsabläufe sind in den Abb. 7 und 8 dargestellt.

Stabilität der Ery-AChE:

$$\text{Stabilität (\%)} = \frac{AChE_{End}(\text{bei } 180\text{min}) - \text{Blindwert}(\text{bei } 189,9\text{min})}{AChE_{Max} - (\text{Blindwert bei } 189,9\text{min} - \text{Zunahme Absorption Blank})}$$

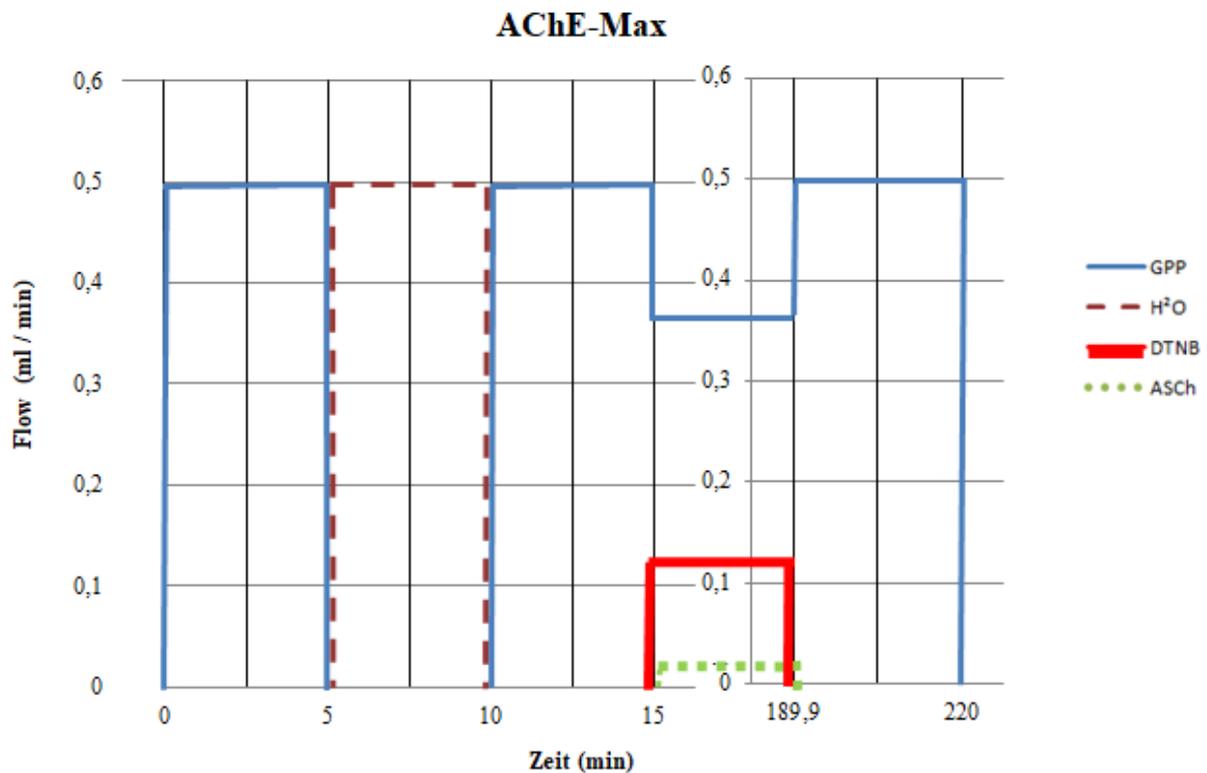


Abb. 7 zeigt exemplarisch die jeweilige Durchflussmenge (Flow in ml/min) der Reagenzien im Zeitverlauf (Zeit in Minuten). Bei jedem Versuch mit erythrozytärer AChE wurde zunächst über 5 min G-PP, dann über 5 min H₂O (zur vollständigen Hämolyse der Erys) und dann wieder über 5 min G-PP zugeführt, jeweils mit einem Flow von 0,500 ml/min. Zur Berechnung der Stabilität wurden die Absorptionenwerte nach Erreichen der maximalen Aktivität (AChE_{Max} ca. bei 32 min), unmittelbar vor Entfernung des Probenfilters (AChE_{End} bei 180 min) und die Absorption von GPP, DTNB und ASCh (Blindwert bei 189,9 min) verwendet.

Stabilität der Muskel-AChE:

$$\text{Stabilität (\%)} = \frac{\text{AChE}_{\text{End}} (\text{bei } 160\text{min}) - \text{Blindwert} (\text{bei } 169,9\text{min})}{\text{AChE}_{\text{Max}} - (\text{Blindwert bei } 169,9\text{min} - \text{Zunahme Absorption Blank})}$$

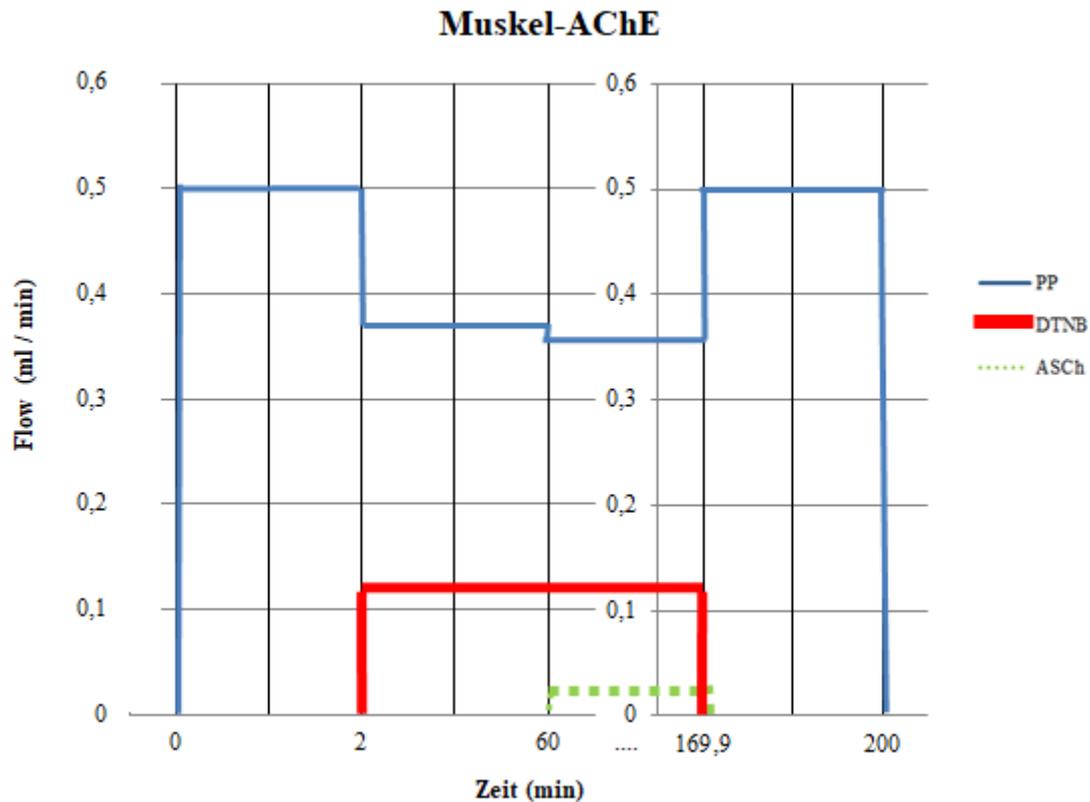


Abb. 8 zeigt analog zu Abb AChE Max die jeweilige Durchflussmenge (Flow in ml/min) der Reagenzien im Zeitverlauf (Zeit in Minuten) bei den Versuchen mit muskulärer AChE. Bei den Versuchen mit muskulärer AChE wurde – anders als bei erythrozytärer AChE – über 2 Minuten Phosphatpuffer und im Anschluss über 58 Minuten PP und DTNB zugeführt, da im Muskel viel Aktin und Myosin mit freien SH-Gruppen, die an DTNB binden, vorhanden waren. Zur Berechnung der Stabilität wurden die Absorptionen nach Erreichen der maximalen Aktivität ($AChE_{Max}$ ca. bei 73 min), unmittelbar vor Entfernung des Probenfilters ($AChE_{End}$ bei 160 min) und die Absorption von GPP, DTNB und ASCh (Blindwert bei 169,9 min) verwendet.

3.2.10.2.2 Hemmung der Maus-AChE (Hemmung-PXE/Muskel-PXE)

Es erfolgten je 3 Messreihen mit erythrozytärer und muskulärer AChE der AChE-Aktivität vor und nach der Hemmung mit PXE (s. Abb. 9 und 10 bzgl. der Darstellung der Versuchsabläufe).

Den Berechnungen zur Hemmung lassen sich auf folgenden mathematischen Zusammenhang zurückführen:

$$A_t = A_0 \times e^{-k \cdot t}$$

Wobei A der Aktivität entspricht, A_0 entspricht jeweils der maximalen AChE-Aktivität, t ist die Zeit nach Beginn der Hemmung und k ist die jeweils errechnete scheinbare Reaktionskonstante in der Berechnung der einphasigen exponentiellen Zerfallsfunktion.

Bei der Berechnung der prozentualen Restaktivität nach Hemmung wurde der Anteil von $AChE_{min}$ an $AChE_{max}$ unter Berücksichtigung der Blank-Werte bestimmt.

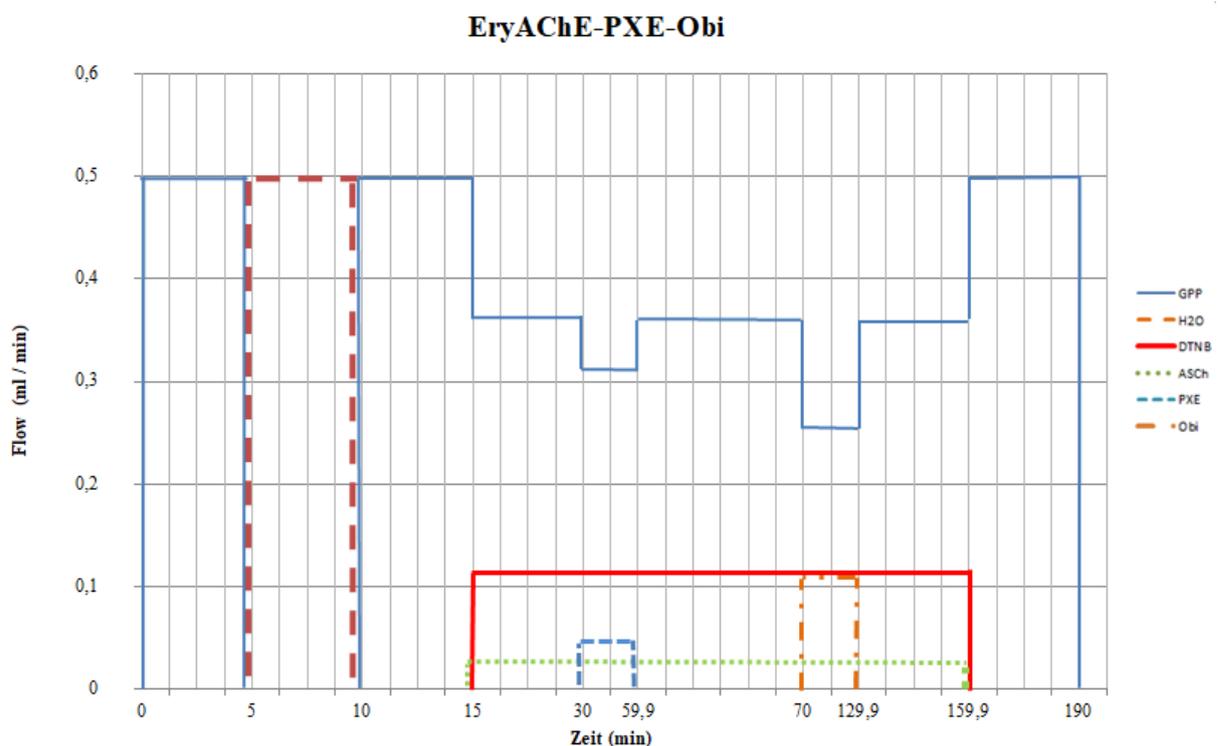


Abb. 9 Durchflussmenge (Flow in ml/min) der Reagenzien im Zeitverlauf (Zeit in Minuten) bei Hemmung und Reaktivierung erythrozytärer AChE am dynamischen Modell. Bei den Versuchen zur Hemmung ohne Reaktivierung wurde anstelle von Obidoxim G-PP im gleichen Zeitraum zugeführt. $AChE_{max}$ wurde vor Perfusion mit dem Gift, $AChE_{min}$ nach Auswaschen des Giftes, unmittelbar vor Zuführen des Reaktivators bestimmt. $AChE_{reakt}$ wurde direkt vor dem Filterwechsel, also zum Zeitpunkt der als maximal anzunehmenden AChE-Aktivität nach Reaktivierung, abgelesen.

3.2.10.2.3 Hemmung und Reaktivierung der Maus-AChE (Ery-AChE-PXE-Obi/Muskel-AChE-PXE-Obi)

Es erfolgten jeweils 6 Messreihen mit erythrozytärer und muskulärer AChE in welchen die AChE-Aktivität vor der Hemmung, nach der Hemmung/vor Reaktivierung und nach der Reaktivierung bestimmt wurden. Die Versuchsabläufe sind schematisch in den Abb. 9 und 10 dargestellt.

Den Berechnungen zur Reaktivierung liegt folgende Formel zu Grunde:

$$A_t = A_0 \times (1 - e^{-kt})$$

Wobei A der Aktivität entspricht, A_0 entspricht jeweils der maximalen AChE-Aktivität, t ist die Zeit nach Beginn der Hemmung und k ist die jeweils errechnete scheinbare Reaktionskonstante in der Berechnung des einphasigen exponentiellen Anstieges.

Für die Reaktivierbarkeit wurde das Verhältnis von $AChE_{\text{reakt}}$ zu $AChE_{\text{max}}$ in Prozent errechnet.

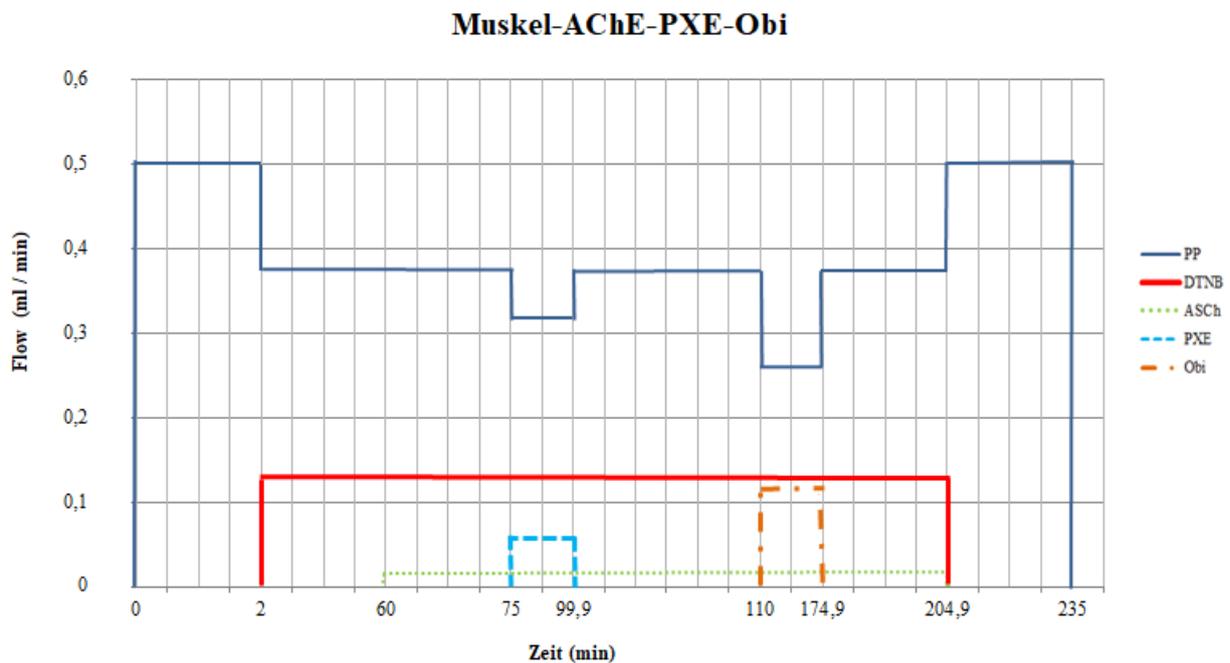


Abb. 10 Durchflussmenge (Flow in ml/min) der Reagenzien im Zeitverlauf (Zeit in Minuten) bei Hemmung und Reaktivierung muskulärer AChE am dynamischen Modell. Bei den Versuchen zur Hemmung ohne Reaktivierung wurde anstelle von Obidoxim PP im gleichen Zeitraum zugeführt.

3.2.10.3 Nachbereitung

Der Filter wurde entfernt und die Pumpe ausgestellt. Die Kanäle wurden mit H₂O ab- und über 4 min durchgespült. Danach wurde das System eine Stunde lang mit H₂O gespült. Schließlich wurden die Kanäle und das System mit 70 % Isopropanol gespült.

Alle Versuche wurden gemäß der Sicherheitsbestimmungen im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr in München durchgeführt.

4. Ergebnisse

Es wurden Versuche mit geliefertem Mausblut einerseits und Versuche mit selbstgewonnenem Mausblut sowie aufbereiteter Muskulatur andererseits durchgeführt.

4.1 Versuche mit Mausblut von Charles River

Zunächst erfolgten Aktivitätsmessungen aus Mausblut, wobei sich folgende Werte ergaben:

4.1.1 AChE-Aktivität aus Ghosts

MW und SD aus 2 Messungen: $0,382 \times 10^3 \pm 0,015 \times 10^3$ U/l

4.1.2 BChE-Aktivität aus Plasma

MW und SD aus 3 Messungen: $7,888 \times 10^3 \pm 0,081 \times 10^3$ U/l

4.1.3 AChE-Aktivität aus Ery-Verdünnung 1:100

MW und SD aus 3 Messungen: $2,282 \times 10^3 \pm 0,237 \times 10^3$ U/l

Die AChE-Aktivität in der Ery-Verdünnung und aus Ghosts war im Verhältnis zur BChE-Aktivität im Mausplasma gering.

4.1.4 Ergebnisse der Michaelis-Menten-Kinetik mit Maus-Erythrozyten-AChE

Bei verschiedenen Spezies bestehen Unterschiede bezüglich der Substrataffinität zu AChE. Um dies in den Berechnungen der Reaktionskonstanten berücksichtigen zu können wurde der K_m -Wert bestimmt, welcher ein Maß hierfür ist.

Zunächst wurden Aktivitätsmessungen bei Acetylthiocholin-Konzentrationen von 0,01 mM – 2mM durchgeführt. Hierbei ergab sich etwa bei 0,2 mM bereits eine hohe Aktivität bei einer Absorption von 54,668 mE/min. Daher wurde eine weitere Messreihe mit niedrigeren Konzentrationen von 0,0025 mM bis 2 mM angefügt. Es erfolgte die Auswertung mit Michaelis-Menten-Kinetik [Abb.6].

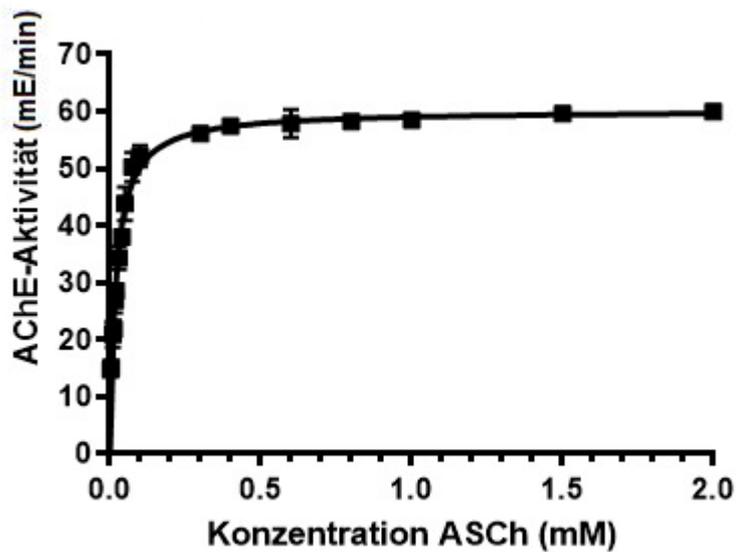


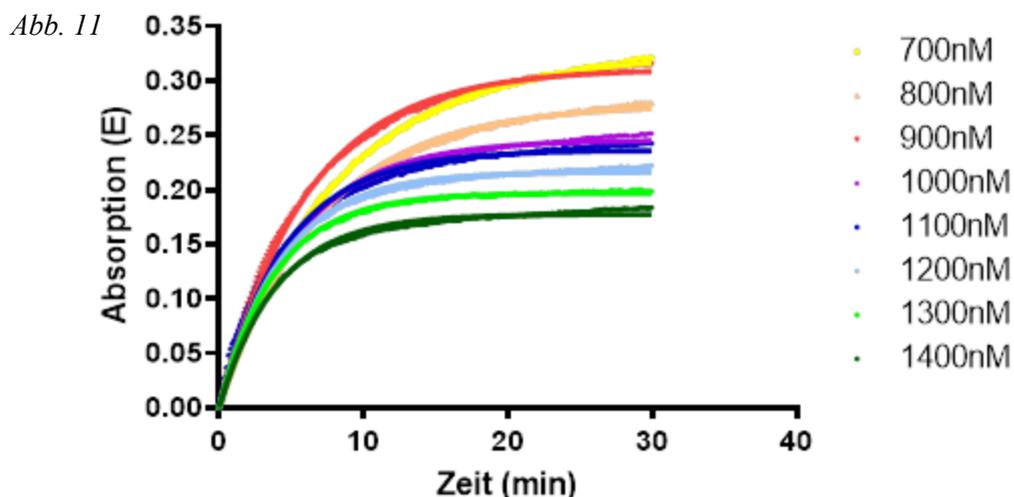
Abb.6 Verdünnungsreihe zur Bestimmung von K_m , Mittelwert aus 2 Messreihen mit jeweils 18 Konzentrationen

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass bei Mäusen eine hohe Affinität zu Acetylthiocholin vorliegt mit einer $K_D (\cong K_m) \approx 0,02004 \pm 0,00132$ mM, also etwa bei 20 μ M (0,02 mM).

4.1.5 Hemmkinetik von PXE mit Maus-Ery-AChE

Die inhibitorische Potenz von PXE auf erythrozytäre Maus-AChE wurde mittels Hemmkinetik untersucht. Zunächst erfolgten Messungen mit 500 nM, 1000 nM und 1250 nM i.A. PXE um den geeigneten Konzentrationsbereich für die Hemmkinetik festzulegen.

Hiernach wurden zuerst 2 Messreihen mit den Konzentrationen 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1250 und 1500 nM PXE, dann 3 weitere Messreihen mit 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 nM PXE durchgeführt.



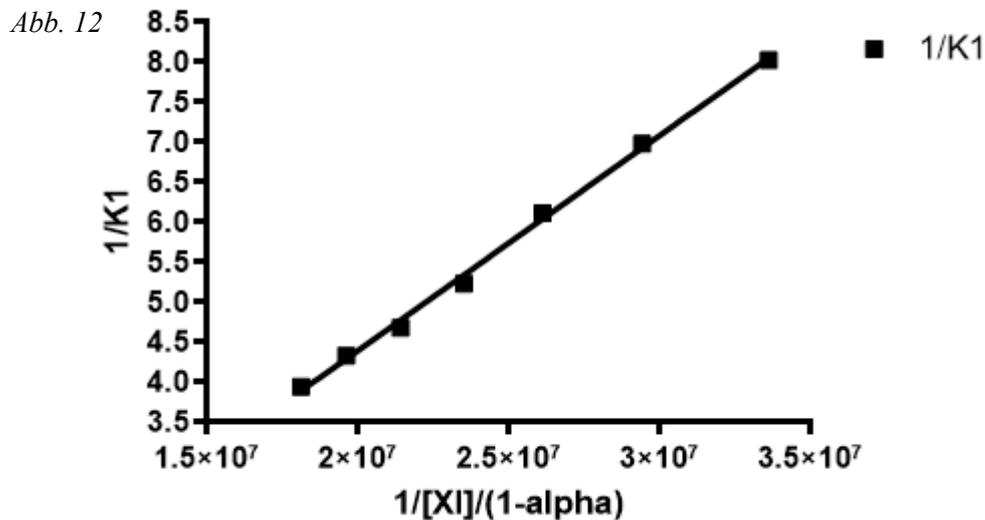


Abb.11 und Abb.12 Grafiken zur Hemmkinetik Maus-Erythrozyten-Ghosts mit verschiedenen Konzentrationen von Paraoxonethyl: k_1 steht für die Steigungen der Tangenten zu den jeweiligen Kurven der Hemmkinetiken der einzelnen PXE- Konzentrationen, $[IX]$ für die jeweiligen PXE-Konzentration und α entspricht $[S]/(K_m + [S])$. $[S]$ ist die Substratkonzentration und K_m die in der Michaelis-Menten-Kinetik ermittelte Konstante für die Substrataffinität zu ASCh.

Das Auftragen der reziproken prozentualen Restaktivität gegen die Zeit mit verschiedenen Paraoxonethylkonzentrationen und Analyse mittels non-linearer Regression, Berechnung der Hemmkonstante k_i nach Forsberg und Puu ergab:

k_i (Mittelwert und Standardabweichung aus 5 Messreihen): $3,41 \times 10^6 \pm 0,36 \text{ M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$

Zum Vergleich mit den Werten, welche am dynamischen Modell erhoben wurden, kann die Inhibitionsrate k_{obs} bei $1 \mu\text{M}$ herangezogen werden, um einen Hinweis zu erhalten, ob eine Korrelation zwischen den Messmethoden (statisches vs. dynamisches System) besteht.

k_{obs} bei Hemmung mit $1 \mu\text{M}$ PXE, Mittelwert aus 5 Werten: $0,1762 \pm 0,016/\text{min}$, entsprechend einer HWZ von $3,961 \pm 0,370 \text{ min}$.

4.2 Versuche mit selbstgewonnenem Mausmaterial

4.2.1 AChE-Aktivität aus Ghosts

Bei der Ghostherstellung (Rühren von Ghosts und hypoosmolarem Puffer) bildeten sich Klumpen, die Aktivität der Klumpen und PP betrug $5,830 \times 10^3$ U/l, aufgrund dessen wurden die Klumpen zur besseren Mischung geschallt. Die Aktivität der Ghosts betrug: $0,827 \times 10^3 \pm 0,011 \times 10^3$ U/l und war damit höher als die AChE-Aktivität aus Maus-Ghosts, welche aus geliefertem Mausblut hergestellt worden waren.

4.2.2 BChE-Aktivität aus Plasma

Die BChE-Aktivität im Mausplasma betrug $3,069 \times 10^3 \pm 0,030 \times 10^3$ U/l. Sie war im Vergleich zum gelieferten Mausblut deutlich geringer.

4.2.3 Hemmung von Maus-AChE mit PXE

Die Methode zur Hemmung musste (wie unter Punkt 3.2.6 beschrieben) angepasst werden aufgrund der geringen Menge an Maus-Ery-AChE (Ghosts), um Materialverlust und Aktivitätsverlust bei ausreichender Hemmwirkung zu erreichen.

Es ergab sich nach Hemmung von Maus-AChE mit $20 \mu\text{M}$ PXE-Lösung eine Restaktivität von 7,4 %. Nach Resuspension und 3 Waschgängen war kein Restgift vorhanden.

4.2.4 Photometer Cary 50

4.2.4.1 Reaktivierungskinetik mit PXE-vergifteter Maus-AChE mit Obidoxim

In der Reaktivierungskinetik PXE-gehemmter Maus-Ery-AChE mit Obidoxim (Konzentrationsbereich $0,5 \mu\text{M} - 15 \mu\text{M}$) nach der kontinuierlichen Methode ergaben sich die folgenden Ergebnisse, die Werte sind Mittelwerte \pm SD aus 2 Messreihen:

$$k_r: 0,33 \pm 0,035/\text{min}$$

$$K_D: 8,9 \pm 2,07 \mu\text{M}$$

$$k_{r2}: 37,7 \pm 4,79 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

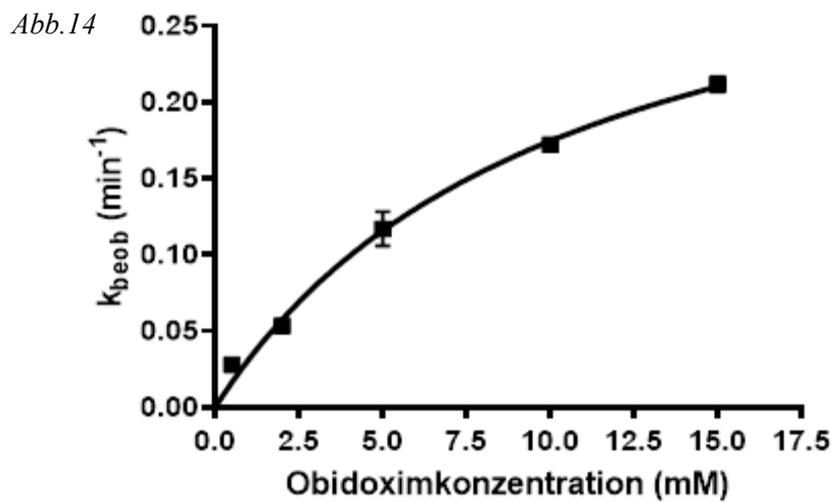
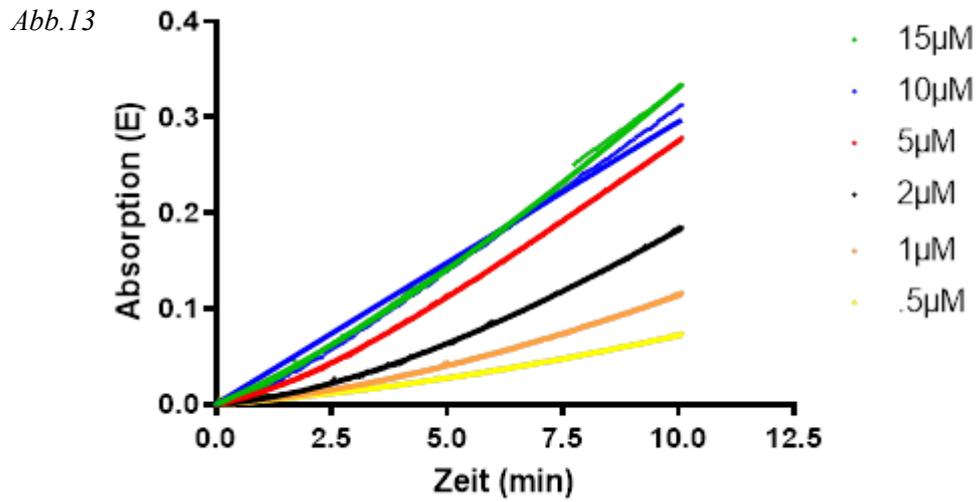


Abb.13 und Abb. 14 Reaktivierungskinetik PXE-gehemmter Maus-AChE mit Obidoxim, Mittelwert \pm SD aus 2 Messreihen.

Es ergibt sich eine im Vergleich zu humaner AChE höhere Reaktivierungskonstante von $37,7 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$, wobei auch eine hohe Affinität zu Obidoxim mit K_D $8,9 \mu\text{M}$ vorliegt.

4.2.4.2 Alterung und Spontanreaktivierung

Es wurden zwei Messreihen zur Bestimmung der Spontanreaktivierung und Alterung mit PXE-gehemmter Maus-Ery-AChE durchgeführt.

Alterung und Spontanreaktivierung mAChE_PXE

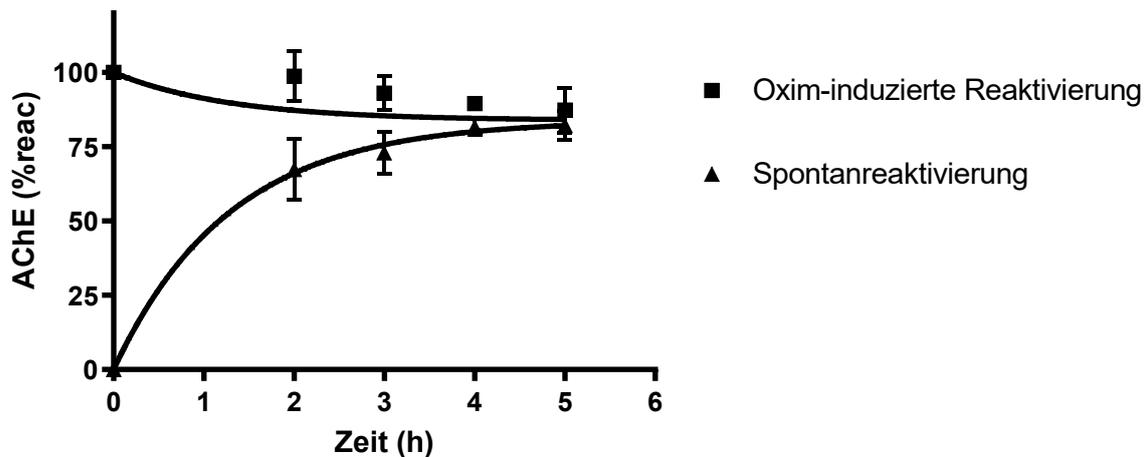


Abb.15 AChE-Aktivität PXE-vergifteter Maus-Ery-AChE in Prozent der verwendeten Kontrollaktivität, Mittelwert \pm SD aus 2 Messreihen.

Es ergaben sich nach der non-linearen Regressionsanalyse wie unter 3.2.8.2 beschrieben folgende Ergebnisse:

Spontanreaktivierung: k_s von $0,651 \pm 0,056/h$, entsprechend einer
HWZ_s von 1,06 h

Alterung: k_a von $0,125 \pm 0,029/h$, entsprechend einer
HWZ_a von 5,53 h

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass eine hohe Spontanreaktivierung und – im Verhältnis – geringe Alterung bei der Maus vorliegt, wobei sowohl Spontanreaktivierung als auch Alterung schnell von Statten gingen.

4.2.4.3 Arylesterase- und Paraoxonase-Aktivität

Aus 22 Messungen ergab sich eine durchschnittliche Arylesterase-Aktivität im Mausplasma von $160,1 \pm 3,0$ U/ml.

Die Paraoxonase-Aktivität im Mausplasma in Anwesenheit von NaCl betrug $259,9 \pm 12,9$ U/l; die Paraoxonase-Aktivität im Mausplasma ohne NaCl betrug $369,4 \pm 11,2$ U/l (Mittelwert aus je 10 Messungen) und war somit höher als die Aktivität mit NaCl.

4.2.5 Dynamisches Modell

4.2.5.1 Versuche mit Maus-Erythrozyten-AChE

Es wurden folgende Versuche mit erythrozytärer Maus-AChE durchgeführt:

2x mAChE-Max

3x Hemmung mit $2\mu\text{M}$ PXE

6x Hemmung und Reaktivierung mAChE mit PXE und Obidoxim, davon 5x mit $2\mu\text{M}$ PXE und 1x mit $1\mu\text{M}$ PXE, jeweils mit $10\mu\text{M}$ Obidoxim

Blank-Lauf: Blindwert nimmt um 5,346 mE zu.

4.2.5.1.1 Stabilität der Maus-AChE (AChE-Max)

Die Messung der Stabilität erythrozytärer Maus-AChE am dynamischen Modell über jeweils 165 Minuten ergab eine Stabilität von $89,2 \pm 4,88$ % (MW \pm SD, n=2).

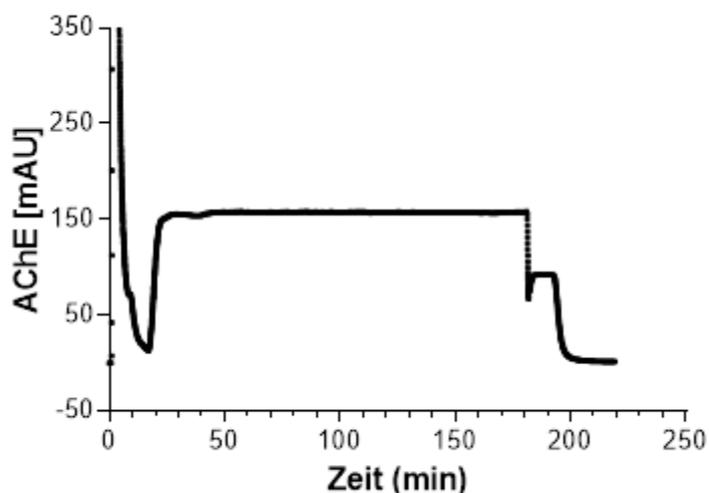


Abb. 16 Ery-AChE-Max: Darstellung der Absorption (mAU) über die Zeit, ab Minute 15 Zufuhr von Substrat (ASCh) und DTNB, bei Minute 180 Filterwechsel vom Probenfilter zum Spülfilter und Bestimmung des Blankwertes für ASCh, DTNB und GPP über 10 Minuten.

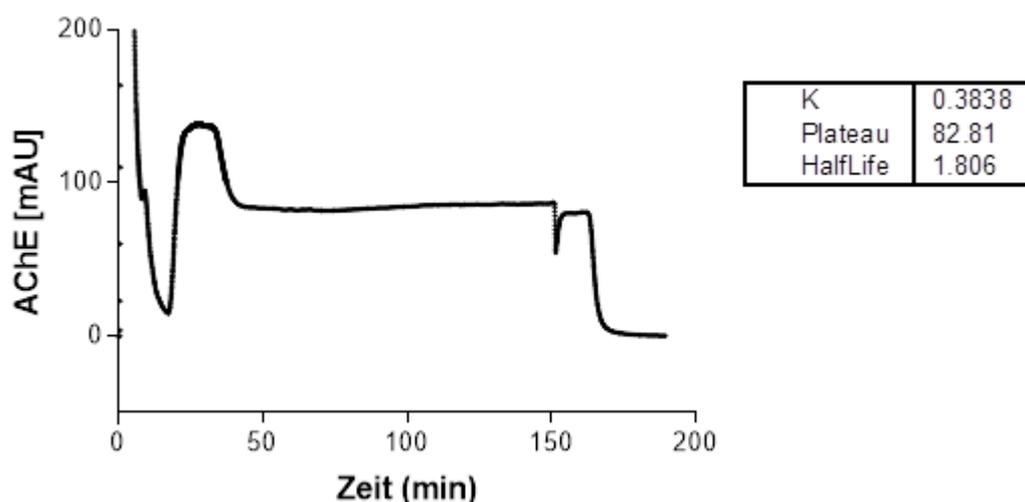
4.2.5.1.2 Hemmung der Maus-AChE mit 2 μ M PXE (Hemmung-PXE)

Abb. 17 Hemmung erythrozytärer Maus-AChE mit 2 μ M PXE am dynamischen Modell: Von $t = 30$ bis $t = 59,9$ Zufuhr von 2 μ M PXE.

	02.07.09	06.07.09	09.07.09
AChE _{max} (mE)	140,91	133,54	138,53
Decay oped: k	0,4296/min	0,3528/min	0,3838/min
t _½	1,614 min	1,965 min	1,806 min
R ²	0,987	0,980	0,991
AChE _{min} (mE)	87,69	85,25	81,92
BWDAG(mE)	86,41	83,91	80,68
Restaktivität	11,1%	12,2%	10,4%

Tbl.2 zeigt die Ergebnisse der Versuche zur Hemmung erythrozytärer Maus-AChE durch PXE am dynamischen Modell. AChE_{max} entspricht dem Absorptionwert der AChE-Aktivität vor Hemmung durch PXE, AChE_{min} dem minimalem Absorptionwert am Ende der Zugabe von Paraoxonethyl, BWDAG ist der Blank-Wert (DTNB, ASCh, GPP) nach Wechsel zum Spülfilter, decay oped steht für die Berechnung mittels monophasischer exponentieller Zerfallsfunktion von k_{obs} der Hemmung, sowie $t_{½}$.

Bei der Hemmung von erythrozytärer Maus-AChE durch 2 μ M PXE ergaben sich eine mittlere k_{obs} der Hemmung von $0,3887 \pm 0,0386$ /min, sowie eine mittlere HWZ von $1,795 \pm 0,176$ min und eine Restaktivität von $11,2 \pm 0,91$ %.

4.2.5.1.3 Hemmung und Reaktivierung der Maus-AChE mit 2 μM PXE und 10 μM Obidoxim (Ery-AChE-PXE-Obi)

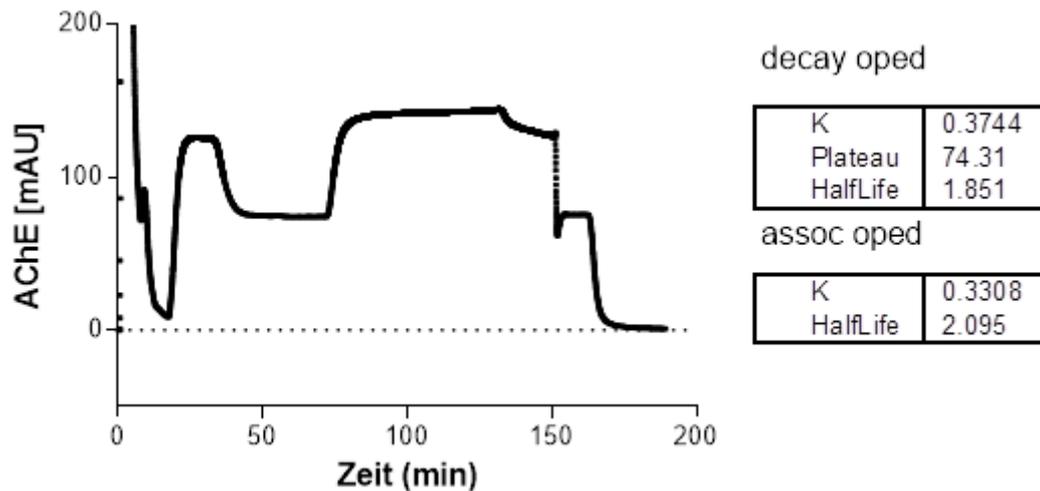


Abb.18 Hemmung erythrozytärer Maus-AChE mit PXE, Reaktivierung mit Obidoxim am dynamischen Modell: Von $t = 30$ bis $t = 59,9$ Zufuhr von $2\mu\text{M}$ PXE, von $t = 60$ bis $t = 69,9$ Auswaschen des Inhibitors, von $t = 70$ bis $t = 129,9$ Zufuhr von $10\mu\text{M}$ Obidoxim.

Aus den Versuchen zur Hemmung und Reaktivierung erythrozytärer Maus-AChE ergaben sich eine mittlere k_{obs} der Hemmung von $0,3759 \pm 0,0390/\text{min}$, sowie eine mittlere HWZ von $1,858 \text{ min} \pm 0,173 \text{ min}$ und eine durchschnittliche Restaktivität von $7,3 \pm 0,46\%$.

Zusammenfassend ergaben sich aus den Versuchen zur Hemmung und den Versuchen zur Hemmung und Reaktivierung eine mittlere k_{obs} der Hemmung von $0,3807 \pm 0,0366/\text{min}$, sowie eine HWZ von $1,834 \pm 0,164 \text{ min}$ und eine durchschnittliche Restaktivität von $8,8 \pm 2,13 \%$.

Es ergaben sich bei der Untersuchung erythrozytärer Maus-AChE eine mittlere k_{obs} der Reaktivierung von $0,3313 \pm 0,0201/\text{min}$, sowie eine HWZ von $2,099 \pm 0,136 \text{ min}$ und eine durchschnittliche Reaktivierbarkeit von $83,9 \pm 8,91\%$.

Datum	06.07.09	07.07.09_1	07.07.09_2	08.07.09	09.07.09
AChE _{max} (mE)	154,89	129,90	147,62	131,72	125,69
Decay oped:					
k	0,4437/min	0,3553/min	0,3486/min	0,3577/min	0,3744/min
t ½	1,562min	1,951min	1,988min	1,938min	1,851min
R ²	0,995	0,992	0,998	0,995	0,998
AChE _{min} (mE)	88,70	80,01	85,52	77,25	74,07
Assoc oped:					
k	0,3414/min	0,2971/min	0,3485/min	0,3385/min	0,3308/min
t ½	2,030min	2,333min	1,989min	2,048min	2,095min
R ²	0,972	0,945	0,985	0,972	0,980
AChE _{reakt} (mE)	139,42	129,466	138,648	130,332	126,79
BWDAG (mE)	88,63	81,81	85,61	78,31	75,48
Restaktivität	7,6%	6,6%	7,8%	7,3%	7,1%
Reaktivierbarkeit	70,9%	89,2%	78,7%	88,5%	92,4%

Tbl. 3 zeigt die Ergebnisse der Versuche zur Hemmung und Reaktivierung erythrozytärer Maus-AChE durch PXE und Obi am dynamischen Modell. AChE_{max} entspricht dem Absorptionswert der AChE-Aktivität vor Hemmung durch PXE, AChE_{min} dem minimalen Absorptionswert am Ende der Zugabe von Paraoxonethyl, vor Beginn der Reaktivierung, AChE_{reakt} ist der Absorptionswert am Ende der Reaktivierungszeit, BWDAG ist der Blank-Wert (DTNB, ASCh, GPP) nach Wechsel zum Spülfilter, decay oped steht für die Berechnung mittels monophasischer exponentieller Zerfallsfunktion von k_{obs} der Hemmung, sowie $t_{1/2}$, assoc oped für die Berechnung von k_{obs} und $t_{1/2}$ der Reaktivierung mittels monophasischer exponentieller Anstiegssfunktion.

Es fiel sowohl bei den Versuchen mit erythrozytärer, als auch mit muskulärer AChE auf, dass die maximale AChE-Aktivität geringer war als nach den Versuchen zur Stabilität (AChE-Max) zu erwarten gewesen wäre. Es könnte vermutet werden, dass PXE im System diffundierte und es bereits vor der eigentlichen Hemmung zu einer Hemmwirkung gekommen sein könnte, sodass nach Auswaschen des Giftes eine relativ gesehen scheinbar höhere Reaktivierbarkeit resultierte.

Einen Hinweis auf die Plausibilität dieser Theorie gab auch ein daraufhin durchgeführter Lauf mit H₂O anstelle von Gift mit muskulärer AChE, bei welchem eine höhere maximale AChE-Aktivität (AChE_{max}) zu verzeichnen war.

Es wurde ein Lauf mit Hemmung erythrozytärer Maus-AChE mit $1\mu\text{M}$ PXE und Reaktivierung mit $10\mu\text{M}$ Obi durchgeführt [Tbl.4].

AChE _{max} (mE)	145,06
Decay oped:	
k	0,2092/min
t $\frac{1}{2}$	3,313min
R ²	0,999
AChE _{min} (mE)	89,43
Assoc oped:	
k	0,3553/min
t $\frac{1}{2}$	1,951min
R ²	0,998
AChE _{reakt} (mE)	144,34
BWDAG (mE)	88,07
BWGPP (mE)	0,93
Restaktivität	10,8%
Reaktivierbarkeit	90,3%

Tbl.4 zeigt analog zu Tbl. 3 die Ergebnisse nach Hemmung mit $1\mu\text{M}$ statt $2\mu\text{M}$ PXE.

4.2.5.2 Versuche mit Maus-Muskel-AChE

Mit muskulärer Maus-AChE wurden folgende Versuche durchgeführt:

2x mAChE-Max

3x Hemmung mit $2\mu\text{M}$ PXE

6x Hemmung und Reaktivierung mAChE mit $2\mu\text{M}$ PXE und $10\mu\text{M}$ Obi

1x mAChE mit H₂O-PP

2x Oximolyse

Blank-Lauf: Blindwert nimmt um 20,933 mE zu.

4.2.5.2.1 Stabilität der Maus-Muskel-AChE (Muskel-AChE)

Die Messung der Stabilität muskulärer Maus-AChE am dynamischen Modell über jeweils 100 Minuten ergab eine Stabilität von $92,7 \pm 0,21 \%$ (MW \pm SD, n=2).

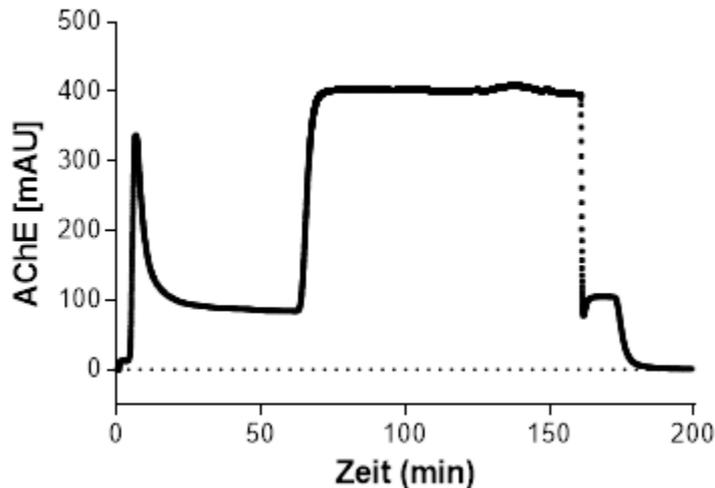


Abb. 19 Muskel-AChE: Darstellung der Absorption (mAU) über die Zeit, ab Minute 2 Zufuhr von DTNB, ab Minute 60 Substrat (ASCh) und bei Minute 160 Filterwechsel vom Probenfilter zum Spülfilter und Bestimmung des Blankwertes für ASCh, DTNB und PP über 10 Minuten.

4.2.5.2.2 Hemmung der Maus-Muskel-AChE mit $2\mu\text{M}$ PXE (Muskel-PXE)

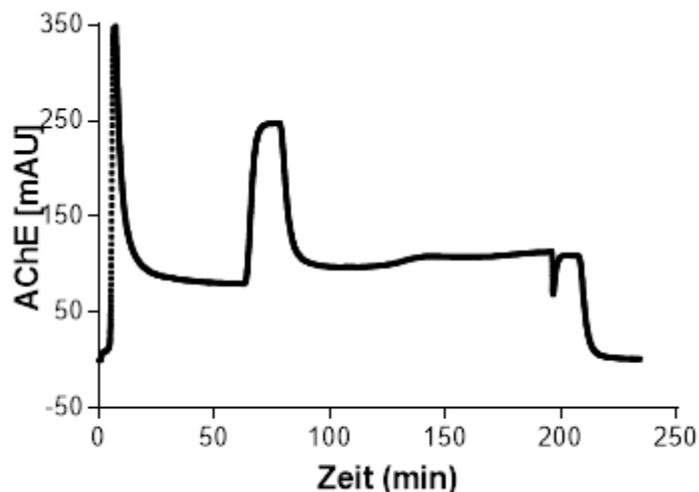


Abb. 20 Hemmung muskulärer Maus-AChE mit $2\mu\text{M}$ PXE am dynamischen Modell, Zufuhr von PXE zwischen min 75,0 und min 99,9.

	15.07.09	16.07.09	30.07.09
AChE _{max} (mE)	247,31	192,05	383,47
Decay oped:			
k	0,3518/min	0,3886/min	0,3904/min
t ½	1,970 min	1,784 min	1,775 min
R ²	0,997	0,999	0,998
AChE _{min} (mE)	96,65	94,06	92,39
BWDAP (mE)	108,92	109,28	90,02
Restaktivität	5,4%	5,5%	7,4%

Tbl.5 zeigt die Ergebnisse der Versuche zur Hemmung muskulärer Maus-AChE durch PXE am dynamischen Modell. AChE_{max} entspricht dem Absorptionswert der AChE-Aktivität vor Hemmung durch PXE, AChE_{min} dem minimalem Absorptionswert am Ende der Zugabe von Paraoxonethyl, BWDAP ist der Blank-Wert (DTNB, ASCh, PP) nach Wechsel zum Spülfilter, decay oped steht für die Berechnung von k_{obs} der Hemmung, sowie $t_{1/2}$ mittels monophasischer exponentieller Zerfallsfunktion.

Bei der Hemmung muskulärer Maus-AChE ergaben sich eine mittlere k_{obs} der Hemmung von $0,3769 \pm 0,0218/\text{min}$, sowie eine HWZ von $1,843 \pm 0,110 \text{ min}$ und eine Restaktivität von $6,1 \pm 1,13 \%$.

4.2.5.2.3 Hemmung und Reaktivierung der Maus-Muskel-AChE mit 2 μ M PXE und 10 μ M Obidoxim (Muskel-AChE-PXE-Obi)

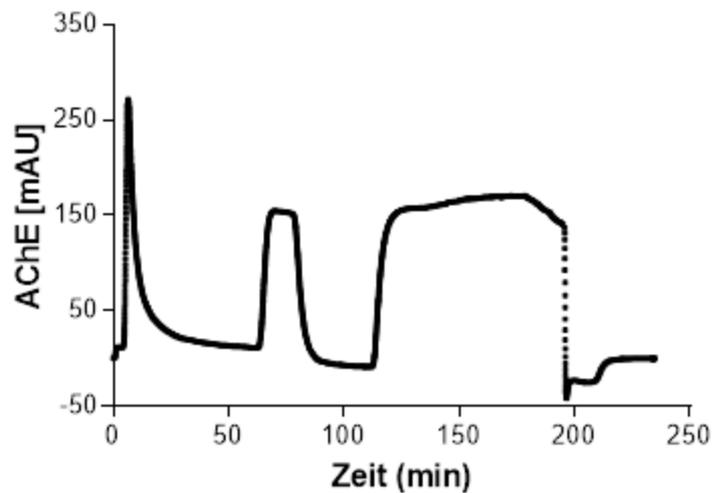


Abb.21 Hemmung muskulärer Maus-AChE mit 2 μ M PXE- Zufuhr von PXE zwischen min 75,0 und min 99,9, Reaktivierung mit 10 μ M Obidoxim- von min 110,0 – 174,9- am dynamischen Modell.

Aus den Versuchen zur Hemmung und Reaktivierung muskulärer Maus-AChE ergaben sich eine mittlere k_{obs} der Hemmung von $0,3680 \pm 0,0111/\text{min}$, sowie eine HWZ von $1,885 \pm 0,0537 \text{ min}$ und eine durchschnittliche Restaktivität von $8,1 \pm 2,74 \%$.

Zusammenfassend ergaben sich aus den Versuchen zur Hemmung und den Versuchen zur Hemmung und Reaktivierung eine mittlere k_{obs} der Hemmung von $0,3710 \pm 0,0147/\text{min}$, sowie eine HWZ von $1,871 \pm 0,075 \text{ min}$ und eine durchschnittliche Restaktivität von $7,4 \pm 2,45 \%$

Bei Reaktivierung muskulärer Maus-AChE ergaben sich eine mittlere k_{obs} der Reaktivierung von $0,3654 \pm 0,0291/\text{min}$, sowie eine HWZ von $1,907 \pm 0,154 \text{ min}$ und eine durchschnittliche Reaktivierbarkeit von $91,1 \pm 12,04 \%$.

	20.07.09	22.07.09_1	22.07.09_2	28.07.09	30.07.09	31.07.09
AChE _{max} (mE)	196,62	218,42	303,16	228,87	240,94	231,72
Decay oped:						
k	0,3689/min	0,3472/min	0,3770/min	0,3684/min	0,3685/min	0,3779/min
t ½	1,879min	1,997min	1,839min	1,881min	1,881min	1,834min
R ²	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999
AChE _{min} (mE)	77,89	96,81	121,81	100,75	84,87	91,08
Assoc oped:						
k	0,3768/min	0,3483/min	0,3624/min	0,4073/min	0,3763/min	0,3216/min
t ½	1,840min	1,990min	1,913min	1,702min	1,842min	2,155min
R ²	0,999	0,990	0,999	0,995	0,999	0,993
AChE _{reakt} (mE)	224,14	256,28	258,52	264,37	247,38	256,75
BWDAP (mE)	86,32	109,73	126,38	109,21	84,86	106,30
Restaktivität	9,5%	6,2%	8,3%	8,9%	11,8%	3,9%
Reaktivierbarkeit	97,7%	97,7%	66,9%	96,4%	91,8%	95,9%

Tbl.6 zeigt die Ergebnisse der Versuche zur Hemmung und Reaktivierung muskulärer Maus-AChE durch PXE und Obi am dynamischen Modell. AChE_{max} entspricht dem Absorptionwert der AChE-Aktivität vor Hemmung durch PXE, AChE_{min} dem minimalem Absorptionwert am Ende der Zugabe von Paraoxonethyl, vor Beginn der Reaktivierung, AChE_{reakt} ist der Absorptionwert am Ende der Reaktivierungszeit, BWDAP ist der Blank-Wert (DTNB, ASCh, PP) nach Wechsel zum Spülfilter, decay oped steht für die Berechnung mittels monophasischer exponentieller Zerfallsfunktion von k_{obs} der Hemmung, sowie $t_{1/2}$, assoc oped für die Berechnung von k_{obs} und $t_{1/2}$ der Reaktivierung mittels monophasischer exponentieller Anstiegssfunktion.

Teilweise zeigte sich ein angedeuteter biphasischer Verlauf – vor allem in den Versuchen zur Hemmung und Reaktivierung bei der Reaktivierung muskulärer AChE. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Vesikel (inside-out-Zellen oder wieder verschlossene Zellen) PXE „speicherten“ und verzögert freigaben. Restgift könnte sich zudem im Schlauch, am Filter oder auch an anderen Ghostbestandteilen (bei den Versuchen mit erythrozytärer AChE) gebunden befunden haben (beispielsweise an Albumin gebunden). Dies wäre auch eine mögliche Ursache des steilen Abfalls der AChE-Aktivität nach Absetzen von Obidoxim. Aufgrund des Versuchsaufbaus ist als Ursache eine Anreicherung von Metaboliten mit Hemmwirkung (DEP-Obidoxim) als unwahrscheinlich zu bewerten.

5. Diskussion

Häufig werden in der Forschung Mäuse als Versuchstiere verwendet, um neue Therapieoptionen zu erproben oder Vorgänge genauer zu untersuchen und die gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen.

Die Ergebnisse der umfassenden kinetischen Untersuchungen des Enzyms Acetylcholinesterase bei der Maus bei Vergiftung mit Paraoxonethyl und Reaktivierung mit Obidoxim sowie die Untersuchung der Organophosphat-Hydrolasen Arylesterase und Paraoxonase im Mausplasma zeigen einige Unterschiede zum Menschen auf, sodass dies bei der Interpretation von Daten, die an Tiermodellen erhoben werden – nicht nur bei Mäusen, sondern anderen Spezies im Allgemeinen – stets berücksichtigt werden sollte.

5.1 Substrataffinität zu ASCh

Es liegt eine höhere Substrataffinität zu ASCh als bei humaner AChE vor – wie bei der Bestimmung mittels Michaelis-Menten-Kinetik ersichtlich. Bei Maus-AChE lag der ermittelte K_m -Wert etwa bei 20 μM (0,02 mM), bei humaner AChE, ist der K_m -Wert mit 95 μM vorbeschrieben. (Worek *et al.*, 2011) Je niedriger der K_m -Wert eines Enzyms für ein Substrat ist, desto spezifischer erfolgt die Reaktion, d.h. es genügen bereits niedrige Substratkonzentrationen, um das Enzym mit halbmaximaler Geschwindigkeit arbeiten zu lassen. Dies hat auch Einfluss auf die übrigen Ergebnisse und wurde in den Berechnungen berücksichtigt. Es bestehen deutliche Speziesunterschiede bezüglich der Substrataffinität zu ASCh [Tbl.7].

	Maus	Mensch	Rhesusaffe	Meerschweinchen	Schwein	Ratte	Kaninchen
K_m (μM)	20,0	95,4	80,9	69,2	67,2	145,6	326,8

*Tbl.7 zeigt die K_m -Werte für die Substrataffinität zu Acetylthiocholin bei verschiedenen Spezies. Der Wert für den Menschen ist der Arbeit von Mast (1997), für Schwein Worek *et al.* (2008), die übrigen Werte Worek (2011) entnommen.*

Es fiel auf, dass bei der Maus die AChE-Aktivität in der Ery-Verdünnung und aus Ghosts deutlich niedriger war als bei humanen Ghosts – fast 10 fach niedriger. Die BChE-Aktivität im Mausplasma war im Verhältnis zur AChE-Aktivität aus Ghosts und in der Ery-Verdünnung höher. Rudakova *et al.* (2011) untersuchten die Aktivität der AChE und BChE im Vollblut von Mensch, Maus und Ratte im Vergleich und fanden insgesamt ebenfalls deutlich höhere Aktivitäten der AChE und BChE beim Menschen als bei der Maus und bei Ratten noch niedrigere Aktivitäten.

5.2 Versuche zur Hemmung

In den photometrischen Versuchen (statische Küvettenmessung) mit Maus-Ery-Ghosts ergab sich eine mittlere k_i von $3,41 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

In humaner AChE ist k_i mit $2,26 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ im Vergleich zu der k_i in mAChE mit $3,41 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ etwas niedriger, somit läuft die Reaktion bei der Maus etwas schneller ab, es scheint eine höhere Hemmwirkung von Paraoxonethyl auf mAChE zu bestehen, wobei die Konzentrationen des verwendeten Giftes bei der zum Vergleich herangezogenen Arbeit (Mast 1997) bei 0,01- 0,5 μM lagen, in den durchgeführten Untersuchungen im Bereich 0,5 – 1,5 μM . Bei Untersuchungen am Rhesusaffen zeigte sich eine der Maus ähnliche inhibitorische Potenz von Paraoxon, diese war bei Schweinen und Meerschweinchen deutlich geringer – und auch geringer als beim Menschen [Tbl.8]. (Herkert *et al.*, 2010) (Worek *et al.*, 2008)

Von Worek *et al.* (2011) wurde die inhibitorische Potenz von Paraoxon in Anwesenheit von Substrat bei verschiedenen Spezies bestimmt, wobei im Verhältnis eine stärkere Hemmwirkung auf menschliche Ery-AChE und Ery-AChE beim Rhesusaffen gefunden wurde als auf Ery-AChE bei der Ratte, den Meerschweinchen, Kaninchen und Schweinen. Coban *et al.* untersuchten die inhibitorische Potenz u.a. von Paraoxon auf die AChE in Hirnhomogenisat von Ratten und Mäusen im Vergleich zu humaner erythrozytärer AChE und postulieren eine vergleichbare inhibitorische Potenz. (Coban *et al.*, 2016) Die AChE-Aktivität im Gehirn scheint jedoch bezüglich des klinischen Outcomes – zumindest bei Ratten und Mäusen – eine untergeordnete Rolle zu spielen, da bereits ein minimaler Anteil von ca. 1 % ausreicht, um zu verhindern, dass sich Acetylcholin in toxischer Menge im Gehirn anreichert. (Milosević, 1970) Beim Menschen hingegen scheinen klinische Symptome bei Hemmung des Enzyms im Gehirn von 50 - 80 % aufzutreten, ab 90 % sind diese schwerwiegend. (Lotti, 2001)

	Maus	Mensch	Rhesusaffe	Meerschweinchen	Schwein
$k_i (\text{M}^{-1} \text{min}^{-1})$	$3,41 \times 10^6$	$2,26 \times 10^6$	$3,45 \times 10^6$	$4,46 \times 10^5$	$1,07 \times 10^6$

*Tbl.8 Inhibitorische Potenz von Paraoxon bei verschiedenen Spezies Die Werte für den Menschen sind der Arbeit von Mast (1997) entnommen, die Werte für Rhesusaffen und Meerschweinchen Herkert *et al.* (2010), die k_i beim Schwein von Worek *et al.* (2008).*

In den Versuchen zur Hemmung am dynamischen Modell zeigte sich eine Vergleichbarkeit von erythrozytärer und muskulärer Maus-AChE mit einer k_{obs} der Hemmung von $0,3807 \text{ min}^{-1}$ für erythrozytäre und $0,3710 \text{ min}^{-1}$ für muskuläre AChE. Herkert *et al.* (2010) untersuchten die Inhibitionsraten erythrozytärer und muskulärer AChE bei anderen Spezies am dynamischen Modell. Hierbei gab es ebenfalls eine Korrelation zwischen erythrozytärer und muskulärer AChE.

Auch beim Menschen wurde eine Vergleichbarkeit zu muskulärer AChE bei Untersuchung erythrozytärer AChE festgestellt (Eckert, 2008a) und somit auch postuliert, dass bei Untersuchungen an humaner Ery-AChE Rückschlüsse auf Ergebnisse an muskulärer AChE gezogen werden können.

Bezüglich der scheinbar hohen Restaktivität (8 % bei muskulärer, 8,7 % bei erythrozytärer Maus-AChE) nach Hemmung könnte vermutet werden, dass bei Anwesenheit von PXE im dynamischen Perfusionssystem bereits zu Beginn in gewissem Maße eine Hemmung vorhanden war (vor eigentlicher Zufuhr des Giftes), sodass nach Auswaschen des Giftes eine scheinbar höhere AChE-Restaktivität resultierte.

Die Ergebnisse der Hemmkinetiken, die nicht am dynamischen Modell durchgeführt wurden, lassen sich nur bedingt mit den Messungen zur Hemmung am dynamischen Modell vergleichen, da nur eine Messung mit $1\mu\text{M}$ PXE zur Hemmung an ersterem durchgeführt wurde. Es bestehen jedoch Hinweise auf eine Korrelation.

In den photometrischen Versuchen mittels statischer Messung mit Maus-Ery-Ghosts lag k_{obs} der Hemmung mit $1\mu\text{M}$ PXE bei $0,1762/\text{min}$ entsprechend einer HWZ von $3,961$ min. Im Vergleich hierzu ergab sich im dynamischen Perfusionssystem eine k_{obs} der Hemmung mit $1\mu\text{M}$ PXE von $0,2092/\text{min}$ entsprechend einer HWZ von $3,313$ min.

In anderen Tiermodellen ergaben sich unterschiedliche Werte für die k_{obs} der Hemmung zwischen $0,0770/\text{min}$ und $0,3414/\text{min}$ bezüglich erythrozytärer und von $0,1019/\text{min}$ bis $0,3015/\text{min}$ bezüglich muskulärer AChE. (Herkert *et al.*, 2010)

Schwankungen der erhobenen Messwerte vor allem bei den Untersuchungen mit der muskulären Maus-AChE könnten sich daraus ergeben, dass die Verarbeitung des gewonnenen Materials schwierig war. So bildeten sich beispielsweise Klumpen bei der Ghost-Herstellung, welche schwer aufzulösen waren und zu Aktivitätsverlust in den AChE-Messungen führten. Auch war für eine Giftentfernung im Dialyseschlauch – wie für andere Tiermodelle oder auch humanes Blut verwendet – zu wenig Material vorhanden, sodass eine andere Methode angewandt werden musste.

5.3 Untersuchungen am Mausplasma

Unterschiede zum Menschen bestehen auch bezüglich der im Plasma vorhandenen Enzyme. Beispielsweise führen unterschiedliche bereits im Plasma vorhandene Mengen von Carboxylesterasen bei der Maus dazu, dass Carbamate, welche als reversible AChE-Inhibitoren zur Behandlung von Vergiftungen eingesetzt werden, schneller abgebaut werden und daher insbesondere bei einer Vorbehandlung vor Vergiftung ein schlechterer Schutz besteht als beim Menschen. (Berry und Davies, 1970) (Gordon, Leadbeater, Maidment, 1978) (Eckert *et al.*, 2006a) Zugleich kann es durch die große Menge an Carboxylesterasen auch zu einer schnelleren Entgiftung kommen, da diese auch als Scavenger wirken und dadurch verhindern können, dass Organophosphate ihre Hemmwirkung auf die AChE ausüben können. (Sterri und Fonnum, 2015) Bei der Maus wurde eine deutlich höhere Menge an frei zirkulierenden Carboxylesterasen gefunden als beim Menschen – etwa 30-fach mehr. (Rudakova, Boltneva und Makhaeva, 2011) Lian *et al.* (2018) beschrieben auch 20 Genloci bei der Maus im Vergleich zu 6 beim Menschen.

Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass – anders als früher angenommen (Maxwell und Brecht, 1991) (Pereira *et al.*, 2014) – wohl auch bei Meerschweinchen und Ratten Carboxylesterasen im Plasma eine Rolle zu spielen scheinen. (Napon *et al.*, 2018)

Li *et al.* (2005) wiesen ebenfalls bei Mäusen, Ratten, Kaninchen, Pferden, Katzen und Tigern relevante Mengen an Carboxylesterasen im Plasma nach und fanden auch neben der Butyrylcholinesterase Acetylcholinesterase im Mausplasma, wohingegen beim Menschen AChE im Blut fast ausschließlich an Erythrozyten gebunden vorkommt. Zudem beobachteten sie, dass BChE beim Menschen durch u.a. Paraoxon irreversibel gehemmt wird, während sich Maus-BChE spontan reaktivierte.

Es wurden bereits genetisch modifizierte Mäuse gezüchtet, welche bezüglich der Carboxylesterase dem menschlichen Organismus näher kommen. (Duysen *et al.*, 2011)

Suemizu *et al.* (2018) führten auch Untersuchungen an Maus-Chimären mit humanisierter Leber durch, um zum Menschen ähnliche BChE-Aktivitäten im Plasma von Mäusen zu erzielen.

Auch bezüglich der Paraoxonase und Arylesterase bestehen Speziesunterschiede bezüglich des Vorkommens bzw. der Menge der Enzyme. Beim Menschen gibt es aufgrund des genetischen Polymorphismus auch innerhalb der „Spezies“ unterschiedlich hohe Aktivitäten dieser Enzyme. (Burns *et al.*, 2013)

Bei der Maus scheint mit 160,1 U/ml eine zum Menschen vergleichbare Arylesterase-Aktivität vorzuliegen. Gemäß Kiderlen *et al.* (2005) wurde beim Menschen eine Arylesterase-Aktivität von 118,5 – 213,5 U/ml festgestellt. Die Arylesterase-Aktivität wurde an einer anderen Stelle mit 141,1 – 153,8 U/ml angegeben (Mackenzie Ross *et al.*, 2010). Hülsmann (2009) fand in Abhängigkeit zur Ernährung beim Menschen Werte zwischen 148,8 und 161,1 U/ml. Rudakova *et al.* (2011) fanden ebenfalls vergleichbare Aktivitäten der Arylesterase bei Mensch, Maus und Ratten.

Die Paraoxonase-Aktivität im Mausplasma betrug in Anwesenheit von NaCl 259,9 U/l, ohne NaCl 369,4 U/l. Konsekutiv ergab sich ein Quotient von 0,70 für den NaCl-Faktor im Vergleich zu 1,90 – 2,55 beim Menschen. Bei Ratte, Meerschweinchen, Schwein und Rhesusaffe konnte die Paraoxonase-Aktivität unter Anwesenheit von NaCl ebenfalls nicht gesteigert werden, bei Ratten und beim Rhesusaffen war die Aktivität in Anwesenheit von NaCl sogar geringer – so wie es auch im Mausplasma der Fall war.

Tatsächlich scheint eine deutliche Stimulation der Paraoxonase-Aktivität durch NaCl nur beim Menschen vorzuliegen. Die genaue Ursache hierfür ist bislang nicht genau geklärt, zeigt aber einmal mehr auf, wie unterschiedlich Enzyme, die bei verschiedenen Spezies ähnliche Reaktionen katalysieren, aufgebaut sein können.

Es fiel auf, dass die Paraoxonase-Aktivität bei der Maus durchschnittlich insgesamt etwas höher als in humanem Plasma war.

Hülsmann (2009) fand eine Paraoxonase-Aktivität von 83,8 – 144,3 U/l beim Menschen.

Die Aktivität beim Menschen wurde in einer anderen Arbeit mit 45,5 – 265,8 U/l (Xu et al. 2005) angegeben. Kiderlen et al. (2005) fanden hingegen eine sehr variable Paraoxonase-Aktivität von durchschnittlich 149,7 – 502,5 U/l ohne NaCl, und 290,5 – 1256 U/l mit NaCl.

Kiderlen et al. (2005) untersuchten auch die Aktivitäten von Paraoxonase und Arylesterase im Plasma bei verschiedenen Spezies. Die Paraoxonase- und Arylesterase - Aktivität war bei anderen Spezies beispielsweise beim Schwein, Rhesusaffen, Pavian und Javaneraffen niedrig im Vergleich zu der Aktivität beim Kaninchen, den Meerschweinchen, der Ratte und den humanen Proben. Insbesondere bei den Kaninchen zeigten sich um ein Vielfaches höhere Werte als bei allen anderen Spezies. Mortazavi et al. (2021) fanden Paraoxonase-Aktivitäten bei Ratten im Mittel bei etwa 250 U/l.

Es besteht die Annahme, dass eine hohe Aktivität sich auch positiv auf den Therapieerfolg beim Einsatz von Obidoxim in der Therapie von Vergiftungen mit Paraoxonethyl auswirkt. Paraoxonase ist eine Arylesterase, je höher der Anteil der Paraoxonase an der Arylesterase, desto besser ist dies wahrscheinlich bzgl. der protektiven Wirkung bei Vergiftungen. (Geldmacher-v. Mallinckrodt *et al.*, 1972)

In Studien an Mäusen und Ratten wurde eine protektive Wirkung einer PON-1-Gabe bei Vergiftungen mit Organophosphaten gezeigt. (Mackness und Mackness, 2015)

Beispielsweise führte eine Gabe von aufbereiteter PON-1 von Kaninchen (bei denen eine extrem hohe Paraoxonase-Aktivität besteht) zu einer 30 – 40fach höheren Aktivität gegen Chlorpyrifos. (Costa *et al.*, 2013)

Lie et al. (1995) stellten eine protektive Wirkung auch bei Verabreichung von Paraoxonase 30 min bis 3 Stunden nach Vergiftung fest, dies würde bedeuten, es bestünde auch eine Möglichkeit des therapeutischen Einsatzes, denn in der Regel ist eine prophylaktische Gabe nicht möglich, weil die Ingestion in akzidenteller oder suizidaler Absicht geschieht.

5.4 Alterung und Spontanreaktivierung

In den Versuchen zur Alterung und Spontanreaktivierung zeigten sich bei der Maus eine vergleichsweise sehr schnelle Spontanreaktivierung, aber auch eine schnelle Alterung, welche jedoch im Verhältnis zur Geschwindigkeit der Spontanreaktivierung betrachtet langsam abläuft.

Eine ältere Studie ist mit diesem Ergebnis konkordant, so fanden Asperen und Dekhuijzen 1958 heraus, dass sich die AChE aus Maus-Gehirn sehr schnell – innerhalb von 3 Stunden – von initial 30 % Aktivität spontan auf 70 % Aktivität reaktivierte. (O'Brien, 1960)

Dennoch war dies überraschend, wenn man hierzu im Vergleich die Werte bei humaner AChE mit einer HWZ_s von 31,0 h und einer HWZ_a von ebenfalls 31,0 h betrachtet (Mast, 1997) und im Vergleich mit anderen Tiermodellen sieht [Tbl.10].

	Maus	Mensch	Rhesusaffe	Meerschwein	Schwein	Ratte	Kaninchen
Spontanreaktivierung							
HWZ_s (h)	1,06	31,0	57,7*/33,0	26,7*/27,7	34,7	46,2	34,7
k_s (h^{-1})	0,651	0,022	0,012*/0,021	0,026*/0,025	0,020	0,015	0,020
Alterung							
HWZ_a (h)	5,53	31,0	68,6*/43,3	31,5*/33,0	33,0	33,0	30,1
k_a (h^{-1})	0,125	0,022	0,010*/0,016	0,022*/0,021	0,021	0,021	0,023

Tbl.10 Überblick über die Halbwertszeiten der Spontanreaktivierung und Alterung (in Stunden) bei der Maus, dem Menschen und anderen Spezies, sowie der jeweiligen Konstanten (h^{-1}). Die Werte für den Menschen und für Schweine sind der Arbeit von Worek et al. (2008) entnommen, die Werte für Rhesusaffen und Meerschweinchen* stammen von Herkert et al. (2010), die Werte von Ratte, Kaninchen, Rhesusaffen und Meerschweinchen von Worek et al. (2011). Zur besseren Übersichtlichkeit Darstellung der Mittelwerte ohne SD (s. Ergebnisteil und Originalarbeiten).*

Während von Worek et al. (2008, 2011) und Herkert et al. (2010) vergleichbare Werte für die Alterung bei Vergiftung mit PXE bei verschiedenen Spezies gefunden wurden, gibt es bei Vergiftung beispielsweise mit Nervenkampfstoffen (Soman, V-Kampfstoffen) deutlichere Speziesunterschiede. (Talbot et al., 1988) (Aurbek et al., 2006) Die Werte beim Rhesusaffen unterscheiden sich in den zwei zum Vergleich herangezogenen Studien relativ stark. Noch ausgeprägter ist jedoch der Unterschied zur Alterung und Spontanreaktivierung bei der Maus, welche jeweils viel schneller ablaufen, als bei den anderen Spezies.

Am ehesten lassen sich diese Unterschiede mit strukturellen Unterschieden der AChE bei den verschiedenen Spezies erklären.

Ansonsten bleibt unklar, weshalb die Halbwertszeiten von Spontanreaktivierung und Alterung so kurz im Vergleich zu anderen Spezies waren. Weitere Untersuchungen könnten vielleicht Aufschluss darüber geben, ob eine Maus-spezifische Ursache vorliegt, so dass eine genauere Untersuchung der Spontanreaktivierung ein Ansatzpunkt sein könnte.

Für eine mögliche Übertragung der Daten auf Prozesse *in vivo* ist auch zu berücksichtigen, dass vermutlich bei Vergiftungen mit hohen Giftkonzentrationen – zum Beispiel in suizidaler Absicht – eine niedrigere Spontanreaktivierung stattfindet, da hier auch eine Abhängigkeit zur Giftkonzentration besteht. (Worek *et al.*, 1997, 1999a)

5.5 Versuche zur Oxim-induzierten Reaktivierung

In den Versuchen zur Reaktivierungskinetik zeigte sich eine im Vergleich zum Menschen schnellere und – auch in Zusammenschau mit der geringen Alterung im Verhältnis zur hohen Spontanreaktivierung – bessere Reaktivierbarkeit der AChE bei der Maus.

Es ergab sich eine im Vergleich zu humaner AChE höhere Reaktivierungskonstante von $37,7 \text{ mM}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Diese lag bei Untersuchungen an PXE-gehemmter humaner AChE bei Reaktivierung mit Obidoxim bei $25,1 \text{ mM}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Worek, 2004)

Einen Überblick über die Reaktivierungskonstanten bei verschiedenen Spezies im Vergleich gibt Tbl. 11. Wieder werden hier Speziesunterschiede deutlich – mit sehr niedrigen Werten beim Kaninchen und sehr hohen bei der Ratte.

	Maus	Mensch	Rhesusaffe	Meerschwein	Schwein	Ratte	Kaninchen
$k_r (\text{min}^{-1})$	0,33	0,81	0,64	0,69	0,55	0,93	0,16
$K_D (\mu\text{M})$	8,9	32,2	25,9	27,8	39,7	16,4	29,3
$k_{r2} (\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1})$	37,7	25,1	24,6	25,2	13,9	57,9	5,5

*Tbl.11 Reaktivierungskonstanten verschiedener Spezies und beim Menschen im Vergleich nach Reaktivierung PXE-vergifteter Ery-AChE mit $10\mu\text{M}$ Obidoxim. Die Daten für den Menschen sind Worek *et al.* (2004) entnommen, für Schwein Worek *et al.* (2008), für Ratte und Kaninchen Worek *et al.* (2011), für Meerschweinchen und Rhesusaffen Herkert *et al.* (2010).*

Anhand der erhobenen Daten zu den Reaktivierungskonstanten (Punkt 4.2.5.1) konnte die scheinbare Reaktivierungskonstante k_{obs} für 10 μM Obidoxim errechnet werden.

k_{obs} der Reaktivierung am statischen Küvettenmodell betrug 0,3302/min. Hieraus ließ sich die HWZ der Reaktivierung berechnen. Diese ist: $t_{1/2} = \ln(2)/k_{obs} = 2,0988$ min. Im dynamischen Perfusionssystem ergaben sich im Vergleich eine mittlere k_{obs} der Reaktivierung von 0,3313/min, sowie eine HWZ von 2,099 min.

In vorangegangenen Untersuchungen (Worek *et al.*, 1997) wurde eine Reaktivierungs-HWZ von 4,3 min von erythrozytärer AChE im statischen Küvettenmodell gemessen, sodass hier auch im Vergleich von einer schnelleren Reaktivierung bei der Maus ausgegangen werden kann.

Tbl. 12 stellt die scheinbaren Reaktivierungskonstanten bei Untersuchung erythrozytärer und muskulärer AChE verschiedener Spezies am dynamischen Modell gegenüber.

	Maus	Mensch	Rhesusaffe	Meerschweinchen	Schwein
Erythrozytär: k_{obs} (min^{-1})	0,3313	0,172	0,1401	0,2319	0,2238
HWZ (min)	2,099	4,03	4,947	2,989	3,097
Muskulär: k_{obs} (min^{-1})	0,3654	0,114	0,0781	0,1697	0,1507
HWZ (min)	1,907	6,080	8,875	4,084	4,599

*Tbl.12 Vergleich der scheinbaren Reaktivierungskonstanten k_{obs} und Halbwertszeiten der Reaktivierung mit 10 μM Obidoxim nach Hemmung mit Paraoxon (2 μM für Maus und GP, 1 μM für Rhesusaffen, Schwein und Mensch) von erythrozytärer und muskulärer AChE bei Messung am dynamischen Modell. Die Werte für Rhesusaffen, Meerschweinchen und Schwein stammen aus der Arbeit von Herkert *et al.* (2010), Werte für den Menschen von Eckert *et al.* (2006b, 2008a).*

Wie bei den Versuchen zur Hemmung gab es auch hier eine Korrelation zwischen erythrozytärer und muskulärer AChE, sowie eine Korrelation der Daten der erythrozytären AChE zwischen dynamischem Modell und den „statischen“ Küvettenmessungen. Jedoch sind vor allem die am dynamischen Modell erhobenen Daten zur Reaktivierbarkeit kritisch zu hinterfragen, da während der Versuche (wie auch weiter oben bzgl. Der Hemmung am dynamischen Modell erwähnt) auffiel, dass in den Experimenten, bei denen PXE beteiligt war, eine geringere AChE_{max} gemessen wurde, als anhand der zuvor durchgeführten Stabilitätsmessungen (AChE-Max und Muskel-AChE) zu erwarten gewesen wäre. Eine Erklärung könnte sein, dass PXE im System bereits vor der eigentlichen Zufuhr diffundierte und dadurch bereits eine Hemmung vor der eigentlichen Zufuhr bestand, sodass nach Auswaschen des Giftes eine höhere AChE-Aktivität resultierte, die nicht nur auf die Reaktivierung durch Obidoxim zurückzuführen war und es den Anschein hatte, als ob eine enorm hohe Reaktivierbarkeit vorliege. Allerdings könnte hier auch die rapide Spontanreaktivierung eine Rolle spielen.

Ungeachtet dessen besteht bei der Maus eine im Vergleich zu anderen Spezies und damit auch dem Menschen (abgesehen von der Ratte) eine hohe Reaktivierbarkeit, bei hoher Affinität zum Oxim, aber auch kürzerer Reaktivierungs-HWZ.

In einer Studie, in welcher Lebendmäuse mit Paraoxon-diethyl vergiftet wurden, die Temperatur, die Lungenfunktion und klinische Anzeichen der Vergiftung beobachtet wurden und eine Behandlung mit Pralidoxim erfolgte, zeigte sich, dass zunächst eine deutlich höhere Dosis von Paraoxon-diethyl erforderlich war, um einen vergleichbaren Effekt wie bei vorangegangenen Untersuchungen des betreffenden Forschungsteams mit Ratten zu erzielen, zudem normalisierten sich Werte, welche bezüglich der respiratorischen Toxizität erhoben wurden, nach 180 min, wohingegen dies bei den Untersuchungen an Ratten nach 4 Stunden immer noch nicht der Fall war. (Houzé *et al.*, 2018)

Dawson (1994) fand bei einem Vergleich von in-vivo-Studien bezüglich der Effektivität verschiedener Oxime einen guten Schutz bei allen Oximen bei Mäusen, bei HI-6 war dieser beispielsweise auch bei niedrigen Dosierungen sehr gut ausgeprägt.

Diese Ergebnisse unterstreichen nicht nur einmal mehr, dass bei den Untersuchungen an Tiermodellen die Übertragbarkeit auf den Menschen kritisch hinterfragt werden muss, da erhebliche Speziesunterschiede bestehen, sondern passen auch zu den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnissen. Eine gute Reaktivierbarkeit in vivo kann in Zusammenschau der in vitro erhobenen Ergebnisse vermutet werden, wenn man die hohe Spontanreaktivierung, die im Verhältnis geringe Alterung, die hohe Substrataffinität, die relativ hohe Paraoxonase-Aktivität und die in anderen Arbeiten vorbeschriebene hohe Carboxylesterase-Menge im Mausplasma berücksichtigt.

Auch eine Untersuchung an Maus-Muskelpräparaten bestätigte neben einer sehr guten Reaktivierbarkeit der muskulären Maus-AChE durch Obidoxim nach Vergiftung durch Paraoxon, die gute Wiederherstellbarkeit der Muskelkraft an den Maus-Hemidiaphragmen, für welche bereits niedrige Dosierungen genügten. (Thiermann, Eyer und Worek, 2010)

Schoene *et al.* stellten bereits 1988 bei Untersuchungen an Mäusen fest, dass die Wirkung nach Gabe von Obidoxim deutlich länger anhielt, als das Oxim im Blut nachweisbar war. Die Ursache hierfür war nicht ganz klar, vermutet wurden u.a. verzögerte Effekte, welche durch die Wirkung an den Zielorganen in zeitlichem Abstand zum Nachweis im Blut aufgetreten sein könnten; die Bildung effektiver Metabolite; ein Ausdruck komplexer Mechanismen wie allosterische Effekte auf die AChE oder die cholinergen Rezeptoren. (Schoene *et al.*, 1988) Unabhängig von der Ursache zeigte sich aber eine gute Wirksamkeit von Obidoxim. Interessant wäre, ob bei Versuchen an anderen Spezies in ähnlichem Versuchsmodell auch vergleichbare Ergebnisse zu erzielen wären insbesondere in Hinblick auf die Übertragbarkeit auf den Menschen.

Szinicz *et al.* fanden deutliche Speziesunterschiede bezüglich der Reaktivierungskonstanten bei Meerschweinchen, Kaninchen und Ratten im Vergleich zum Menschen. (Szinicz *et al.*, 2007)

Weitere Untersuchungen wären vor allem im Bereich der Reaktivierung und Spontanreaktivierung, sowie am Mausplasma (Paraoxonase, Carboxylesterase) sinnvoll, um protektive Faktoren zu identifizieren und letztlich neue Therapieansätze zu entwickeln.

Zusammenfassend zeigen sich Speziesunterschiede in verschiedenen Bereichen. Beispielsweise ist die inhibitorische Potenz von Paraoxon bei Meerschweinchen im Vergleich sehr gering, bei Kaninchen wurden um ein Vielfaches höhere Werte für die Enzyme Arylesterase und Paraoxonase gefunden als bei anderen Spezies und zudem eine niedrige Reaktivierungskonstante bei der Oxim-induzierten Reaktivierung. Bei Ratten hingegen wurde eine sehr gute Reaktivierbarkeit, noch höher als bei Mäusen, vorbeschrieben. Bei Mäusen fiel hier zudem die schnelle Spontanreaktivierung auf.

Hinsichtlich der Erprobung neuer Therapieoptionen könnten daher beispielsweise genetisch modifizierte Tiere – wie etwa die vor kurzem entwickelte sog. KIKO-Maus, bei welcher humane AChE integriert und Maus-Carboxylesterase eliminiert wurde, zukunftssträftig sein. (Marrero-Rosado *et al.*, 2021) (Duyzen *et al.*, 2011) Hierzu müssten jedoch noch Vergleichsstudien durchgeführt werden, da die Unterschiede von Maus und Mensch wahrscheinlich nicht nur durch diese zwei Enzyme zu begründen sind.

6. Zusammenfassung

Aufgrund der weiterhin hohen Zahlen von Vergiftungen – akzidentell und in suizidaler Absicht – mit Organophosphor-Verbindungen, die in der Landwirtschaft in großen Teilen der Welt noch eingesetzt werden ist es wichtig, geeignete Therapiemöglichkeiten zu untersuchen und wenn möglich neue Medikamente zur Behandlung bzw. Antagonisierung von Vergiftungen zu entwickeln. Hierfür ist es unabdingbar, auch Versuche an Tiermodellen durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Acetylcholinesteraseaktivität in Mausblut sowie im Mausmuskel untersucht, wobei für die Hemmung Paraoxonethyl und für die Reaktivierung Obidoxim verwendet wurde. Ebenso wurden die Spontanreaktivierung und Alterung untersucht. Ziel war es, orientierend zu eruieren, ob die Maus ein geeignetes Tiermodell darstellt, also ob die Ergebnisse mit denen bei humaner AChE vergleichbar sind.

Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten einerseits photometrisch mittels statischer Küvettenmessungen, es wurden aber auch photometrische Versuche am dynamischen Modell mit erythrozytärer und muskulärer Maus-AChE durchgeführt. Zusätzlich wurden die Paraoxonase- und Arylesterase-Aktivität im Mausplasma gemessen sowie die Substrataffinität zu Acetylthiocholin (ASCh) mittels Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt, um diese bei den weiteren Berechnungen zu berücksichtigen.

Hierbei ergaben sich eine hohe Substrataffinität zu ASCh, sowie eine bessere Reaktivierbarkeit als für humane AChE, jedoch auch eine höhere inhibitorische Potenz von Paraoxon auf Maus-AChE. Ferner zeigten sich eine unerwartet schnelle Spontanreaktivierung und Alterung, wobei die Alterung im Verhältnis zur Spontanreaktivierung als langsam bewertet werden kann.

Vermutlich besteht ein nicht zu vernachlässigender Einfluss von frei im Mausplasma zirkulierenden Carboxylesterasen, die als sog. „Bioscavenger“ fungieren können und damit zu schnellerer Entgiftung führen. Dies sollte bei Extrapolation der Daten zum Menschen berücksichtigt werden, da freie Carboxylesterasen in menschlichem Plasma bislang nicht nachgewiesen wurden.

Auch sonst gibt es Unterschiede bezüglich der im Plasma vorhandenen Enzyme. In den letzten Jahren wurde viel Forschung im Bereich der Enzyme Paraoxonase und Arylesterase durchgeführt, wobei ein hoher Anteil an Paraoxonase im Verhältnis zur Arylesterase im Allgemeinen als günstig angesehen wird. In den hierzu durchgeführten Untersuchungen ergab sich eine zum Menschen vergleichbare Arylesterase-Aktivität bei im Verhältnis durchschnittlich etwas höherer Paraoxonase-Aktivität bei der Maus.

Es zeigte sich, dass grundsätzlich eine Vergleichbarkeit zwischen den Untersuchungen, welche mit der konventionellen photometrischen Methode durchgeführt wurden und denen, welche am dynamischen Modell durchgeführt wurden, besteht. Zudem zeigten sich Hinweise auf eine gute Vergleichbarkeit von erythrozytärer und muskulärer AChE bezüglich der Hemmung und Reaktivierbarkeit. Dies bestätigt vor dem Hintergrund der bei anderen Spezies und beim Menschen publizierten Werte, dass eine Übertragbarkeit von Ergebnissen, die bei Versuchen mit humaner erythrozytärer AChE durchgeführt werden, auf muskuläre AChE besteht.

Weitere Untersuchungen der im Plasma vorhandenen und als Scavenger fungierenden Enzyme könnten ein Ansatz für Therapieoptionen sein. Zudem wären ergänzende Untersuchungen im Bereich der Spontanreaktivierung und Alterung aufgrund der ungewöhnlichen Werte interessant. Auch andere, Maus-spezifische Eigenschaften beispielsweise der AChE könnten ursächlich sein.

Aufgrund der in vielen der untersuchten Bereiche deutlichen Speziesunterschiede scheinen (genetische) Modifikationen – beispielsweise am Mausmodell – ein sinnvoller Kompromiss zu sein, um letztlich eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu erreichen, wobei immer auch in den Modifikationen nicht berücksichtigte speziesspezifische Eigenschaften interferieren können, was stets zu kritischem Hinterfragen der Ergebnisse führen sollte.

6. Abstract

Owing to the continued high number of intoxications – accidental or intentional – with organophosphorous compounds, which are still being used in numerous countries across the world in agriculture, it is important to develop and test new strategies and methods of treatment. To this end it is unavoidable to study these new methods using animal models. In this work the activity of acetylcholinesterase was examined in the blood and muscle-tissue of mice, whereas paraoxonethyl was chosen as inhibitor and obidoxime as the reactivating agent. Furthermore, the spontaneous reactivation- and aging-kinetics were examined. The goal was to determine whether the results obtained in mice show a good correlation with the corresponding results in humans, so that results gained utilizing the mouse-model can be extrapolated to humans.

The kinetic experiments were conducted using the conventional static cuvette-model, but also a dynamically working in-vitro-model (for erythrocyte- and muscle-AChE-activities) to examine the enzyme activities photometrically. In addition, arylesterase- and paraoxonase-activities in the plasma of mice was measured and the substrate-affinity to acetylthiocholine was determined to correct for this value.

A high substrate-affinity to acetylthiocholine was observed, as well as a better reactivity than with human AChE, but also a faster inhibition. Furthermore a fast spontaneous reactivation and aging of AChE was detected in mice whereas the aging-rate could be described as slow compared to the even faster rate of spontaneous reactivation.

One explanation might be a not to be underestimated effect of carboxylesterases that circulate in the plasma of mice and can act as “bioscavengers” which leads to faster detoxification. This should be accounted for when extrapolating the results because these enzymes could to date not be detected in human plasma.

There are also differences between other enzymes in human versus mouse plasma. Over the past years many studies have been conducted concerning the enzymes arylesterase and paraoxonase. Usually a high proportion of paraoxonase is viewed as beneficial. In mice the arylesterase-activity seems to be comparable to the activity in humans while the mean paraoxonase-activity appears to be a bit higher in mice.

The results of the experiments conducted using the conventional static cuvette-model were comparable to those acquired with the dynamically working in-vitro-model. Furthermore the results of inhibition and reactivation with erythrocyte- and muscle-AChE respectively were comparable with each other. This - in light of published results with other species - supports the assumption that experiments with human erythrocyte-AChE can mirror possible outcome with muscle-AChE.

Further studies of enzymes in plasma that can act as scavengers could be an approach for therapeutic options. Additionally research in respect to spontaneous reactivation and aging in mice would be interesting because of the unusual results. Maybe other mouse-specific properties – for example concerning the AChE-structure – could be causative.

Due to the apparent species-related differences (genetically) modified animal models – e.g. mouse models – might be a compromise to acquire results that can be better extrapolated to humans, but species-related differences which could cause interference and were not included in the modifications need to be kept in mind and should lead to critical interpretation of the obtained data.

7. Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChE _{max}	maximaler AChE-Wert (Absorption) vor Beginn der Hemmung
AChE _{min}	minimaler AChE-Wert (Absorption) am Ende der Zugabe von Paraoxonethyl bzw vor Beginn der Reaktivierung
AChE _{reakt}	AChE-Wert (Absorption) am Ende der Reaktivierungszeit
ASCh	AcetylthiocholinIodid
Ak-Blank	Aktivität Blank
Anm.	Anmerkung
Assoc oped	monophasische exponentielle Anstiegsfunktion für die Berechnung von k_{obs} der Reaktivierung, sowie $t_{1/2}$ am dynamischen Modell
AV-Block II	Atrioventrikulärer Block Grad II
BChE	Butyrylcholinesterase
BSCh	Butyrylthiocholin
BWDAG	Blank-Wert DTNB, ASCh, GPP
BWGPP	Blank-Wert Gelatine-Phosphatpuffer
Decay oped	monophasische exponentielle Zerfallsfunktion für die Berechnung von k_{obs} der Hemmung, sowie $t_{1/2}$ am dynamischen Modell
DEP-Obidoxim	Diethylphosphoryl-Obidoxim
DTNB	5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoesäure
Ery	Erythrozyten
Ery-AChE	erythrozytäre Acetylcholinesterase
GD-Plasma	Soman-gehemmtes Plasma
gepackte Erys	Zwischenprodukt bei der Herstellung von Maus-Erythrozyten-Ghosts, nach dem 2. Waschgang
Ghosts	isolierte, hämoglobinfreie Erythrozytenmembranen
GPP	Gelatine-Phosphat-Puffer
hAChE	humane Acetylcholinesterase
Hb	Hämoglobin
HWZ	Halbwertszeit
iv	intra venös
M	Molekülmasse
mAChE	Maus-Acetylcholinesterase
mAChE _{PXE}	Mit Paraoxonethyl vergiftete Maus-Acetylcholinesterase
Muskel-ÄChE	muskuläre Maus-Acetylcholinesterase
MW	Mittelwert
Obi	Obidoxim
OP	Organophosphat
PO	hyposmolarer Phosphatpuffer
POX	Phosphyloxim
PP	Phosphatpuffer
PXE	Paraoxonethyl
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VHF	Vorhofflimmern

8. Literatur

- Atkins, P. W., Beran, J. A. (1998) *Chemie-einfach alles*. Weinheim, Deutschland: VCH Verlagsgesellschaft mbH. S. 926-927.
- Aurbek, N., Thiermann, H., Eyer, F., Eyer, P., Worek, F. (2006) Analysis of inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds with human and pig acetylcholinesterase. *Toxicology*, 224(1–2): 91-99.
- Aurbek, N., Thiermann, H., Eyer, F., Eyer, P., Worek, F. (2009) Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudo catalytic scavenger in organophosphate poisoning: a kinetic analysis. *Toxicology*. 259(3):133-139.
- Balali-Mood, M., Balali-Mood, K., Moodi, M., Balali-Mood, B. (2012) Health aspects of organophosphorous pesticides in Asian countries. *Iran J Public Health*. 41(10):1-14.
- Balali-Mood, M., Shariat, M. (1998) Treatment of organophosphate poisoning. Experience of nerve agents and acute pesticide poisoning on the effects of oximes. *J Physiol Paris*. 92(5-6): 375-378.
- Ballantyne, B., Marrs, T. C. (1992) In: *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Oxford: Butterworth-Heinemann. S. 297 -300.
- Berry, W., Davies, D. (1970) The use of carbamates and atropine in the protection of animals against poisoning by 1, 2, 2-Biochem, trimethylpropyl methylphosphonofluoridate. *Biochem Pharmacol*. 19: 927-34.
- Betapudi, V., Goswami, R., Silayeva, L., Doctor, D. M., Chilukuri, N. (2020) Gene therapy delivering a paraoxonase 1 variant offers long-term prophylactic protection against nerve agents in mice. *Science Translational Medicine*. 12(527).
- Bieg, S. D., Maelicke, A. P. D. (ohne Datum) Acetylcholin-Esterase. *Chemgapedia*. Verfügbar unter:
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/biokatalyse_enzyme/acetlycholinesterase.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/biokatalyse/ache_4.vscml.html (Zugegriffen: 10. März 2019).
- Bird, S. B., Sutherland, T. D., Gresham, C., Oakeshott, J., Scott, C., Eddleston, M. (2008) OpdA, a bacterial organophosphorus hydrolase, prevents lethality in rats after poisoning with highly toxic organophosphorus pesticides. *Toxicology*. 247(2-3): 88-92.
- Bosak, A., Bavec, A., Konte, T., Šinko, G., Kovarik, Z., Goličnik, M. (2020) Interactions of Paraoxonase-1 with Pharmacologically Relevant Carbamates. *Molecules*. 25 (1): 211.
- Burns, C. J., McIntosh, L. J., Mink, P. J., Jurek, A. M., Li, A. A. (2013) Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: review of the epidemiologic and animal studies. Part B, Critical reviews. *Journal of toxicology and environmental health*, 16(3-4): 127-283.
- CAMEO Chemicals (1992) Paraoxon. Verfügbar unter:
<https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/16198>.

- Coban, A., Carr, R. L., Chambers, H. W., Willeford, K. O., Chambers, J. E. (2016) Comparison of inhibition kinetics of several organophosphates, including some nerve agent surrogates, using human erythrocyte and rat and mouse brain acetylcholinesterase. *Toxicology letters*. 248: 39-45.
- Costa, L. G., Giordano, G., Cole, T. B., Marsillach, J., Furlong, C. E. (2013) Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity. *Toxicology*. 307: 115-122.
- Darvesh, S., Hopkins, D., Geula, C. (2003) Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci*. 4: 131-138.
- Dawson, R.M. (1994) Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *J Appl Toxicol*. 14(5):317-31.
- De Silva, H., Samarawickrema, N., Wickremasinghe, A. (2006) Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 100(9):803-6.
- Duysen, E.G., Koentgen, F., Williams, G.R., Timperley, C.M., Schopfer, L.M., Cerasoli, D.M., Lockridge, O. (2011) Production of ES1 plasma carboxylesterase knockout mice for toxicity studies. *Chemical Research in Toxicology*. 24(11):1891-8.
- Eckerson, H.W., Wyte, C.M., Du, B.N.L.A. (1983) The Human Serum Paraoxonase / Arylesterase Polymorphism. *Am J Hum Genet*. 35: 1126-1138.
- Eckert, S., Eyer, P., Herkert, N., Bumm, R., Weber, G., Thiermann, H., Worek, F. (2008a) Comparison of the oxime-induced reactivation of erythrocyte and muscle acetylcholinesterase following inhibition by sarin or paraoxon, using a perfusion model for the real-time determination of membrane-bound acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 75(3): 698-703.
- Eckert, S., Eyer, P., Melzer, M., Thiermann, H., Worek, F. (2008b) Effects of oximes on rate of decarbamylation of human red blood cell AChE measured with two different methods. *Biochemical Pharmacology*, 75(7): 1561-1566.
- Eckert, S., Eyer, P., Mueckter, H., Worek, F. (2006a) Kinetic analysis of the protection afforded by reversible inhibitors against irreversible inhibition of acetylcholinesterase by highly toxic organophosphorus compounds. 72: 344-357.
- Eckert, S., Eyer, P., Mueckter, H., Worek, F. (2006b) Development of a dynamic model for real-time determination of membrane-bound acetylcholinesterase activity upon perfusion with inhibitors and reactivators. *Biochemical Pharmacology*. 72(3): 358-365.
- Eckert, S., Eyer, P., Worek, F. (2007) Reversible inhibition of acetylcholinesterase by carbamates or huperzine A increases residual activity of the enzyme upon soman challenge. *Toxicology*. 233(1-3 SPEC. ISS.): 180-186.
- Eddleston, M., Buckley, N.A., Eyer, P., Dawson, A.H. (2008) Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet*. 371(9612): 597-607.

- Eddleston, M., Chowdhury, F. R. (2016) Pharmacological treatment of organophosphorus insecticide poisoning: the old and the (possible) new. *British journal of clinical pharmacology*. 81(3): 462-470.
- Eddleston, M., Clutton, R. E., Taylor, M., Thompson, A., Worek, F., John, H., Thiermann, H., Scott, C. (2020) Efficacy of an organophosphorus hydrolase enzyme (OpdA) in human serum and minipig models of organophosphorus insecticide poisoning. *Clinical toxicology*. 58(5): 397-405.
- Eddleston, M., Eyer, P., Worek, F., Sheriff, M.H., Buckley, N.A. (2008) Predicting outcome using butyrylcholinesterase activity in organophosphorus pesticide self-poisoning. *Quarterly Journal of Medicine*. 101(6): 467-74.
- Eddleston, M., Eyer, P., Worek, F., Mohamed, F., Senarathna, L., Von Meyer, L., Juszczak, E., Hittarage, A., Azhar, S., Dissanayake, W., Sheriff, M.H. R., Szinicz, L., Dawson, A.H., Buckley, N.A. (2005) Differences between organophosphorus insecticides in Human self-poisoning: A prospective cohort study. *Lancet*. 366(9495): 1452-1459.
- Eddleston, M., Konradsen, F., Gunnell, D., Phillips, M.R., Chang, S., Padmanathan, P., Mew, E.J. (2017) The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006-15: Systematic review. *Journal of Affective Disorders*. Elsevier B.V., 219(5): 93-104.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., Feather-Stone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7: 88-95.
- Erdmann, W., von Clarmann, M. (1963) Ein neuer Esterase-Reaktivator für die Behandlung von Vergiftungen mit Alkylphosphaten. *Dtsch med Wschr*. 88: 2201-2206.
- Escher, B. (2021) Protein-Engineering katalytischer Bioscavenger zur Detoxifizierung phosphororganischer Verbindungen. *Thesis*. Technische Universität München. Verfügbar unter: <http://mediatum.ub.tum.de/?id=1608980>.
- Eto, M. (1974) *Organophosphorus Pesticides: Organic and biological Chemistry*. Cleveland, Ohio; USA: CRC Press, Inc..
- Eyer, P.A., Worek, F. (2007) Oximes. In: Marrs, T.C., Maynard, R.L., Sidell, F.R. (Hrsg.) *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment (2nd Edition)*. John Wiley&Sons, Ltd., S. 305-329.
- Eyer, P., Worek, F., Thiermann, H., Eddleston, M. (2010) Paradox findings may challenge orthodox reasoning in acute organophosphate poisoning. *Chem Biol Interact*. 187(1-3): 270-8.
- Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E. (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: Reassessment. *Analytical Biochemistry*. 312: 224-227.
- Eyer F., Eyer, P. (1998) Enzyme-based assay for quantification of paraoxon in blood of parathion poisoned patients. *Human Exp Toxicol*. 17: 645-51.
- Forget, G. (1991) Pesticides and the Third World. *J Toxicol Environ Health*. 32(1): 11-31.

- Forsberg, A., Puu, G. (1984) Kinetics for the inhibition of acetylcholinesterase from the electric eel by some organophosphates and carbamates. *Eur J Biochem.* 140(1):153-6.
- Franklin, M.C., Rudolph, M.J., Ginter, C., Cassidy, M.S., Cheung, J. (2016) Structures of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase reveal perturbations of the acyl loop and the dimer interface. *Proteins.* 84(9):1246-56.
- Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Baumgartner, W., Pétenyi, M., Burgis, H., Lindorf, H., Metzner, H. (1972) Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-Systems in menschlichen Seren. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 353(1): 217-220.
- Gordon, J., Leadbeater, L., Maidment, M. (1978) The protection of animals against organophosphate poisoning by pretreatment with a carbamate. *Toxicol Appl Pharmacol*, 43: 207-16.
- Gould, C., Folb, P. (2002) *Project Coast : Apartheid ' s Chemical and Biological Warfare Programme*. Herausgegeben von R. Berold. Geneva, Switzerland: United Nations Publication.
- Hahn, A., Begemann, K., Burger, R., Hillebrand, J., Meyer, H., Preußner, K. (2009) *Ärztliche Mitteilungen bei Vergiftungen 2009*. Verfügbar unter: http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2007/20/aerztliche_meldepflicht_bei_vergiftungen_bleibt_auch_unter_europaischem_chemikalienrecht_reach_erhalten-10316.html.
- Hatfield, M.J., Umans, R.A., Hyatt, J.L., Edwards, C.C., Wierdl, M., Tsurkan, L., Taylor, M.R., Potter, P.M. (2016) Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chemico-biological interactions.* 259(Pt B): 327-331.
- Herkert, N.M., Eckert, S., Eyer, P., Bumm, R., Weber, G., Thiermann, H., Worek, F. (2008) Identical kinetics of human erythrocyte and muscle acetylcholinesterase with respect to carbamate pre-treatment, residual activity upon soman challenge and spontaneous reactivation after withdrawal of the inhibitors. *Toxicology.* 246(2-3): 188-192.
- Herkert, N.M., Aurbek, N., Eyer, P., Thiermann, H., Worek, F. (2010) Comparative study of oxime-induced reactivation of erythrocyte and muscle AChE from different animal species following inhibition by sarin or paraoxon. *Toxicol Lett.* 194(3): 94-101.
- Herkert, N.M., Freude, G., Kunz, U., Thiermann, H., Worek, F. (2012) Comparative kinetics of organophosphates and oximes with erythrocyte, muscle and brain acetylcholinesterase. *Toxicol Lett.* 209(2):173-8.
- Herkert, N.M., Lallement, G., Clarençon, D., Thiermann, H., Worek, F. (2009) Comparison of the oxime-induced reactivation of rhesus monkey, swine and guinea pig erythrocyte acetylcholinesterase following inhibition by sarin or paraoxon, using a perfusion model for the real-time determination of membrane-bound acetylcholinesterase. *Toxicology.* 258(2-3):79-83.
- Houzé, P., Berthin, T., Raphalen, J.H., Hutin, A., Baud, J.F. (2018) High Dose of Pralidoxime Reverses Paraoxon-Induced Respiratory Toxicity in Mice. *Turkish journal of anaesthesiology and reanimation.* 46(2): 131-138.

- Hülsmann, O. D. oec. troph. (2009) Effekte einer Nährstoffkombination auf Parameter des antioxidativen Stoffwechsels bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko. *Thesis*. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
- Jackson, C.J., Carville, A., Ward, J., Mansfield, K., Ollis, D.L., Khurana, T., Bird, S.B. (2014) Use of OpdA, an organophosphorus (OP) hydrolase, prevents lethality in an African green monkey model of acute OP poisoning. *Toxicology*. 317: 1-5.
- Jeyaratnam, J., Maroni, M. (1994) Organophosphorous Compounds. *Toxicology*. 91(1): 15-27.
- Kiderlen, D., Eyer, P., Worek, F. (2005) Formation and disposition of diethylphosphoryl-obidoxime, a potent anticholinesterase that is hydrolyzed by human paraoxonase (PON1). *Biochemical Pharmacology*. 69: 1853-1867.
- Kitz, R., Ginsburg, S., Wilson, I. (1965) Activity-structure relationships in the reactivation of diethylphosphoryl acetylcholinesterase by phenyl-1-methyl pyridinium ketoximes. *Biochem Pharmacol*. 14: 1471-1477.
- Kul, A., Uzkeser, H., Ozturk, N. (2017) Paraoxonase and Arylesterase Levels in Behcet's Disease and Their Relations with the Disease Activity. *Biochem Genet*. 55(4): 335-344.
- Kwong, T.C. (2002) Organophosphate pesticides: Biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*. 24(1): 144-149.
- La Du, B.N. (1988) Invited Editorial : The Human Serum Paraoxonase / Arylesterase Polymorphism. *Am. J. Hum. Genet*. 43: 227-229.
- Laumann, V., Weber, C. (ohne Datum) Pestizide und Gesundheitsgefahren Daten und Fakten. *Pestizid Aktions-Netzwerk e.V.*
- Lian, J., Nelson, R., Lehner, R. (2018) Carboxylesterases in lipid metabolism: from mouse to human. *Protein & cell*. 9(2): 178-195.
- Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E.G., Masson, P., Lockridge, O. (2005) Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem Pharmacol*. 70(11): 1673-84.
- Li, W.F., Furlong, C.E., Costa, L.G. (1995) Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett*. 76(3): 219-26.
- Lotti, M. (2001) Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. In: Krieger, R. (Hrsg.) *Handbook of pesticide toxicology*. San Diego: Academic Press Inc, S. 1043-1085.
- Luo, C., Saxena, A., Smith, M., Garcia, G., Radić, Z., Taylor, P., Doctor, B.P. (1999) Phosphoryl oxime inhibition of acetylcholinesterase during oxime reactivation is prevented by edrophonium. *Biochemistry*. 38(31): 9937-47.
- Lüttringhaus, A., Hagedorn, I. (1964) Quartäre Hydroxyiminomethyl-pyridiniumsalze. Das Dichlorid des Bis-[4-hydroxyiminomethyl-pyridinium-(1)-methyl]-äthers (,LüH6'), ein neuer Reaktivator der durch organische Phosphorsäureester gehemmten Acetylcholin-Esterase. *Arzneim Forsch*. 14: 1-5.

- Mackenzie Ross, S.J., Brewin, C.R., Curran, H.V., Furlong, C.E., Abraham-Smith, K.M., Harrison, V. (2010) Neuropsychological and psychiatric functioning in sheep farmers exposed to low levels of organophosphate pesticides. *Neurotoxicology and teratology*. 32(4): 452-459.
- Mackness, M., Mackness, B. (2015) Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene*. 567(1): 12-21.
- Marrero-Rosado, B.M., Stone, M.F., de Araujo Furtado, M., Schultz, C.R., Cadieux, C.L., Lumley, L. A. (2021) Novel Genetically Modified Mouse Model to Assess Soman-Induced Toxicity and Medical Countermeasure Efficacy: Human Acetylcholinesterase Knock-in Serum Carboxylesterase Knockout Mice. *International journal of molecular sciences*, 22(4): 1893.
- Mast, U. (1997) Reaktivierung der Erythrozyten-Acetylcholinesterase durch Oxime. *Thesis*. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Masuhr, K.F., Neumann, M. (2007) *Neurologie - Duale Reihe*. 6.Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Merck Co. Index (Hrsg.) (1983) *The Merck Index*. 10th ed. Rahway, New Jersey. USA.
- Maxwell, D.M., Brecht, K.M. (1991) The role of carboxylesterase in species variation of oxime protection against soman. *Neurosci Biobehav Rev*. 15(1): 135-9.
- Milosević, M.P. (1970) Acetylcholine content in the brain of rats treated with paraoxon and Obidoxime. *British journal of pharmacology*. 39(4): 732-737.
- Mortazavi, H., Omid-Ardali, H., Amini, S.A., Saffari-Chaleshtori, J., Samani, K.G. (2021) In vivo/in silico insight into the effect of titanium dioxide nanoparticle on serum paraoxonase 1 activity in rat. *J Biomol Struct Dyn*. 18:1-11.
- Namba, T. (1971) Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical Effects. *Bulletin of the World Health Organization*. 44(1-3): 289-307. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2428032/>.
- Napon, G., Dafferner, A.J., Saxena, A., Lockridge, O. (2018) Identification of Carboxylesterase, Butyrylcholinesterase, Acetylcholinesterase, Paraoxonase, and Albumin Pseudoesterase in Guinea Pig Plasma through Nondenaturing Gel Electrophoresis. *Comparative medicine*. 68(5): 367-374.
- National Center for Biotechnology Information, U.S.N.L. of M. (2004) Paraoxon C10H14NO6P. *PubChem*. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/paraoxon#section=Top> (Zugegriffen: 10. März 2019).
- O'Brien, R.D. (1960) *Toxic Phosphorus Esters - Chemistry, Metabolism and biological Effects*. New York: Academic Press Inc.
- Pereira, E.F., Aracava, Y., DeTolla, L.J.Jr., Beecham, E.J., Basinger, G.W.Jr., Wakayama, E.J., Albuquerque, E.X. (2014) Animal models that best reproduce the clinical manifestations of human intoxication with organophosphorus compounds. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 350(2): 313-321.

- Pestizid-Atlas (2022) Heinrich-Böll-Stiftung (Hrsg.). Verfügbar unter:
<https://www.spiegel.de/wissenschaft/natur/noch-nie-wurden-weltweit-mehr-pflanzenschutzmittel-eingesetzt-a-3d813c46-1c9f-4554-9322-2306073b476f>
- Rudakova, E.V., Boltneva, N.P., Makhaeva, G.F. (2011) Comparative analysis of esterase activities of human, mouse, and rat blood. *Bull Exp Biol Med.* 152(1): 73-5.
- Sax, N.I. and R.J. Lewis, S. (Hrsg.) (1987) *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. 11th ed. New York: Van Nostrand Reinhold Co.
- Schoene, K., König, A., Oldiges, H., Krügel, M. (1988) Pharmacokinetics and efficacies of obidoxime and atropine in paraoxon poisoning. *Arch Toxicol.* 61(5): 387-91.
- Shafferman, A., Ordentlich, A., Barak, D., Stein, D., Ariel, N., Velan, B. (1996) Aging of phosphorylated human acetylcholinesterase: Catalytic processes mediated by aromatic and polar residues of the active centre. *Biochemical Journal.* 318(3): 833-840.
- Shafferman, A., Ordentlich, A., Barak, D., Stein, D., Ariel, N., Velan, B. (1997) Aging of soman-acetylcholinesterase adducts: facts and models. *Biochem J.* 324: 996-998.
- Skrinjaric-Spoljar, M., Simeon, V., Reiner, E. (1973) Spontaneous reactivation and ageing of dimethylphosphorylated acetylcholinesterase and cholinesterase. *Biochim Biophys Acta.* 315: 363-369.
- Stark, I. (1984) Insektizide und Nervengase: Vergiftung und Therapie. *Chemie in unserer Zeit*, 18(3): 96-106.
- Stenzel, J. (2007) Einfluss des Paraoxonase-Phänotyps auf die Abbaugeschwindigkeit hochtoxischer Phosphoryloxime - Ein pharmakogenetischer Faktor, der die Wirksamkeit der Obidoxim-Therapie bei Organophosphat-Vergiftungen beeinflusst. *Thesis*. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Sterri, S.H., Fonnum, F. (2015) The role of carboxylesterases in therapeutic intervention of nerve gases poisoning. In: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. New York: Academic Press; S.1099-1106.
- Stigler, L., Köhler, A., Koller, M., Job, L., Escher, B., Potschka, H., Thiermann, H., Skerra, A., Worek, F., Wille, T. (2022) Post-VX exposure treatment of rats with engineered phosphotriesterases. *Arch Toxicol.* 96(2): 571-583.
- Suemizu, H., Kawai, K., Murayama, N., Nakamura, M., Yamazaki, H. (2018) Chimeric mice with humanized liver as a model for testing organophosphate and carbamate pesticide exposure. *Pest management science.* 74(6): 1424-1430.
- Szinicz, L., Worek, F., Thiermann, H., Kehe, K., Eckert, S., Eyer, P. (2007) Development of antidotes: problems and strategies. *Toxicology.* 233(1-3): 23-30.
- Talbot, B.G., Anderson, D.R., Harris, L.W., Yarbrough, L.W., Lennox, W.J. (1988) A comparison of in vivo and in vitro rates of aging of soman-inhibited erythrocyte acetylcholinesterase in different animal species. *Drug Chem Toxicol.* 11(3): 289-305.
- Thiermann, H., Eyer, P., Worek, F. (2010) Muscle force and acetylcholinesterase activity in mouse hemidiaphragms exposed to paraoxon and treated by oximes in vitro. *Toxicology.* 272(1-3): 46-51.

- Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, F., Worek, F., Eyer, P. (1999) Modern strategies in therapy of organophosphate poisoning. *Toxicol Lett.* 107: S. 233-239.
- Thompson, C., Gerdes, J., VanBrocklin, H. (2020) Positron emission tomography studies of organophosphate chemical threats and oxime countermeasures. *Neurobiol Dis.* 133: 1044-55.
- Trepel, M. (2004) *Neuroanatomie - Struktur und Funktion.* 3. Herausgegeben von U. & Fischer. München: Elsevier B.V.
- WHO (2018) The public health impact of chemicals: knowns and unknowns. Data addendum for 2016. Verfügbar unter: CC BY-NC-SA 3.0 IGO licence.
- WHO, Roberts, A. H. (2019) Life Expectancy and Causes of Death, World Health Statistics 2019: Monitoring health for the SDGs.
- WHO-IARC (2015) IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. Verfügbar unter: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/MonographVolume112.pdf>.
- Wille, T., Scott, C., Thiermann, H., Worek, F. (2012) Detoxification of G- and V-series nerve agents by the phosphotriesterase OpdA. *Biocatalysis and Biotransformation.* 30: 203-208.
- Wille, T., Thiermann, H., Worek, F. (2011) Development of New Oximes for the Treatment of Poisoning by Organophosphorus Compounds. *Wehrmedizinische Monatsschrift.* 12. Verfügbar unter: <https://wehrmed.de/humanmedizin/entwicklung-neuer-oxime-fuer-die-therapie-von-vergiftungen-durch-phosphororganische-verbindungen.html>
- Worek, F. (2004) In-vitro-Untersuchungen zu Interaktionen von Organophosphaten und Reaktivatoren mit Cholinesterasen als Basis für die Therapieoptimierung. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Worek, F., Diepold, C., Eyer, P. (1999a) Dimethylphosphoryl-inhibited human cholinesterases: Inhibition, reactivation, and aging kinetics. *Archives of Toxicology.* 73(1): 7-14.
- Worek, F., Aurbek, N., Wetherell, J., Pearce, P., Mann, T., Thiermann, H. (2008) Inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds: pig versus minipig acetylcholinesterase. *Toxicology.* 244(1): 35-41.
- Worek, F., Aurbek, N., Wille, T., Eyer, P., Thiermann, H. (2011) Kinetic analysis of interactions of paraoxon and oximes with human, Rhesus monkey, swine, rabbit, rat and guinea pig acetylcholinesterase. *Toxicol Lett.* 200(1-2): 19-23.
- Worek, F., Bäcker, M., Thiermann, H., Szinicz, L., Mast, U., Klimmek, R., Eyer, P. (1997) Reappraisal of indications and limitations of oxime therapy in organophosphate poisoning. *Hum Exp Toxicol.* 16(8): 466-72.
- Worek, F., Eyer, P., Szinicz, L. (1998) Inhibition, reactivation and aging kinetics of cyclohexylmethylphosphonofluoridate-inhibited human cholinesterases. *Arch Toxicol.* 72(9): 580-7.

- Worek, F., Kirchner, T., Bäcker, M., Szinicz, L. (1996) Reactivation by various oximes of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by different organophosphorus compounds. *Arch Toxicol.* 70(8): 497-503.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P. (1999b) Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta.* 288(1-2): 73-90.
- Worek, F., Reiter, G., Eyer, P., Szinicz L. (2002) Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Arch Toxicol.* 76(9): 523-9.
- Xu, G.Y., Lu, G.C., Chen, Y., Hua, Y.C., Zhu, S.M., Yang, Y.D. (2005) Monitoring the level of serum paraoxonase 1 activity in liver transplantation patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 4(2): 178-81.
- Ye, M., Beach, J., Martin, J.W., Senthilselvan, A. (2013) Occupational pesticide exposures and respiratory health. *International journal of environmental research and public health.* 10(12): 6442-6471.
- Zilker, T., Hibler, A. (1996) Treatment of severe parathion poisoning. In: Szinicz, L., Eyer, P., und Klimmek, R. (Hrsg.) *Role of Oximes in the Treatment of Anticholinesterase Agent Poisoning.* Heidelberg: Spektrum, S. 9-17.

Eidesstaatliche Versicherung

Ich, Gundruna Flux, geb. 06.06.1985, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Kinetische Untersuchungen der Acetylcholinesteraseaktivität im Blut und im Muskel von Mäusen in vitro - bei Hemmung der Enzymaktivität durch Paraoxonethyl, Reaktivierung durch Obidoxim, sowie Bestimmung der Aktivitäten von Paraoxonase und Arylesterase im Mausplasma“ selbstständig angefertigt, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass ich die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe.

Koblenz, den 05.12.2022

Gundruna Flux